



VERGLEICHENDE RÖNTGENSTRUKTUR- ANALYSEN VON NUKLEINSÄUREN

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

André Eichert

aus Staaken

2010

Diese Arbeit wurde in der Zeit von September 2008 bis Oktober 2010 unter der Leitung von Prof. Dr. V.A. Erdmann am Institut für Chemie und Biochemie der Freien Universität Berlin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Markus C. Wahl
2. Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann

Tag der Disputation: 16.12.2010

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung.....	1
1.1	Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse.....	1
1.1.1	Kristallisation und Kristalle	2
1.1.2	Röntgenstrukturanalyse	3
1.1.3	Struktureigenschaften von Nukleinsäuren	4
1.2	Weltraumkristallisation.....	6
1.2.1	Nichtkodierende RNA HAR1F	8
1.3	tRNA-Akzeptorstamm-Mikrohelices.....	10
1.3.1	Transfer-Ribonukleinsäuren.....	10
1.3.2	Wasser- und Ionenbindung durch Nukleinsäuren	12
1.3.3	Protein-Nukleinsäure-Komplexe	14
1.3.4	Bindung der tRNA ^{Ser} an die Seryl-tRNA-Synthetase.....	15
1.4	„Locked“ Nukleinsäuren.....	18
2	Aufgabenstellung.....	22
3	Material und Methoden.....	23
3.1	Konzentrationsbestimmung der RNA und Hybridisierung.....	23
3.2	Synthetisierung der ncRNA HAR1	24
3.2.1	Polymerasekettenreaktion.....	26
3.2.2	Gelelektrophorese	29
3.2.3	T7 <i>in vitro</i> -Transkription	30
3.2.4	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	32
3.2.5	Ethanol-fällung	32

3.2.6	Ribozyme	33
3.3	Kristallisation	35
3.3.1	Weltraumkristallisation	36
3.4	Röntgenstrukturanalyse.....	39
4	Ergebnisse	42
4.1	Kristallisationsversuche unter Mikrogravitationsbedingungen	43
4.2	tRNA ^{Arg} -Akzeptorstamm-Isoakzeptor RR-1660 aus <i>E.coli</i>	46
4.2.1	Kristallisation.....	46
4.2.2	Datensammlung und -prozessierung	47
4.2.3	Struktur und Eigenschaften.....	48
4.2.4	Hydratation der RNA und Liganden	51
4.3	tRNA ^{Ser} -Akzeptorstamm-Mikrohelix RS-1661.....	55
4.3.1	Kristallisation.....	55
4.3.2	Datensammlung und -prozessierung	56
4.3.3	Struktur und Eigenschaften.....	57
4.3.4	Hydratation der RNA und Liganden	59
4.4	Vergleich des tRNA ^{Ser} -Akzeptorstammes RS-1661 mit dem tRNA ^{Ser} - Isoakzeptor RS-1660 aus <i>E.coli</i>	64
4.4.1	Hydratation der RNAs	65
4.4.2	Magnesiumbindung.....	69
4.5	Bindung der tRNA ^{Ser} an die Seryl-tRNA-Synthetase	71
4.6	Struktur einer „locked“ Nukleinsäure	76
4.6.1	Datenaufnahme und -prozessierung.....	76
4.6.2	Struktur und Eigenschaften.....	77

4.6.3	Ligandenbindungsstellen	80
4.6.4	Hydratation der LNA	82
4.6.5	Vergleiche zwischen RNA, RNA/LNA-Hybrid und LNA.....	85
4.6.6	Thermostabilitätsvergleich	91
4.6.7	Vergleich mit anderen modifizierten Nukleinsäuren	92
5	Diskussion	94
	Zusammenfassung	105
	Summary	106
	Liste der verwendeten Referenzen	107
	Eigene Publikationen.....	120
	Danksagung	121
	Lebenslauf.....	123
	Anhang	125

1 EINLEITUNG

1.1 Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse

Im Jahr 1912 wurden durch Max von Laue, Walter Friedrich und Paul Knipping erstmalig Streuexperimente mit Röntgenstrahlen an Kristallen durchgeführt. Max von Laue wurde für diese Experimente und die daraus resultierenden Ergebnisse im Jahr 1914 mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet.

Obwohl bereits im Jahr 1934 das erste Diffraktionsbild eines Proteins aufgenommen werden konnte, dauerte es bis 1960 bis Max Perutz und John Kendrew die ersten Proteinstrukturen röntgenkristallographisch aufklärten. Perutz veröffentlichte in diesem Jahr die dreidimensionale Struktur des Hämoglobins (Perutz et al., 1960) und Kendrew die des Myoglobins (Kendrew et al., 1960); Proteine, die den Sauerstofftransport im Blut bzw. im Herz- und Skelettmuskel bei Säugetieren sicherstellen. Für ihre Arbeiten erhielten Perutz und Kendrew 1962 den Nobelpreis für Chemie.

Auf dem Gebiet der Röntgenkristallographie von Nukleinsäuren machten im Jahr 1953 James Watson und Francis Crick die wohl spektakulärste Entdeckung. Sie klärten die dreidimensionale Struktur der DNA-Doppelhelix auf (Watson et al., 1953a) und leiteten gleichzeitig genetische Implikationen, wie einen Replikationsmechanismus, daraus ab (Watson et al., 1953b). Beide Forscher wurden ebenfalls im Jahr 1962 für ihre Arbeit mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

Mittlerweile sind in der Proteindatenbank (Berman et al., 2000) fast 68.000 Strukturen hinterlegt. Davon sind ca. 63.000 Proteinstrukturen, 2.200 Nukleinsäurestrukturen und 2.800 Strukturen von Protein-Nukleinsäurekomplexen. 59.000 Strukturen wurden mittels Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt und 8.600 durch Nukleare Magnetresonanz-spektroskopie. Diese rasante Zunahme von Strukturen biologischer Makromoleküle hat auch das Verständnis für die Funktion dieser stark erweitert. So lassen sich durch das Wissen um die Struktur eines Moleküls bessere Aussagen über dessen Wirkungsweise und Wechselwirkungen mit anderen Biomolekülen oder Reaktionspartnern treffen. Außerdem ist nur durch das Wissen um die räumliche Struktur von Molekülen eine rationale Wirkstoffentwicklung möglich (Erdmann et al., 2008).

1.1.1 Kristallisation und Kristalle

Die Erzeugung von geordneten Einkristallen ist der kritische Schritt der Röntgenkristallographie. Da nicht vorhersagbar ist unter welchen Bedingungen eine Substanz kristallisiert, sind aufwendige Testverfahren notwendig, um die optimalen Bedingungen zur Erzeugung eines Einkristalls herauszufinden. Dazu werden verschiedene Parameter variiert, die das Kristallwachstum beeinflussen: die Konzentration der zu kristallisierenden Substanz, die Konzentration des Fällungsmittels, der pH-Wert, die Temperatur und verschiedene Additive. Auch weniger offensichtliche Bedingungen üben einen Einfluss auf das Kristallwachstum aus; dazu zählen die Reinheit der Probe, Konvektion, Vibrationen, auch durch Geräusche, und das Alter der Probe.

Ein Kristall ist eine dreidimensionale Anordnung von Atomen oder Molekülen in identischer Orientierung, die, abgesehen vom Diamant, durch nicht-kovalente Interaktionen zusammengehalten werden. Das kleinste Volumenelement eines Kristalls, das repräsentativ für den Gesamtkristall ist, stellt die Einheits- oder Elementarzelle dar. Die Elementarzelle ist durch sechs Parameter, die Gitterkonstanten, definiert. Es können sieben verschiedene Achsensysteme definiert werden, die sich durch die spezifischen Rahmenbedingungen für die Gitterkonstanten unterscheiden. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Gitterzentrierungen - primitiv (P), flächenzentriert (A, B, C, F) und innenzentriert (I) - können 14 Bravais-Gitter abgeleitet werden.

Die Elementarzelle kann durch Symmetrieelemente in asymmetrische Einheiten unterteilt werden, die im einfachsten Fall aus einem Molekül bestehen. Die Symmetrie einer Elementarzelle ist definiert durch die Raumgruppe. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass es insgesamt 230 mögliche Raumgruppen gibt. Allerdings sind durch den enantiomeren Aufbau von Nukleinsäuren bzw. Proteinen keine Spiegelsymmetrien erlaubt, so dass es für diese Moleküle nur 65 Raumgruppen gibt. Die periodische Anordnung der Elementarzellen im Kristall führt zu Ebenen, die gleichartig mit Atomen besetzt sind. Diese Netz- oder Gitterebenen sind mit konstantem Abstand d zueinander angeordnet und werden durch die Millerschen Indizes h , k und l beschrieben.

1.1.2 Röntgenstrukturanalyse

Treffen Röntgenstrahlen auf einen Kristall wird ein Teil der Strahlung an der Elektronenhülle der im Kristall befindlichen Atome bzw. Moleküle gestreut. Trifft Strahlung einer bestimmten Wellenlänge λ im Winkel θ auf einen Satz paralleler Ebenen mit den Indizes hkl und einem Ebenenabstand d_{hkl} und wird im gleichen Winkel abgestrahlt, entsteht ein diffraktierter Strahl, wenn θ die Bragg-Gleichung

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin \theta$$

erfüllt. Es kommt zu konstruktiver Interferenz der reflektierten Wellen aufeinanderfolgender paralleler Ebenen. Ziel der Röntgenstrukturanalyse ist es zunächst die Positionen und Intensitäten der diffraktierten Strahlen, der Reflexe, zu bestimmen.

Die Fouriertransformation erlaubt eine Fourier-Serie der Reflexe in eine Fourier-Serie der Elektronendichte zu konvertieren. Ziel ist es, die Funktion der Elektronendichte $\rho(x,y,z)$, deren Graph die Elektronendichtekarte des untersuchten Moleküls ist, zu berechnen. Zunächst werden die Strukturfaktoren kalkuliert. Ein Strukturfaktor F_{hkl} beschreibt einen diffraktierten Röntgenstrahl, der vom Detektor registriert wird und kann als Fourier-Serie dargestellt werden. Dabei gibt jeder Term den Beitrag eines einzelnen Atoms zum Reflex hkl an. Die folgende Gleichung zeigt einen einzelnen Term, der als atomarer Strukturfaktor f_{hkl} bezeichnet wird, und den Beitrag eines Atoms j zum Reflex hkl beschreibt:

$$f_{hkl} = f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}.$$

Da ein diffraktierter Strahl eine dreidimensionale Welle, der Summe der Beiträge aller Atome der Einheitszelle ist, ist der Strukturfaktor F_{hkl} einer Einheitszelle mit n Atomen die Summe aller atomaren Strukturfaktoren der einzelnen Atome. Der Strukturfaktor eines Reflexes wird durch die folgende Gleichung beschrieben:

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^n f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}.$$

Die Strukturfaktoren können auch als Summe der Beiträge der Elektronendichte von Volumenelementen der Einheitszelle beschrieben werden. Die Gleichung für die Elektronendichte ist die Fouriertransformation der Strukturfaktoren:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}.$$

F_{hkl} ist eine Wellenfunktion, die durch die drei Parameter Frequenz, Amplitude und Phase definiert ist. Die Intensität I_{hkl} eines Reflexes und die Position hkl des Reflexes sind direkt aus dem Diffraktionsmuster mess- oder berechenbar. Die Phase eines Strukturfaktors kann jedoch nicht direkt bestimmt werden. Dies ist das sogenannte Phasenproblem der Röntgenstrukturanalyse.

Dieses Problem kann durch den Einsatz von Schwermetallderivaten der nativen Kristalle gelöst werden. Aus der Differenz der Strukturfaktoren von nativem und derivatisiertem Kristall, errechnet sich indirekt die Lage der Schweratome aus der Patterson-Karte und es ist letztlich möglich Aussagen über den Phasenterm der Nukleinsäure oder des Proteins zu machen. Die klassische Methode ist Multipler Isomorpher Ersatz; dabei sind mindestens zwei Schwermetallderivate notwendig. Breite Anwendung findet auch die Anomale Dispersion, bei der ausgenutzt wird, dass bei der Wellenlänge, bei der die Schweratome die eingehende Strahlung absorbieren, Friedels Gesetz außer Kraft gesetzt wird.

Eine andere Methode ist die des Molekularen Ersatzes, die zur Strukturaufklärung während dieser Arbeit eingesetzt wurde. Dabei wird ein strukturell ähnliches Molekül als Suchmodell eingesetzt, dessen korrekte Position und Orientierung in der Elementarzelle durch Rotation und Translation bestimmt werden soll. Bei Übereinstimmung der berechneten mit den gemessenen Strukturfaktoren werden die mit Hilfe des Suchmodells gewonnenen Phasen als Startpunkt verwendet, um die Elektronendichtekarte des zu untersuchenden Moleküls zu berechnen.

1.1.3 Struktureigenschaften von Nukleinsäuren

Die Struktur eines Moleküls ist definiert durch die räumliche Anordnung seiner Atome. Diese wird zum einen durch Bindungslängen und Bindungswinkel und zum anderen durch Rotationen von Atomgruppen um diese Bindungen bestimmt. Der Furanosering von Nukleinsäuren kann 20 verschiedene Konformationen einnehmen, ohne dass alle Atome in einer Ebene liegen. In Nukleinsäuren sind allerdings fast ausschließlich die C3'-*endo*- oder die C2'-*endo*-Konformation anzutreffen. Diese

unterscheiden sich dadurch, dass bei einer Projektion der Zuckeratome C1', C4' und O4' auf eine Ebene entweder das C2'-Atom – C2'-endo – oder das C3'-Atom – C3'-endo – oberhalb dieser Ebene liegt.

Weiterhin gibt es sechs Torsionswinkel, die die Konformation des Zucker-Phosphat-Rückgrats eines Nucleotids festlegen: α , β , γ , δ , ϵ und ζ . Dazu kommt der Winkel χ , der die Orientierung der Base in Relation zur Ribose beschreibt. Die Winkel werden in der organischen Chemie und Biochemie in Klassen nach Klyne und Prelog eingeteilt. Dabei werden die Winkel mit *syn*, *anti*, *synclinal* und *anticlinal* bezeichnet. In wissenschaftlichen Veröffentlichungen kristallographischer Ergebnisse werden aber häufig die Bezeichnungen *cis*, *trans* und *gauche* verwendet (Saenger, 1984).

Daneben lässt sich die relative Bewegung eines Basenpaares in Bezug auf ein benachbartes Basenpaar durch helikale Parameter beschreiben. Diese sind definiert als drei Translationsparameter - die Ganghöhe, gleichbedeutend mit der Verschiebung entlang der z-Achse, die Verschiebung entlang der x-Achse, die Verschiebung entlang der y-Achse - und drei Winkel: Torsion, Rollwinkel und Kippwinkel. Eine Übersicht zeigt Abbildung 1.1.

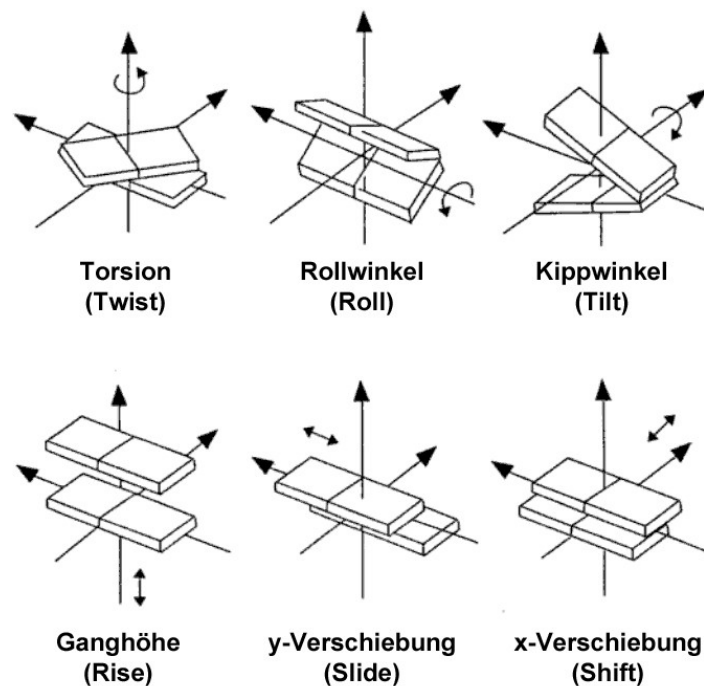


Abbildung 1.1: Helikale Parameter von Nucleinsäurestrukturen

Abbildung nach M. Daune (Daune, 1997)

Außerdem gibt es fünf Rotations- und fünf Translationsparameter, die die relative Bewegung einer Base in Bezug zur zweiten Base eines Basenpaares beschreiben. Die Rotationsparameter sind: Neigung (*tip*), Schräge (*inclination*), Öffnung (*opening*), helikale Torsion (*propeller twist*) und Knicken (*buckle*). Zu den Translationsparametern gehören: Verschiebung entlang der y-Achse (*slide*), Verschiebung entlang der x-Achse (*shift*), Stapelung (*stagger*), Dehnung (*stretch*) und Scherung (*shear*). Neigung, Schräge, Verschiebung entlang der x-Achse und Verschiebung entlang der y-Achse sind gleichgerichtete Parameter, d. h. die beiden Basen eines Basenpaares vollziehen eine Bewegung in die gleiche Richtung. Öffnung, helikale Torsion, Knicken, Stapelung, Dehnung und Scherung sind entgegengesetzte Parameter, bei denen die Bewegung der beiden Basen dementsprechend in entgegengesetzte Richtungen verläuft.

1.2 Weltraumkristallisation

Da es wie zuvor beschrieben nicht möglich ist, Vorhersagen über die Kristallisationsbedingungen einer Substanz zu machen, ist man auf systematisches Testen verschiedener Bedingungen angewiesen. Eine Möglichkeit die Kristallqualität zu verbessern, ist die Kristallisation unter Mikrogravitätsbedingungen im Weltraum. Das bietet den Vorteil eines räumlich ungerichteten Kristallwachstums, da der Kristall bei einer 10^3 - 10^6 -fach geringeren Gravitation als auf der Erdoberfläche in alle Raumrichtungen gleichmäßig wachsen kann. Außerdem sind im Weltraum Konvektionsströme innerhalb der Mutterlauge, Kristallsedimentation und ein „Umherschwimmen“ des Kristalls verringert, was Störungen und somit Fehler während der Kristallwachstums reduziert (Vergara et al., 2005).

Die Vorteile der Kristallisation im Weltraum wurden 1984 bei der Kristallisation von Lysozymkristallen an Bord eines Raumschiffs erstmalig gezeigt (Littke et al., 1984). Diese Experimente zogen aufgrund ihrer hohen Kosten und limitierter Flugmöglichkeiten schnell Kritik auf sich (Leberman, 1985). Allerdings zeigte sich, dass Kristallisationsexperimente unter Mikrogravitationsbedingungen einen wichtigen Beitrag leisten konnte zum besseren Verständnis des Kristallisationsprozesses und der Parameter, die die Kristallqualität bedingen (Vergara et al., 2003). Außerdem machten verschiedene Beispiele deutlich, dass im Weltraum gezüchtete Kristalle

durchaus einen Mehrwert für die Strukturbiologie haben (Han et al., 2004; Lorber, 2002; Miele et al., 2003). Diese Vorteile führten zum Einsatz eines supraleitenden Magneten, der Mikrogravitationsbedingungen für Kristallisationsexperimente auf der Erde simuliert (Wakayama et al., 2006). Eine vergleichende Auswahl verschiedener Moleküle, die im Weltraum und auf der Erde kristallisiert wurden zeigt Tabelle 1.1.

Tabelle 1.1: Beispiele für Strukturen im Weltraum kristallisierter Moleküle

Molekül	Organismus	Molekulargewicht (kDa)	Auflösung (g) (Å)	Auflösung (µg) (Å)	PDB-Code
(Pro-Pro-Gly) ₁₀	synthetisch	8	1,8	1,3	1K6F ¹
Lysozym	<i>Gallus gallus</i>	14	1,3	0,9	194L, IBWJ, 1IEE ²
Apocrustacyanin C1	<i>Homarus gammarus</i>	20	2,0	1,9	1OBQ ³
Thaumatococin	<i>Thaumatococcus daniellii</i>	22	1,7	1,2	1KWN ⁴
Collagenase	<i>Hypoderma lineatum</i>	25	1,8	1,7	2HLC ⁵
Proteinase K	<i>Tritirachium album</i>	45	1,3	1,0	1IC6 ⁶
Aspartyl-tRNA-Synthetase	<i>Thermus thermophilus</i>	132	2,4	2,0	1LOW ⁷
Canavalin	<i>Canavalia ensiformis</i>	142	2,6	1,7	1DGW ⁸

Quellen: 1: (Berisio et al., 2002), 2: (Dong et al., 1999; Sauter et al., 2001; Vaney et al., 1996), 3: (Habash et al., 2003), 4: (Sauter et al., 2002), 5: (Broutin et al., 2000), 6: (Betz et al., 2001), 7: (Ng et al., 2002), 8: (Ko et al., 2001)

g – Gravitation; µg - Mikrogravitation

Ein gutes Beispiel für die Verbesserung von Röntgenkristallstrukturen unter Mikrogravitationsbedingungen ist die Aspartyl-tRNA-Synthetase aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermus thermophilus*. Dabei handelt es sich um ein Homodimer, dessen Untereinheiten aus je 580 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von $M_r \sim 66$ kDa bestehen (Poterszman et al., 1993). Die Struktur des Proteins wurde erstmalig 1994 bis zu einer Auflösung von 2,5 Ångström aufgeklärt (Delarue et al., 1994).

Die Kristallisation der tRNA-Synthetase im Weltraum führte zu größeren Kristallen als auf der Erde, die zudem weniger Oberflächendefekte aufwiesen. Aufgrund dieser Verbesserungen konnte die Auflösung bis auf 2,0 Ångström gesteigert werden. Dadurch wurden wesentlich bessere Ergebnisse im Bereich der Elektronendichtekarte des Rückgrats und der Seitenketten des Proteins erzielt, was auch mit einer größeren Anzahl von geordneten Solvensmolekülen einherging (Ng et al., 2002).

Auch für Nukleinsäuren konnten mit Hilfe von Weltraumkristallisationsversuchen Fortschritte erzielt werden. So wurden beispielsweise Kristalle der 5S rRNA unter Mikrogravitationsbedingungen gezüchtet (Lorenz et al., 2000) und die Struktur eines Racemates aus D- und L-Nukleinsäuren aufgeklärt (Rypniewski et al., 2006). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Qualität der Kristalle, die unter Mikrogravitationsbedingungen erzeugt wurden, im Vergleich zu Kristallen, die auf der Erde gewachsen waren, teilweise erheblich verbessert war. Dies zeigte sich in einer höheren Auflösung und einem besseren Verhältnis von Signal zum Hintergrund, die mit den Weltraumkristallen erzielt werden konnten (Rypniewski et al., 2006).

1.2.1 Nichtkodierende RNA HAR1F

Die nichtkodierende RNA (ncRNA) HAR1F (*human accelerated region*) aus Mensch und Schimpanse wird während der frühen Embryonalentwicklung im Neokortex exprimiert. Dabei handelt es sich um den Teil des Gehirns, der beim Menschen im Vergleich zu anderen Säugetieren stark vergrößert ist und in dem unter anderem die spezifisch menschlichen geistigen Fähigkeiten lokalisiert sind. Die ncRNA wird durch ein Gen kodiert, das die 118 Nukleotide (nt) große Region HAR1 auf dem menschlichen Chromosom 20 beinhaltet.

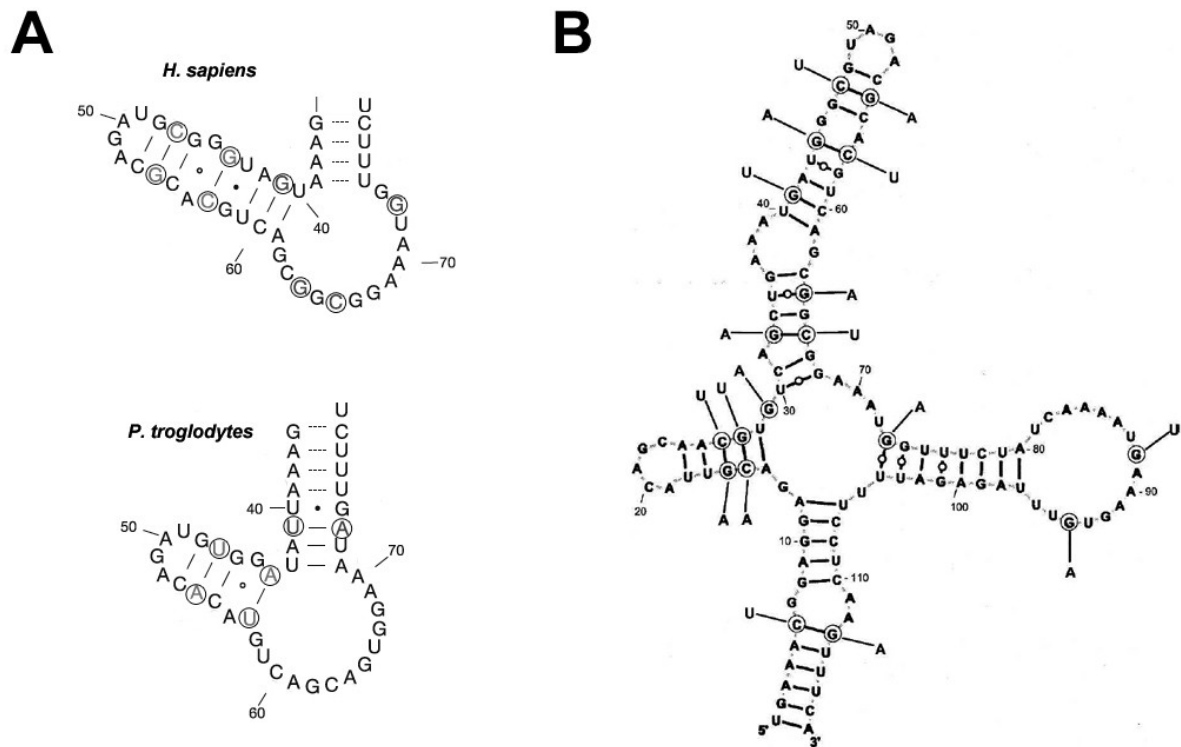


Abbildung 1.2: Sekundärstrukturmodelle der ncRNA HAR1

(A) zeigt die Sekundärstrukturen der veränderten HAR1-Domäne nach (Pollard et al., 2006). Markierte Nukleotide sind Stellen, die zwischen Mensch und Schimpanse Mutationen aufweisen. (B) zeigt die Sekundärstruktur der gesamten humanen HAR1-RNA nach (Beniaminov et al., 2008). Markierte Nukleotide stellen Mutationen dar. Die stattdessen in der HAR1-RNA des Schimpansen auftretenden Nukleotide sind neben der jeweiligen Markierung bezeichnet.

Diese Region ist in höheren Wirbeltieren konserviert und hat während der 310 Millionen Jahre dauernden Evolution vom Huhn zum Schimpansen nur zwei Basensubstitutionen erlebt. Aber seit der evolutionären Trennung des Menschen vom Schimpansen können für den Zeitraum von nur einer Million Jahren 18 Mutationen nachgewiesen werden. Dies entspricht einer 3.000-fach beschleunigten Evolution. Dadurch könnte diese ncRNA Teil der Antwort auf die Frage sein, was den Menschen vom Affen unterscheidet (Pollard et al., 2006).

Die Untersuchung von Pollard und Kollegen (Pollard et al., 2006) resümierte, dass es eine 44 nt große Domäne in beiden Molekülen gibt, in der sich durch Mutationen die größte Veränderung der Struktur ereignete. Eine Sekundärstrukturvorhersage dieser Domäne ist in Abbildung 1.2 (A) gezeigt. In einer nachfolgenden Untersuchung

wurde vermutet, dass die Domäne allein nicht ausreichend ist, um die Unterschiede zu erklären. Außerdem wurde ein Sekundärstrukturmodell für die gesamte ncRNA vorgeschlagen (Benjaminov et al., 2008). Dieses ist für die HAR1-RNA des Menschen in Abbildung 1.2 (B) dargestellt.

1.3 tRNA-Akzeptorstamm-Mikrohelices

1.3.1 Transfer-Ribonukleinsäuren

Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs) sind einzelsträngige Moleküle, welche aus 74 bis 94 Ribonukleotiden bestehen. Sie bilden intramolekulare Doppelstrangbereiche aus, was in der Sekundärstruktur zur charakteristischen Kleeblattform der Moleküle führt. Bereits 1955 vermutete Francis Crick in seiner „Adapter-Hypothese“, dass es ein Molekül geben muss, das den Vier-Buchstaben-Code der Nukleinsäuren mit dem 20-Buchstaben-Alphabet der Aminosäuren verbindet (Crick, 1955). Da eine tRNA das Anticodon enthält und spezifisch die entsprechende Aminosäure bindet, ist es das einzige Molekül, das den genetischen Code „kennt“ und damit zentraler Faktor der Proteinbiosynthese.

Die dreidimensionale Struktur einer kompletten tRNA konnte 1974 anhand der tRNA^{Phe} gleichzeitig von Alex Rich (Suddath et al., 1974) und Aaron Klug (Robertus et al., 1974) aufgeklärt werden. Die räumliche Struktur von tRNA-Molekülen nimmt die Form des Buchstaben „L“ ein. Abbildung 1.3 zeigt die Struktur einer tRNA am Beispiel der Hefe-tRNA^{Phe} (Shi et al., 2000). Dargestellt sind die Lage des Akzeptorstammes im tRNA-Molekül in direkter Nachbarschaft des CCA-Endes und in größtmöglicher Entfernung zum Anticodon, sowie die Sequenzen der während dieser Arbeit untersuchten Ribonukleinsäuren.

Ein wesentliches Element, das die Integrität des Informationsflusses während der Proteinbiosynthese gewährleistet, ist die fehlerlose Beladung der tRNAs durch die entsprechende Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS). Die meisten prokaryotischen Zellen besitzen 20 verschiedene aaRS; ein Enzym für jede Aminosäure. Nur in Ausnahmefällen enthalten Zellen zwei Formen einer Synthetase mit gleicher Aminosäurespezifität (Leveque et al., 1990). Diese zentralen Komponenten des Translationsapparates zeigen einen hohen Grad an Sequenz-, Struktur- und

Funktionshomologie über alle Reiche hinweg (Arnez et al., 1997; Carter, Jr., 1993; Cusack, 1993; Nagel et al., 1995). Es wird postuliert, dass tRNAs und aaRSs eine Koevolution durchlaufen haben. Für die tRNAs wird zudem angenommen, dass sie von einfachen Strukturen abstammen (Schimmel et al., 1993) und sich ausgehend von einem einzigen Vorfahren durch Genduplizierung und nachfolgende Mutationen entwickelt haben (Eigen et al., 1989; Jukes, 1995).

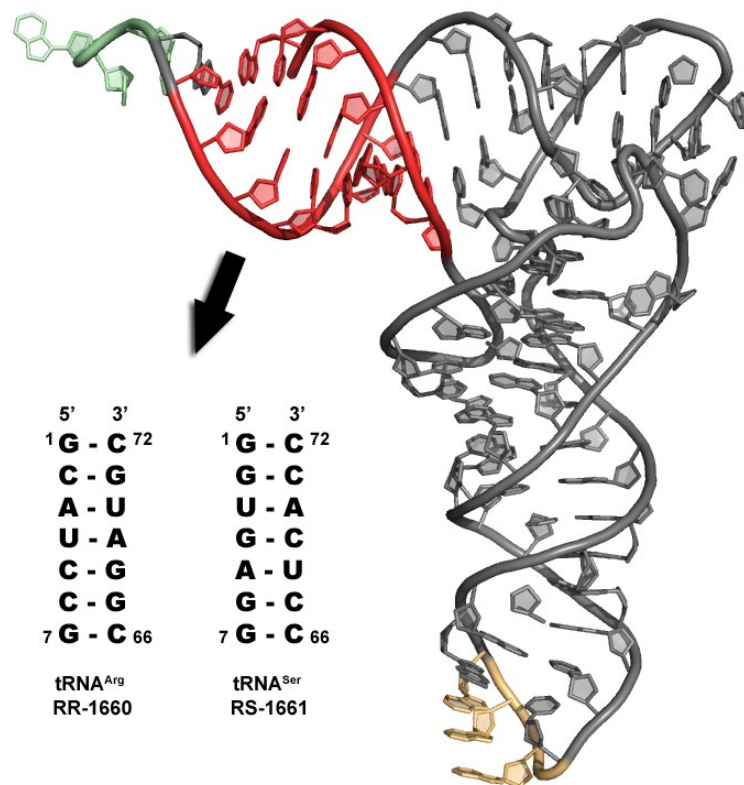


Abbildung 1.3: Struktur einer der Phenyl-tRNA aus Hefe

Der Akzeptorstamm ist rot hervorgehoben, das CCA-Ende ist grün und das Anticodon gelb dargestellt. Die Struktur hat den PDB-Eintrag: 1EHZ. Dargestellt sind die Sequenzen, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

Durch die Identifizierung von zwei konservierten nicht verwandten Sequenzmotiven wurde über Sequenzähnlichkeiten eine Einteilung der aaRS in zwei Klassen vorgenommen (Eriani et al., 1990). Röntgenkristallographische Untersuchungen unterstützten die Sicht, dass es praktisch keine strukturellen Gemeinsamkeiten zwischen den beiden aaRS-Klassen gibt (Cavarelli et al., 1993; Cavarelli et al., 1994;

Cusack, 1995; Rould et al., 1989). So sind sich Synthetasen mit gleicher Aminosäurespezifität, unabhängig von ihrem Herkunftsorganismus, immer ähnlicher als Synthetasen aus dem gleichen Organismus mit unterschiedlicher Aminosäurespezifität (Nagel et al., 1991). Davon abgeleitet wurden die tRNA/aaRS-Systeme in zwei Gruppen unterteilt: Klasse I- und Klasse II-Systeme (Eriani et al., 1990).

Klasse I-Systeme zeichnen sich durch komplexe tRNA-Identitätsmerkmale aus, die über verschiedene Regionen der tRNA verteilt sind und häufig das Anticodon beinhalten. Klasse I-Synthetasen katalysieren die Verknüpfung der Aminosäure an das 2'-OH-Ende der endständigen Ribose der tRNA. Im Gegensatz dazu wird die Aminosäure im Klasse II-System an die 3'-OH-Gruppe der endständigen Ribose der tRNA gebunden. Die Erkennung der tRNA durch die Synthetase funktioniert hier über nur wenige, relativ einfache Identitätsmerkmale, die zumeist im Akzeptorstamm der tRNA lokalisiert sind (Eriani et al., 1990). Am Beispiel einer Alanyl-tRNA konnte gezeigt werden, dass im einfachsten Fall für die korrekte tRNA-Erkennung nur ein einziges Basenpaar notwendig ist (Hou et al., 1988).

Diese Konzentration der tRNA-Identitätselemente macht tRNA-Akzeptorstamm-Mikrohelicen des Klasse II-Systems für hochauflösende Strukturuntersuchungen interessant. Dadurch ist es möglich tiefere Einblicke in die Bindung von Liganden und Wassermolekülen zu bekommen, als es bei niedriger aufgelösten Strukturen ganzer tRNAs oder tRNA/aaRS-Komplexe möglich ist.

1.3.2 Wasser- und Ionenbindung durch Nukleinsäuren

Wassermoleküle sind nicht nur ein integraler Bestandteil von Nukleinsäurestrukturen (Westhof, 1988), sondern auch Teil von Komplexen zwischen Nukleinsäuren und Proteinen (Shakked et al., 1994) bzw. kleinen Liganden (Wang et al., 1987). Es wurde auch vorgeschlagen, dass geordnete Wassermoleküle eine Rolle bei der Bestimmung der Identität von tRNAs haben (Rould et al., 1989).

Die Hydratation von Nukleinsäuren ist von entscheidender Bedeutung bei der Interaktion mit biologischen Makromolekülen, da die Hydrathülle die erste Kontaktstelle zwischen zwei Molekülen darstellt (Draper, 1999). Gleichzeitig kann die

Hydrathülle eine stabilisierende Wirkung auf die Konformation von Oligonukleotid-Doppelhelices ausüben (Sundaralingam et al., 2002). Dabei ist die Bindung von Wassermolekülen an Nukleinsäuren an die Wasserstoffakzeptoren und –donoren der Basen, Zucker und Phosphatgruppen geknüpft. Unterschiede im Muster dieser Wasserstoffbrückenakzeptoren und –donoren führen zu unterschiedlichen Hydratationsmustern, was mit der Beschreibung von 31 verschiedenen Wasserstoffbrückenbindungsmustern der fünf RNA- und DNA-Basen deutlich wird (Pan et al., 1999). Diese werden noch komplexer durch die Möglichkeit von C-H-Wasserstoffen an C-H \cdots O- (Wahl et al., 1996; Wahl et al., 1997) bzw. C-H \cdots N-Wasserstoffbrücken (Mitra et al., 2000) teilzunehmen.

Die Watson-Crick-Basenpaare G-C und A-U sind von jeweils acht Wassermolekülen umgeben. Davon befinden sich drei in der kleinen und fünf in der großen Furche, wobei die Hydratation von A-U-Basenpaaren diffuser ist (Auffinger et al., 1998). Besonders die Hydratation in der kleinen Furche unter Einbeziehung der 2'-OH-Gruppe ist nahezu immer detektierbar, auch bei Basenfehlpaarungen und in tRNAs (Westhof et al., 1988).

Ionen, insbesondere Magnesiumionen (Mg²⁺), haben wesentlichen Anteil an Struktur und Funktion von RNA-Molekülen. Beispielsweise sind sie für die katalytische Funktion von Ribozymen essentiell (Cech et al., 1986; Dahm et al., 1991). Außerdem sind sie für die Faltung von RNA-Molekülen in ihre dreidimensionale Struktur von Bedeutung, da die starke negative Ladung eines RNA-Moleküls seiner Faltung in eine kompakte Struktur entgegenwirkt. Positiv geladene Ionen reduzieren die Abstoßung zwischen den negativ geladenen Phosphatgruppen. So wurde bereits vor über 30 Jahren bei Untersuchungen zur Faltung von tRNAs festgestellt, dass millimolare Konzentrationen von Magnesiumionen einen besonders starken Effekt auf die Faltung von RNA-Molekülen haben (Cole et al., 1972; Romer et al., 1975; Stein et al., 1976).

In einer Lösung befindliche monovalente Ionen sind auch in Anwesenheit doppelsträngiger DNA hydratisiert (Braunlin, 1995). Diese Ionen werden entweder als „diffuse Ionen“ oder als „Ionenatmosphäre“ bezeichnet. Diffuse Ionen tragen durch ihr Verhalten zur Stabilität von Nukleinsäurestrukturen bei, indem sie auch über größere

Distanzen negative Ladungen des Phosphatrückgrats elektrostatisch kompensieren, ohne jedoch direkt an die Nukleinsäure gebunden zu sein (Draper, 2004).

Auch Magnesiumionen sind Teil dieser Ionenatmosphäre im Umfeld von Nukleinsäuren. Aber im Gegensatz zu monovalenten Ionen können teilhydratisierte Mg^{2+} -Ionen direkt mit doppelsträngiger DNA oder RNA assoziiert sein (Kankia et al., 1999). Beispielsweise konnten für die große ribosomale Untereinheit, deren ribosomale RNAs ~3000 nt umfassen, ~60 direkt gebundene Magnesiumionen nachgewiesen werden (Klein et al., 2004). Daher stellt sich die Frage inwieweit die diffusen Ionen zur Stabilität von Nukleinsäurestrukturen, insbesondere zur nativen Struktur von tRNAs, beitragen oder ob es konkrete Magnesiumbindungsstellen gibt, die für die Stabilisierung der tRNA-Tertiärstruktur verantwortlich sind (Schimmel et al., 1980). Eine Untersuchung am purinbindenden *A-Riboswitch* zeigte, dass zur korrekten Faltung der RNA sowohl die über größere Distanzen wirkende Ionenatmosphäre als auch die Bindung von Magnesiumionen an konkrete Bindungsstellen beitragen (Leipply et al., 2010).

1.3.3 Protein-Nukleinsäure-Komplexe

Obwohl es viele Untersuchungen zu Protein-Protein- und Protein-DNA-Interaktionen gibt, stecken die Untersuchungen von Protein-RNA-Komplexen noch in den Anfängen. Dies liegt vor allem daran, dass die Anzahl veröffentlichter Komplexstrukturen erst seit Beginn des Jahrzehnts stark ansteigt. Dadurch haben die ersten vergleichenden Studien eine relativ dünne Datengrundlage (Allers et al., 2001; Cusack, 1999; Draper, 1999; Jones et al., 2001; Treger et al., 2001). Die späteren Untersuchungen stützen sich auf größere Datenmengen (Baker et al., 2007; Ellis et al., 2007; Jeong et al., 2003; Kim et al., 2006; Lejeune et al., 2005; Morozova et al., 2006), bilden aber noch immer nicht die gesamte Komplexität von Protein-RNA-Komplexen in lebenden Organismen ab.

Die Studien zeigen, dass dem Zucker-Phosphat-Rückgrat und der 2'-OH-Gruppe der Ribose eine besondere Bedeutung bei der Erkennung von RNA durch Proteine zukommt. Die basenspezifischen Kontakte stellen nur 31% der Protein-RNA-Wasserstoffbrücken dar (Bahadur et al., 2008). Allerdings gibt es nur eine Untersuchung, die sich auf die Beteiligung der Wassermoleküle an der Schnittstelle

von Protein-RNA-Komplexen bezieht (Sonavane et al., 2009). Diese beschreibt Höhlen an der Grenzfläche zwischen Protein und RNA in Komplexen und den Beitrag von Wassermolekülen an der Bindung.

Bei Protein-Protein-Interaktionen bilden sich durch Unregelmäßigkeiten der Oberflächenkomplementarität oft Höhlen an der Schnittstelle der beiden interagierenden Moleküle (Hubbard et al., 1994a). Höhlen stellen Defekte in der Proteinstruktur dar (Connolly, 1986; Hubbard et al., 1994b) und sind oft mit Wassermolekülen ausgefüllt (Rashin et al., 1986; Williams et al., 1994). Die Wassermoleküle haben dabei eine stabilisierende Wirkung, indem sie die Destabilisierungen kompensieren, die durch verringerte Van-der-Waals-Interaktionen und verminderte hydrophobe Zusammenlagerungen im Bereich dieser Höhlen auftreten (Takano et al., 2003).

Die Oberflächenkomplementarität von Protein-Nukleinsäure-Komplexen ist nur halb so effizient wie in Protein-Protein-Komplexen (Sonavane et al., 2009). Dies erhöht die Notwendigkeit der Anwesenheit von Wassermolekülen. Es wurde analysiert, dass bei Protein-DNA-Komplexen 37% der Wassermoleküle in Kontakt sowohl mit der DNA, als auch mit dem Protein stehen, während 55% der Wassermoleküle Interaktionen mit nur einem der beiden Makromoleküle eingehen. Für RNA-Protein-Komplexe stehen 16% der Wassermoleküle in Kontakt mit beiden Makromolekülen und 73% interagieren entweder nur mit der RNA oder dem Protein. Die restlichen Wassermoleküle liegen ungeordnet vor und füllen Leerstellen in den Strukturen auf (Sonavane et al., 2009). Das bedeutet, dass die Mehrheit der in den Schnittstellen von Protein-Nukleinsäure-Komplexen gebundenen Wassermoleküle zur Solvatisierung der beteiligten Makromoleküle beitragen und nur eine Minderheit direkt am Bindungsverhalten der Interaktionspartner beteiligt ist.

1.3.4 Bindung der tRNA^{Ser} an die Seryl-tRNA-Synthetase

Die Seryl-tRNA-Synthetase (SerRS) katalysiert in einer Zwei-Schritt-Reaktion die Bindung der Aminosäure Serin an die endständige 3'-OH-Gruppe der tRNA. Im ersten Schritt wird die Aminosäure durch ATP aktiviert. Das dabei entstandene Aminoacyl-Adenylat wird dann im zweiten Schritt an das CCA-Ende der tRNA gebunden.

Die tRNA^{Ser} und die zugehörige Seryl-tRNA-Synthetase gehören zum Klasse II-System (Eriani et al., 1990; Giege et al., 1998). Die Identitätselemente sind also vornehmlich im Akzeptorstamm lokalisiert und umfassen die Basenpaare A3-U70, G2-C71 und das Nukleotid C72. Daneben benötigt die Synthetase zur fehlerfreien Erkennung der tRNA auch die Diskriminatorbase G73 und das Basenpaar C11-G24 im D-Stamm (Normanly et al., 1986; Normanly et al., 1992; Schimmel, 1987). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die SerRS an den Positionen 4-69 und 5-68 Purin-Pyrimidin-Basenpaare präferiert (Saks et al., 1996). Darüber hinaus ergaben *Footprinting*-Analysen, dass die SerRS mit den Basen 67, 68, 69 und 70 des Akzeptorstammes Kontakte ausbildet (Schatz et al., 1991).

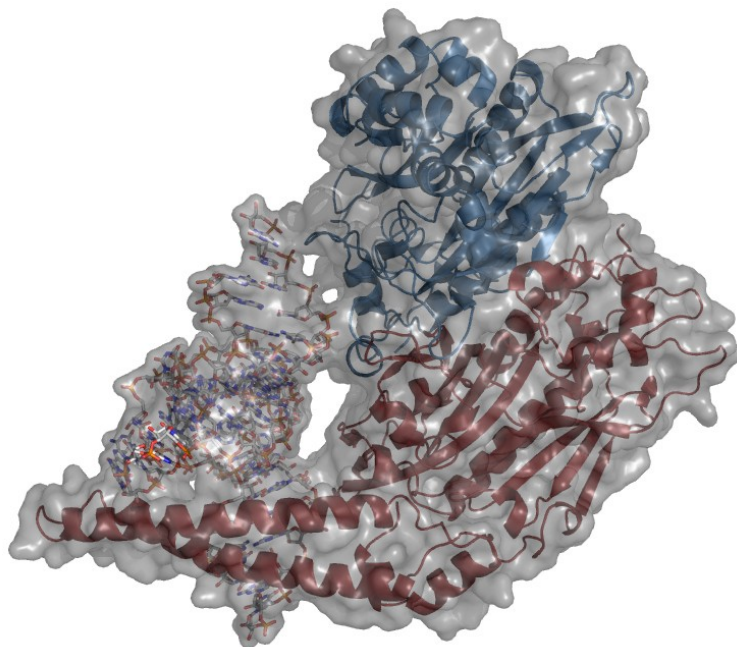


Abbildung 1.4: Struktur der Seryl-tRNA-Synthetase im Komplex mit der tRNA^{Ser}

Die beiden Untereinheiten der Synthetase sind blau und rot dargestellt. Beide Untereinheiten stehen in Kontakt mit der tRNA. PDB-Eintrag: 1SER. Die tRNA^{Ser} (links) bindet gleichzeitig an beide Untereinheiten des Proteins.

Zu Beginn der 1990er Jahre wurden die dreidimensionalen Strukturen der Seryl-tRNA-Synthetase aus *T. thermophilus* (Fujinaga et al., 1993) und *E. coli* (Cusack et al., 1990) jeweils bei einer Auflösung von 2,5 Ångström aufgeklärt. Die Primärstrukturen beider Enzyme weisen eine Ähnlichkeit von nur 34% auf. So

besteht das Enzym aus *T. thermophilus* aus 421 Aminosäuren, während die Synthetase aus *E. coli* 430 Bausteine aufweist. Jedoch sind die dreidimensionalen Strukturen sehr ähnlich (Fujinaga et al., 1993). Die SerRS aus *E. coli* besteht zu 40% aus α -Helix- und zu 20% aus β -Faltblattbereichen. Es handelt sich bei dem Protein um ein α 2-Homodimer, welches zwei tRNA-Moleküle simultan binden kann (Price et al., 1993; Yaremchuk et al., 1992). Charakteristische Bestandteile sind der helikale Arm und die globuläre Domäne.

Mittels Röntgenstrukturanalyse wurde 1994 erstmalig die Struktur einer Seryl-tRNA-Synthetase im Komplex mit einer tRNA^{Ser} aus *T. thermophilus* bei einer Auflösung von 2,9 Ångström aufgeklärt (Biou et al., 1994). Die Struktur ist in Abbildung 1.4 gezeigt. In weiten Bereichen sind die generellen Eigenschaften der Struktur, wie die beiden Dimere und die tRNA, gut aufgeklärt.

Die tRNA bindet an beide Untereinheiten der Synthetase, wobei der helikale Arm eine entscheidende Rolle in der Erkennung und Stabilisierung der Bindung spielt. Dies wurde auch durch eine Reihe biochemischer Experimente gezeigt, in denen sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryoten nachgewiesen wurde, dass die Interaktion des helikalen Arms der Synthetase mit dem langen variablen Arm der tRNA entscheidend für eine effiziente und spezifische Aminoacylierung der tRNA^{Ser} ist (Asahara et al., 1994; Asahara et al., 1993; Hasegawa et al., 1991; Wu et al., 1993).

Das Protein bildet mehr Kontakte mit dem Zuckerphosphatrückgrat der Nukleinsäure aus, als es Basen-spezifische Interaktionen gibt. Dies muss jedoch im Licht der Probleme gesehen werden, die die Struktur mit sich bringt. So ist der helikale Arm der Untereinheit 1, die mit dem Akzeptorstamm der tRNA in Verbindung steht, nicht sichtbar. Genauso wenig sichtbar ist mehr als ein Drittel der tRNA, wobei auch Bereiche des Akzeptorstammes fehlen. Daher wurden nur sieben direkte Kontakte zwischen der Synthetase und dem Akzeptorstamm in der Struktur detektiert. Eine Übersicht gibt Abbildung 1.5.

Eine Verbesserung wurde durch die Struktur eines ternären Komplexes erreicht. Diese besteht aus der Seryl-tRNA-Synthetase, der tRNA^{Ser} und einem Seryl-Adenylat-Analogon (Cusack et al., 1996). Die Auflösung betrug 2,7 Ångström, allerdings wurden durch die Anwesenheit des Sulfamoyl-Analogs des Seryl-Adenylats Konformationsänderungen der Synthetase beobachtet, die einen Zustand

der Synthetase nach der Aktivierung der Aminosäure widerspiegeln (Belrhali et al., 1994). Die Struktur wurde nicht in der Proteindatenbank veröffentlicht.

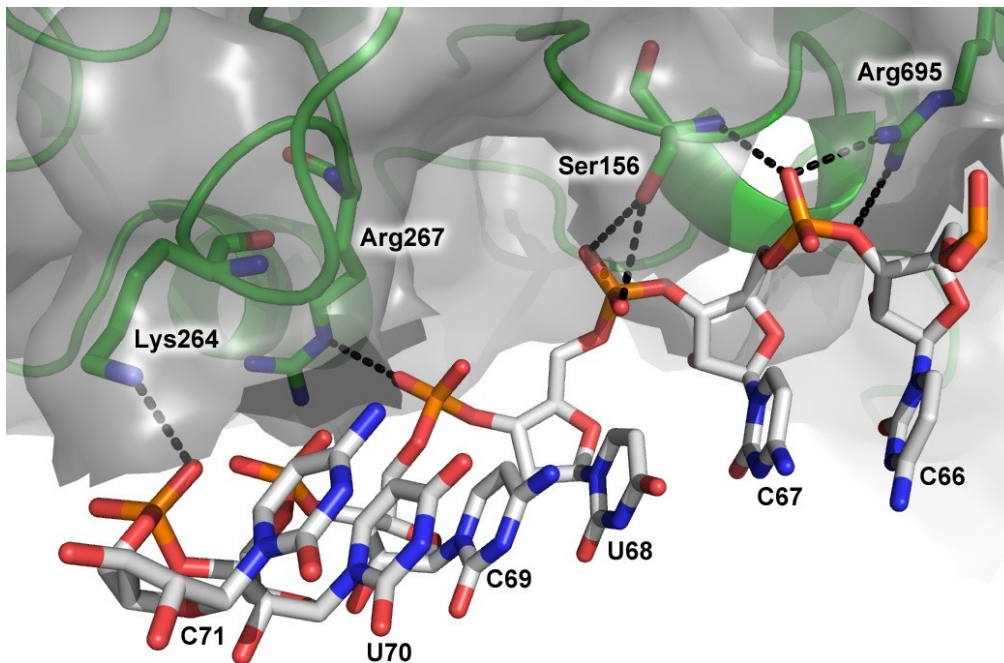


Abbildung 1.5: Bindung des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes an die Seryl-tRNA-Synthetase

Dargestellt sind die direkten Kontakte zwischen der SerRS und dem tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm, der Struktur mit dem PDB-Eintrag 1SER.

Weitere Einblicke in die Bindung des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes an die Synthetase konnten durch *Docking*-Experimente einer hochaufgelösten tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm-Mikrohelix (Förster et al., 2007a) an die Struktur der SerRS gewonnen werden (Förster et al., 2007b). Bei dieser Betrachtung wurden die nichtaufgelösten Bereiche des tRNA-Akzeptorstammes in der Komplexstruktur ausgeglichen, ohne allerdings die Hydratation der Nukleinsäure und deren Beitrag zur Bindung zu betrachten.

1.4 „Locked“ Nukleinsäuren

Da Nukleinsäuren zunehmend als hoffnungsvolle Wirkstoffklasse für den Einsatz als Therapeutika und Diagnostika wahrgenommen werden, konzentriert sich ein eigenes

Forschungsfeld auf die Aufgabe, die Stabilität natürlicher Nucleinsäuren zu erhöhen. Dies ist notwendig, da die Halbwertszeit von natürlichen Nucleinsäuren im Organismus nur wenige Sekunden beträgt, bis sie von Nucleasen abgebaut werden. Eine zusätzliche Limitierung natürlicher Nucleinsäuren ist ihre geringe Thermostabilität, die den Einsatz von kurzen Doppelsträngen oder Doppelstrangbereichen, wie sie beispielsweise für die Funktion von Aptameren essentiell sind, bei Umgebungstemperatur erschweren kann.

Für die Anwendung geeignete modifizierte Nucleinsäuren müssen aber trotzdem die Fähigkeit zur Watson-Crick-Basenpaarung aufweisen. Außerdem müssen sie die Bildung von Tertiärstrukturen zuzulassen, um mit RNA oder DNA-Bindungspartnern interagieren zu können. Deshalb wurden in den vergangenen Jahren große Anstrengungen unternommen, Nucleotid-Analogs zu entwickeln, die die positiven Eigenschaften modifizierter Nucleinsäuren mit der Konformation einer Standard-A-RNA vereinen. Dazu zählen 2'-alkylierte RNAs, wie die 2'-O-Methyl-RNA, die 2'-F-RNAs (Kawasaki et al., 1993), Phosphoramidat-RNAs und die „locked“ Nucleinsäurefamilie (Petersen et al., 2003).

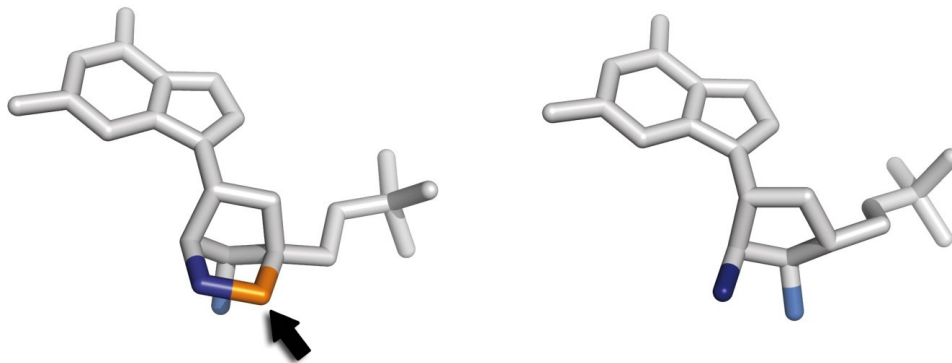


Abbildung 1.6: Vergleich des Guanodinucleotids der RNA mit dem LNA-Analogon

Links ist der LNA-Baustein mit der 2'-O-4'-C-Methylen-β-D-Ribofuranose-Modifikation, rechts das RNA-Nucleotid abgebildet. Die O_{2'}-Atome sind dunkelblau, die 3'-OH Gruppen hellblau hervorgehoben. Das Kohlenstoffatom der Methylenbrücke ist orange dargestellt.

„Locked“ Nucleinsäuren (LNAs) sind eine Klasse modifizierter bicyklischer Nucleinsäureanalogons, die von Ribonucleinsäuren abgeleitet sind und sich von

diesen durch eine Methylenbrücke zwischen dem Sauerstoffatom O2' und dem Kohlenstoffatom C4' der Ribose unterscheiden (Abbildung 1.6). Durch diesen Austausch der natürlich vorkommenden Ribose gegen eine 2'-O-4'-C-Methylen- β -D-Ribofuranose zeichnen sich LNAs durch eine stark gesteigerte Nukleaseresistenz aus. Zudem sind sie verglichen mit RNAs wesentlich thermostabiler. So führt der Einbau eines LNA-Bausteins in eine RNA-Doppelhelix zu einer Erhöhung des Schmelzpunktes um 2 – 10°C (Petersen et al., 2003). Das ist die größte Schmelzpunkterhöhung, die für modifizierte Nukleinsäuren beobachtet wurde, wie eine Studie durch Substitutionen von RNA-Bausteinen am Tenascin-C-Aptamer gezeigt hat (Schmidt et al., 2004). Dabei konnte folgende Reihenfolge der *in vitro*-Thermostabilität erstellt werden: 2'-F/2'OMe < RNA/RNA \leq 2'-OMe/2'-OMe < 2'-F/LNA < RNA/LNA < 2'-OMe/LNA < LNA/LNA.

Diese Eigenschaften machen LNAs interessant für therapeutische und diagnostische Anwendungen, weshalb sie bereits in vielen Bereichen der Nukleinsäureforschung zum Einsatz kommen. So werden LNAs beispielsweise eingesetzt, um die Spezifität, die Affinität und die Stabilität von Aptameren zu verbessern (Darfeuille et al., 2006; Schmidt et al., 2004). LNAs werden benutzt, um die Spezifität und die Reaktionseffizienz von DNAzymen zu steigern (Jakobsen et al., 2007; Vester et al., 2002). Sie finden Verwendung als molekulare Signalsysteme - *Molecular Beacons* - (Wang et al., 2005) und werden zur Transfektans-unabhängigen Einbringung von Oligonukleotiden in Zellen eingesetzt (Stein et al., 2010). Außerdem werden LNAs für *Antisense*- (Jakobsen et al., 2007; Wahlestedt et al., 2000) und *small interfering RNA* (siRNA)-Anwendungen benutzt (Braasch et al., 2003; Elmen et al., 2005). Ein weiteres Einsatzgebiet ist das *micro RNA* (miRNA) *silencing*, entweder direkt mittels LNAs als RNA-Antagonisten (Elmen et al., 2008) oder über LNAzyme (Jadhav et al., 2009). LNAs werden auch verwendet, um unter Ausnutzung der Schmelzpunkterhöhung verbesserte *in situ*-Hybridisierungen von RNAs durchzuführen (Thomsen et al., 2005; Wienholds et al., 2005).

Zur Aufklärung der Struktur von LNAs wurde bereits eine ganze Reihe von Untersuchungen durchgeführt. Diese hatten das Ziel bessere Aussagen zum Hybridisierungs- und Bindungsverhalten, sowie den Gründen für die hohe Thermostabilität machen zu können. Dabei konnten die Strukturen von Nukleinsäuren mit einzelnen LNA-substituierten Nukleotiden sowie LNA/DNA- und LNA/RNA-Hetero-

duplexstrukturen (Nielsen et al., 2004) aufgeklärt werden. Außerdem wurde eine Moleküldynamik-Simulation einer LNA-Duplexstruktur durchgeführt, die neben den Strukturuntersuchungen weitere Einblicke in die Thermodynamik und das Wasserbindungsverhalten der LNA erbrachte (Pande et al., 2008).

Strukturuntersuchungen mit 2'-O-4'-C-Methylen- β -D-Ribofuranose-LNA-RNA-Mixmeren, die an RNA-Einzelstränge hybridisiert waren, haben gezeigt, dass die Substitution einzelner RNA-Nukleotide durch LNA-Bausteine die Standard-A-RNA-Konformation in Doppelsträngen nicht verändert. Genausowenig führt der Einbau von einzelnen 2'-O-4'-C-Methylen- α -L-Ribofuranose-Einheiten in DNA-Doppelstränge zu einer Veränderung der Standard-B-DNA-Geometrie (Petersen et al., 2002; Vester et al., 2004). Ein ähnliches Bild zeigen Untersuchungen an Heteroduplexstrukturen, in denen jeweils ein Strang aus RNA oder DNA und der zweite Strang komplett aus der komplementären LNA besteht. Die A-RNA- bzw. B-DNA-Konformationen werden nur wenig verändert (Nielsen et al., 2004).

Für die in dieser Arbeit untersuchte LNA, deren Rückgrat aus 2'-O-4'-C-Methylen- β -D-Ribofuranose-Einheiten aufgebaut ist, zeigen bisherige Untersuchungen, dass der Zucker die Nukleinsäure in der C3'-*endo*-Konformation fixiert (Petersen et al., 2003). Dies konnte auch durch eine Moleküldynamik-Simulation gezeigt werden (Pande et al., 2008). Es wird angenommen, dass diese Rigidität der Nukleinsäuregeometrie ein Grund für die hohe Thermostabilität dieser modifizierten Nukleinsäuren ist, da das starrere Zuckerphosphatrückgrat die Basen zu einer effizienteren Basenstapelung zwingt.

Ungeklärt ist die Frage nach der Hydratisierung der „locked“ Nukleinsäuren, insbesondere des modifizierten Zuckers, da alle Strukturinformationen bisher von NMR-Untersuchungen stammen. Diese Frage ist dann von Bedeutung, wenn die LNA im biologischen System RNAs als Interaktionspartner anderer Makromoleküle ersetzen soll. Es ist bekannt, dass die Hydrathülle der RNA eine wichtige Rolle für RNA-Protein-Interaktionen spielt, vor allem in der Region der kleinen Furche (Draper, 1999). Aber das Hydratisierungsmuster in dieser Region wird bei Ribonukleinsäuren stark von der Anwesenheit der 2'-OH-Gruppe der Ribose bestimmt, die in der LNA über eine Methylenbrücke mit dem Kohlenstoffatom C4' des Zuckers verbunden ist.

2 AUFGABENSTELLUNG

Das Ziel der Arbeit ist die hochauflösende Untersuchung von Nukleinsäuren mittels Röntgenstrukturanalyse. Dazu sollten als Modellsysteme tRNA-Akzeptorstämme einer Länge von sieben Basenpaaren eingesetzt werden, sowie eine modifizierte „locked“ Nukleinsäure, deren Sequenz von der des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes abgeleitet ist. Zur weiteren Erhöhung der Auflösung sollte die Qualität der Kristalle durch Kristallisationsversuche unter Mikrogravitationsbedingungen gesteigert werden.

Die Strukturen zweier tRNA-Akzeptorstamm-Mikrohelices sollten mittels hochauflösender Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden, mit dem Ziel nicht nur die Strukturen der RNA-Moleküle zu beschreiben, sondern auch Metallbindungsstellen und Wasserhüllen an entscheidenden Identitätsmerkmalen zu vergleichen. Die untersuchten Moleküle waren ein tRNA^{Arg}- und ein tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm, die beide aus dem Bakterium *E.coli* stammen. Der tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm sollte mit der Struktur eines Isoakzeptors übereinandergelagert werden, um auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten bei der Hydratation und Bindung von Liganden untersucht zu werden.

Die hochaufgelösten Strukturen des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes und des Isoakzeptors sollten mittels Superpositionierung in die Struktur der Seryl-tRNA-Synthetase projiziert werden. Das Ziel dieser Untersuchung war die Einbeziehung des Hydratationsnetzwerkes der RNA in das Bindungsverhalten der Nukleinsäure an die Synthetase.

Von der Sequenz des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes wurde eine modifizierte „locked“ Nukleinsäure abgeleitet. Damit sollte ein sequenzunabhängiger, direkter Vergleich der Strukturen einer natürlichen RNA mit einer „locked“ Nukleinsäure erfolgen. Dieses besonders thermostabile, nicht-natürliche Nukleinsäure-Analogon unterscheidet sich von der natürlichen RNA durch eine Methylen-Brücke zwischen der 2'-Hydroxyl-Gruppe und dem Kohlenstoffatom C4' der Ribose.

Das Ziel der Untersuchung war die Beschreibung der Struktur, der Hydratation und der Ligandenbindung der Nukleinsäure. Außerdem sollten Vergleiche mit anderen modifizierten Nukleinsäuren durchgeführt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Konzentrationsbestimmung der RNA und Hybridisierung

Zur Bestimmung der Konzentration wurden die tRNA-Akzeptorstamm-Mikrohelices zunächst alkalisch hydrolysiert. Dabei wird in alkalischem Milieu die 2'-OH-Gruppe der Ribose deprotoniert, was zur Entstehung eines Alkoxidions führt. Dieses Alkoxidion ist stärker nukleophil als die Alkoholgruppe und greift das benachbarte Phosphoratom an. Als Übergangszustand kommt es zu einem intramolekularen Ringschluss mit einem fünfach koordinierten Phosphoratom. Der letzte Schritt der nukleophilen Substitutionsreaktion ist die Abspaltung des über das 5'-Ende verknüpften Nukleotids, welches die Abgangsgruppe der Reaktion darstellt.

Für die Reaktion wurden zunächst die Konzentrationen der RNA-Proben photometrisch bestimmt. Anschließend wurden 0,2 OD in 25 µl Wasser gelöst und das gleiche Volumen 0,1 M NaOH dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 45 Minuten bei 90°C im Heizblock erwärmt und dann mit 25 µl 0,1 M HCl neutralisiert. Nach Zugabe von 100 µl 10-fach TBE-Puffer und 825 µl Wasser, um ein Gesamtvolumen von 1 ml zu erhalten, wurde die Absorption der Probe innerhalb eines Spektrums von 220-320 nm gemessen. Das Absorptionsmaximum von RNA liegt bei 260 nm, was sich als Maximum der Absorptionskurve zeigt.

Daraus konnte mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes die Konzentration der RNA berechnet werden.

$$c = \frac{A}{\varepsilon \cdot d} ;$$

dabei sind:

A = Absorption bei 260 nm,

ε = Extinktionskoeffizient [$\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$],

d = Dicke der Küvette [cm].

Zuvor wurde der Extinktionskoeffizient der RNA berechnet. Dies erfolgte mittels folgender Formel unter Zuhilfenahme der Extinktionskoeffizienten der einzelnen Nukleotide bei einem pH-Wert von 7:

$$\varepsilon(\text{RNA}) = N_A \cdot \varepsilon_A + N_C \cdot \varepsilon_C + N_G \cdot \varepsilon_G + N_U \cdot \varepsilon_U, \text{ mit}$$

$$\varepsilon_A = 15.385 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1},$$

$$\varepsilon_C = 7.308 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1},$$

$$\varepsilon_G = 11.794 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1},$$

$$\varepsilon_U = 9.804 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}.$$

Nach Berechnung der RNA-Konzentrationen wurden von den zu hybridisierenden Proben jeweils 50 μl Lösung einer Konzentration von 0,5 mM in einem Reaktionsgefäß gemischt und 2 min im Heizblock auf 90°C erwärmt. Die Proben wurden dann im Heizblock eine Stunde bis auf Raumtemperatur abgekühlt.

3.2 Synthetisierung der ncRNA HAR1

Die Vollängenprodukte des HAR1-Gens aus dem Schimpansen und dem Menschen wurden in mehreren Schritten im Labor synthetisiert, da die Ausbeute einer chemischen RNA-Synthese für ein Produkt von 118 nt nicht ausreichend ist. Deswegen sollte die HAR1-RNA durch T7 *in vitro*-Transkription hergestellt werden. Um von der RNA-Polymerase produzierte Überhänge nach der Transkription zu entfernen, sollten am 3'- und 5'-Ende Ribozyme mitsynthetisiert werden. Dadurch ist es möglich definierte Enden an der transkribierten RNA zu erzeugen.

Bei den Ribozymen handelt es sich am 5'-Ende um ein 64 nt langes *Hairpin*-Ribozym, an das 3'-Ende der HAR1-RNA wurde ein 46 nt langes *Hammerhead*-Ribozym konstruiert. Terminal am 3'-Ende befindet sich der aus 19 nt bestehende *T7-Primer*, der letztlich mit dem *Hammerhead*-Ribozym von der RNA abgeschnitten wird.

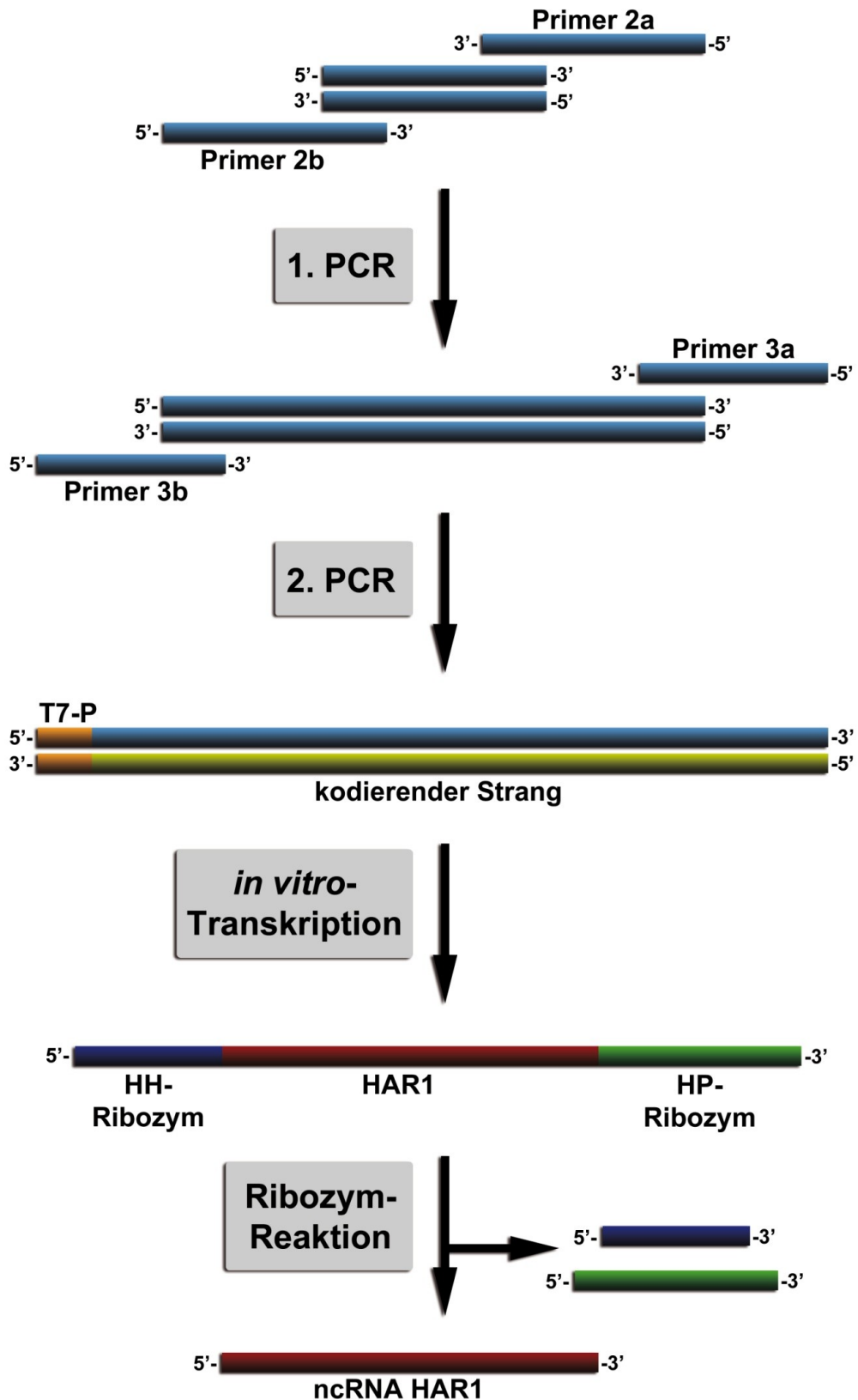


Abbildung 3.1: Syntheschema der ncRNA HAR1

HH: Hammerhead, HP: Hairpin, T7-P: T7-Promotor

Da das Gesamtkonstrukt aus einer Länge von 248 nt besteht und auch DNA nur bis zu einer Länge von 80 - 100 nt zuverlässig und mit zufriedenstellender Ausbeute chemisch synthetisiert werden kann, sollte die *Template*-DNA durch eine Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction* - PCR) mit überhängenden *Primern* hergestellt werden. Dabei sollte das Vollängenkonstrukt in zwei PCR-Schritten hergestellt werden. Das Konstrukt wurde dazu in fünf Teile zerlegt.

Im ersten Schritt der PCR wurde die 70 Basenpaare (bp) lange doppelsträngige DNA (dsDNA) auf 170 bp verlängert. Die *Primer* waren dabei je 70 nt lang, davon überlappten 20 nt mit der Ausgangs-DNA. Der zweite Schritt der PCR führte dann zum Vollängen-Template für die *in vitro*-Transkription mit einer Länge von 248 bp. Die *Primer* waren in diesem Schritt je 59 nt lang, von denen wieder jeweils 20 nt mit dem Produkt der vorhergehenden PCR überlappten.

Das so hergestellte DNA-*Template* wurde nach der Aufreinigung in einer T7 *in vitro*-Transkription in RNA umgeschrieben. Die RNA wurde anschließend aufgereinigt und ein Ribozymverdau durchgeführt, um das fertige HAR1-Genprodukt nach einem letzten Aufreinigungsschritt zur Kristallisation einzusetzen. Die HAR1-Synthese ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt.

3.2.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion ist eine effiziente Methode DNA-Moleküle zu amplifizieren. Für die Reaktion werden das zu vervielfältigende doppelsträngige DNA-*Template*, zwei *Primer*, die zu den 3'-Enden der beiden *Template*stränge komplementär sind und freie 3'-OH-Gruppen haben, eine thermostabile DNA-Polymerase und die vier DNA-Nukleotide, sowie Magnesium als Kofaktor für die Polymerase eingesetzt.

Ein Reaktionszyklus besteht aus drei Schritten: Denaturierung, *Annealing* und Elongation. Während der Denaturierung wird die dsDNA thermisch in zwei Einzelstränge getrennt. An die 3'-Enden der beiden DNA-Stränge werden die *Primer* hybridisiert, die während der Elongation von der DNA-abhängigen DNA-Polymerase in 5' → 3'-Richtung verlängert werden. Dabei wird ein zum *Template* komplementärer Strang synthetisiert. So verdoppelt sich theoretisch während jedes PCR-Zyklus die

Anzahl der DNA-Moleküle, was gleichbedeutend mit einer exponentiellen Amplifikation ist.

Tabelle 3.1: Pipettierschema einer 50 µl-Reaktion der ersten PCR

Komponente	c (end)	Volumen
Template 1a	100 nM	0,5 µl
Template 1b	100 nM	0,5 µl
Primer 2a	0,5 µM	0,25 µl
Primer 2b	0,5 µM	0,25 µl
5x PCR-Puffer	1x	10 µl
dNTPs	0,2 mM	1 µl
MgCl ₂	0,5 mM	0,5 µl
<i>Phusion</i> Polymerase	0,02 U/µl	0,5 µl
H ₂ O		ad 50 µl

Die Angaben sind sowohl für die human-RNA- als auch für die Schimpansen-RNA-Ansätze gültig.

Tabelle 3.2: Programm der ersten PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
Initialdenaturierung	98	30 s
Denaturierung	98	10 s
<i>Annealing</i>	50 ¹ / 47 ²	30 s
Elongation	72	30 s
Denaturierung	98	10 s
<i>Annealing</i> und Elongation	72	30 s
Finalelongation	72	5 min
Pause	4	∞

¹Annealingtemperatur humane RNA; ²Annealingtemperatur Schimpansen-RNA; Die hellgrau gefärbten Schritte wurden zweimal durchgeführt, die dunkelgrau gefärbten 20 mal.

Für die erste PCR ist das Produkt nach der ersten Runde um die *Primer*-Überhänge verlängert, so dass die *Primer* nun eine Komplementarität mit dem Template von 70 Nukleotiden haben. Um sicherzustellen, dass genügend verlängertes *Template*-material zur Verfügung steht, kann die Hybridisierungstemperatur nach der zweiten

Runde erhöht werden. Wichtig ist der Einsatz einer DNA-Polymerase mit einer geringen Fehlerquote und der Eigenschaft glatte Enden zu produzieren, damit keine weiteren Nukleotide an die Enden der neusynthetisierten DNA-Stränge angehängt werden. Das Pipettierschema der ersten PCR ist in Tabelle 3.1, das Programm in Tabelle 3.2 angegeben.

Tabelle 3.3: Pipettierschema der zweiten PCR

Komponente	human		Schimpanse	
	c (end)	Volumen	c (end)	Volumen
Template*	1 ng/μl	3,8 μl	1 ng/μl	4,4 μl
Primer 3a	0,5 μM	0,1 μl	0,5 μM	0,1 μl
Primer 3b	0,5 μM	0,1 μl	0,5 μM	0,1 μl
5x PCR-Puffer	1x	4 μl	1x	4 μl
dNTPs	0,2 mM	0,4 μl	0,2 mM	0,4 μl
MgCl ₂	0,5 mM	0,4 μl	0,5 mM	0,4 μl
<i>HiFidelity</i> Polymerase	0,02 U/μl	0,4 μl	0,02 U/μl	0,4 μl
H ₂ O		ad 20 μl		ad 20 μl

* Das *Template* ist das Produkt der vorhergehenden PCR.

Tabelle 3.4: Programm der zweiten PCR

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit
Initialdenaturierung	95	5 min
Denaturierung	94	15 s
<i>Annealing</i>	58	1 min
Elongation	72	1 min
Denaturierung	94	15 s
<i>Annealing</i> und Elongation	72	1 min
Finalelongation	72	10 min
Pause	4	∞

Die hellgrau gefärbten Schritte wurden zweimal, die dunkelgrau gefärbten 20 mal durchgeführt.

Das Produkt der ersten PCR wird in der zweiten als *Template* eingesetzt. Hier ist nach einer Runde das Vollängenprodukt vorhanden, nachdem die *Template*-DNA

um die *Primer*-Überhänge von 39 nt verlängert worden ist. Das Pipettierschema der zweiten PCR ist in Tabelle 3.3, das Programm in Tabelle 3.4 angegeben.

Die *Phusion*-Polymerase der ersten PCR stammt von New England Biolabs, die *HiFidelity*-Polymerase, die in der zweiten PCR eingesetzt wurde, stammt von Qiagen. Nach jeder Reaktion wurde der gesamte PCR-Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen und das Produkt mit dem *NucleoSpin Extract II-Kit* von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Danach wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

3.2.2 Gelelektrophorese

Gelelektrophorese ist eine Methode, Moleküle gemäß ihrer Ladung und Größe voneinander zu trennen. Dabei wandern die Moleküle in einem elektrischen Feld durch das molekulare Sieb der Gelmatrix. Die elektrophoretische Beweglichkeit wird durch die Feldstärke und die Porengröße des Gels beeinflusst. Bei nativen Gelen beeinflusst auch die Sekundärstruktur der Moleküle das Laufverhalten.

Zur Analyse bzw. Reinigung von Nukleinsäuren wurden entweder Agarose- oder Polyacrylamid (PAA)-Gele eingesetzt. Die Gelmatrix bei Agarosegelen besteht aus vernetzten D-Galaktose- und 3,6-Anhydro-L-Galaktoseeinheiten und wird durch Aufkochen der Agarose in TAE-Puffer und anschließendes Abkühlen hergestellt. Um die Nukleinsäuren nach dem Gellauf sichtbar zu machen, werden der Gellösung vor dem Erstarren 2 µl 1%ige Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Die Proben wurden mit einem Gelprobenpuffer vermischt auf das Gel aufgetragen und zur Auswertung mit einem Größenstandard verglichen. Die Gellaufzeit betrug 1-2 h bei einer konstanten Spannung von 90-100 V.

PAA-Gele werden durch radikalische Polymerisation von Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid hergestellt. Der Radikalstarter ist Ammoniumperoxodisulfat (APS), dessen Zerfall zu zwei Sulfatradikalen führt, die durch Tetramethylethylendiamin (TEMED) stabilisiert werden. Während der Reaktion bilden sich langkettige Acrylamidpolymere, die durch Bisacrylamid quervernetzt werden, so dass ein dreidimensionales Gitternetz entsteht, dessen Porengröße durch das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid eingestellt werden kann. Um den Einfluss

von räumlichen Strukturen der Nukleinsäuren auf deren Mobilität im Gel auszuschalten, erfolgte die PAA-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen. Dazu wurde der Gellösung 8 M Harnstoff hinzugefügt.

Zur anfänglichen Denaturierung der Proben wurden diese zusammen mit dem 8 M-Harnstoffpuffer 5 min bei 95°C erhitzt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet und der Gellauf erfolgte bei einer konstanten Spannung von 300 V für 90 min. Für die Auswertung wurde ein Größenstandard eingesetzt und das Gel nach dem Gellauf für 20 min mit einer 0,5 µg/ml Lösung von Ethidiumbromid in TBE-Puffer inkubiert.

Ethidiumbromid interkaliert mit einem Molekül pro zehn Basenpaare zwischen die Nukleinsäurebasen. Als heterozyklischer Fluoreszenzfarbstoff kann es in ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden und verstärkt dabei die Fluoreszenz-Emission der Nukleinsäuren.

Präparative Gele wurden nicht mit Ethidiumbromid gefärbt. Für Agarosegele wurde die Eigenfluoreszenz der aromatischen Nukleinsäurebasen bei einer Wellenlänge von 260 nm ausgenutzt, um die Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen und mit einem Skalpell auszuschneiden. Präparative PAA-Gele wurden in Klarsichtfolie auf eine mit dem Farbstoff F254 beschichtete Zellulosemembran überführt. Der Farbstoff ist bei einfallendem Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar, während die Nukleinsäurebanden das Licht absorbieren und als Schatten sichtbar werden. Um Strahlenschäden so gering wie möglich zu halten, wurden die Banden markiert und anschließend ausgeschnitten. Die Elution der Nukleinsäuren aus dem Gel erfolgte durch Zugabe von 500 µl 0,3 M Natriumacetat und starkem Schütteln bei 4°C über Nacht.

3.2.3 T7 *in vitro*-Transkription

Während der *in vitro*-Transkription wird der Sinnstrang der in der PCR hergestellten dsDNA in RNA umgeschrieben. Dies geschieht durch eine DNA-abhängige RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7. Die Polymerase benötigt dazu eine spezifische Initiationssequenz, den T7-Promotor. Dieser besteht aus 17 bp, wobei die Effizienz der Transkription durch das Anhängen von zwei weiteren Guanosin-Nukleotiden gesteigert werden kann.

In vivo wird die Transkription durch Sekundärstrukturmuster der naszierenden RNA-Kette terminiert. *In vitro* dissoziiert die Polymerase, sobald sie das 5'-Ende des DNA-*Templates* erreicht hat, von der DNA ab. Dieser Vorgang wird als *run-off*-Transkription bezeichnet und führt häufig dazu, dass die RNA-Polymerase unspezifisch eines oder mehrere Nukleotide an das 3'-Ende der RNA anheftet.

Für die T7-Transkription wurde das *RNA Maxx Yield Transcription Kit* von Stratagene verwendet. Die Reaktion erfolgte in 25 µl-Reaktionsansätzen für 2 h bei 37°C unter leichtem Schütteln, dabei wurde je 1 µg DNA als Template eingesetzt. Das Pipettierschema der Reaktionsansätze ist in Tabelle 3.5 angegeben.

Tabelle 3.5: Pipettierschema der T7 *in vitro*-Transkription

Komponente	human		Schimpanse	
	c (end)	Volumen	c (end)	Volumen
Template	0,04 µg/µl	8,7 µl	0,04 µg/µl	11,3 µl
5x Puffer	1x	5 µl	1x	5 µl
rUTP	4 mM	1 µl	4 mM	1 µl
rATP	4 mM	1 µl	4 mM	1 µl
rCTP	4 mM	1 µl	4 mM	1 µl
rGTP	4 mM	1 µl	4 mM	1 µl
Pyrophosphatase	0,015 U/µl	0,5 µl	0,015 U/µl	0,5 µl
Dithiothreitol	0,03 mM	1 µl	0,03 mM	1 µl
Rnase <i>block</i>		1 µl		1 µl
T7-Polymerase	8 U/µl	1 µl	8 U/µl	1 µl
DEPC-Wasser		ad 25 µl		ad 25 µl

Nach der Reaktion wurden als Kontrolle 5 µl für die Gelelektrophorese abgenommen und anschließend 2 U RNase-freie DNase (Promega) zum Transkriptionsansatz gegeben. Der DNase-Verdau zum Abbau der Template-DNA erfolgte für 45 min bei 37°C unter leichtem Schütteln. Danach wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt, um die Nukleinsäuren von den übrigen Bestandteilen des Reaktionsansatzes abzutrennen.

3.2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Abtrennung der Nukleinsäuren aus Protein-Nukleinsäuregemischen, insbesondere nach enzymatischen Reaktionen. Das Prinzip ist, dass die Proteine denaturiert werden und in der organischen Phase verbleiben, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Phase in Lösung bleiben.

Die Transkriptionsansätze wurden mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 100 µl gebracht. Jeder Ansatz wurde mit 100 µl Phenol gut vermischt und anschließend für 1 min bei 4°C und 13.000 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und mit 100 µl Chloroform gemischt. Ein weiterer Zentrifugationsschritt von 1 min bei 4°C mit 13.000 g folgte. Die wässrige Phase, die die transkribierte RNA enthielt, wurde abgenommen und die Chloroform-Phase verworfen.

3.2.5 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung dient der Reinigung von Nukleinsäuren von unerwünschten Pufferkomponenten, Phenolresten und freien Nukleotiden. Gleichzeitig können die Nukleinsäuren bei der Resuspendierung konzentriert werden. Das Prinzip ist, dass durch die Verdrängung der Hydrathülle der Nukleinsäuren deren Löslichkeit soweit abnimmt bis diese ausfallen.

Die Nukleinsäurelösung wurde dazu mit dem 2,5-fachen Volumen eisgekühltem 100% Ethanol, 0,3 M Natriumacetat und 1 µl einer 20 mg/ml Glykogenlösung versetzt. Die Fällung fand entweder für 30 min bei -80°C oder über Nacht bei -20°C statt. Das Gemisch wurde für 45 min bei 4°C und 13.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit eisgekühltem 70% Ethanol gewaschen. Ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13.000 x g für 5 min folgte. Das Pellet wurde 1 min im Vakuumrotationsverdampfer getrocknet. Das Pellet wurde schließlich in H₂O 5 min bei 65°C unter starkem Schütteln resuspendiert und die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt.

3.2.6 Ribozyme

Zur Darstellung des endgültigen HAR1-Genprodukts wurde die *in vitro*-transkribierte RNA mit Ribozymen an den 5'- und 3'-Enden konstruiert, da die T7-Transkription allein noch kein homogenes Produkt liefert: Am 5'-Ende befinden sich die Guanosin-Nukleotide, die zur Erhöhung der Transkriptionseffizienz stromaufwärts der Promotorsequenz benötigt werden und das 3'-Ende ist durch die Natur der *run-off*-Transkription heterogen. Diese Limitierungen heben die intramolekular wirkenden Ribozyme auf, die sich durch Zugabe von Magnesium selbst abspalten und damit die HAR1-RNA mit definierten Enden ausschneiden. Abbildung 3.2 zeigt das Transkript vor der Ribozym-Reaktion.

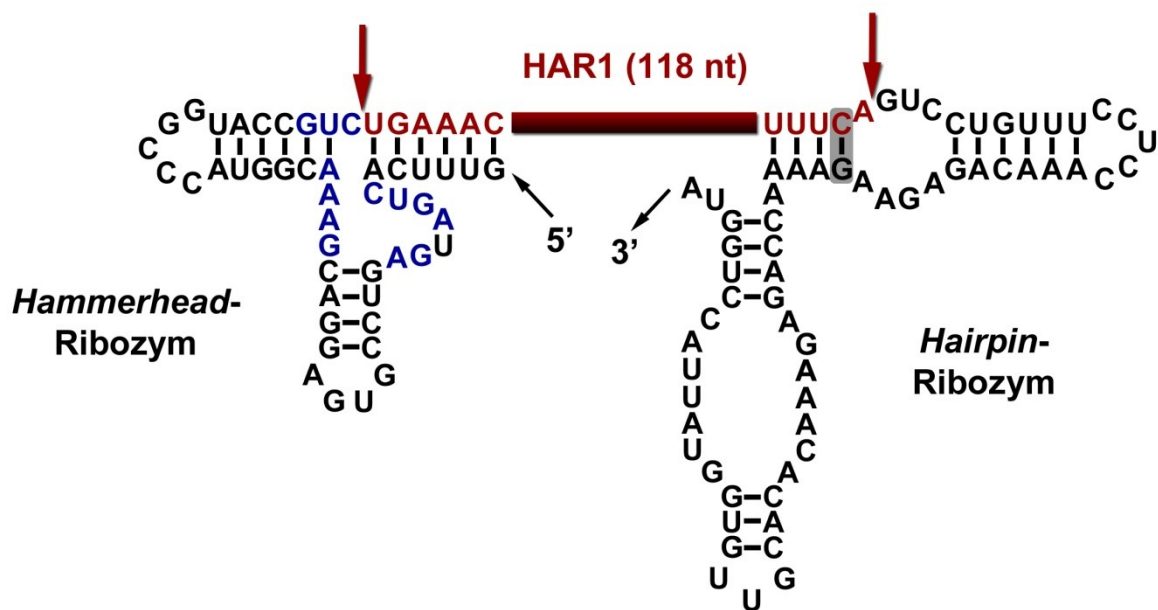


Abbildung 3.2: Transkript vor der Ribozymreaktion

Am 5'-Ende des Transkripts befindet sich ein *Hammerhead*-Ribozym, am 3'-Ende ein *Hairpin*-Ribozym. Nucleotide, die für eine effiziente Spaltungsreaktion notwendig sind, sind für das *Hammerhead*-Ribozym blau dargestellt. Das *Hairpin*-Ribozym benötigt in der -2-Position entweder ein G,C oder U (grau unterlegt). Die Spaltstellen der Ribozyme sind als rote Pfeile markiert.

An das 5'-Ende der ncRNA wurde ein *Hammerhead*-Ribozym synthetisiert. Das *Hammerhead*-Ribozym wurde erstmalig 1986 als katalytischer Teil der Autolyse der

Tabakringfleckenvirus-Satelliten-RNA entdeckt (Prody et al., 1986). Es spaltet sich selbst vom Rest der RNA ab, wobei am 3'-Ende des Ribozyms ein zyklischer 2',3'-Phosphodiester und am 5'-Ende der prozessierten HAR1-RNA eine freie 5'-OH-Gruppe gebildet werden. Für die Reaktion sind divalente Kationen als Kofaktor notwendig (Uhlenbeck, 1987). Die hier verwendete Sequenz ist abgeleitet von Price und Kollegen (Price et al., 1995), die erstmals Ribozyme zur RNA-Synthese für Kristallisationsversuche eingesetzt haben. Abbildung 3.2 zeigt die aus 46 nt bestehende Sekundärstruktur des Ribozyms.

Auch das *Hairpin*-Ribozym am 3'-Ende ist ein sich selbst abspaltendes Ribozym, das erstmalig in Tabakringfleckenvirus-Satelliten-RNA entdeckt wurde (Feldstein et al., 1989). *In vivo* katalysiert das Ribozym die Generierung einzelner Satelliten-RNAs aus multimeren Transkripten, die durch Transkription von DNA produziert werden, die nach dem Schema des rollenden Kreises repliziert wurde (Ferre-D'amare et al., 2002). Dabei wird die RNA sequenzspezifisch gespalten und eine freie 5'-OH-Gruppe sowie ein zyklischer 2',3'-Phosphodiester am 3'-Terminus der prozessierten RNA gebildet.

Das *Hairpin*-Ribozym weist eine Restriktion auf, und zwar benötigt es für eine effiziente Spaltung an der Position -2 entweder ein G, C oder U. Da die HAR1-RNAs, sowohl die des Menschen als auch die des Schimpansen, an dieser Stelle ein C-Nukleotid aufweisen, ist das Ribozym geeignet das 3'-Ende dieser ncRNAs zu prozessieren. Die Sequenz des hier eingesetzten Ribozyms ist ebenfalls abgeleitet von Price und Kollegen (Price et al., 1995) und die aus 64 nt bestehende Sekundärstruktur ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

Nach der Ethanol-fällung wurde die resuspendierte RNA für 2 min bei 90°C denaturiert und 1 h auf Raumtemperatur abgekühlt, um die Ribozyme zu renaturieren. Dann wurde eine Magnesiumkonzentration von 25 mM eingestellt und die Proben für 24 h bei 37°C leicht geschüttelt.

Nach der Ribozym-Reaktion wurden die kompletten Reaktionsansätze auf ein 8%iges denaturierendes PAA-Gel mit 8 M Harnstoff aufgetragen. Die HAR1-Banden bei einer Länge von ca. 120 nt wurden ausgeschnitten und die RNA mit 500 µl 0,3 M Natriumacetat, pH 5,2, bei 4°C unter starkem Schütteln über Nacht aus dem Gel eluiert. Das Eluat wurde gefällt und die RNA-Menge photometrisch bestimmt.

3.3 Kristallisation

Grundvoraussetzung für die Röntgenstrukturanalyse ist die Kristallisation der zu untersuchenden Substanz. Diese muss dazu in reinstem Zustand vorliegen, um Einkristalle züchten zu können, die in Qualität und Größe geeignet sind Röntgenstrahlen zu beugen und eine hohe Auflösung der Messdaten zu erreichen.

Da jede Verbesserung der Qualität der Kristalle zu einer Verbesserung der Qualität Röntgendiffraktionsdaten und somit letztlich zu einer Verbesserung der Struktur führen kann, sind groß angelegte *Screening*-Verfahren das Mittel, um die besten Bedingungen zur Kristallisation einer Substanz zu finden und somit auch eine bestmögliche Kristallqualität zu erreichen.

Die am häufigsten angewandte Methode ist die der Dampfdiffusion. Dabei unterscheidet man das Verfahren des sitzenden Tropfens und das des hängenden Tropfens. Gemein ist beiden, dass einem kleinen Tropfen, der über die Dampfphase im Gleichgewicht mit dem an Fällungsmittel höher konzentrierten Reservoir steht, langsam Wasser entzogen wird, um die zu kristallisierende Substanz kontrolliert in eine übersättigte Lösung zu überführen, so dass sie letztendlich in regelmäßiger Packung ausfällt.

Zur Kristallisation wurden während dieser Arbeit zwei *Screening-Kits* der Firma Hampton Research (CA, USA) eingesetzt, um mittels Dampfdiffusionskristallisation qualitativ hochwertige Einkristalle zur Messung am Synchrotron zu erzeugen. Zum einen wurde das *Natrix Kit* (HR2-116, Hampton Research, CA, USA) von Hampton Research verwendet; welches nach der Methode des sitzenden Tropfens eingesetzt wurde. Das Kit enthält 48 verschiedene Kristallisationspuffer.

Die Kristallisation erfolgte in 96-well *CrystalQuick* Lp-Platten von Greiner Bio-One, Frickenhausen. Dazu wurde 1 µl der hybridisierten RNA mit 1 µl Kristallisationspuffer gemischt und gegen 80 µl des Kristallisationspuffers als Reservoir äquilibriert. Das System wurde gegen Gasaustausch mit der Umgebung durch eine Klebefolie abgedichtet.

Das zweite *Screening-Kit*, das *Nucleic Acid Mini Screen Kit* von Hampton Research, wurde nach der Methode des hängenden Tropfens in 24-well *Linbro* Platten der Firma ICN Biochemicals Inc., Ohio, USA, durchgeführt. Dieses Kit enthält 24

verschiedene Kristallisationspuffer. Für die Kristallisation wurde 1 µl hybridisierte RNA mit 1 µl Kristallisationspuffer auf einem silikonisierten Deckgläschen der Firma Jena Bioscience, Jena gemischt. In die Vertiefung der Platte wurde als Reservoir 1 ml MPD gegeben und das Deckgläschen mit dem Tropfen nach unten als Deckel benutzt. Um das System luftdicht zu verschließen, wurde der Rand der Plattenvertiefung mit Baysilone von Bayer, Leverkusen bestrichen.

3.3.1 Weltraumkristallisation

Es wurden während zweier Missionen Kristallisationsexperimente auf der ISS durchgeführt. Das waren im Jahr 2008 die Sojus TMA-13-Mission und im Jahr 2009 die Sojus TMA-16-Mission. Die Sojus TMA-13-Mission dauerte zwölf Tage, während der Sojus TMA-16-Mission verblieben die Kristallisationsansätze neun Tage im Weltraum und legten dabei eine Strecke von ca. 4.000.000 km zurück.

Die Kristallisation der Proben erfolgte in einem relativ einfachen System nach der Dampfdiffusionsmethode oder durch direkte Diffusion. Bei der direkten Diffusion standen das Proben-Mutterlaugengemisch und die Reservoirlösung in direktem Kontakt miteinander. Dazu wurden die Proben mit der Kristallisationslösung vermischt und zusammen mit der Reservoirlösung in Tygon-Schläuche mit einem Innendurchmesser von 0,2 mm pipettiert. Für die flüssig-flüssig-Diffusion wurden je 1 µl Proben-Mutterlaugengemisch und 1 µl Fällungsmittel eingesetzt; alle Kristallisationsversuche der Sojus-TMA-16-Mission erfolgten nach diesem Prinzip. Für die Dampfdiffusion wurden 2 µl Probe und zweimal 3 µl Fällungsmittel eingesetzt. Die Tygonschläuche wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem von der NASA speziell für Weltraumkristallisationen entwickelten Behälter aufbewahrt. Eine schematische Darstellung der Kristallisationsansätze zeigt Abbildung 3.3.

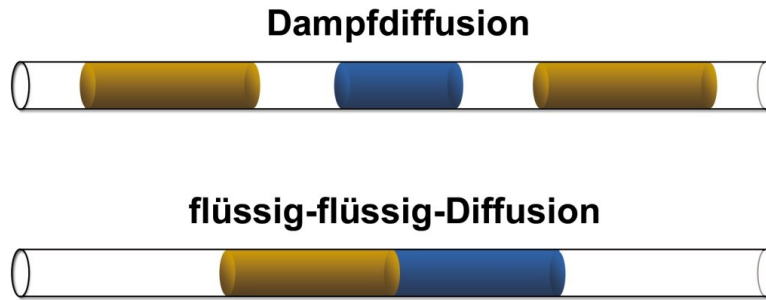


Abbildung 3.3: Schema der Weltraumkristallisationsexperimente

Das Fällungsmittel ist gelb, das Proben-Mutterlaugengemisch blau dargestellt. Bei der Dampfdiffusion befindet sich zwischen Probe und Fällungsmittel Luft, bei der flüssig-flüssig-Diffusion stehen die Lösungen in direktem Kontakt miteinander.

Der Probenbehälter war so konzipiert, dass die Proben während des Fluges der Rakete in den Weltraum nicht auftauen, um zu gewährleisten, dass die Kristallisationsreaktion tatsächlich erst unter Mikrogravitationsbedingungen beginnt. Dazu war der Behälter mit einem Vakuumschaum ausgekleidet, der einen Wärmeaustausch zwischen dem Inneren des Systems und der Umgebung minimierte. Gleichzeitig waren die Verschlüsse des Behälters so abgedichtet, dass kein Stoffaustausch zwischen dem System und der Umgebung möglich war. Der Kristallisationsbehälter ist in Abbildung 3.4 dargestellt.

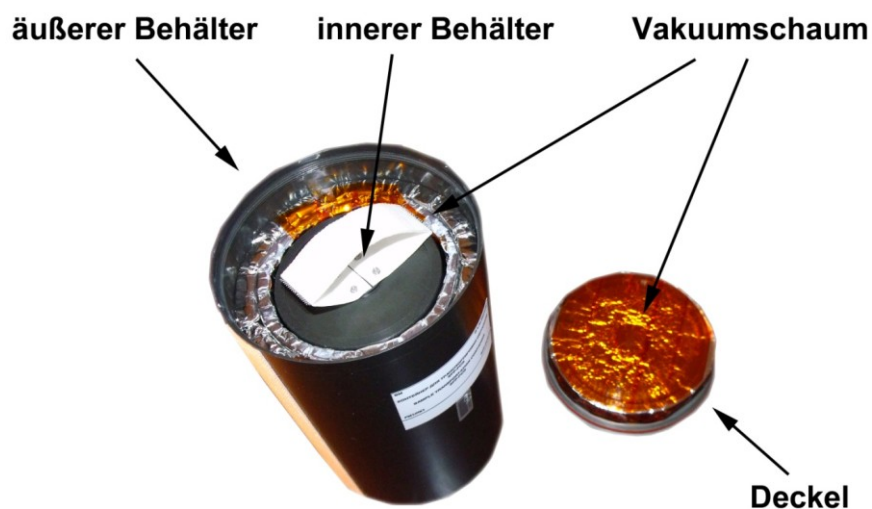


Abbildung 3.4: Probentransportbehälter der Weltraumkristallisationsversuche

Während beider Missionen wurden Bodenkontrollversuche durchgeführt. Diese fanden, abgesehen vom Standort, unter den gleichen Bedingungen statt, wie die Weltraumkristallisationen. Die Kristallisationsexperimente wurden in Tygon-Schläuchen durchgeführt, die nach dem Befüllen in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden und dann langsam auftauten, um die Kristallisationsreaktion zu starten. Während der Sojus-TMA-13-Mission wurden Kontrollversuche in Berlin und Birmingham, USA, durchgeführt. Während der Sojus-TMA-16-Mission fanden Bodenkontrollversuche in Berlin und Baikonur, Kasachstan, statt.

Tabelle 3.6: Proben für die Weltraumkristallisation

Substanz	Quelle
tRNA ^{Ser} -Akzeptorstamm RS-1660	<i>Escherichia coli</i>
tRNA ^{Ser} -Akzeptorstamm RS-1661	<i>Escherichia coli</i>
tRNA ^{Arg} -Akzeptorstamm RR-1660	<i>Escherichia coli</i>
tRNA ^{Arg} -Akzeptorstamm RR-1662	<i>Escherichia coli</i>
tRNA ^{Sec} -Akzeptorstamm RZ-1665	<i>Escherichia coli</i>
tRNA ^{Gly} -Akzeptorstamm G-9990	<i>Homo sapiens</i>
tRNA ^{Gly} -Akzeptorstamm G-9992	<i>Homo sapiens</i>
5S rRNA E-Helix, Racemat	<i>Thermus flavus</i>
5S rRNA A-Helix, Racemat	<i>Thermus flavus</i>
ncRNA HAR1 Domäne	<i>Homo sapiens</i>
ncRNA HAR1 Domäne	<i>Pan troglodytes</i>
ncRNA HAR1 LNA-modifizierte Domäne	<i>Homo sapiens</i>
ncRNA HAR1 LNA-modifizierte Domäne	<i>Pan troglodytes</i>
ncRNA HAR1	<i>Homo sapiens</i>
ncRNA HAR1	<i>Pan troglodytes</i>
LNA abgeleitet von RS-1661	synthetisch

Neben verschiedenen tRNA-Akzeptorstamm-Mikrohelicen wurden ein LNA-Molekül, zwei Racemate verschiedener Domänen der 5S ribosomalen RNA (rRNA) und die ncRNA HAR1 aus dem Gehirn von Mensch und Schimpanse zur Kristallisation

eingesetzt. Aufgrund der einleitend beschriebenen widersprüchlichen Ergebnisse wurden Kristallisationsversuche mit den Domänen und der Gesamt-RNA unternommen. Weitere Versuche wurden mit ncRNA-Domänen, deren RNA-Nukleotide der Stammregion am 5'- bzw. 3'-Ende gegen LNA-Bausteine ausgetauscht wurden. Das Ziel sollte hierbei sein, die Thermostabilität der doppelsträngigen Region an den 5'- und 3'-Enden zu erhöhen, um dadurch die Gesamtstruktur zu stabilisieren. Die Substanzen, die zur Kristallisation in den Weltraum befördert wurden, sind in Tabelle 3.6 aufgelistet.

Startpunkt beider Missionen war der Weltraumbahnhof Baikonur in Kasachstan. Das Trägersystem waren Sojus FG-Raketen der russischen Weltraumagentur Roskosmos. Während der gesamten Flugdauer, also während der Hinfluges, der Andockzeit der Kapsel an die ISS und des Rückfluges bis zur Landung verblieb der Kristallisationsbehälter in der Sojus-Kapsel. Die Landung erfolgte in der kasachischen Wüste und die ungeöffneten Probenbehälter wurden nach der Sojus TMA-13-Mission in die USA überführt, wo die Kristallisationsexperimente auch ausgewertet wurden. Nach der Sojus-TMA-16-Mission wurden die Proben, zur Verringerung von Transportwegen, über Moskau direkt nach Berlin gebracht, wo die Auswertung der Experimente und der Vergleich mit den Bodenkontrollversuchen erfolgte.

Nach der Dokumentation wurden die Lösungen mit einer Pipette aus den Schläuchen auf ein Deckgläschen geblasen, die Kristalle gefischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Röntgenkristallographische Messungen wurden am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY) in Hamburg durchgeführt.

3.4 Röntgenstrukturanalyse

Das Ziel der Sammlung von Röntgenstrukturdaten ist es die Position und Intensität einer Maximalanzahl von Reflexen zu bestimmen. Röntgenstrahlung ist elektromagnetische Strahlung mit Wellenlängen zwischen $0,1 \text{ \AA}$ und 100 \AA .

Die Akquisition von Röntgendiffraktionsdaten kann entweder an Röntgenstrahlgeneratoren mit Cu-K_{α} -Anoden oder an Synchrotronanlagen erfolgen. Da Cu-K_{α} -Anoden nur Strahlung einer festen Wellenlänge von $1,54 \text{ \AA}$ erzeugen

können, sind Messungen am Synchrotron vorzuziehen. Die Vorteile der Synchrotronstrahlung liegen in der deutlich höheren Intensität, Brillanz sowie der kürzeren und modulierbaren Wellenlängen.

Die Datensätze wurden unter Kryobedingungen aufgenommen. Dazu wurden die Kristalle zunächst aus der Kristallisationslösung gefischt und in Kryopuffer äquilibriert. Die Zusammensetzung entsprach der der Mutterlauge, jedoch wurde als Kryoprotektans 30% (v/v) Glycerin hinzugefügt. Danach wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Kristalle, die in MPD als Fällungsmittel gezüchtet wurden, konnten direkt eingefroren werden, da MPD, wie auch Glycerin, als Kryoprotektans wirkt.

Die Aufnahme der Daten erfolgte am Synchrotrone ELETTRA, Triest, Italien, bei einer Temperatur von 100 K nach der Rotationsmethode (Arndt et al., 1977). Dabei wurde der Kristall um den Oszillationswinkel $\Delta\phi$ gedreht. Der Primärstrahl der senkrecht auf die Mitte des Detektors gerichtet ist, wurde von einem Strahlenfänger abgeschirmt.

Die Prozessierung der Daten erfolgte mit dem Programm DENZO (Otwinowski, 1991). Dazu wurden aus dem ersten Diffraktionsbild die Raumgruppe und die Einheitszellparameter bestimmt. Unter Berücksichtigung der Messparameter, wie Detektorabstand, Oszillationswinkel und Wellenlänge, wurde die Position und Intensität der Reflexe aller Diffraktionsbilder bestimmt. Die Skalierung der prozessierten Daten wurde mit dem Programm SCALEPACK (Otwinowski, 1993) durchgeführt. Dabei wurden Intensitäten von gemessenen Reflexen mit identischen Indizes, verschiedener Diffraktionsbilder miteinander verglichen. Da in der Regel die absoluten Intensitäten auf verschiedenen Diffraktionsbildern variieren, wurden durch den Vergleich der identischen Reflexe relative Intensitäten für alle Reflexe eines Diffraktionsbildes bestimmt und damit die absoluten Intensitäten angepasst. Die beiden Programme sind in dem Programmpaket HKL-2000 (Otwinowski et al., 1997) enthalten.

Nach der Prozessierung wurden die Daten auf Hinweise untersucht, ob zwei Kristalle zu einem Zwillingskristall zusammengewachsen waren. Dazu wurden die Daten mit dem Algorithmus von Padilla und Yeates (Padilla et al., 2003), wie er auf der Website <http://nihserver.mbi.ucla.edu/pystats/> implementiert ist, auf merohedrales Twinning untersucht.

Die Strukturen wurden durch Molekularen Ersatz mit dem Programm PHASER (McCoy et al., 2005) gelöst. Die Verfeinerung der Strukturen erfolgte mit dem Programm REFMAC5 (Murshudov et al., 1997) und die Berechnung der Elektronendichtekarte wurde mit dem Programm FFT durchgeführt (Read et al., 1988). Die drei verwendeten Programme sind in dem Programmpaket CCP4 enthalten (CCP4, 1994). Die Visualisierung der Struktur wurde mit den Programmen COOT (Emsley et al., 2004) und PYMOL (DeLano, 2002) erzeugt. Mit letzterem wurden sämtliche Abbildungen dieser Arbeit erstellt. Zur Berechnung der durchschnittlichen und lokalen helikalen Parameter der Nukleinsäuren wurde das Programm X3DNA (Lu et al., 2003) eingesetzt, mit dem auch die Verlängerung der Helices durchgeführt wurde.

4 ERGEBNISSE

Während dieser Arbeit wurden Kristallisationsexperimente unter Mikrogravitationsbedingungen auf der Internationalen Raumstation und konventionell im Labor erfolgreich durchgeführt. Im ersten Teil des Kapitels werden die Ergebnisse der Weltraumkristallisationsversuche beschrieben.

Mit den im Labor gezüchteten Kristallen konnten die Strukturen zweier tRNA-Akzeptorstamm-Mikrohelices und einer modifizierten „locked“ Nukleinsäure aufgeklärt werden. Die Strukturaufklärung der tRNA-Akzeptorstämme ist im zweiten Teil der Ergebnisse dargestellt.

Die Strukturen der tRNA-Akzeptorstämme wurden hinsichtlich ihrer Hydratation und Bindung von Liganden untersucht. Bei den Untersuchungen der Hydratation der Ribonukleinsäuren wurde besonderes Augenmerk auf die Analyse von strukturellen Wassermolekülen in der Umgebung von tRNA-Identitätselementen gelegt, um nach Hinweisen auf den Einfluss von Wassermolekülen bei der Erkennung der tRNAs durch die korrespondierenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen zu suchen. Dazu wurde die Hydratation des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661 mit der des tRNA^{Ser}-Isoakzeptors RS-1660 verglichen. Beide Strukturen wurden durch Superpositionierungsexperimente in die Struktur eines Seryl-tRNA-Synthetase/tRNA^{Ser}-Komplexes projiziert, um den Anteil des Wassernetzwerkes der tRNA an der Bindung zwischen Protein und Nukleinsäure zu untersuchen. Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, ob es Magnesiumbindungsstellen innerhalb der tRNA-Strukturen gibt, die für die Struktur der Nukleinsäuren bzw. deren Interaktionen mit Proteinen oder dem Ribosom von Bedeutung sind.

Im letzten Unterkapitel der Ergebnisse ist die Strukturaufklärung einer „locked“ Nukleinsäure beschrieben, deren Sequenz von der des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661 abgeleitet wurde. Dies ermöglichte einen sequenzunabhängigen Vergleich zwischen der modifizierten und der natürlichen Nukleinsäure. Bei der vergleichenden Analyse wurden besonders die Aspekte Struktur und Konformation, Hydratation und Ligandenbindung betrachtet. Die Struktur wurde sowohl mit der natürlichen RNA als auch mit anderen modifizierten Nukleinsäurestrukturen verglichen.

4.1 Kristallisationsversuche unter Mikrogravitationsbedingungen

Die Synthese der RNA hat mit der beschriebenen optimierten Methode qualitativ gut funktioniert, allerdings war die Ausbeute gemessen am Materialeinsatz niedrig. So konnten für die HAR1-RNA aus dem Schimpansen pro 100 U T7-Polymerase 22,05 pmol RNA synthetisiert werden. Für die ncRNA aus dem Menschen wurden pro 100 U T7-Polymerase 45,9 pmol reine RNA hergestellt. Für jeden Kristallisationsansatz in dem 1 µl RNA der Konzentration 0,5 mM eingesetzt wird, würden somit für die ncRNA des Schimpansen ca. 2.000 U und für die humane ncRNA ca. 1000 U T7-Polymerase benötigt.

Aufgrund dessen wurde die Konzentration der RNA für die Kristallisation auf 0,25 mM eingestellt und die Ansätze wurden ohne vorherige Tests nur unter den Bedingungen durchgeführt, unter denen ein Kristallisations-Screening für die Domäne der ncRNA erste Kristalle lieferte. Systematische Tests von Kristallisationsbedingungen der Vollängen-RNAs sind nur unter großem Materialeinsatz für die RNA-Synthese durchführbar.

Die Versuche der Sojus-TMA-13-Mission wurden in den USA von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Ng ausgewertet. Es konnten für mehrere Proben Kristalle beobachtet werden, jedoch waren diese entweder von schlechter Qualität oder haben sich auf dem Weg von Birmingham, Alabama, zum Argonne Advanced Photon Source-Synchrotron bei Chicago, Illinois, aufgelöst.

Daher wurde versucht bei der folgenden Sojus-TMA-16-Mission auf nicht notwendige Transportwege zu verzichten. Außerdem wurden nur noch Kristallisationsversuche nach der flüssig-flüssig-Diffusionsmethode angesetzt, da diese für die Tygonschläuche erfolgreicher war. Aufgrund dieser Modifikationen war die Kristallausbeute während der Sojus-TMA-16-Mission wesentlich besser. Eine Übersicht der Ergebnisse der Sojus-TMA-16-Mission ist in der Tabelle 4.1 dargestellt.

Die Tabelle zeigt Unterschiede in der Kristallausbeute für die Bodenkontrollversuche in Berlin und in Kasachstan. So konnten während der Bodenkontrollversuchen in Berlin für zwei tRNA-Akzeptorstämme und eine „locked“ Nukleinsäure Kristalle gezüchtet werden. In Kasachstan kristallisierten dahingegen fünf Nukleinsäurespezies: drei tRNA Akzeptorstämme, die unmodifizierte Domäne der ncRNA HAR1 aus dem Schimpansen und die LNA.

Tabelle 4.1: Beobachtete Kristalle während der Sojus-TMA-16-Mission

Substanz	μg	g (Berlin)	g (Kasachstan)
tRNA ^{Ser} -Akzeptorstamm RS-1660	x	x	x
tRNA ^{Arg} -Akzeptorstamm RR-1662	x	x	x
tRNA ^{Sec} -Akzeptorstamm RZ-1665			x
ncRNA HAR1 Domäne (S)	x		x
ncRNA HAR1 Domäne (M)	x		
ncRNA HAR1 LNA-modifizierte Domäne (S)	x		
ncRNA HAR1 LNA-modifizierte Domäne (M)	x		
ncRNA HAR1 (S)	x		
ncRNA HAR1 (M)	x		
LNA abgeleitet von RS-1661	x	x	x

Die meisten Kristalle lieferten die Experimente im Weltraum. Hier konnten Kristalle von neun verschiedenen Nukleinsäurearten beobachtet werden. Darunter waren drei tRNA-Akzeptorstamm-Mikrohelices, die unmodifizierten Domänen der ncRNA HAR1, die modifizierten Domänen der ncRNA und die Volllängen-ncRNAs, jeweils sowohl die humane RNA als auch die Form aus dem Schimpansen.

Wie die Beispiele in Abbildung 4.1 zeigen, konnten in allen Kristallisationsexperimenten ausschließlich Mikrokristalle gezüchtet werden. Da der innere Durchmesser der verwendeten Tygonschläuche 0,2 mm beträgt, wird deutlich dass die Abmessungen der Kristalle relativ gering sind.

Trotzdem wurden Röntgendiffraktionsexperimente mit Kristallen der tRNA-Akzeptorstämme RS-1660 und RR-1662 sowie der LNA am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY) in Hamburg durchgeführt. Die Diffraktion der vermessenen Kristalle war allerdings so schwach, dass eine Bestimmung der Raumgruppe oder der Zellkonstanten nicht möglich war. Dementsprechend eigneten sich die Kristalle letztlich nicht, um an einer konventionellen Synchrotronstrahlenquelle genügend Daten zur weiteren Prozessierung und für eine anschließende Strukturbestimmung zu sammeln.

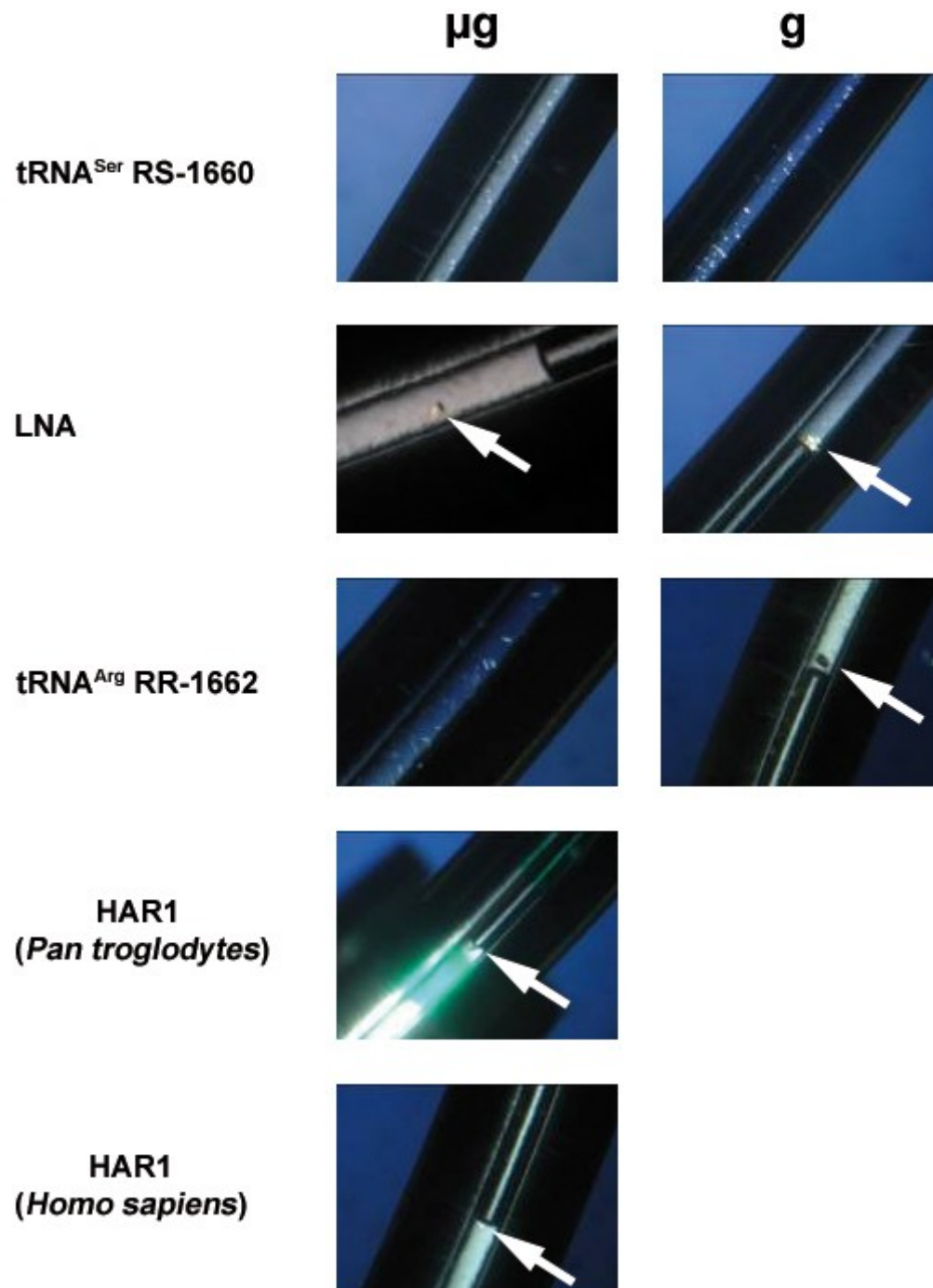


Abbildung 4.1: Beispiele für Kristalle der Sojus-TMA-16-Mission

μg – Unter Mikrogravitationsbedingungen gezüchtete Kristalle; g – Kristalle der Bodenkontrollversuche

4.2 tRNA^{Arg}-Akzeptorstamm-Isoakzeptor RR-1660 aus *E. coli*

4.2.1 Kristallisation

Die Sequenz des tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes RR-1660 entstammt dem Eintrag in der tRNA-Datenbank mit der Basenfolge 5'-G₁C₂A₃U₄C₅C₆G₇-3' – 5'-C₆₆G₆₇G₆₈A₆₉U₇₀G₇₁C₇₂-3'. Die RNA-Doppelhelix wurde einem systematischen Testverfahren verschiedener Kristallisationsbedingungen unter Benutzung der Hampton Research *Kits Matrix Formulation Kit* (HR2-116) mit 48 verschiedenen Kristallisationsbedingungen und dem 20 Bedingungen umfassenden *Nucleic Acid Mini Screen* (HR2-118) unterzogen. Die zunächst kleinen Kristalle konnten durch eine Optimierung der Bedingungen verbessert werden. Bereits nach 24 h konnte Kristallwachstum unter folgenden Bedingungen beobachtet werden: 0,5 M 2-(N-morpholino)-ethansulfonsäure (MES), pH 5,6, 10 mM Magnesiumchlorid, 2,0 M Lithiumsulfat bei 294 K. Die Konzentration der RNA betrug 0,5 mM. Die Kristallisation erfolgte nach der Methode des sitzenden Tropfens und die Kristalle hatten eine Größe von 0,2 x 0,05 x 0,05 mm. Abbildung 4.2 zeigt einen Kristall des tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes RR-1660.

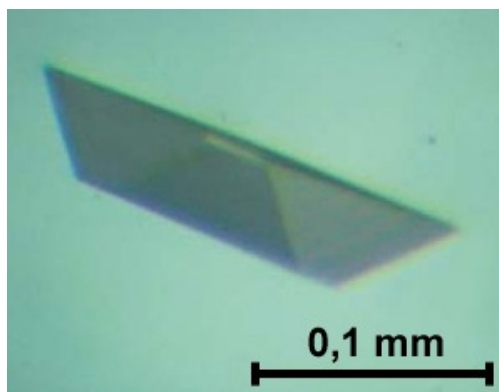


Abbildung 4.2: Repräsentativer Kristall des tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes RR-1660

Zur Vermeidung von Wassereisbildung beim Einfrieren wurden die Kristalle in eine Kryolösung mit folgender Zusammensetzung überführt: 0,5 M MES, pH 5,6, 10 mM Magnesiumchlorid, 2,0 M Lithiumsulfat und 20% (v/v) Glycerin. Das Glycerin wirkt hier als Kryoprotektans.

4.2.2 Datensammlung und -prozessierung

Die Vermessung der Kristalle erfolgte am Synchrotrone ELETTRA in Triest, Italien. Bei einer Wellenlänge von 1,00 Å wurde ein Datensatz im Auflösungsbereich von 40 – 1,7 Å aufgenommen. Dabei wurden 12.812 Reflexe aufgezeichnet von denen 7.118 einzigartige Reflexe waren, was einer Multiplizität von 1,8 entspricht. Die Daten wurden über den gesamten Auflösungsbereich von 40 – 1,7 Å mit einem R -Wert von $R_{\text{merge}} = 3,8\%$ und einer Vollständigkeit von 95% prozessiert.

Tabelle 4.2: Datensammlungs- und Prozessierungsstatistik des tRNA^{Arg}-Isoakzeptors RR-1660

Strahlenquelle	ELETTRA/XRD1 (BL 5.2R)
Wellenlänge	1,000 Å
Raumgruppe	<i>P</i> 1
Einheitszellparameter	$a = 26,28 \text{ Å}$, $b = 28,92 \text{ Å}$, $c = 29,00 \text{ Å}$, $\alpha = 105,74^\circ$, $\beta = 99,01^\circ$, $\gamma = 97,44^\circ$
Matthews-Koeffizient ($\text{Å}^3\text{Da}^{-1}$)	2,34
RNA-Duplexe pro asymmetrischer Einheit	2
Lösungsmittelgehalt (%)	59,6
gemessene Reflexe	12.812
einzigartige Reflexe	7.118
Redundanz	1,8 (1,7)
Auflösungsbereich (Å)	40 - 1,70 (1,73 - 1,70)
Vollständigkeit (%)	95,0 (93,2)
$R_{\text{merge}}^{\#}$ (%)	3,8 (16,5)

$\#R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \{I(hkl)\}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, dabei entsprechen $I_i(hkl)$ den gemessenen individuellen und $\{I(hkl)\}$ den durchschnittlichen Intensitäten eines Reflexes mit den Indizes hkl ; \sum_i ist die Summe über die individuellen Messungen eines Reflexes mit den Indizes hkl und \sum_{hkl} entspricht der Summe aller Reflexe. Daten in Klammern geben die Werte für die höchste Auflösungsschale an.

Der tRNA^{Arg}-Isoakzeptor RR-1660 kristallisiert in der triklinen Raumgruppe *P*1 mit zwei Molekülen pro asymmetrischer Einheit. Die Parameter der Einheitszelle sind:

$a = 26,28 \text{ \AA}$, $b = 28,92 \text{ \AA}$, $c = 29,00 \text{ \AA}$, $\alpha = 105,74^\circ$, $\beta = 99,01^\circ$, $\gamma = 97,44^\circ$. Der Matthews-Koeffizient wurde mit $2,34 \text{ \AA}^3\text{Da}^{-1}$ berechnet, was unter Berücksichtigung der Standardatomvolumen für RNA nach Voss und Gerstein (Voss et al., 2005) einem Wassergehalt von 59,6% entspricht. Eine Übersicht über die Datensammlungs- und Prozessierungsstatistik gibt Tabelle 4.2.

Da merohedrale Verzwilligung ein Problem ist, das bei kleinen Nukleinsäuren nicht selten anzutreffen ist, wurde der Datensatz mit dem Algorithmus von Padilla und Yeates auf Anzeichen für merohedrale Verzwilligung untersucht. Das Ergebnis entsprach dem eines theoretisch unverzwilligten Kristalls.

4.2.3 Struktur und Eigenschaften

Die Struktur der tRNA^{Arg}-Akzeptorstamm-Mikrohelix RR-1660 wurde mittels Molekularem Ersatz gelöst. Als Modell wurde die Struktur des humanen tRNA^{Gly}-Akzeptorstammes G9992 verwendet, dessen Sequenz unter Verwendung des Programmes *Coot* zu der des *E.coli* tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes geändert wurde. Nachdem der am Synchrotron aufgenommene Datensatz bis zu einer Auflösung von $1,7 \text{ \AA}$ prozessiert wurde, wurden die Daten während der Verfeinerung der Struktur bei einer Auflösung von $2,0 \text{ \AA}$ abgeschnitten.

Tabelle 4.3: Verfeinerungsstatistik des tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes RR-1660

R/R_{free}	21,1/25,5
Anzahl RNA-Atome	586
Anzahl Wasser-Sauerstoffatome	88
Anzahl Glyzerin-Atome	6
Rmsd Bindungslängen (Å)	0,019
Rmsd Bindungswinkel (°)	2,55

Dies führte zu einer Lösung mit R -Werten von $R/R_{\text{free}} = 21,1/25,5\%$. Die mittlere quadratische Abweichung (*root mean square deviation*, rmsd) für die

Bindungslängen beträgt 0,019 Å und die mittlere quadratische Abweichung der Bindungswinkel ist 2,55°. Tabelle 4.3 enthält die Daten der Verfeinerungsstatistik.

Die asymmetrische Einheit enthält zwei RNA Doppelstränge mit insgesamt 586 Atomen. Daran assoziiert sind 88 Wassermoleküle und es wurde ein Glycerinmolekül aus dem Kryopuffer detektiert, welches zwischen die beiden RNA-Moleküle eingelagert ist. Eine Stereo-Übersicht über die Gesamtstruktur des tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes zeigt Abbildung 4.3.

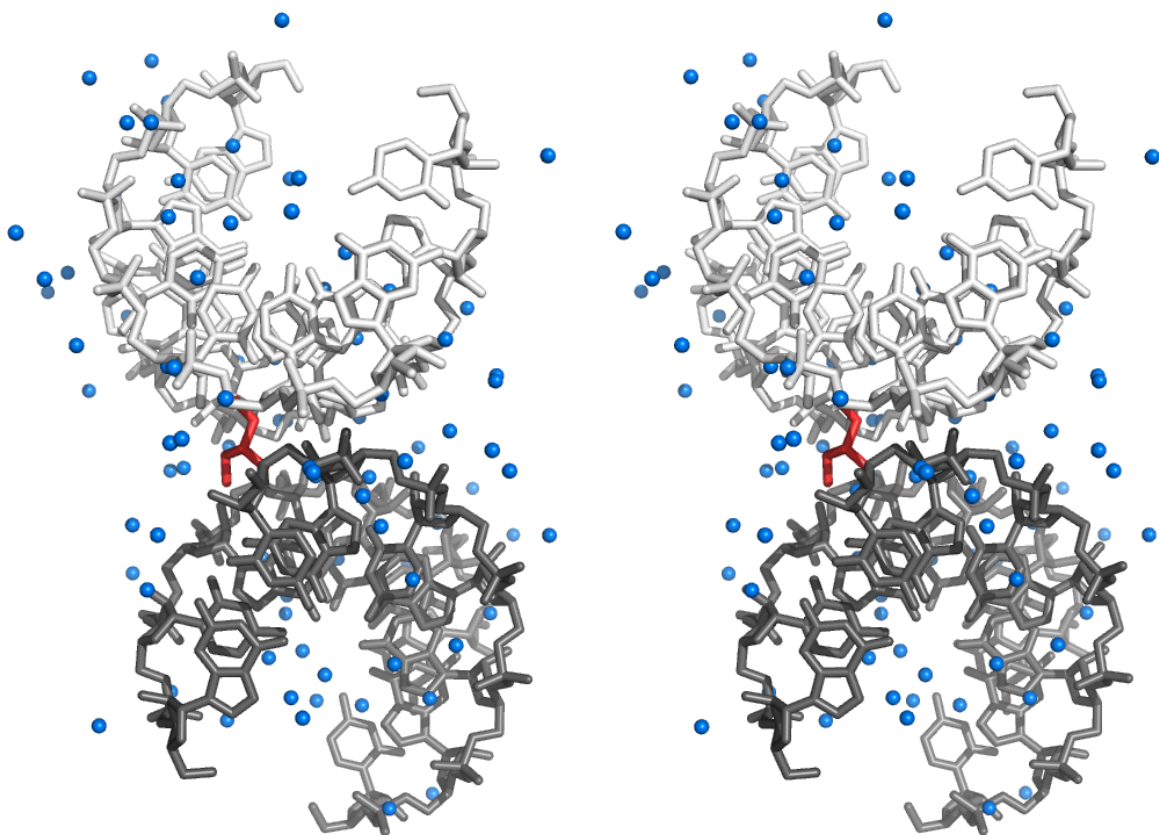


Abbildung 4.3: Stereoansicht der Gesamtstruktur des tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes RR-1660

Die Stereoansicht zeigt die beiden RNA-Moleküle der asymmetrischen Einheit (hellgrau und dunkelgrau), die gebundenen Wassermoleküle (blaue Kugeln) und das Glycerinmolekül aus dem Kryopuffer (rot).

Die helikalen Parameter des tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes, wie *Twist*, *Slide*, *Rise* und χ -*Displacement* sind ähnlich zu denen anderer untersuchter tRNA-Mikrohelicies. Die Konformation entspricht der Standard-A-RNA-Konformation und die lokalen und

gesamten helikalen Parameter sind im Bereich derer einer idealisierten A-RNA-Struktur. Dies trifft auf sämtliche Basenpaare beider RNA-Doppelstränge zu. Auch an den Enden der beiden Nukleinsäuremoleküle, wo es durch Kristallpackungskräfte zu ungewöhnlichen Konformationserscheinungen kommen kann, wurden keine Abweichungen beobachtet. Eine Übersicht ausgewählter helikaler Parameter der tRNA^{Arg}-MikroheliX zeigt Tabelle 4.4.

Tabelle 4.4: Ausgewählte helikale Parameter der tRNA^{Arg}-MikroheliX

	<i>Twist</i> (°)	<i>Slide</i> (Å)	<i>Rise</i> (Å)	<i>χ-Displacement</i> (Å)
GC / GC	32,24	-1,68	3,10	-3,38
CA / UG	34,41	-1,45	3,44	-3,88
AU / AU	24,06	-1,57	3,19	-4,73
UC / GA	35,37	-1,05	3,33	-1,99
CC / GG	32,06	-1,72	3,14	-4,42
CG / CG	32,81	-1,60	3,23	-3,75
∅	31,82 ± 4,02	-1,51 ± 0,24	3,24 ± 0,12	-3,69 ± 0,96
GC / GC	28,99	-1,74	3,13	-4,57
CA / UG	35,71	-1,31	3,53	-3,29
AU / AU	27,90	-1,37	3,03	-4,03
UC / GA	36,21	-1,03	3,22	-2,36
CC / GG	29,41	-1,53	3,23	-4,52
CG / CG	37,60	-1,14	3,30	-2,81
∅	32,63 ± 4,31	-1,35 ± 0,26	3,24 ± 0,17	-3,60 ± 0,92

Die Daten der beiden RNA-Moleküle der asymmetrischen Einheit sind durch verschiedene Grautöne voneinander unterschieden.

Die α - und ζ -Torsionswinkel des Phosphatrückgrates nehmen die (-) *gauche*, die γ - und δ -Torsionswinkel die (+) *gauche*-Konformation ein und die β -Torsionswinkel liegen sämtlich, die ε -Torsionswinkel überwiegend in der *trans*-Konformation um +/- 180° vor. Eine Übersicht aller Torsionswinkel ist im Anhang gegeben. Die Zucker-

konformation ist für alle Nukleotide die C3'-*endo*-Konformation, was die typische A-RNA-Konformation der untersuchten Ribonukleinsäure bestätigt.

4.2.4 Hydratation der RNA und Liganden

Die tRNA^{Arg}-Mikrohelix ist von einem Hydratationsnetzwerk aus 88 Wassermolekülen umgeben. Das Hydratationsmuster stimmt mit den generellen Regeln für RNA-Hydratisierung überein, wobei durch die mittlere Auflösung von 2,0 Å nicht alle Basenpaare eine vollständig besetzte Hydrathülle aufweisen. Ein Beispiel für ein vollständig hydratisiertes Basenpaar, sind die Nukleotide U70-A3, dargestellt in Abbildung 4.4.

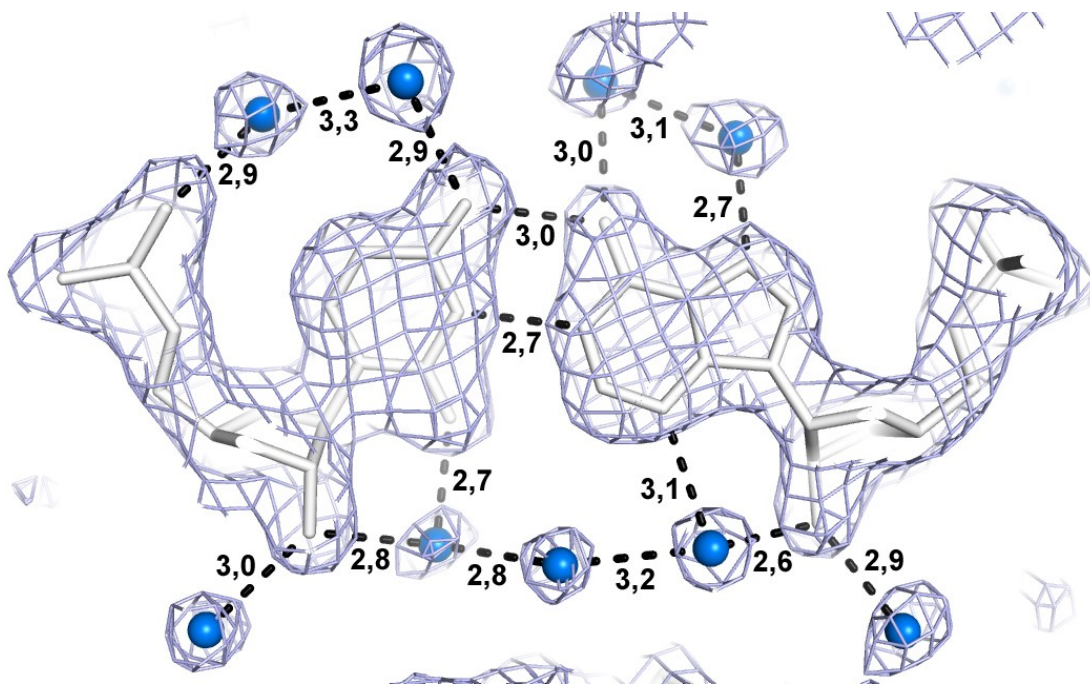


Abbildung 4.4: Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte des tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes

Gezeigt ist das Basenpaar A3-U70. Blaue Kugeln stellen Wassermoleküle dar. Entfernungen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Das Basenpaar A3-U70 ist komplett von einem Wassernetzwerk umgeben. Die Wassermoleküle sind dabei sowohl in der kleinen als auch in der großen Furche vollständig enthalten. In der kleinen Furche sind drei Wassermoleküle gebunden.

Jeweils eines ist direkt an die Nukleotide A3 und U70 gebunden und ein weiteres interagiert über Wasserstoffbrückenbindungen mit den beiden nukleotidgebundenen Wassermolekülen. Adenosin 3 bindet ein Wassermolekül über das endozyklische Stickstoffatom N3 und über die 2'-Hydroxylgruppe der Ribose. Uridin 70 bindet ein Wassermolekül ebenfalls durch Kontakt mit der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose und einen weiteren Kontakt mit dem exozyklischen Sauerstoffatom O2. Zwei weitere Wassermoleküle stehen in Kontakt zu den beiden 2'-Hydroxylgruppen der Nukleotide.

In der großen Furche sind vier Wassermoleküle gebunden. Es stehen jeweils zwei Wasser in direktem Kontakt zu den Basen A3 und U70. Dabei ist ein Wassermolekül an das endozyklische Stickstoffatom N7 und ein weiteres an die exozyklische Aminogruppe des Adenosin 3 gebunden. Beide Wassermoleküle bilden auch untereinander eine Wasserstoffbrückenbindung aus. Die beiden an das Nukleotid U70 gebundenen Wassermoleküle bilden Wasserstoffbrücken mit dem exozyklischen Sauerstoffatom O4 und einem Sauerstoffatom der Phosphatgruppe des Rückgrats. Auch diese beiden Wassermoleküle sind durch eine Wasserstoffbrückenbindung miteinander verbunden.

Darüber hinaus ist an die Struktur der Nukleinsäure ein Glycerinmolekül gebunden, was aus der Datensammlung unter Tieftemperaturbedingungen resultiert, da es dem Kryopuffer entstammt. Das Glycerin befindet sich an der Schnittstelle der beiden RNA-Doppelstränge der asymmetrischen Einheit.

Abbildung 4.5 (A) zeigt die beiden RNA-Moleküle der asymmetrischen Einheit, umgeben von Wassermolekülen und mit gebundenem Glycerin. Durch die Zusammenlagerung der RNA-Doppelstränge an den kleinen Furchen ist ein Kanal entstanden, in den Wassermoleküle eingelagert sind. Am Ende dieses Kanals ist das Glycerinmolekül angelagert.

Noch deutlicher wird dies in Abbildung 4.5 (B), in der die Oberfläche der beiden RNA-Moleküle vereinheitlicht betrachtet wird. Der Kanal ist hier deutlicher erkennbar und an dessen Ende hat sich eine Bindungstasche gebildet. In diese ist das Glycerinmolekül durch Wechselwirkungen mit einzelnen Nukleotiden entweder direkt oder indirekt - über Wasserbrücken - eingebettet.

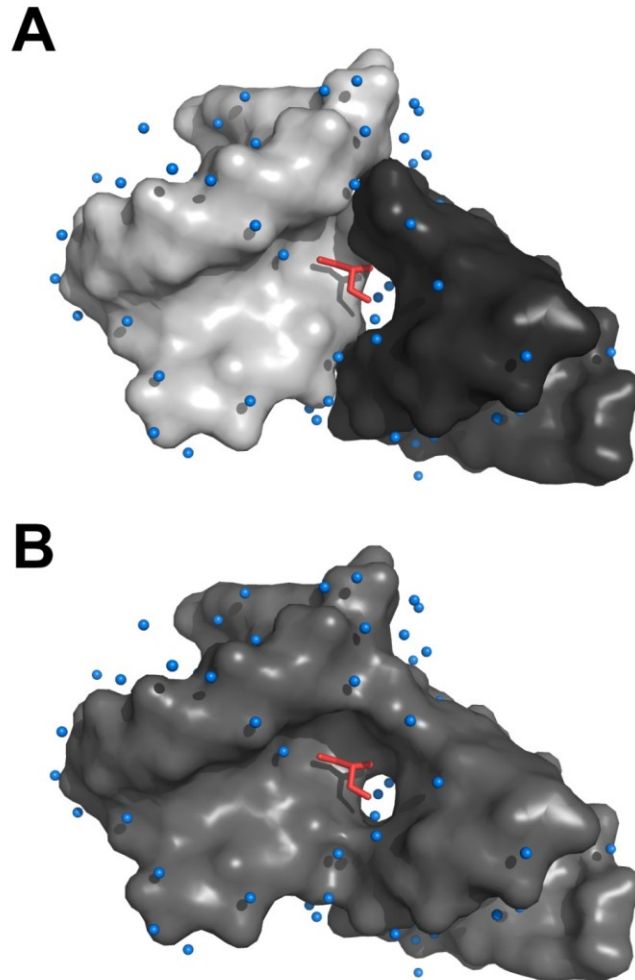


Abbildung 4.5: Bindung des Glycerinmoleküls an die tRNA^{Arg}-MikroheliX RR-1660

(A): Die Oberflächen der beiden tRNA-Doppelstränge der asymmetrischen Einheit sind in unterschiedlichen Grautönen dargestellt. (B): Die Oberflächen der beiden RNA-Moleküle sind vereinheitlicht gezeigt. Das Glycerinmolekül ist rot gefärbt. Blaue Kugeln stellen Wassermoleküle dar.

Die Bindung des Glycerinmoleküls an die RNA-Moleküle ist detailliert in Abbildung 4.6 gezeigt. Dabei ist das Glycerin über vier Wasserstoffbrückenbindungen direkt an einzelne Nukleotide koordiniert und über ein Wassermolekül bildet es zwei zusätzliche Kontakte zu einem weiteren RNA-Baustein aus.

Die erste Hydroxylgruppe des 1,2,3-Propantriols bindet an das endozyklische Stickstoffatom N3 des Adenosins 69 der ersten RNA-Doppelhelix. Das Glycerinmolekül bildet über seine sekundäre Hydroxylgruppe zwei Kontakte zum

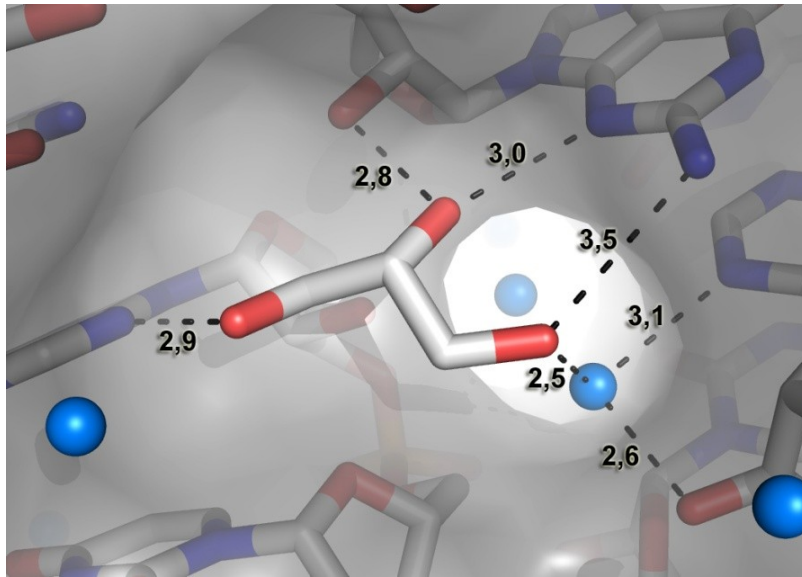


Abbildung 4.6: Detailansicht der Bindung des Glycerinmoleküls an den tRNA^{Arg}-Akzeptorstamm RR-1660

Die Atome der Nukleinsäuren und des Glycerinmoleküls sind folgendermaßen farbkodiert: Sauerstoff – rot, Stickstoff – blau, Kohlenstoff – grau, Phosphor – orange. Blaue Kugeln zeigen Wassermoleküle. Entfernungen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Guanosin 71 der zweiten RNA-Doppelhelix aus. Dabei kommt es zu Wasserstoffbrückenbindungen mit der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose und mit dem endozyklischen Stickstoffatom N3. Die dritte Hydroxylgruppe des dreiwertigen Alkohols ist zum einen in direktem Kontakt mit der exozyklischen Aminogruppe des Guanosins 71, zu dem auch die beiden vorher beschriebenen Wasserstoffbrücken bestehen. Zum anderen bildet die Hydroxylgruppe des Alkohols über ein Wassermolekül indirekte Kontakte zur 2'-OH-Gruppe der Ribose und dem endozyklischen Stickstoff N3 des Adenosins 3 der zweiten RNA-Helix aus.

4.3 tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm-Mikrohelix RS-1661

4.3.1 Kristallisation

Die Sequenz des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661 ist der tRNA-Datenbank entnommen und lautet: 5'-G₁G₂U₃G₄A₅G₆G₇-3' – 5'-C₆₆C₆₇U₆₈C₆₉A₇₀C₇₁C₇₂-3'. Nach der Hybridisierung wurde die RNA-Doppelhelix mit einer Konzentration von 0,5 mM in einem systematischen Testverfahren zur Bestimmung von Kristallisationsbedingungen eingesetzt. Dabei wurden das *Nucleic Acid Mini Screen Kit* (HR2-118) mit 24 verschiedenen Bedingungen und das *Natrix Formulation Kit* (HR2-116) mit 48 verschiedenen Kristallisationsbedingungen verwendet. Beide *Kits* stammen von Hampton Research.

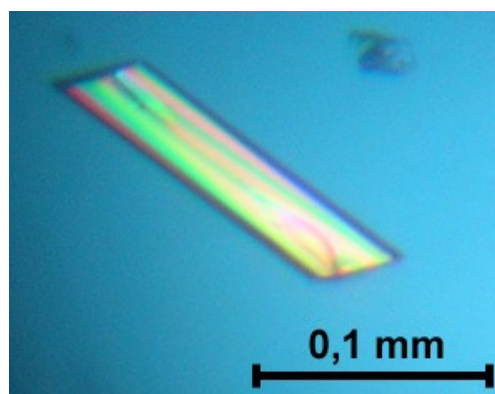


Abbildung 4.7: Repräsentativer Kristall der tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm-Mikrohelix RS-1661

Nach wenigen Tagen konnte unter folgenden Bedingungen regelmäßiges und reproduzierbares Kristallwachstum beobachtet werden: 10% (v/v) 2-Methyl-2,4-pentandiol (MPD), 40 mM Natriumcacodylat, pH 5,5, 20 mM Kobalthexamin, 80 mM Natriumchlorid und 20 mM Magnesiumchlorid bei einer Temperatur von 294 K. Als Reservoirlösung wurde 1 ml 35% (v/v) MPD verwendet. Die Kristalle konnten ohne weitere Optimierung zur Messung verwendet werden. Außerdem wirkt das MPD als Kryoprotektans, was eine Äquilibration der Kristalle vor dem Einfrieren in einem separaten Kryopuffer obsolet machte. Abbildung 4.7 zeigt einen Kristall des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes.

4.3.2 Datensammlung und -prozessierung

Die Datensammlung erfolgte am Synchrotrone ELETTRA in Triest, Italien. Es konnte ein hochaufgelöster Datensatz bis zu einer Auflösung von 1,0 Å aufgenommen werden. Während der Datenprozessierung zeigten die R-Werte jedoch, dass eine sinnvolle Auswertung nur in einem Auflösungsbereich von 120 - 1,2 Å möglich war. Es wurden 91.016 Reflexe gemessen, von denen 12.806 einzigartige Reflexe waren. Dies entspricht einer Redundanz von 7,1. Die Vollständigkeit des Datensatzes betrug 99,2% und der R_{merge} der prozessierten Daten war $R_{\text{merge}} = 7,4\%$.

Tabelle 4.5: Datensammlungs- und Prozessierungsstatistik des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661

Strahlenquelle	ELETTRA/XRD1 (BL 5.2R)
Wellenlänge	1,000 Å
Raumgruppe	C2
Einheitszellparameter	$a = 35,79 \text{ Å}$, $b = 39,13 \text{ Å}$, $c = 31,37 \text{ Å}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 111,1^\circ$, $\gamma = 90^\circ$
Matthews-Koeffizient (Å ³ Da ⁻¹)	2,33
RNA-Duplexe pro asymmetrischer Einheit	1
Lösungsmittelgehalt (%)	59,4
gemessene Reflexe	91.016
einzigartige Reflexe	12.806
Redundanz	7,1 (15,4)
Auflösungsbereich (Å)	120,0 - 1,20 (1,22 - 1,20)
Vollständigkeit (%)	99,2 (99,1)
$R_{\text{merge}}^{\#}(\%)$	7,4 (15,4)

$R_{\text{merge}}^{\#} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \{I(hkl)\}| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$, dabei entsprechen $I_i(hkl)$ den gemessenen individuellen und $\{I(hkl)\}$ den durchschnittlichen Intensitäten eines Reflexes mit den Indizes hkl ; \sum_i ist die Summe über die individuellen Messungen eines Reflexes mit den Indizes hkl und \sum_{hkl} entspricht der Summe aller Reflexe.

Daten in Klammern geben die Werte für die höchste Auflösungsschale an.

Der tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm kristallisiert in der monoklinen Raumgruppe C2 mit den Zellkonstanten: $a = 35,79 \text{ \AA}$, $b = 39,13 \text{ \AA}$, $c = 31,37 \text{ \AA}$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 111,1^\circ$. Der Matthews-Koeffizient wurde mit $2,33 \text{ \AA}^3\text{Da}^{-1}$ berechnet, was unter Einbeziehung der Standardatomvolumen für RNA nach Voss und Gerstein einem Wassergehalt des Kristalls von 59,4% entspricht. Eine Übersicht der Datensammlungs- und Prozessierungsstatistik gibt Tabelle 4.5.

Die Daten wurden mit dem Algorithmus von Padilla und Yeates nach Hinweisen auf merohedrale Verzwilligung untersucht, da diese Art von Kristallunregelmäßigkeit schon mehrfach bei Kristallen kurzer Nukleinsäuren beobachtet wurde. Die Analyse zeigte das Ergebnis eines theoretisch unverzwilligten Kristalls.

4.3.3 Struktur und Eigenschaften

Die Struktur des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes wurde mittels Molekularem Ersatz gelöst. Als Suchmodell diente die Struktur des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1660 aus *E.coli* dessen Sequenz mit Hilfe des Programmes *Coot* zu der des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661 geändert wurde. Die erhaltene Lösung wurde über den Auflösungsbereich von 80 – 1,2 Å verfeinert bis sich die *R*-Werte bei $R/R_{\text{free}} = 19,0/20,1\%$ nicht weiter verringerten. Die mittlere quadratische Abweichung (*root mean square deviation*, rmsd) der Bindungslängen betrug 0,036 Å, die mittlere quadratische Abweichung der Bindungswinkel 2,783°.

Tabelle 4.6: Verfeinerungsstatistik des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661

R/R_{free}	19,0/20,1
Anzahl RNA-Atome	293
Anzahl Wasser-Sauerstoffatome	97
Anzahl Magnesium-Atome	2
Rmsd Bindungslängen (Å)	0,036
Rmsd Bindungswinkel (°)	2,783

Die Struktur der tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm-Mikrohelix RS-1661 enthält ein RNA-Molekül pro asymmetrischer Einheit mit 293 RNA-Atomen. Weiterhin wurden 97 Wassermoleküle sowie zwei an die RNA gebundene Magnesiumionen detektiert. Die Datenverfeinerungsstatistik im Überblick zeigt Tabelle 4.6, eine Stereoansicht der Gesamtstruktur ist in Abbildung 4.8 gezeigt.

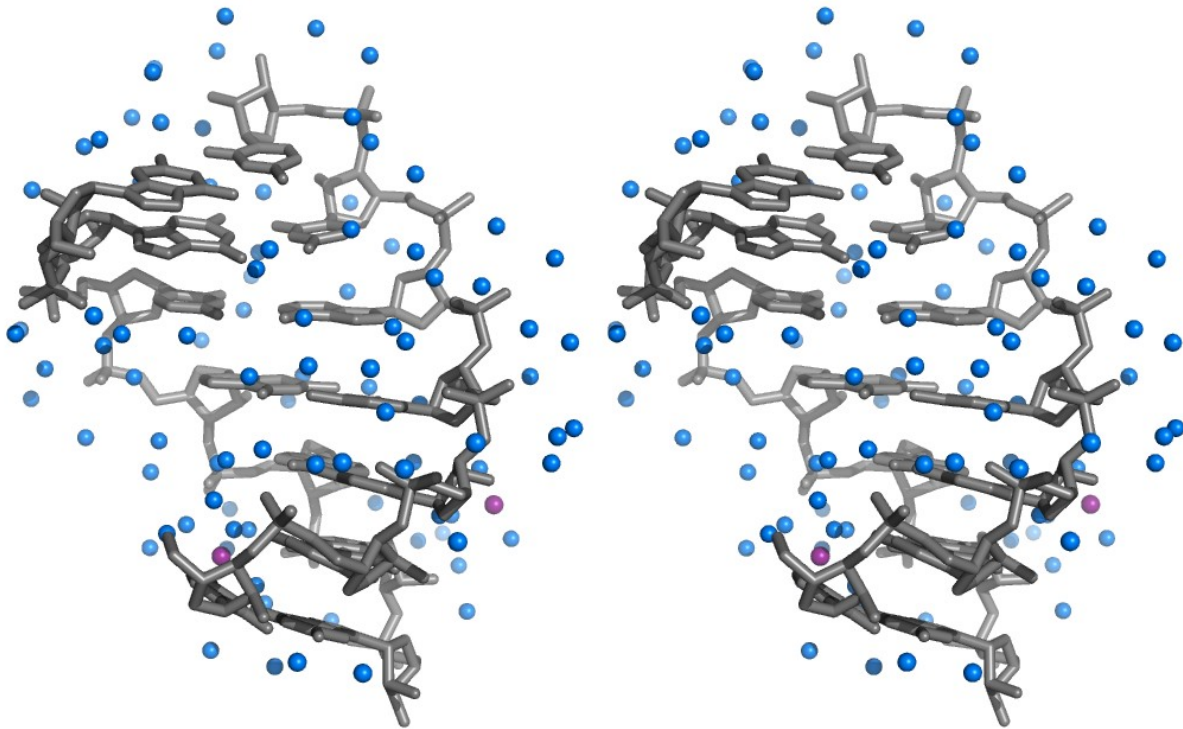


Abbildung 4.8: Stereoansicht der Struktur des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661

Die Nukleinsäure ist grau dargestellt. Blaue Kugeln stellen Wassermoleküle, magentafarbene Magnesiumionen dar.

Die RNA liegt in der Standard-A-RNA-Konformation vor. Die Zuckerkonformation ist für alle Nukleotide die C3'-*endo*-Konformation. Die α - und ζ -Torsionswinkel des Phosphatrückgrates nehmen die (-) *gauche*-, die γ - und δ -Torsionswinkel die (+) *gauche*-Konformation ein und die β -Torsionswinkel liegen sämtlich, die ε -Torsionswinkel überwiegend in der *trans*-Konformation um +/- 180° vor. Eine Anomalie weisen die α - und γ -Torsionswinkel am Guanosin 4 auf, die entgegen der Erwartung nicht die (+) bzw. (-) *gauche*-Konformation einnehmen. Stattdessen liegt der α -Torsionswinkel mit 147,1° nahe der *trans*-Konformation, die der γ -

Torsionswinkel mit $-175,2^\circ$ aufweist. Alle Torsionswinkel sind im Anhang als Übersicht angegeben.

Tabelle 4.7: Ausgewählte helikale Parameter der tRNA^{Ser}-Mikrohelix RS-1661

	<i>Twist</i> (°)	<i>Slide</i> (Å)	<i>Rise</i> (Å)	<i>χ-Displacement</i> (Å)
GC / CC	30,82	-2,04	3,38	-4,68
GU / AC	31,78	-1,27	3,10	-3,59
UG / CA	24,40	-2,04	3,25	-6,61
GA / UC	34,86	-1,84	3,19	-3,88
AG / CU	30,59	-1,32	3,41	-3,37
GG / CC	36,52	-1,58	3,23	-3,40
∅	31,49 ± 4,20	-1,68 ± 0,34	3,26 ± 0,12	-4,25 ± 1,25

Auch die helikalen Parameter des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes bestätigen die Standard-A-RNA-Konformation der untersuchten Nukleinsäure. Sie liegen im Bereich einer idealisierten RNA-Struktur. Ausgewählte helikale Parameter der tRNA^{Ser}-Mikrohelix RS-1661 zeigt die Tabelle 4.7.

4.3.4 Hydratation der RNA und Liganden

An die Struktur des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes sind 97 Wassermoleküle gebunden. Die Wasseranlagerung an die RNA folgt auch hier im Wesentlichen den allgemeinen Hydratationsregeln für Nukleinsäuren. Exemplarisch ist das dichte Solvensnetzwerk am Basenpaar A5-U68 in Abbildung 4.9 gezeigt.

Eine extensive Hydratisierung der Nukleotide ist im Bereich der großen Furche erkennbar. Hier sind jeweils drei Wassermoleküle direkt an die Nukleotide Adenosin 5 bzw. Uridin 68 der RNA gebunden. Zwei weitere Wasser stehen über die Bindung an jeweils zwei RNA-assoziierte Wassermoleküle in indirektem Kontakt zur Nukleinsäure.

damit das Solvensnetzwerk in der Region der großen Furche des Basenpaares A5-U68.

Vier weitere Wassermoleküle sind in der Region der kleinen Furche gebunden. Jeweils eines steht mit der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose der Nukleotide in Kontakt. An die Base A5 ist ein weiteres Wassermolekül mit dem endozyklischen Stickstoffatom N3 assoziiert. U68 bindet ein zweites Wasser über das exozyklische Sauerstoffatom O2.

Neben diesem ausgeprägten Wassernetzwerk enthält die Struktur des Seryl-tRNA-Akzeptorstammes auch zwei an die Nukleinsäure gebundene hydratisierte Magnesiumionen. Die erste der beiden Magnesiumbindungsstellen liegt in der großen Furche in direkter Nachbarschaft zu den Nukleotiden G6 und G7. Kontakte zwischen der RNA und dem Magnesiumion sind dabei indirekter Natur und werden durch Wassermoleküle vermittelt. Abbildung 4.10 zeigt die erste der beiden Magnesiumbindungsstellen der tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm-Mikrohelix RS-1661.

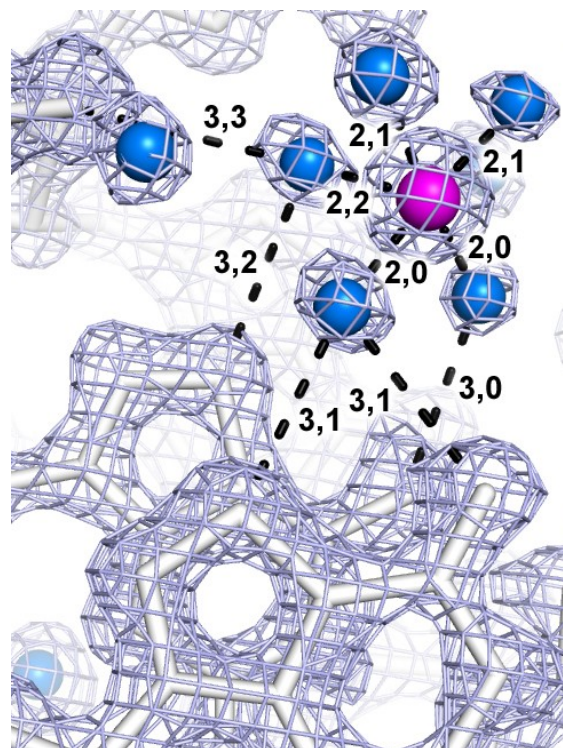


Abbildung 4.10: Erste Magnesiumbindungsstelle des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte. Die Nukleinsäure ist grau, das Magnesiumion magentafarben gezeigt. Blaue Kugel repräsentieren Wassermoleküle. Entfernungen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Das Magnesiumion liegt hier fünffach Wasser-koordiniert vor. Drei der Wassermoleküle der Hydrathülle des Magnesiums haben gleichzeitig eine Brückenfunktion für die Bindung an die RNA. Eines der beiden Wassermoleküle bildet hierbei Wasserstoffbrückenbindungen zum endozyklischen Stickstoffatom N7 und der exozyklischen Ketogruppe des Nukleotids G7 aus. Das zweite Wassermolekül stellt eine Verbindung zur exozyklischen Ketogruppe des Guanosins 6 her. Das dritte Wassermolekül ist über Wasserstoffbrückenbindungen zum einen an das endozyklische Stickstoffatom N7 des Nukleotids G6 und zum anderen an ein Sauerstoffatom der Phosphatgruppe des Zuckerphosphatrückgrats der RNA gebunden.

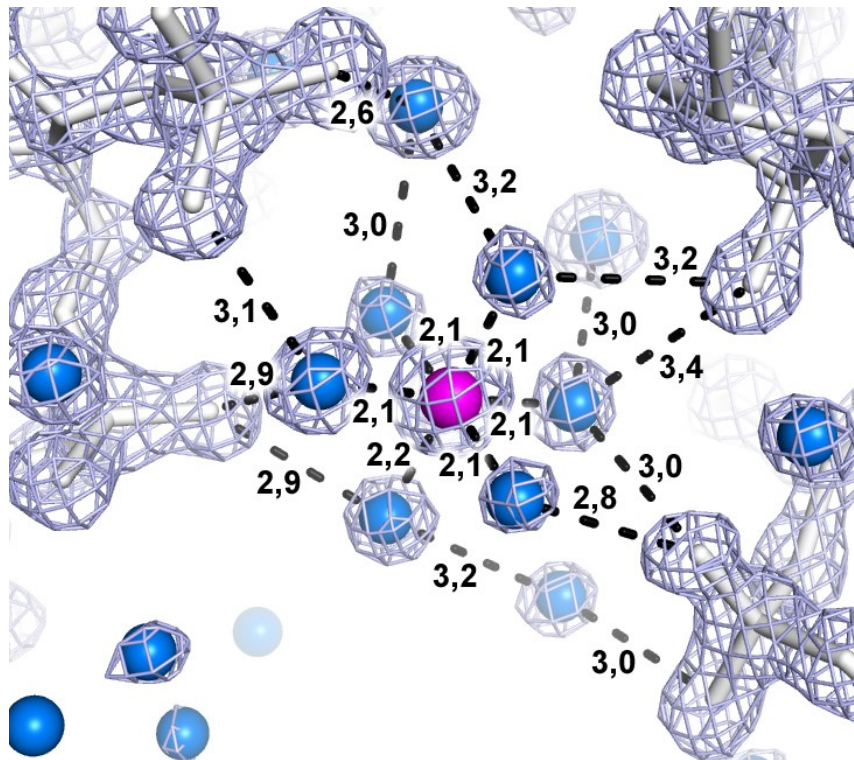


Abbildung 4.11: Zweite Magnesiumbindungsstelle der tRNA^{Ser}-Mikrohelix RS-1661

Das magentafarben dargestellte Magnesiumion ist sechsfach von blau dargestellten Wassermolekülen koordiniert. Es werden Wasserstoffbrückenbindungen zum Zuckerphosphatrückgrat verschiedener symmetrieäquivalenter Nukleinsäuremoleküle ausgebildet. Entfernungen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Die zweite Magnesiumbindungsstelle ist in der kleinen Furche der RNA lokalisiert. Sie befindet sich auch in der Nachbarschaft zum Guanosin 6 und liegt damit in

Relation zur ersten Magnesiumbindungsstelle auf der gegenüberliegenden Seite des Nukleotids. Abbildung 4.11 zeigt die Einbindung des Magnesiumions in das ausgeprägte Solvensnetzwerk am Zuckerphosphatrückgrat der RNA. Dieses Magnesium ist vollständig hexakoordiniert von Wassermolekülen umgeben, die ihrerseits entweder mit weiteren Wassermolekülen oder mit der Nukleinsäure in Kontakt stehen.

Die Hydrathülle des Magnesiumions bildet zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit der 2'-Hydroxylgruppe der Ribose des Guanosins 6 aus. Fünf weitere Wasserstoffbrücken stellen die Verbindung zu symmetrieäquivalenten RNA-Molekülen des Kristallgitters her. Die Bindung erfolgt über Sauerstoffatome der Phosphatgruppen der jeweiligen Nukleinsäuren.

Das hydratisierte Magnesiumion ist darüber hinaus in das Wassernetzwerk dieser Region eingebunden. So zeigt die Abbildung 4.11 Kontakte zu drei weiteren Wassermolekülen. Diese stellen ihrerseits teilweise weitere Kontakte zu den Nukleinsäuremolekülen in dieser Region des Kristalls her.

4.4 Vergleich des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661 mit dem tRNA^{Ser}-Isoakzeptor RS-1660 aus *E.coli*

Die hier beschriebene tRNA^{Ser}-Mikrohelix RS-1661 wurde mit der bereits zuvor aufgeklärten Struktur des tRNA^{Ser}-Isoakzeptors RS-1660 (Forster et al., 2007a) hinsichtlich der Hydratationsmuster und Ligandenbindungsstellen verglichen. Dazu wurde eine Superpositionierung mit dem Programm *Pymol* durchgeführt und die übereinandergelagerten Strukturen im Hinblick auf wesentliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede untersucht.

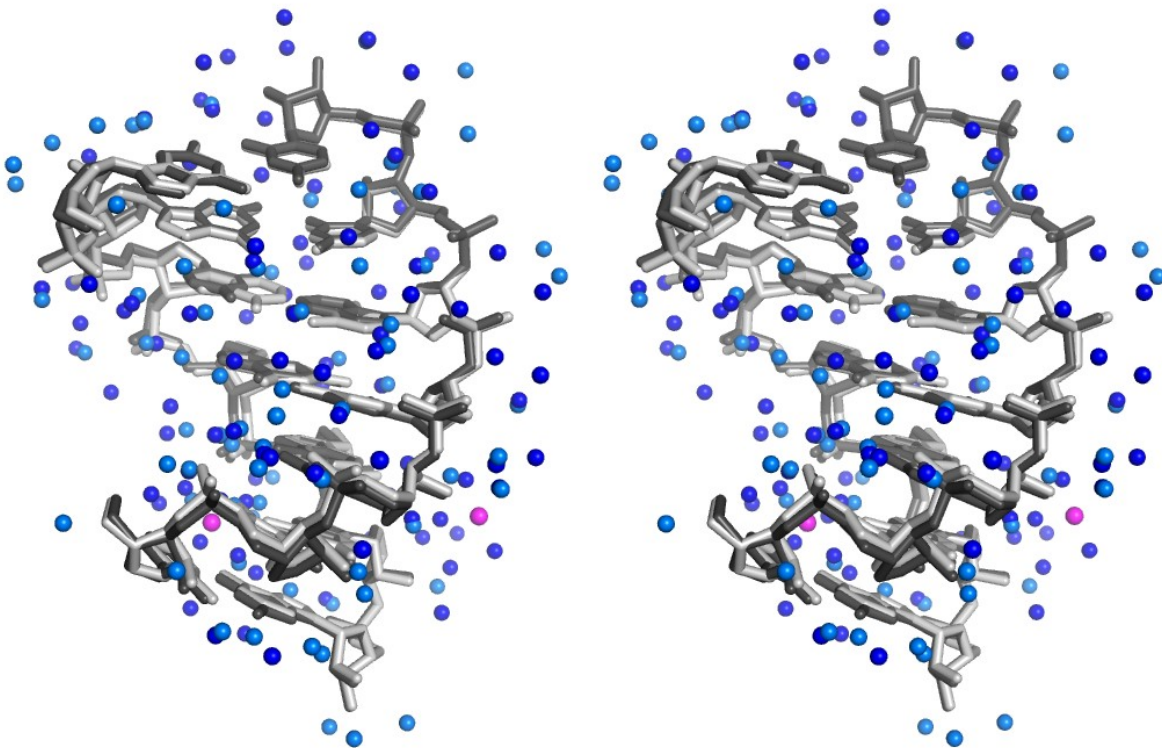


Abbildung 4.12: Stereoansicht der übereinandergelagerten tRNA^{Ser}-Isoakzeptoren RS-1660 und RS-1661

Die übereinandergelagerten Nucleinsäuremoleküle sind grau, Wassermoleküle als blaue Kugeln und die Magnesiumionen magentafarben dargestellt. Hellgrau und –blau ist die Struktur tRNA^{Ser}-Isoakzeptors RS-1660 und dunkelgrau bzw. –blau die Struktur des tRNA^{Ser}-Isoakzeptors RS-1661 gezeigt. Die Magnesiumionen entstammen der Struktur des RS-1661-Akzeptorstammes.

Die Sequenzen der beiden tRNA^{Ser}-Isoakzeptoren RS-1660 und RS-1661 aus *E.coli* unterscheiden sich durch einen natürlicherweise vorkommenden Austausch von zwei Basenpaaren. Die Sequenz des RS-1660-Isoakzeptors ist 5'-G₁G₂A₃G₄A₅G₆A₇-3' – 5'-U₆₆C₆₇U₆₈C₆₉U₇₀C₇₁C₇₂-3'; die Unterschiede zum RS-1661-Isoakzeptor sind die Basenpaare 3-70 und 7-66.

Beide tRNA^{Ser}-Akzeptorstämme kristallisieren in der Raumgruppe C2 mit ähnlichen Einheitszellparametern und einer RNA-Duplex pro asymmetrischer Einheit. Die Auflösung des RS-1660-Isoakzeptors lag bei 1,8 Å und ging mit der Detektion von 75 assoziierten Wassermolekülen einher. Dies sind 22 weniger als in der Struktur des RS-1661-Aminoacylstammes. Außerdem enthält die Struktur des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1660 keine gebundenen Magnesiumionen. Eine Stereoansicht der beiden übereinandergelagerten Strukturen zeigt Abbildung 4.12.

4.4.1 Hydratation der RNAs

Im Folgenden sollen die Hydratationsmuster der beiden tRNA^{Ser}-Isoakzeptoren verglichen werden. Es konnten grundlegende Unterschiede und Gemeinsamkeiten gefunden werden, wie die Vergleiche der Identitätsmerkmale, das Basenpaar G2-C71 und das Nukleotid C72, sowie die in die Bindung an die Seryl-tRNA-Synthetase involvierten Nukleotide C69 und C68 deutlich machen.

Das Identitätsbasenpaar G2-C71 ist in Abbildung 4.13 (A) gezeigt. Vier Wasserpositionen sind in beiden Strukturen nahezu identisch, jeweils zwei in der großen und der kleinen Furche. Weiterhin haben einige Wassermoleküle eine ähnliche Position in Nachbarschaft zum Identitätsbasenpaar, während andere Wasserpositionen nur in einer der beiden Strukturen nachgewiesen werden konnten. Interessant ist das Wassermolekül in der großen Furche, welches nicht direkt an eine der beiden Basen gebunden ist. Es stellt je eine Verbindung zum Nukleotid G2 und zum C71 indirekt über benachbarte Wassermoleküle her. Diese Position konnte in der Nachbarschaft anderer GC-Basenpaare nicht gefunden werden.

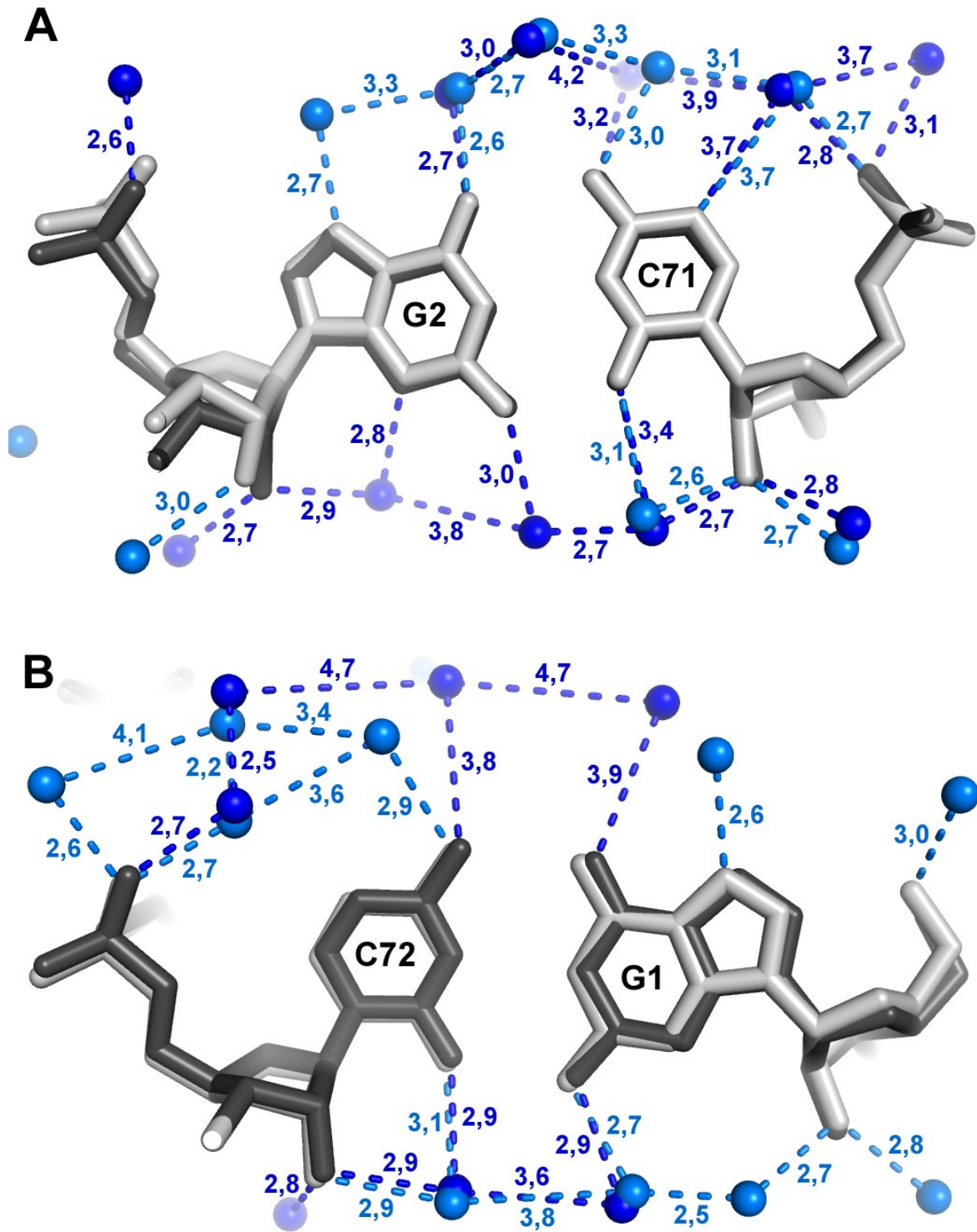


Abbildung 4.13: Vergleich der Hydratationsmuster bei tRNA^{Ser}-Identitätselementen

Dargestellt sind das Identitätsbasenpaar G2-C71 (A) und das Nukleotid C72 als Basenpaar G1-C72 (B). Helle Farben kennzeichnen den tRNA^{Ser}-Isoakzeptor RS-1660 und dunkle Farben den Isoakzeptor RS-1661. Blaue Kugeln stellen Wassermoleküle dar. Entfernungen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

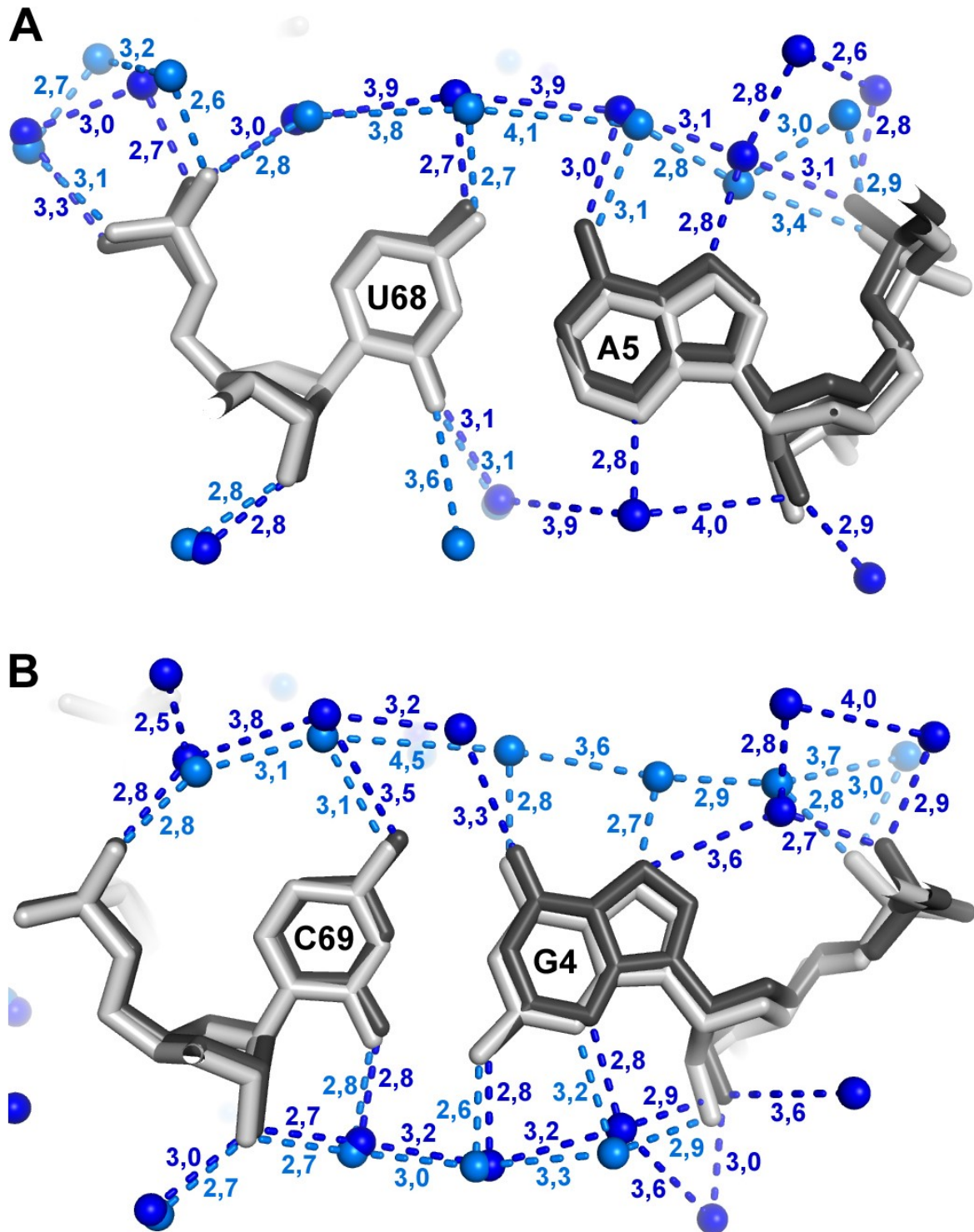


Abbildung 4.14: Vergleich der Hydratationsmuster von mit der Seryl-tRNA-Synthetase in Kontakt stehenden Nukleotiden

Dargestellt sind die mit der Synthetase in Kontakt stehenden Nukleotide U68 und C69, als Basenpaare U68-A5 (A) bzw. C69-G4. (B). Helle Farben kennzeichnen den tRNA^{Ser}-Isoakzeptor RS-1660 und dunkle Farben den Isoakzeptor RS-1661. Blaue Kugeln stellen Wassermoleküle dar. Entfernungen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Abbildung 4.13 (B) zeigt das Nukleotid C72, das auch zu den tRNA^{Ser}-Identitätsmerkmalen gehört, im Paar mit dem Nukleotid Guanosin 1. Da es Prsich bei diesem Basenpaar, um ein endständiges handelt, entspricht die Hydratation nicht komplett den Standardregeln für RNA-Hydratisierung. Trotzdem ist die Wasserdistribution im Bereich der kleinen Furche in weiten Bereichen identisch. Im Gegensatz dazu lässt das Hydratisierungsmuster in der großen Furche keine Aussage über Gemeinsamkeiten in Bezug auf mögliche Kontaktstellen für Interaktionspartner zu.

In Abbildung 4.14 sind die in Kontakt mit der Seryl-tRNA-Synthetase stehenden Nukleotide U68 und C69 in Form der Basenpaare A5-U68 (Abbildung 4.14 (A)) und G4-C69 (Abbildung 4.14 (B)) dargestellt. Das Basenpaar A5-U68 zeigt acht identische Wasserpositionen vor allem im Bereich der großen Furche. Da das Nukleotid Uridin 68 in die Bindung mit der Synthetase involviert ist, wobei vor allem Kontakte über das Zuckerphosphat-Rückgrat ausgebildet werden, ist eine genaue Analyse dieser Region aufschlussreich. Es wird deutlich, dass vier von fünf Wassermolekülen, die mit dem Rückgrat des Nukleotids U68 assoziiert sind, nahezu identische Positionen in beiden Isoakzeptoren aufweisen. Der Vergleich zum Nukleotid A5, dessen Zuckerphosphat-Rückgrat nicht in direktem Kontakt zur Synthetase steht, weist dagegen nur eine von fünf Wasserposition auf, die in beiden Isoakzeptoren ähnlich ist.

Ein ähnliches Bild zeigt das Basenpaar G4-C69, von dem die Base C69 Kontakte mit der Seryl-tRNA-Synthetase ausbildet. Hier sind ähnliche Wasserpositionen in der Hydrathülle beider tRNA^{Ser}-Isoakzeptoren vor allem im Bereich der kleinen Furche vorhanden; vier von sechs Wasserpositionen haben eine nahezu identische Lage in den Strukturen beider Akzeptorstamm-Mikrohelices. Demgegenüber zeigt die große Furche für beide Strukturen nur drei ähnliche von zehn Wasserlagen. Auffällig ist, dass die Positionen der Wassermoleküle um das Nukleotid Cytidin 69 eine wesentlich größere Kohärenz aufweisen als die um das Nukleotid Guanosin 4, und zwar sowohl in der großen als auch in der kleinen Furche.

4.4.2 Magnesiumbindung

Die Übereinanderlagerung der ersten Magnesiumbindungsstelle an den Nukleotiden G6 und G7 des RS-1661-Akzeptorstammes zeigt, dass die in der Umgebung befindlichen Wassermoleküle im tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm RS-1660 eine ähnliche Distribution aufweisen. Dies ist in Abbildung 4.15 dargestellt.

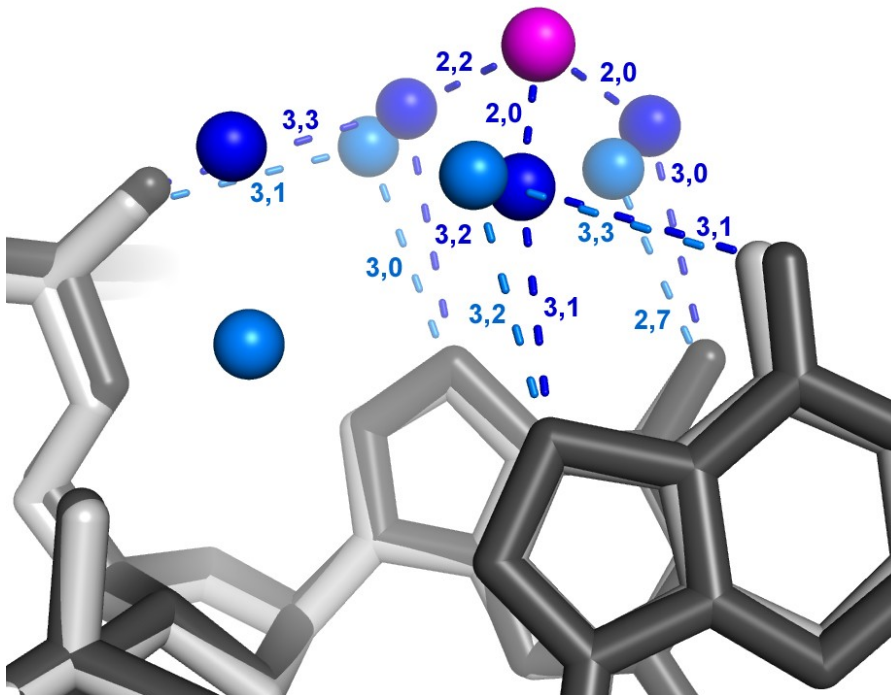


Abbildung 4.15: Erste Magnesiumbindungsstelle der tRNA^{Ser}-RS-1661

Gezeigt sind die Nukleotide G6 und G7, in deren Umgebung in der Struktur des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes ein gebundenes Magnesiumion detektiert wurde. Helle Farben kennzeichnen den Isoakzeptor RS-1660, dunkle Farben den Isoakzeptor RS-1661. Die Abbildung zeigt Wassermoleküle als blaue Kugeln, das Magnesiumion ist magentafarben dargestellt. Abstände zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Die drei Wassermoleküle, die sowohl an das Magnesiumion als auch an die Basen Guanosin 6 und 7 binden, haben in beiden Akzeptorstämmen eine fast identische Lokalisation. Das zeigt, dass die Lage der Wassermoleküle in dieser Region für beide RNA-Moleküle dem Standard-Hydratationsverhalten von Nukleinsäuren folgt, da die Wasserstoffakzeptoren und –donoren der RNA vollständig besetzt sind. Was wie bereits beschrieben für den tRNA^{Ser}-Isoakzeptor RS-1661 gilt, trifft auch auf den tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm RS-1660 zu: Das endozyklische Stickstoffatom N7 und die

Ketogruppe der Guanosinbasen stellen Kontakte zu Wassermolekülen her. Eine weitere Wasserstoffbrückenbindung besteht zwischen einem Sauerstoffatom der Phosphatgruppe des Zuckerphosphatrückgrats der Nucleinsäuren und einem Wassermolekül der Umgebung.

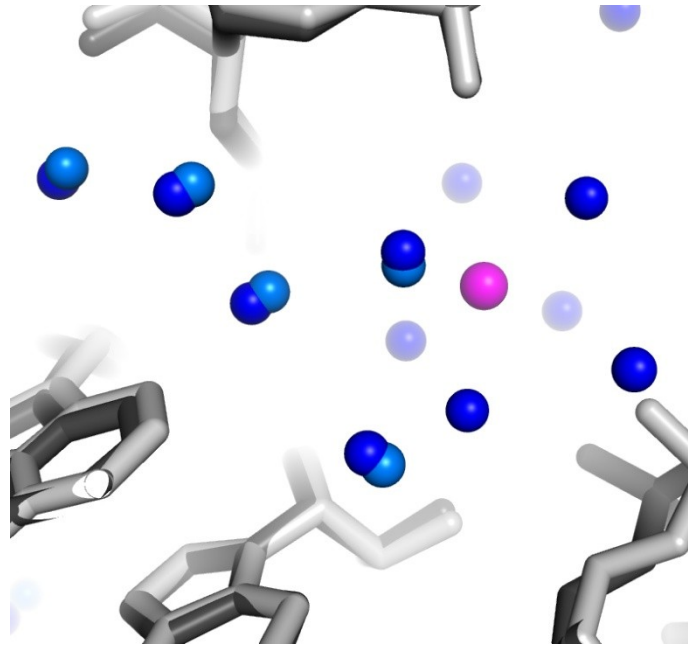


Abbildung 4.16: Zweites Magnesiumion der Struktur des tRNA^{Ser}-Isoakzeptors RS-1661

Die Umgebung des zweiten Magnesiumions zeigt in den beiden Strukturen der tRNA^{Ser}-Isoakzeptoren nur wenige Gemeinsamkeiten. Helle Farben kennzeichnen die Struktur des Isoakzeptors RS-1660, dunkle Farben den Isoakzeptor RS-1661.

Abbildung 4.16 zeigt die zweite Magnesiumbindungsstelle der tRNA^{Ser}-Mikrohelix RS-1661 übereinandergelagert mit der Struktur des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1660. Hier ist in direkter Nachbarschaft zum Magnesiumion nur ein Wassermolekül vorhanden, das in beiden Strukturen die gleiche Lokalisation aufweist. Die Positionen der übrigen Wassermoleküle, die das Magnesiumion in der Struktur des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661 hydratisieren, sind in der Struktur des RS-1660 Isoakzeptors nicht vorhanden. Gleichzeitig sind aber vier Wasserpositionen um die Basen G4 und A5 identisch.

4.5 Bindung der tRNA^{Ser} an die Seryl-tRNA-Synthetase

Die Struktur der Seryl-tRNA-Synthetase im Komplex mit der tRNA^{Ser} (PDB-Eintrag: 1SER) wurde mit den Strukturen der tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm-Mikrohelicies RS-1660 und RS1661 übereinandergelagert. Das Ziel war die Untersuchung der Beteiligung der an die RNA-Moleküle gebundenen Wassermoleküle an der Bindung der SerRS zur RNA.

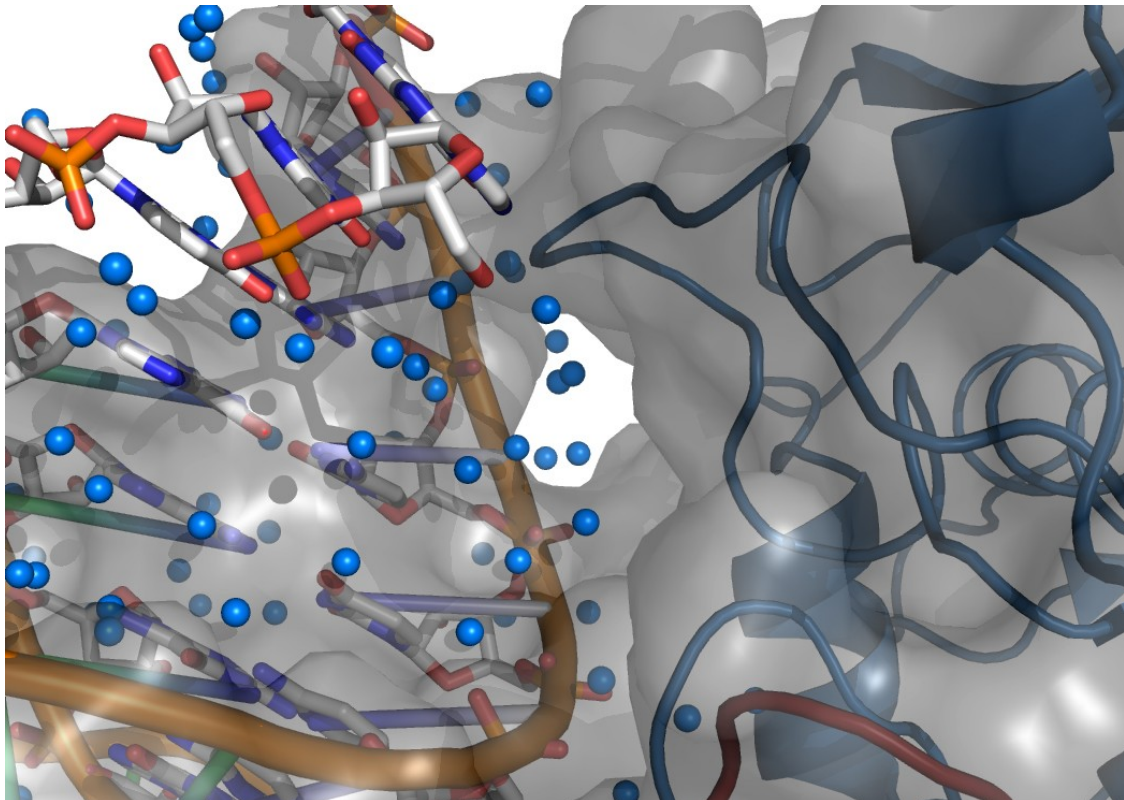


Abbildung 4.17: Übersicht der Übereinanderlagerung der SerRS mit dem tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm RS-1661

Die Seryl-tRNA-Synthetase ist dunkelblau und -rot als *Ribbon*-Modell dargestellt. Die Abbildung zeigt, dass das orangefarbene Phosphatrückgrat der zur Synthetase gehörenden tRNA nahezu deckungsgleich zu dem des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661 ist. Die als blaue Kugeln dargestellten Wassermoleküle füllen die Lücken zwischen den Oberflächen des Proteins und der Nucleinsäure aus.

Da es keine Informationen über die geordnete Wassermoleküle in der Struktur gibt, kann eine Übereinanderlagerung der hochaufgelösten Akzeptorstammstruktur mit der Struktur der Synthetase-tRNA-Komplexes diese Lücke schließen. Vor allem in

Anbetracht der Tatsache, dass eine Einbeziehung der Hydratisierung der RNA und des Proteins in die Betrachtung der Bindung zulässig ist, da bei der Bindung einer tRNA durch die entsprechende aaRS praktisch kein Wasser frei wird (Banerjee et al., 2003).

Abbildung 4.17 zeigt eine Übersicht der Übereinanderlagerung der Struktur des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661 und der Seryl-tRNA-Synthetase. Die Darstellung zeigt, wie die an die tRNA gebundenen Wassermoleküle die Höhle an der Schnittstelle zwischen Protein und Nukleinsäure besetzen. Die Abbildung zeigt deutlich, dass das Rückgrat der hochaufgelösten RNA eine gute Kohärenz mit dem Zuckerphosphatrückgrat der tRNA der ursprünglichen Struktur aufweist.

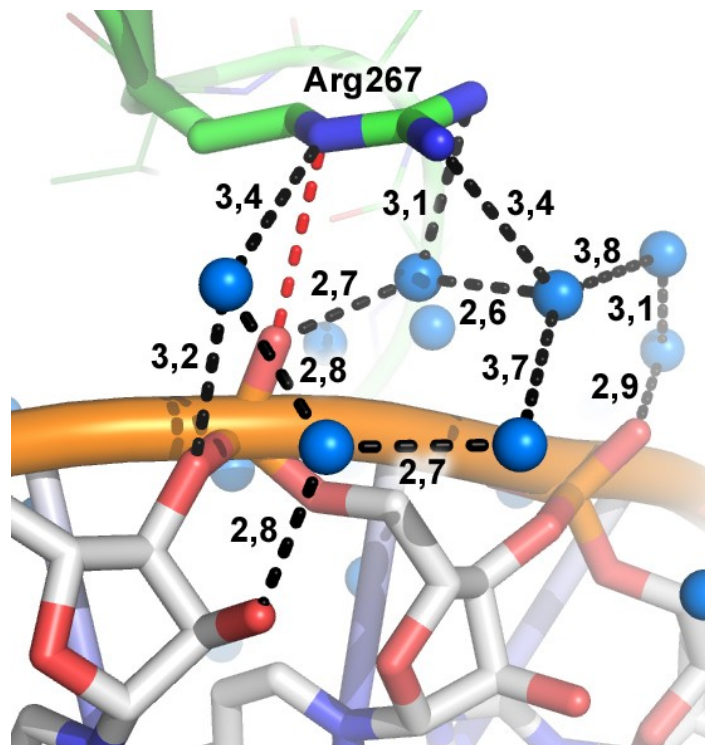


Abbildung 4.18: Anteil des Solvensnetzwerkes an der Bindung zwischen Arg267 und tRNA

Die bekannte Bindung zwischen Arg267 und C69 ist rot dargestellt. Der orangefarbene Schlauch kennzeichnet das Phosphatrückgrat der tRNA^{Ser} aus der Struktur des Komplexes. Blaue Kugel stellen Wassermoleküle dar. Entfernungen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Abbildung 4.18 zeigt die Einbindung des Arginin 267 der Untereinheit 1 in das Wassernetzwerk der Nukleinsäure. Wie einleitend beschrieben, gibt es einen Kontakt

zwischen dem Arg267 und einem Sauerstoffatom der Phosphatgruppe des Zuckerphosphatrückgrats am Nukleotid C69. Diese Bindung ist in Abbildung 4.18 rot dargestellt. Darüber hinaus stellt die Aminosäure über die Seitenkette Wasserstoffbrückenbindungen zu drei Wassermolekülen in der Nachbarschaft her. Zwei der interagierenden Wassermoleküle stellen Brücken zwischen dem Protein und der Nukleinsäure dar, indem sie gleichzeitig Wasserstoffbrückenbindungen zum Arg267 und dem Zuckerphosphatrückgrat der tRNA ausbilden. Eine der Bindungen erfolgt dabei an das Sauerstoffatom O3' der Ribose des Nukleotids U68. Das zweite Wassermolekül steht in Kontakt mit demselben Sauerstoffatom der Phosphatgruppe am Cytidin 69, welches auch eine direkte Verbindung zum Arginin 267 ausbildet.

Zusätzlich gibt es Kontakte zwischen den mit Arg267 interagierenden Wassermolekülen und weiteren H₂O-Molekülen in der Umgebung. Dabei kommt es zu indirekten Kontakten zwischen dem Arg267 und der 2'-OH-Gruppe der Ribose am Nukleotid U68 sowie einem Sauerstoffatom der Phosphatgruppe am Nukleotid A70.

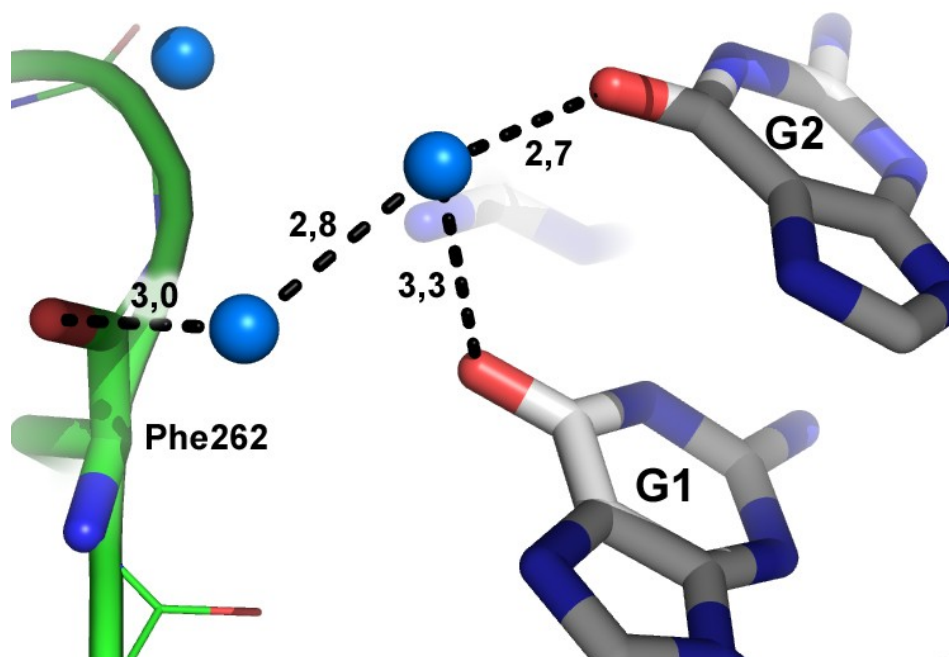


Abbildung 4.19: Beispiel einer basenspezifischen Interaktion der SerRS mit dem tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm RS-1661

Die Abbildung zeigt die wasservermittelte Interaktion der Aminosäure Phenylalanin 262 mit den Basen G1 und G2 der tRNA. Sauerstoffatome der Nukleinsäure und des Proteins sind rot, Stickstoffatome blau dargestellt. Blaue Kugeln geben Wassermoleküle wieder. Distanzen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Abbildung 4.19 zeigt ein Beispiel für eine wasservermittelte basenspezifische Bindung der Synthetase an die tRNA. Dabei steht die Carbonylgruppe des Peptidrückgrats an der Aminosäure Phenylalanin 262 über zwei Wassermoleküle im Kontakt mit den exozyklischen Sauerstoffatomen O6 der Nukleotide G1 und G2.

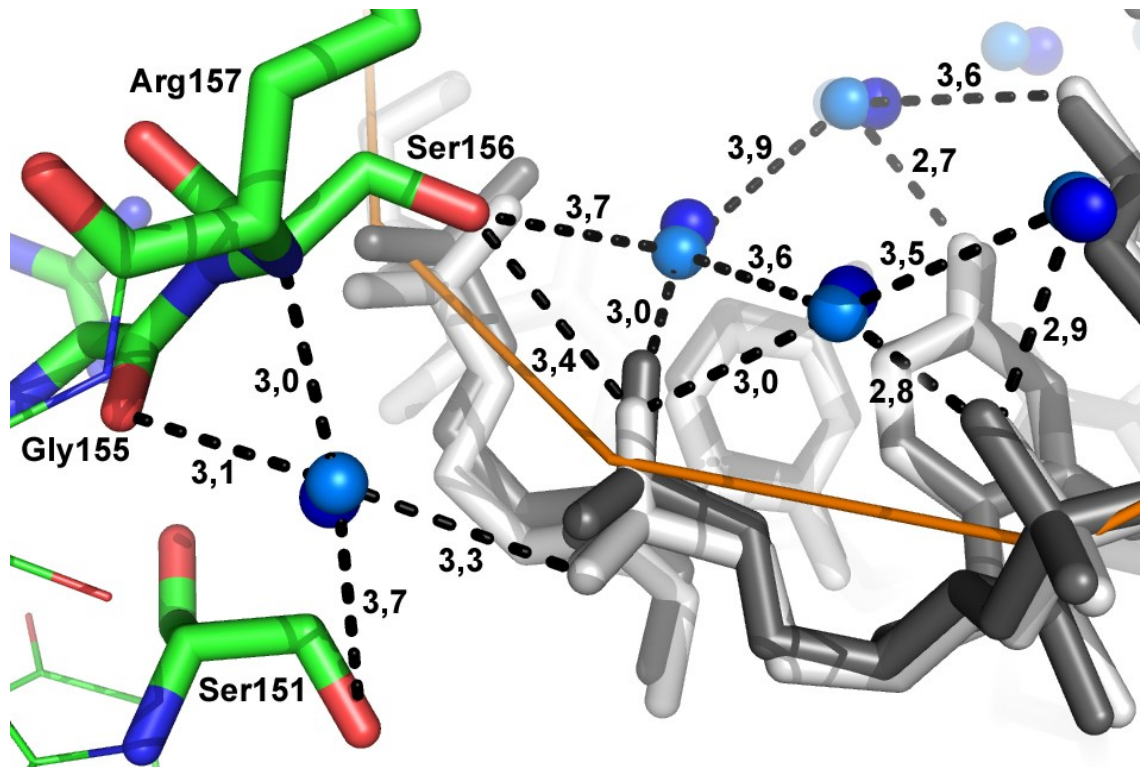


Abbildung 4.20: Übereinanderlagerung zweier tRNA^{Ser}-Isoakzeptoren und der Seryl-tRNA-Synthetase

Die Abbildung zeigt die Region um die Nukleotide U68 und C69, dabei sind der tRNA^{Ser}-Isoakzeptor RS-1661 dunkelgrau und die zugehörigen Wassermoleküle dunkelblau, der Isoakzeptor RS1660 hellgrau, bzw. -blau dargestellt. Aminosäuren, die an der Bindung beteiligt sind, sind fett dargestellt. Das Phosphatrückgrat der tRNA der ursprünglichen Komplexstruktur ist orangefarben gezeigt. Abstände zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Abbildung 4.20 zeigt die Übereinanderlagerung der Struktur der SerRS mit den Strukturen der beiden tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm-Mikrohelices RS-1660 und RS-1661. Zur besseren Übersichtlichkeit sind nur die Wassermoleküle gezeigt, die in beiden Isoakzeptoren ähnliche bzw. identische Positionen aufweisen. Dies ist ein gutes Beispiel für den Anteil des Solvensnetzwerkes an der Bindung der tRNA durch die

Synthetase, insbesondere, da die Wassermoleküle beider tRNA-Strukturen an der Herstellung von Kontakten zwischen der Synthetase und der tRNA beteiligt sind.

Die Hydroxylgruppe der Aminosäure Ser156 bildet neben der Bindung an das Phosphatrückgrat der tRNA am Nukleotid U68 einen Kontakt zu einem Wassermolekül aus, das seinerseits in Kontakt zum Phosphatrückgrat des Nukleotids U68 steht. Gleichzeitig gibt es Bindungen desselben Wassermoleküls an zwei weitere Wassermoleküle, die selbst in Kontakt zum exozyklischen Sauerstoffatom O4 des Nukleotids U68 und zur exozyklischen Aminogruppe des Nukleotids C69, sowie zum Phosphatrückgrat am Cytidin 69 stehen.

Zur Bildung des Interaktionsnetzwerkes tragen zudem die Hydroxylgruppe des Serin 151, das Sauerstoffatom des Peptidrückgrats der Aminosäure Glyzin 155 und das Stickstoffatom des Rückgrats der Aminosäure Arginin 157 bei, die allesamt mit einem Wassermolekül Kontakte ausbilden. Dieses interagiert seinerseits mit einem Sauerstoffatom des Zuckerphosphatrückgrats am Nukleotid U68.

4.6 Struktur einer „locked“ Nukleinsäure

Die Struktur einer „locked“ Nukleinsäure (LNA) wurde bei einer Auflösung von 1,9 Å aufgeklärt. Die Sequenz der LNA leitet sich direkt von derjenigen der tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm-Mikrohelix RS-1661 ab. Dadurch war es möglich, einen direkten Vergleich der modifizierten mit der natürlichen Nukleinsäure vorzunehmen.

Die Kristallisation wurde durchgeführt, wie in (Behling et al., 2009) beschrieben. Die LNA kristallisierte dabei unter folgenden Bedingungen: 40 mM Natriumcacodylat, pH 5,5, 20 mM Kobalthexamin, 80 mM Natriumchlorid, 20 mM Magnesiumchlorid und 10% (v/v) MPD, äquilibriert gegen eine Reservoirlösung von 35% MPD, pH 7,4, bei einer Temperatur von 294 K. Die Kristallisation erfolgte nach der Methode des hängenden Tropfens und nach drei bis vier Tagen konnten Kristalle mit den ungefähren Abmessungen 0,2 x 0,2 x 0,1 mm beobachtet werden.

4.6.1 Datenaufnahme und -prozessierung

Die Kristalle wurden am Synchrotrone ELETTRA in Triest, Italien, vermessen. Die Datenakquisition der LNA-Duplex erfolgte bei einer Wellenlänge von 1,00 Å. Es wurden ein hochaufgelöster Datensatz in einem Auflösungsbereich von 80,0 – 1,90 Å und ein niedrigaufgelöster Datensatz im Auflösungsbereich von 80,0 – 2,70 Å aufgenommen. Dadurch konnte die Qualität der Daten gesteigert werden, da übersättigte Reflexe im niedrigaufgelösten Bereich des hochaufgelösten Datensatzes durch Reflexe des niedrigaufgelösten Datensatzes ergänzt werden konnten. Die beiden Datensätze wurden dazu nach der Prozessierung zusammengeführt. Insgesamt wurden 35.694 Reflexe gemessen, von denen 7.382 einzigartige Reflexe waren. Dies entspricht einer Redundanz der Daten von 4,8 bei einer Vollständigkeit von 98%. Der R -Wert nach der Prozessierung war $R_{\text{merge}} = 7,3\%$.

Die LNA kristallisiert in der Raumgruppe $C2$ mit zwei Molekülen pro asymmetrischer Einheit. Die Einheitszellparameter sind $a = 77,91$ Å, $b = 40,74$ Å, $c = 30,06$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 91,02^\circ$. Der Matthews-Koeffizient wurde mit $2,48$ Å³Da⁻¹ berechnet, was einem Wassergehalt des Kristalls von 66,5% entspricht. Eine Übersicht der Datensammlungs- und -prozessierungsstatistik gibt Tabelle 4.8. Gezeigt sind die Daten nach der Zusammenführung der beiden Datensätze.

Tabelle 4.8: Datensammlungs- und -prozessierungsstatistik der LNA

Strahlenquelle	ELETTRA/XRD1 (BL 5.2R)
Wellenlänge	1,000 Å
Raumgruppe	C2
Einheitszellparameter	$a = 77,91 \text{ Å}$, $b = 40,74 \text{ Å}$, $c = 30,06 \text{ Å}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 91,02^\circ$, $\gamma = 90^\circ$
Matthews-Koeffizient ($\text{Å}^3\text{Da}^{-1}$)	2,48
LNA-Duplexe pro asymmetrischer Einheit	2
Lösungsmittelgehalt (%)	66,5
gemessene Reflexe	35.694
einzigartige Reflexe	7.382
Redundanz	4,8 (3,8)
Auflösungsbereich (Å)	80,0 - 1,90 (1,93 - 1,90)
Vollständigkeit (%)	98,0 (97,2)
R_{merge} (%)	7,3 (21,7)

$\#R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \{I(hkl)\}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$, dabei entsprechen $I_i(hkl)$ den gemessenen individuellen und $\{I(hkl)\}$ den durchschnittlichen Intensitäten eines Reflexes mit den Indizes hkl ; \sum_i ist die Summe über die individuellen Messungen eines Reflexes mit den Indizes hkl und \sum_{hkl} entspricht der Summe aller Reflexe. Daten in Klammern geben die Werte für die höchste Auflösungsschale an.

4.6.2 Struktur und Eigenschaften

Die Struktur der LNA wurde mittels Molekularem Ersatz gelöst. Als Modell wurde die Sequenz der tRNA^{Ser}-Mikrohelix RS-1661 verwendet, deren Nukleotide durch

Tabelle 4.9: Verfeinerungsstatistik der LNA

R/R_{free} (%)	22,4/26,4
Anzahl LNA-Atome	314
Anzahl Wasser-Sauerstoffatome	100
Cacodylat-Moleküle	1
Kobalthexaminmoleküle	1
Anzahl Magnesium-Atome	1
Rmsd Bindungslängen (Å)	0,016
Rmsd Bindungswinkel (°)	3,371

LNA-Bausteine ersetzt wurden. Die Methylgruppen am Kohlenstoffatom C5' der Cytosinbasen wurden während der Verfeinerung in die Differenzdichte eingefügt. Neben den beiden Nukleinsäuredoppelsträngen wurden ein Kobalthexaminmolekül, ein Cacodylatmolekül, ein Magnesiumion, sowie 100 Wassermoleküle in der Elektronendichtekarte detektiert. Der R -Wert der Struktur war am Ende $R/R_{\text{free}} = 22,4/26,4\%$. Tabelle 4.9 zeigt die Verfeinerungsstatistik der LNA-Struktur.

Pro asymmetrischer Einheit gibt es zwei LNA-Doppelstränge, die in der „Ende-an-Ende“-Anordnung vorliegen und dabei sogenannte „endlose Helices“ ausbilden. Die beiden Moleküle werden an der Schnittstelle von einem Kobalthexaminmolekül komplexiert, das dadurch massgeblich Anteil an der Zusammensetzung und Anordnung der asymmetrischen Einheit hat. Eine Stereoübersicht des Inhalts der asymmetrischen Einheit zeigt Abbildung 4.21.

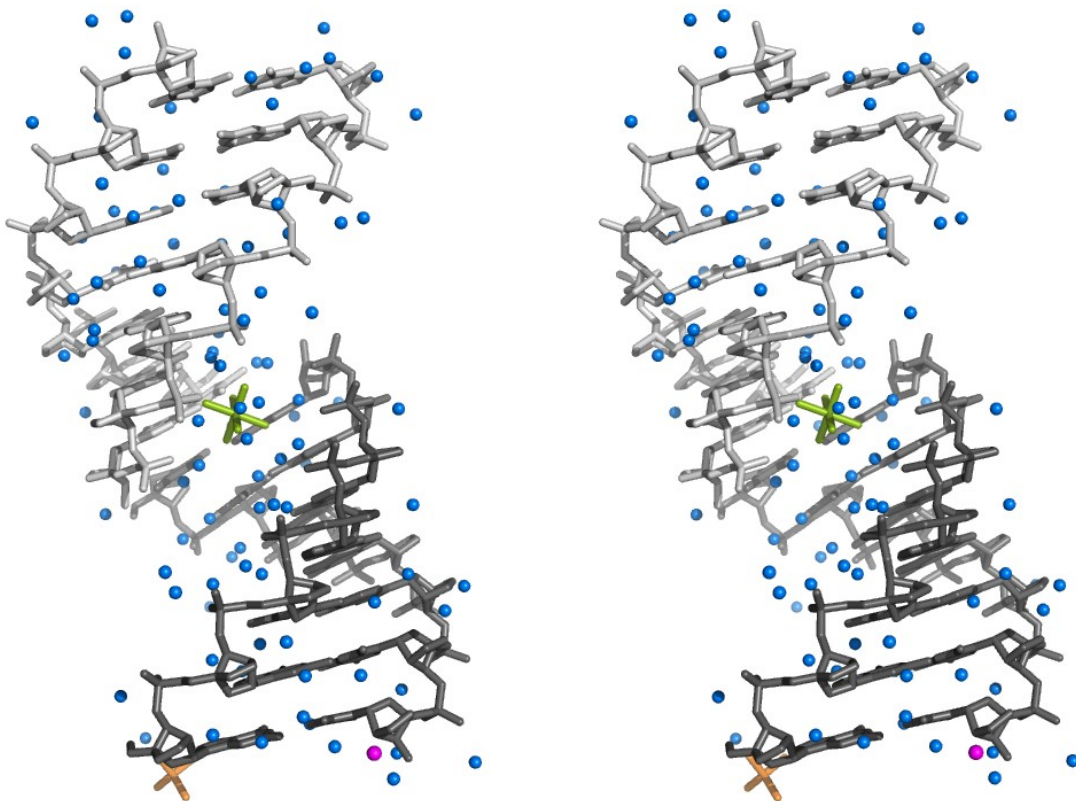


Abbildung 4.21: Stereoansicht der Struktur der LNA-Duplex

Die beiden LNA-Doppelstränge der asymmetrischen Einheit sind hell- bzw. dunkelgrau dargestellt. Blaue Kugeln sind Wassermoleküle. Das Magnesiumion ist magentafarben abgebildet. Das Kobalthexaminmolekül ist grün, das Cacodylatmolekül orange gefärbt.

Eine Übersicht ausgewählter helikaler Parameter der LNA zeigt Tabelle 4.10. Die LNA zeigt dabei durchschnittliche Werte für den helikalen *Twist* von $25,6^\circ$, der *Slide* beträgt $-2,5 \text{ \AA}$, der *Rise* liegt bei $3,3 \text{ \AA}$ und die Verschiebung der Basen entlang der x-Achse beträgt $-6,6 \text{ \AA}$.

Die Tabelle 4.10 ist im Vergleich zu den Tabellen 3.3 und 3.6 der beiden RNAs zu betrachten. Insbesondere ist ein direkter Vergleich zur RNA korrespondierender Sequenz möglich, deren helikale Parameter in Tabelle 4.7 angegeben sind. Ein ausführlicher Vergleich wird später in diesem Kapitel durchgeführt.

Die helikalen Parameter der LNA bewirken, dass die Anordnung der komplementären Stränge zueinander so arrangiert ist, dass es zu einer Interstrang-Basenstapelung kommt. Dies ist beispielhaft in Abbildung 4.22 gezeigt.

Tabelle 4.10: Ausgewählte helikale Parameter der LNA

	<i>Twist</i> ($^\circ$)	<i>Slide</i> (\AA)	<i>Rise</i> (\AA)	χ - <i>Displacement</i> (\AA)
CC / GG	26,70	-2,37	3,33	-6,05
CT / AG	26,58	-2,46	3,47	-6,73
TC / GA	26,12	-2,49	3,10	-6,25
CA / TG	24,52	-2,15	3,25	-6,49
AC / GT	25,60	-2,86	3,19	-7,23
CC / GG	23,91	-2,60	3,24	-6,87
\emptyset	$25,57 \pm 1,14$	$-2,49 \pm 0,24$	$3,26 \pm 0,13$	$-6,61 \pm 0,43$
CC / GG	26,98	-2,36	3,23	-5,84
CT / AG	27,18	-2,29	3,31	-6,13
TC / GA	27,10	-2,47	3,23	-6,45
CA / TG	23,79	-2,26	3,13	-6,85
AC / GT	25,04	-2,79	3,15	-6,56
CC / GG	24,96	-2,67	3,24	-6,98
\emptyset	$25,84 \pm 1,43$	$-2,47 \pm 0,21$	$3,22 \pm 0,06$	$-6,47 \pm 0,43$

Die Daten der beiden LNA-Moleküle der asymmetrischen Einheit sind durch verschiedene Grautöne voneinander unterschieden.

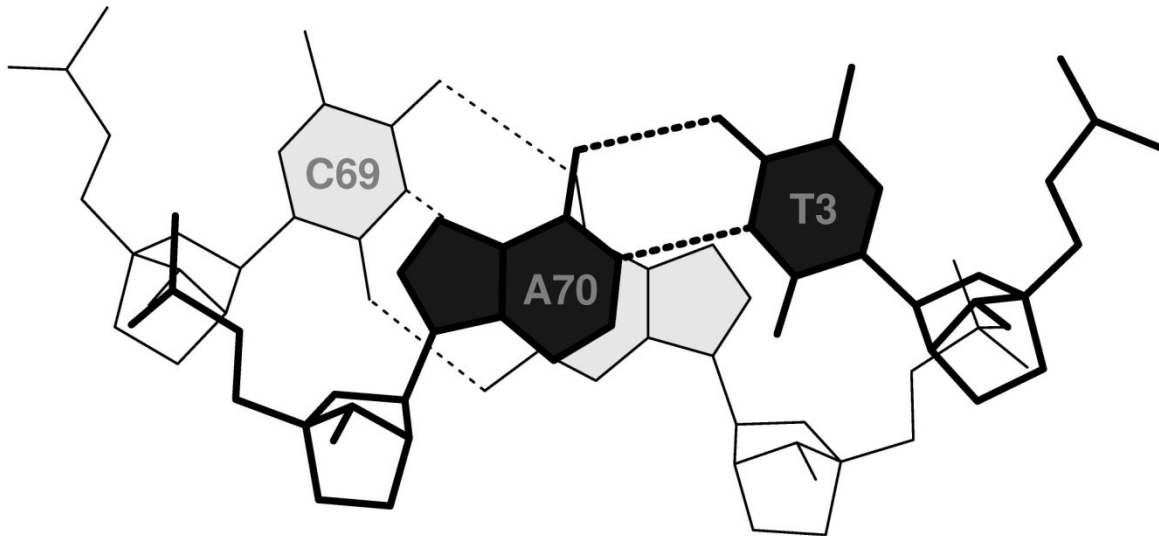


Abbildung 4.22: Beispiel für Interstrang-Basenstapelung der LNA

Die aromatischen Ringe der Basen A70 und G4 liegen fast direkt übereinander, was zu Wechselwirkungen der π -Orbitale führt.

Die Torsionswinkel des Zuckerphosphatrückgrats der LNA ähneln denen einer RNA und liegen für die Winkel α und ζ in der (-) *gauche*-Konformation vor. Die γ - und δ -Torsionswinkel nehmen die (+) *gauche*-Konformation ein und die β - und ε -Torsionswinkel liegen sämtlich in der *trans*-Konformation um $\pm 180^\circ$ vor. Abweichungen zur RNA zeigen vor allem die δ -Winkel zwischen den Atomen C5'-C4'-C3'-O3', die in der LNA im Vergleich zur RNA verringert sind.

4.6.3 Ligandenbindungsstellen

Das Kobalthexaminmolekül ist über vier Aminogruppen direkt mit den Nucleinsäuremolekülen koordiniert. Zwei weitere Kontakte zwischen den Aminogruppen und der LNA kommen über brückende Wassermoleküle zustande.

Eine Detailansicht zeigt Abbildung 4.23. Das Kobalthexaminmolekül bindet an die endständigen Guanosinnucleotide G6 und G7 der beiden LNA-Doppelstränge. Hierbei werden sowohl direkt als auch indirekt Wasserstoffbrückenbindungen zu den vier exozyklischen Sauerstoffatomen O6 und den vier endozyklischen Stickstoffatomen N7 ausgebildet. Direkte Kontakte zwischen dem Kobalthexamin und

der Nukleinsäure bestehen zu den endozyklischen Stickstoffatomen N7 der beiden Guanosinnukleotide G6 und G7 des einen Doppelstranges und desselben Heteroatoms des G7 des zweiten LNA-Duplex. Außerdem steht das Kobalthexaminmolekül über eine Wasserstoffbrückenbindung in direktem Kontakt zur exozyklischen Ketogruppe des G7 der zweiten Doppelhelix.

Wasservermittelte Kontakte zwischen den Nukleinsäuremolekülen und Kobalthexamin bestehen zur exozyklischen Ketogruppe des G6 des einen Doppelstranges. Weitere wassergebrückte Interaktionen zwischen Nukleinsäure und Ligand wurden für das endozyklische Stickstoffatom N7 und die exozyklische Ketogruppe des zweiten LNA-Moleküls detektiert.

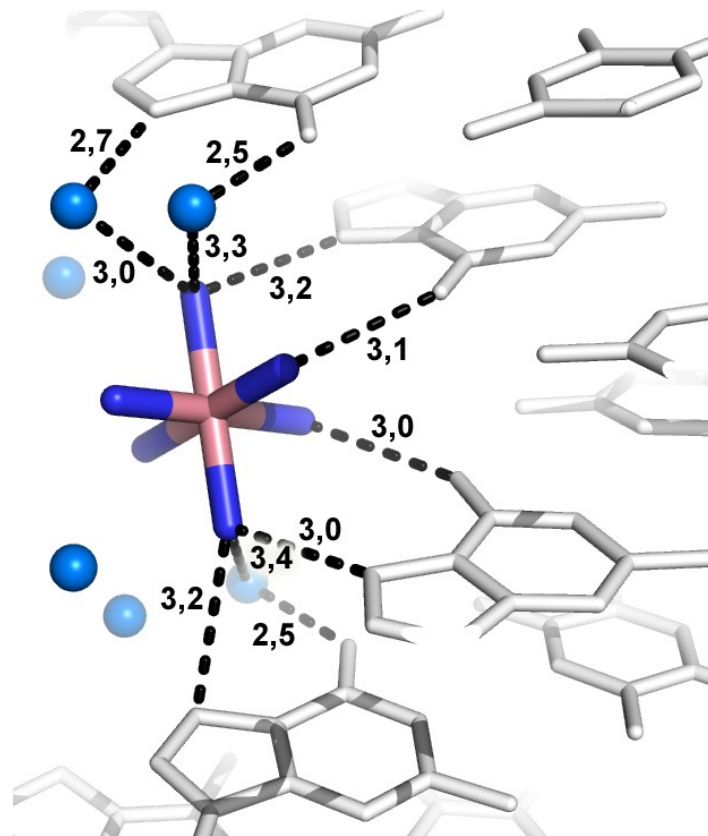


Abbildung 4.23: Von zwei LNA-Doppelsträngen komplexiertes Kobalthexamin

Das zentrale Kobalthexaminmolekül interagiert mit Wassermolekülen (blau) und den endständigen Nukleotiden G6 und G7 der beiden Nukleinsäuremoleküle (grau) der asymmetrischen Einheit. Entfernungen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Zwei weitere Liganden aus dem Kristallisationspuffer konnten in der Kristallstruktur detektiert werden. Von diesen ist das Magnesiumion interessant, da es direkt an den gebrückten Zucker zweier LNA-Moleküle gebunden ist. Dies ist in Abbildung 4.24 dargestellt.

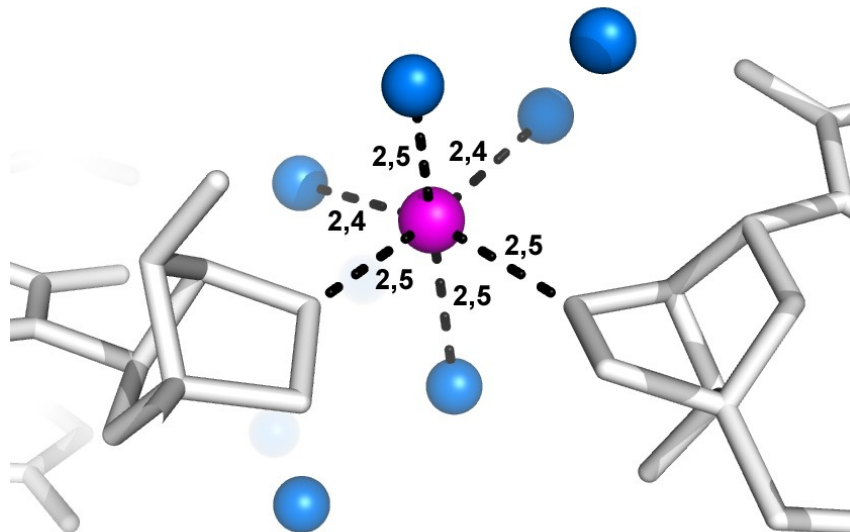


Abbildung 4.24: Magnesiumbindungsstelle der LNA-Struktur

Das Magnesiumion (magenta) ist sechsfach koordiniert. Vier Bindungen werden zu Wassermolekülen (blau) ausgebildet, zwei zu den O2'-Atomen der Zucker zweier symmetrieäquivalenter Nukleinsäuremoleküle (grau). Entfernungen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Das Magnesiumion liegt hier sechsfach koordiniert vor. Dabei werden vier Bindungsstellen von Wassermolekülen besetzt. Zusätzlich ist das Magnesiumion an die gebrückten Sauerstoffatome O2' des Zuckerrückgrats zweier symmetrieäquivalenter Nukleinsäuremoleküle gebunden.

4.6.4 Hydratation der LNA

Ein repräsentativer Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte ist in Abbildung 4.25 gezeigt. Dargestellt ist das Basenpaar T3-A70 und die umgebenden Wassermoleküle. Bei der Bindung von Wassermolekülen folgt die modifizierte Nukleinsäure

den Standard-Hydratationsregeln für Ribonukleinsäuren. Neun Wassermoleküle konnten im Umfeld des Basenpaares T3-A70 detektiert werden. Von diesen binden vier an das Nukleotid Adenosin 70 und fünf an Thymidin 3. Vier Wassermoleküle sind in der großen Furche, die anderen fünf in der kleinen Furche lokalisiert.

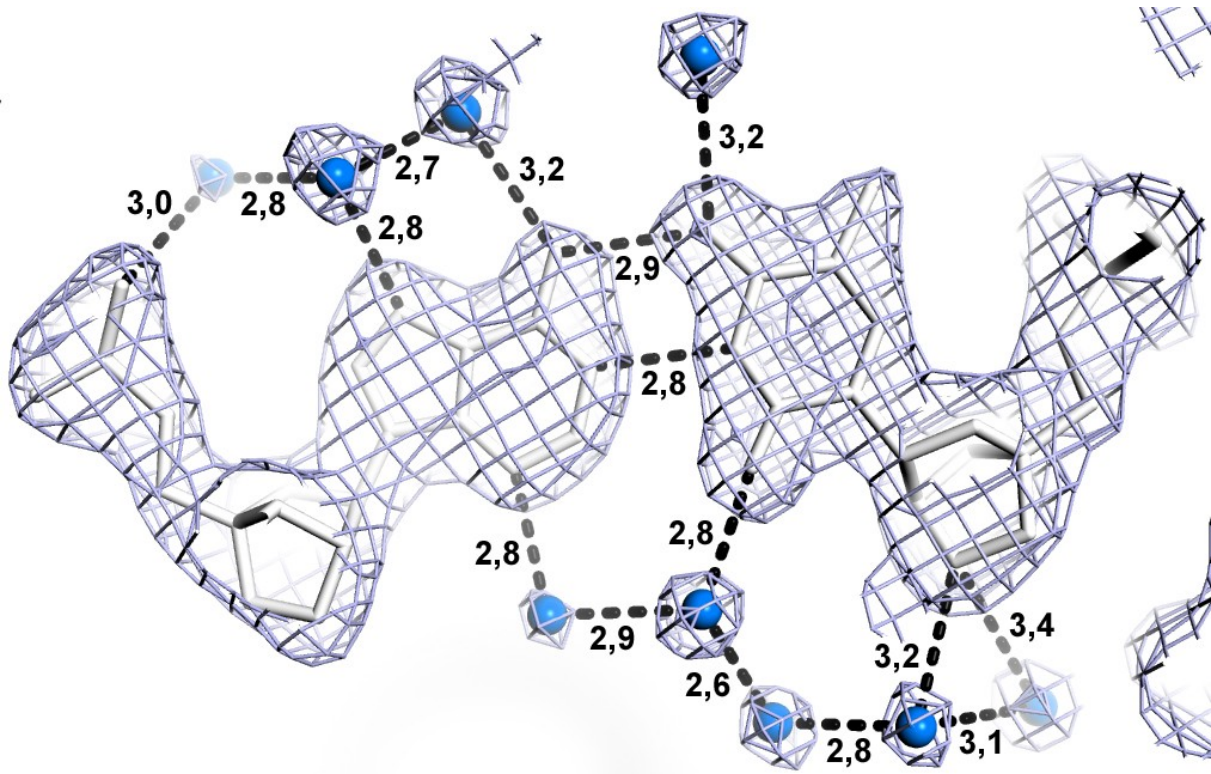


Abbildung 4.25: Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte der LNA

Abgebildet sind das Basenpaar T3-A70 und dessen Hydrathülle. Blaue Kugeln stellen Wassermoleküle dar. Entfernungen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Dabei kommt es zu Bindungen an die Standard-Wasserstoffbrückenakzeptoren und –donoren. Für das Nukleotid A70 sind Bindungen zu den endozyklischen Stickstoffatomen N7 und N3, zur exozyklischen Aminogruppe, sowie zum Zuckerphosphatrückgrat zu beobachten.

Das Nukleotid T3 bindet über die beiden exozyklischen Ketogruppen jeweils ein Wassermolekül. Zwei weitere Wassermoleküle sind an das Sauerstoffatom O2' des Zuckers gebunden. Ein weiteres Wasser trägt durch indirekte Bindung über andere Wassermoleküle zur Hydratation des Nukleotids bei.

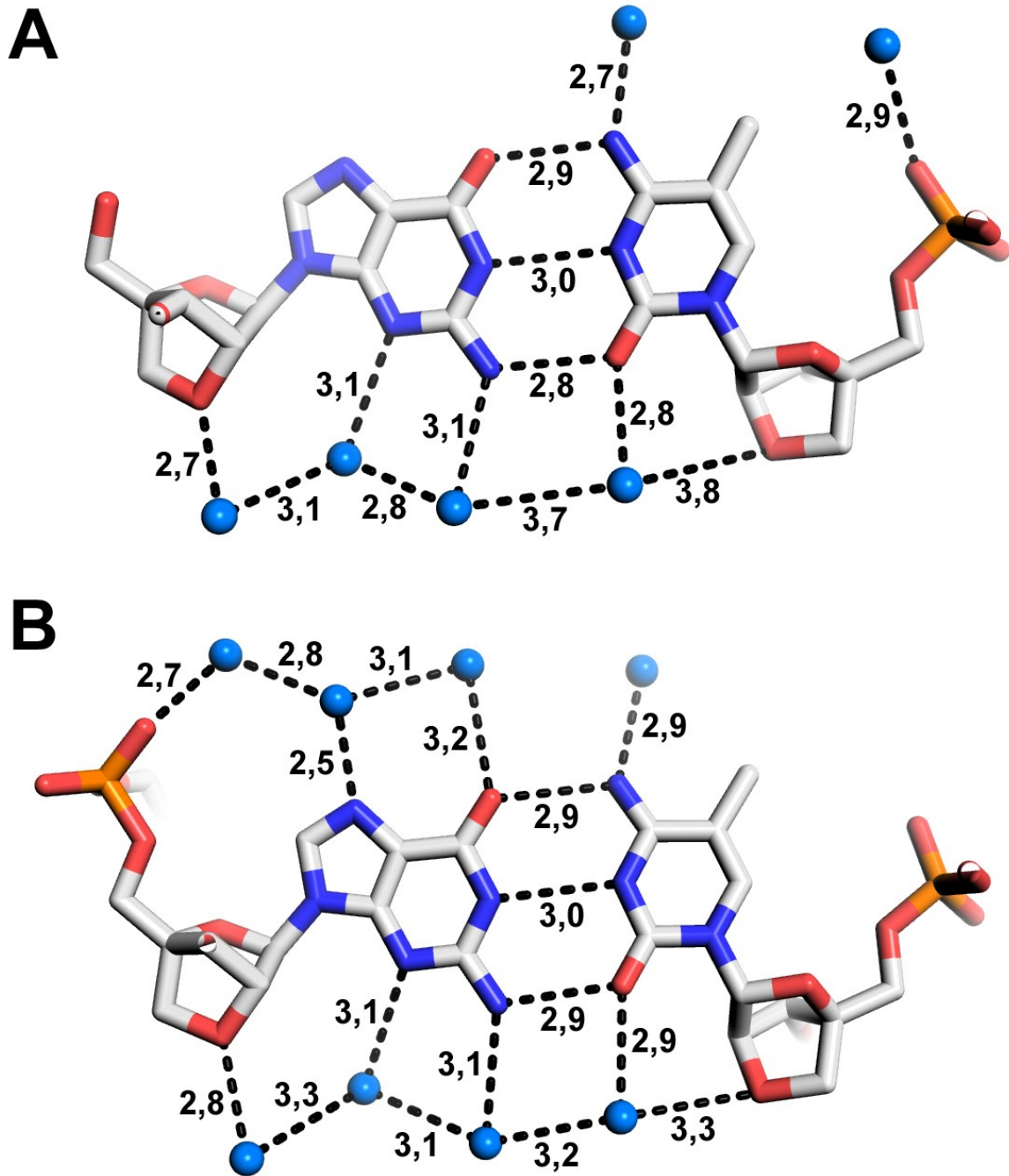


Abbildung 4.26: Hydratation der LNA

Gezeigt sind die Basenpaare G1-m⁵C72 (A) und G4-m⁵C69 (B). Blaue Kugeln stellen Wassermoleküle dar. Die Farbkodierung der Nukleotide ist: blau – Stickstoff, rot – Sauerstoff, orange – Phosphor, grau – Kohlenstoff. Entfernungen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

Weitere Beispiele für die Hydratisierung der LNA sind in der Abbildung 4.26 gezeigt. Das Basenpaar G1-m⁵C72 ist in Abbildung 4.26 (A) dargestellt, Abbildung 4.26 (B) zeigt das Basenpaar G4-m⁵C69. Da es sich bei G1-m⁵C72 um ein endständiges

Basenpaar handelt, ist die Hydratisierung vor allem in der großen Furche nicht komplett. Hier konnten nur zwei geordnete Wassermoleküle in der Elektronendichtekarte detektiert werden. Eines bindet an ein Sauerstoffatom der Phosphatgruppe des Rückgrats am 5-Methyl-Cytidin 72. Das zweite Wassermolekül in der großen Furche ist an die exozyklische Aminogruppe des m^5C72 gebunden.

Die Hydratisierung der kleinen Furche ist im Vergleich dazu wesentlich vollständiger. Hier stehen vier Wassermoleküle mit den Wasserstoffdonoren und -akzeptoren der Nukleotide in Kontakt. Drei der Wasser binden an das Nukleotid G1 und eines an m^5C72 . Dabei konnten für das Guanosin 1 Wasserstoffbrückenbindungen zum endozyklischen Stickstoffatom N3, der exozyklischen Aminogruppe und dem gebrückten Sauerstoffatom des Zuckers festgestellt werden. Das 5-Methyl-Cytidin bindet über seine exozyklische Ketogruppe ein Wassermolekül, welches gleichzeitig nur 3,8 Å vom gebrückten Sauerstoff des Zuckers entfernt liegt.

Die Hydratation der kleinen Furche um das Basenpaar G4- m^5C69 bestätigt die Ergebnisse des vorher beschriebenen Basenpaares. Einziger Unterschied ist die kürzere Entfernung des an die exozyklische Ketogruppe des Cytidins gebundenen Wassermoleküls zum gebrückten Sauerstoffatom des Zuckers.

Die Analyse der großen Furche zeigt, dass für das Basenpaar G4- m^5C69 vier gebundene Wassermoleküle detektiert werden konnten. Drei hiervon binden an das Guanosin 4, eines an das Nukleotid m^5C69 . Wasserstoffbrückenbindungen gehen für G4 vom endozyklischen Stickstoffatom N7 und der exozyklischen Ketogruppe, sowie einem Sauerstoffatom der Phosphatgruppe aus. Das Wassermolekül am m^5C69 interagiert mit der exozyklischen Aminogruppe der Base.

4.6.5 Vergleiche zwischen RNA, RNA/LNA-Hybrid und LNA

Im folgenden Abschnitt soll die LNA-Struktur mit der tRNA^{Ser}-Mikrohelix RS-1661, von der die Sequenz abgeleitet wurde, und der NMR-Struktur einer RNA/LNA-Heteroduplex (Nielsen et al., 2004) verglichen werden. Die Hybridstruktur mit der Sequenz 5'-($m^5CTGATATGm^5C$)^L-3' / 5'-GCAUAUCAG-3' hat den PDB-Eintrag: 1H0Q.

Die Kristallstruktur der LNA zeigt eine einzigartige Nukleinsäuregeometrie, die nicht im Bereich der Standard-A- oder B-Typen liegt. Es handelt sich um eine rechtsgängige antiparallele Helix. Gemeinsamkeiten mit der RNA bestehen darin, dass die Nukleotide Watson-Crick-Basenpaare ausbilden und die Zucker in der C3'-*endo*-Konformation vorliegen. Jedoch hat die LNA helikale Parameter, die zu einer nicht-Standard Nukleinsäuregeometrie führen. Eine ausführliche Auswahl helikaler Parameter der LNA ist in einem vorhergehenden Abschnitt in Tabelle 4.10 aufgelistet. Einen Vergleich geometrischer Parameter der LNA mit denen der RNA korrespondierender Sequenz, sowie der RNA/LNA-Heteroduplex zeigt Tabelle 4.11.

Tabelle 4.11: Vergleich geometrischer Parameter von RNA, RNA/LNA-Hybrid und LNA

	tRNA ^{Ser} RS-1661	RNA/LNA-Hybrid	LNA (Str. 1)	LNA (Str. 2)
<i>Twist</i> (°)	32,46 ± 3,76	28,98 ± 4,06	25,97 ± 1,49	26,13 ± 1,53
<i>Rise</i> (Å)	2,64 ± 0,27	2,72 ± 0,11	2,81 ± 0,04	2,84 ± 0,05
<i>Slide</i> (°)	-1,68 ± 0,34	-2,24 ± 0,24	-2,49 ± 0,24	-2,47 ± 0,21
<i>Roll</i> (Å)	6,61 ± 1,80	6,07 ± 6,03	4,08 ± 1,67	4,15 ± 2,23
<i>χ-Displacement</i> (Å)	-4,25 ± 1,25	-5,40 ± 0,88	-6,60 ± 0,43	-6,47 ± 0,43
<i>Propeller-twist</i> (°)	-10,46 ± 4,95	-12,84 ± 3,64	-6,65 ± 3,91	-7,45 ± 2,84

Die Tabelle zeigt für *Twist* und *Rise* die globalen Parameter, die auf Grundlage von C1'-C1'-Vektoren berechnet wurden. Für die LNA sind die Werte beider Doppelstränge getrennt dargestellt (Str. 1 und Str. 2).

Bei der LNA sind die Werte für *Twist* und *Roll* gegenüber einer unmodifizierten RNA signifikant verringert. Gleiches gilt für die Beträge des *Propellertwists*. Für die Ganghöhe (*Rise*) zeigt die LNA einen gegenüber der RNA leicht erhöhten Wert. Ebenso sind für die Beträge der Parameter *Slide* und *χ-Displacement* für die LNA höhere Werte als für die vergleichbare RNA berechnet worden. Die Werte der

einzelnen Parameter liegen für die RNA/LNA-Heteroduplex, abgesehen vom *Propellertwist*, zwischen denen der RNA- und der LNA-Duplexstrukturen.

Der Wert für den helikalen *Twist* beträgt bei der LNA 26° und ist damit im Vergleich zur RNA um 6° reduziert. Dies führt zu einer Öffnung der großen Furche, deren Durchmesser von 16 \AA bei Standard-A-RNA auf 25 \AA bei der LNA erhöht ist. Gleichzeitig ist der Durchmesser der kleinen Furche von 19 \AA bei der RNA auf 15 \AA bei der LNA verringert. Diese Unterschiede führen zu Änderungen der Geometrie der Gesamtstruktur werden, was durch die Abbildung 4.27 sichtbar wird. Letztlich führt dies dazu, dass die LNA 14 Basenpaare pro Windung hat, verglichen mit elf Basenpaaren pro Windung bei einer Standard-A-RNA.

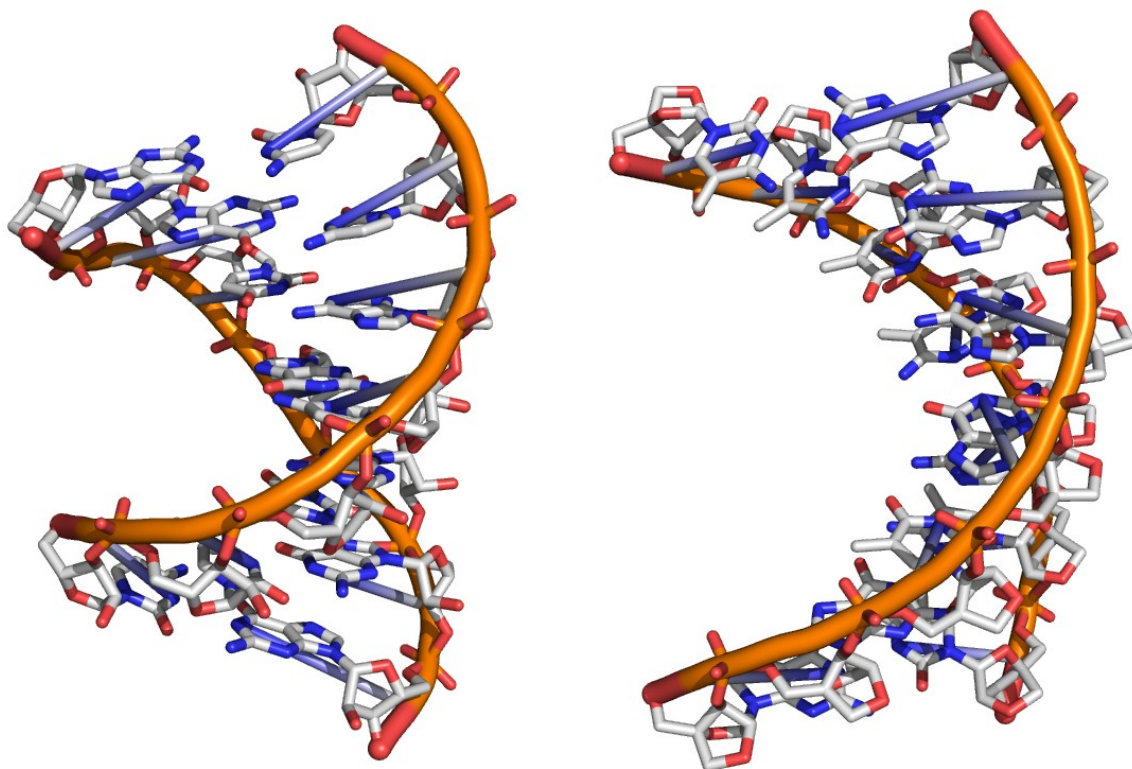


Abbildung 4.27: Vergleich der Struktur der LNA mit der korrespondierenden RNA-Struktur

Links ist die Kristallstruktur der tRNA^{Ser}-Mikrohelix, rechts die LNA mit korrespondierender Sequenz abgebildet. Die Farbkodierung bedeutet: orange – Phosphor, rot – Sauerstoff, blau – Stickstoff, weiß – Kohlenstoff.

Einen Vergleich der Hydratationsmuster von RNA und LNA zeigt die Abbildung 4.28. Abbildung 4.28 (A) zeigt das Basenpaar G2-C71 aus der Struktur der

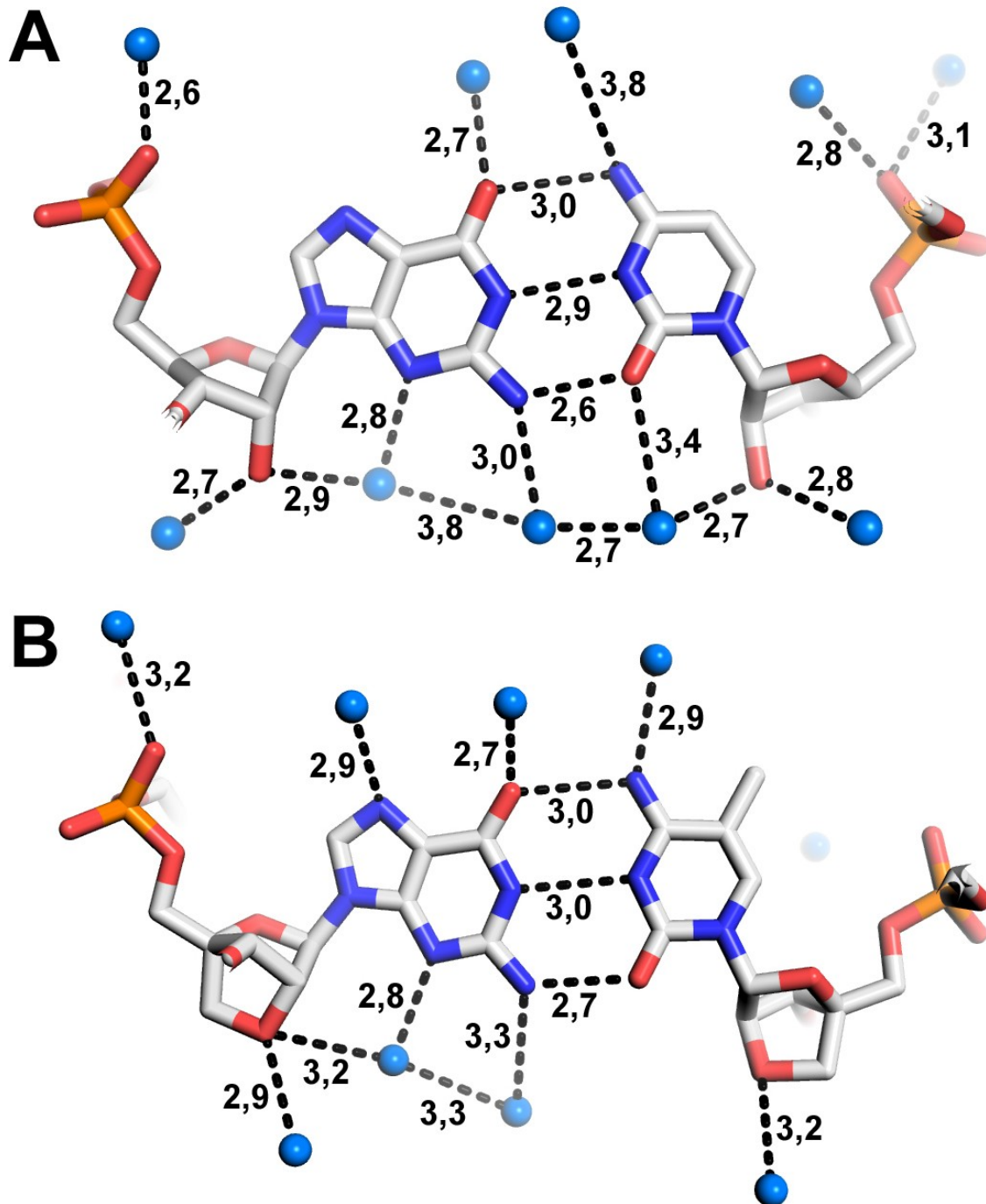


Abbildung 4.28: Vergleich der Hydratation von RNA und LNA

Gezeigt ist das Basenpaar G2-C71 der RNA (A) bzw. G2-m⁵C71 der LNA (B). Blaue Kugeln stellen Wassermoleküle dar. Die Farbkodierung der Nukleotide ist: rot – Sauerstoff, blau – Stickstoff, orange – Phosphor, grau – Kohlenstoff. Entfernungen zwischen Atomen sind in Ångström angegeben.

tRNA^{Ser}-Mikrohelix RS-1661. Das äquivalente Basenpaar der LNA ist in Abbildung 4.28 (B) dargestellt.

Die Hydratation der Nukleinsäuren ist in weiten Bereichen ähnlich. Unterschiede sind zumeist nicht besetzte Wasserpositionen in einer der beiden Strukturen. Dazu zählen beispielsweise die Wassermoleküle um die Phosphatgruppe der Cytidinnukleotide, die in der RNA-Struktur detektiert wurden, in der LNA-Struktur jedoch nicht. Außerdem gehört dazu das Wassermolekül, das in der RNA-Struktur mit der exozyklischen Ketogruppe des Nukleotids C71 in Kontakt steht, aber nicht in der LNA-Struktur. Dagegen ist das Wassermolekül, welches in der LNA-Struktur mit dem endozyklischen Stickstoffatom N7 des Guanosins eine Wasserstoffbrückenbindung bildet, in der RNA-Struktur nicht zu finden.

Interessant sind jedoch vielmehr die Unterschiede in der Wasserbindung durch das Sauerstoffatom O2' des Zuckers. Dabei geht es nicht darum, dass in der Struktur der LNA am m⁵C71 ein Wassermolekül fehlt, was in der RNA vorhanden ist, denn die Fähigkeit der LNA an dieser Stelle ein Wassermolekül zu binden, wurde in Abbildung 4.26 (B) demonstriert. Aber die Ausrichtung der nicht Basen-assoziierten Wassermoleküle ist für die LNA und die RNA unterschiedlich.

Abbildung 4.29 zeigt einen Vergleich der Strukturen einer idealisierten RNA, einer RNA/LNA-Heteroduplex und der LNA. Dazu wurden die Kristall- bzw. NMR-Strukturen der kurzen Helices unter Ausnutzung des gleichmäßigen, helikalen Charakters von Nukleinsäuren verlängert. Abbildung 4.29 (A) ist eine Darstellung im Calladine-Drew-Plot. Jedes Basenpaar ist als Viereck dargestellt, die rote Line ist die Verbindung der Mittelpunkte der Vierecke und zeigt die Windung der Nukleinsäuren an. Alle Nukleinsäuren haben in der Abbildung zwei komplette helikale Windungen.

Die RNA braucht dazu 22 Basenpaare, die RNA/LNA-Heteroduplex 25 Basenpaare und die LNA besteht aus 28 Basenpaaren. In der Seitenansicht sind vor allem Unterschiede in der Basenstapelung sichtbar: die Kippwinkel der Basenpaare sind in der RNA unregelmäßig, was über die Hybrid-Struktur bis zur LNA abnimmt. In der Struktur der LNA liegen die Basenpaare fast parallel übereinander.

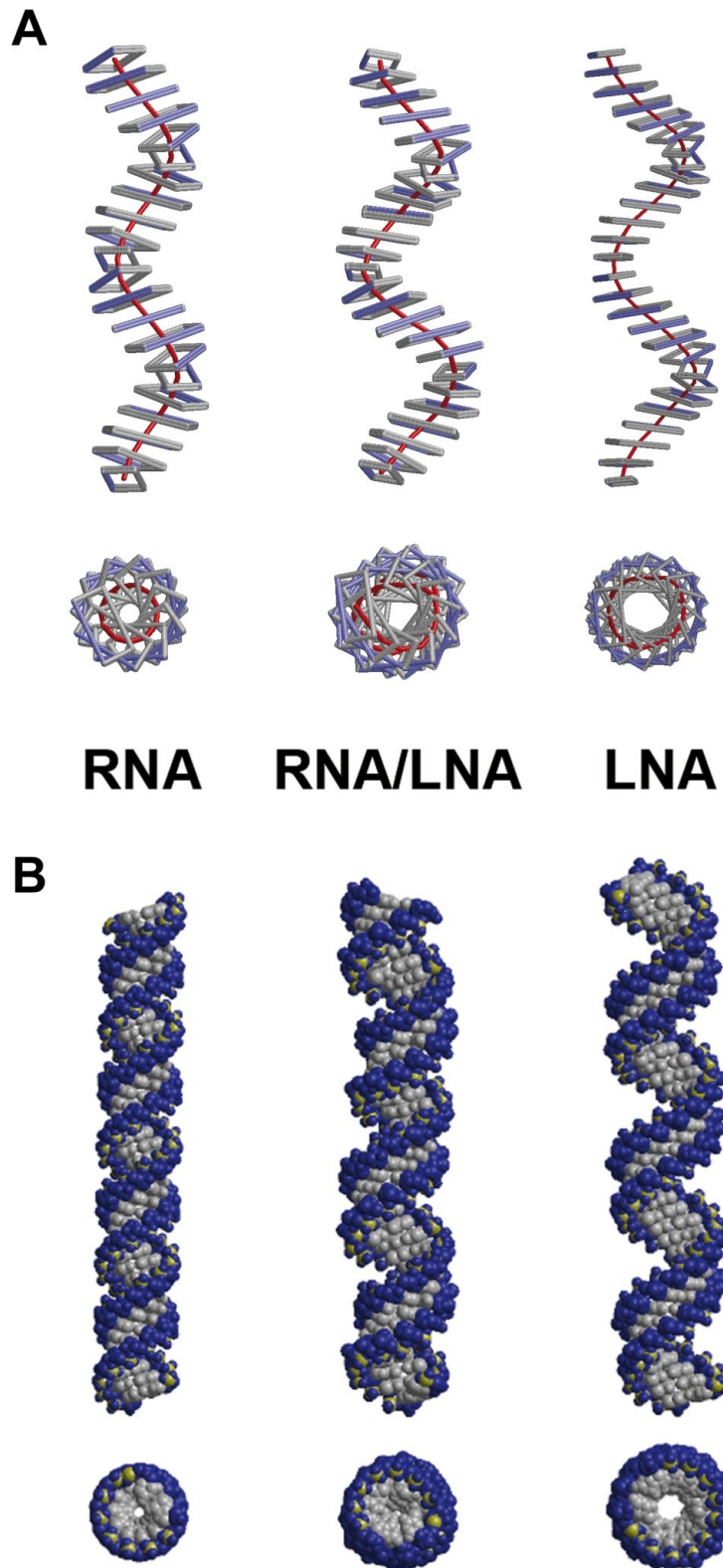


Abbildung 4.29: Vergleich von RNA, RNA/LNA-Hybrid und LNA

(A) Calladine-Drew-Plot zweier Windungen der Nucleinsäuren; (B) Raumfüllendes Modell bei dem alle Doppelstränge aus 46 Basenpaaren bestehen

Die Draufsicht zeigt die unterschiedlichen Radien der Nukleinsäuren. Am engsten gepackt ist die RNA und der Radius der Doppelhelices nimmt über die RNA/LNA-Heteroduplex zum LNA-Doppelstrang zu. Die Hybridstruktur ist in einem hohen Maße ungeordnet.

Abbildung 4.29 (B) zeigt ein raumfüllendes Modell der Nukleinsäuren. Dazu wurden die Strukturen bis auf 46 bp verlängert. Die kompakte Struktur der Doppelhelix der RNA mit 11 bp pro helikaler Windung wird über die Hybridstruktur zur LNA mit 14 bp pro Windung immer gestreckter. In der Draufsicht ist auch gut der zunehmende Radius der Doppelhelices von der RNA über die Hybrid-Struktur zur LNA zu erkennen.

4.6.6 Thermostabilitätsvergleich

Es wurde gezeigt, dass der Einbau von LNA-Bausteinen in RNA-Doppelstränge zu einem Anstieg des Schmelzpunktes um 2 – 10°C pro LNA-Monomer führt (Petersen et al., 2003). Deswegen wurden Schmelzkurven der tRNA^{Ser} RS-1661 und der LNA aufgenommen mit dem Ziel die Schmelzpunkte der beiden Nukleinsäuren zu vergleichen. Für die RNA mit der Sequenz 5'–CCUCACC–3' / 5'–GGUGAGG–3' wurde ein Schmelzpunkt von $T_m = 45^\circ\text{C}$ gemessen. Der Schmelzpunkt der LNA mit der abgeleiteten Sequenz 5'–(m⁵Cm⁵CTm⁵CAm⁵Cm⁵C)^L–3' / 5'–(GGTGAGG)^L–3' liegt über 90°C, was außerhalb des Messbereiches des Messgerätes liegt. Nichtsdestotrotz kann davon abgeleitet werden, dass der Schmelzpunkt der LNA um mindestens 4°C pro Monomer gegenüber der RNA erhöht ist.

In der NMR-Studie über die RNA/LNA-Hybridstruktur sind auch Thermostabilitätsexperimente beschrieben. Der dabei gemessene Schmelzpunkt der RNA/LNA-Heteroduplex wurde mit einer DNA/RNA-Heteroduplex als Referenz verglichen. Hierbei wurde eine Schmelzpunkterhöhung von 5,2°C pro LNA-substituiertem DNA-Monomer berechnet (Nielsen et al., 2004).

4.6.7 Vergleich mit anderen modifizierten Nukleinsäuren

Im folgenden Abschnitt sollen generelle Unterschiede der LNA zu anderen modifizierten Nukleinsäuren dargestellt werden. Dazu wurden Strukturvergleiche mit einer Glykol-Nukleinsäure (GNA) (Schlegel et al., 2008) und einer Peptid-Nukleinsäure (PNA) (Rasmussen et al., 1997) durchgeführt.

Das Rückgrat der GNA besteht aus nicht-zyklischen Propylen-Glykol-Phosphodiester-Einheiten. Diese sind aus nur drei Kohlenstoffatomen aufgebaut und damit die einfachsten Bausteine für ein Phosphodiester-Nukleinsäure-Rückgrat. Die PNA hingegen ist mit einem Peptid-Rückgrat ausgestattet, deren Monomere ohne Phosphodiester-Einheiten verknüpft sind. Beide Nukleinsäure-Spezies sind zur Watson-Crick-Basenpaarung fähig.

Tabelle 4.12: Vergleich von geometrischen Parametern der RNA, LNA, GNA und PNA

	RNA	LNA	GNA	PNA
<i>Twist</i> (°)	32	26	23	20
<i>Rise</i> (Å)	2,9	3,2	3,8	3,2
Basenpaare pro Windung	11	14	16	18

Während die GNA, wie die natürlichen A-RNA und B-DNA, eine rechtsgängige Helix formt, kann die Helixrichtung der PNA sowohl rechts- als auch linksgängig sein. Beide Nukleinsäuren sind, wie die LNA, im Vergleich zu natürlichen Nukleinsäuren gestreckt. Dies wird bei einem Vergleich verschiedener Parameter, wie in Tabelle 4.12 dargestellt, deutlich. Der *Twist*, der bei der LNA 26° beträgt und damit gegenüber einer A-RNA schon um 6° verringert ist, nimmt über 23° in der GNA zu 20° für die PNA ab. Dies führt dazu, dass es zu einem Anstieg der Basen pro Windung von 14 für die LNA über 16 bei GNA zu 18 für die PNA kommt.

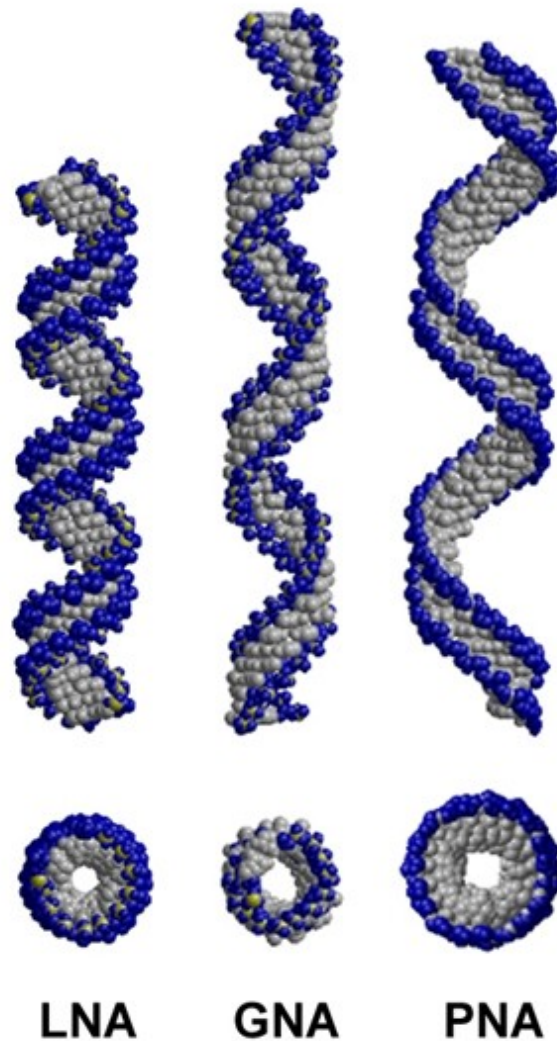


Abbildung 4.30: Raumfüllende Modelle einer LNA, GNA und PNA im Vergleich

Die Helices bestehen aus je 46 Basenpaaren. Die Basen sind grau, das Rückgrat blau dargestellt. Phosphoratome im Rückgrat der LNA und GNA sind gelb gefärbt.

Anschaulich werden die Auswirkungen durch Abbildung 4.30. Die Nukleinsäuren sind hierfür auf 46 bp verlängert worden. Vor allem die Linksgängigkeit der PNA und die immer größere Öffnung der Helixwindung von der LNA über die GNA zur PNA sind auffällig. In der Draufsicht wird eine Zunahme der Helixradien zusammen mit einer Zunahme der Lücke innerhalb der Doppelhelices deutlich.

5 DISKUSSION

Das Ziel der Arbeit war die Untersuchung von natürlichen und modifizierten Nukleinsäurestrukturen, um Aussagen über die Konformation, Hydratation und Ligandenbindung der Moleküle treffen zu können. Um möglichst detaillierte Ergebnisse zu erhalten, wurde versucht, die Auflösung der röntgenkristallographisch analysierten Strukturen zu maximieren. Dazu wurden zwei Ansätze verfolgt: Zum einen wurde versucht, die Kristallqualität durch Kristallisationsversuche unter Mikrogravitationsbedingungen zu verbessern. Darüberhinaus wurden nur Nukleinsäuren mit einer Länge von sieben Basenpaaren zur Kristallisation eingesetzt, da kleinere Moleküle in der Regel zu höher aufgelösten Datensätzen führen. Als Modellsystem wurden die Akzeptorstämme zweier tRNAs analysiert und eine modifizierte „locked“ Nukleinsäure, deren Sequenz von der des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes abgeleitet war.

Die Durchführung von Kristallisationsexperimenten unter Mikrogravitationsbedingungen ist eine Möglichkeit die Qualität von Kristallen und nachfolgend die Qualität von röntgenkristallographisch aufgeklärten Strukturen biologischer Makromoleküle zu verbessern (Vergara et al., 2005). In dieser Arbeit wurden im Rahmen der Sojus-TMA-13- und Sojus-TMA-16-Missionen verschiedene Nukleinsäurespezies auf der Internationalen Raumstation kristallisiert. Dabei wurden während der Sojus-TMA-16-Mission im Weltraum Kristalle der ncRNA HAR1 gezüchtet, die in Versuchen auf der Erde nicht erzeugt werden konnten.

Allerdings wurde beobachtet, dass die Kristallisationen nicht komplett reproduzierbar waren. So wurden nie in allen Mehrfachansätzen einer Probe gleichzeitig Kristalle gefunden. Das lag zum einen an der Natur der flüssig-flüssig-Diffusionsmethode, die die Konzentrationserhöhung des Fällungsmittels im Kristallisationsansatz weniger schonend und kontrolliert möglich macht, als es die Dampfdiffusionsmethode in Kristallisationsschalen bietet. Zum anderen ist denkbar, dass auch das Einfrieren und Auftauen der Kristallisationsansätze einen Effekt auf das Kristallisationsverhalten der Proben haben.

Außerdem führte der Transport der Proben zu Erschütterungen, was sich daran zeigte, dass der kontinuierliche Flüssigkeitsfilm der flüssig-flüssig-Diffusionsansätze bei den Weltraumproben und denen aus Kasachstan zerrissen war. Dieser Effekt war

am größten für die Weltraumproben; möglicherweise bedingt durch die Einwirkung der Landung der Sojus-Kapsel.

Dennoch konnten vor allem von den vergleichsweise langen ncRNAs unter Mikrogravitationsbedingungen eher Kristalle beobachtet werden. Wie Abbildung 4.1 im Ergebnisteil zeigt, waren aber alle Kristalle in den Schläuchen sehr klein. Röntgenkristallographische Untersuchungen am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg zeigten für die untersuchten Kristalle aufgrund ihrer geringen Größe nur eine sehr schwache Diffraktion, so dass keine Datensätze aufgenommen werden konnten. Die gezüchteten Mikrokristalle sind somit zwar nicht zur Messung von Kristallisationsdaten geeignet, aber als Kristallisationskeime für weitergehende Kristallisationsversuche im Labor verwendbar.

Insgesamt konnte die Ausbeute der erfolgreichen Kristallisationsexperimente durch verschiedene Modifikationen nach der Sojus-TMA-13-Mission während der Sojus-TMA-16 Mission stark verbessert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die einleitend beschriebenen Vorteile, die die Kristallisation unter Mikrogravitationsbedingungen, bietet, vor allem für die langen ncRNAs zu besseren Ergebnissen als die Kristallisation auf der Erde führte.

Allerdings ist das System der flüssig-flüssig-Diffusion in Tygonschläuchen nicht vollständig ausgereift. Das Probenvolumen von 1 μl wird bei einem Innendurchmesser der Schläuche von 0,2 mm auf eine Länge von mehr als 1 cm gestreckt. Dies ist für einen gleichmäßigen und kontrollierten Stoffaustausch, wie ihn die Kristallisation nach der Dampfdiffusionsmethode in Kristallisationsschalen bietet, nicht optimal. Daher sollte zukünftig entweder mit einem größeren Schlauchvolumen gearbeitet oder weiter entwickelte Möglichkeiten genutzt werden, wie sie die Fortgeschrittene Proteinkristallisationseinheit (*Advanced Protein Crystallization Facility* – APCF) der Europäischen Weltraumagentur auf der Internationalen Raumstation bietet.

Die Struktur des tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes RR-1660 wurde bis zu einer Auflösung von 2,0 Å aufgeklärt (Abbildung 4.3). Die beiden Nukleinsäuremoleküle der asymmetrischen Einheit zeigen dabei die Standard-A-RNA-Konformation und die Hydratisierung entspricht den Standardregeln für die Wasserbindung durch RNA-Moleküle (Sundaralingam et al., 2002). Die Untersuchung des Akzeptorstammes ist

für tRNAs der Klasse I vor allem deshalb interessant, weil der Akzeptorstamm, obwohl er hier nicht für die Identität der tRNA entscheidend ist, wesentliche Kontakte zur korrespondierenden Arginyl-tRNA-Synthetase ausbildet. Dabei kommt es vor allem zu wasservermittelten Interaktionen zwischen der Synthetase und den Nukleotiden an den Positionen 69-72 (Delagoutte et al., 2000).

Besonders interessant an der Struktur dieses Akzeptorstammes ist die Komplexbildung mit einem Glycerinmolekül aus dem Kryopuffer, der zur Vorbereitung des Kristalls für die Messung unter Kryobedingungen diente. Die Bindung des Glycerinmoleküls an den tRNA^{Arg}-Akzeptorstamm RR-1660 hat zwar keine direkte biologische Relevanz, dennoch kann es als Beispiel für die Bindung kleiner Moleküle an Ribonukleinsäuren dienen. Auf Aptamere übertragen zeigt es, dass bereits mit einfachen und kurzen Sequenzen räumliche Bindungsmotive für kleine Moleküle erzeugt werden können. Aptamere sind Oligonukleotide, die durch *in vitro*-Selektion nach der Methode der Systematischen Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment* – SELEX) hergestellt werden können. Als Ergebnis binden die selektierten Nukleinsäuren das Zielmolekül mit hoher Affinität und Spezifität (Ellington et al., 1990; Tuerk et al., 1990).

Biologische Bedeutung bekommt es als Beispiel für „natürliche Aptamere“ – *Riboswitches*. Diese RNA-Moleküle sind durch spezifische Bindung von Zellmetaboliten während der Regulation von Zellprozessen von großer Bedeutung für den Organismus. Dabei ist die hier beobachtete Nukleinsäure-Ligand-Komplexbildung ähnlich zu der für Typ I-*Riboswitches* beschriebenen. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass es eine klar definierte lokale Bindungstasche gibt, deren Ausbildung durch die globale Struktur der Nukleinsäure bestimmt wird. Aufgrund dessen induziert die Bindung eines Liganden nur geringe, lokal begrenzte Konformationsänderungen in der Gesamtstruktur (Montange et al., 2008).

Wie in Abbildung 4.5 dargestellt, entsteht durch die einfache Aneinanderlagerung zweier Doppelhelices hier eine Oberflächenstruktur, in die das Glycerinmolekül genau hineinpasst. Dabei wird das Glycerinmolekül durch direkte Wasserstoffbrückenbindungen an die Basen der Nukleinsäure gebunden. Zusätzlich kommt es zu wasservermittelten Interaktionen zwischen der RNA und dem Liganden. Das

Glyzerinmolekül bildet dabei, wie Abbildung 4.6 zeigt, Kontakte zu beiden RNA-Doppelhelices aus.

Die Struktur des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661 wurde mit einer Auflösung von 1,2 Å aufgeklärt. Auch hier entsprechen die geometrischen Parameter denen einer Standard-A-RNA. In der Umgebung der RNA-Doppelhelix wurden 97 Wassermoleküle und zwei Magnesiumionen detektiert (Tabelle 4.6). Die Detektion dieses hohen Hydratationsgrades resultiert aus der nahezu atomaren Auflösung der Gesamtstruktur von 1,2 Å, was dazu führt dass bei den meisten Basenpaaren fast alle Bindungsstellen der Standard-Wasserstoffbrückenakzeptoren und –donoren besetzt sind. Dies wurde beispielhaft in Abbildung 4.9 dargestellt.

Die beiden Magnesiumionen befinden sich in hydratisierter Form in der Umgebung der Nukleotide G6 und G7. Dabei ist eines in der großen Furche (Abbildung 4.10) und das zweite in der kleinen Furche (Abbildung 4.11) des RNA-Doppelstranges lokalisiert. Das erste Magnesiumion ist nur fünffach wasserkoordiniert, wobei davon auszugehen ist, dass das fehlende sechste Wasser für die bekannte Hexakoordinierung von Magnesium nicht in der Elektronendichte zu finden war. Es ist über brückende Wassermoleküle mit den Basen assoziiert.

Im Gegensatz dazu ist das zweite Magnesiumion vollständig, also sechsfach, wasserkoordiniert und stellt über die Hydrathülle Kontakte zum Rückgrat dreier symmetrieäquivalenter Nukleinsäuremoleküle her. Dadurch trägt es zur Stabilität des Kristalls bei, denn durch die Anwesenheit des zweifach positiv geladenen Magnesiumions werden die Abstoßungskräfte der negativen Phosphatrückgrate der RNAs verringert, so dass die Nukleinsäuren leichter in räumliche Nähe kommen können.

Es wurde eine Superpositionierung des beschriebenen tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661 mit der zuvor aufgeklärten Struktur des tRNA^{Ser}-Isoakzeptors RS-1660 durchgeführt (Abbildung 4.12). Dabei wurden insbesondere die Hydratationsmuster und die Magnesiumbindungsstellen beider Strukturen miteinander verglichen. Die Untersuchung von Hydratationsmustern steht vor den generellen Problemen, dass nicht alle Wasserbindungsstellen immer vollständig besetzt sind und bei niedrigerer Auflösung auch weniger Wassermoleküle in der Elektronendichtekarte aufgefunden werden können. Dazu kommt eine Ungenauigkeit in der Bestimmung der exakten

Lage von Atomen, die durch den kristallographischen Temperaturfaktor beschrieben wird.

Dennoch wurden bei der Betrachtung der Hydratationsmuster des Identitätsbasenpaares G2-C71 (Abbildung 4.13) und des Nukleotids C72, welches ein Identitätselement der tRNA^{Ser} ist, Gemeinsamkeiten und Unterschiede festgestellt. Gleiches gilt für die Hydratation der mit der Seryl-tRNA-Synthetase in Kontakt stehenden Nukleotide U68 und C69 (Abbildung 4.14). Beim Vergleich des Identitätsbasenpaares fällt vor allem ein Wassermolekül auf, das in anderen GC-Basenpaaren nicht detektiert wurde. Es befindet sich in der großen Furche und ist nur indirekt über brückende Wassermoleküle mit den beiden Basen assoziiert. Möglicherweise hat es einen Anteil an der Erkennung der tRNA durch die Synthetase, da auch die Wassermoleküle in der Nachbarschaft konserviert sind, deren Distribution aber große Ähnlichkeit zu der in anderen GC-Basenpaaren aufweist.

Die Superpositionierung der ersten Magnesiumbindungsstelle der tRNA^{Ser} RS-1661 zeigt, dass die Wassermoleküle der Hydrathülle, die in Kontakt mit den Basen G6 und G7 stehen, auch in der Struktur des Isoakzeptors RS-1660 detektiert wurden (Abbildung 4.15). Dies bestätigt zum einen, dass die Wasserbindungsstellen der Standardwasserstoffbrückenakzeptoren und –donoren der Basen G6 und G7 in dieser Region in beiden Strukturen vollständig mit Wassermolekülen besetzt sind.

Es deutet gleichzeitig darauf hin, dass hier eine allgemeine Magnesiumbindungsstelle von tRNA^{Ser}-Isoakzeptoren vorliegen könnte, die im Fall des RS-1660-Akzeptorstammes nicht in der Kristallstruktur detektiert wurde. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die Magnesiumkonzentration des Kristallisationspuffers zu gering gewesen sein könnte. Im Kristallisationspuffer des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661 betrug sie 20 mM (Eichert et al., 2009), während die Magnesiumkonzentration im Kristallisationspuffer der tRNA^{Ser}-Mikrohelix RS-1660 demgegenüber mit 15 mM um 25% geringer war (Forster et al., 2007a). Dadurch könnte die Magnesiumionenkonzentration während der Kristallisation der RS-1660-Struktur nicht ausgereicht haben, um die Bindungsstelle aller RNA-Moleküle im Kristall zu besetzen. Dies würde im Ergebnis dazu führen, dass das Magnesiumion bei der Strukturbestimmung nicht in der Elektronendichtekarte detektierbar ist. Wenn diese Magnesiumbindungsstelle allerdings noch in der Struktur anderer tRNA^{Ser}-

Isoakzeptoren festgestellt werden kann, so ist davon auszugehen, dass diese auch eine Funktion bei der Interaktion mit Proteinen oder dem Ribosom hat.

Die Untersuchung der zweiten Magnesiumbindungsstelle zeigte nur wenige Gemeinsamkeiten zwischen beiden Strukturen auf. Die Wasserpositionen der Hydrathülle sind bis auf eine ausschließlich in der Struktur des Isoakzeptors RS-1661 vorhanden, obwohl gleichzeitig vier Wassermoleküle der ersten Hydratschicht der RNA identische Positionen aufweisen (Abbildung 4.16). Wie schon bei der Beschreibung der Magnesiumbindungsstelle vermutet, ist diese wahrscheinlich artifizieller Natur und in der Kristallpackung begründet.

Eine Analyse der Strukturen anderer tRNAs nach weiteren Magnesiumbindungsstellen ergab mehrere Beispiele: Es gibt eine Magnesiumbindungsstelle, die sowohl für die tRNA^{Phe} aus Hefe (Shi et al., 2000) und einen tRNA^{Gly}-Akzeptorstamm aus *E.coli* beschrieben wurde (Förster et al., 2007c). Das hydratisierte Magnesiumion befindet sich in beiden Strukturen im Bereich des Basenpaares 3-70. In dieser Region wurde eine ähnliche Magnesiumbindungsstelle in einer NMR-Studie der tRNA^{Ala} detektiert (Limmer et al., 1993).

Nach der Definition von Draper (Draper, 2004) gehören vollständig hydratisierte Mg²⁺-Ionen aber zur Ionenatmosphäre, was eine Zuordnung dieser als spezifisch gebundene Ionen, mit einer konkreten Funktion entweder für die Struktur der tRNA oder die Erkennung durch zelluläre Interaktionspartner, nur schwer möglich macht. Gleichzeitig kann eine dreifache Bestätigung dieser Magnesiumposition kaum durch eine zufällige Lokalisation eines Mitgliedes der Ionenatmosphäre erklärt werden, so dass es durchaus denkbar ist, dass dieses Magnesiumion eine funktionelle Bedeutung hat. Da die Lage des Magnesiums in verschiedenen tRNA-Spezies festgestellt wurde, ist aber eher eine Funktion im Zusammenhang mit der Interaktion der tRNA mit dem Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) oder dem Ribosom wahrscheinlich, als im Zusammenhang mit den korrespondierenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Denn die Synthetase erkennt spezifische tRNA-Identitätselemente, während EF-Tu und das Ribosom alle tRNAs gleichermaßen als Interaktionspartner akzeptieren.

Die Strukturen der tRNA^{Ser}-Akzeptorstämme wurden in weiteren Superpositionierungsexperimenten mit der Struktur des Seryl-tRNA-Synthetase/tRNA-Komplexes übereinandergelagert. In diesem Zusammenhang wurde von Banerjee und Kollegen

gezeigt, dass bei der Bindung einer tRNA an die korrespondierende Aminoacyl-tRNA-Synthetase nahezu kein Wasser frei wird (Banerjee et al., 2003). Dies ermöglicht es durch einfache Übereinanderlagerungsexperimente, Informationen über den Beitrag des Solvensnetzwerkes der hochaufgelösten tRNA zur Bindung zwischen Protein und Nukleinsäure zu gewinnen.

Die Tatsache, dass die Synthetase aus *T. thermophilus* stammt, während die tRNA ihren Ursprung in *E.coli* hat, sollte keine Einschränkung der Aussagekraft der Übereinanderlagerung mit sich bringen, denn durch die hohe Ähnlichkeit der beiden Synthetasen (Fujinaga et al., 1993) und der tRNA-Identitätselemente beider Organismen kann angenommen werden, dass beide Systeme auf eine sehr ähnliche Art und Weise funktionieren (Cusack et al., 1996). Bei der Superpositionierung konnten die Phosphatrückgrate der beiden tRNA^{Ser}-Isoakzeptoren nahezu in Deckung mit dem der ursprünglich in der Struktur vorhandenen tRNA^{Ser} gebracht werden (Abbildung 4.17). Die Wassermoleküle der Struktur des hochaufgelösten Akzeptorstammes füllen dabei die Lücken an der Grenzfläche von Protein und RNA und sorgen somit für eine höhere Stabilität des Komplexes.

So konnte gezeigt werden, dass durch die Einbindung der Aminosäure Arg267 in das Solvensnetzwerk der tRNA, mehrere wasservermittelte Kontakte zwischen der Aminosäure und dem Zuckerphosphatrückgrat verschiedener Nukleotide dieser Region detektierbar sind (Abbildung 4.18). Diese Bindungen deuten auf ein Interaktionsnetzwerk hin, das mit einer direkten Bindung zwischen Arg267 und C69 bei der Aufklärung der Komplexstruktur nicht vollständig beschrieben werden konnte. In einem Beispiel für eine wasservermittelte basenspezifische Interaktion der Synthetase mit der tRNA, steht Phe262 über zwei brückende Wassermoleküle in Kontakt mit den konservierten Identitätselementen G1 und G2. Diese stellen sowohl in *E.coli* als auch in *T.thermophilus* tRNA^{Ser}-Identitätselemente dar.

Interessant ist auch eine Analyse des gemeinsamen Wassernetzwerkes der beiden gleichzeitig in die Struktur des Synthetase/tRNA-Komplexes projizierten tRNA^{Ser}-Isoakzeptoren (Abbildung 4.20). Die in beiden Akzeptorstamm-Strukturen vorhandenen Wassermoleküle wirken auf drei Funktionsebenen: (i) als Brücke zwischen der SerRS und der tRNA^{Ser}; (ii) sie bilden Wasserstoffbrücken zu einem der beiden Makromoleküle aus und fungieren somit als Solvens; (iii) einige sind ausschließlich in Kontakt zu anderen Wassermolekülen und füllen somit den Raum

zwischen Protein und Nukleinsäure bzw. stabilisieren über Wechselwirkungen mit anderen Wassermolekülen, das Hydratnetzwerk in diesem Bereich.

Diese Beispiele zeigen die Beteiligung des Solvensnetzwerkes an der Bindung der tRNA^{Ser} zur korrespondierenden Seryl-tRNA-Synthetase, die bei der Untersuchung der Synthetasestruktur nicht möglich waren. Für Komplexstrukturen von tRNAs mit deren korrespondierenden Synthetasen, in denen keine Einbeziehung des Solvensnetzwerkes in die Analyse der Bindung von tRNA und aaRS durchgeführt wurde, ist diese Kombination aus hochaufgelösten tRNA-Bereichen, insbesondere dem wichtige Identitätselemente tragenden Akzeptorstamm, und niedriger aufgelösten Protein-Nukleinsäurekomplexen eine gute Möglichkeit das Verständnis für die Beteiligung der gebundenen Wassermoleküle an der Erkennung und Komplexbildung dieser biologischen Makromoleküle zu erhöhen.

Von der Sequenz des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes RS-1661 wurde eine modifizierte „locked“ Nukleinsäure (LNA) abgeleitet, so dass sequenzunabhängige Vergleiche zwischen der LNA und der RNA durchgeführt werden konnten. Die Struktur der LNA wurde bis zu einer Auflösung von 1,9 Å aufgeklärt. Die asymmetrische Einheit enthält zwei Nukleinsäure-Doppelstränge, die von einem Kobalthexaminmolekül komplexiert werden. Das Kobalthexamin befindet sich an der Schnittstelle der beiden Doppelhelices und bildet direkte und indirekte Kontakte zu den beiden endständigen Nukleotiden G6 und G7 beider LNA-Moleküle aus (Abbildung 4.23). Das Kobalthexamin hält dadurch praktisch die beiden Nukleinsäuremoleküle zusammen und wirkt somit stabilisierend auf die Anordnung der beiden LNA-Doppelstränge in der asymmetrischen Einheit (Abbildung 4.21).

Die Struktur der LNA stellt eine neue und einzigartige Form von Nukleinsäuredoppelhelix dar, die weder bei natürlichen noch bei anderen modifizierten Nukleinsäuren bisher beobachtet wurde. Es wurde eine Verringerung des δ -Winkels zwischen den Atomen C4' und C3' des modifizierten Zuckers im Vergleich zur RNA festgestellt. Durch einen im Vergleich zur RNA verringerten helikalen *Twist* benötigt die LNA für eine komplette Windung der Doppelhelix 14 Basenpaare im Vergleich zu 11 Basenpaaren pro Windung bei RNA-Doppelhelices (Abbildung 4.29 und Tabelle 4.12). Dies führt zu einer Öffnung der großen Furche und einer Verkleinerung der kleinen Furche der LNA. Gleichzeitig ist die Basenstapelung in der LNA wesentlich effizienter, was die Interaktionsmöglichkeiten

benachbarter Basenpaare erhöht. Zum einen sind die Roll- und Kippwinkel im Vergleich zur RNA reduziert, so dass benachbarte Basenpaare nahezu parallel übereinander liegen. Zum anderen ermöglicht die Nukleinsäuregeometrie der LNA Interstrang-Basenstapelungen (Abbildung 4.22). Durch die Übereinanderlagerung der Basen beider Doppelstrang-bildender Einzelstränge können die senkrecht zu den aromatischen Ringen stehenden π -Orbitale der beteiligten Basen in Kontakt treten. Diese π - π -Interaktionen zwischen den beiden Strängen führen dazu, dass mehr Energie aufgewendet werden muss, um den Doppelstrang aufzuschmelzen.

Neben den beiden LNA-Molekülen wurden in der Elektronendichtekarte 100 Wassermoleküle und ein Magnesiumion detektiert. Das machte eine Analyse der Hydratation der modifizierten Nukleinsäure auch im Vergleich zur korrespondierenden RNA möglich. Dabei konnte gezeigt werden, dass die LNA ähnlich hydratisiert ist, wie die korrespondierende RNA. Im Bereich der Basen ist dieses Ergebnis nicht überraschend, da die Wasserstoffbrückenakzeptoren und -donoren praktisch dieselben sind (Abbildung 4.26). Eine der großen Fragen bezüglich der LNA war bis dahin, inwieweit das in die Methylenbrücke einbezogene Sauerstoffatom O2' des modifizierten Zuckers an der Bindung von Wassermolekülen und Liganden beteiligt sein kann.

Mit der hier beschriebenen Struktur konnte belegt werden, dass dieses Sauerstoffatom ähnliche quantitative Bindungsfähigkeiten aufweist, wie die 2'-OH-Gruppe der Ribose (Abbildung 4.28). Allerdings zeigen die Wassermoleküle in direkter Nachbarschaft des O2'-Atoms der LNA eine veränderte Distribution im Vergleich zu denen um die 2'-OH-Gruppe der Ribose in RNA. Diese Unterschiede bedingen, dass durch die Methylenbrücke weniger Raum in der unmittelbaren Umgebung des Sauerstoffatoms zur Verfügung steht, so dass die an das Sauerstoffatom koordinierten Wassermoleküle aufgrund sterischer Restriktionen in den freien Raum ausweichen. Dieser Unterschied kann das Bindungsverhalten der LNA an andere Makromoleküle beeinflussen, gerade in Anbetracht der Tatsache, dass die Hydratation der 2'-OH-Gruppe der Ribose von entscheidender Bedeutung bei der Komplexbildung von RNA- und Proteinmolekülen ist (Draper, 1999).

Die hier beschriebene Hydratation der LNA erweitert auch die Vorhersagen der Moleküldynamikstudie zum selben Thema (Pande et al., 2008). Die Autoren beschrieben darin ein dichtes Netzwerk von Wassermolekülen am Phosphatrückgrat,

aber eine im Vergleich zur RNA geringere Hydratisierung des Zuckers, insbesondere des gebrückten Sauerstoffatoms O2'. Die Ergebnisse der kristallographischen Untersuchung zeigen aber eher qualitative als quantitative Unterschiede in diesem Punkt. Die Einbindung der 2'-OH-Gruppe in die Stabilisierung der Nukleinsäure über die Methylenbrücke beeinträchtigt deren Fähigkeit mit Wassermolekülen zu interagieren nicht. Das gebrückte Sauerstoffatom des Zuckers ist aktiv an der Organisation der ersten Lage des Solvensnetzwerkes beteiligt.

Ein weiteres Beispiel dafür, dass das methylierte O2'-Atom der LNA an der Ligandenbindung in ähnlicher Weise beteiligt sein kann, wie die 2'-OH-Gruppe der RNA, ist die Bindung eines Magnesiumions in diesem Bereich (Abbildung 4.24). Da das Magnesiumion hier die energetisch unvorteilhafte, direkte Bindung an die Nukleinsäure unter Abgabe zweier Wassermoleküle der Hydrathülle eingeht, zeigt dieses Beispiel eindrucksvoll die Fähigkeit des gebrückten Sauerstoffatoms zur Ligandenbindung.

Die Struktur der LNA-Doppelhelix ordnet die Struktur der RNA/LNA-Heteroduplexstruktur (Nielsen et al., 2004) in eine konformationell-geometrische Reihe von der RNA über das Hybrid zur LNA ein. Denn die Hybridstruktur stellt ein Intermediat in dieser Reihe von Nukleinsäurestrukturen dar, bezogen auf deren geometrische Parameter (Tabelle 4.11) und Konformationen (Abbildung 4.29). Allerdings ist noch ungeklärt, inwieweit sich die konformationellen Änderungen und die hohe Thermostabilität auf die Spezifität der LNA in Bezug auf Basenfehlpaarungen auswirken. Es gibt erste Hinweise darauf, dass das Basenpaarungsverhalten der LNA bei Fehlpaarungen von dem der RNA abweicht (Förster 2010, persönliche Kommunikation). Zur Klärung dieser Frage wurde bereits eine LNA mit G-U-Wobble-Basenpaaren kristallisiert (Förster et al., 2009).

Wie einleitend beschrieben, birgt die modifizierte „locked“ Nukleinsäure aufgrund ihrer erhöhten biologischen und thermischen Stabilität großes Potential für ein breites Spektrum an diagnostischen und therapeutischen Anwendungen. Dies wird durch ihren Einsatz in einer großen Anzahl verschiedener RNA-Technologien unterstrichen. Allerdings zeigt die hier beschriebene Struktur der LNA-Doppelhelix Limitierungen für deren Einsatz auf: Beispielsweise bewirkte eine Substitution von Doppelstrangbereichen in RNA-Molekülen, die mit anderen Molekülen Komplexe bilden, dass die Bindungseigenschaften verändert würden. RNA, die zu therapeutischen oder

diagnostischen Zwecken LNA-substituiert wird, könnte aufgrund der veränderten Struktur nicht mehr mit natürlichen bzw. erwarteten Bindungspartnern interagieren.

Anschaulich wird dies bei einer Analyse der Arbeit von Schmidt und Kollegen (Schmidt et al., 2004). In ihrer Untersuchung systematischer Substitutionen des Tenascin-C-Aptamers haben sie beobachtet, dass Substitutionen in der Stammregion die Spezifität und Affinität des Aptamers erhöhen, aber Substitutionen in der Loopregion des Aptamers, die wahrscheinlich an der Bindung des Zielmoleküls beteiligt ist, zu einer Schwächung der Bindung des Aptamers an das Zielmolekül führen: Die Einführung von LNA-Bausteinen in für die Bindung kritische Regionen hat deren Struktur so stark verändert, dass die Komplementarität von Aptamer und Ziel nicht mehr gegeben war.

Darüberhinaus geben die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise darauf, dass auch stabilisierende Substitutionen in Doppelstrangbereichen, die nicht an der Bindung von Interaktionspartnern beteiligt sind, einen negativen Einfluss auf das Bindungsverhalten ausüben können. Denn durch die Einführung von LNA-Bausteinen wird die Geometrie einer Doppelhelix verändert, was auch in entfernten Bereichen der Gesamtstruktur zu Veränderungen führen kann. So ist denkbar, dass die an eine LNA-substituierte, doppelhelikale Stammregion eines Aptamers anschließende Loopregion, die die Bindung an das Zielmolekül vermittelt, nach der Substitution mit veränderten Winkeln in den Kontext der Gesamtstruktur eingebettet ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen genaue Vorhersagen über den Einfluss von LNA-Substitutionen auf die Nukleinsäuregeometrie möglich.

Durch die Fokussierung auf kurze Nukleinsäuren, die in hochaufgelösten Strukturen resultierten, konnte mit dieser Arbeit ein Beitrag zum Verständnis der Konformation, Hydratation und Ligandenbindung von Nukleinsäuren geleistet werden. Es wurde am Beispiel des tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes gezeigt, wie einfache Sequenzmotive die Bindung kleiner Moleküle an Ribonukleinsäuren ermöglichen. Anhand des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes konnte der Einfluss der Hydratation von Ribonukleinsäuren auf die Bindung an biologische Interaktionspartner dargelegt und die Frage nach spezifischen Magnesiumbindungsstellen in tRNA-Molekülen diskutiert werden. Die Struktur der LNA-Doppelhelix zeigte eine einzigartige Nukleinsäurekonformation, die Auswirkungen auf deren Einsatz in diagnostischen und therapeutischen Anwendungen haben wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Hochaufgelöste Strukturen von Nucleinsäuren geben Aufschluss über die Konformation, Hydratation und Ligandenbindung der Moleküle. Als Modellsysteme für natürliche Nucleinsäuren wurden zwei tRNA-Akzeptorstämme und zum Vergleich eine davon abgeleitete modifizierte „locked“ Nucleinsäure untersucht. Um eine maximale Auflösung der Strukturen zu erzielen, wurden Kristallisationsansätze unter Mikrogravitationsbedingungen durchgeführt und gleichzeitig die Länge der untersuchten Moleküle auf sieben Basenpaare begrenzt.

Anhand der Struktur des tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes konnte beispielhaft die Bindung von kleinen Molekülen an einfache Nucleinsäurefaltungsmotive gezeigt werden. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen zur basen-spezifischen Bindung von kleinen Molekülen an Aptamere und *Riboswitches*.

Die Struktur des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes weist durch ihre hohe Auflösung von 1,2 Å eine nahezu vollständige Hydratation aller Basenpaare auf. Da der Akzeptorstamm von tRNAs wesentliche Identitätsmerkmale für die Erkennung durch die korrespondierenden Aminoacyl-tRNA-Synthetasen trägt, konnte durch einen Vergleich mit einem Isoakzeptor der Einfluss des Wassernetzwerkes auf die Interaktion mit natürlichen Bindungspartnern untersucht werden. Dies wurde durch eine Superpositionierung der beiden Isoakzeptoren mit der Seryl-tRNA-Synthetase bestätigt und ausgeweitet.

Die Sequenz und Struktur des tRNA^{Ser}-Akzeptorstammes stellten die Grundlage für die Untersuchung der davon abgeleiteten Struktur einer „locked“ Nucleinsäure hinsichtlich Konformation, Hydratation und Ligandenbindung dar. Dies ermöglichte einen sequenzunabhängigen Vergleich der LNA mit der korrespondierenden RNA. Dabei zeigte sich, dass die LNA eine vorher nicht beschriebene Doppelhelixstruktur einnimmt, aus der heraus Gründe für die hohe thermische Stabilität dieser Nucleinsäureklasse abgeleitet werden konnten. Die Duplex ist im Vergleich zur RNA durch eine Streckung bei gleichzeitiger Öffnung charakterisiert, was konformationell eher anderen modifizierten als der natürlichen Nucleinsäure ähnelt. Trotz der strukturellen Unterschiede gleichen das Hydratationsmuster und das Ligandenbindungsverhalten in weiten Bereichen dem der natürlichen Nucleinsäure.

SUMMARY

High-resolution X-ray crystallography of nucleic acids is a powerful method to investigate conformation, hydration and ligand-binding of these molecules. Two tRNA-acceptorstem-microhelices were employed as model systems for natural nucleic acids and compared to a modified “locked” nucleic acid, which sequence was derived from one of those acceptorstems. Oligonucleotides were restricted to a length of seven base pairs and crystallization was even performed under microgravity conditions to maximize resolution of the structures.

The structure of the tRNA^{Arg} acceptorstem can be seen as a model for the binding of small molecules to simple structural motifs of nucleic acids. The results are consistent with investigations on base-specific interactions of small molecules with aptamers and riboswitches.

Due to its high resolution of 1.2 Å, the structure of the tRNA^{Ser} acceptorstem reveals a nearly complete hydration of all base pairs. Since tRNA acceptorstems carry important identity elements for the interaction with the cognate aminoacyl-tRNA-synthetase, a comparison with an isoacceptor yielded insight into the impact of the hydration network for the interaction of tRNAs with other molecules. These findings were confirmed and extended by a superposition of the two isoacceptors with the seryl-tRNA-synthetase.

The highly-resolved structure of the tRNA^{Ser} acceptorstem was the fundament for the investigation of a “locked” nucleic acid. The sequence of the LNA was derived from the acceptorstem. This allowed a sequence independent comparison of the modified nucleic acid with its corresponding natural counterpart. The structure was investigated with focus on conformation, hydration and ligand-binding. It could be demonstrated, that the LNA shows a double helix geometry, which differs significantly from natural nucleic acids and can be rather brought in vicinity to other modified nucleic acids. The structure of the LNA duplex can be described as a stretched helix with an enlarged helical pitch. Despite these structural differences the hydration and ligand-binding ability of the modified nucleic acid are similar to those observed in RNA.

LISTE DER VERWENDETEN REFERENZEN

- Allers, J., and Shamoo, Y. (2001). Structure-based analysis of protein-RNA interactions using the program ENTANGLE. *J. Mol. Biol.* 311, 75-86.
- Arndt, U.W., and Wonacott, A.J. (1977). *The Rotation Method in Crystallography*. (Amsterdam: North Holland Publishing Co.).
- Arnez, J.G., and Moras, D. (1997). Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends Biochem. Sci.* 22, 211-216.
- Asahara, H., Himeno, H., Tamura, K., Hasegawa, T., Watanabe, K., and Shimizu, M. (1993). Recognition nucleotides of *Escherichia coli* tRNA(Leu) and its elements facilitating discrimination from tRNA^{Ser} and tRNA^(Tyr). *J. Mol. Biol.* 231, 219-229.
- Asahara, H., Himeno, H., Tamura, K., Nameki, N., Hasegawa, T., and Shimizu, M. (1994). *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase recognizes tRNA^(Ser) by its characteristic tertiary structure. *J. Mol. Biol.* 236, 738-748.
- Auffinger, P., and Westhof, E. (1998). Hydration of RNA base pairs. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16, 693-707.
- Bahadur, R.P., Zacharias, M., and Janin, J. (2008). Dissecting protein-RNA recognition sites. *Nucleic Acids Res.* 36, 2705-2716.
- Baker, C.M., and Grant, G.H. (2007). Role of aromatic amino acids in protein-nucleic acid recognition. *Biopolymers* 85, 456-470.
- Banerjee, R., Mandal, A.K., Saha, R., Guha, S., Samaddar, S., Bhattacharyya, A., and Roy, S. (2003). Solvation change and ion release during aminoacylation by aminoacyl-tRNA synthetases. *Nucleic Acids Res.* 31, 6035-6042.
- Behling, K., Eichert, A., Fürste, J.P., Betzel, C., Erdmann, V.A., and Förster, C. (2009). Crystallization and X-ray diffraction analysis of an 'all-locked' nucleic acid duplex derived from a tRNA^(Ser) microhelix. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 65, 809-812.
- Belrhali, H., Yaremchuk, A., Tukalo, M., Larsen, K., Berthet-Colominas, C., Leberman, R., Beijer, B., Sproat, B., Is-Nielsen, J., Grubel, G., and . (1994). Crystal structures at 2.5 angstrom resolution of seryl-tRNA synthetase complexed with two analogs of seryl adenylate. *Science* 263, 1432-1436.
- Benjaminov, A., Westhof, E., and Krol, A. (2008). Distinctive structures between chimpanzee and human in a brain noncoding RNA. *RNA* 14, 1270-1275.
- Berisio, R., Vitagliano, L., Mazzarella, L., and Zagari, A. (2002). Crystal structure of the collagen triple helix model [(Pro-Pro-Gly)(10)](3). *Protein Sci.* 11, 262-270.

- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242.
- Betzl, C., Gourinath, S., Kumar, P., Kaur, P., Perbandt, M., Eschenburg, S., and Singh, T.P. (2001). Structure of a serine protease proteinase K from *Tritirachium album limber* at 0.98 Å resolution. *Biochemistry* 40, 3080-3088.
- Biou, V., Yaremchuk, A., Tukalo, M., and Cusack, S. (1994). The 2.9 Å crystal structure of *T. thermophilus* seryl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Ser). *Science* 263, 1404-1410.
- Braasch, D.A., Jensen, S., Liu, Y., Kaur, K., Arar, K., White, M.A., and Corey, D.R. (2003). RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 42, 7967-7975.
- Braunlin, W.H. (1995). NMR Studies of cation-binding environments an nucleic acids. *Adv. Biophys. Chem* 5, 89-139.
- Broutin, L., L'Hermite, I., Riès-Kautt, M., and Ducruix, A. (2000). 1,7 Å X-ray structure of space-grown collagenase crystals. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 56, 376-378.
- Carter, C.W., Jr. (1993). Cognition, mechanism, and evolutionary relationships in aminoacyl-tRNA synthetases. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 715-748.
- Cavarelli, J., Eriani, G., Rees, B., Ruff, M., Boeglin, M., Mitschler, A., Martin, F., Gangloff, J., Thierry, J.C., and Moras, D. (1994). The active site of yeast aspartyl-tRNA synthetase: structural and functional aspects of the aminoacylation reaction. *EMBO J.* 13, 327-337.
- Cavarelli, J., Rees, B., Ruff, M., Thierry, J.C., and Moras, D. (1993). Yeast tRNA(Asp) recognition by its cognate class II aminoacyl-tRNA synthetase. *Nature* 362, 181-184.
- Cech, T.R., and Bass, B.L. (1986). Biological catalysis by RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 599-629.
- Cole, P.E., Yang, S.K., and Crothers, D.M. (1972). Conformational changes of transfer ribonucleic acid. Equilibrium phase diagrams. *Biochemistry* 11, 4358-4368.
- Connolly, M.L. (1986). Atomic size packing defects in proteins. *Int. J. Pept. Protein Res.* 28, 360-363.
- Crick, F. (1955). On Degenerate Templates and the Adaptor Hypothesis. A Note for the RNA Tie Club, Cambridge.
- Cusack, S. (1993). Sequence, structure and evolutionary relationships between class 2 aminoacyl-tRNA synthetases: an update. *Biochimie* 75, 1077-1081.
- Cusack, S. (1999). RNA-protein complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 66-73.
- Cusack, S. (1995). Eleven down and nine to go. *Nat. Struct. Biol.* 2, 824-831.

Cusack,S., Berthet-Colominas,C., Hartlein,M., Nassar,N., and Leberman,R. (1990). A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature* 347, 249-255.

Cusack,S., Yaremchuk,A., and Tukalo,M. (1996). The crystal structure of the ternary complex of *T.thermophilus* seryl-tRNA synthetase with tRNA(Ser) and a seryl-adenylate analogue reveals a conformational switch in the active site. *EMBO J.* 15, 2834-2842.

Dahm,S.C., and Uhlenbeck,O.C. (1991). Role of divalent metal ions in the hammerhead RNA cleavage reaction. *Biochemistry* 30, 9464-9469.

Darfeuille,F., Reigadas,S., Hansen,J.B., Orum,H., Di,P.C., and Toulme,J.J. (2006). Aptamers targeted to an RNA hairpin show improved specificity compared to that of complementary oligonucleotides. *Biochemistry* 45, 12076-12082.

Daune,M. (1997). *Molekulare Biophysik*. Friedr. Vieweg & Sohn Verlagsgesellschaft.

Delagoutte,B., Moras,D., and Cavarelli,J. (2000). tRNA aminoacylation by arginyl-tRNA synthetase: induced conformations during substrates binding. *EMBO J.* 19, 5599-5610.

DeLano,W.L. (2002). *The PyMol Molecular Graphics System*. (Palo Alto, CA, USA: DeLano Scientific).

Delarue,M., Poterszman,A., Nikonov,S., Garber,M., Moras,D., and Thierry,J.C. (1994). Crystal structure of a prokaryotic aspartyl tRNA-synthetase. *EMBO J.* 13, 3219-3229.

Dong,J., Boggon,T.J., Chayen,N.E., Raftery,J., Bi,R.C., and Helliwell,J.R. (1999). Bound-solvent structures for microgravity-, ground control-, gel- and microbatch-grown hen egg-white lysozyme crystals at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 55, 745-752.

Draper,D.E. (2004). A guide to ions and RNA structure. *RNA*. 10, 335-343.

Draper,D.E. (1999). Themes in RNA-protein recognition. *J. Mol. Biol.* 293, 255-270.

Eichert,A., Fürste,J.P., Schreiber,A., Perbandt,M., Betzel,C., Erdmann,V.A., and Förster,C. (2009). The 1.2Å crystal structure of an *E. coli* tRNA^{Ser} acceptor stem microhelix reveals two magnesium binding sites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 386, 368-373.

Eigen,M., Lindemann,B.F., Tietze,M., Winkler-Oswatitsch,R., Dress,A., and von,H.A. (1989). How old is the genetic code? Statistical geometry of tRNA provides an answer. *Science* 244, 673-679.

Ellington,A.D., and Szostak,J.W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 346, 818-822.

Ellis,J.J., Broom,M., and Jones,S. (2007). Protein-RNA interactions: structural analysis and functional classes. *Proteins* 66, 903-911.

- Elmen, J., Lindow, M., Schutz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjarn, M., Hansen, H.F., Berger, U., Gullans, S., Kearney, P., Sarnow, P., Straarup, E.M., and Kauppinen, S. (2008). LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 452, 896-899.
- Elmen, J., Thonberg, H., Ljungberg, K., Frieden, M., Westergaard, M., Xu, Y., Wahren, B., Liang, Z., Orum, H., Koch, T., and Wahlestedt, C. (2005). Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res.* 33, 439-447.
- Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60, 2126-2132.
- Erdmann, V.A., Brauer, A.E., Förster, C., Kurreck, J., Fürste, J.P., and Barciszewski, J. (2008). RNA Technologien. *J. Verbr. Lebensm.* 3, 49-64.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J., and Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* 347, 203-206.
- Feldstein, P.A., Buzayan, J.M., and Bruening, G. (1989). Two sequences participating in the autolytic processing of satellite tobacco ringspot virus complementary RNA. *Gene* 82, 53-61.
- Ferre-D'Amare, A.R., and Rupert, P.B. (2002). The hairpin ribozyme: from crystal structure to function. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 1105-1109.
- Förster, C., Brauer, A.B., Brode, S., Fürste, J.P., Betzel, C., and Erdmann, V.A. (2007a). tRNA^{Ser} acceptor stem: conformation and hydration of a microhelix in a crystal structure at 1.8 Å resolution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 63, 1154-1161.
- Förster, C., Brauer, A.B., Fürste, J.P., Betzel, C., Weber, M., Cordes, F., and Erdmann, V.A. (2007b). Superposition of a tRNA^{Ser} acceptor stem microhelix into the seryl-tRNA synthetase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 415-418.
- Förster, C., Brauer, A.B., Perbandt, M., Lehmann, D., Fürste, J.P., Betzel, C., and Erdmann, V.A. (2007c). Crystal structure of an *Escherichia coli* tRNA(Gly) microhelix at 2.0 Å resolution. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363, 621-625.
- Förster, C., Oberthuer, D., Gao, J., Eichert, A., Quast, F.G., Betzel, C., Nitsche, A., Erdmann, V.A., and Fürste, J.P. (2009). Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of an LNA 7-mer duplex derived from a ricin aptamer. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 65, 881-885.
- Fujinaga, M., Berthet-Colominas, C., Yaremchuk, A.D., Tukalo, M.A., and Cusack, S. (1993). Refined crystal structure of the seryl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus* at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 234, 222-233.
- Giege, R., Sissler, M., and Florentz, C. (1998). Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res.* 26, 5017-5035.

- Habash, J., Boggon, T.J., Raftery, J., Chayen, N.E., Zagalsky, P.F., and Helliwell, J.R. (2003). Apocrustacyanin C(1) crystals grown in space and on earth using vapour-diffusion geometry: protein structure refinements and electron-density map comparisons. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59, 1117-1123.
- Han, Y., Cang, H.X., Zhou, J.X., Wang, Y.P., Bi, R.C., Colelesage, J., Delbaere, L.T., Nahoum, V., Shi, R., Zhou, M., Zhu, D.W., and Lin, S.X. (2004). Protein crystal growth on board Shenzhou 3: a concerted effort improves crystal diffraction quality and facilitates structure determination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 1081-1086.
- Hasegawa, T., Himeno, H., Asahara, H., Tamura, K., Nameki, N., Watanabe, K., and Shimizu, M. (1991). Identity determinants of *E. coli* tRNAs. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 153-154.
- Hou, Y.M., and Schimmel, P. (1988). A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA. *Nature* 333, 140-145.
- Hubbard, S.J., and Argos, P. (1994a). Cavities and packing at protein interfaces. *Protein Sci.* 3, 2194-2206.
- Hubbard, S.J., Gross, K.H., and Argos, P. (1994b). Intramolecular cavities in globular proteins. *Protein Eng* 7, 613-626.
- Jadhav, V.M., Scaria, V., and Maiti, S. (2009). Antagomirzymes: oligonucleotide enzymes that specifically silence microRNA function. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 48, 2557-2560.
- Jakobsen, M.R., Haasnoot, J., Wengel, J., Berkhout, B., and Kijms, J. (2007). Efficient inhibition of HIV-1 expression by LNA modified antisense oligonucleotides and DNAzymes targeted to functionally selected binding sites. *Retrovirology.* 4, 29.
- Jeong, E., Kim, H., Lee, S.W., and Han, K. (2003). Discovering the interaction propensities of amino acids and nucleotides from protein-RNA complexes. *Mol. Cells* 16, 161-167.
- Jones, S., Daley, D.T., Luscombe, N.M., Berman, H.M., and Thornton, J.M. (2001). Protein-RNA interactions: a structural analysis. *Nucleic Acids Res.* 29, 943-954.
- Jukes, T.H. (1995). A comparison of mitochondrial tRNAs in five vertebrates. *J. Mol. Evol.* 40, 537-540.
- Kankia, B.I., and Marky, L.A. (1999). DNA, RNA and RNA/RNA oligomer duplexes: A comparative study of their stability, heat, hydration and Mg²⁺ binding properties. *J. Phys. Chem. B* 103, 8759-8767.
- Kawasaki, A.M., Casper, M.D., Freier, S.M., Lesnik, E.A., Zounes, M.C., Cummins, L.L., Gonzalez, C., and Cook, P.D. (1993). Uniformly modified 2'-deoxy-2'-fluoro phosphorothioate oligonucleotides as nuclease-resistant antisense compounds with high affinity and specificity for RNA targets. *J. Med. Chem.* 36, 831-841.

- Kendrew, J.C., Dickerson, R.E., Strandberg, B.E., Hart, R.G., Davies, D.R., Phillips, D.C., and Shore, V.C. (1960). Structure of myoglobin: A three-dimensional Fourier synthesis at 2 Å resolution. *Nature* 185, 422-427.
- Kim, O.T., Yura, K., and Go, N. (2006). Amino acid residue doublet propensity in the protein-RNA interface and its application to RNA interface prediction. *Nucleic Acids Res.* 34, 6450-6460.
- Klein, D.J., Moore, P.B., and Steitz, T.A. (2004). The contribution of metal ions to the structural stability of the large ribosomal subunit. *RNA*. 10, 1366-1379.
- Ko, T.P., Kuznetsov, Y.G., Malkin, A.J., Day, J., and McPherson, A. (2001). X-ray diffraction and atomic force microscopy analysis of twinned crystals: rhombohedral canavalin. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57, 829-839.
- Leberman, R. (1985). Crystals in space. *Science* 230, 373-374.
- Leipply, D., and Draper, D.E. (2010). Dependence of RNA tertiary structural stability on Mg²⁺ concentration: interpretation of the Hill equation and coefficient. *Biochemistry* 49, 1843-1853.
- Lejeune, D., Delsaux, N., Charlotiaux, B., Thomas, A., and Basseur, R. (2005). Protein-nucleic acid recognition: statistical analysis of atomic interactions and influence of DNA structure. *Proteins* 61, 258-271.
- Leveque, F., Plateau, P., Dessen, P., and Blanquet, S. (1990). Homology of lysS and lysU, the two *Escherichia coli* genes encoding distinct lysyl-tRNA synthetase species. *Nucleic Acids Res.* 18, 305-312.
- Limmer, S., Hofmann, H.P., Ott, G., and Sprinzl, M. (1993). The 3'-terminal end (NCCA) of tRNA determines the structure and stability of the aminoacyl acceptor stem. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 6199-6202.
- Littke, W., and John, C. (1984). Materials: protein single crystal growth under microgravity. *Science* 225, 203-204.
- Lorber, B. (2002). The crystallization of biological macromolecules under microgravity: a way to more accurate three-dimensional structures? *Biochim. Biophys. Acta* 1599, 1-8.
- Lorenz, S., Perbandt, M., Lippmann, C., Moore, K., DeLucas, L.J., Betzel, C., and Erdmann, V.A. (2000). Crystallization of engineered *Thermus flavus* 5S rRNA under earth and microgravity conditions. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 56, 498-500.
- Lu, X.J., and Olson, W.K. (2003). 3DNA: a software package for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res.* 31, 5108-5121.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2005). Likelihood-enhanced fast translation functions. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 61, 458-464.

- Miele, A.E., Federici, L., Sciara, G., Draghi, F., Brunori, M., and Vallone, B. (2003). Analysis of the effect of microgravity on protein crystal quality: the case of a myoglobin triple mutant. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59, 982-988.
- Mitra, S., Biswas, R., Shi, K., and Sundaralingam, M. (2000). Crystal structure of an RNA duplex [r(gugcaca)dC]₂ with 3'-dinucleoside overhangs forming a superhelix. *J. Biomol. Struct. Dyn. Conversation* 11, 189-194.
- Montange, R.K., and Batey, R.T. (2008). Riboswitches: emerging themes in RNA structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 37, 117-133.
- Morozova, N., Allers, J., Myers, J., and Shamoo, Y. (2006). Protein-RNA interactions: exploring binding patterns with a three-dimensional superposition analysis of high resolution structures. *Bioinformatics.* 22, 2746-2752.
- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 53, 240-255.
- Nagel, G.M., and Doolittle, R.F. (1991). Evolution and relatedness in two aminoacyl-tRNA synthetase families. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 8121-8125.
- Nagel, G.M., and Doolittle, R.F. (1995). Phylogenetic analysis of the aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Mol. Evol.* 40, 487-498.
- Ng, J.D., Sauter, C., Lorber, B., Kirkland, N., Arnez, J., and Giege, R. (2002). Comparative analysis of space-grown and earth-grown crystals of an aminoacyl-tRNA synthetase: space-grown crystals are more useful for structural determination. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58, 645-652.
- Nielsen, K.E., Rasmussen, J., Kumar, R., Wengel, J., Jacobsen, J.P., and Petersen, M. (2004). NMR studies of fully modified locked nucleic acid (LNA) hybrids: solution structure of an LNA:RNA hybrid and characterization of an LNA:DNA hybrid. *Bioconj. Chem.* 15, 449-457.
- Normanly, J., Ogden, R.C., Horvath, S.J., and Abelson, J. (1986). Changing the identity of a transfer RNA. *Nature* 321, 213-219.
- Normanly, J., Ollick, T., and Abelson, J. (1992). Eight base changes are sufficient to convert a leucine-inserting tRNA into a serine-inserting tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 5680-5684.
- Otwinowski, Z. (1991). DENZO: A film processing program for macromolecular crystallography. (Yale University).
- Otwinowski, Z. (1993). SCALEPACK: Software for the scaling together of integrated intensities measured on a number of separate diffraction images. (Yale University).
- Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. *Methods in Enzymology* 276, 307-326.

- Padilla, J.E., and Yeates, T.O. (2003). A statistic for local intensity differences: robustness to anisotropy and pseudo-centering and utility for detecting twinning. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59, 1124-1130.
- Pan, B., and Sundaralingam, M. (1999). Mismatched base pairing in RNA crystal structures. *J. Quantum Chem.* 75, 275-287.
- Pande, V., and Nilsson, L. (2008). Insights into structure, dynamics and hydration of locked nucleic acid (LNA) strand-based duplexes from molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Res.* 36, 1508-1516.
- Perutz, M.F., Rossmann, M.G., Cullis, A.F., Muirhead, H., Will, G., and North, A.C. (1960). Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* 185, 416-422.
- Petersen, M., Bondensgaard, K., Wengel, J., and Jacobsen, J.P. (2002). Locked nucleic acid (LNA) recognition of RNA: NMR solution structures of LNA:RNA hybrids. *J. Am. Chem Soc.* 124, 5974-5982.
- Petersen, M., and Wengel, J. (2003). LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends Biotechnol.* 21, 74-81.
- Pollard, K.S., Salama, S.R., Lambert, N., Lambot, M.A., Coppens, S., Pedersen, J.S., Katzman, S., King, B., Onodera, C., Siepel, A., Kern, A.D., Dehay, C., Igel, H., Ares, M., Jr., Vanderhaeghen, P., and Haussler, D. (2006). An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans. *Nature* 443, 167-172.
- Poterszman, A., Plateau, P., Moras, D., Blanquet, S., Mazauric, M.H., Kreutzer, R., and Kern, D. (1993). Sequence, overproduction and crystallization of aspartyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. Implications for the structure of prokaryotic aspartyl-tRNA synthetases. *FEBS Lett.* 325, 183-186.
- Price, S., Cusack, S., Borel, F., Berthet-Colominas, C., and Leberman, R. (1993). Crystallization of the seryl-tRNA synthetase:tRNAs^(ser) complex of *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 324, 167-170.
- Price, S.R., Ito, N., Oubridge, C., Avis, J.M., and Nagai, K. (1995). Crystallization of RNA-protein complexes. I. Methods for the large-scale preparation of RNA suitable for crystallographic studies. *J. Mol. Biol.* 249, 398-408.
- Prody, G.A., Bakos, J.T., Buzayan, J.M., Schneider, I.R., and Bruening, G. (1986). Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* 231, 1577-1580.
- Rashin, A.A., Iofin, M., and Honig, B. (1986). Internal cavities and buried waters in globular proteins. *Biochemistry* 25, 3619-3625.
- Rasmussen, H., Kastrup, J.S., Nielsen, J.N., Nielsen, J.M., and Nielsen, P.E. (1997). Crystal structure of a peptide nucleic acid (PNA) duplex at 1.7 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 4, 98-101.
- Read, R.J., and Schierbeek, A.J. (1988). A phased translation function. *J. Appl. Cryst.* 21, 490-495.

Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F., and Klug, A. (1974). Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature* 250, 546-551.

Romer, R., and Hach, R. (1975). tRNA conformation and magnesium binding. A study of a yeast phenylalanine-specific tRNA by a fluorescent indicator and differential melting curves. *Eur. J. Biochem.* 55, 271-284.

Rould, M.A., Perona, J.J., Soll, D., and Steitz, T.A. (1989). Structure of *E. coli* glutamyl-tRNA synthetase complexed with tRNA(Gln) and ATP at 2.8 Å resolution. *Science* 246, 1135-1142.

Rypniewski, W., Vallazza, M., Perbandt, M., Klusmann, S., DeLucas, L.J., Betzel, C., and Erdmann, V.A. (2006). The first crystal structure of an RNA racemate. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 62, 659-664.

Saenger, W. (1984). *Principles of Nucleic Acid Structure*. Springer-Verlag.

Saks, M.E., and Sampson, J.R. (1996). Variant minihelix RNAs reveal sequence-specific recognition of the helical tRNA(Ser) acceptor stem by *E. coli* seryl-tRNA synthetase. *EMBO J.* 15, 2843-2849.

Sauter, C., Lorber, B., and Giege, R. (2002). Towards atomic resolution with crystals grown in gel: the case of thaumatin seen at room temperature. *Proteins* 48, 146-150.

Sauter, C., Otalora, F., Gavira, J.A., Vidal, O., Giege, R., and Garcia-Ruiz, J.M. (2001). Structure of tetragonal hen egg-white lysozyme at 0.94 Å from crystals grown by the counter-diffusion method. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57, 1119-1126.

Schatz, D., Leberman, R., and Eckstein, F. (1991). Interaction of *Escherichia coli* tRNA(Ser) with its cognate aminoacyl-tRNA synthetase as determined by footprinting with phosphorothioate-containing tRNA transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 6132-6136.

Schimmel, P. (1987). Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 125-158.

Schimmel, P., Giege, R., Moras, D., and Yokoyama, S. (1993). An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 8763-8768.

Schimmel, P.R., and Redfield, A.G. (1980). Transfer RNA in solution: selected topics. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 9, 181-221.

Schlegel, M.K., Essen, L.O., and Meggers, E. (2008). Duplex structure of a minimal nucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 8158-8159.

Schmidt, K.S., Borkowski, S., Kurreck, J., Stephens, A.W., Bald, R., Hecht, M., Friebe, M., Dinkelborg, L., and Erdmann, V.A. (2004). Application of locked nucleic acids to improve aptamer in vivo stability and targeting function. *Nucleic Acids Res.* 32, 5757-5765.

- Shakke, Z., Guzikevich-Guerstein, G., Frolow, F., Rabinovich, D., Joachimiak, A., and Sigler, P.B. (1994). Determinants of repressor/operator recognition from the structure of the trp operator binding site. *Nature* 368, 469-473.
- Shi, H., and Moore, P.B. (2000). The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 1.93 Å resolution: a classic structure revisited. *RNA* 6, 1091-1105.
- Sonavane, S., and Chakrabarti, P. (2009). Cavities in protein-DNA and protein-RNA interfaces. *Nucleic Acids Res.* 37, 4613-4620.
- Stein, A., and Crothers, D.M. (1976). Conformational changes of transfer RNA. The role of magnesium(II). *Biochemistry* 15, 160-168.
- Stein, C.A., Hansen, J.B., Lai, J., Wu, S., Voskresenskiy, A., Hog, A., Worm, J., Hedtjarn, M., Souleimanian, N., and Miller, P. (2010). Efficient gene silencing by delivery of locked nucleic acid antisense oligonucleotides, unassisted by transfection reagents. *Nucleic Acids Res.* 38, e3.
- Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Sneden, D., Kim, J.J., Kim, S.H., and Rich, A. (1974). Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA at 3.0 Å resolution. *Nature* 248, 20-24.
- Sundaralingam, M., and Pan, B. (2002). Hydrogen and hydration of DNA and RNA oligonucleotides. *Biophys. Chem* 95, 273-282.
- Takano, K., Yamagata, Y., and Yutani, K. (2003). Buried water molecules contribute to the conformational stability of a protein. *Protein Eng* 16, 5-9.
- The CCP4 suite: programs for protein crystallography. (1994). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 50, 760-763.
- Thomsen, R., Nielsen, P.S., and Jensen, T.H. (2005). Dramatically improved RNA in situ hybridization signals using LNA-modified probes. *RNA* 11, 1745-1748.
- Treger, M., and Westhof, E. (2001). Statistical analysis of atomic contacts at RNA-protein interfaces. *J. Mol. Recognit.* 14, 199-214.
- Tuerk, C., and Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 249, 505-510.
- Uhlenbeck, O.C. (1987). A small catalytic oligoribonucleotide. *Nature* 328, 596-600.
- Vaney, M.C., Maignan, S., Ries-Kautt, M., and Ducruix, A. (1996). High-resolution structure (1.33 Å) of a HEW lysozyme tetragonal crystal grown in the APCF apparatus. Data and structural comparison with a crystal grown under microgravity from SpaceHab-01 mission. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 52, 505-517.
- Vergara, A., Lorber, B., Sauter, C., Giege, R., and Zagari, A. (2005). Lessons from crystals grown in the Advanced Protein Crystallisation Facility for conventional crystallisation applied to structural biology. *Biophys. Chem* 118, 102-112.

- Vergara,A., Lorber,B., Zagari,R., and Giegé,R. (2003). Physical aspects of protein crystal growth investigated with the Advanced Protein Crystallization Facility in reduced gravity environments. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59, 2-15.
- Vester,B., Lundberg,L.B., Sorensen,M.D., Babu,B.R., Douthwaite,S., and Wengel,J. (2002). LNAzymes: incorporation of LNA-type monomers into DNAzymes markedly increases RNA cleavage. *J. Am. Chem. Soc.* 124, 13682-13683.
- Vester,B., and Wengel,J. (2004). LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry* 43, 13233-13241.
- Voss,N.R., and Gerstein,M. (2005). Calculation of standard atomic volumes for RNA and comparison with proteins: RNA is packed more tightly. *J. Mol. Biol.* 346, 477-492.
- Wahl,M.C., Rao,S.T., and Sundaralingam,M. (1996). The structure of r(UUCGCG) has a 5'-UU-overhang exhibiting Hoogsteen-like trans U.U base pairs. *Nat. Struct. Biol.* 3, 24-31.
- Wahl,M.C., and Sundaralingam,M. (1997). C-H...O hydrogen bonding in biology. *Trends Biochem. Sci.* 22, 97-102.
- Wahlestedt,C., Salmi,P., Good,L., Kela,J., Johnsson,T., Hokfelt,T., Broberger,C., Porreca,F., Lai,J., Ren,K., Ossipov,M., Koshkin,A., Jakobsen,N., Skouv,J., Oerum,H., Jacobsen,M.H., and Wengel,J. (2000). Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 5633-5638.
- Wakayama,N.I., Yin,D.C., Harata,K., Kiyoshi,T., Fujiwara,M., and Tanimoto,Y. (2006). Macromolecular crystallization in microgravity generated by a superconducting magnet. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1077, 184-193.
- Wang,A.H., Ughetto,G., Quigley,G.J., and Rich,A. (1987). Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2-Å resolution. *Biochemistry* 26, 1152-1163.
- Wang,L., Yang,C.J., Medley,C.D., Benner,S.A., and Tan,W. (2005). Locked nucleic acid molecular beacons. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 15664-15665.
- Watson,J.D., and Crick,F.H. (1953a). Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738.
- Watson,J.D., and Crick,F.H. (1953b). Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171, 964-967.
- Westhof,E. (1988). Water: an integral part of nucleic acid structure. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 17, 125-144.
- Westhof,E., Dumas,P., and Moras,D. (1988). Hydration of transfer RNA molecules: a crystallographic study. *Biochimie* 70, 145-165.
- Wienholds,E., Kloosterman,W.P., Miska,E., varez-Saavedra,E., Berezikov,E., de,B.E., Horvitz,H.R., Kauppinen,S., and Plasterk,R.H. (2005). MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 309, 310-311.

Williams, M.A., Goodfellow, J.M., and Thornton, J.M. (1994). Buried waters and internal cavities in monomeric proteins. *Protein Sci.* 3, 1224-1235.

Wu, X.Q., and Gross, H.J. (1993). The long extra arms of human tRNA((Ser)Sec) and tRNA(Ser) function as major identify elements for serylation in an orientation-dependent, but not sequence-specific manner. *Nucleic Acids Res.* 21, 5589-5594.

Yaremchuk, A.D., Tukalo, M.A., Krikliiviy, I., Malchenko, N., Biou, V., Berthet-Colominas, C., and Cusack, S. (1992). A new crystal form of the complex between seryl-tRNA synthetase and tRNA(Ser) from *Thermus thermophilus* that diffracts to 2.8 Å resolution. *FEBS Lett.* 310, 157-161.

EIGENE PUBLIKATIONEN

Eichert A, Behling K, Betzel C, Erdmann VA, Fürste JP, Förster C.

The Crystal Structure of an 'All Locked' Nucleic Acid Duplex.

Nucleic Acids Res. 2010;38(19):6729-36

Titelbild der Nucleic Acids Research-Ausgabe 38(19)

Eichert A, Fürste JP, Ulrich A, Betzel C, Erdmann VA, Förster C.

Superposition of two tRNA^{Ser} acceptor stem crystal structures: comparison of structure, ligands and hydration.

Biochem Biophys Res Commun. 2010;395(3):291-5.

Förster C, Oberthuer D, Gao J, **Eichert A**, Quast FG, Betzel C, Nitsche A, Erdmann VA, Fürste JP.

Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of an LNA 7-mer duplex derived from a ricin aptamer.

Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2009;65(Pt 9):881-5.

Behling K, **Eichert A**, Fürste JP, Betzel C, Erdmann VA, Förster C.

Crystallization and X-ray diffraction analysis of an 'all-locked' nucleic acid duplex derived from a tRNA^{Ser} microhelix.

Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2009;65(Pt 8):809-12.

Eichert A, Fürste JP, Schreiber A, Perbandt M, Betzel C, Erdmann VA, Förster C.

The 1.2Å crystal structure of an E. coli tRNA^{Ser} acceptor stem microhelix reveals two magnesium binding sites.

Biochem Biophys Res Commun. 2009;386(2):368-73.

Eichert A, Perbandt M, Oberthür D, Schreiber A, Fürste JP, Betzel C, Erdmann VA, Förster C.

Crystal structure of the E. coli tRNA^{Arg} aminoacyl stem isoacceptor RR-1660 at 2.0 Å resolution.

Biochem Biophys Res Commun. 2009;385(1):84-7.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt zuvorderst Prof. Dr. Volker A. Erdmann, der diese Arbeit durch seine Hilfe bei der Schaffung der wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Rahmenbedingungen erst möglich gemacht hat. Seine stets wohlwollende Unterstützung und die Schaffung einer Atmosphäre geistiger Freiheit waren mir ein ständiger Ansporn.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Markus Wahl für die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit.

Zu besonderem Dank bin ich Dr. Charlotte Förster für die ausgezeichnete und lehrreiche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die motivierende Stimmung über den gesamten Zeitraum der Arbeit verpflichtet.

Aufrichtig bedanken möchte ich mich bei Dr. Jens Peter Fürste für die vielen hilfreichen Ideen und Anregungen, sowie die unterhaltsamen Anekdoten.

Großer Dank gilt Dr. Norbert Krauß für die fundierte und freundliche Betreuung während der Zeit in seiner Arbeitsgruppe in London und darüber hinaus.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundliche Atmosphäre im Laboralltag, sowie die stete Hilfsbereitschaft. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Andreas Zeressen-Harte für die angenehme Kollegialität und das Lesen dieser Arbeit.

Katja danke ich von Herzen für die anregenden Diskussionen und die immer fröhliche und warmherzige Begleitung.

Der größte Dank gilt meinen Großeltern, ohne die diese Arbeit nicht im Ansatz möglich gewesen wäre. Sie haben mir durch alle Täler hinweg geholfen und mich auf meinem Weg jederzeit bedingungslos begleitet und unterstützt.

LEBENS LAUF

Dieser Bereich wurde aus datenschutztechnischen Gründen in der Online-Version entfernt.

ANHANG

Abkürzungen

°	Grad
°C	Grad Celsius
A	Adenosin
Å	Ångström
bp	Basenpaar
c	zenti (10^{-2})
C	Cytidin
C	Kohlenstoff
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
F	Fluor
g	Gravitation
G	Guanosin
H	Wasserstoff
HAR	<i>human accelerated region</i>
K	Kelvin
l	Liter
LNA	<i>locked</i> Nukleinsäure
m	Meter
m	milli (10^{-3})
M	mol/l, molar

MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
miRNA	<i>microRNA</i>
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
N	Stickstoff
ncRNA	<i>noncoding RNA</i>
nt	Nukleotid
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
O	Sauerstoff
OD	optische Dichte
OH	Hydroxyl-
PDB	Proteindatenbank
P	Phosphor
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
T	Thymidin
tRNA	Transfer RNA
U	Uracil

Geräte

Analysewaage:	AC 88, Mettler
Autoklav:	Varioklav 400 E, H+P Labortechnik GmbH
Eismaschine:	AF-10, Scotsman
Fotoapparat:	Camedia C-5060, Olympus
Kühl- und Gefrierschrank:	cooler____****, Bosch
Kühlfalle:	Refrigerated Vapor Trap RVT 100, Savant
Laser-Spectroscatter:	Laser-Spectroscatter 202, RiNA GmbH
Magnetrührer:	IKAMAG® REO
Mikroskop:	SZH-ILLB, Olympus
Ölpumpe:	Chemie-Hybrid-Pumpe RC5, vacuubrand
pH-Meter:	pH-Meter 766 Calimatic, Knick
Pipetten:	Labmate 2, 20, 200, 1000 µl, Abimed GmbH
Rotationsverdampfer:	SpeedVac SC 110, Savant
Spektralphotometer:	UV-VIS Spectrophotometer UV-1202, Shimadzu
Spectroimager:	Spectroimager 501, RiNA GmbH
Thermoschüttler:	Thermomixer comfort, Eppendorf
Trockenschrank:	Memmert
Vortex:	Vortex-Genie, Bender & Hobein
Wasserreinigungssystem:	Milli-Q Biocel, Millipore

Nukleinsäuren

Folgende während dieser Arbeit eingesetzten Nukleinsäuren wurden von der Firma IBA, Göttingen, in HPLC-aufgereinigter Qualität bezogen:

tRNA^{Arg}-Akzeptorstamm-MikroheliX-Isoakzeptor RR-1660 aus *E.coli*

5' -GCAUCCG-3' , 5' -CGGAUGC-3'

tRNA^{Arg}-Akzeptorstamm-MikroheliX-Isoakzeptor RR-1662 aus *E.coli*

5' -GUCCUCU-3' , 5' -AGGGGAC-3'

tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm-MikroheliX-Isoakzeptor RS-1660 aus *E.coli*

5' -GGAGAGA-3' , 5' -UCUCUCC-3'

LNA abgeleitet von tRNA^{Ser}-Akzeptorstamm-MikroheliX-Isoakzeptor RS-1660 aus *E.coli*

5' - (GGAGAGA)¹-3' , 5' - (TCTCTCC)¹-3'

Unmodifizierte Domäne der ncRNA HAR1F aus Schimpanse

5' -GAAAUUAUAGGUGUAGACACAUGUCAGCAGUGGAAAUAGUUUCU-3'

Unmodifizierte Domäne der humanen ncRNA HAR1F

5' -GAAUGAUGGGCGUAGACGCACGUCAGCGCGGAAAUAGUUUCU-3'

human 1A

5' –
AACGTGTCAGCTGAAATGATGGGCGTAGACGCACGTCAGCGGCGGAAATGGTTTCTATCAA
ATGAAAGT–3'

human 1B

5' –
ACTTTCATTTTGATAGAAACCATTTCCGCCGCTGACGTGCGTCTACGCCCATCATTTCAGCT
GACACGTT–3'

human 2A

5' –
CTTCTCTGTTTGGAGGAAACAGGACTGAAACTTGAGGAAAATCTCTAAACACTTTCATTTTG
ATAGAAAC–3'

human 2B

5' –
GAGGACGAAACGGTACCCGGTACCGTCTGAAACGGAGGAGACGTTACAGCAACGTGTCAGCT
GAAATGAT–3'

human 3A

5' –
TACCAGGTAATATACCACAACGTGTGTTTCTCTGGTTTTCTTCTCTGTTTGGAGGAAAC–3'

human 3B

5' –
TAATACGACTCACTATAGGGGTTTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGGTACCCGG–3'

chimp 1A

5' –
AATTTATCAACTGAAATTATAGGTGTAGACACATGTCAGCAGTGGAAATAGTTTCTATCAA
ATTAAAGT–3'

chimp 1B

5' –
ACTTTAATTTTGATAGAACTATTTCCACTGCTGACATGTGTCTACACCTATAATTTTCAGTT
GATAAATT–3'

chimp 2A

5' –
CTTCTCTGTTTGGAGGAAACAGGACTGAAATTTGAGGAAAATCTCTAAATACTTTAATTTTG
ATAGAAAC–3'

chimp 2B

5' –
GAGGACGAAACGGTACCCGGTACCGTCTGAAATGGAGGAGAAATTACAGCAATTTATCAACT
GAAATTAT–3'

chimp 3A

5' –
TACCAGGTAATATACCACAACGTGTGTTTCTCTGGTTTTCTTCTCTGTTTGGAGGAAAC–3'

chimp 3B

5' –
TAATACGACTCACTATAGGGATTTCACTGATGAGTCCGTGAGGACGAAACGGTACCCGG–3'

Software

CCP4:

Phaser

Refmac5

Scaletomtz

Mosflm

AMoRe

Phenix

ShelX

HKL-2000:

Denzo

Scalepack

MS Word 2007

MS Excel 2007

WinCoot

Pymol

Rasmol

X3DNA

PDB-Viewer

Adobe Photoshop CS4

Sonstige Materialien

Kristallisationskits:

Nucleic Acid Mini Screen (HR2-118)

Natrix (HR2-116)

JBScreen Nuc-Pro 1-4

NucleoSpin Extract II Kit, Macherey-Nagel

RNA Maxx Yield Transcription Kit, Stratagene

Phusion DNA-Polymerase, Finnzymes

HiFidelity DNA-Polymerase, Qiagen

Torsionswinkel der Nukleinsäuren

Tabelle 0.1: Torsionswinkel des Zucker-Phosphatrückgrats des tRNA^{Arg}-Akzeptorstammes

	α	β	γ	δ	ϵ	ζ
G	---	---	56,1	81,8	-157,8	-70,2
C	-63,0	175,5	54,4	78,0	-160,4	-67,2
A	-51,9	-172,1	31,7	90,1	-153,5	-70,8
U	-64,5	168,4	50,2	82,6	-146,9	-84,5
C	-70,0	160,6	63,7	72,9	-148,0	-70,4
C	-64,2	173,2	46,6	77,7	-159,8	-64,9
G	-72,5	-178,7	55,6	76,9	---	---
C	-74,6	178,0	56,6	80,8	---	---
G	-69,9	170,5	52,7	79,4	-161,0	-67,7
U	-64,5	161,0	59,4	72,7	-149,9	-66,9
A	-66,4	174,6	45,3	90,9	-151,0	-87,3
G	-58,1	-171,5	41,2	89,1	-153,0	-70,4
G	-65,3	176,6	47,9	78,7	-160,9	-65,2
C	---	---	39,1	86,2	-158,5	-74,1
G	---	---	54,2	83,9	-152,3	-81,1
C	-72,6	174,6	55,7	84,5	-147,3	-77,1
A	-51,6	167,0	43,9	79,9	-153,0	-81,0
U	-62,4	169,0	46,7	83,5	-152,5	-74,1
C	-67,3	166,0	62,0	82,2	-151,8	-85,9
C	-45,8	176,1	28,5	84,3	-157,7	-70,9

G	-61,8	166,4	47,2	79,9	---	---
C	-54,6	171,4	41,4	79,5	---	---
G	-57,2	178,5	39,0	80,7	-153,5	-71,9
U	-59,6	164,7	52,5	84,3	-157,4	-79,2
A	-62,4	170,6	47,7	79,0	-156,9	-64,3
G	-55,9	170,1	52,6	80,7	-152,2	-83,9
G	-60,3	165,5	50,7	82,5	-142,1	-76,7
C	---	---	40,5	85,9	-145,3	-85,0

Tabelle 0.2: Torsionswinkel des Seryl-tRNA-Akzeptorstammes RS-1661

	α	β	γ	δ	ϵ	ζ
G	---	---	63,9	77,7	-160,3	-67,5
G	-64,9	174,1	65,4	80,7	-147,4	-60,9
U	-78,6	179,1	48,0	69,7	-157,4	-66,2
G	147,1	-167,0	-175,2	81,7	-156,3	-74,9
A	-65,8	-177,7	54,8	80,4	-145,9	-69,5
G	-65,3	169,4	55,7	79,7	-144,6	-66,6
G	-65,5	174,7	53,1	81,9	---	---
C	-66,3	174,8	55,0	78,4	---	---
C	-64,2	160,2	58,1	77,5	-151,7	-63,0
A	-75,7	-172,6	53,1	77,2	-149,9	-72,2
C	-63,2	168,3	59,0	76,1	-161,6	-70,6
U	-73,4	171,6	52,6	73,8	-152,6	-65,8
C	-78,6	-177,9	52,3	77,4	-151,3	-65,3
C	---	---	54,9	86,7	-157,7	-69,9

Tabelle 0.3: Torsionswinkel der LNA

	α	β	γ	δ	ϵ	ζ
C	---	---	47,1	62,1	177,1	-53,8
C	-88,6	-172,1	64,1	64,8	-157,1	-73,0
T	-43,4	171,4	41,3	64,6	-165,8	59,9
C	-68,6	172,6	62,7	65,7	-157,2	-68,1
A	-67,2	168,4	52,6	65,1	-155,6	-58,4
C	-64,9	177,8	56,4	63,3	-162,1	-76,4
C	-61,2	173,2	57,6	66,7	---	---
G	-68,1	178,1	55,2	71,2	---	---
G	-65,8	178,0	48,9	67,0	-164,6	-55,4
A	-69,0	178,6	57,7	64,1	-157,7	-63,3
G	-73,2	177,1	60,4	69,2	-164,7	-61,9
T	-75,6	-166,7	53,8	65,6	-159,5	-68,4
G	-59,5	173,4	47,7	71,0	-177,6	-58,2
G	---	---	50,1	66,4	-154,3	-69,0
C	---	---	40,9	63,6	-176,5	-60,0
C	-71,6	-179,7	54,3	64,4	-161,5	-67,6
T	-53,6	176,4	45,3	66,0	-172,9	-49,5
C	-82,0	-179,2	70,1	72,4	-151,0	-70,1
A	-72,6	-177,0	55,9	71,8	-156,8	-61,1
C	-65,3	173,7	55,1	67,3	-160,2	-72,3
C	-67,1	175,1	56,3	66,5	---	---
G	-77,6	-175,8	66,6	66,6	---	---
G	-57,9	174,8	45,2	69,0	-161,3	-63,3
A	-68,6	-174,1	51,4	70,6	-152,1	-73,2
G	-71,5	175,9	52,2	73,3	-164,1	-63,9
T	-67,3	-178,7	49,8	67,7	-166,8	-62,2
G	-80,1	-176,6	58,5	65,4	-164,2	-62,1
G	---	---	51,2	65,7	-162,6	-62,5