

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	RNA-Welt.....	1
1.2	Ribosomale 5S RNA.....	2
1.3	RNA-Strukturaufklärung.....	8
1.4	Kristallisation & Diffraktion der <i>Thermus flavus</i> 5S rRNA.....	9
1.5	Kristallstruktur gegen Lösungsstruktur.....	10
1.6	Grundlagen der Kristallographie.....	11
2.	PROBLEMSTELLUNG	16
3.	MATERIAL UND METHODEN	17
3.1	Material	17
3.1.1	Geräte.....	17
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	17
3.1.3	Chemikalien.....	18
3.1.4	Enzyme.....	19
3.1.5	Kits.....	19
3.1.6	Zellen.....	20
3.1.7	Medien.....	20
3.1.8	Puffer.....	21
3.2	Methoden	23
3.2.1	Nukleinsäure-Aufreinigung	23
3.2.1.1	Isolation genomischer DNA.....	23
3.2.1.2	Phenol/Chloroform-Extraktion.....	23
3.2.1.3	Proteinase K-Verdau von Proteinen.....	24
3.2.1.4	Fällungen mit Alkohol.....	24
3.2.1.5	Gelfiltration.....	25
3.2.1.6	rpHPLC.....	25
3.2.1.7	Gelelution.....	26
3.2.2	Gelelektrophorese	26
3.2.2.1	Agarosegele.....	27
3.2.2.2	Denaturierende Harnstoff-PAGE.....	28
3.2.2.3	Denaturierende SDS-PAGE.....	29
3.2.2.4	Native Polyacrylamidgele.....	29
3.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
3.2.3.1	Optische Dichte.....	30
3.2.3.2	Lambert-Beersches Gesetz.....	30
3.2.3.3	Integration von HPLC-Peaks.....	31
3.2.4	DNA-Amplifikation und Mutagenese	32

3.2.5	<i>in-vitro</i> Rekombination und Klonierung	35
3.2.5.1	Dephosphorylierung des Vektors	35
3.2.5.2	Phosphorylierung des Inserts	36
3.2.5.3	DNA-Ligation	37
3.2.5.4	Transformation kompetenter Zellen	37
3.2.5.5	Selektion	38
3.2.5.6	Zellanzucht im Flüssigmedium	39
3.2.5.7	Plasmid-Präparation	39
3.2.5.8	Restriktionsspaltung	40
3.2.5.9	DNA-Sequenzierung	41
3.2.6	<i>in-vitro</i> Transkription	41
3.2.7	Prozessierung von RNA	42
3.2.7.1	3'-Prozessierung der 5S rRNA in der S100-Fraktion	42
3.2.7.2	3'-Modifikation mit Phosphodiesterase I	43
3.2.7.3	RNA-Spaltung mit DNA-Enzym 10-23	43
3.2.7.4	RNase H-Spaltung	44
3.2.7.5	Nukleosidanalyse	44
3.2.8	Proteinexpression von TflL18	45
3.2.8.1	<i>in-vitro</i> Proteinbiosynthese	45
3.2.8.2	<i>in-vivo</i> Überexpression	45
3.2.8.3	Protein-Fällungen	47
3.2.8.4	Dialyse	47
3.2.8.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	48
3.2.8.6	N-terminale Proteinsequenzierung	48
3.2.9	Chemische Synthese von RNA-Oligonukleotiden	49
3.2.10	Kristallisation	50
3.2.10.1	Vorinkubation und Kristallisationsansätze	50
3.2.10.2	Seeding	51
3.2.10.3	Derivatisierung mit Schweratomen	52
3.2.10.4	Cryo-Konservierung	52
3.2.10.5	Kristallisation unter Bedingungen der Schwerelosigkeit	53
3.2.10.6	Röntgendiffraktion	54
4.	ERGEBNISSE	56
4.1	<i>Thermus flavus</i> 5S rRNA Mutanten	56
4.1.1	Design von 5S rRNA-Strukturvarianten	56
4.1.2	Klonierung von 5S rDNA-Templates	58
4.1.3	Mutageneseeffizienz	59
4.1.4	Optimierung der <i>run-off</i> Transkription	61
4.1.5	Posttranskriptionale Prozessierung	64
4.1.5.1	Precursorspaltung mit RNasen	64
4.1.5.2	RNA-Abbau mit Phosphodiesterase I	66
4.1.5.3	DNA-Enzym katalysierte RNA-Spaltung	67
4.1.6	<i>in-vitro</i> Synthese homogener Transkripte	69
4.1.7	Kristallisation der 5S rRNA	70

4.2	Charakterisierung thermophiler 5S rRNA Bindungsproteine.....	72
4.2.1	Wachstumskurven von <i>Thermus flavus</i>	72
4.2.2	Fischen genomischer DNA-Sequenzen von TflL18 und TflL25.....	73
4.2.3	Überexpression von TflL18 <i>in-vivo</i> und <i>in-vitro</i>	77
4.2.4	Bindungsstudien.....	80
4.2.5	Komplekxkristallisation.....	81
4.3	Strukturaufklärung von <i>Thermus flavus</i> 5S rRNA Domänen.....	82
4.3.1	Synthese von RNA-Oligonukleotiden.....	83
4.3.2	Bestimmung von spezifischen Extinktionskoeffizienten.....	85
4.3.3	Kristallisationsanalyse im erweiterten RNA-MPD-Screen.....	88
4.3.4	Mathematische Modellierung der Dampfdiffusion.....	91
4.3.5	Kristallisation der 5S rRNA Domänen B, C und E.....	94
4.3.6	Kristallisation unter Mikrogravitationsbedingungen.....	99
4.3.7	Strukturelle Eigenschaften des 8 bp Fragments der Domäne E.....	101
5.	DISKUSSION.....	104
5.1	RNA-Kristallisation.....	104
5.2	Kristallisation von Oligoribonukleotiden.....	106
5.3	RNA-Struktur motive.....	108
5.4	<i>in-vitro</i> Transkription und RNA-Prozessierung.....	111
5.5	Ribosomale Bindungsproteine der 5S rRNA.....	112
6.	AUSBLICK.....	114
7.	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMERY.....	115
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	117
9.	ANHANG.....	125
9.1	Abkürzungsverzeichnis.....	125
9.1.1	Abkürzungen.....	125
9.1.2	Naturwissenschaftliche und mathematische Größen.....	126
9.1.3	Physikalische Einheiten.....	126
9.2	Sequenzen, ALKABRID, Kristallisationsscreen.....	127
9.3	Eigene Publikationen.....	130
9.3.1	Artikel.....	130
9.3.2	Vorträge.....	131
9.3.3	Poster.....	131
9.4	Lebenslauf.....	132
9.5	Danksagung.....	133