

2. PROBLEMSTELLUNG

Die Kristallisation von großen RNA-Molekülen beinhaltet den herausfordernden kritischen Schritt in ihrer Strukturbestimmung durch die Röntgenkristallographie. Die Komplexität der makromolekularen RNA-Kristallisation im Vergleich zu Proteinen ergibt sich aus dem ca. dreifachen Molekulargewicht der Nukleotidbausteine gegenüber Aminosäuren und dem potentiellen Vorkommen sehr langer Sequenzen. Im Vergleich zur DNA ist eine höhere Flexibilität der RNA-Faltung infolge der Einzelsträngigkeit sowie nichtkanonischer Wechselwirkungen (z. B. G:U-Wobble-Basenpaare) zu verzeichnen. Auch liegt RNA in der Zelle vielfach in Assoziation mit Proteinen vor, was ihre Konformation determiniert. Hieraus resultiert eine limitierte Anzahl von nur 30 hochaufgelösten RNA-Strukturen, die keine gezielte Tertiärstrukturvorhersage wie bei Proteinen (8000 Strukturen) oder DNA-Sequenzen (350 Strukturen) zuläßt. Die funktionelle Charakterisierung von RNA-Molekülen setzt jedoch die Kenntnis der räumlichen Struktur voraus.

Ziel der Arbeit ist es daher, wegweisend zur Methodik der RNA-Kristallisation beizutragen. Als Modellsubstanz wurde die ribosomale 5S RNA aufgrund ihrer geringen Größe und der noch ungeklärten Funktion im Ribosom gewählt. Da die bisher erreichte maximale Auflösung von 7,4 Å eines *Thermus flavus* 5S rRNA Kristalls für die Strukturlösung unzureichend war, werden drei methodische Ansätze verfolgt, um sich der 3D-Struktur zu nähern. Der erste Ansatz ist auf das Design von Zielmolekülen mit verbesserten Kristallisationseigenschaften, deren *in-vitro* Transkription sowie die Prozessierung einer homogenen Molekülspezies gerichtet. Im zweiten Ansatz wird eine RNA-Stabilisierung im Kristall durch die Komplekxkristallisation mit dem ribosomalen Bindungsprotein Tfil18 angestrebt, das charakterisiert und als Fusionsprotein mit annähernd nativer Sequenz überexprimiert wird. Der dritte Ansatz hat die Optimierung der Kristallisation und Diffraktion von chemisch synthetisierten Oligoribonukleotiden für die nachfolgende Röntgenstrukturanalyse zum Ziel. Die *Thermus flavus* 5S rRNA Domänen B, C und E repräsentieren die näher zu untersuchenden Struktur motive. Neben der chemischen Synthese dieser Fragmente und ihrer biophysikalischen Charakterisierung sollen Sequenz motive und Kristallisationsbedingungen erarbeitet werden, die auf andere interessante RNA-Moleküle, wie Aptamere, übertragbar sind. Die detaillierten Strukturinformationen können für den Zusammenbau eines vorläufigen dreidimensionalen Bildes der 5S rRNA herangezogen werden.