

4. ERGEBNISSE

4.1 *Thermus flavus* 5S rRNA Mutanten

Die Funktion der 5S rRNA als biologisches Makromolekül definiert sich über die Struktur. Aus ihrer intakten Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse werden nicht nur Erkenntnisse zur Rolle der 5S rRNA bei einer Schlüsselreaktion des Lebens erwartet; die Struktur würde auch einen wertvollen Beitrag zur Verallgemeinerung der RNA-Faltung liefern. Obwohl es sich bei der 5S rRNA mit einer Länge von ca. 120 Nukleotiden um eine relativ kleine Ribonukleinsäure handelt, entspricht ihr Molekulargewicht von 40 kDa der Größe eines mittleren Proteins von etwa 350 Aminosäuren, was den Anspruch an die Kristallisation und Strukturlösung unterstreicht. Die molekulare Stabilität im Kristall und dessen Diffraktionsqualität korrelieren mit der Verringerung der intrinsischen Flexibilität. Die Einführung kristallisationsfördernder Motive und/oder der Austausch beweglicher Molekülbereiche der 5S rRNA sollten zum kompakteren Kristall führen. Zwei Schwerpunkte auf diesem Weg waren die Optimierung der Transkriptionsausbeute, um den hohen Materialbedarf in der Kristallisation zu befriedigen, und die Prozessierung des heterogenen Transkript-Pools für die nachfolgende Kristallisation einer homogenen Spezies.

4.1.1 Design von 5S rRNA-Strukturvarianten

Die externe Veränderung der Kristallisationsbedingungen und die interne Sequenzvariation stellen zwei generelle Möglichkeiten auf dem Weg zum Kristall dar (Doudna *et al.*, 1993; Berger *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1996). Um die intrinsische Flexibilität der 5S rRNA zu unterbinden, bietet sich vordergründig eine molekulare Stabilisierung an. Die Beweglichkeit des Moleküls wird durch die Gelenkverbindungen beidseitig der helikalen Struktur der Domäne B verursacht. Der nukleolytische Abbau der flexiblen Domänen B und C ergab ein 62 nt Fragment der *E. coli* 5S rRNA, dessen Kristalle bis 3,0 Å diffraktierten (Correll *et al.*, 1997a). Der rudimentäre Charakter dieser 5S rRNA ließ jedoch keine biologische Funktion erwarten. Ausgehend von diesem Ansatz wurde im folgenden nur die Domäne C deletiert und die bewegliche Gelenkstruktur zwischen den Domänen B und C durch einen stabilen Tetraloop ersetzt. Dieses spezielle Konstrukt, kurz als C-Del bezeichnet, wurde nach Klonierung und *in-vitro* Transkription erhalten (Abb. 4.1b).

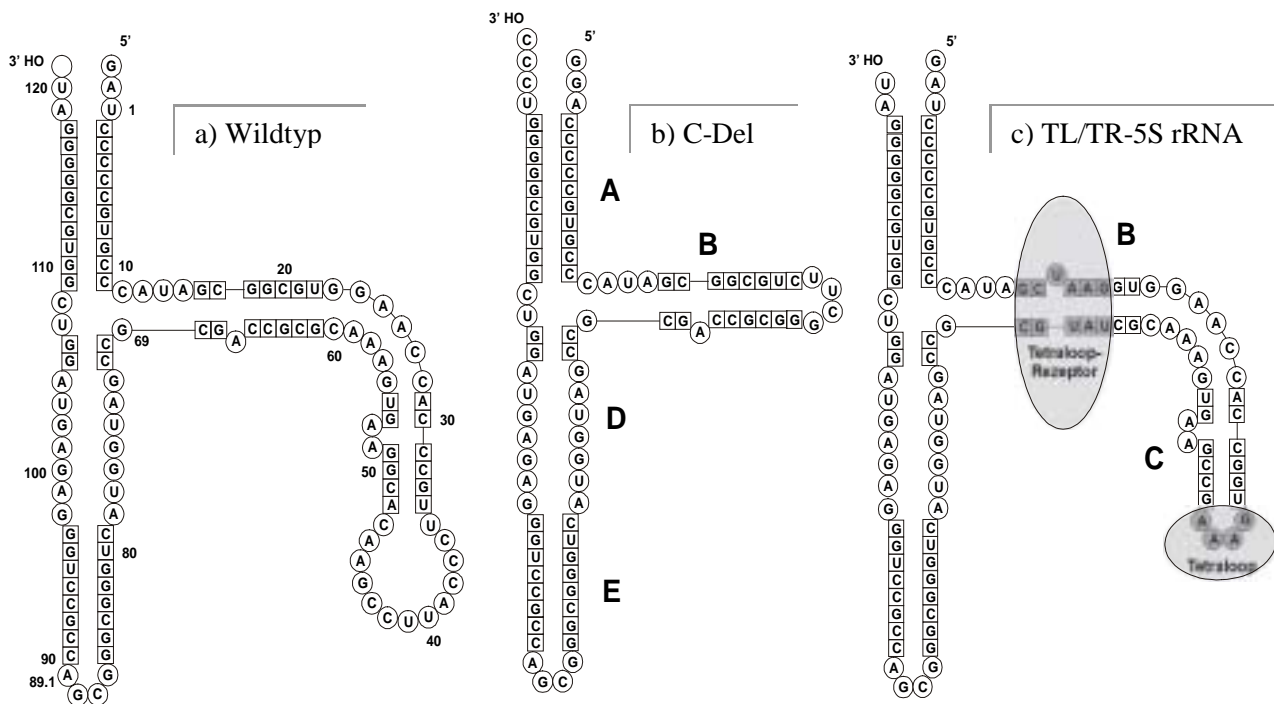


Abb. 4.1 Sekundärstrukturmodelle von *Thermus flavus* 5S rRNA Varianten.

Ferré-D'Amaré *et al.* entwickelten 1998 ein neues, allgemeines Modul für die RNA-Kristallisation, das ausschließlich intermolekulare oder kristalline Kontakte fördert. Die Idee ist eine Veränderung der gleichmäßigen, negativ geladenen RNA-Oberfläche, so daß stereospezifische Wechselwirkungen benachbarter Moleküle möglich werden. Diese Kontakte werden in Form eines zweiteiligen Moduls – bestehend aus 11 nt eines Tetraloop-Rezeptors in beliebiger Orientierung (TR) und einem 5'-GAAA-3'-Tetraloop (TL) – in das Zielmolekül eingeführt (Abb. 4.1c). Beim Konstrukt-Design ist der Erhalt der biochemischen Aktivität zu berücksichtigen. Durch die geringe Nukleotidzahl der 5S rRNA und ihre potentielle Funktion als Strukturmolekül im Ribosom waren die Einbaumöglichkeiten für das Modul stark eingeschränkt. Unter Ausschluß der proteinbindenden Domänen (siehe 4.2) und des Tetraloops der Domäne E, der mit der 23S rRNA verbunden ist (Sergiev *et al.*, 1998), wurden die 13 nt des C-Loops durch den o. g. Tetraloop ersetzt. Für den Tetraloop-Rezeptor mit seiner singulären Bulge-Struktur bot sich ein korrespondierender Bereich innerhalb der Domäne B an, wodurch nur eine minimale Sequenzänderung von 3 bp plus Bulge-Nukleotid auftrat.

Neben der partiellen Deletion flexibler Molekülbereiche sowie der Insertion des o. g. Kristallisationsmoduls ist das *helix engineering* eine dritte Alternative zur gezielten Sequenzvariation, auf das unter Berücksichtigung der nachfolgenden Erkenntnisse zurückgegriffen wurde. Die Doppelhelix ist ein Grundelement der RNA-Struktur. Insbesondere die Duplex-Enden sind aufgrund von Stapelwirkungen in molekulare Kontakte im Kristall involviert, so daß deren geeignete Wahl hilfreich für die Kristallisation sein kann. Limmer *et al.* (1993) zeigten

den Zusammenhang zwischen Stabilität und Basenstapelung bei einer schrittweisen Addition ungepaarter Nukleotide an das 3'-Ende der ^{Ala}tRNA. Obgleich ein einzelnes, ungepaartes Adenosin den größten Beitrag zur helikalen Stabilität lieferte, verringerten noch weitere drei Nukleotide die Beweglichkeit der Konformation meßbar, was mit einem höheren Ordnungsgrad der Stapelung einherging.

Lorenz *et al.* (2000) beschrieben den empirisch ermittelten Einfluß verschiedener 3'-Enden auf das Kristallisationsverhalten der *Th. flavus* 5S rRNA.

4.1.2 Klonierung von 5S rDNA-Templates

Drei Ur-Konstrukte der 5S rRNA wurden kloniert: der *Th. flavus* 5S rRNA Wildtyp, die C-Deletionsmutante (C-Del) und die TL/TR-5S rRNA. Alle anderen Varianten der 5S rRNA in dieser Arbeit sind durch *in-vitro* Vektormutagenesen aus diesen Konstrukten abgeleitet.

10 µg genomische DNA aus *Th. flavus* wurden mit *Bam*H I verdaut. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des Restriktionsansatzes erfolgte die Isolation und Aufreinigung eines 3,2 kb-Fragments, welches das 23S/5S rDNA Operon trägt (Hartmann *et al.*, 1987). Die 5S rRNA wurde mit den phosphorylierten Primern 1b-5S-T7 und 2-5S-runoff amplifiziert (Sequenzen im Anhang). Durch überhängende Primerbereiche konnten der T7-Promotor am 5'-Ende sowie Restriktionsschnittstellen für die *run-off* Transkription am 3'-Ende eingeführt werden. Das PCR-Produkt wurde in den *Sma* I-geschnittenen, dephosphorylierten Vektor pUC18 ligiert und das Plasmid in *E. coli* JM109-Zellen transformiert. Durch Sequenzierung konnte die Orientierung des Inserts in *lacZ'*-Richtung festgestellt werden. Die Linearisierung des Plasmids für ein natives 3'-Ende der 5S rRNA erfolgte mit *Eco*R V.

Als Template für die o. g. Mutanten dienten synthetische DNA-Oligonukleotide. Die RNA-Sequenzen sind in Abb. 4.1 dargestellt, die mit den entsprechenden DNA-Oligonukleotid-Templates für die PCR korrespondieren. Die TL/TR-5S rRNA wurde analog dem Wildtyp kloniert. Für die PCR von C-Del fanden die Primer 3a-CDel-T7 und 4-CDel-runoff Verwendung (Abb. 4.2).

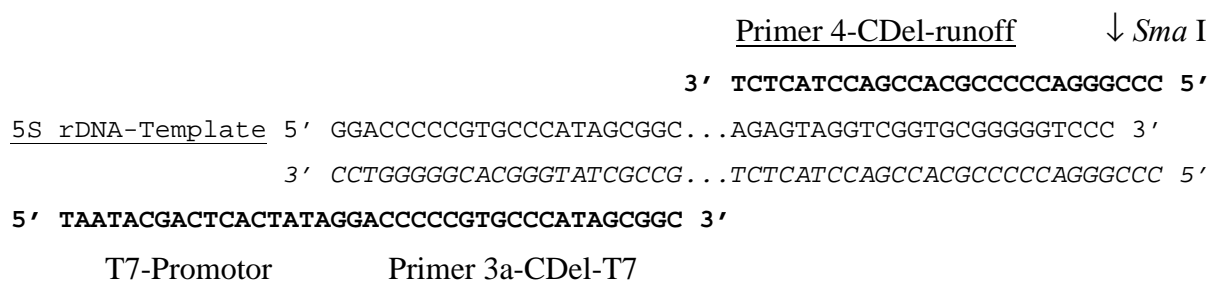


Abb. 4.2 Amplifikation der 5 S rDNA C-Deletionsmutante (C-Del) inklusive T7-Promotor und *Sma* I-Restriktionsschnittstelle.

Im 1. Zyklus hybridisierte nur der Primer 4-CDel-runoff, und der komplementäre 5S rDNA-Strang wurde synthetisiert. Im 2. Zyklus entstanden zwei Produkte mit 5'-Überhang. Erst nach dem 3. Zyklus waren die Primer vollständig ins Template integriert, so daß ab Zyklus 4 die exponentielle Amplifikation begann. Die Ligation erfolgte in pUC18/*Hinc* II/CIP entgegen der *lacZ'*-Orientierung. Linearisiert wurde mit *Sma* I.

4.1.3 Mutageneseeffizienz

Ausgehend von den beschriebenen drei Ur-Konstrukten konnten durch PCR gezielt Mutationen ins Insert eingeführt werden. Die gewünschten Basensubstitutionen, Insertionen und/oder Deletionen waren in den Primern enthalten. Im Ergebnis der vollständigen Amplifikation der komplementären Stränge wurde ein linearisiertes, modifiziertes Plasmid erhalten, das direkt (QuikChange™) oder nach Ligation (ExSite™) transformiert werden konnte (Abb. 4.3). Die durch *in-vitro* Vektormutagenesen generierten Konstrukte beinhalteten Variationen der Initiations- und Terminationssequenzen für die *in-vitro* Transkription, deren Einfluß auf die RNA-Ausbeute untersucht wurde. Die Klonierung von Precursorsequenzen an das 3'-Ende der 5S rRNA hatte die Prozessierung der Endheterogenität zum Ziel. In Tab. 4.1 sind einige Beispiele der Vektormutagenesen zusammengefaßt. Das QuikChange™-Prinzip erwies sich mit einer 100 %-igen Effizienz in 7 von 11 Beispielen und einer erfolgreichen Mutagenese in allen Fällen als bedeutend geeigneter gegenüber der ExSite™-Methode. Generell war festzustellen, daß ein optimales Primerdesign, die Art des *Mismatches* sowie die Qualität des Plasmid-Templates die Mutageneseeffizienz entscheidend beeinflussen.

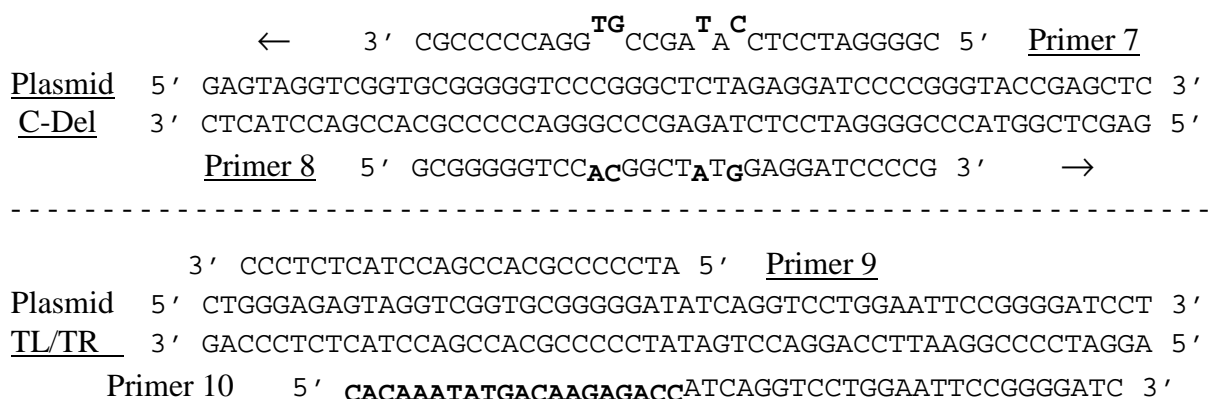


Abb. 4.3 Prinzip der *in-vitro* Mutagenesen nach QuikChange™ am Beispiel von C-Del für die Kreation einer *Msl* I-Schnittstelle (oben) sowie nach ExSite™ für die Insertion einer Precursorsequenz in die TL/TR-5S rRNA (unten).

Tab. 4.1 Effizienz der *in-vitro* Vektormutagenese für zwei verschiedene methodische Ansätze. In den Plasmidbezeichnungen beziehen sich GROSSBUCHSTABEN auf das terminale 3'-Ende des Transkripts, *Kursivschrift* auf die Restriktionsschnittstelle für die *run-off* Transkription und Zahlen auf die Nummer des Klons. Erläuterungen zur Sequenz der resultierenden Transkripte finden sich im Anhang. Die 2-teilige Tabelle ist nach absteigender Mutageneseeffizienz der beiden Methoden geordnet.

Elternplasmid	Art der Mutation	Plasmid	Basenzahl	Klone	Klone	Effizienz	Prinzip
<i>pUC18</i>		<i>mutiert</i>	<i>mutiert</i>	<i>gepickt</i>	<i>positiv</i>	<i>[%]</i>	<i>QuikChange™/ExSite™</i>
Wildtyp_224prec	Deletion & Punktmutationen	QWildtyp_CUU3	10 & 2	4	4	100	QuikChange
precB_2G3	Punktmutationen	precB_Bbs4	5	4	4	100	QuikChange
QWildtyp_CUU3	Substitution CAT zu GTC	QWildtyp_CUU3a	3	3	3	100	QuikChange
C-Del	Punktmutationen	C-Del_MsI2	4	3	3	100	QuikChange
TL/TR-5S rRNA	Deletion & Pyrimidin-Transition	QPfl_2	2 & 1	4	4	100	QuikChange
precB_1	Purin-Transition	QprecB_GG1	2	2	2	100	QuikChange
QWildtyp_CUU3	Punktmutation C zu A	QWildtyp_AUU1	1	3	3	100	QuikChange
QPfl_2	Pyrimidin-Transition & Insertion & Punktmutation	QPfl_2b	1 & 2 & 1	3	2	67	QuikChange
precB_1	Punktmutation & Insertion & Punktmutation	precB_4Ü3	1 & 15 & 1	3	2	67	QuikChange
precB_1	Punktdeletion A	precB_A2	1	2	1	50	QuikChange
precB_1	Purin-Transition	precB_2G3	1	5	1	20	QuikChange
TL/TR-5S rRNA	Insertion Precursorsequenz	precB_1	20	4	2	50	ExSite
QPfl_2	Deletion & Insertion Promotorsequenz	QPfl_3TP	16 & 36	4	1	25	ExSite
Wildtyp 5S rRNA	Insertion Precursorsequenz	Wildtyp_224prec	20	9	1	11	ExSite
Wildtyp_224prec	Deletion & Insertion	Ziel: QWildtyp_CUUx	13 & 3	5	0	<17	ExSite
C-Del	Insertion Precursorsequenz	Ziel: C-Del_precx	18	7	0	<13	ExSite
precB_1	Insertion multipler Schnittstellen	Ziel: QPfl_2b	16	8	0	<12	ExSite
TL/TR-5S rRNA	Deletion & Insertion	Ziel: QPfl_x	3 & 1	10	0	<10	ExSite

4.1.4 Optimierung der *run-off* Transkription

Für das Screening biologischer Makromoleküle auf Kristalle sind hohe Ausbeuten homogener Produkte erforderlich. Im Fall von RNA ist die *in-vitro* Transkription gegenüber der nativen Isolierung aufgrund von Syntheserate, Einzelprodukt-Aufreinigung und guter Beeinflussung des künstlichen Systems prädestiniert. Zur Erhöhung der Transkriptausbeute wurde einerseits das Reaktionssystem variiert und andererseits die interne Ebene der Primär- und Sekundärstruktur des DNA-Templates bzw. RNA-Transkripts optimiert. Als Maß für die quantitative Güte der Transkription wurde ein Transkriptionsfaktor TF definiert:

$$TF = \frac{n_{\text{Transkript}}}{n_{\text{Template}}} * \frac{\text{Anzahl}_{\text{Nukleotide}}}{100} \quad (4-1)$$

Den Einfluß der Nukleotidkomposition und der Reaktionszeit auf TF in verschiedenen Transkriptionssystemen verdeutlicht Abb. 4.4. Die RiboMAX™-Synthese von precB_1/Msl I ergab einen 22-fach höheren Transkriptionsfaktor im Vergleich zum Riboprobe®-System (Promega). Bereits nach einer Transkriptionsdauer von 3 h waren etwa 30 % Produkt synthetisiert, aber erst nach 13 bis 15 h kam die Synthese zum Stillstand. Der theoretisch berechnete maximale Transkriptionsfaktor wurde nur zu $\leq 53\%$ erreicht. Dieser geringe Wert ist mit der schrittweisen Hydrolyse der Nukleotidedukte und dem Verlust der Enzymaktivität zu erklären. Beiden Phänomenen kann durch eine Fed-Batch-Reaktionsführung entgegen gewirkt werden.

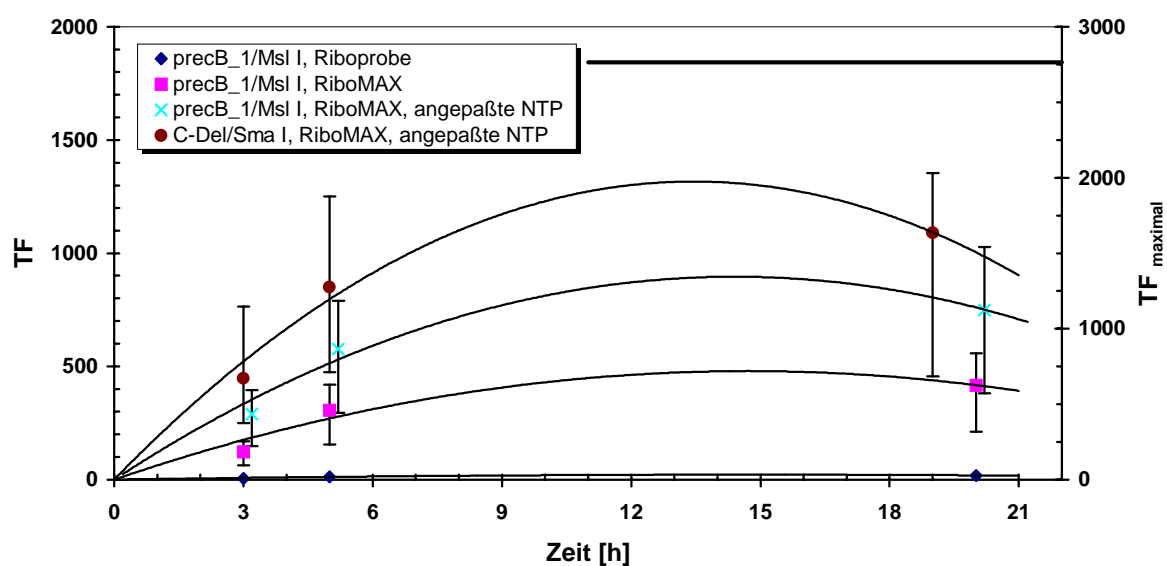


Abb. 4.4 Transkriptionsfaktor-Zeit-Diagramm. Die reproduzierten Verläufe sind mit einem relativ großen Fehler behaftet, der vor allem durch Qualitätsunterschiede der Enzymchargen und deren Alterung nach mehrmaligem Auftauen bedingt ist.

Der leichte Rückgang des Transkriptionsfaktors im weiteren Zeitverlauf ist auf eine beginnende Produktdegradation zurückzuführen.

Der thermophile Charakter der 5S rRNA zeigt sich in einer ungleichmäßigen Nukleotidhäufigkeit: $G \gg C \gg A \approx U$. Bei einem extremen G:A-Verhältnis von 4:1, wie es in C-Del/Sma I auftritt, bewirken identische Nukleotid-Molaritäten im Edukt-Mix eine theoretische Verringerung des maximalen Transkriptionsfaktors um 75 %. Die transkriptspezifische Anpassung der Nukleotidkomposition beschleunigte nicht nur die anfängliche Transkriptionsrate (40 % RNA nach 3 h), sondern verdoppelte auch die Gesamtausbeute.

Für die template- und transkriptabhängige Optimierung der Ausbeute wurde zunächst die Promotorstärke untersucht. Gängig für die *in-vitro* RNA-Synthese sind die Bakteriophagen-Promotoren T3, T7 und SP6. Letzterer kam hier nicht in Frage, da er aufgrund der partiellen Übereinstimmung von Promotor- und Initiationssequenz für den Erhalt eines nativen Transkripts ungeeignet ist (Milligan *et al.*, 1987). Ein Test des T3- bzw. T7-Promotors anhand von C-Del fiel mit ca. 6-facher Stärke zugunsten des T7-Promotors aus (Tab. 4.2).

Eine thermophile Transkription mit dem prokaryotischem *Th. thermophilus* Promotor (Hartmann *et al.*, 1987) ergab nicht nur minimale Ausbeuten und Endheterogenität; die *Thermus* RNA-Polymerase erkannte auch die *E. coli* Promotoren im Vektor pUC18.

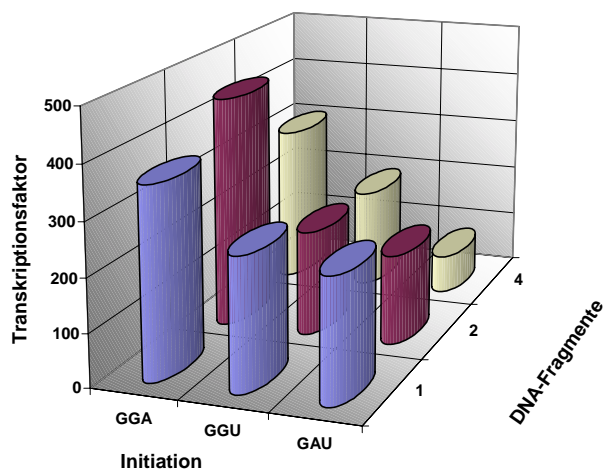


Abb. 4.5 Initiationssequenz und multiple Plasmid-Restriktion beeinflussen die Transkriptaushbeute.

Auf die Notwendigkeit der Initiation mit Guanosin wurde bereits im Abschnitt 3.2.6 hingewiesen. Im folgenden soll exemplarisch die Bedeutung des 2. und 3. Initiationsnukleotids analysiert werden. In Betracht kamen nur Transkripte vergleichbarer Länge mit 122 ± 7 nt sowie einem (homogenen) 3'-Überhang mit ≤ 7 nt. PrecB_2G3/Bsa I mit +12 nt am 3'-Ende sowie die kürzeren C-Del-Transkripte

bildeten klonierungstechnische Ausnahmen. Die Güte der Initiationssequenzen war $GGA > GGU > GAU$. Da eine Vielzahl an Plasmid-Fragmenten den Diffusions- und Erkennungsprozess der RNA-Polymerase verlangsamte, wurde die Anzahl der Schnittstellen des verwendeten Restriktionsenzym als weitere Initiationsgröße in Abb. 4.5 aufgenommen.

Tab. 4.2 Wichtige Synthese- und Strukturdaten der 5S rRNA-Transkripte. Die RNAs wurden im RiboMAX™-T7 unter Standardbedingungen hergestellt und auf der HPLC analysiert. Die tabellarische Anordnung erfolgte in Blöcken ähnlicher 3'-Sequenz und mit steigendem 3'-Überhang für eine Erklärung der Endheterogenität (vergleiche Abschnitt 4.1.6).

Transkript 5S rRNA	Größe [nt]	5'-Ende	Restriktion			3'-Ende	Überhang 3'-Ende	TF	Heterogenität
			Enzym	Art _{Enden}	Fragmente				
T3_C-Del	93	5' GGAC-	<i>Sma</i> I	glatt	2	-GGGUCCC 3'	+1	77	n
T7_C-Del	93	5' GGAC-	<i>Sma</i> I	glatt	2	-GGGUCCC 3'	+1	408	n
precB_4Ü3	120	5' GAUC-	<i>Bbv</i> I	kohäsiv	13	-GGGAUCAACCC 3'	+5	99	n
precB_4Ü3	122	5' GAUC-	<i>Sma</i> I	glatt	2	-GGGAUCAACCCCC 3'	+7	285	n
Wildtyp 5S rRNA	53	5' GAUC-	<i>Msl</i> I	glatt	4	-ACACGG 3'	0	256	n, n+1
T3_C-Del	95	5' GGAC-	<i>Ava</i> I	kohäsiv	2	-GGGUCCC GG 3'	+3	67	n
T7_C-Del	96	5' GGAC-	<i>Msl</i> I	glatt	4	-GGGUCCACGG 3'	+4	289	n
QprecB_GG1	119	5' GAUC-	<i>Msl</i> I	glatt	4	-GGGAUCACGG 3'	+4	87	n
precB_4Ü3	124	5' GAUC-	<i>Ava</i> I	kohäsiv	2	-GGGAUCAACCCCC GG 3'	+9	183	n, n+1
precB_4Ü3	129	5' GAUC-	<i>Ngo</i> M IV	kohäsiv	1	-GGGAUCAACCCCCGGGCCGG 3'	+14	256	n, n+1
Wildtyp 5S rRNA	123	5' GAUC-	<i>Eco</i> R V	glatt	1	-GGGAU 3'	-1	330	n, n+1, n+2
QWildtyp_AUU1	126	5' GAUC-	<i>Bsa</i> I	kohäsiv	2	-GGGAUAUU 3'	+2	132	n
QWildtyp_CUU3	126	5' GAUC-	<i>Bsa</i> I	kohäsiv	2	-GGGAUCUU 3'	+2	209	n
QWildtyp_CUU3	127	5' GAUC-	<i>Dde</i> I	kohäsiv	7	-GGGAUCUUA 3'	+3	415 (ÜN)	n
WildtypU_5	129	5' GGUC-	<i>Asp</i> 718 I	kohäsiv	1	-GGGACCGGUAC 3'	+5	381	n
QPfl_2	128	5' GAUC-	<i>Eco</i> R I	kohäsiv	2	-GGGACCAGGUCCUGGAAUU 3'	+13	191	n, n+1
T7_C-Del	108	5' GGAC-	<i>Bam</i> H I	kohäsiv	1	-GGGUCCC GGGCTCTAGAGGAUC 3'	+16	386	n, n+1
QPfl_2	116	5' GAUC-	<i>Pfl</i> I	kohäsiv	1	-GGGACCA 3'	+1	266	n, n+1
precB_Bbs4	117	5' GGUC-	<i>Bbs</i> I	kohäsiv	1	-GGGAUCAA 3'	+2	237	n
precB_A2	118	5' GAUC-	<i>Msl</i> I	glatt	4	-GGGAUCACAA 3'	+4	108	n
precB_1	119	5' GAUC-	<i>Msl</i> I	glatt	4	-GGGAUCACAA 3'	+4	123	n
precB_2G3	119	5' GGUC-	<i>Msl</i> I	glatt	4	-GGGAUCACAA 3'	+4	223	n
precB_1	127	5' GAUC-	<i>Bsa</i> I	kohäsiv	2	-GGGAUCACAAUAUGACA 3'	+12	195	n, n+1
precB_2G3	127	5' GGUC-	<i>Bsa</i> I	kohäsiv	2	-GGGAUCACAAUAUGACA 3'	+12	251	n, n+1

Auch die Art der Restriktion spielte eine Rolle. Plasmid-Templates mit glatten Enden erzielten höhere RNA-Ausbeuten als solche mit kohäsiven Enden (T3_C-Del/*Sma* I & /*Ava* I sowie precB_4Ü3/*Sma* I & /*Ava* I in Tab. 4.2). Darüber hinaus konnte für die Terminationsstruktur weder primär (Sequenz oder Endheterogenität) noch sekundär (Länge des 3'-RNA-Überhangs) ein Zusammenhang zur Transkriptionsausbeute festgestellt werden.

4.1.5 Posttranskriptionale Prozessierung

Bakteriophagen-RNA-Polymerasen besitzen eine template-unabhängige Transferaseaktivität, die bei *in-vitro* Transkriptionen zur Addition ein- bis mehrerer Nukleotide an das 3'-Ende des Transkripts führt (Milligan *et al.*, 1987). Obwohl mit größerer Kettenlänge die Bedeutung der Endheterogenität auf das Kristallisationsverhalten sinkt, bleibt ein ungünstiger Effekt der (überhängenden) 3'-Vielfalt auf die intermolekulare Kristallpackung wahrscheinlich. Deshalb wurden hohe Anforderungen an die Reinheit einer homogenen Transkript-Spezies gestellt. Eine gelelektrophoretische Trennung des n vom n+1-Transkript und die Isolation aus dem Gel gestaltete sich durch die limitierende RNA-Länge (< 130 nt) und den hohen Materialbedarf schwierig. Anknüpfend an die Selbstspaltung eines Transkripts, das zwei Hammerhead-Ribozyme enthielt (Wyszko *et al.*, 1998), werden im folgenden weitere Möglichkeiten der posttranskriptionalen Prozessierung aufgezeigt.

4.1.5.1 Precursorspaltung mit RNasen

Als erstes wurde eine Prozessierung mit jenen RNasen untersucht, die *in-vivo* die Reifung der 5S rRNA aus dem Primärtranskript bewirken. Hierfür waren zunächst die benachbarten DNA-Bereiche der *Thermus flavus* 5S rDNA zu charakterisieren, um über Homologien zu Spacerregionen in anderen Mikroorganismen auf analoge Prozessierungsschemata zu schließen.



Abb. 4.6 Partielle Sequenz des *Thermus flavus* 23S / 5S rRNA / ^{Gly}tRNA Operons inklusive der Spacerregionen.

Aus dem *Bam*H I-Fragment der genomischen *Th. flavus* DNA wurde mit den Primern 5Sprec_23S RNA und 5Sprec_GlytRNA (vergleiche Anhang) die primäre 5S rDNA inklusive ihrer Spacersequenzen amplifiziert (Annealing bei 69°C), das PCR-Produkt ins Plasmid pCR[®]2.1-TOPO kloniert und das Insert sequenziert (Abb. 4.6).

Eine bemerkenswerte Randerscheinung ist die nur 85,5 %-ige Homologie der GlytRNAs aus *Th. thermophilus* und *Th. flavus*.

Beim Vergleich der 23S–5S rDNA-Spacerregionen aus *E. coli* bzw. *B. subtilis* mit *Th. flavus* waren weder auf der Ebene der Primär- noch der Sekundärstruktur signifikante Homologien festzustellen (Sogin *et al.*, 1977; Brosius *et al.*, 1981). Da unter Ausschluß der o. g. ungünstigen Initiationssequenzen ein homogener 5'-Terminus des *in-vitro* Transkripts zu erwarten war, lag der Schwerpunkt auf dem 3'-Ende. Der 5S rRNA-GlytRNA-Spacer wies nur eine sehr geringe Länge von 10 nt auf. Ein Homologievergleich mit dem 5S rRNA-AsptRNA-Spacer (52 nt) im *E. coli* rrnC- bzw. rrnF-Operon (Young, 1979), dem 5S rRNA-ThrtRNA-Spacer (12 nt) im rrnD-Operon (Ray *et al.*, 1982) oder mit den 43 nt des *B. subtilis* Precursors p5_A (Sogin *et al.*, 1977) ergab keine Übereinstimmung. Aus der Aktivität der RNase P am 5'-Ende der *Th. flavus* GlytRNA wird ein 5S rRNA-Precursor resultieren, dessen weitere 3'-Prozessierung sehr spekulativ ist. Aufgrund der fehlenden Rotationssymmetrie in Sekundärstrukturanalysen ist eine RNase M5-analoge Spaltung unwahrscheinlich. In Anlehnung an die Prozessierung der 7S RNA wäre eine Reifung durch RNase III denkbar, sofern der dsRNA-Stamm der Domäne A vom Enzym erkannt würde (Szeberenyi *et al.*, 1984). Vorzugsweise ist jedoch eine Kombination von endonukleolytischer RNase E- und exonukleolytischer RNase T-Aktivität anzunehmen. Die Idee war folglich die *in-vitro* Prozessierung eines 5S rRNA-Precursors mit diesen beiden Enzymen. Da eine kommerzielle Verfügbarkeit nicht gegeben ist, wurde auf einen S100-Zellextrakt aus *E. coli* zurückgegriffen. Die Klonierung einer *E. coli* Precursorsequenz (5' CACAA↓AUAUGACA 3') an den 3'-Terminus der *Th. flavus* 5S rRNA und die Konservierung ihrer 3D-Struktur sollten eine hinreichende Substraterkennung gewährleisten (Horne & Erdmann, 1972; Szeberenyi *et al.*, 1984; Apirion & Miczak, 1993).

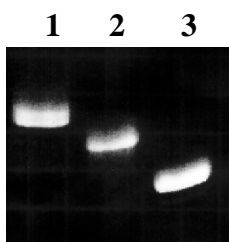


Abb. 4.7 Überwindung der Endheterogenität durch RNasen.

Spur 1: Wildtyp_224prec (136 nt);

Spur 2: Wildtyp_224prec_{S100} (133 nt);

Spur 3: WildtypU_IV/5 (129 nt)

Sowohl der heterogene Wildtyp (Abb. 4.7) als auch die *Th. flavus* 5S rRNA Mutante mit TL/TR-Modul konnten erfolgreich prozessiert werden (Tab. 4.3). Voraussetzung war eine intakte Precursorsequenz. Eine Vorinkubation des Substrats hatte keinen Einfluß auf die Reaktion, die innerhalb von 20 min abgeschlossen war. Erstaunlich blieb die Tatsache, daß anstatt der erwarteten 11 nt nur 3 nt abgespalten wurden. Die Homogenität der Produktbande läßt entweder auf eine gezielte endonukleolytische Enzymaktivität schließen oder auf eine unspezifische Exonuklease, für die – bedingt durch die 5S rRNA-Tertiärstruktur – nur 3 nt zugänglich sind. Da die Positivkontrolle, der *E. coli* 5S rRNA Wildtyp mit verkürztem Precursor, nicht prozessiert wurde, war die RNase T nicht beteiligt.

Tab. 4.3 *in-vitro* Prozessierung der *Th. flavus* 5S rRNA im *E. coli* S100-Extrakt.

5S rRNA-Substrat	3'-Überhang	Vorinkubation	Reaktion	Prozessierung
Wildtyp_224prec/ <i>Bsa</i> I	-ACAAUAUGACA 3'	1 mM MgCl ₂ , 80°C ↓	20 min	n-3
Wildtyp_224prec/ <i>Bsa</i> I	-ACAAUAUGACA 3'	-	20-75 min	n-3
precB_1/ <i>Bsa</i> I	-ACAAUAUGACA 3'	-	20 min	n-3
<i>E. coli</i> 5S rRNA	-UCAA 3'	1 mM MgCl ₂ , 80°C ↓	20 min	-
precB_1/ <i>Msi</i> I	-ACAA 3'	1 mM MgCl ₂ , 80°C ↓	20 min	-
precB_1/ <i>Msi</i> I	-ACAA 3'	-	20 min	-

4.1.5.2 RNA-Abbau mit Phosphodiesterase I

Sekundärstrukturen verhindern exonukleolytische Reaktionen, indem sie als physikalische Barrieren einen RNA-Abbau begrenzen. Auf dieser Grundlage prozessiert die RNase T einzelsträngige 3'-Termini verschiedenster RNA-Moleküle, wie es am Beispiel der 5S rRNA-Reifung im Kapitel 1.2 dargestellt ist (Zhongwei *et al.*, 1998). Im folgenden wurde die schrittweise, exonukleolytische Hydrolyse des 3'-Überhangs der 5S rRNA mit kommerzieller Schlangengift-Phosphodiesterase I aus *Crotalus adamanteus* getestet (Tab. 4.4).

Tab. 4.4 *in-vitro* Prozessierung der *Th. flavus* 5S rRNA mit Phosphodiesterase I.

5S rRNA-Substrat	Molekulargewicht [g/mol]	3'-Überhang	m _{Substrat} [µg]	Menge _{Enzym} [Units]	Zeit [h]	Spez. Aktivität [U*h/µmol]	Produkt
precB_43 / <i>Msi</i> I	33000	-ACAA 3'	1,8	0,005	1	100	n
precB_43 / <i>Msi</i> I	33000	-ACAA 3'	1,8	0,007	1	125	n, n-1, n-4
precB_43 / <i>Msi</i> I	33000	-ACAA 3'	1,8	0,008	1	150	n, n-1, n-4
precB_43 / <i>Msi</i> I	33000	-ACAA 3'	1,8	0,011	1	200	n, n-1, n-4 , Degradation
precB_43 / <i>Msi</i> I	33000	-ACAA 3'	1,8	0,014	1	251	n, n-1, n-4 , Degradation
precB_43 / <i>Msi</i> I	33000	-ACAA 3'	1,8	0,016	1	301	n-4 , Degradation
precB_43 / <i>Msi</i> I	33000	-ACAA 3'	1,8	0,019	1	345	Degradation

Das Ergebnis war unbefriedigend, da kein definiertes, homogenes Produkt entstand. Zum einen setzte der RNA-Abbau erst bei sehr hohen spezifischen Aktivitäten ein, die beim 10^4 -fachen der Herstellerangaben – bezogen auf das chemische Substrat p-Nitrophenyl-Thymidin-5'-Phosphat – lagen. Zum zweiten hatte das Enzym nur in einem schmalen Konzentrationsbereich die erwartete Aktivität, bevor es zu einer vollständigen Substrat-Degradation kam. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die Tertiärstruktur der 5S rRNA einen enzymatischen Angriff am 3'-Ende verhindert. Sollte der 3'-Terminus zugänglich sein, könnte ein Überhang von nur 4 nt als Erkennungssignal für das Enzym zu dicht an der Helix A liegen. Da längere 3'-Überhänge für die Kristallisation nicht erwünscht waren, wurde auf eine tiefere Analyse verzichtet. Die bei hohen Enzymkonzentrationen beobachtete RNA-Degradation könnte auf ein gewaltsames Auflösen der helikalen Sekundärstruktur mit nachfolgendem exonukleolytischen Abbau hindeuten oder in einer Kontamination mit Endonukleasen bzw. einer endonukleolytische Aktivität des Enzyms selbst begründet sein – wie sie von Richards *et al.* (1965) beschrieben wurde.

4.1.5.3 DNA-Enzym katalysierte RNA-Spaltung

Eine weitere Möglichkeit der Transkript-Prozessierung stellt die Anwendung eines DNA-Enzyms zur Abspaltung heterogener 3'-Termini dar. Das bereits im Abschnitt 3.2.7.3 erläuterte Reaktionsprinzip verdeutlicht schematisch Abb. 4.8.

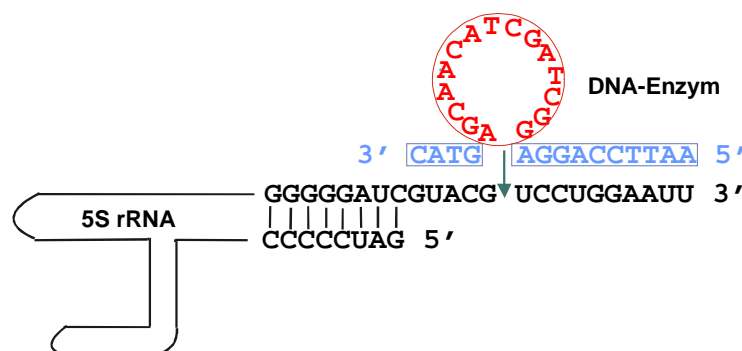


Abb. 4.8 Angriff des DNA-Enzyms QPfl_cut2 auf die *Th. flavus* 5S rRNA Variante QPfl_2b. Die konservierte Loop-Struktur mit dem katalytischen Zentrum ist rot gezeichnet (Kreis); die variablen Arme sind blau dargestellt (Kasten).

Im allgemeinen bedarf es einer Länge der Substraterkennungsarme von 7 bis 9 nt, um die optimale Hybridisierung des DNA-Enzyms an die RNA zu gewährleisten. Aufgrund der helikalen Sekundärstruktur der Domäne A, deren Stränge aus dem 5'- und 3'-Terminus bestehen, hätte die Bildung einer idealen Hybrid-Duplex einen minimalen 3'-Überhang der 5S rRNA von 8 nt nach dem Schnitt zur Folge. Um eine RNA-Spaltung in unmittelbarer Nähe der Helix zu erreichen, wurde im ersten Versuch die höhere Struktur der 5S rRNA-Variante QPfl_2a bei 90°C denaturiert und anschließend das DNA-Enzym QPfl_cut1 im 10-fachen

molaren Überschuß an die RNA hybridisiert. Es sollte eine Hybrid-Duplex mit der Option einer partiellen Hybrid-Triplex entstehen. Wie der unvollständige RNase H-Verdau verifizierte, erfolgte nur eine suboptimale Anlagerung des DNA-Enzyms durch die Bevorzugung der nativen RNA-Struktur (Tab. 4.5). Innerhalb des 3'-Arms des DNA-Enzyms war keine RNase H-Spaltung zu verzeichnen, was eine einzelsträngige Form bzw. die erwähnte Triplex bestätigte. Dem entsprechend wurde auch keine DNA-Enzymaktivität beobachtet.

Tab. 4.5 *in-vitro* Prozessierung der *Th. flavus* 5S rRNA mit dem DNA-Enzym 10-23. Alle 3'-Enden wurden durch Plasmid-Restriktion mit *EcoR* I definiert.

5S rRNA-Substrat	QPfl_2a	QWildtyp_CUU3a	QWildtyp_CUU3b	QPfl_2b
DNA-Enzym	QPfl_cut1	QWT_cut2	QWT_cut1	QPfl_cut2
Faltungsenthalpie _{DNA-Enzym}	-1,6 kcal/mol	-1,7 kcal/mol	-0,4 kcal/mol	0,1 kcal/mol
Sekundärstruktur _{DNA-Enzym}	4 bp Helix / 17 nt Loop	4 bp Helix / 17 nt Loop	3 bp Helix / 5 nt Loop	3 bp Helix / 5 nt Loop
Armlängen	9 & 9 nt	9 & 9 nt	9 & 9 nt	10 & 4 nt
DNA-RNA-Bindung	7 bp Hybrid-Triplex	Hybrid-Duplex	Hybrid-Duplex	Hybrid-Duplex
3'-Überhang _{nach Spaltung}	+3	+15	+15	+5
Spaltung _{DNA-Enzym}	0 %	< 20 %	100 %	> 90 %
Spaltung _{RNase H}	< 50 % (+5; +7)	< 35 % (+10; +12)	100 % (+10; +11; +12)	> 90 % (+5)

Die Verschiebung der Spaltstelle stromabwärts im 5S rRNA QWildtyp_CUU3a bewirkte dagegen einen Schnitt. Dessen geringe Frequenz wies auf ein zweites Problem, das Potential des DNA-Enzyms zur Sekundärstrukturausbildung, hin. Mit steigender struktureller Stabilität, ausgedrückt durch den Wert der negativen Faltungsenthalpie, sank die Hybridisierungsfähigkeit des Oligonukleotids und damit verbunden seine Spaltungseffizienz. Das Design des DNA-Enzyms QWT_cut1 mit einem deutlich erhöhten Energiewert resultierte in einer vollständigen Spaltung des Transkripts QWildtyp_CUU3b. Unter Beibehaltung dieser „DNA-Struktur“ wurde ein neues DNA-Enzym mit ungleichmäßigen Armen (und leicht verringerter Anzahl komplementärer Basen zum Zielmolekül) entworfen, um die Spaltstelle der endständigen 5S rRNA-Helix anzunähern. Die Spaltungseffizienz von QPfl_cut2 lag bei über 90 % (Abb. 4.9).

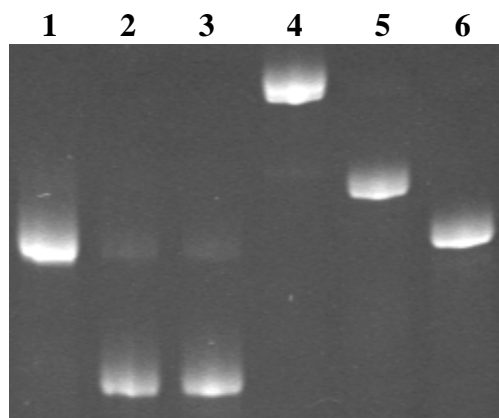


Abb. 4.9 DNA-Enzymaktivität am terminalen 3'-Ende von 5S rRNA-Transkripten.

Spur 1: QPfl_2b / - / -

Spur 2: QPfl_2b / QPfl_cut2 / -

Spur 3: QPfl_2b / QPfl_cut2 / RNase H

Spur 4: QWildtyp_CUU3b / - / -

Spur 5: QWildtyp_CUU3b / QWT_cut1 / -

Spur 6: QWildtyp_CUU3b / QWT_cut1 / RNase H

4.1.6 *in-vitro* Synthese homogener Transkripte

Im Zuge der gelelektrophoretischen Qualitätskontrolle wurde entdeckt, daß die Transkripte C-Del/*Sma* I und C-Del/*Ava* I keine Endheterogenität aufweisen. Um die Ursache für dieses überraschende Phänomen näher zu charakterisieren und eine Übertragung auf andere Transkripte zu prüfen, wurden weitere Konstrukte hergestellt, die in ihrer Primär-, Sekundär- und/oder Tertiärstruktur variierten (Tab. 4.2).

Auf der Ebene der Primärstruktur war ein Einfluß der 3'-terminalen Sequenz auf die Dissoziation der RNA-Polymerase vom Template denkbar. Die Restriktionsenzyme *Sma* I und *Ava* I erzeugten die Enden –GTCCC-3' bzw. –CCCGG-3', so daß auf eine Konsensussequenz –NNC(X)₂-3' geschlossen wurde. Tatsächlich bestätigte sich diese Vermutung auch für die Termini –AUCUU-3' (QWildtyp_CUU3/*Bsa* I), –AUCAA-3' (precB_*Bbs*4) und –CACAA-3' (precB_1/*Msl* I). Die Substitution von Cytosin gegen Adenin an der Position n-2 resultierte jedoch ebenso in einem homogenen Produkt (QWildtyp_AUU1) wie die terminalen Sequenzen –UCUUA-3' (QWildtyp_CUU3/*Dde* I) und –GGUAC-3' (WildtypU_5). Damit schied die Primärstruktur des Transkripts als Parameter der Endheterogenität aus.

Die Sekundärstruktur der 5S rRNA zeigt im relevanten Bereich der Domäne A eine ideale Helix, die für alle Transkripte dieser Arbeit identisch ist. Sofern ein sekundärer Einfluß auf die Endheterogenität besteht, könnte sich dieser nur im Fall einer verzögerten 5S rRNA-Faltung äußern. Eine isolierte Analyse der letzten 23 bis 28 nt homogener Transkripte bezüglich ihrer Sekundärstruktur (<http://www.mfold2.wustl.edu>) ergab eine *Stem-Loop*-Struktur mit einer *Mismatch*-Basenpaarung bzw. einem einzelnen Bulge-Nukleotid. Diese Konformation trat dagegen nicht bei heterogenen Transkripten, wie der Wildtyp 5S rRNA oder *QPfl_2/PflF* I, auf. Trotzdem hatte auch die Deletion des Bulge-Adenylats (entspricht nt 104, Abb. 4.1) in precB_A2/*Msl* I ein homogenes Transkript als Ergebnis.

Als tertiäres Terminationsmerkmal wurde die Länge des 3'-Überhangs betrachtet. Zu diesem Zweck mußte ein Konstrukt precB_4Ü3 mit multiplen Restriktionsschnittstellen kloniert werden, das die Generierung eines 3'-Überhangs mit +5 (*Bbv* I), +7 (*Sma* I), +9 (*Ava* I) und +14 (*Ngom* IV) –Nukleotiden ermöglichte. Während die beiden Transkripte mit weniger als acht ungepaarten Nukleotiden am 3'-Terminus homogen waren, kam es bei größeren Längen zur Endheterogenität (Tab. 4.2). Das Resultat korrespondierte – unter der Voraussetzung eines multiplen Nukleotidüberhangs – mit sämtlichen Transkripten, so daß folgende Verallgemeinerung postuliert werden kann:

- 3'-Überhang mit 2 nt ≤ homogenes 5S rRNA Transkript ≤ 7 nt im 3'-Überhang

Dieses Phänomen könnte in der terminalen Helixstruktur der Domäne A begründet sein. Die angestrebte Hybridisierung der 5S rRNA 5'- und 3'-Termini bedingt einen mechanischen Druck des freien 5'-Endes auf die RNA-Polymerase, der ihre Verdrängung vom RNA-Strang bewirkt. Infolge dieser beschleunigten Dissoziation unterbleibt eine template-unabhängige Nukleotidaddition. Mit zunehmender Länge des 3'-Überhangs reduzieren sich die sterische Behinderung der RNA-Hybridisierung durch die RNA-Polymerase und die Schubkraft auf das Enzym, so daß wieder eine Endheterogenität erscheint. Diese Verdrängungshypothese ist 5S rRNA-spezifisch bzw. auf längere terminale Helices beschränkt (≥ 12 bp), da beispielsweise tRNAs mit +4 nt im 3'-Überhang eine deutliche 3'-Transkriptvielfalt besitzen (persönliche Mitteilung: Michael Gerrits, RiNA GmbH, Berlin).

4.1.7 Kristallisation der 5S rRNA

Für die Kristallisation wurden die beiden *Thermus flavus* 5S rRNA Varianten C-Del/*Sma* I und precB_1/*Msl* I verwendet. Die optimierte Transkription im 1 ml Maßstab mit 100 μ g linearisiertem Plasmid ergab maximal 3,9 mg RNA. Durch die Anpassung des Edukt-Mixes an die Nukleotidkomposition der RNA-Mutanten konnte eine deutliche Verringerung der Zahl an Abbruchfragmenten und eine bessere Ausnutzung der Nukleotidbausteine erzielt werden. Die verbliebene Menge an Nukleotidedukten von ca. 50 % bedingte eine partielle Verunreinigung des Transkripts auch nach der Gelfiltration. Aus diesem Grund schloß sich eine HPLC-Reinigung an (Abb. 4.10).

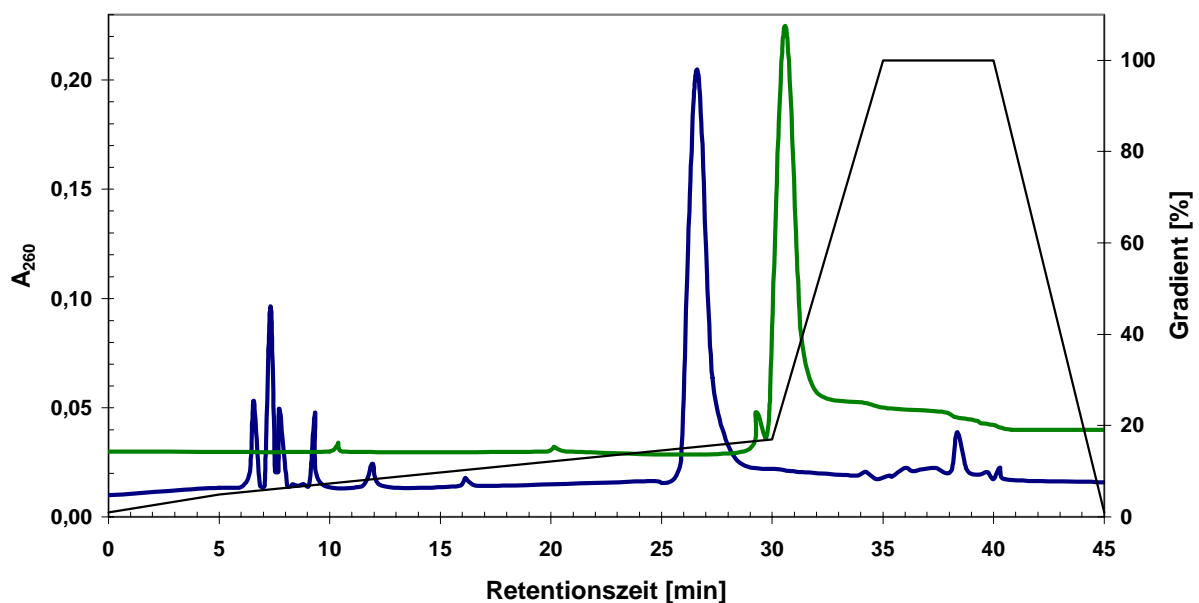


Abb. 4.10 Analytische HPLC-Chromatogramme des 5S rRNA-Transkripts C-Del/*Sma* I nach der Gelfiltration (**unten**) und nach dem präparativen HPLC-Lauf (**oben**).

Die 5S rRNA wurde sowohl direkt als auch nach einer Vorinkubation im Temperaturgradienten von 80°C auf RT in Gegenwart von 5 mM MgCl₂ zur Kristallisation im Hängenden Tropfen angesetzt. Um die Löslichkeit und das Präzipitationsverhalten zu testen, kamen verschiedene kommerzielle Screens der Firma Hampton Research sowie die Matrix nach Dounda *et al.* (1993) zum Einsatz. Die Kristallisationstemperaturen betragen 4°C, 18°C und 32°C. Die Eingangskonzentration am unteren Rand des Sättigungsbereichs wurde mit 1,5 mg/ml RNA ermittelt.

Die wenigen gezüchteten Kristalle zeigten im Vergleich mit dem 5S rRNA Wildtyp eine Morphologie von geringerer Größe und Regelmäßigkeit. Kein Kristall diffraktierte im Röntgenstrahl. Weder eine Optimierung der jeweiligen Kristallisationsbedingung noch ein Seeding führten zu einer Verbesserung des Kristallwachstums. Bedingt durch die Sequenzvariation der 5S rRNA Mutanten erzielte auch der bereits für den Wildtyp optimierte Puffer keinen Erfolg (Lorenz *et al.*, 2000). Dieses Resultat unterstreicht die Schwierigkeit der Kristallisation einer nackten RNA. Für die *Th. flavus* 5S rRNA Mutanten konnte kein geeignetes Kristallisationsfenster gefunden werden.

4.2 Charakterisierung thermophiler 5S rRNA Bindungsproteine

Im Unterschied zu tRNAs, die ihre Funktion in der Zelle als isolierte, strukturell determinierte Moleküle erfüllen (Perona *et al.*, 1991), liegt die 5S rRNA im Ribosom assoziiert mit Proteinen vor. Ihre hypothetische Aufgabe ist nicht-katalytischer Natur und beschränkt sich auf den korrekten Zusammenbau der großen ribosomalen Untereinheit, was den Einfluß von Bindungspartnern auf ihre Struktur unterstreicht (Khaitovich & Mankin, 1999; Ban *et al.*, 2000). Die beobachtete intrinsische Flexibilität der einzelnen 5S rRNA im Kristall könnte folglich durch eine Fixierung beweglicher Molekülbereiche mit Proteinen aus der ribosomalen Umgebung umgangen werden. In Prokaryoten wurden drei Bindungsproteine gefunden, die im Bakterium *E. coli* mit EcoL5, EcoL18 und EcoL25 bezeichnet werden (Horne & Erdmann, 1972). Von besonderer Bedeutung für die Komplexkristallisation ist das Protein L18, da die interne „Atmung“ des 5S rRNA-Gelenkarms der Domänen B und C als Ursache für das unzureichende Kristallisations- und Diffraktionsverhalten angesehen wird. Während die ribosomalen Bindungsproteine Tfil5 aus *Th. flavus* (Jahn *et al.*, 1991) und TL5 aus *Th. thermophilus* (Gryaznova *et al.*, 1996) bereits kloniert wurden, lag zu Beginn dieser Arbeit nur eine N-terminale Sequenzinformation für das *Th. flavus* Protein Tfil18 vor. Die folgenden Abschnitte befassen sich im Einzelnen mit dem „Fischen“ von Tfil18 auf DNA-Ebene und der Charakterisierung seiner Primärstruktur, der *in-vivo* und *in-vitro* Expression sowie mit Bindungsstudien vor der abschließenden Komplexkristallisation.

4.2.1 Wachstumskurven von *Thermus flavus*

Das extrem thermophile Eubakterium *Thermus flavus* wurde Anfang der siebziger Jahre aus heißen Quellen in Japan isoliert (Saiki *et al.*, 1972). Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 70°C und 75°C, die zugleich die Anzucht einer Monokultur gewährleistet. Das Bakterium wächst obligat aerob bei einer chemo-hetero-organotrophen Ernährungsweise. Die Anforderungen an das Medium beinhalten eine C- und N-Quelle, wobei hohe Konzentrationen an organischem Material nicht toleriert werden. Der Zusatz einer Reihe von Spurenelementen in Anlehnung an die nativen Umweltbedingungen fördert die Zellteilung. Die Wachstumskurven im Minimal- und salzhaltigen Komplexmedium zeigt Abb. 4.11.

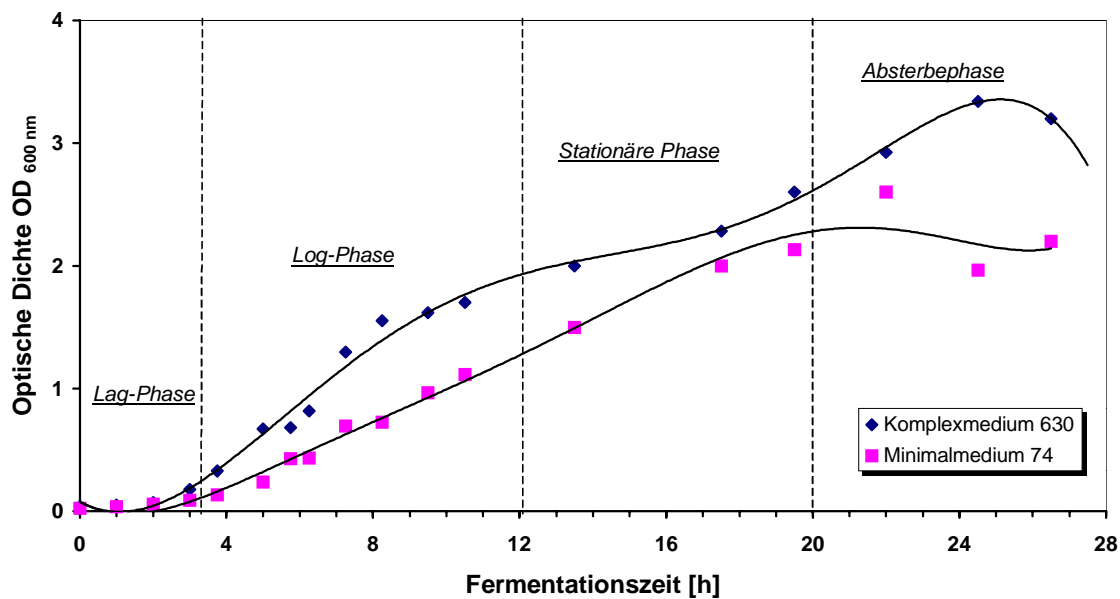


Abb. 4.11 Wachstumskurven von *Th. flavus* bei 75°C in verschiedenen Medien. 0,1 OD₆₀₀ entsprechen rund 0,96 mg Naßzellen bzw. $6,2 \cdot 10^7$ Zellen/ml.

Nach einer Adaptationszeit von etwa 3 h gingen die Zellen in die logarithmische Wachstumsphase über, die durch die mathematische Gleichung:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} * X \quad (4-2)$$

beschrieben wird. Die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} wurde durch Regressionsanalyse mit $0,543 \text{ h}^{-1}$ (Verdopplungszeit: 1,28 h) im Komplexmedium 630 und $0,47 \text{ h}^{-1}$ (Verdopplungszeit: 1,47 h) im Minimalmedium 74 bestimmt. Die komplexe Spurenelementelösung 630 beschleunigte die Teilungsrate und führte zu einer um etwa 5 h verkürzten Log-Phase; die maximal erreichte Zelldichte blieb jedoch annähernd gleich. Der weitere Anstieg der optischen Dichte in der Absterbephase ist auf die Zelllyse und die Freisetzung von Zellbestandteilen zurückzuführen.

4.2.2 Fischen genomischer DNA-Sequenzen von Tfil18 und Tfil25

Die Anzucht der *Th. flavus* Zellen erfolgte im salzhaltigen Komplexmedium 630 bis zu einer optischen Dichte von ca. 1,0. Die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet und die genomische DNA isoliert.

Für die PCR wurden im ersten Ansatz degenerierte Primer synthetisiert, deren Design sich an der bevorzugten Codonverwendung von *Th. thermophilus* (Jahn *et al.*, 1991; Gryaznova *et al.*,

1996) sowie der bekannten DNA-Sequenz von BstL18 aus *Bacillus stearothermophilus* – einer ebenfalls thermophilen Spezies – orientierte (Ramakrishnan & Gerchman, 1991). In vorangegangenen Experimenten hatten Erdmann *et al.* (1993) ribosomale Bindungsproteine aus *Th. flavus* über eine 5S rRNA-Affinitätsmatrix isoliert und N-terminal ansequenziert. Homologievergleiche mit dem Programm BLAST Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ermöglichten u. a. die Identifizierung von TflL18. Die Aminosäuresequenz bildete die Grundlage für den 5'-Primer am N-Terminus. Für den Entwurf des 3'-Primers war der hohe Grad der Konservierung des C-Terminus von L18 vorteilhaft (Setterquist *et al.*, 1996). Als Positivkontrolle der PCR-Methodik dienten zwei Primer für TflL5 (Jahn *et al.*, 1991). Es konnte jedoch weder eine diskrete PCR-Bande von TflL18 erhalten werden, noch ergab die Gelelektion und Klonierung (TOPO TA Cloning[®] Invitrogen) eine Sequenzhomologie. Eine Ursache dürfte in den 288 Primerkombinationen liegen, die aufgrund der Wobble-Basen möglich waren (Abb. 4.12).

Erst die Publikation der Sequenz des *spc*-Operons von *Th. thermophilus*, das die TL18-Sequenz beinhaltet, gestattete eine exakte Primersynthese (Vysotskaya *et al.*, 1997). Die Homologie zu den degenerierten Primern betrug lediglich 84,6 %, was als weitere wesentliche Ursache für das o. g. negative Ergebnis anzusehen ist.

N-Terminus	C-Terminus
5' . . . G C C C G S C T B A C C G C C T A C G A R C G S C G C C G C C C G S G A G G C C G G C C T B G A R T T C . . . 3'
5' A T G G C A C G T T T G A C C G C T T A C G A G C G C G C C C G G G A A G G C G G C C T C G A G T T C T A A 3'

Abb. 4.12 Vergleich der degenerierten (oben) und nativen Primersequenzen (unten) für TflL18. Fett gedruckte Nukleotide verdeutlichen *Mismatches*. B: C/G/T; R: A/G; S: C/G.

Die Primer für TflL25 korrespondierten mit der TL5-Sequenz aus *Th. thermophilus* (Gryaznova *et al.*, 1996). Der Ablauf der PCR entsprach dem für TflL18 (siehe 3.2.4) mit Ausnahme einer Annealing-Temperatur von 59°C und einer Elongationszeit von 50 s. Zur Unterdrückung von Sekundärstrukturen in GC-reichen (thermophilen) Sequenzen wurde mit dem Advantage[®]-GC Genomic PCR System (Clontech) gearbeitet. Für die direkte Zwischenklonierung ins pCR[®]2.1-TOPO-Plasmid erfolgte mit der *KlenTaq* DNA-Polymerase die Addition eines einzelnen Adenylat an das 3'-Ende (1 µl Enzym, 72°C, 30 min). Die erhaltenen DNA- und Proteinsequenzen sind auf der nächsten Seite wiedergegeben (Abb. 4.13).

TfIL18

M A R L T A Y E R R K F R V R N R
 ATG GCA CGT TTG ACC GCT TAC GAG CGC CGT AAG TTC CGC GTG CGC AAC CGC
 I K R T G R L R L S V F R S L K H
 ATC AAG CGC ACC GGG AGG CTC CGC CTC TCC GTC TTC CGG AGC CTG AAG CAC
 I Y A Q I I D D E K G V T L V S A
 ATC TAC GCC CAG ATC ATT GAC GAC GAG AAG GGG GTT ACC CTG GTG TCC GCC
 S S L A L K L K G N K T E V A R Q
 TCC AGC CTG GCC CTG AAG CTC AAG GGC AAC AAG ACG GAG GTG GCC CGC CAG
 V G R A L A E K A L A L G I K Q V
 GTG GGC CGG GCC TTG GCG GAG AAG GCC CTG GCG CTT GGC ATC AAG CAG GTG
 A F D R G P Y K Y H G R V K A L A
 GCC TTT GAC CGG GGG CCC TAC AAG TAC CAC GGC CGG GTG AAG GCC CTG GCG
 E G A R E G G L E F
 GAA GGG GCC CGG GAA GGC GGC CTC GAG TTC TAA

TfIL25

M E Y R L K A Y Y R E G E K P S A
 ATG GAG TAC CGT TTG AAA GCG TAC TAC CGC GAG GGA GAG AAG CCG TCG GCC
 L R R A G K L P G V M Y N R H L N
 CTC AGG CGG GCG GGC AAG CTG CCT GGG GTC ATG TAC AAC CGG CAC CTG AAC
 R K V Y V D L V E F D K V F R Q A
 CGG AAG GTC TAC GTG GAC CTG GTG GAG TTT GAC AAG GTC TTC CGC CAG GCC
 S I H H V I V L E L P D G Q S L P
 TCC ATC CAC CAC GTC ATC GTC CTG GAG CTT CCC GAC GGC CAG AGC CTG CCC
 T L V R Q V N L D K R R R R P E H
 ACC TTG GTG CGC CAG GTG AAC CTG GAC AAG CGG CGT CGG CGC CCC GAG CAC
 V D F F V L S D E P V E M Y V P L
 GTG GAC TTC TTC GTC CTC TCC GAC GAG CCC GTG GAG ATG TAC GTG CCC CTC
 R F V G T P A G V R A G G V L Q E
 CGG TTC GTG GGC ACC CCG GCC GGG GTG CGG GCG GGC GGC GTG CTC CAG GAG
 I H R D I L V K V S P R N I P E F
 ATC CAC CGG GAC ATC CTG GTA AAG GTC TCC CCC CGG AAC ATC CCC GAG TTC
 I E V D V S G L E I G D S L H A S
 ATT GAG GTG GAC GTG AGC GGC CTG GAG ATC GGC GAC AGC CTC CAC GCC TCC
 V L K L P P G V E L A V S P E E T
 GAC CTC AAG CTG CCT CCT GGG GTG GAG CTC GCC GTC TCC CCC GAG GAG ACC
 I A A V V P P E D V E K L A E E A
 ATC GCC GCC GTG GTC CCG CCC GAG GAC GTG GAG AAG CTC GCC GAG GAG GCG
 A A E V A E P E V I K K G K E E E
 GCG GCC GAG GTG GCG GAG CCC GAG GTC ATC AAG AAG GGC AAG GAA GAG GAA
 E E
 GAG GAG

Abb. 4.13 Sequenzen ribosomaler 5S rRNA Bindungsproteine aus *Thermus flavus*.

EcoL18	M ----DKK S A-RIR R AT R ARRK L Q-ELGAT R L V V H RT P R H I A Q V I A P N G S E V L V	49
BstL18	M ITK V D R N- A V R KK R H A R I R K K I F G T T E R P R L S V F R S N K H I A Q I I D D T K S A T I V	54
TthL18	M ----AR L T A Y -ERR K F V R N R I K R -TG R L R L S V F R S L K H I A Q I I D D E K G V T L V	49
TflL18	M ----AR L T A Y -ERR K F V R N R I K R -TG R L R L S V F R S L K H I A Q I I D D E K G V T L V	49
EcoL18	A A S T V E- K A I A E Q L K Y T G N K D A A A A V G K A V A E R A L E K G I K D V S F D R S G F Q Y H G R V	103
BstL18	S A S T L D- K E F G--LD S T N N I E A A K K V G E L V A K R A L E K G I K Q V V F D R G G Y L Y H G R V	106
TthL18	S A S S L A L K A Q G ----A T R-R G V A R Q V G R A L A E K A L A L G I K Q V A F D R G P Y K Y H G R V	99
TflL18	S A S S L A L K L K G N-- K - T -- <u>E</u> V A R Q V G R A L A E K A L A L G I K Q V A F D R G P Y K Y H G R V	98
EcoL18	Q A L A D A A R E A G L Q F	117
BstL18	K A L A D A A R E A G L E F	120
TthL18	K A L A E G A R E G G L E F	113
TflL18	K A L A E G A R E G G L E F	112
<hr/>		
EcoL25	M -F T I N A E V R K E Q G K G A S R R L R A A G K F P A I I Y G G K E A P L A T E L D H D K V M N M Q A K	53
BsuCTC	M -A T L T A K E R T D F T R S S L R N I R T S G H V P G I I Y G K D T G N K P V S L D S V E L I K T L R D	53
TL5	M E Y R L K A Y Y R E G E K P S A L R R-- A G K L P G L M Y N R H L -N R K V Y V D L V E F D K V F R Q	50
TflL25	M E Y R L K A Y Y R E G E K P S A L R R-- A G K L P G V M Y N R H L -N R K V Y V D L V E F D K V F R Q	50
EcoL25	A E F Y S E V L T I V V- D G K E I K V K A Q D V Q R H P Y K P K L Q H I D F V R A	94
BsuCTC	E G K -N A V I T L E V - S G E K H S V M V T D L Q T D P L K N E I T H A D F Q V V N M S E D I E V E V P I	105
TL5	A S I -H H V I V L E L P D G Q S L P T L V R Q V N L D K R R R R R P E H V D F F V L S- D E P V E M Y V P L	102
TflL25	A S I -H H V I V L E L P D G Q S L P T L V R Q V N L D K R R R R R P E H V D F F V L S- D E P V E M Y V P L	102
BsuCTC	H L T G E A I G V K N G G V L Q Q P L Y A L T V K A K P K A I P Q T I E A D I S S L D V N E V L T I A D L P	159
TL5	R F V G T P A G V R A G G V L Q E I H R D I L V K V S P R N I P E F I E V D V S G L E I G D S L H A S D L K	156
TflL25	R F V G T P A G V R A G G V L Q E I H R D I L V K V S P R N I P E F I E V D V S G L E I G D S L H A S V L K	156
BsuCTC	A G G D Y S F N H E S D E V V A S I L P P Q Q E----- A A E V D E E E S A D A Q P E G E N E Q	204
TL5	L P P G V E L A V S P E T I A A V V P P E D V E K L A E E A A E V A E P E V I K K G K E E E E E	206
TflL25	L P P G V E L A V S P E T I A A V V P P E D V E K L A E E A A E V A E P E V I K K G K E E E E E	206

Abb. 4.14 Vergleich der Proteinsequenzen von L18 und L25 aus verschiedenen Mikroorganismen. Die Sequenzdaten stammen aus Setterquist *et al.* (1996), Vysotskaya *et al.* (1997) und Stoldt *et al.* (1998). **Fett gedruckte Aminosäuren** sind konserviert; unterstrichene Aminosäuren sind in den *Thermus sp.* unterschiedlich. Die eingeführten Leerstellen dienen der Optimierung des Sequenzvergleichs. Zur Abkürzung der Mikroorganismen siehe Tab. 5.1.

TfIL18 besteht aus 112 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 12,6 kDa. Das Protein hat einen isoelektrischen Punkt von 11,1. Die häufigsten Aminosäuren sind Arginin (13,4 %), Alanin (12,5 %) und Leucin (11,6 %). Der GC-Gehalt der DNA-Sequenz beträgt 66,7 %.

Das 23,2 kDa große Protein TfIL25 setzt sich aus 206 Aminosäuren zusammen. Valin (13,6 %) und Glutaminsäure (13,1 %) treten am häufigsten auf; der isoelektrische Punkt ist 5,3. Der genomische GC-Gehalt entspricht mit 67,2 % dem von TfIL18.

Für die Analyse der Primärstruktur wurden die homologen Proteinsequenzen aus einigen Mikroorganismen verschiedener Thermophilie überlagert (Abb. 4.14). Obwohl die *Thermus sp.* eine erwartungsgemäß hohe Homologie zeigen, erstaunt insbesondere die erhebliche Sequenzvariation der Aminosäuren 58 bis 65 im nicht-RNA-bindenden Bereich von TfIL18. Die Daten werden in Abhängigkeit von der optimalen Wachstumstemperatur des Mikroorganismus und den Erkennungssequenzen der 5S rRNA für die Proteinwechselwirkung im Abschnitt 5.5 diskutiert.

4.2.3 Überexpression von TfIL18 *in-vivo* und *in-vitro*

Im Hinblick auf die Kristallisation einer möglichst nativen Proteinsequenz wurde die Expression von TfIL18 als Fusionsprotein gewählt. Im Gegensatz zu His-Tag oder Strep-Tag, die am Zielprotein verbleiben und dessen Struktur bzw. Funktion beeinflussen können, wird das fusionierte Affinitätsprotein abgespalten. Das IMPACT™-System von NEB ermöglicht nicht nur eine Ein-Schritt-Aufreinigung des Zielproteins, sondern auch ein proteasefreies Arbeiten durch eine Thiol-induzierte Spaltung. Da nicht vorherzusagen ist, welchen Einfluß die Fusion auf die Expression und Struktur des Fusionsproteins hat, mußte TfIL18 sowohl C- als auch N-terminal ins Expressionsplasmid kloniert werden. Aus dem Vektor pCR® 2.1-TOPO wurde ein TfIL18 enthaltenes *Nco I/Xho I*-Fragment in pTYB4 (C-terminale Fusion) bzw. ein *Nde I/Xho I*-Fragment in pTYB12 (N-terminale Fusion) umklont. Die N-terminalen Schnittstellen waren über *in-vitro* Vektormutagenen eingeführt worden (QuikChange™-Prinzip). Zur Transformation fanden ultrakompetente XL10-Gold-Zellen (Stratagene) Anwendung. Aufgrund der geringen Klonierungseffizienz erwies sich die Kolonie-PCR als geeignete, schnelle Screening-Methode. Die positiven Klone wurden angeimpft, die Plasmide isoliert und sequenziert. Die Transformation der fertigen Expressionsplasmide erfolgte in die Expressionsstämme *E. coli* B ER2566 und Epicurian Coli® BL21-CodonPlus™ (DE3)-RP. Letzterer enthält Extrakopien der tRNA-Gene *argU* (AGA, AGG) und *proL* (CCC), da andernfalls die Translation des heterologen Proteins TfIL18 in *E. coli* limitiert werden könnte.

Die C-terminale Sequenz des rekombinanten C-TfIL18 lautet –GLEPG; zusätzlich ist die N-terminale Sequenz des rekombinanten N-TfIL18 um drei Aminosäurereste verlängert: AGHMA-. Die Veränderungen in der Sequenz sind jeweils **fett gedruckt**.

Die Optimierung der Expression und Proteinaufreinigung erfolgte durch Variation einer Vielzahl von Parametern. Die Proteinexpression wurde durch IPTG im Konzentrationsbereich von 0,4 bis 0,5 mM induziert. Dem schloß sich der Test von drei verschiedenen Expressionstemperaturen und –zeiten mit *E. coli* B ER2566 Zellen an: 16°C ÜN, 24°C 6 h sowie 30°C 3 h. Im Ergebnis lieferten die ersten beiden Ansätze bessere Ausbeuten, die durch die Verwendung des Expressionsstamms Epicurian Coli® BL21-CodonPlus™ (DE3)-RP weiter gesteigert werden konnten. Der Zellaufschluß wurde zum einen mit Lysozym (10 µg/ml Enzym, 4°C, 1 h; anschließend DNase I-Verdau: 10 µg/ml Enzym in 5 mM MgCl₂, 4°C, 10 min) und zum anderen mit Ultraschall durchgeführt. Die biochemische Variante war zunächst schonender für die Zellproteine, führte aber zu einer Kontamination der Proteinprobe mit der Protease und einem möglichen Abbau des Zielproteins (Abb. 4.15). Dagegen war der mechanische Zellaufschluß sehr effektiv; er ging jedoch mit einer starken Erwärmung der Suspension einher, die eine partielle Denaturierung und Degradation von Proteinen hervorrufen kann. Die Inteinpleißung auf der Affinitätssäule erfolgte mit 50 bis 70 mM DTT zwischen 16 und 23°C innerhalb von 16 bis 44 h. Die jeweils höchsten Werte ergaben die beste Abspaltung von TfIL18.

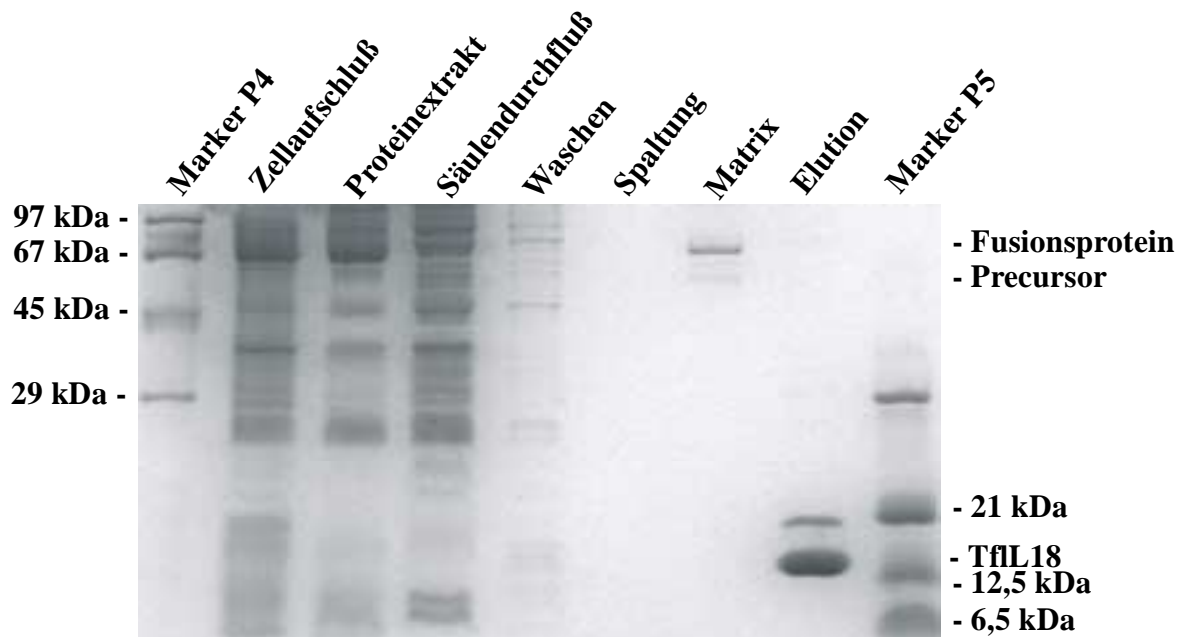


Abb. 4.15 *in-vivo* Überexpression von N-TfIL18. Die Bedingungen sind in Tab. 4.7 und Abschnitt 3.2.8.2 angegeben. Der Zellaufschluß erfolgte im Beispiel-Gel durch Lysozym (Nebenbande bei der Elution).

Parallel wurde Tfil18 im *in-vitro* System des Proteinbioreaktors synthetisiert. Ein *Nco* I / *Pst* I-Fragment wurde aus pTYB4 (mit Tfil18-Intein-CBD) in den Vektor pHMFA3xSRTR kloniert und in *E. coli* JM109-Zellen transformiert. Die Insertion ließ sich über die Fragmentzahl und -größe nach einer *Bam*H I-Restriktion nachweisen. Die Proteinsynthese erfolgte unter Kontrolle des T7-Promotors innerhalb von 90 min. Das Fusionsprotein umfaßte 630 Aminosäuren (davon 62 x Leucin) mit einem Molekulargewicht von 70,1 kDa. Die Ausbeute war im Bereich von 0,2 bis 2 nM Plasmid template-unabhängig und betrug $170 \pm 7 \mu\text{g/ml}$. Der Rohextrakt wurde über eine Gelfiltrationssäule (NickTM) umgepuffert und Tfil18 anschließend wie oben beschrieben aufgereinigt.

In Tab. 4.6 sind die optimierten Bedingungen zusammengefaßt und die verschiedenen Wege im Hinblick auf die Proteinausbeute verglichen. Die Expressionsrate des N-terminal fusionierten N-Tfil18-Konstrukts lag beim drei- bis fünffachen von C-Tfil18-Intein-CBD. Darüber hinaus besaß die chitinbindende Domäne des N-terminalen Fusionsproteins einen hervorragenden Zugang zur Affinitätsmatrix. Jedoch blockierte seine 3D-Faltung die Spleißstelle. Im Endergebnis blieb eine zwei- bis dreifach höhere Ausbeute von N-Tfil18 gegenüber C-Tfil18, die im Vergleich zu Referenzproteinen im unteren Bereich einzuordnen war (IMPACTTM-Manual NEB).

Tab. 4.6 Synthese und Aufreinigung von Tfil18 in Abhängigkeit vom Konstrukt und Expressionssystem. Mit Ausnahme der Ausbeute sowie der *in-vitro* Expressionsrate wurden die Parameter über die Intensität der Gelbanden quantifiziert.

	<i>in-vivo</i> Überexpression von Tfil18		<i>in-vitro</i> Synthese von Tfil18
	N-terminal fusioniert	C-terminal fusioniert	C-terminal fusioniert
Expressionsrate des Fusionsproteins	4,2-6,3 $\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{h})$ <i>(BL21-CodonPlus (DE3)-RP, 24°C, 5 h)</i>	0,8-1,9 $\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{h})$	109-118 $\mu\text{g}/(\text{ml} \cdot \text{h})$ <i>(37°C, 1,5 h)</i>
Säulenaffinität	> 95 %	< 50 %	< 50 %
Spaltung_{Intein}	< 15 % <i>(70 mM DTT, 23°C, 44 h)</i>	< 66 %	< 66 % <i>(70 mM DTT, 23°C, 44 h)</i>
Ausbeute Tfil18	1,2-2,6 mg/l	0,4-1,1 mg/l	< 20,5 mg/l ^{*)}

*) Interpolation

Deutlich besser schnitt die *in-vitro* Synthese im Proteinbioreaktor ab, dessen Syntheserate und Ausbeute die 20- bis 60-fachen Werte im Vergleich zur *in-vivo* Überexpression erreichten. Die Herstellung der für die Kristallisation erforderlichen Mengen setzt aber eine Vergrößerung des Synthesemaßstabs und eine kontinuierliche Reaktionsführung voraus.

4.2.4 Bindungsstudien

Das Bindungsvermögen des rekombinanten Proteins Tfil18 an die ribosomale 5S rRNA wurde in *Gel-Shift*-Experimenten untersucht (siehe 3.2.2.4). Die Komplexierung erfolgte in 1 x TMK-Puffer mit zusätzlichen 30 mM Tris-HCl. Eine Verringerung der Pufferkonzentration bis 0,4 x TMK hatte keinen Effekt auf die RNA-Bindung. Getestet wurden der *Th. flavus* 5S rRNA Wildtyp und verschiedene Mutanten. Als Negativkontrolle diente ^{ArgU}tRNA.

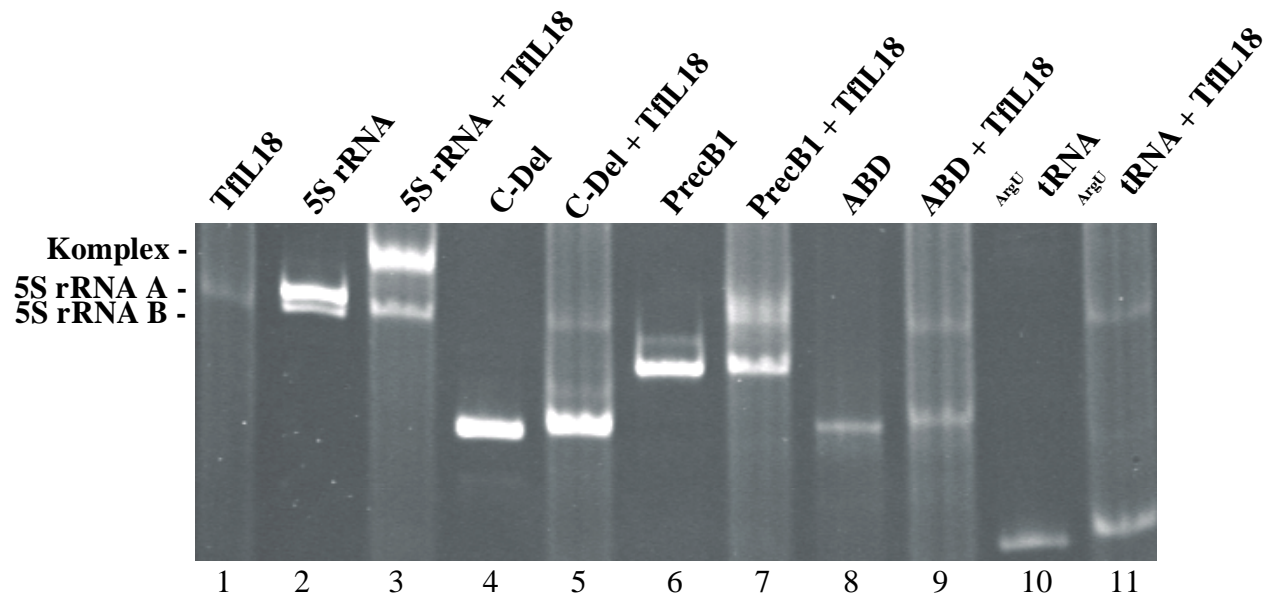


Abb. 4.16 Bindungsassay von N-Tfil18 an die 5S rRNA. Die Proben wurden in einem nativen 12 %-igen Polyacrylamidgel getrennt und die RNA mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Obwohl die erste Spur eine reine Proteinprobe beinhaltete, ist eine leicht Bande in Höhe der 5S rRNA zu erkennen (Abb. 4.16). Hierbei dürfte es sich um die *E. coli* 5S rRNA handeln, die auch während der stringenten Aufreinigung an das überexprimierte Tfil18 gebunden blieb. Der transkribierte Wildtyp der *Th. flavus* 5S rRNA (mit *Asp718* I-Überhang am 3'-Ende) trat in den schon anderweitig beschriebenen Formen A und B auf (Lorenz *et al.*, 1991). Ausschließlich die A-Form besaß ein Bindungsvermögen an das Protein Tfil18 (Spur 3). Die modifizierte 5S rRNA precB1 enthielt in den Domänen C und B das kristallisationsfördernde Tetraloop/Tetraloop-Rezeptor-Modul. Die Sequenzveränderung, insbesondere die Substitution von A66 gegen U17.1 im essentiellen L18-Bindungsereich (Egebjerg *et al.*, 1989), verschlechterte die Proteinbindung (Spuren 6 & 7). Das Fehlen der Loopverbindung b zwischen den Domänen B und C in der C-Deletionsmutante sowie im Fragment ABD (siehe Anhang) führte zu einem vollständigen Verlust der Bindung (Spuren 4 & 5 sowie 8 & 9). Das Fragment ABD war außerdem in der Lage zu dimerisieren.

Das Gleichgewicht lag auf Seite des Monomers mit einem molaren Monomer:Dimer-Verhältnis von ca. 4:1. Weder das Monomer noch das Dimer banden an Tfil18. Im Gel-ausschnitt ist nur die Dimerbande zu sehen.

4.2.5 Komplexkristallisation

Aufgrund der eingeschränkten Bindung der 5S rRNA Mutanten an Tfil18 war es zweckmäßig, die Ansätze der Komplexkristallisation nur mit dem Wildtyp durchzuführen. Das Protein Tfil18 und die *Th. flavus* 5S rRNA wurden im äquimolaren Verhältnis in 1 x TMK-Puffer – mit zusätzlichen 30 mM Tris-HCl (pH 8.0) – gemischt. Die Endkonzentration des Komplexes betrug 35 μ M. Der Komplex wurde 30 min bei 37°C inkubiert, bevor die Kristallisation im Hängenden Tropfen unter Anwendung verschiedener Screens und Temperaturen erfolgte. Nach 1 bis 4 Monaten bei 4°C konnten in 0,1 M Citronensäure (pH 4.3) und 0,8 bis 1,6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Reservoirkonzentration) Kristalle erhalten werden (Abb. 4.17). Die Eingangspräzipitantenkonzentration und die Zeit des Kristallwachstums waren umgekehrt proportional. Die relativ lange Zeitspanne verzögerte die Reproduzierbarkeit, so daß keine Aussage über die Diffraktionsqualität der morphologisch ansprechenden Kristalle getroffen werden kann. Durch Ansätze im Temperaturgradienten ist eine Beschleunigung des Kristallwachstums denkbar.



Abb. 4.17 Kristall des Komplexes aus *Th. flavus* 5S rRNA Wildtyp und rekombinantem N-Tfil18. Der sechseckige Kristall wuchs innerhalb von 3,5 Monaten zu einer Größe von 0,09 x 0,25 x 0,25 mm.

In weiteren Versuchen wurden Mikrokristalle in 50 mM Natriumcacodylat (pH 6.0), 1 M Li_2SO_4 und 10 mM MgCl_2 (Reservoirkonzentration) bei 4°C gezüchtet.

Zur weitergehenden Optimierung der Komplexkristalle werden Kristallisationsexperimente unter den Bedingungen der Schwerelosigkeit angesetzt, die in Kooperation mit der US-Weltraumbehörde NASA zwischen April und August 2001 auf der International Space Station (ISS-6A // STS-100/105) stattfinden.

4.3 Strukturaufklärung von *Thermus flavus* 5S rRNA Domänen

Die Kristallisation kleiner RNA-Moleküle ist in der Literatur als unkompliziert beschrieben, und diese Kristalle diffraktieren zugleich in hohe Auflösungsbereiche (Ott *et al.*, 1996; Förster *et al.*, 1999). Ausgehend von ihrem Sekundärstrukturmodell wurde die *Th. flavus* 5S rRNA in fünf Domänen A bis E unterteilt (Specht *et al.*, 1990), die aus verschiedenen Helices, helikalen Bereichen mit Bulge-Strukturen oder Loops bestehen (Abb. 4.18). Die Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der 5S rRNA-Fragmente dient nicht nur einer schrittweisen Annäherung an die 5S rRNA-Struktur, sondern wird wesentlich zum Verständnis spezieller struktureller RNA-Motive beitragen.

Anknüpfend an die Kristallstrukturen der *Th. flavus* 5S rRNA Domäne A (Betzel *et al.*, 1994) – einer 12 bp Helix mit den Nukleotiden 0 bis 11 und 109 bis 120 – sowie der *Stem-Loop*-Domäne E (Nukleotide 79-97; Perbandt *et al.*, 1998) wurden in der vorliegenden Arbeit zum einen die helikalen Bereiche der Domänen B und C kristallisiert. Durch die Optimierung der Auflösung konnten zum anderen tiefere Einblicke in die helikale Struktur der Domäne E gewonnen werden. Die Domäne D wurde nicht in Betracht gezogen, da sie aufgrund fehlender Basenpaarungen einer Kristallisation als Einzeldomäne nicht zugänglich ist.

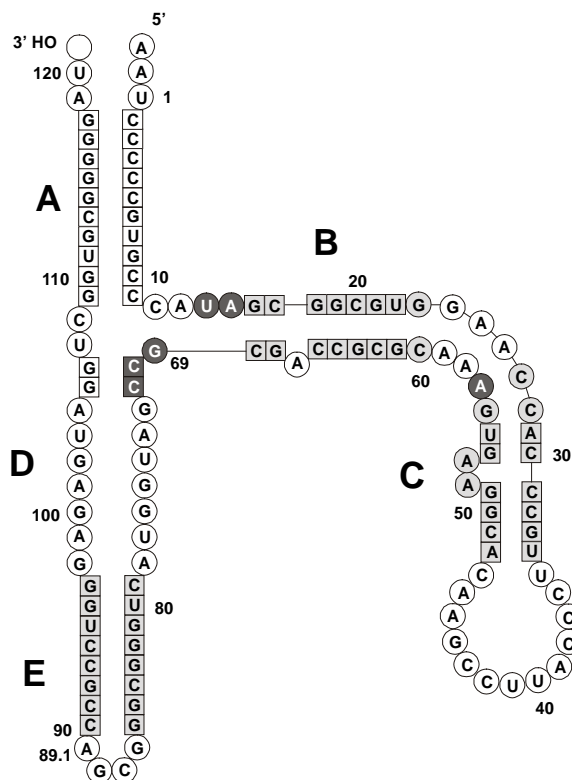


Abb. 4.18 Sekundärstrukturmodell der *Thermus flavus* 5S rRNA. Die im Rahmen dieser Arbeit kristallisierten Bereiche der Domänen B, C und E sind grau hinterlegt. Invertiert dargestellte Nukleotide wurden zur Verbesserung des Kristallisationsverhaltens substituiert. Die exakten Kristallisationssequenzen sind Tab. 4.7 zu entnehmen.

4.3.1 Synthese von RNA-Oligonukleotiden

Die chemische Phosphoramidit-Festphasensynthese ermöglicht die Darstellung von Oligoribonukleotiden in großen Ausbeuten und in hoher Reinheit sowie die Einführung von Modifikationen für strukturelle und funktionelle Studien. Beispielsweise kann durch die Verwendung schweratom-modifizierter Synthone ein konventionelles *Soaking* vermieden werden, das die Kristalle oft zerstört.

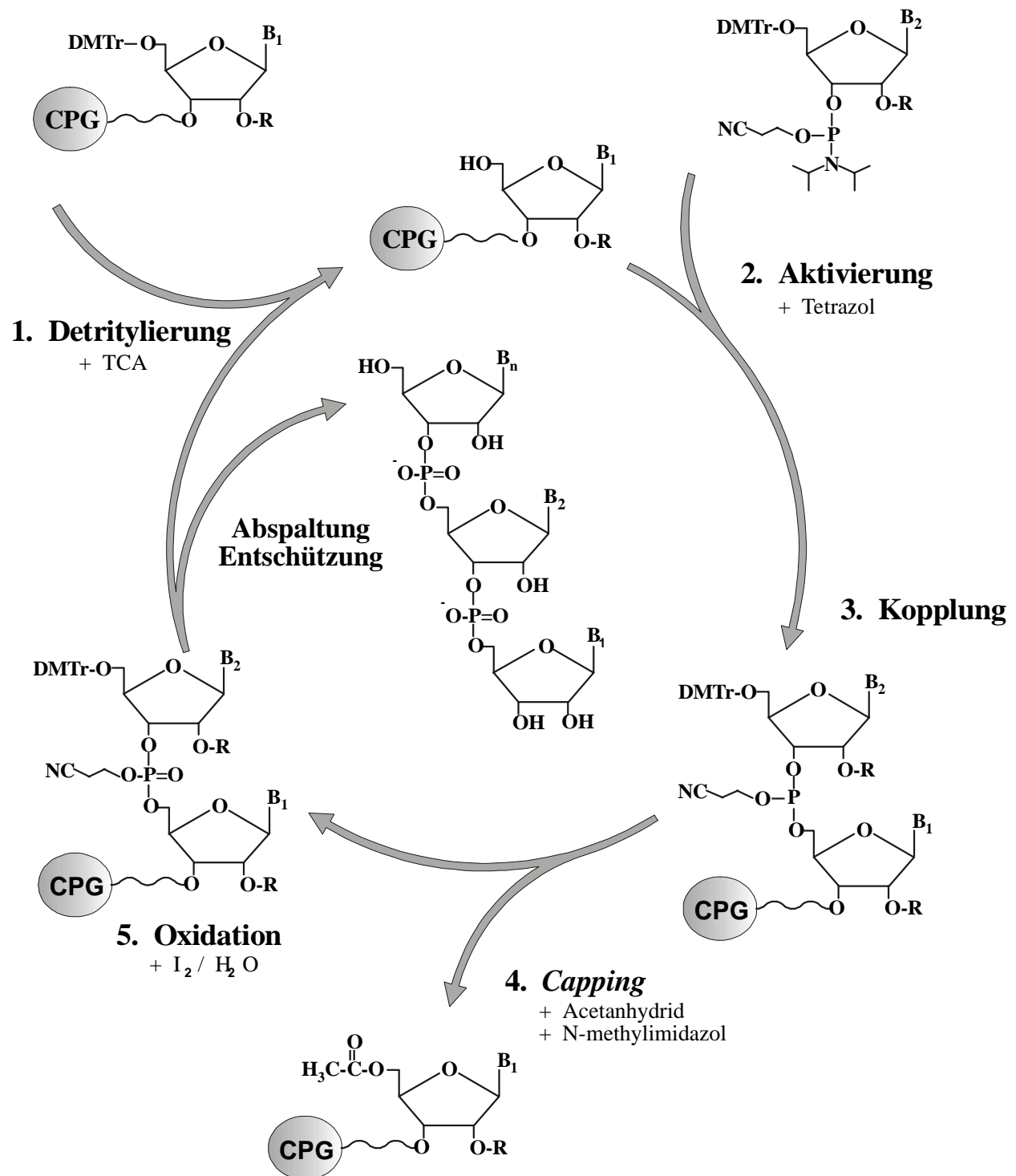


Abb. 4.19 Chemischer Syntheszyklus von Oligoribonukleotiden für die Kristallisation.

Wie im Fall der Domäne A erwähnt, setzen sich die zu kristallisierenden Bereiche der Domänen B, C und E aus jeweils zwei komplementären Einzelsträngen zusammen, die hybridisiert eine Helix ergeben. Die Oligomere mit Längen von 7 bis 10 nt wurden einzeln im 1,0 µmol Maßstab synthetisiert; der Syntheseyklus ist in Abbildung 4.19 dargestellt.

Der Zyklus startete mit der sauren Abspaltung der Dimethoxytritylgruppe (DMTr) des am CPG über Succinylaminopropyl immobilisierten Nukleosids. Der 2. Schritt war die Aktivierung des zu koppelnden Amidits durch Tetrazol auf der Synthesesäule. Dadurch wurde ein nukleophiler Angriff der 5'-Hydroxylgruppe des trägergebundenen Nukleosids bzw. der wachsenden Polymerkette auf den aktivierten Phosphor eingeleitet. Unter Abspaltung von Diisopropylamin erfolgte als 3. Schritt die Kopplung. Die Acetylierung im 4. Syntheseschritt inaktivierte nicht umgesetzte 5'-Hydroxylgruppen. Der erhaltene Phosphittriester wurde anschließend mit Jod zum stabilen Phosphattriester oxidiert, bevor mit der Abspaltung der DMTr-Schutzgruppe ein neuer Zyklus begann. Aus der Intensität der abgespaltenen Trityl-Gruppe konnte auf die Kopplungsausbeute geschlossen werden, die hier über 98 % lag.

Nach der Synthese wurde die Esterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe des endständigen Nukleotides und CPG mit Ammoniak/Ethanol (3:1, v/v) hydrolysiert. Die Entfernung der Benzoyl- und Isobutyrylschutzgruppen an den Basen sowie der Methylschutzgruppen an den Phosphatresten erfolgte im alkalischen Milieu. Die Triisopropylsilylschutzgruppen wurden mit Tetrabutylammoniumfluorid abgespalten.

Die Wahrscheinlichkeit des Kristallisationserfolgs korreliert mit der Reinheit der Probe. Deshalb mußten alle RNA-Stränge mit der rpHPLC aufgereinigt und einer intensiven Qualitätskontrolle unterworfen werden, um störende Interaktionen im Kristallisationstropfen auszuschließen sowie die Kristallisation der richtigen Sequenz zu garantieren. Die Qualität der chemisch synthetisierten D-Oligoribonukleotide bezüglich kompletter Entschützung, Fehlen von Nukleosidmodifikationen oder unerwünschter 2',5'-Verknüpfungen wurde durch Nukleosidanalyse überprüft. Oligoribonukleotide, die partiell 2',5'-Esterbrücken enthalten, könnten sich aufgrund der chemischen Ähnlichkeit in den wachsenden Kristall einlagern, würden aber die gleichmäßige Packung stören und die Diffraktionseigenschaften negativ beeinflussen. Die Totalhydrolyse mit RNase T₂, die ausschließlich 3',5'-Phosphodiesterbindungen spaltet, und die nachfolgende Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase sollte in vier diskreten Nukleosid-Peaks auf der rpHPLC resultieren. Die Integration der Peakflächen unter Einbeziehung der spezifischen Extinktionskoeffizienten der Nukleoside ließ Rückschlüsse auf die Zusammensetzung des Oligomers zu (Abb. 4.20).

Im vorliegenden Beispiel wurde experimentell die folgende Zusammensetzung ermittelt: C = 5,05 (5), U = 1,03 (1), G = 0,97 (1) und A = 0,95 (1); die Werte in Klammern geben die gerundeten Mengen an.

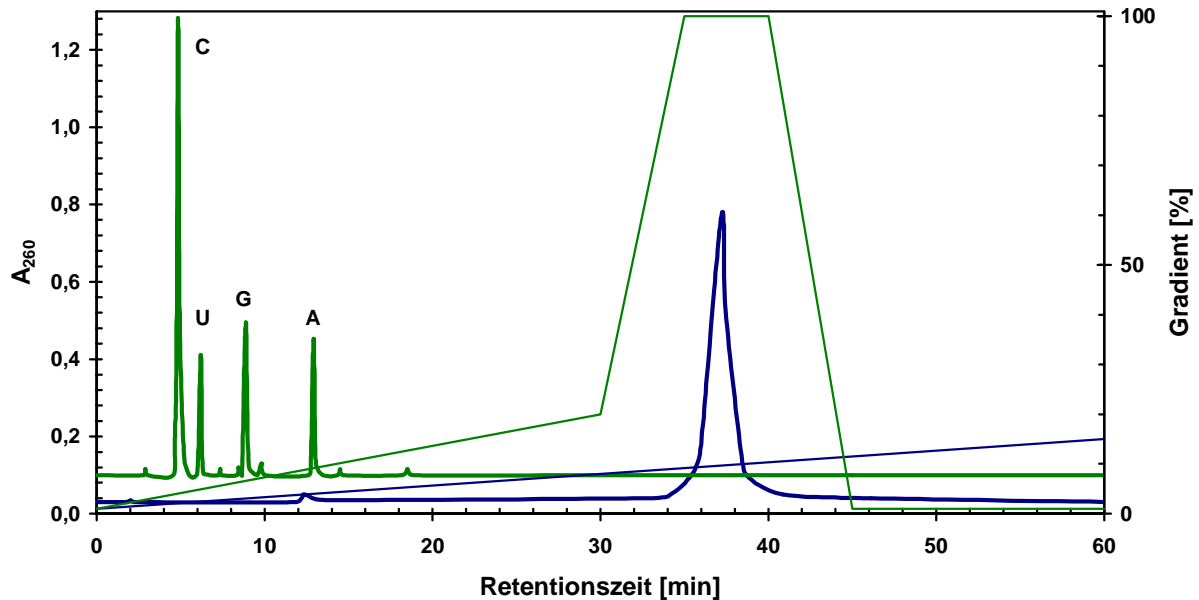


Abb. 4.20 HPLC-Chromatogramme des RNA-Oligonukleotids C3_27-34 nach chemischer Synthese & Entschützung (**unten**) sowie Nukleosidanalyse (**oben**).

4.3.2 Bestimmung von spezifischen Extinktionskoeffizienten

Für die Hybridisierung der komplementären RNA-Stränge im äquimolaren Verhältnis ist die Kenntnis der exakten Konzentration essentiell. Sie lässt sich nach einer Extinktionsmessung bei 260 nm mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnen:

$$c = \frac{E}{\epsilon * d} \quad (4-3)$$

Voraussetzung ist die Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ . Infolge der Hypochromie ist die Absorption eines Oligonukleotides im Vergleich zur Summe der Einzelabsorptionen seiner Nukleotidbausteine verringert. Dieser Effekt ist sequenzabhängig, da sich benachbarte Basen unterschiedlich beeinflussen. Die Methode nach TINOKO versucht, diese gegenseitige Beeinflussung durch theoretische Zerlegung des Oligonukleotides in Dinukleotide zu erfassen. Wie aus Tab. 4.7 ersichtlich ist, waren diese berechneten spezifischen Extinktionskoeffizienten mit großen Abweichungen behaftet. Deshalb wurde eine experimentelle Bestimmungsmethode bevorzugt. Die Oligoribonukleotide wurden im Alkalischen äquimolar zu 2'- bzw. 3'-Nukleosidmonophosphaten hydrolysiert.

Die spezifischen Extinktionskoeffizienten der vier binären 2'/3'-NMP-Gemische waren nach äquimolarer Einwaage und einer E_{260} -Messung ermittelt worden. Die Summe der spezifischen Extinktionskoeffizienten der binären Spaltprodukte unter Berücksichtigung der Basenzusammensetzung des Oligoribonukleotids ergab den spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ_h für ein quarternäres Gemisch:

$$\epsilon_h = N_G * \epsilon_G + N_C * \epsilon_C + N_A * \epsilon_A + N_U * \epsilon_U \quad (4-4)$$

N_i : Anzahl des Nukleotids im Oligomer G: 2'/3'-GMP C: 2'/3'-CMP A: 2'/3'-AMP U: 2'/3'-UMP

Die Absorptionen der Oligoribonukleotide wurden vor und nach der alkalischen Hydrolyse gemessen. Aus dem E_{260} -Verhältnis und dem spezifischen Extinktionskoeffizienten ϵ_h konnte nach folgender Formel der spezifische Extinktionskoeffizient ϵ_i des RNA-Oligonukleotids berechnet werden:

$$\epsilon_i = \frac{E_i}{E_h} * \epsilon_h \quad \text{i: intakt} \quad \text{h: hydrolysiert} \quad (4-5)$$

Die Konzentration des hydrolysierten Oligoribonukleotids entsprach nach dem Gesetz der Massenerhaltung der Konzentration des intakten Oligoribonukleotids.

Tab. 4.7 Spezifische Extinktionskoeffizienten von Oligoribonukleotiden.

Oligoribonukleotid	Sequenz		ϵ_i Alkalische Hydrolyse [l/(mol*cm)]	ϵ_i TINOKO [l/(mol*cm)]	ϵ_i Solver [l/(mol*cm)]
B1_16-22	5' GCGGCGU 3'		56685	67420	55690
B1_61-68 (Δ 66)	5' GCGCCGC 3'		52579	60620	54563
B2_61-68	5' GCGCCAGC 3'		67861	73420	68647
B3_14-21 (C14, C15)	5' CCGCGGCG 3'		65028	71720	65143
B3_62-70 (G70)	5' CGCCAGCGG 3'		78955	84520	79227
B4_14-22 (G15, ^{Bf} U22)	5' UGGCGGCGU 3'		-	86760	68230
B4_62-71 (C69, A70, ^{Bf} U71)	5' CGCCAGCCAU 3'		-	92760	79817
B8_16-23	5' GCGGCGUG 3'		62272	78010	66270
B8_60-68 (Δ 66)	5' CGCGCCGC 3'		64528	67240	60269
C1_28-34	5' CACCCGU 3'		48688	63160	49448
C1_48-56 (Δ 52, 53)	5' ACGGGUG 3'		68097	74270	64068
C2_48-56	5' ACGGAAGUG 3'		92809	99450	92236
C3_27-34	5' CCACCCGU 3'		54831	70600	55154
C3_48-57 (G57)	5' ACGGAAGUGG 3'		96450	110150	102816
C8_48-57 (G57, Δ 52, 53)	5' ACGGGUGG 3'		79923	84970	74648
E1_79-85	5' CUGGGCG 3'		54030	66130	55690
E1_91-97	5' CGCCUGG 3'		49920	62870	50817
E2_80-86	5' UGGGCGG 3'		61563	70300	60564
E2_90-96	5' CCGCCUG 3'		46111	59610	45943
E3_79-86	5' CUGGGCGG 3'		62167	76830	66270
E3_90-97	5' CCGCCUGG 3'		60171	70310	56523

Um die Schritte zu rationalisieren, wurde die Datenmaske ALKABRID unter Excel programmiert. Ein typischer Computerausdruck ist im Anhang beigefügt. ALKABRID erfordert die Eingabe der Sequenzen, Absorptionswerte, Endkonzentration und des Endvolumen im Hybridisierungsansatz. Im Ergebnis der Berechnung erhält man die spezifischen Extinktionskoeffizienten, Oligoribonukleotid-Konzentrationen und Volumina für die Hybridisierung.

In Tab. 4.7 sind die ermittelten spezifischen Extinktionskoeffizienten der RNA-Oligonukleotide zusammengefaßt. Die theoretischen Werte nach TINOKO liegen erheblich über den experimentellen Ergebnissen einer Doppelbestimmung; die Abweichungen betragen bis zu 30 %. Die theoretische Berechnung, deren Ergebnisse in der letzten Spalte aufgelistet sind, legt die Annahme zugrunde, daß durch die gleichmäßige Verteilung jeglicher Basenabfolgen über das Oligonukleotid der hypochrome Effekt sequenzunabhängig wird. In diesem Fall ist die Absorption der vier Nukleotide im Oligomer jeweils um einen konstanten basenspezifischen Betrag gegenüber der Absorption des ungebundenen Nukleotids verringert. Zur Bestimmung der spezifischen Extinktionskoeffizienten der vier gebundenen Ribonukleotide war ein Gleichungssystem mit vier Unbekannten unter Anwendung des Solvers von Excel zu lösen:

$$\epsilon_{1AlkalischeHydrolyse} = N_{1G} * \epsilon_G + N_{1C} * \epsilon_C + N_{1A} * \epsilon_A + N_{1U} * \epsilon_U \quad (4-6)$$

$$\epsilon_{2AlkalischeHydrolyse} = N_{2G} * \epsilon_G + N_{2C} * \epsilon_C + N_{2A} * \epsilon_A + N_{2U} * \epsilon_U \quad (4-7)$$

$$\begin{array}{c} \vdots \\ \vdots \\ \epsilon_{nAlkalischeHydrolyse} = N_{nG} * \epsilon_G + N_{nC} * \epsilon_C + N_{nA} * \epsilon_A + N_{nU} * \epsilon_U \end{array} \quad (4-8)$$

G: Guanylat C: Cytidylat A: Adenylat U: Uridylat

Die Nebenbedingungen lauteten: • $\sum_{i=1}^n (\epsilon_{iAlkalischeHydrolyse} - \epsilon_{iSolver})^2 \rightarrow Minimum \quad (4-9)$

• $\frac{\epsilon_{iAlkalischeHydrolyse} - \epsilon_{iSolver}}{\epsilon_{iAlkalischeHydrolyse}} * 100\% \rightarrow 0 \quad (4-10)$

Das nebenstehende Ergebnis des Solvers für gebundene Nukleotide im RNA-Oligonukleotid wurde mit einem Fehler von $\pm 6,6 \%$ berechnet. Da der Wert nur wenig über dem Pipettierfehler liegt, kann anstelle der alkalischen Hydrolyse auf diese Methode zurückgegriffen werden. Tests der Konzentrationsbestimmung mit einem VR1-mRNA-Oligonukleotid bzw. der Hybridisierung und Kristallisation anhand der Helices B1 und E3 verliefen erfolgreich.

$\epsilon_{\text{Gebundenes Nukleotid}}$:

• $\epsilon_G = 10580 \text{ l}/(\text{mol} * \text{cm})$

• $\epsilon_C = 5706 \text{ l}/(\text{mol} * \text{cm})$

• $\epsilon_A = 14084 \text{ l}/(\text{mol} * \text{cm})$

• $\epsilon_U = 1960 \text{ l}/(\text{mol} * \text{cm})$

4.3.3 Kristallisationsanalyse im erweiterten RNA-MPD-Screen

16 Fragmente der ribosomalen 5S RNA aus *Thermus flavus* wurden auf ihr Kristallisationsverhalten getestet: B1, B2 (hybridisiert mit B1_16-22), B3, B4, B8, C1, C2 (hybridisiert mit C1_28-34), C3, C3^{Br34} (mit 5-Br-U34), C8, E1, E2, E2^{Br91} (mit 5-Br-C91), E3, E3^{Br79} (mit 5-Br-C79), E3^{Br84} (mit 5-Br-C84). Alle Fragmente bestanden aus zwei hybridisierten Einzelsträngen, deren Sequenzen in Tab. 4.7 angegeben sind.

Berger *et al.* beschrieben 1996 eine effiziente Matrix mit 24 Bedingungen für die Kristallisation von Nukleinsäuren, welche die Grundlage für den Nucleic Acid Mini Screen™ (NUC-MPD-Screen) der Firma Hampton Research ist. Für eine systematische Analyse der Kristallisation von kleinen RNA-Molekülen wurde die unvollständige Matrix um 36 neue Bedingungen erweitert. Die Weiterentwicklung des Screens erfolgte so, daß jede Kombination von zwei Additiven bzw. von Additiv und pH-Wert des Puffers wenigstens einmal auftrat. Die Additivpaare wurden in Excel nach dem Zufallsprinzip zu vollständigen Kristallisationsbedingungen zusammengefaßt. Der Screen basiert auf einer MPD-Präzipitation und enthält neben dem Fällungsmittel zwei Polyamine, vier monovalente und fünf divalente Ionen. Im Natriumcacodylat-Puffer waren drei verschiedene pH-Werte eingestellt.

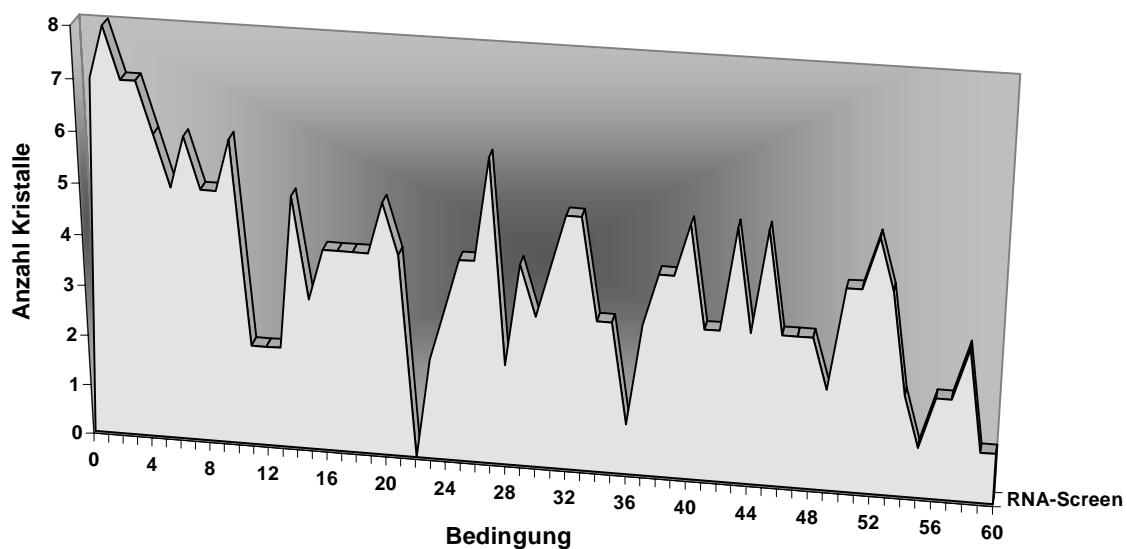


Fig. 4.21 Kristallwachstum im erweiterten RNA-MPD-Screen.

Eine Übersicht zur Zusammensetzung der einzelnen Lösungen befindet sich im Anhang dieser Arbeit. Deren Effizienz für die Kristallisation der 16 RNA-Fragmente ist in Abb. 4.21 wiedergegeben. Während in einigen Bedingungen bis zu 50 % der getesteten Moleküle kristallisierten, erwiesen sich die Kompositionen 22, 36, 55, 59 und 60 als ungeeignet.

Die primäre Häufigkeitsverteilung der RNA-Kristalle innerhalb der verschiedenen Einflußgrößen zeigt Abb. 4.22. Aufgrund der höheren Stabilität von RNA im sauren Milieu wuchsen erwartungsgemäß mehr Kristalle im pH-Bereich von 5.5 bis 6.0. Das Polyamin Kobalt-hexamaminchlorid war gegenüber Spermintetrachlorid (SpCl_4) etwas besser geeignet. Natrium- und Magnesium-Ionen fanden sich am häufigsten in jenen Bedingungen, die zu Kristallen führten.

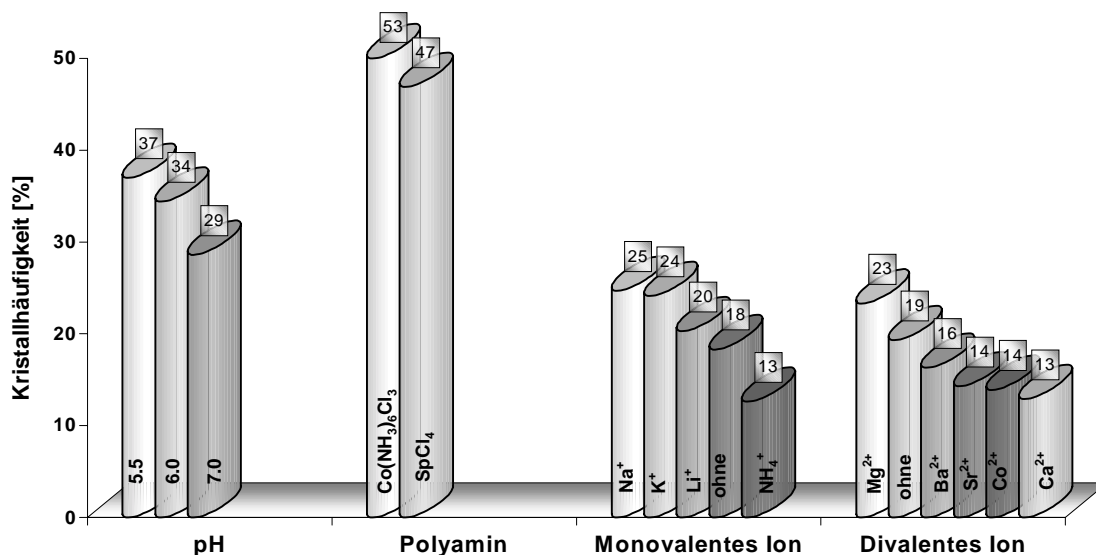


Abb. 4.22 Primäre Häufigkeitsverteilung des Kristallwachstums im erweiterten RNA-MPD-Screen. Die Zahlen sind entsprechend dem Vorkommen des einzelnen Parameters im Screen gewichtet. Gleiche Säulenschattierungen sollen keinerlei Verbindung implizieren.

Da der Screen eine komplette zweidimensionale Matrix abdeckte, konnten in einem zweiten Schritt die bevorzugten Additiv-Zusammensetzungen ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden je zwei relevante Einflußgrößen gegen ihren erzielten Kristallisationserfolg aufgetragen. Die sechs Kombinationsmöglichkeiten sind in Abb. 4.23 dargestellt. Die 20 % der Additivpaare mit den meisten Kristallen wurden ausgewählt und zu neuen Bedingungen zusammengefaßt, von denen angenommen werden konnte, daß sie die Kristallisation kleiner RNA-Fragmente optimal unterstützen (Abb. 4.24). Alle Lösungen hatten einen sauren pH-Wert. Neben Natrium- und Magnesium-Ionen traten weitere Ionen auf, die die Kristallisation überwiegend selektiv (wie Lithium) oder kooperativ (wie im Fall von Strontium) förderten. Die abgeleiteten Bedingungen sollten in Zukunft für das Vorscreenen genutzt werden. 12 Fragmente der 5S rRNA kristallisierten unter diesen Bedingungen mindestens einmal. Der RNA-MPD-Screen diente nachfolgend der weiteren Optimierung des Kristallwachstums kleiner RNA-Moleküle (vergleiche Tab. 4.8).

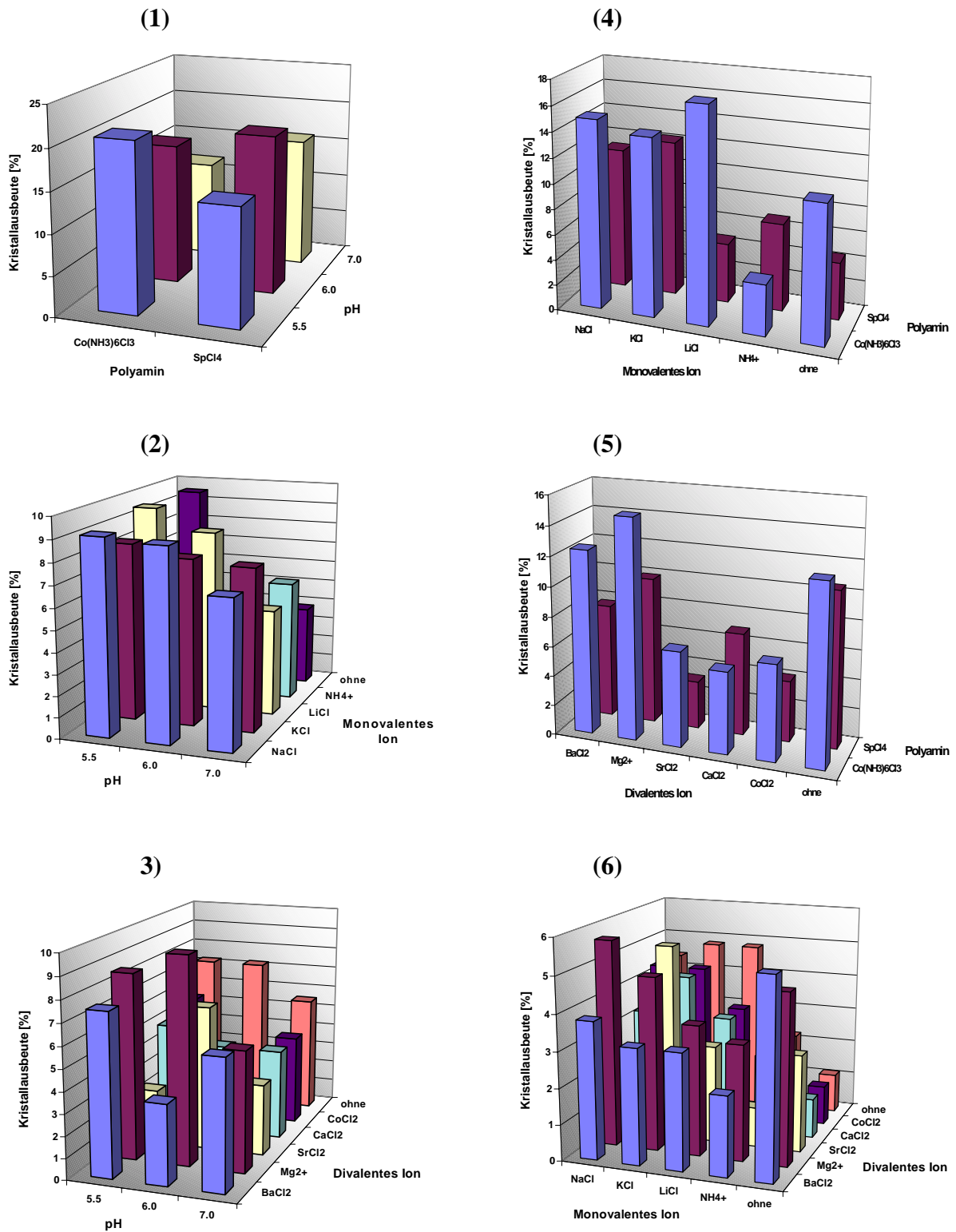


Abb. 4.23 Kristallausbeute für verschiedene Additiv-pH-Kombinationen (1-3) bzw. Additiv-Additiv-Kombinationen (4-6). Neben den variablen Zusätzen (bzw. pH-Werten) enthalten alle Kristallisationslösungen 10 % MPD und 40 mM Natriumcacodylat. Die Häufigkeitsverteilung berücksichtigt die unterschiedliche Anzahl der einzelnen Paare im Screen. Die Kristallausbeute bezeichnet den prozentualen Anteil an Kristallen, die in einer bestimmten Additiv-Variante gewachsen sind. Bezugsgröße ist die gewichtete Gesamtzahl der erhaltenen Kristalle im Screen.

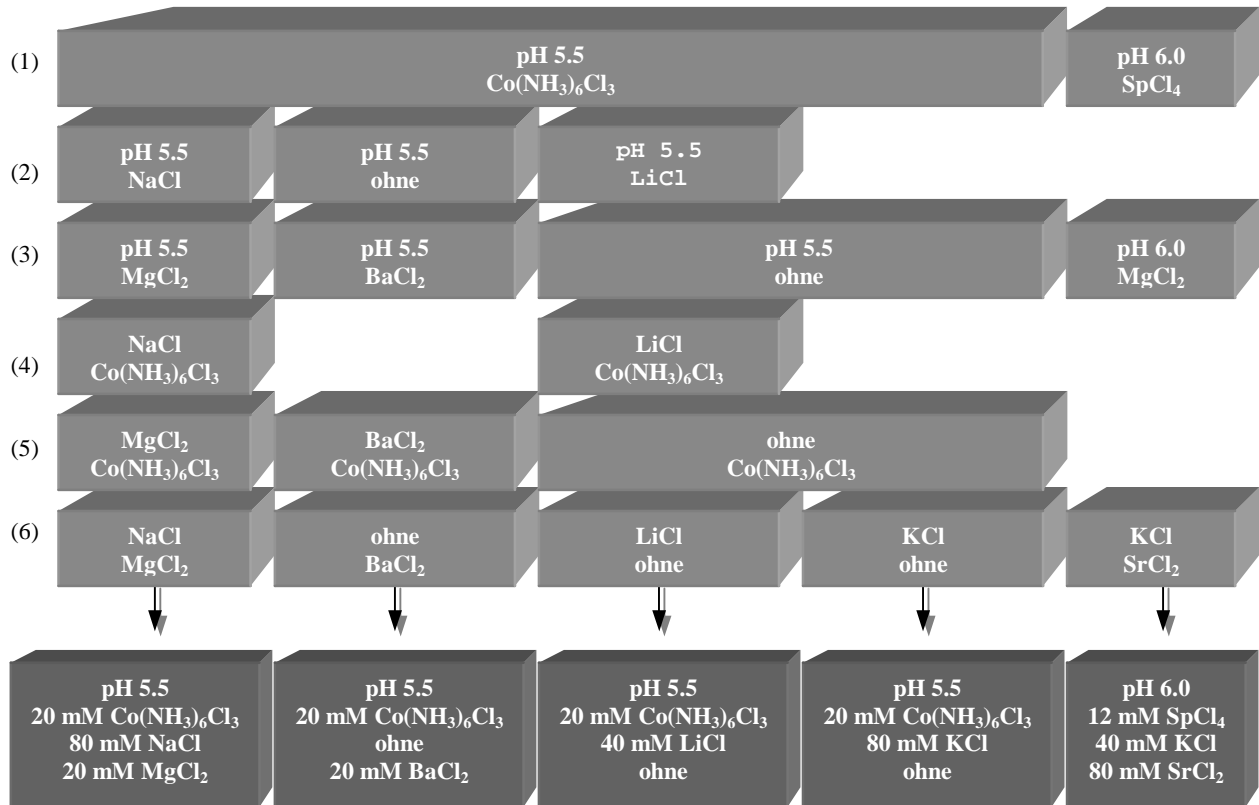


Abb. 4.24 Ableitung optimaler Kristallisationsbedingungen für kleine RNA-Moleküle.

4.3.4 Mathematische Modellierung der Dampfdiffusion

Der Stoffübergang im geschlossenen System des Hängenden Tropfens besteht aus drei Schritten:

1. Stofffluß von Wasser aus der Flüssigphase des ideal durchmischten Kristallisationstropfens in die Gasphase an der Phasengrenzfläche,
2. Transport von Wasserdampf durch die Gasphase,
3. Absorption von Wasserdampf ins Reservoir.

Aufgrund einer vergleichsweise großen Volumendifferenz zwischen Tropfen und Reservoir bleibt der wäßrige Partialdruck der Dampfphase beim Übergang weniger Wassermoleküle konstant. Der Transport- und Absorptionswiderstand im 2. und 3. Schritt sind nicht limitierend. Zu Beginn des Diffusionsprozesses (Schritt 1) handelt es sich folglich um eine einseitige Stephandiffusion,

$$\frac{m_w}{A \cdot t} = - \frac{D^* M_w}{T^* R} \left(\frac{\partial p_w}{\partial y} \right) \cdot \frac{p}{p - p_w} \quad (4-11)$$

die durch kontinuierlichen Gradientenausgleich in die äquimolare Diffusion übergeht.

Es gilt das Ficksche Gesetz:

$$\frac{m_W}{A * t} = - \frac{D * M_W}{T * R} * \left(\frac{\partial p_W}{\partial y} \right) \quad (4-12)$$

Da der wäßrige Partialdruck im Tropfen nicht gegen null, sondern gegen den konstanten wäßrigen Partialdruck des Reservoirs strebt, muß ein Korrekturterm eingeführt werden:

$$\frac{m_W}{A * t} = - \frac{D * M_W}{T * R} * \left(\frac{\partial p_W}{\partial y} \right) * \frac{p}{p - p_W + p_R} \quad (4-13)$$

Als Differentialquotient geschrieben, lautet die Gleichung:

$$\frac{dm_W}{dt} = - \frac{A * D * M_W}{T * R} * \left(\frac{p_W - p_R}{\partial y} \right) * \frac{p}{p - p_W + p_R} \quad (4-14)$$

Um die Volumenänderung im Kristallisationstropfen über die Zeit zu erfassen, wurde der Partialdruck p_W durch das wäßrige Tropfenvolumen V_W ersetzt. Zwischen beiden Größen besteht eine exponentielle Abhängigkeit:

$$f(V_W) = p_W = p^0 (1 - x_1 * e^{-\frac{V_W}{x_2}}) \quad (4-15)$$

Für einen 5 µl Kristallisationstropfen im MPD-System, der bei 20°C äquilibriert wurde, nahmen die Konstanten die Werte $x_1 = 0,692$ und $x_2 = 8,9 * 10^{-10} \text{ m}^3$ an. Die Funktionsgleichung wurde nach der Methode der kleinsten quadratischen Abweichung optimiert ($R^2 = 0,945$). Die Grundlage der Berechnung bildeten die Wasser-Aktivitätswerte von Mikol *et al.* (1990).

- Masse und Volumen sind physikalisch über die Dichte verknüpft. Es gilt:

$$\frac{dm_w}{dt} = \frac{d(\vartheta_W * V_W)}{dt} = \vartheta_W * \frac{dV_w}{dt} \quad (4-16)$$

- Einsetzen von (4-16) in (4-14) ergibt:

$$\frac{dV_W}{dt} = - \frac{A * D * M_W}{\vartheta_W * T * R} * \left(\frac{p_W - p_R}{\partial y} \right) * \frac{p}{p - f(V_W) + p_R} \quad (4-17)$$

- Umformen:

$$\frac{p - p_W + p_R}{p_W - p_R} dV_W = - \frac{A * D * M_W * p}{\vartheta_W * T * R * \partial y} dt \quad (4-18)$$

- Integrationsgrenzen:

$$\int_{V_{W0}}^{V_W} \left(\frac{p}{p_W - p_R} - 1 \right) dV_W = \int_0^t - \frac{A * D * M_W * p}{\vartheta_W * T * R * \partial y} dt \quad (4-19)$$

- Durch Einsetzen von Gleichung (4-15) in (4-19) erhält man:

$$\frac{p}{l} \int_{V_{w0}}^{V_w} \frac{I}{p^0 (1 - x_1 * e^{-\frac{V_w}{x_2}}) - p_R} dV_w - \int_{V_{w0}}^{V_w} I dV_w = \int_0^t -\frac{A * D * M_w * p}{\vartheta_w * T * R * \partial y} dt \quad (4-20)$$

- Die Integration nach Bronstein & Semendjajew (1958) des Integral-Typs Nr. 454 führte zu:

$$\left[\frac{p * V_w}{p^0 - p_R} + \frac{p * x_2}{p^0 - p_R} * \ln(p^0 - p_R - p^0 * x_1 * e^{-\frac{V_w}{x_2}}) \right]_{V_{w0}}^{V_w} - V_w \Big|_{V_{w0}}^{V_w} = -\frac{A * D * M_w * p}{\vartheta_w * T * R * \partial y} * t \quad (4-21)$$

- Zur Vereinfachung wurden die folgenden Ausdrücke zu Konstanten zusammengefaßt:

$$K_1 = \frac{p}{p^0 - p_R} \quad (4-22)$$

$$K_2 = \frac{A * D * M_w * p}{\vartheta_w * T * R * \partial y} \quad (4-23)$$

$$K_3 = V_{w0} - K_1 * V_{w0} - K_1 * x_2 * \ln(p^0 - p_R - p^0 * x_1 * e^{-\frac{V_{w0}}{x_2}}) \quad (4-24)$$

- Gleichung (4-21) läßt sich dann wie folgt schreiben:

$$\boxed{\frac{1}{K_2} * (V_w - K_1 * V_w - K_1 * x_2 * \ln[p^0 - p_R - p^0 * x_1 * e^{-\frac{V_w}{x_2}}] - K_3) = t} \quad (4-25)$$

Das Modell in der Form (4-25) berücksichtigt als wesentliche Einflußgrößen der Dampfdiffusionskinetik die Präzipitantenkonzentrationen im Tropfen und im Reservoir (über V_{w0} , p^0 und p_R), die Tropfengröße (über V_{w0} und A) und die Kristallisationstemperatur (T ; über p^0 und p_R). Beispiele für deren Auswirkung auf die Kinetik zeigt Abb. 4.25. Sowohl ein größerer Konzentrationsgradient als auch eine Erhöhung der Temperatur beschleunigen die Volumenreduktion. Die Temperaturabhängigkeit der RNA-Löslichkeit wird hierbei als bedeutend kleiner im Vergleich zur Temperaturabhängigkeit der Dampfdiffusionskinetik vorausgesetzt. Dagegen sinkt die Diffusionsrate mit steigender Tropfengröße im Ansatz. Die einzige Unbekannte für die Berechnung ist der Diffusionskoeffizient D , der für das jeweilige Präzipitantensystem experimentell bestimmt werden muß. Die Probe hat keinen Einfluß auf die Äquilibrierungsgeschwindigkeit (Mikol *et al.*, 1990). Bei Kristallisationen unter schwerelosen Bedingungen war aufgrund der Standzeiten zwischen Befüllung, Shuttle-Start und

Aktivierung der Reaktoren im Weltraum eine Verlangsamung des Kristallisationsprozesses erwünscht. Dieses theoretische Modell bot hier praktische Anhaltspunkte für die Beeinflussung der Kristallisationsgeschwindigkeit.

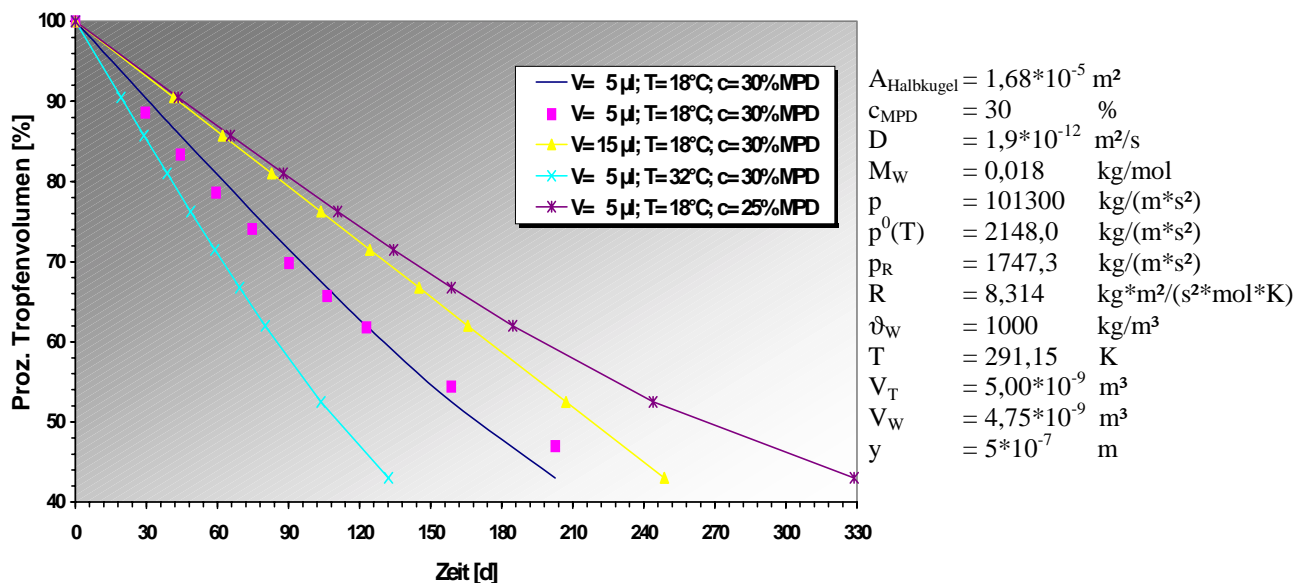


Abb. 4.25 Volumen-Zeit-Diagramm des Hängenden Tropfens. $p^0(T)$ wurde nach Mikol *et al.* (1990) und p_R nach Gleichung (4-15) berechnet; alle weiteren Werte sind Stoffkonstanten oder werden durch den Prozess definiert. Die 2. Kurve v. l. repräsentiert reale Meßwerte mit der E3-Helix im MPD-System.

4.3.5 Kristallisation der 5S rRNA Domänen B, C und E

Die Mehrzahl der erhaltenen Kristalle wuchs innerhalb weniger Tage bei 18°C in mehreren Bedingungen des RNA-MPD-Screens. Tab. 4.8 gibt eine Übersicht.

Von der Domäne B der *Thermus flavus* 5S rRNA konnte ausschließlich ein 7 bp Fragment (B1) ohne Adenylat in der Bulge-Position kristallisiert werden (Abb. 4.26). Weder die native Sequenz B2, noch strukturstabilisierende Variationen führten im RNA-MPD- oder einem anderen Screen (vergleiche Abschnitt 3.1.5) zu Kristallen. Die Idee der B3-Sequenz war es, eine Stabilisierung der RNA-Helix durch vier G:C-Basenpaare beidseitig des ungepaarten Adenylats zu erreichen, während in der B4-Sequenz je ein überhängendes 5-Bromo-Uridin am 3'-Ende inter-

Tab. 4.8 Σ Kristalle.

RNA	Ergebnis
B1	2,6 Å
B2	keine Kristalle
B3	keine Kristalle
B4	keine Kristalle
B8	3,5 Å
C1	2,2 Å
C2	keine Kristalle
C3	2,5 Å
C3 ^{Br34}	in Messung
C8	Mikrokristalle
E1	3,0 Å
E2	2,8 Å
E2 ^{Br91}	keine Diffraktion
E3	1,5 Å
E3 ^{Br79}	keine Diffraktion
E3 ^{Br84}	1,6 Å

molekulare Wechselwirkungen („*stacking*“) fördern sollte (Cruse *et al.*, 1994; Anderson *et al.*, 1996). Beide Ansätze konnten die strukturelle Verzerrung nicht kompensieren.

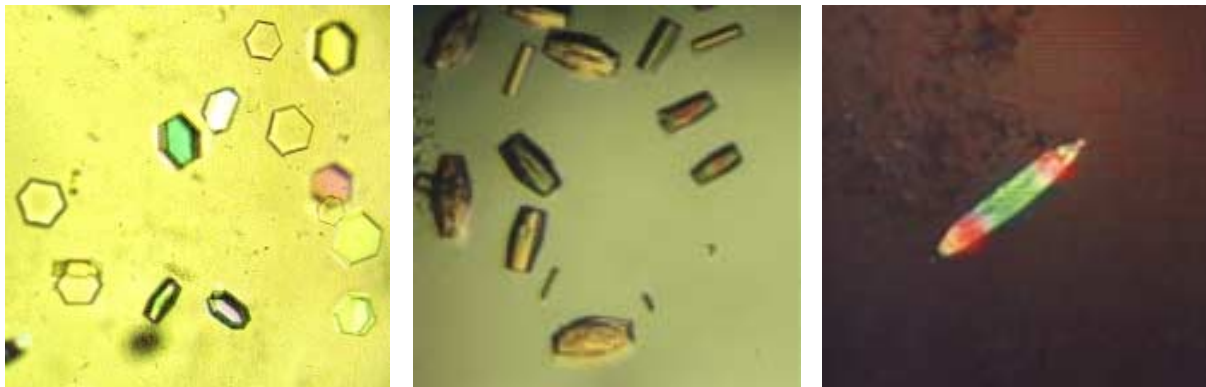


Abb. 4.26 Kristallfotos der *Thermus flavus* 5S rRNA Fragmente B1, C1 und C3 (v. l.).

In der Domäne C kristallisierte ebenfalls das 7 bp Fragment C1, nicht jedoch die native C2-Sequenz mit zwei Adenylaten im Bulge. Im Unterschied zur Domäne B führte die Addition eines weiteren G:C-Basenpaares an die Helix zum Erfolg (Abb. 4.26). Die Optimierung der C3-Kristallisationsbedingungen ist in Abb. 4.27 dargestellt. Alle Screen-Bedingungen, in denen suboptimale Kristalle gewachsen waren, wurden in ihre Einzelkomponenten aufgespalten und auf vier Ringen für Polyamin, Puffer-pH, monovalentes und divalentes Ion angeordnet (von innen nach außen). Durch Drehen der Ringe konnten beliebige neue Kombinationen erzeugt werden, die auf ihre Eignung für die C3-Kristallisation getestet wurden. Das Optimum ist markiert; die exakte Zusammensetzung gibt Tab. 4.9 wieder.

Der bei 32°C gewachsene C3-Kristall war sehr sensitiv gegenüber Umweltveränderungen, wie Temperaturschwankungen, der Cryo-Konservierung oder dem Zusatz von Schweratomen in der Mutterlösung. Aufgrund einer hohen Mosaizität des C1-Kristalls konnte dessen Struktur nicht gelöst werden, so daß auch kein Suchmodell zur

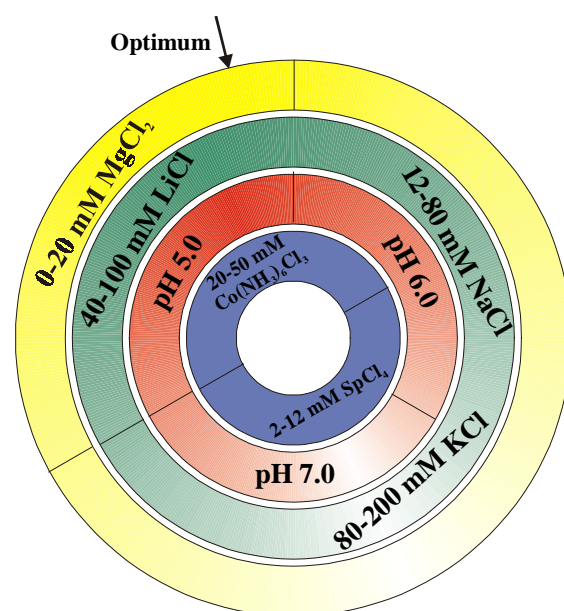


Abb. 4.27 Kristallisationsfenster der C3-Helix.

Anwendung der Methode des molekularen Ersatzes am C3-Kristall zur Verfügung stand. Darüber hinaus war fraglich, ob die C3-Kristallstruktur durch die bulge-bedingte Strukturänderung der Helix überhaupt einer Lösung über den molekularen Ersatz zugänglich ist. Aus diesem Grund wurde die Modifikation mit Schweratomen für den isomorphen Ersatz notwendig. Da weder das herkömmliche noch das neue *Cryo-Soaking* (Dauter *et al.*, 2000) stabile Kristallderivate ergaben, wurde ein 5-Bromo-Uridin während der Synthese am 3'-Ende eingebaut. Die Reproduktion des modifizierten Kristalls (RNA-MPD-Screen Nr. 59, 18°C, 6 Monate, 0.06 x 0.06 x 0.2 mm) hätte den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt.

Die 7 bp Fragmente E1 und E2 sowie das 8 bp Fragment E3, die sich jeweils nur durch ein G:C Basenpaar unterschieden, kristallisierten im RNA-MPD-Screen in verschiedenen Größen und Morphologien (Abb. 4.28).



Abb. 4.28 Kristallphotos der *Thermus flavus* 5S rRNA Fragmente E1, E2 und E3 (v. l.).

Der E3-Kristall wuchs nicht nur bis zu einer Länge von fast 1 mm ÜN, sondern erzielte auch eine hohe Auflösung von 1,5 Å. Das steht in Kontrast zu den 8 bp Helices der Domänen B und C. Die Helix B8 diffraktierte mit 3,5 Å deutlich schlechter als das 7 bp Fragment B1 (2,6 Å); die Mikrokristalle des C8-Fragments waren für eine Röntgenmessung nicht geeignet. Zur Kontrolle der Strukturlösung des 8 bp Fragments wurde eine Schweratomderivatisierung durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden sowohl die Einzelstränge als auch die hybridisierte Helix mit Quecksilber(II)-acetat chemisch modifiziert. Kristalle analoger Morphologie der nativen E3-Helix konnten nur für die prä-hybridisierte Helix erhalten werden. Jedoch zeigten sie im Röntgenbild erhebliche Alterungserscheinungen. Im zweiten Ansatz wurde deshalb ein anderes Schweratom während der chemischen Synthese eingebaut. Die kovalente Kopplung eines Bromatoms an die C5-Position von Uracil oder Cytosin stellte die Methode der Wahl dar.

Tab. 4.9 Kristallisationsdaten.

RNA-Fragment Datensatz	7 bp Helix B1	7 bp Helix C1	8 bp Helix C3 mit Bulge	7 bp Helix E1	7 bp Helix E2	8 bp Helix E3	8 bp Helix E3 mit 5-Br-C84
Sequenz	5' GCGGCGU 3' 3' CGCCGCG 5'	5' CACCCGU 3' 3' GUGGGCA 5'	5' CCAC--CCGU 3' 3' GGUGAAGCA 5'	5' CUGGGCG 3' 3' GGUCCGC 5'	5' UGGGCGG 3' 3' GUCCGCC 5'	5' CUGGGCGG 3' 3' GGUCCGCC 5'	5' CUGGG ^{Br} CGG 3' 3' GGUCC GCC 5'
RNA-Konzentration	0.5 mM	0.5 mM	0.2 mM	0.5 mM	0.5 mM	0.25 mM	0.25 mM
<u>Kristallisationslösung</u>							
pH	7.2	5.5	6.0	5.5	7.0	6.0	7.0
Puffer	40 mM Natrium-cacodylat	40 mM Natrium-cacodylat	40 mM Natrium-cacodylat	40 mM Natrium-cacodylat	40 mM Natrium-cacodylat	40 mM Natrium-cacodylat	40 mM Natrium-cacodylat
Präzipitant	10 % (v/v) MPD	10 % (v/v) MPD	10 % (v/v) MPD	10 % (v/v) MPD	10 % (v/v) MPD	10 % (v/v) MPD	10 % (v/v) MPD
Polyamin	100 mM SpCl ₄	20 mM Co(NH ₃) ₆ Cl ₃	50 mM Co(NH ₃) ₆ Cl ₃	20 mM Co(NH ₃) ₆ Cl ₃	12 mM SpCl ₄	12 mM SpCl ₄	12 mM SpCl ₄
Monovalentes Ion	80 mM NaCl	80 mM NaCl	80 mM NaCl	60 mM KCl	-	80 mM KCl	80 mM NaCl
Divalentes Ion	-	20 mM MgCl ₂	20 mM MgCl ₂	40 mM MgCl ₂	20 mM MgCl ₂ & 80 mM SrCl ₂	20 mM BaCl ₂	20 mM BaCl ₂
<u>Reservoir</u>							
pH	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Präzipitant	30 % (v/v) MPD	30 % (v/v) MPD	30 % (v/v) MPD	30 % (v/v) MPD	30 % (v/v) MPD	30 % (v/v) MPD	30 % (v/v) MPD
<u>Kristalleigenschaften</u>							
T_{Kristallisation}	18°C	18°C	32°C	18°C	18°C	18°C	18°C
Wachstumszeit [d]	2 - 3	2 - 3	3 - 4	7	1	1	30
Kristallgröße [mm] & Gestalt	0.1 x 0.1 x 0.02 Hexagonale Plättchen	0.07 x 0.07 x 0.3 Dicke Stäbchen	0.09 x 0.09 x 0.4 Konische Stäbchen	0.08 x 0.08 x 0.14 Pyramiden	0.04 x 0.04 x 0.2 Dünne Nadeln	0.05 x 0.05 x 0.8 Lange Stäbchen	0.06 x 0.06 x 0.14 Kurze Stäbchen

Tab. 4.10 Röntgendiffraktionsdaten.

Datensatz	RNA-Fragment	7 bp Helix B1	7 bp Helix C1	8 bp Helix C3 mit Bulge	7 bp Helix E1	7 bp Helix E2	8 bp Helix E3	8 bp Helix E3	8 bp Helix E3 mit 5-Br-C84
Zellaxen		a = 35.1 Å b = 35.1 Å c = 141.2 Å	a = 48.1 Å b = 48.1 Å c = 31.7 Å	a = 35.9 Å b = 35.9 Å c = 71.3 Å	a = 42.8 Å b = 39.8 Å c = 29.4 Å	a = 42.32 Å b = 42.32 Å c = 28.87 Å	a = 42.70 Å b = 42.70 Å c = 127.53 Å	a = 41.94 Å b = 41.94 Å c = 127.09 Å	a = 39.805 Å b = 39.805 Å c = 35.578 Å
Zellwinkel		α = 90.0° β = 90.0° γ = 120.0°	α = 90.0° β = 94.4° γ = 90.0°	α = 90.0° β = 90.0° γ = 90.0°	α = 90.0° β = 95.5° γ = 90.0°	α = 90.0° β = 95.6° γ = 90.0°	α = 90.0° β = 90.0° γ = 120.0°	α = 90.0° β = 90.0° γ = 120.0°	α = 90.0° β = 90.0° γ = 120.0°
Raumgruppe		P3 ₁ 21	C2	P4 ₁	C2	C2	R32	R32	P3
Volumen _{Einheitszelle}		173959.8 Å ³	73341.4 Å ³	91892.2 Å ³	50081.1 Å ³	51705.7 Å ³	232524.2 Å ³	223546.7 Å ³	48818.9 Å ³
V_M-Wert		3.0 Å ³ / Da	2.2 Å ³ / Da	2.1 Å ³ / Da	2.8 Å ³ / Da	2.72 Å ³ / Da	2.35 Å ³ / Da	2.35 Å ³ / Da	2.68 Å ³ / Da
Duplex _{RNA} je asymmetrische Einheit		2	2	2	1	1	1	1	1
Strahlungsquelle		ESRF / ID2	ESRF / ID2	DESY / X11	ESRF / ID2	DESY / X31	DESY / X31	Elettra / 5.2R	Elettra / 5.2R
Wellenlänge		1.000 Å	1.000 Å	0.9090 Å	1.000 Å	1.000 Å	1.000 Å	1.000 Å	1.000 Å
Detektor		IP 180 mm	IP 180 mm	MAR 345 180 mm	IP 180 mm	IP 180 mm	IP 180 mm	IP 180 mm	MAR 345 mm
Temperatur		100 K	100 K	100 K	100 K	100 K	100 K	100 K	100 K
Max. Auflösung		2.6 Å	2.2 Å	2.5 Å	3.0 Å	2.8 Å	2.7 Å	1.5 Å	1.6 Å
Auflösung _{Datensatz}		25 - 3.0 Å	25 - 3.1 Å	30 - 2.6 Å	20 - 2.4 Å	30.0 - 2.9 Å	30.0 - 2.8 Å	30.0 - 1.6 Å	30.0 - 1.6 Å
Gesamtzahl Reflexe		52632	9733	29993	17176	7677	8907	43171	2735
Einzelne Reflexe		2362	1433	2814	1782	1207	1249	5994	624
R_{symm}		11.3 %	10.7 %	5.4 %	9.5 %	8.7 %	7.4 %	6.6 %	4.9 %
R_{symm} letzte Schale		24.7 %	35.8 %	17.1 %	31.0 %	23.4 %	38.7 %	29.2 %	14.2 %
Vollständigkeit		97.8 %	93.0 %	99.9 %	89.4 %	99.3 %	97.2 %	96.1 %	97.8 %
Vollständigkeit _{letzte Schale}		99.6 %	84.1 %	100%	90.5 %	93.0 %	95.1 %	89.1 %	98.0 %

Die Anordnung des Bromatoms innerhalb der großen Furche kann die Konformation und Kristallpackung positiv ändern und zu einer Steigerung der Datenqualität führen (Anderson *et al.*, 1996). Die Kristallisationsbedingungen der derivatisierten Helices stimmten partiell mit denen der nativen Fragmente überein. Weder die E2^{Br91}- noch die E3^{Br79}-Kristalle zeigten eine Diffraktion. Dafür erreichte die Helix E3^{Br84} mit 1,6 Å eine der nativen Sequenz E3 analoge Auflösung (Abb. 4.29). Das unterstreicht den Einfluß der Schweratomlage auf die Kristallpackung: Der räumliche Effekt einer zentralen Bromderivatisierung kann besser innerhalb der Helix kompensiert werden als in endständiger Position.

Die optimalen Kristallisationsbedingungen und die statistischen Daten der Röntgendiffraktion sind in den Tab. 4.9 und 4.10 zusammengestellt. Entscheidend für die vorliegenden Kristallisationen waren die Additive, die auf interne Faktoren, wie Oligolänge, Basenzusammensetzung oder 3D-Struktur reagierten. Ein allgemeiner Zusammenhang bestand zwischen der Kristallgröße und dem Diffraktionsverhalten. Je länger der Kristall, desto besser war die Auflösung. Auch die Qualität der *Beamline* hatte einen großen Einfluß auf die Auflösung, wie eine exemplarische Vergleichsmessung des 8 bp Fragments E3 am DESY (2,7 Å) bzw. am ELETTRA (1,5 Å) bestätigte.

4.3.6 Kristallisation unter Mikrogravitationsbedingungen

Um die Auflösung der 5S rRNA Domänen in atomare Bereiche zu steigern, wurden im Rahmen des NASA-Shuttle-Fluges STS-95 Kristallisationsexperimente unter Bedingungen der Schwerelosigkeit durchgeführt. Für diese Experimente wurden 14 HD8-Reaktoren (*Hanging Drop*, 8 µl) am DESY befüllt. Die Bodenkontrollen verblieben bei 18°C in Hamburg, während die übrigen Reaktoren im deaktivierten Zustand zum *Kennedy Space Center* in Florida (USA) geflogen wurden. Die Kristallisationszeit nach der Aktivierung im Weltraum betrug 7,5 Tage. Vor der Shuttle-Landung erfolgte die erneute Deaktivierung der Reaktoren. Die Kristalle wurden in Mutterlösung (mit 25 % MPD) geerntet und in flüssigem Stickstoff für den Rücktransport tiefgekühlt.

Für die 7 bp Helix B1 konnte eine Vielzahl kleiner hexagonaler Plättchen erhalten werden; von der 8 bp Helix E3 waren einige dünne Kristalle gewachsen. (Tab. 4.11). Aufgrund der zu geringen Größe und Dicke waren die E3-Kristalle für die Röntgendiffraktion nicht geeignet.



Abb. 4.29 Kristallphoto E3^{Br84}. Nukleotid 84 der 8 bp Helix ist 5-Bromo-Cytidin.

Der beste Kristall der B1-Helix erzielte dagegen eine Auflösung von 3,0 Å (Abb. 4.30). Der Vergleich mit den Kristallen der Bodenkontrolle, die maximal 4,0 Å erreichten, unterstrich den positiven Einfluß der Mikrogravitation auf das Kristallwachstum und das Diffraktionsverhalten.

Tab. 4.11 Kristallisation und Diffraktion von RNA-Helices bei der STS-95.

RNA	Reaktor	RNA-MPD-Screen	Reservoir	Ort	Ergebnis
B1	105	Nr. 10 (5 % MPD)	20 % MPD	Weltall	3,0 Å
B1	135	Nr. 10 (5 % MPD)	20 % MPD	Boden	4,0 Å
B1	120	Nr. 10 (10 % MPD)	30 % MPD	Weltall	3,5 Å
B1	110	Nr. 10 (10 % MPD)	30 % MPD	Boden	5,0 Å
B1	144	Nr. 20 (10 % MPD)	30 % MPD	Weltall	3,3 Å
B1	132	Nr. 20 (10 % MPD)	30 % MPD	Boden	Keine Kristalle

E3	134	Nr. 20 (5 % MPD)	20 % MPD	Weltall	Keine Kristalle
E3	142	Nr. 20 (5 % MPD)	20 % MPD	Boden	Keine Diffraktion
E3	164	Nr. 20 (10 % MPD)	30 % MPD	Weltall	Keine Kristalle
E3	138	Nr. 20 (10 % MPD)	30 % MPD	Boden	Keine Diffraktion
E3	149	Nr. 21 (10 % MPD)	30 % MPD	Weltall	Keine Diffraktion
E3	245	Nr. 21 (10 % MPD)	30 % MPD	Boden	Keine Diffraktion
E3	250	Nr. 10 (10 % MPD)	30 % MPD	Weltall	Keine Diffraktion
E3	247	Nr. 10 (10 % MPD)	30 % MPD	Boden	Keine Diffraktion

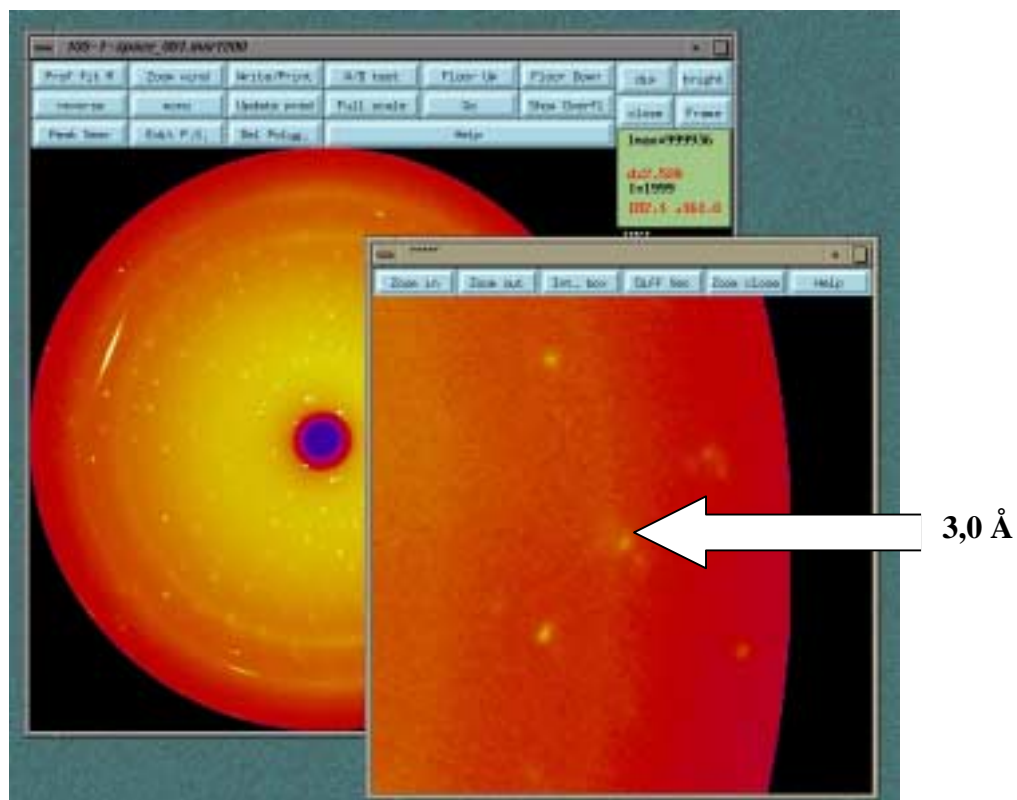


Abb. 4.30 Diffraktionsbild des Weltraumkristalls B1 aus dem Reaktor 105.

Für das schlechtere Ergebnis gegenüber den vorangegangenen Experimenten (2,6 Å, vergleiche Tab. 4.8) kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Zum einen differierte die Intensität der Strahlungsquellen am ESRF (ID2) bzw. DESY (X11). Zum anderen ließ die gelartige Konsistenz der Lösung in den Reaktoren auf eine zu große Verringerung des Tropfenvolumens schließen, die nicht mit der theoretischen Kinetik korrelierte. Bei einer Überprüfung der Dichtigkeit wiesen selbst die deaktivierten Reaktoren einen Volumenverlust auf, so daß von einem Kriechen der Flüssigkeit zwischen Kolben und Glaswand mit nachfolgend unkontrollierter Diffusion ausgegangen werden mußte (Tab. 4.12).

Tab. 4.12 Volumenverringerung in HD8-Reaktoren.

RNA	Reaktor	RNA-MPD-Screen	Reservoir	Status	$V_{T\ 1\ Tag} [\mu l]$	$V_{T\ 11\ Tage} [\mu l]$
B1	135	Nr. 10 (5 % MPD)	20 % MPD	deaktiviert	7,6	6,5
E3	245	Nr. 20 (5 % MPD)	20 % MPD	aktiviert	6,0	1,4
B1	110	Nr. 10 (10 % MPD)	30 % MPD	deaktiviert	7,1	6,1
E3	142	Nr. 10 (10 % MPD)	30 % MPD	aktiviert	2,9	2,6
B1	132	Nr. 20 (10 % MPD)	30 % MPD	deaktiviert	7,7	7,7
E3	247	Nr. 20 (10 % MPD)	30 % MPD	aktiviert	2,9	2,7

4.3.7 Strukturelle Eigenschaften des 8 bp Fragments der Domäne E

Die Struktur der Helix E3 wurde mit der Methode des molekularen Ersatzes gelöst. Als Suchmodell diente das synthetische Oligoribonukleotid r[U(UA)₆A]₂. Das Prinzip der Methode ist die Bestimmung von Rotations- und Translationsfunktionen, die die ortsunabhängigen Pattersonräume von Modell- und Zielstruktur zur Deckung bringen. Der Pattersonraum repräsentiert einen Vektorraum, der aus den Strukturfaktoramplituden berechnet wird. Die helikale RNA-Struktur entspricht dem A-Typ. Die wesentlichen Charakteristika sind ein relativ weiter Helixdurchmesser, die rechtsgängige Verwindung, eine *anti*-Konformation der glycosidischen Bindung, 11 bp pro Helixwindung sowie eine 19°-Neigung der Basenpaare zur Helixachse (*C*_{3'}-*endo*-Zuckerkonformation). Daraus resultieren eine enge & tiefe große Furche und eine breite & flache kleine Furche. Abb. 4.31 zeigt die kompakte Füllung der Helix E3 mit 47 Wassermolekülen entlang der großen Furche. Insbesondere die Sauerstoffatome der Phosphatgruppen und die 2'-Hydroxylgruppen sind stark hydratisiert. Die 2'-Hydroxylgruppen bilden direkte und wasservermittelte Kontakte innerhalb der Helix aus, und sie sind ebenfalls in intermolekulare Wechselwirkungen involviert. Dieses strukturierte Netz an Wasserstoffbrücken ist für den Erhalt der dreidimensionalen RNA-Struktur verantwortlich.

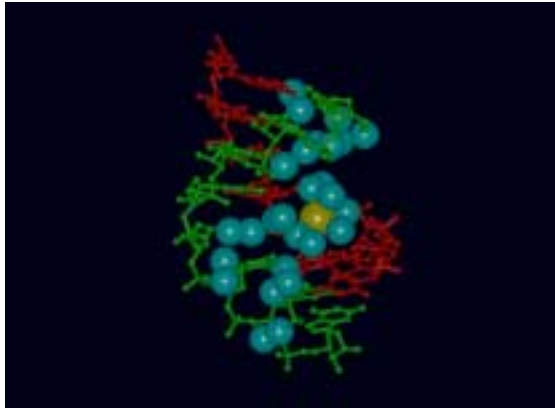


Abb. 4.31 Struktur der E3-Helix mit 1,5 Å Auflösung. Die antiparallelen RNA-Stränge sind grün und rot dargestellt; die Wassermoleküle erscheinen blau. Innerhalb einer Tasche der großen Furche des 8 bp Fragments konnte außerdem eine Ionenbindungsstelle für ein Ba^{2+} -Ion aus der Kristallisationslösung lokalisiert werden (gelb).

Der häufigste und stabilste *Mismatch* in der ribosomalen 5S RNA ist die Tandemformation von G:U-Wobble-Basenpaaren (Wu *et al.*, 1995). Durch den Austausch der exozyklischen 4-Aminogruppe des Cytosins gegen ein Sauerstoffatom am Uridin ist das G:U-Basenpaar über zwei neue Wasserstoffbrückenbindungen verbunden (GUA N1 – URI O2, GUA O6 – URI N3). Dieser *Mismatch* wird durch drei strukturelle Wassermoleküle stabilisiert. Sie stellen ein Netzwerk an Wasserstoffbrücken zwischen den Basen her, das die fehlende dritte Wasserstoffbrückenbindung einer G:C-Basenpaarung kompensiert (Abb. 4.32).

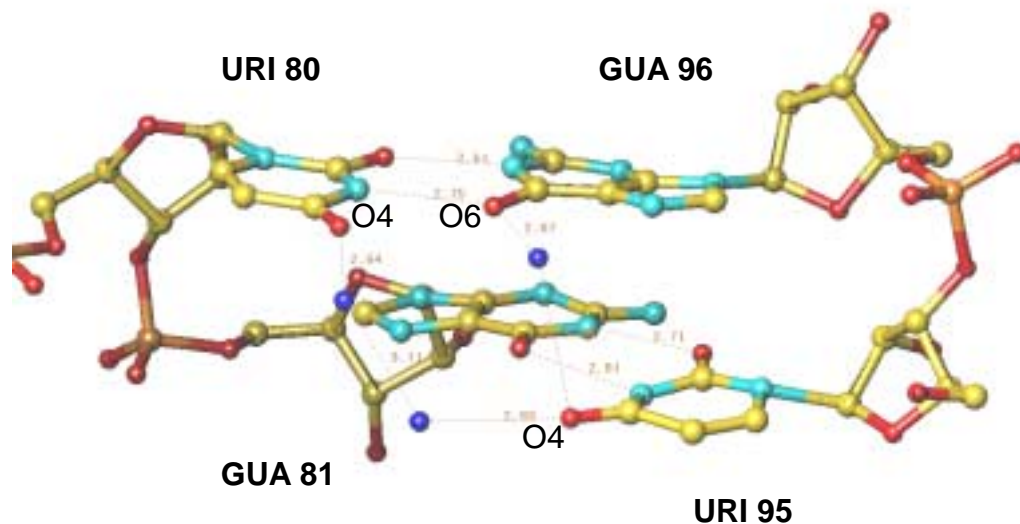


Abb. 4.32 G:U-Wobble-Basenpaare und Wassermoleküle (blau) in der RNA-Helix E3.

Sehr gut ist in Abb. 4.32 der sogenannte „*cross-strand G stack*“ zu erkennen, d. h. die Stapelung der beiden Guanine aus den entgegengesetzten Strängen. Dieses Motiv kehrt mit einer r.m.s.-Abweichung von 0,54 Å in der Domäne A der *Thermus flavus* 5S rRNA wieder (Perbandt *et al.*, 1999). Des weiteren sind die Strukturen der G:U-Basenpaare in den

Domänen E der 5S rRNAs aus *Th. flavus* und *E. coli* identisch (Dallas & Moore, 1997). Somit kann dieses Motiv als strukturell konserviert angesehen werden.

Als weitere Besonderheit enthält die RNA-Duplex der Domäne E ein ungewöhnliches G:C-Basenpaar in nicht-Watson-Crick-Formation. Anstelle der erwarteten drei Wasserstoffbrücken (GUA N2 – CYT O2, GUA N1 – CYT N3, GUA O6 – CYT N4) wurden für das Basenpaar GUA92:CYT84 zwei neue Verknüpfungen gefunden (GUA N1 – CYT O2, GUA O6 – CYT N3), die dem oben beschriebenen G:U-Wobble ähneln. Die Struktur wird zusätzlich durch benachbarte Wassermoleküle (z. B. am CYT N4) oder durch intermolekulare RNA-RNA-Wechselwirkungen stabilisiert. Eine Wasserstoffbrücke verbindet GUA N2 mit der 2'-Hydroxylgruppe des benachbarten Guanosins 83 (Abb. 4.33). Diese neue Konformation läßt sich entweder durch eine Amino-Imino-Tautomerie des Cytosins oder durch eine zusätzliche Protonierung des CYT N3-Atoms erklären.

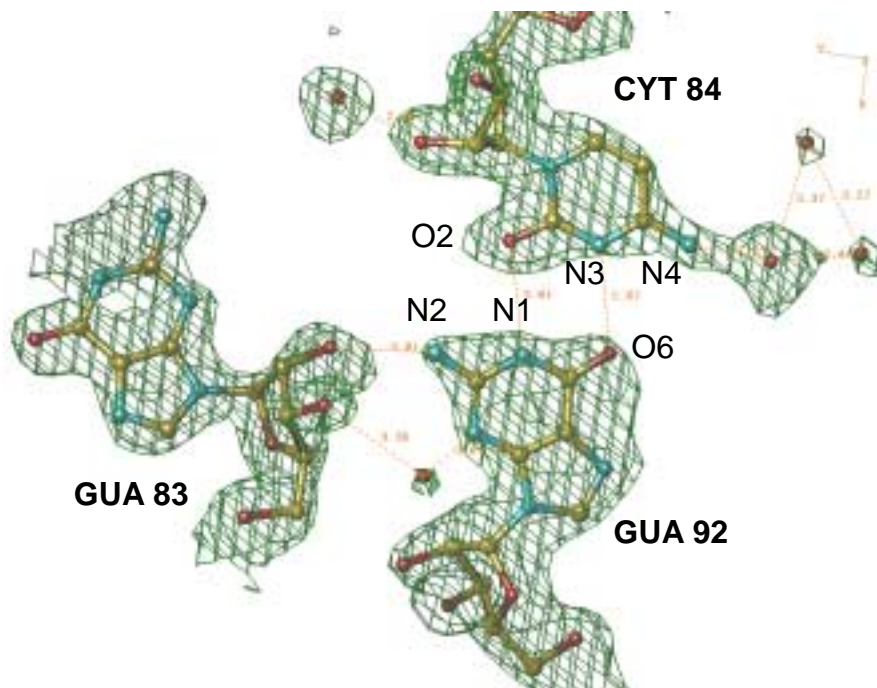


Abb. 4.33 GUA92:CYT84 Basenpaar in wobble-ähnlicher Anordnung.