

## 5. DISKUSSION

### 5.1 RNA-Kristallisation

Aufgrund der Komplexität biologischer Makromoleküle stellt die Röntgenstrukturanalyse die geeignetste Methode zur Strukturaufklärung dar. Unabdingbare Voraussetzung für die Anwendung der Methode sind nicht nur Kristalle – sondern Kristalle, die gut diffraktieren. In den seltensten Fällen führt die Kristallisation im ersten Ansatz zu wohlgestalteten, hochauflösenden Kristallen, die biochemische Einblicke erlauben. Stattdessen sind die folgenden sieben Phänomene zu beobachten:

(1) keine Kristalle, (2) Mikrokristalle, (3) kleine Kristalle, (4) *Twin*-Kristalle, (5) Aggregate, (6) nicht reproduzierbares Kristallwachstum oder (7) Kristalle mit schlechter Diffraktion.

Diese Phänomene traten auch bei der ribosomalen 5S RNA auf. Die Isolierung und Kristallisationsanalyse nativer 5S rRNAs aus einer Vielzahl pro- und eukaryotischer Organismen und die nachfolgende Verbesserung der Kristallisationsbedingungen für die *Thermus flavus* Variante führte zu einem morphologisch ansprechenden, kompakten Kristall. Die Diffraktion im hochenergetischen Synchrotronstrahl endete jedoch bei einer geringen Auflösung von 7,4 Å (Phänomen 7), die sich aus dem Sekundärstrukturmodell mit einer intrinsischen Flexibilität des Moleküls erklärt. Aufgrund der in Rekonstitutionsexperimenten nachgewiesenen hohen Konservierung der dreidimensionalen Struktur der 5S rRNA lag die Vermutung nahe, daß das mangelnde Diffraktionsverhalten auf alle nativen 5S rRNA-Moleküle zutrifft. Eine Verbesserung im Zuge einer ausschließlichen Optimierung des Kristallisationsfensters war damit nicht zu erwarten. Die potentiell geringe Breite des Kristallisationsfensters unterstreichen Ansätze verschiedener nativer 5S rRNAs pflanzlichen Ursprungs mit minimalen Sequenzunterschieden von ein bis zwei Nukleotiden, die nur in einer einzigen Bedingung und für ausschließlich einen Wildtyp (*mung bean*) kleine Kristalle ergaben (persönliche Mitteilung: Prof. Dr. Jan Barciszewski, Universität Poznan).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb ein strukturelles Design des 5S rRNA-Moleküls untersucht, dessen Herausforderung in der Erhöhung der Kristallisierbarkeit bei Erhalt der biochemischen Aktivität bestand. Einen neuartigen Ansatz bot ein hochkonserviertes Tetraloop/Tetraloop-Rezeptor-Motiv aus katalytischen RNAs, das sich durch eine geringe Größe und eine bestehende Funktionalität auch außerhalb des ursprünglichen Kontexts auszeichnet (Ferré-D'Amaré *et al.*, 1998). Die Anwendung als Kristallisationsmodul stellt

einen „*trial and error*“-Prozeß dar, der dazu dient, jenes Konstrukt zu finden, das durch intensive, intermolekulare Kontakte zu geordneten Kristallen führt. Die Klonierung mehrerer Konstrukte, die Tetraloop und Rezeptor in verschiedenen Positionen und Orientierungen tragen, war für die 5S rRNA begrenzt. Bereits die kleinste zu realisierende Sequenzvariation, welche die TL/TR-5S rRNA (Abb. 4.1c) durch die Rezeptor-Insertion im Bereich der Domäne B verkörperte, ging mit einem partiellen Verlust der RNA-Bindung an das ribosomale Protein TflL18 einher. Da biochemische und strukturelle Studien auf die essentielle Bedeutung der 5S rRNA für die strukturelle Integrität des Ribosoms hinweisen (Khaitovich & Mankin, 1999; Ban *et al.*, 2000), ist von einer weitgehenden Abdeckung der relativ kleinen RNA mit ribosomalen Proteinen auszugehen. RNA-Mutationen führen mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Verlust der Bindung eines oder mehrerer Proteine. Die nicht erfolgte Verbesserung der 5S rNA-Kristallisation korreliert mit der Statistik des Moduls. Maximal 50 % der Konstrukte kristallisierten bei Ferré-D'Amaré *et al.* (1998), von denen wiederum nur 8 % eine hinreichende Auflösung von bis zu 3,5 Å erzielten.

Eine weitere Strukturvariante beinhaltete eine Deletion der Domäne C. Die Idee war, die Beweglichkeit des Gelenkarms der 5S rNA zu unterbinden. Die kreiselförmigen Kristalle, die u. a. in der MPD-haltigen Screen-Bedingung Nr. 33 (Scott *et al.*, 1995) innerhalb von fünf Monaten bei 18°C wuchsen, konnten aufgrund des zeitlichen Rahmens nicht reproduziert und vermessen werden (Phänomen 6). Des Weiteren war der erwartete vollständige Verlust des TflL18-Bindungsvermögens eingetreten.

Auch ein *helix engineering* an beiden Mutanten, bei dem verschiedene 3'-Enden durch diverse Restriktionsenzyme und *run-off* Transkription erzeugt wurden, führte zu keinen dem Wildtyp vergleichbaren Kristallen. Offensichtlich verkörperte die im Verlauf der Evolution optimierte Struktur des Wildtyps die stabilste Form der nackten 5S rNA. Deren Kristallwachstum konnte in mehreren Bedingungen der *Sparse Matrix* von Scott *et al.* (1995) reproduziert und damit ein negativer Effekt der *in-vitro* Transkription oder Aufreinigung ausgeschlossen werden.

Die Simulation der natürlichen RNA-Umgebung in der Zelle schließt Bindungspartner ein, deren Interaktionen die RNA-Struktur beeinflussen. Während dieser Einfluß aufgrund ihrer Transportfunktion bei tRNAs kaum ausgeprägt ist (Perona *et al.*, 1991), wurde eine kompaktere 5S rNA-Struktur im Ribosom gegenüber der ungebundenen Form beobachtet (Funari *et al.*, 2000). Folgerichtig stabilisierte die Komplexierung der flexiblen Gelenkverbindungen der Domäne B durch das ribosomale Bindungsprotein TflL18 den *Th. flavus* 5S rNA Wildtyp, so daß ein regelmäßiger, voluminöser Kristall gezüchtet wurde. Diese

Strategie der Kokristallisation erwies sich bereits in anderen Fällen als erfolgreich, wie z. B. bei einem Komplex aus der RNA-bindenden Domäne des ribosomalen Proteins BstL11 und einem 58 nt Fragment der *E. coli* 23S rRNA (Conn *et al.*, 1999) oder im großen Rahmen am gesamten *Th. thermophilus* Ribosom (Yusupov *et al.*, 2001). Bedingt durch eine wiederum sehr lange Inkubationszeit von 3,5 Monaten lagen die Reproduzierbarkeit des Wachstums und die Datensammlung des Komplexkristalls nicht mehr im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit. Beschleunigende Kristallisationsexperimente im Temperaturgradienten sowie mit erhöhten Präzipitantkonzentrationen im Reservoir führten nicht zu Kristallen. In Abhängigkeit vom Diffraktionsergebnis ist weiterhin ein *protein engineering* denkbar, das eine Mutation von nicht-bindenden Seitenketten, die in die Kristallpackung involviert sind, umfaßt (Oubridge *et al.*, 1995).

## 5.2 Kristallisation von Oligoribonukleotiden

In den vergangenen Jahren ist ein sprunghafter Anstieg publizierter Kristallisationsdaten und Strukturen von kurzen Oligoribonukleotid-Helices zu verzeichnen (Lorenz *et al.*, 1993; Cruse *et al.*, 1994; Schindelin *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1996; Ott *et al.*, 1996; Biswas *et al.*, 1997; Förster *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 1999). Ein wesentlicher Grund dürfte in methodischen Verbesserungen der chemischen RNA-Synthese liegen, die heutzutage die Produktion von 50-mer Oligoribonukleotiden ermöglicht, die sich durch Homogenität und große Ausbeuten auszeichnen. Ein zweiter Grund für das gestiegene Interesse an kleinen RNA-Molekülen ergibt sich aus zwei Beobachtungen: Zum einen erhöhen sich mit abnehmender Kettenlänge die Kristallisationswahrscheinlichkeit und die Diffraktionsqualität (Berman *et al.*, 1996). Zum anderen war die Struktur der *E. coli* Domäne E als integraler Bestandteil der intakten 5S rRNA identisch mit der isolierten Domänenstruktur (Grüne *et al.*, 1996b). Auf diesen Beobachtungen basiert der Ansatz, über die Lösung von Partialstrukturen große Molekülstrukturen zu konstruieren. Voraussetzung ist die Kenntnis der Sekundärstruktur für eine sinnvolle Domänenendefinition.

Diese Strategie wurde auch auf die *Th. flavus* 5S rRNA angewandt. Anknüpfend an vielversprechende Ergebnisse bei den Domänen A und E (Betzel *et al.*, 1994; Perbandt *et al.*, 1998) lagen die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit auf der Kristallisation der Domänen B und C sowie auf der Optimierung der Auflösung für die Domäne E. Dabei konnte auf verschiedene *Sparse Matrix Screens* zurückgegriffen werden, die passend für die Kristallisation von Oligonukleotiden entwickelt wurden (Doudna *et al.*, 1993; Scott *et al.*, 1995; Berger

*et al.*, 1996). Sie erlauben ein schnelles Durchmusterung empirisch bewährter Bedingungen, beinhalten jedoch aufgrund der Unvollständigkeit das Risiko, das Kristallisationsfenster nicht zu treffen.

Die systematische Analyse der Kristallisation auf MPD-Basis anhand einer Vielzahl von 5S rRNA-Fragmenten unterstrich nicht nur die kristallisationsfördernden Eigenschaften von Kobalthexaminchlorid, sondern auch die Bedeutung der richtigen Ionenkombinationen. Sie konnten in sechs Bedingungen zusammengefaßt werden, die für das Vorscreenen kleiner RNA-Moleküle auf ihr Kristallisationspotential geeignet sind (vergleiche Abb. 4.24).

Während der helikale Bereich der Domäne E gegenüber einer Veränderung der Bedingungen sehr resistent war und eine Vielzahl morphologisch identischer Kristalle ergab, führten die Bulge-Nukleotide in der Domäne C zu einer signifikanten Verkleinerung des Kristallisationsfensters. Erst im Zuge einer Sequenzstabilisierung wurden *Twin*-Kristalle erhalten (Phänomen 4, siehe Abschnitt 5.1), die durch eine systematische Veränderung der Kristallisationsbedingungen zum isomorphen Einkristall optimiert werden konnten.

Zwei grundsätzliche Möglichkeiten der Sequenzvariation sind repetitive G:C-Basenpaare beidseitig der Bulge-Struktur, die intramolekular eine Unterbindung der helikalen Aufweitung und Molekülbeweglichkeit bewirken sollen, sowie 3'-Überhänge (wie 5-Bromo-Uridin), die eine intermolekulare Stapelung induzieren können. Während beide Strategien für die C-Helix erfolgreich verliefen, kristallisierte die B-Helix nicht mit einem singulären Bulge-Adenylat (Phänomen 1). Für das Bulge-Nukleotid bestand die Möglichkeit der Interkalation in die Helix oder einer Verlagerung nach außen. Interkaliert die Base, ist ein Abknicken der Helix die Folge. Der Krümmungswinkel hängt hierbei von der Art und Anzahl der Basen im Bulge ab (12,1-15,5° je ADE). Mit der Konformationsänderung ist eine Schwächung benachbarter Basenpaare und eine flexiblere Struktur verbunden (Lilley, 1995). Eine nach außen gewölbte Base kann zusätzlich in Wechselwirkung mit anderen Molekülen treten. Eine potentielle Kontaktstelle wäre die kleinen Furche, wobei insbesondere die Art der Base (Purin oder Pyrimidin) für die Interaktion und die Stabilität entscheidend ist. Im Fall der B-Helix wurde die Kristallpackung durch einen dieser beiden Effekte nachhaltig gestört.

Eine weitere Optimierung des Kristallwachstums ausgewählter RNAs wurde unter Mikrogravitationsbedingungen durchgeführt. Durch Reduktion der Konvektionsströme sowie der Sedimentation von Kristallisationskeimen in der Schwerelosigkeit werden ein gleichmäßiger Kristallaufbau und eine höhere Packungsdichte unterstützt (Erdmann *et al.*, 1989). Morphologisch zeigt sich die fehlende Gravitation in einem gleichmäßigen Kristallwachstum in allen drei Raumrichtungen gegenüber einem linearen Wachstum am Boden, das

vorzugsweise nadelförmige Kristalle ergibt. Obwohl nur 60 % aller NASA-Weltraumproben diffraktierende Kristalle ergaben, erzielten 37 % eine bessere Auflösung, als sie jemals in Bodenexperimenten gemessen wurde (<http://crystal.nasa.gov>). Diese Zahlenwerte verdeutlichen einerseits das Potential der Kristallisation unter Mikrogravitationsbedingungen, andererseits die Schwierigkeiten, die richtigen Einstellungen für die Kristallisation in den Weltraumreaktoren zu finden. Neben der chemischen Komposition der Kristallisationslösung spielen hier insbesondere die veränderten physikalischen Parameter eine Rolle, wie Tropfengröße, Abstand des Tropfens zum Reservoir, Diffusionsprozesse durch das reservoir-aufnehmende Polymer, Standzeiten zwischen Reaktorbefüllung und Aktivierung oder mechanische Erschütterungen bei Start und Landung.

Der Vergleich der Weltraumkristalle mit den Bodenkontrollen am Beispiel der B-Helix sprach mit maximalen Auflösungen von 3,0 Å zu 4,0 Å für das Weltraumexperiment. Die nicht erreichte Steigerung der Datenqualität, bezogen auf den besten vorherigen Bodenmeßwert von 2,6 Å, war auf Hardwareprobleme, unterschiedliche *Beamline*-Intensitäten und eine u. U. suboptimale Abstimmung der Kristallisationsbedingungen im HD8-Reaktor zurückzuführen.

### 5.3 RNA-Struktur motive

Die Regeln der RNA-Faltung und der RNA-Konformation stellen wichtige Merkmale dar, die die RNA-Struktur und ihre Funktion definieren. Die feste Kristallpackung des 8 bp Fragments der Domäne E und ein niedriger Solventanteil von 37 % resultierten in einer ausgezeichneten Auflösung von 1,5 Å, die eine detaillierte Analyse spezieller Struktur motive ermöglichte.

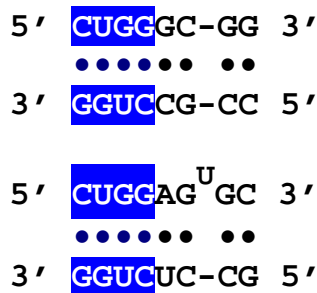
Wie bereits von Betzel *et al.* (1994) am Beispiel der *Th. flavus* 5S rRNA Domäne A gezeigt, besitzen auch in der Domäne E Wassermoleküle eine essentielle Bedeutung für die RNA-Struktur. Das Verhältnis Wassermoleküle zu Nukleinsäureatome beträgt in der E3-Helix 80 zu 343. Zusätzlich wurde eine stabilisierende Wechselwirkung der RNA-Helix mit einem Ba<sup>2+</sup>-Ion beobachtet, das eine oktahedrale Koordinationsgeometrie aufweist. Drei von sechs Koordinationsstellen sind zwei Purine; die verbleibenden drei sind mit Wassermolekülen aus der großen Furche belegt (Perbandt *et al.*, 2001).

Die G:U-Wobble-Basenpaare in Tandemformation werden in der E-Helix durch strukturelle Wassermoleküle stabilisiert. Diese Konformation korrespondierte nicht nur mit dem G:U-Motiv in der Domäne A der *Th. flavus* 5S rRNA (Betzel *et al.*, 1994), sondern ihre hohe Konservierung wurde auch in Kristallstrukturen der *E. coli* 5S rRNA Domäne E bestätigt

(Correll *et al.*, 1997a). Darüber hinaus tritt dieses Hydrationsmuster in anderen RNA-Strukturen, z. B. von mRNAs, auf (Biswas *et al.*, 1997) und ist sogar dem einzelner G:U-Basenpaare, wie im Akzeptor-Stamm der <sup>Ala</sup>tRNA (Müller *et al.*, 1999), vergleichbar. Die strukturelle Bedeutung eines G:U-Wobble-Basenpaares ist von Musier-Forsyth *et al.* (1995) am Beispiel der Aminoacylierung gezeigt worden. Die ungepaarte exozyklische 2-Amino-Gruppe des Guanosins ist essentiell für die Erkennung der <sup>Ala</sup>tRNA durch die korrespondierende Aminoacyl-tRNA-Synthetase und die nachfolgende Beladung mit der Aminosäure. Obwohl im Fall der bakteriellen 5S rRNA Domäne E die G:U-Wobble-Basenpaare Bestandteil der Konsensussequenz sind (Leontis & Westhof, 1998), konnte keine absolute Notwendigkeit für die Wechselwirkung mit dem ribosomalen Bindungsprotein L25 nachgewiesen werden (Stoldt *et al.*, 1999; Lu & Steitz, 2000).

Die E3-Kristallstruktur enthält das ungewöhnliche G92:C84-Basenpaar in einer wobble-ähnlichen Konformation. Die Existenz von nur zwei, neuartigen Wasserstoffbrücken kann durch eine Amino-Imino-Tautomerie des Cytosins oder durch die Protonierung des N3-Atoms begründet sein. In beiden Fällen wird aufgrund des fehlenden H-Akzeptors die klassische Watson-Crick-Wasserstoffbrücke GUA N1 – CYT N3 blockiert, was eine Drehung des Cytosins in die neue Konformation zur Folge hat. Während das Auftreten der Iminoform in der Literatur als wenig wahrscheinlich eingeschätzt wird (Saenger, 1987), sind protonierte Cytosine bereits in einem anderen Kontext – bei der Ausbildung von Triple-Helices linearer DNA-Moleküle – beobachtet worden (Leitner *et al.*, 1998). Der leicht saure pH-Wert des verwendeten Kristallisationspuffers könnte die Protonierung begünstigen. Weitere, eigene Versuche sollten eine detaillierte Erklärung bringen: Zum einen wurden die Kristallisationsbedingungen optimiert, um Kristalle höherer Packungsdichten und mit atomaren Auflösungen zu züchten. Das erreichte Maximum, die Auflösungsgrenze, lag bei 1,5 Å. Zum anderen wurde die E3-Helix mit Brom modifiziert und kristallisiert, um über diese strukturelle Variation und den Ansatz des isomorphen Ersatzes u. U. ein genaueres Strukturbild zu erhalten. Der derivatisierte Kristall war im neutralen pH-Bereich gewachsen, der einer externen Protonierung entgegenwirkt. Die maximale Auflösung betrug 1,6 Å. In der Elektronendichtekarte konnte das kovalent gebundene Brom-Atom in der C5-Position des Cytosins 84 lokalisiert werden. Neue Erkenntnisse werden aus der Strukturverfeinerung erwartet. Die Antwort, ob es sich bei diesem erstmalig enthüllten G:C<sup>+</sup>-Basenpaar um ein neues Faltungs- oder Erkennungsmotiv in RNA handelt oder ob die Konformationsänderung ausschließlich durch intermolekulare Wechselwirkungen in der Kristallpackung induziert wird, bleibt künftigen Forschungen an anderen RNA-Strukturen vorbehalten.

Ein Vergleich der diskutierten strukturellen Merkmale in den 5S rRNA Helices E von *Th. flavus* und *H. marismortui* (Ban *et al.*, 2000) ist aufgrund einer partiellen Übereinstimmung bezüglich Basenpaarung und Sequenz nur bedingt möglich (Abb. 5.1). So gestaltet sich durch die artspezifische Variabilität auch die angedachte Übertragung der Ribosomenstruktur von *H. marismortui* auf *E. coli* sehr schwierig (Brimacombe, 2000).



**Abb. 5.1** Sequenzen der ribosomalen 5S RNA Helix E von *Thermus flavus* (oben) und *Haloarcula marismortui* (unten) - entnommen aus der 5S rRNA-Datenbank (Szymanski *et al.*, 1999). Die homologen Bereiche sind markiert.

Insbesondere das ungepaarte Uridin innerhalb der *H. marismortui* Helix E verursacht eine strukturelle Flexibilität. Ein ähnlicher, mobiler Effekt konnte bereits in der *Th. flavus* Domäne E anhand des Tetraloops beobachtet werden: Die Hairpin-Loops der Moleküle A und B in der asymmetrischen Einheit wurden als hochbeweglich und nicht identisch charakterisiert (Perbandt *et al.*, 1998). Die direkte Nachbarschaft des Bulge-Nukleotids in *H. marismortui* zum ungewöhnlichen G:C<sup>+</sup>-Basenpaar aus *Th. flavus* übt insbesondere einen Einfluß auf dessen Konformation aus, so daß die beiden dreidimensionalen Strukturen differieren. Aufgrund der Datenmenge stehen atomare Auswertungen der Ribosomenstruktur noch aus. Wassermoleküle sind den hinterlegten Koordinaten nicht beigefügt.

Welche Relevanz haben diese Partialstrukturen für das dreidimensionale Bild der 5S rRNA? In Kleinwinkelstreuungsexperimenten (SAXS) mit der freien *Th. flavus* 5S rRNA in Lösung konnte ihre Gestalt mit einer Auflösung von 13 Å erhalten werden (Funari *et al.*, 2000). Das Modell besteht aus zwei langen Helices, den Domänen B–C sowie D–E, und einer kurzen Helix, der Domäne A, wobei A–D–E eine gekrümmte, zusammenhängende Helix darstellen. Diese Struktur kann als Äquivalent einer NMR-Struktur betrachtet werden. Basierend auf der Beobachtung identischer struktureller Konformationen der Domäne E im isolierten Zustand und im 5S rRNA-Kontext (Grüne *et al.*, 1996b) wurden die bekannten Atommodelle der 5S rRNA Domänen erfolgreich in die neue SAXS-Gestalt integriert (Funari *et al.*, 2000). Im Ergebnis entstand ein vorläufiges Modell der gesamten 5S rRNA. Es zeigt keine tertiäre Interaktion zwischen den Domänen C und E (A-Form der 5S rRNA; Grüne *et al.*, 1996b) und beweist damit die Hypothese der intrinsischen Flexibilität. Erst die Bindung des ribosomalen

Proteins L25 führte zu einer Annäherung der o. g. Domänen (B-Form der 5S rRNA) und einer kompakteren 5S rRNA-Struktur (Svergun & Nierhaus, 2000).

## 5.4 *in-vitro* Transkription und RNA-Prozessierung

Aufgrund der Kettenlänge der 5S rRNA und dem hohen RNA-Bedarf für die Kristallisation kam anstatt einer chemische Synthese die *in-vitro* Transkription zur Anwendung. Für die Maximierung der Transkriptausbete wurden Bakteriophagen-RNA-Polymerasen sowie die *Th. thermophilus* RNA-Polymerase in verschiedenen Reaktionssystemen eingesetzt. Als prozesslimitierende Schritte waren zu Beginn der Transkription die Reaktion (Initiation) und mit fortschreitender Zeit infolge Eduktmangels die Diffusion anzusehen. Die biochemische und verfahrenstechnische Optimierung beider Parameter ergab eine 15-fache Steigerung des Transkriptionsfaktors, bezogen auf die niedrigste (T7\_QprecB\_GG1/*Msl* I) und die höchste RNA-Ausbeute (T7\_C-Del/*Sma* I). Im Ergebnis konnten bis zu 1350 5S rRNA-Kopien je DNA-Template synthetisiert werden, was einer Produktkonzentration von 3,9 mg/ml RNA im Reaktionsansatz entsprach. Dieser Wert lag im oberen Drittel der Literaturangaben (Promega Technical Bulletin No. 166).

Ein Problem der *in-vitro* Transkription mit Bakteriophagen-RNA-Polymerasen ist die template-unabhängige Addition eines bis mehrerer Nukleotide an das 3'-Ende des Transkripts (Milligan *et al.*, 1987). Die daraus resultierende Endheterogenität kann in ausgewählten RNA-Anwendungen störend wirken, wie bei der *in-vitro* Beladung von tRNAs mit der korrespondierenden Aminosäure oder beim homogenen Kristallwachstum. Das ist im Fall der Kristallisation aber nicht zu verallgemeinern, denn in der Literatur wurden sowohl Beispiele der fraktionierten Kristallisation beschrieben (Ferré-D'Amaré *et al.*, 1998) als auch die Notwendigkeit der Aufreinigung einer homogenen Molekülspezies betont, die einen verzerrungsfreien, gleichmäßigen Aufbau des Kristallgitters erlaubt (Doudna *et al.*, 1993).

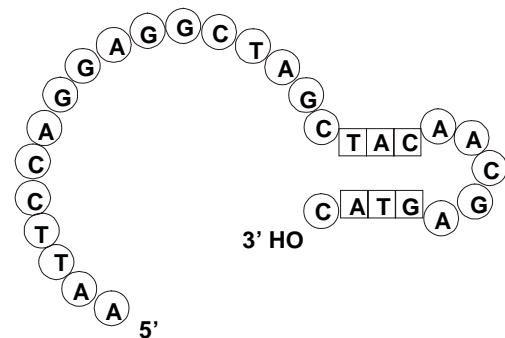
Des weiteren werden 5'-Heterogenitäten in ausgewählten Initiationssequenzen beobachtet: Zum einen bedingt eine Anhäufung von vier bis fünf aufeinanderfolgenden Guanosinen am Transkriptionsstart die Einführung mindestens eines weiteren Guanosins am 5'-Ende (Pleiss *et al.*, 1998). Zum anderen umgeht die T7 RNA-Polymerase das unvorteilhafte Startnukleotid Cytidylat durch eine „Sequenzoptimierung“ per Addition von Adenylat oder per Verschiebung der Initiation, so daß die Transkription mit einem Purin beginnt (Helm *et al.*, 1999).

Da mit steigender Reinheit der Probe ein möglicher Inhibitionsgrund des Kristallwachstums ausgeschlossen wird, war ein weiteres Ziel der Arbeit, ein homogenes Transkript zu erhalten.



Drei Methoden der posttranskriptionalen Prozessierung wurden untersucht. Während eine unspezifische Erkennung von Sekundärstrukturelementen durch die *Crotalus adamanteus* Phosphodiesterase I nicht erfolgte, d. h. die 3'-überhängende einzelsträngige RNA nicht bis zur Helix abgebaut wurde, konnte eine spezifische Prozessierung durch RNasen im *E. coli* S100-Mix erreicht werden. Unabdingbare Voraussetzung hierfür war eine *E. coli* Precursorsequenz des 9S Primärtranskripts. Im Gegensatz zur verminderten Wechselwirkung mit ribosomalen Proteinen hatten Mutationen im RNA-Konstrukt keinen Einfluß auf die RNase-Bindung und nachfolgende RNA-Prozessierung. Welche RNasen an der *in-vitro* als auch der *in-vivo* Reifung der *Th. flavus* 5S rRNA beteiligt sind, ist noch unklar. Die quantitative Aufreinigung des RNA-Produkts im Gel ist unproblematisch.

Die dritte Methode beinhaltet eine gezielte RNA-Restriktion durch Verwendung des DNA-Enzyms vom Typ 10-23 (Santoro & Joyce, 1997). Infolge der strikten Trennung des konservierten aktiven Zentrums im Loop von den variablen Substratbindungsarmen (Abb. 4.8) ist ein fast universeller Einsatz gegeben. Beim Design des DNA-Enzyms war auf ein geringes Sekundärstrukturpotential zu achten. Ein Faltungsmotiv mit einem hohen Energiewert konnte identifiziert werden, das auch eine einseitige Verkürzung eines Substratbindungsarms bei annähernd konstanter Enzymaktivität ermöglichte (Abb. 5.2). Daraus ergibt sich ein breiteres Anwendungsspektrum in unmittelbarer Nähe von RNA-Sekundärstrukturelementen, wie Helices.



**Abb. 5.2** Sekundärstruktur des DNA-Enzyms QPfl\_cut2.

## 5.5 Ribosomale Bindungsproteine der 5S rRNA

Für die stabilisierende Kokristallisation der ribosomalen *Th. flavus* 5S RNA war eine Überexpression der natürlichen proteinogenen Bindungspartner von Interesse. Aufgrund der nicht bekannten Sequenzdaten wurde eine Primärstrukturanalyse aus der genomischen DNA vorgenommen. Homologien der verschiedenen ribosomalen 5S rRNA Bindungsproteine sind in Tab. 5.1 dargestellt, wobei die Auswahl der Mikroorganismen exemplarisch nach dem Grad ihrer Thermophilie erfolgte. *Escherichia sp.* ist mesophil (37°C), *Bacillus sp.* wächst thermophil (55°C) und *Thermus sp.* extrem thermophil (70 bis 75°C).

|               |               |               |               |               |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|               | <b>EcoL5</b>  | <b>BstL5</b>  | <b>TthL4</b>  | <b>TfIL5</b>  |
| <b>EcoL5</b>  | -             | 59,9          | 56,5          | 56,5          |
| <b>BstL5</b>  | 59,9          | -             | 59,2          | 59,2          |
| <b>TthL4</b>  | 56,5          | 59,2          | -             | 100           |
| <b>TfIL5</b>  | 56,5          | 59,2          | 100           | -             |
|               | <b>EcoL18</b> | <b>BstL16</b> | <b>TthL18</b> | <b>TfIL18</b> |
| <b>EcoL18</b> | -             | 53,0          | 44,0          | 46,0          |
| <b>BstL18</b> | 53,0          | -             | 55,0          | 58,0          |
| <b>TthL18</b> | 44,0          | 55,0          | -             | 93,8          |
| <b>TfIL18</b> | 46,0          | 58,0          | 93,8          | -             |
|               | <b>EcoL25</b> | <b>BsuCTC</b> | <b>TthL5</b>  | <b>TfIL25</b> |
| <b>EcoL25</b> | -             | 27,7          | 18,1          | 17,9          |
| <b>BsuCTC</b> | 27,7          | -             | 32,5          | 32,2          |
| <b>TthL5</b>  | 18,1          | 32,5          | -             | 99,0          |
| <b>TfIL25</b> | 17,9          | 32,2          | 99,0          | -             |

**Tab. 5.1 Prozentuale Identität zwischen ribosomalen Proteinen.** Verglichen werden L5, L18 und L25 aus *E. coli* (Eco), *B. stearothermophilus* (Bst) bzw. *B. subtilis* (Bsu), *Th. thermophilus* (Tth) und *Th. flavus* (Tfl).

Für die Interpretation der Proteinhomologien sind die jeweilige Sequenz der proteinbindenden Domäne der 5S rRNA und die Thermophilie des Organismus heranzuziehen. Während sich für L5 und L18 beide Einflüsse überlagern, muß aufgrund völlig identischer 5S rRNA Domänen D in *E. coli* und *Th. flavus* die mangelnde Homologie von L25 eine Anpassung an die Thermophilie darstellen. Diese Schlußfolgerung steht im Einklang mit Lu & Steitz (2000), die eine Wechselwirkung der nicht-konservierten Aminosäurereste mit den Basen beobachteten. Das Protein CTC bleibt hier unberücksichtigt, da es sich um ein Streßprotein handelt, dessen Nachweis der Bindung an die 5S rRNA aussteht (Gryaznova *et al.*, 1996).

Der N-Terminus von L18 ist argininreich, aber in den verschiedenen Mikroorganismen für eine kooperative Bindung mit dem korrespondierenden ribosomalen Protein L5 variabel gestaltet (Newberry *et al.*, 1978; Huber & Wool, 1984). Dagegen läßt die hohe Konservierung des C-Terminus eine Interaktion mit der 5S rRNA vermuten. Bemerkenswert ist die Sequenzabweichung im mittleren Bereich der Aminosäuren von 57 bis 72, die auch innerhalb der *Thermus sp.* mit ähnlicher optimaler Wachstumstemperatur (70°C bei *Th. thermophilus* gegenüber 75°C bei *Th. flavus*) auftritt. Die aus der Primärstrukturvariation resultierende, andere dreidimensionale Faltung dürfte für die Hitzestabilität von TfIL18 entscheidend sein.

Das für die Bindung an die 5S rRNA essentielle Fragment 1-91 von L25 (Gongadze *et al.*, 1999) verfügt über eine Vielzahl an Argininen, deren postulierte Relevanz für eine RNA-Wechselwirkung sich auf die Phosphatgruppen beschränkt (Stoldt *et al.*, 1999). Stattdessen sind die Aminosäuren von EcoL25, die mit den Basen der 5S rRNA in Kontakt treten, kaum konserviert (Lu & Steitz, 2000). Die im Vergleich zu TL5 beobachteten beiden Mutationen in TfIL25 sind ohne Bedeutung: Valin27 substituiert die ebenfalls hydrophobe Aminosäure Leucin, und der Austausch von Asparaginsäure gegen Valin154 erfolgte im nicht-bindenden Proteinbereich.