

7. ZUSAMMENFASSUNG

Strukturell determinierte Funktionen von RNA-Molekülen lassen sich durch hochaufgelöste Kristallstrukturen erklären. Am Beispiel der *Thermus flavus* 5S rRNA – einem Gerüstmolekül der Peptidyltransferase – wurden im Rahmen dieser Arbeit drei Wege auf ihre Eignung untersucht, die RNA-Kristallisation zu verbessern: das Moleküldesign (1), die RNA-Komplexierung mit dem Protein Tfil18 (2) und die 5S rRNA-Fragmentierung in strukturelle Domänen (3). Die Arbeit schloß gleichermaßen die Optimierung der Synthese und Aufreinigung der RNA- bzw. Proteinkomponenten ein.

Die Anpassung diverser Parameter der *in-vitro* Transkription resultierte in max. 1350 Kopien der rRNA vom Template. Durch die 3'-Prozessierung des heterogenen Transkript-Pools in der RNase-haltigen *E. coli* S100-Fraktion oder mittels eines optimierten DNA-Enzyms vom Typ 10-23 konnte ein homogenes RNA-Produkt erhalten werden. Zur Erklärung des Auftretens homogener Transkripte *in-vitro* wurde eine 5S rRNA-spezifische Verdrängungshypothese entwickelt. Kristallisationsstudien führten zu der Erkenntnis, daß das Kristallisationsfenster der engineerter Moleküle im Vergleich zum 5S rRNA Wildtyp nicht zu optimieren ist.

Zwei ribosomale 5S rRNA-Bindungsproteine aus *Th. flavus*, bezeichnet mit Tfil18 und Tfil25, wurden kloniert und charakterisiert. Die beobachtete Sequenzvariabilität verschiedener L18-Spezies im mittleren Proteinbereich bewirkt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine thermostabilisierende 3D-Faltung. Der Vergleich der Überexpression von Tfil18 in *E. coli* und im Proteinbioreaktor ergab eine mindestens 20-fache Syntheserate des *in-vitro* Systems. Die native 5S rRNA Domäne B war für die Bindung von Tfil18 essentiell. Ein Komplexkristall ansprechender Morphologie aus dem 5S rRNA Wildtyp und Tfil18 konnte gezüchtet werden.

Im Ergebnis systematischer Optimierungen der chemischen und physikalischen Parameter im Kristallisationsansatz wurden eine Diffusionskinetik für den Hängenden Tropfen sowie effektive Pufferkompositionen für die RNA-Kristallisation abgeleitet. Der positive Einfluß der Mikrogravitation auf das Kristallwachstum und das Diffraktionsverhalten ließ sich bestätigen. Sequenzvariable und schweratom-modifizierte Fragmente der *Th. flavus* 5S rRNA Domänen B, C und E konnten erfolgreich kristallisiert und mit Auflösungen von max. 1,5 Å vermessen werden. Die Strukturlösung der 8 bp Helix der Domäne E zeigte die Bedeutung konservierter struktureller Wassermoleküle für die Stabilisierung von G:U-Wobble-Basenpaaren und führte zur Entdeckung eines neuartigen G:C-Basenpaares in nicht-Watson-Crick-Formation, die durch eine Protonierung des Cytosins hervorgerufen wird.

SUMMERY

Functions of RNA molecules which are structurally determined can be explained by highly resolved crystal structures. At the example of *Thermus flavus* 5S rRNA which represents a scaffold of the peptidyl transferase three ways has been analyzed concerning their suitability to improve RNA crystallization: the molecular design (1), the complex formation of RNA with the protein Tfil18 (2) and the subdivision of 5S rRNA into structural domains (3). The optimization of synthesis and downstream processing of the RNA as well as the protein components is included in this thesis.

By adjusting several reaction parameters up to 1350 copies of rRNA could be produced from a single DNA template during *in-vitro* transcription. The subsequent 3'-processing of the heterogeneous transcript pool has been performed first in the *E. coli* S100 fraction containing various RNases and secondly by means of an optimized DNA enzyme originated from the catalytic motif 10-23. In both cases a homogeneous RNA product was generated. A pushing-away-hypothesis specific for 5S rRNA molecules is presented explaining the appearance of homogeneous transcripts *in-vitro*. Crystallization studies revealed that crystallization of the engineered molecules is not optimized in comparison with the 5S rRNA wildtype.

Two ribosomal binding proteins of *Th. flavus* 5S rRNA termed Tfil18 and Tfil25 have been cloned and characterized. Probably, the sequence variability observed in the protein centre of different L18 species causes a thermo-stabilizing 3D folding. The comparison of Tfil18 overexpression in *E. coli* with the synthesis in the protein bioreactor showed at least 20-fold higher yields for the *in-vitro* system. The native 5S rRNA domain B has been proved to be essential for the binding of Tfil18. A well-shaped crystal of the RNA-protein-complex consisting of the *Th. flavus* 5S rRNA wildtype and the protein Tfil18 was obtained.

The systematical optimization of the chemical and physical influences in the crystallization trial resulted in the derivation of diffusion kinetics for the hanging drop as well as in effective buffer compositions for RNA crystallization. The positive effect of microgravity on the crystal growth and the diffraction ability has been confirmed. Fragments of *Th. flavus* 5S rRNA domains B, C and E which were partly mutated and modified with heavy atoms could successfully be crystallized. Data sets have been collected to max. resolutions of 1.5 Å. The structure solution of the 8 bp helix of the domain E revealed important RNA features. G:U wobble base pairs are stabilized by highly conserved structural water molecules. A novel G:C base pair appears in non-Watson-Crick formation enabled by the protonation of cytidine.