

Substratbindung und Katalyse in RNase P RNA

vom cyanobakteriellen Typ

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Olaf Gimple

aus
Würzburg

Würzburg 2004

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Substratbindung und Katalyse in RNase P RNA vom cyanobakteriellen Typ“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 9.11.2004

(Olaf Gimple)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg von Juni 1999 bis November 2004 unter Anleitung von Frau PD Dr. Astrid Schön angefertigt.

Das Arbeiten mit rekombinanter DNA erfolgte entsprechend den Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch *in vitro*-neukombinierte Nukleinsäuren des BMFT und mit Genehmigung der Zentralen Kommission für biologische Sicherheit beim Robert Koch-Institut, Berlin.

Für meine Eltern

Danke!

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. Astrid Schön für die interessante Themenstellung, ihr großes persönliches Engagement sowie für die fachlichen Ratschläge und stete Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion. Durch ihren Einsatz und ihr fortwährendes Interesse hat sie maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. H. J. Gross danke ich für sein immerwährendes Interesse am Fortgang meiner Arbeit, die Möglichkeit meine Arbeiten am Institut für Biochemie durchführen zu können sowie für die Bereitschaft, das Zweitgutachten für meine Arbeit zu übernehmen.

Frau Prof. Dr. H. Beier danke ich für ihr stetes Interesse an meiner Arbeit, die gute Zusammenarbeit in B103 und für die vielen geselligen Unternehmungen.

Herrn Prof. Dr. U. Fischer möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Arbeiten am Institut für Biochemie beenden zu können.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Christian Heubeck für die wunderbare gemeinsame Zeit in und außerhalb von B103 bedanken. Er hat mir als Kollege geholfen und war als wirklicher Freund immer für mich da.

Bei Dr. Michael Grimm möchte ich mich bedanken für die vielen kleinen Tipps und Anregungen, aber ganz besonders für die Zeit, die er sich für Gespräche und das Korrekturlesen meiner Arbeit genommen hat.

Ein spezielles Dankeschön gilt auch Hans-Dieter Sickinger für seine Unterstützung bei den vielen kleinen praktischen und organisatorischen Problemen im Laboralltag.

Karsten Höhn danke ich für die unerschöpfliche Bereitschaft, mir bei allen Computerproblemen zu helfen.

Dank gilt auch Anke Meisner, Simon Otter, Sonja Stahl und Nikolas Menzel für die fröhliche Zusammenarbeit und all die Dinge, die wir im und außerhalb des Labors erlebt haben.

Allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Arbeitskreise Beier, Gross, Grummt und Fischer danke ich für die freundliche Atmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit.

Ich danke auch der FAZIT-Stiftung für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Schließlich und endlich bedanke ich mich bei meinen Eltern für ihre fortwährende Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Ribonuklease P: ein ubiquitäres Enzym mit essentieller Funktion	1
1.2. Die Entdeckung der RNase P	2
1.3. Bakterielle RNase P	2
1.3.1. Struktur und Konservierung der bakteriellen RNase P RNA Untereinheit	3
1.3.2. Substraterkennung und Reaktionsmechanismus	8
1.3.2.1. Substraterkennung durch bakterielle RNase P	8
1.3.2.2. Substratbindung durch bakterielle RNase P	9
1.3.2.3. Der Reaktionsmechanismus der bakteriellen RNase P	13
1.3.3. Das bakterielle RNase P Protein	14
1.3.4. Ein Modell der dreidimensionalen Struktur des RNase P Holoenzym	17
1.4. Vorkommen, Morphologie und phylogenetische Stellung von <i>P. marinus</i> CCMP1375	18
1.4.1. RNase P von <i>P. marinus</i>	19
1.4.1.1. RNase P RNA von <i>P. marinus</i>	19
1.4.1.2. RNase P-Protein von <i>P. marinus</i> PCC9511	22
1.5. Morphologie und phylogenetische Stellung von <i>Cyanophora paradoxa</i>	23
1.5.1. Funktionelle und strukturelle Eigenschaften der Cyanellen-RNase P von <i>C. paradoxa</i>	25
1.6. Nukleotidyltransferase	27
1.7. Aufgabenstellung	29
2. Materialien	30
2.1. Chemikalien	30
2.2. Nukleotide und Oligonukleotide	32
2.3. Enzyme und Proteine	33
2.4. Plasmide	34
2.5. Biologisches Material	34
2.6. Chromatographiemedien	34
2.7. Gebrauchsfertige Analyse-Reagentiensätze	35
2.8. Geräte und sonstige Materialien	35

3. Methoden	37
3.1. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	37
3.1.1. Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA	37
3.1.2. Polyacrylamid-Elektrophorese zur Analyse von Nukleinsäuren	38
3.1.3. Lokalisierung von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen	39
3.1.3.1. Lokalisierung durch Autoradiographie	39
3.1.3.2. Lokalisierung durch Fluoreszenzlöschung	40
3.1.3.3. Lokalisierung durch Anfärben mit Toluidinblau	40
3.1.4. Elution von gelelektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren aus der Gelmatrix	41
3.1.4.1. Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	41
3.1.4.2. Elution von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen	41
3.2. Isolierung von Nukleinsäuren	41
3.2.1. Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	41
3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung	42
3.2.3. Abtrennung von Proteinen aus wässrigen Nukleinsäurelösungen	42
3.2.4. Isolierung von Plasmid-DNA	43
3.2.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab und Anlegen von Glycerinkulturen	43
3.2.4.2. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	43
3.3. Amplifizierung von DNA durch die Polymerasekettenreaktion	45
3.3.1. Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von DNA-Matrizen	45
3.3.2. Oligodesoxynukleotid-vermittelte bidirektionale Mutagenese	46
3.3.3. Analyse und Aufreinigung von PCR-Produkten	48
3.4. In vitro Transkription mit T7-RNA-Polymerase	48
3.4.1. Herstellung von RNase-freiem ddH ₂ O	48
3.4.2. Linearisierung der Matrizen-DNA durch Restriktionshydrolyse	49
3.4.3. Präparative T7-Transkription	49
3.4.4. Präparation radioaktiv markierter Transkripte	50
3.4.5. Initiation der T7-Transkription mit GMPS und GMP	51
3.4.6. Präparative T7-Transkription mit s ⁴ UTP	52
3.5. Sequenzanalyse von Nukleinsäuren	53
3.5.1. Sequenzanalyse von DNA nach der Didesoxy-Kettenterminations-Methode	53
3.5.2. Sequenzierung von DNA mit "AmpliTaQ Polymerase FS Big Dye Terminator"	54
3.5.3. Nachweis von Reaktionsprodukten durch Primer-Extension-Analyse	55

3.6. Klonierung von Fremd-DNA in Plasmid-Vektoren	56
3.6.1. Präparation von Plasmidvektoren durch Restriktionshydrolyse	56
3.6.2. Dephosphorylierung linearisierter Plasmide mit alkalischer Phosphatase	57
3.6.3. Erzeugung glatter Enden und 5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten	58
3.6.4. Ligation von DNA-Fragmenten mit Plasmidvektoren	58
3.6.5. Präparation kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	59
3.6.5.1. Präparation chemokompetenter Zellen	59
3.6.5.2. Präparation elektrokompeter Zellen	61
3.6.6. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	61
3.6.6.1. Hitzeschocktransformation	61
3.6.6.2. Elektroporation	61
3.7. Kultivierung von <i>E. coli</i>	62
3.7.1. Kultivierung von <i>E. coli</i> in Flüssigkultur	62
3.7.2. Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen als Plattenkultur	62
3.8. Charakterisierung von Proteinen	63
3.8.1. Dialyse einer Enzymlösung	63
3.8.2. Konzentrationsbestimmung nach Bradford	64
3.8.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	64
3.8.4. Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	66
3.8.5. Silanisieren von Plastikgefäßen	66
3.9. Präparation und Aufreinigung rekombinanter Proteine	67
3.9.1. Das T7-Expressionssystem	67
3.9.2. Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> -Stämmen	67
3.9.2.1. Überexpression im präparativen Maßstab	67
3.9.2.2. Aufarbeitung von Protein-Einschlußkörperchen	68
3.9.2.3. Aufreinigung von Protein-Einschlußkörperchen eines rekombinanten Proteins	68
3.9.3. Säulenchromatographie	69
3.9.3.1. Denaturierende Aufreinigung eines rekombinanten Proteins über Affinitäts- Chromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	69
3.10. Modifizierung von Nukleinsäuren	70
3.10.1. Markierung und Aufreinigung von Oligodesoxyribonukleotiden mit [γ - ³² P] ATP	70
3.10.2. Vervollständigung des 3'CCA-Endes von tRNAs durch die Nukleotidyltransferase	71
3.10.2.1 Analytische Nukleotidyltransferase-Reaktion	71
3.10.2.2. Präparative Nukleotidyltransferase-Reaktion	72

3.10.3. Modifizierungsreaktion mit APA-Br	73
3.10.4. Photochemisch induzierte RNA-RNA-Verknüpfungen	74
3.10.4.1. Analytische Crosslink-Reaktion	74
3.10.4.2. Präparative Crosslink-Reaktion und Aufreinigung der Komplexe	76
3.10.5. RNA-Ligation durch T4-DNA-Ligase	77
3.11. Analyse von Nukleinsäure-Modifikationen	79
3.11.1. Enzymatische Totalhydrolyse von RNA	79
3.11.2. Dünnschichtchromatographie	79
3.11.3. Nachweis von Thioketonen und Thiolen	80
3.12. Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P RNA	81
3.12.1. <i>In vitro</i> Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P RNA	81
3.13. Bestimmung enzymkinetischer Parameter	82
3.13.1. Quantifizierung von Autoradiographien	82
3.13.2. Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} von RNase P RNA	83
3.14. Modellierung von RNA mit dem Programm ERNA-3D	83
4. Ergebnisse	85
4.1. Konstruktion von tRNA^{Arg}_{CCU} T7-Transkriptionsklonen	85
4.1.1. Konstruktion von pre-tRNA ^{Arg} _{CCU} T7-Transkriptionsklonen	85
4.1.2. Konstruktion von mat-tRNA ^{Arg} _{CCU} T7-Transkriptionsklonen	86
4.1.3. Sequenzanalyse des Transkriptionsklons pPmT7k	87
4.2. Prozessierung von tRNA^{Arg}_{CCU} mit <i>P. marinus</i> RNase P RNA und Bestimmung von Michaelis-Menten-Konstanten	88
4.3. Crosslink-Experimente mit <i>P. marinus</i> s⁴U-RNase P RNA	98
4.3.1. <i>In vitro</i> Transkription mit s ⁴ UTP	98
4.3.2. Crosslink-Reaktion von s ⁴ U-M1-RNA	99
4.3.3. Crosslink-Reaktion von <i>P. marinus</i> s ⁴ U-RNase P RNA	102
4.3.3.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen	102
4.3.3.2. Crosslink-Reaktion von <i>P. marinus</i> s ⁴ U-RNase P RNA mit pre-tRNA ^{Arg}	105
4.4. Splint-Ligation von tRNAs	109
4.4.1. <i>In vitro</i> Transkription mit GMP	109
4.4.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen	111
4.4.3. Splint-Ligation von pre-tRNA ^{Arg}	111

4.5. Modifizierung des 3'-CCA-Endes von tRNAs mit der Nukleotidyltransferase	113
4.5.1. Überexpression und Isolierung der <i>E. coli</i> Nukleotidyltransferase	113
4.5.2. Analytische Nukleotidyltransferase-Reaktion	114
4.5.3. Präparative Synthese von pre-tRNA _{CdCsA} und mat-tRNA _{CdCsA}	116
4.5.4. Präparative Synthese von pre-tRNA _{Cs²CA}	117
4.6. Modifizierung des tRNA-5'-Endes	117
4.6.1. Präparative Synthese von 5'GMPS-pre-tRNA ^{Arg} und 5'GMPS-mat-tRNA ^{Arg}	117
4.7. Modifizierung von RNA mit der APA-Gruppe	118
4.7.1. Synthese von 5'APA-pre-tRNA _{CCA} und 5'APA-mat-tRNA _{CCA}	118
4.7.2. Synthese von 3'APA-pre-tRNA _{CdCsA} und 3'APA-mat-tRNA _{CdCsA}	119
4.7.3. Synthese von APA-s ⁴ U-RNase P RNA	119
4.7.4. Synthese von 3'APA-pre-tRNA _{Cs²CA}	120
4.8. Crosslink-Experimente von <i>P. marinus</i> RNase P RNA mit APA-modifizierten RNAs	120
4.8.1. Prozessierung von APA-modifizierten tRNAs	120
4.8.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen	121
4.8.3. Crosslink-Reaktion von <i>P. marinus</i> RNase P RNA mit APA-modifizierten tRNAs	123
4.9. Crosslink-Experimente mit pre-tRNA_{Cs²CA} und 3'APA-pre-tRNA_{Cs²CA}	138
4.10. Crosslink-Experimente mit APA-s⁴U-RNase P RNA	138
4.11. Crosslink-Experimente mit <i>C. paradoxa</i> RNase P RNA	139
4.11.1. Prozessierung von tRNA ^{Arg} durch <i>C. paradoxa</i> RNase P RNA unter Crosslink-Bedingungen	139
4.11.2. Crosslink-Reaktion von <i>C. paradoxa</i> RNase P RNA mit APA-modifizierten tRNAs	140
4.12. Qualitativer Nachweis von Thioketonen und Thiolen in RNA	148
4.13. Modellierung der 3D-Strukturen von <i>P. marinus</i> RNase P RNA und tRNA^{Arg}	149
5. Diskussion	152
5.1. RNase P RNA aus <i>Prochlorococcus marinus</i> CCMP1375	152
5.2. Substratspezifität von <i>P. marinus</i> RNase P RNA	153
5.2.1. Synthese von Transkriptionsklonen	153
5.2.2. Enzymkinetische Untersuchung des homologen <i>P. marinus</i> Prozessierungssystems	153

5.3. Die Methode des Crosslinking zur Analyse von RNA-Struktur und Substraterkennung	158
5.3.1. Strategien zur Positionierung von photoreaktiven Gruppen in RNase P	159
5.4. Experimente mit dem <i>short-range</i>-Crosslinker s^4U in <i>P. marinus</i> RNase P RNA	160
5.5. Experimente mit dem <i>long-range</i>-Crosslinker Azidophenacyl (APA) in <i>P. marinus</i> tRNA^{Arg}	163
5.5.1. Modifizierung des 3'-Endes	164
5.5.1.1. Synthese von 3'APA-pre-tRNA _{CdCsA} und 3'APA-mat-tRNA _{CdCsA}	165
5.5.2. Modifizierung des 5'-Endes.....	166
5.5.2.1. Synthese von 5'APA-pre-tRNA _{CCA} und 5'APA-mat-tRNA _{CCA}	166
5.5.3. Crosslink-Reaktion und Identifizierung vernetzter Nukleotide der RNase P RNA	166
5.5.3.1. Region P2 und J18/2	167
5.5.3.2. Die Helix P18	169
5.5.3.3. Region P15 und P16	170
5.5.3.4. Region von P5 und J5/15	171
5.5.3.5. Region von P3 und P4	173
5.5.3.6. Die Region von P7 bis P11 (Kruziform)	175
5.6. Experimente mit dem <i>short-range</i>-Crosslinker s^2C in <i>P. marinus</i> tRNA^{Arg}	180
5.7. RNase P RNA aus Cyanellen von <i>C. paradoxa</i>	180
5.7.1. Crosslink-Experimente mit <i>C. paradoxa</i> RNase P RNA	181
5.7.1.1. Die Region J18/2, P2 und J2/4	182
5.7.1.2. Die Region von P15 und P16	183
5.7.1.3. Die Region von P5 und J5/15	184
5.7.1.4. Die Region von P4 und P3	185
5.7.1.5. Die Region von P7 bis P11 (Kruziform)	186
5.8. Ausblick	187
6. Zusammenfassung	189
7. Literaturverzeichnis	193
Verzeichnis der Abkürzungen	
Lebenslauf	

1. Einleitung

1.1. Ribonuklease P: ein ubiquitäres Enzym mit essentieller Funktion

Die Ribonuklease P (RNase P) ist ein für die Reifung der Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs) essentielles Enzym. Die tRNAs spielen neben ihrer Hauptfunktion als Adaptermoleküle der Translation auch in verschiedenen Regulations- und Biosynthesewegen eine wichtige Rolle. In der Zelle werden sie als Vorläufermoleküle mit 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen transkribiert. Zusätzlich können sie intervenierende Sequenzen (Introns) enthalten. Erst durch die Entfernung aller dieser nichtcodierenden Sequenzen entsteht die funktionsfähige reife tRNA (mat-tRNA).

Dieser Reifungsprozess umfasst die hydrolytische Abspaltung der 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen und das Einführen von Nukleotidmodifikationen und kann durch das Entfernen von Introns und das Anhängen der CCA-Sequenz am 3'-Ende der tRNA ergänzt werden. Die Endonuklease RNase P hydrolysiert dabei strikt magnesiumabhängig die Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Flanke und reifer tRNA des tRNA-Primärtranskripts. Es verbleiben eine endständige 5'-Phosphatgruppe an der gereiften tRNA und eine 3'-Hydroxylgruppe an der 5'-Flanke. RNase P ist das strukturell und funktionell außergewöhnlichste Enzym im Biosyntheseweg der tRNAs.

Als ubiquitäres Enzym existiert RNase P in allen Organismen sowie den genetisch kompetenten Organellen der eukaryotischen Zelle: Kern, Mitochondrien und Chloroplasten. Das Enzym zeigt jedoch eine außerordentliche Variabilität in Aufbau und Funktion. In allen bisher genauer untersuchten Organismen und Organellen besteht RNase P aus einer RNA-Untereinheit und bis zu zehn Protein-Untereinheiten (Krupp *et al.*, 1986; Bartkiewicz *et al.*, 1989; Lee und Engelke, 1989; Morales *et al.*, 1989; Nieuwlandt *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1996; Baum *et al.*, 1996; Chamberlain *et al.*, 1998; Jarrous *et al.*, 1998; Jarrous und Altman, 2001). RNase P wird deshalb als Ribonukleoprotein beschrieben. Lediglich für die RNase P aus den Chloroplasten und Mitochondrien höherer Pflanzen und aus animalen Mitochondrien konnte die Existenz einer RNA-Untereinheit bis jetzt nicht eindeutig bewiesen werden.

Im Gegensatz zur Situation *in vivo*, bei der die Prozessierung beide Untereinheiten erfordert, kann die pre-tRNA-Spaltungsreaktion von der RNA-Komponente bakterieller RNase P unter bestimmten Bedingungen *in vitro* auch ohne die Proteinuntereinheit durchgeführt werden. Aus diesem Grund wird die RNA-Komponente auch als Ribozym bezeichnet (Guerrier-Takada *et al.*, 1983).

Für die RNase P RNAs aus eukaryotischen Zellkernen (Pitulle *et al.*, 1998), Organellen (Groom *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Rossmannith und Karwan, 1998) und einigen Archaea (LaGrandeur *et al.*, 1993; Pannucci *et al.*, 1999) konnte diese *in vitro* Ribozym-Aktivität bis jetzt nicht nachgewiesen werden.

1.2. Die Entdeckung der RNase P

Ausgangspunkt der Entdeckung von RNase P war eine temperatursensitive *E. coli*-Mutante, die unter nicht-permissiven Wachstumsbedingungen tRNA-Vorläufermoleküle akkumulierte (Altman, 1971). Diese pre-tRNAs verfügten noch über die 5'-Flanke des Primärtranskripts. Auf der Suche nach dem für diesen Prozessierungsschritt verantwortlichen Enzym stieß B. Stark auf ein bis dato unerklärliches Phänomen: *in vitro* besaß das Enzym unter Niedrigsalzbedingungen hitzelabile, unter Hochsalzbedingungen hingegen hitzestabile Aktivität. In weiterführenden Untersuchungen konnte erstmals der Ribonukleoprotein-Charakter des Enzyms sowie eine essentielle Funktion der RNA-Untereinheit bei der Katalyse gezeigt werden (Stark *et al.*, 1978). Kole *et al.* (1980) zeigten erstmals, dass sich RNA- und Protein-Untereinheit trennen und anschließend wieder zu aktivem Holoenzym rekonstituieren lassen. 1983 entdeckten schließlich Guerrier-Takada *et al.* die katalytische Aktivität und damit den Ribozym-Charakter der RNase P RNA Untereinheit unter Hochsalzbedingungen. Cech *et al.* (1982) hatten nur kurz zuvor erstmals das Tetrahymena-Ribozym beschrieben. Die Entdeckung der Ribozyme veränderte die bis dahin dogmatische Aufgabenteilung zwischen Nukleinsäuren und Proteinen. Das neue Wissen um die Doppelfunktion der RNA als Informationsträger und Biokatalysator, vereint in einer Molekülklasse, unterstützte dabei die Modellvorstellungen von einer präbiotischen RNA-Welt (Gilbert, 1986).

Die meisten heute bekannten Ribozyme, wie *Hammerhead* oder das rRNA-Intron aus *Tetrahymena*, sind nicht zu mehrfachem Substratumsatz fähig, da sie sich bei der Hydrolysereaktion selbst zerstören (Doherty und Doudna, 2001; Blount und Uhlenbeck, 2002). Die RNA-Komponente der bakteriellen RNase P stellt hier immer noch eine äußerst bemerkenswerte Ausnahme dar, da sie das einzige natürlich vorkommende Ribozym ist, welches die *trans* liegenden Substrate spaltet (Gilbert, 1986). Sie ist zu mehrfachem Substratumsatz fähig und somit ein wirklicher Katalysator.

Für die Entdeckung katalytisch aktiver RNA wurden S. Altman und T. Cech 1989 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet (Altman, 1990).

1.3. Bakterielle RNase P

Insbesondere wegen ihrer Ribozymeigenschaften sind die RNase P-Enzyme aus Bakterien heute am besten charakterisiert. Das bakterielle RNase P-Holoenzym setzt sich aus einem 350-450 nt langen RNA-Molekül, welches vom *rnpB*-Gen codiert wird und einer 14-15 kDa großen, durch *rnpA* codierten Protein-Untereinheit zusammen (Darr *et al.*, 1992).

1.3.1. Struktur und Konservierung der bakteriellen RNase P RNA Untereinheit

Obwohl eine Sequenz-Homologie von nur 10-15 % besteht, lässt sich für alle eubakteriellen RNase P RNA Untereinheiten eine minimale Konsensusstruktur postulieren (Haas *et al.*, 1994; Abb. 1-1). Um auch *in vitro* enzymatisch aktiv zu sein, müssen alle strukturellen Domänen der RNase P RNA in einer katalytisch kompetenten Tertiärstruktur angeordnet sein. Diese Grundstruktur besteht aus elf basengepaarten Abschnitten (P1, P2, P3, P4, P5, P7, P8, P9, P10, P11 und P15).

Zusätzlich lassen sich fünf Regionen mit hochkonservierten Basen (CR I bis CR IV) erkennen. Diese Regionen können auch in eukaryotischer RNase P RNA lokalisiert werden (Frank *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2002).

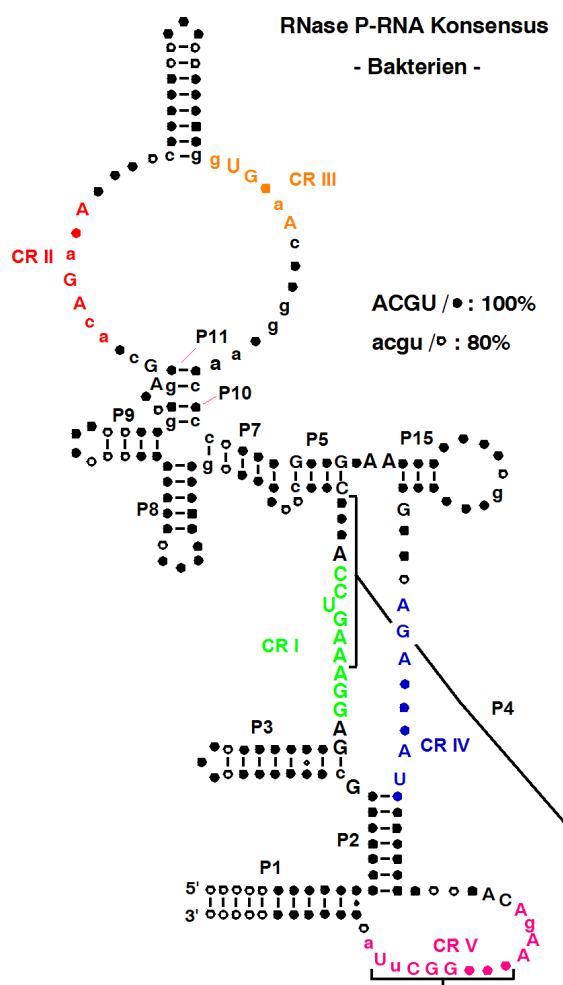


Abb. 1-1: Minimale Konsensusstruktur der eubakteriellen RNase P RNA

Zur Erstellung der Konsensusstruktur wurden nur Strukturelemente berücksichtigt, die in allen Eubakterien enthalten sind. Vollständig konservierte Nukleotide werden durch Großbuchstaben gekennzeichnet. Kleinbuchstaben bezeichnen Nukleotide, die in mindestens 80 % aller Eubakterien konserviert sind. Schwarz ausgefüllte Kreise symbolisieren Nukleotide, die in keiner RNase P RNA fehlen, während solche, die in mindestens 80 % der Eubakterien identifiziert wurden, durch leere Kreise dargestellt werden (Haas *et al.*, 1994; Siegel *et al.*, 1996). Regionen, die auch in eukaryotischer RNase P RNA konserviert sind, sind farbig dargestellt (CR I bis CR V; Xiao *et al.*, 2002).

Alle bekannten bakteriellen RNase P RNA Sequenzen werden auf Grund ihrer strukturellen Merkmale in zwei Klassen eingeteilt: Typ A und Typ B (Abb. 1-2).

Die RNA-Untereinheit des Typ A findet sich in Gram-negativen Bakterien sowie Gram-positiven Bakterien mit einem hohen genomischen GC-Gehalt. Die *E. coli* M1-RNA steht hierbei stellvertretend für Typ A. Typ B wird durch *B. subtilis* RNase P RNA repräsentiert. Diese evolutiv jüngere RNA findet sich in Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt.

Vergleicht man beide RNA-Typen, so sind mehrere Unterschiede feststellbar.

Typ A verfügt über die zusätzlichen Helices P13 und P14. Im Anschluss an P15 findet sich P16, in einigen Fällen P17. Typ B besitzt dagegen zwischen P10 und P11 eine zusätzliche Helix P10.1. Für dieses Strukturelement wird eine die Ribozymstruktur stabilisierende Wechselwirkung mit dem P12 abschließenden *Tetraloop* angenommen. (Siegel *et al.*, 1996; Massire *et al.*, 1998). Neben der nicht verlängerten P15 existieren die Helices P15.1 und P15.2. Zwischen P5 und P7 findet sich P5.1.

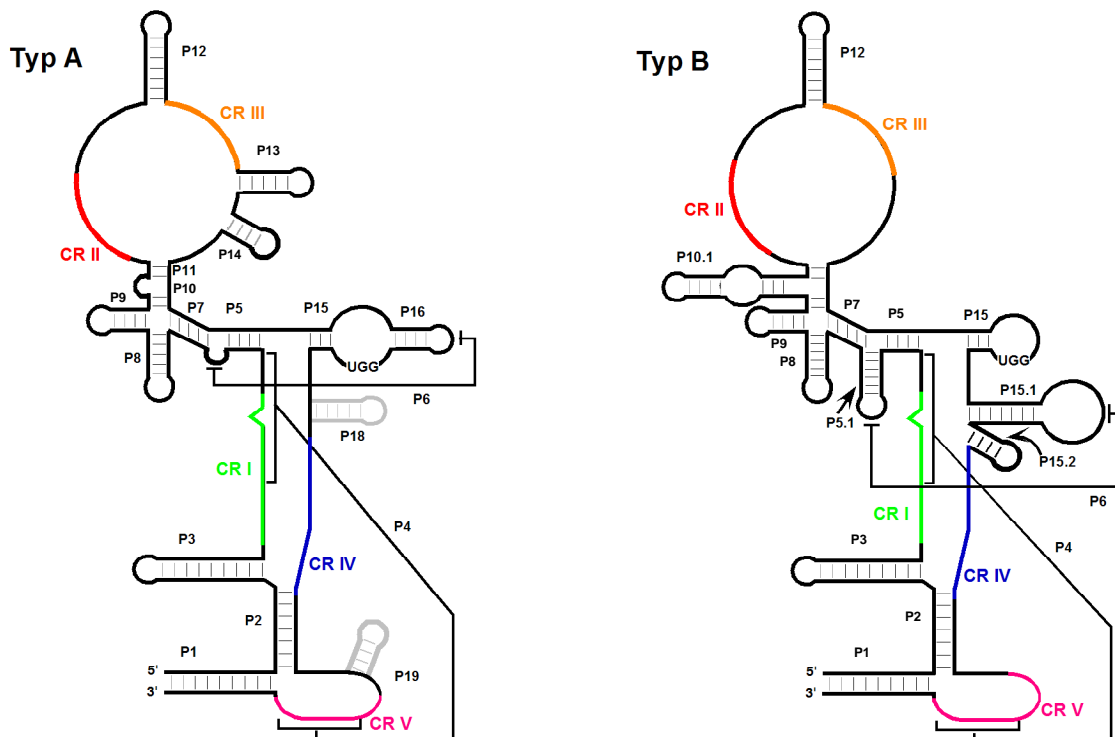


Abb. 1-2: Schematische Sekundärstruktur-Darstellung von Typ A und Typ B RNase P RNAs

Die universal, auch in Eukaryoten, konservierten Elemente CR I bis CR V sind farbig dargestellt; P18 und P19, welche nicht zwingend konserviert sind, in grau. Die minimale Zahl an Basenpaarungen pro Helix ist durch dicke, schwarze Linien repräsentiert, Abweichungen hiervon in grau. Die Fernwechselwirkungen P4 und P6 sind durch Linien angedeutet. Das 3'-CCA-Substratbindungsmotiv GGU in L15 ist durch Buchstaben repräsentiert (Schön, 2000).

Jede bakterielle RNase P RNA-Untereinheit lässt sich in zwei Domänen aufteilen, die sich unabhängig voneinander in ihre aktive Struktur falten können (Loria und Pan, 1996). Domäne I beinhaltet die Helices P7-P14. Sie ist für die Substraterkennung zuständig und wird deshalb auch Spezifitäts-Domäne (S-Domäne) genannt. Domäne II hingegen umfasst mit den Helices P1-P6 und P15-P19 das Katalysezentrum und wird deshalb auch Katalyse-Domäne (C-Domäne) genannt (Loria und Pan, 1996).

Durch phylogenetischen Vergleich von 137 bakteriellen Sequenzen konnte ein Modell der Tertiärstruktur von Typ A und Typ B RNase P RNA aufgestellt und durch Daten aus Crosslink-Experimenten verifiziert werden (Abb. 1-3, Abb. 1-4; Massire *et al.*, 1998).

Domäne I

Alle bakteriellen RNAs besitzen eine weite innere Schleife L11/12, welche die Helices P11-P14 verbindet, und die die beiden konservierten Regionen CRII (130-ACAGNRA-136) und CRIII (177-GUGNAA-182) beinhaltet (Abb. 1-2). Sie wird durch die Helices P10 und P11, die zusammen mit den Basenpaaren 127/231, 128/230 und 129/229 eine 7 bp lange irreguläre Helix ausbilden, geschlossen. Hierbei wird ein G...YAA-Motiv durch das Basenpaar 127/231 und den benachbarten A232 und A233 gebildet, das geeignet ist, tertiäre Wechselwirkungen einzugehen (Mattsson *et al.*, 1994).

Die Helices P13 und P14 sind koaxial gestapelt, wobei P13 immer die Länge 6 bp und eine konservierte Schleife der Sequenz GUAAGAG besitzt, die mit einem G...YAA-Motiv in P12 eine Wechselwirkung ausbilden könnte. Helix P14 ist hingegen 9 oder 10 bp lang, wobei L14 eine Fernwechselwirkung mit Helix P8 eingeht (L14-P8).

In Typ B sind P13 und P14 nicht vorhanden. Ihre Rolle zur Stabilisierung der Tertiärstruktur übernehmen P10.1a und P10.1. Durch koaxiale Stapelung bilden sie eine irreguläre Helix aus, die einen 11 nt-Rezeptor (145-CCUAAG...159-UAUGG) für den GAAA *Tetraloop* in L12 besitzt (L12-P10.1a; Tanner und Cech, 1995).

Im sogenannten *Kruziform* der Sekundärstruktur, das von den Helices P7-P10 gebildet wird, sind räumlich P8 und P9 sowie P7 und P10 koaxial gestapelt. Somit ist Domäne I aus 3 irregulären Helices aufgebaut (P8/P9, P7/P10/P11 und P13/P14 bzw. P10.1a/P10.1). Die genaue Position von P12, welche auf der Stapelung P7/P10/P11 sitzt, ist in diesem Modell nur aufgrund der bekannten Geometrie der L12-P10.1a Wechselwirkung zu bestimmen.

Die räumliche Fixierung der doppelsträngigen Regionen in Domäne I geschieht durch mehrere Wechselwirkungen der koaxialen Stapel untereinander. Während Domäne I in Typ A zusätzlich durch Interaktion von L13 mit dem Akzeptormotiv in P12 stabilisiert wird (L13-P12; Massire *et al.*, 1998), wird in Typ B durch eine L12-P10.1a Fernwechselwirkung ein analoger Effekt erzielt (Tanner und Cech, 1995).

Domäne II

In Domäne II findet sich ebenfalls ein Motiv aus drei komplexen Helices, die sich wie folgt zusammensetzen.

Helix P19 tritt sporadisch zwischen P2 und J19/4, welche konserviert ist (ACARAA), auf, und ist dabei auf P2 gestapelt. Hierbei ist der Abstand in der Sequenz von P19 zu P2 und J19/4 fast immer

gleich (0-3 nt). Ist P19 nicht vorhanden, so ist die Helix durch eine 4 nt lange Verbindung ersetzt. P2 ihrerseits ist koaxial mit P3 gestapelt, so dass P19/P2/P3 eine durchgehende Stapelung ausbildet.

Die zweite durchgehende helikale Stapelung wird bei Typ A durch P1/P4/P5, bzw. P1/P4/P5/P5.1 bei Typ B gebildet.

Die dritte Helix wird in Typ A durch P18, in Typ B durch den koaxialen Stapel P15.1/P15.2 dargestellt. Dabei wird Helix P18 immer durch einen 8 bp langen Stamm gebildet, auf dem sich ein GNRA-*Tetraloop* befindet, der eine Wechselwirkung zu P8 ausbildet (L18-P8). P15.2 als äquivalente Helix in Typ B, besitzt hingegen keine dieser konservierten Eigenschaften in Länge und Sequenz. Die P15.1/P15.2 Stapelung kann aber durch eine *Loop-Loop*-Wechselwirkung (L15.1-L5.1) einen analogen Beitrag zur Tertiärstruktur liefern.

Da P5.1 in Typ B die Stapelung P1/P4/P5 verlängert, kommt es deshalb P15.1 räumlich sehr nahe (Chen *et al.*, 1998). Diese mögliche Wechselwirkung zwischen P5.1 und P15.1 (P22) wurde häufig postuliert (Haas *et al.*, 1991, Haas *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998), konnte jedoch erstmals von Otter (2001) für *Phytoplasma* RNase P RNA durch Mutationsanalyse bestätigt werden.

In Domäne II ist P15 der einzige konservierte Stamm, der nicht Teil der helikalen Hauptstapelungen ist. In Typ A bildet P15 die Basis der P15/P16/P17-Verlängerung, die durch die Ausbildung des Pseudoknotens P6 bewirkt wird (Haas *et al.*, 1991). P6 variiert dabei zwischen 4 und 7 bp und besteht aus einer Fernwechselwirkung mit J5/7. Durch die Verknüpfung der Verlängerung P15/P16/P17/P6 an beiden Enden, wird somit eine starke Biegung zwischen P16 und P17 erzwungen. In Typ B RNase P RNAs hingegen fehlt diese P16/P17/P6 Verlängerung von P15.

Zur weiteren Stabilisierung der Ribozym-Gesamtstruktur tragen neben den genannten Wechselwirkungen L14-P8, L13-P12, bzw. L12-P10.1a in Domäne I und P6 bzw. L5.1-L15.1 in Domäne II auch zusätzliche Fernwechselwirkungen zwischen den beiden Domänen bei: Für Typ A postulierten Brown *et al.* (1996) eine Wechselwirkung der *Tetraloops* L18 und L14 mit gepaarten Basen aus P8 unter Ausbildung von Basentriplets (L18-P8). Eine Interaktion des *Tetraloops* L9 mit einem *Tetraloop*-Akzeptor in P1 konnte von Massire *et al.* (1997) gezeigt werden (L9-P1). Aufgrund dieser Ergebnisse wird außerdem eine Fernwechselwirkung zwischen L8 und Helix P4 angenommen (L8-P4; Massire *et al.*, 1998). Für Typ B wird als einzige Wechselwirkung zwischen den Domänen eine L8-P4-Interaktion postuliert (Harris *et al.*, 1997).

Basierend auf einer Vielzahl von unterschiedlichen Ansätzen lassen sich für die zentrale Domäne der RNase P RNAs von *E. coli* und *B. subtilis* weitere Raumstrukturmodelle aufstellen (Harris *et al.*, 1994; Westhof und Altman, 1994; Westhof *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Massire *et al.*, 1998). Obwohl die meisten dieser Modelle im Detail voneinander abweichen, gleichen sie sich alle in der Lokalisierung einer zentralen, katalytisch entscheidenden Domäne: Helix P4. P4 wird von zwei hoch konservierten RNA-Abschnitten gebildet (CR II und CR V; Abb. 1-2). Bestimmte Phosphoratome im Rückgrat dieser Helix sind von entscheidender Bedeutung für die Bindung von

Mg²⁺-Ionen. Gleichzeitig spielen sie eine wichtige Rolle bei der Bindung des Akzeptor-Stammes der pre-tRNA (Hardt *et al.*, 1995; Harris und Pace, 1995; Schmitz und Tinoco, 2000). Die Konservierung dieser essentiellen Strukturelemente impliziert dabei die Erhaltung der katalytischen Funktion (Chen und Pace, 1997).

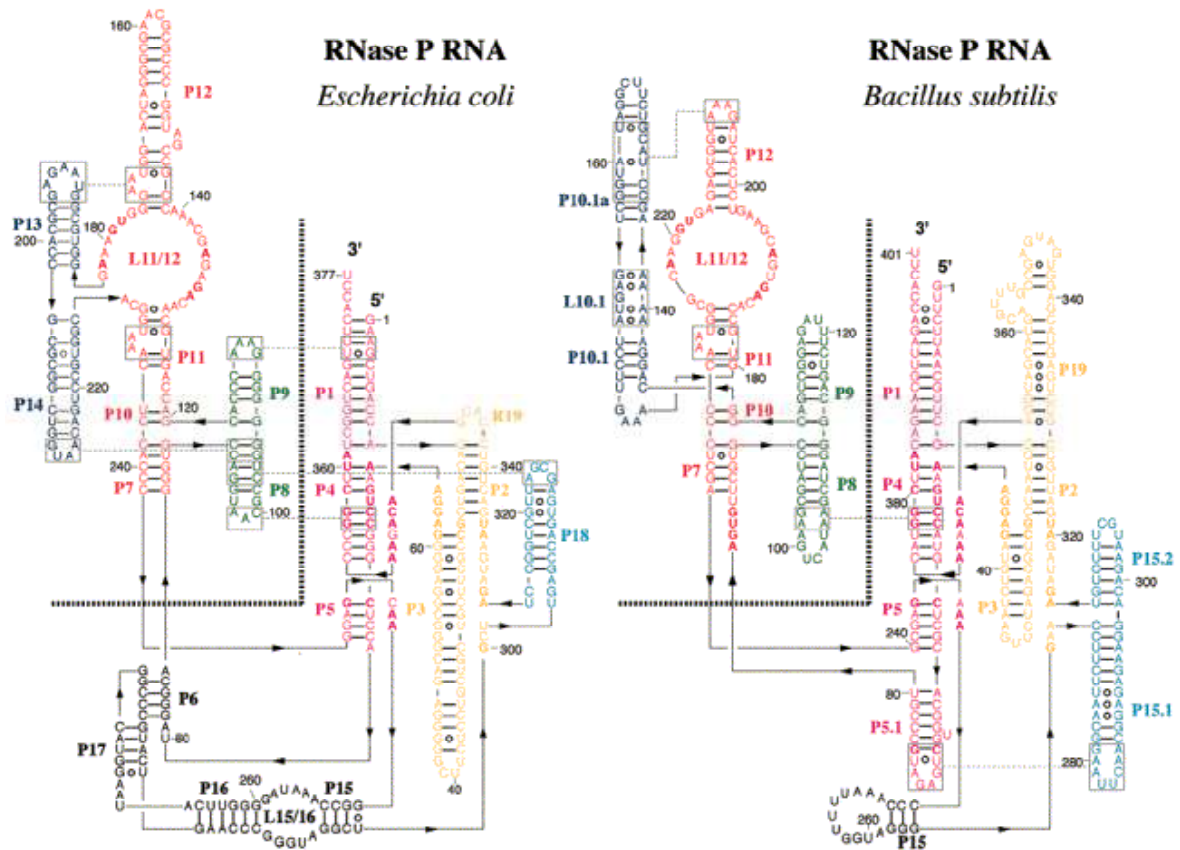


Abb. 1-3: Alternative Darstellung der Sekundärstrukturen von *E. coli* und *B. subtilis* RNase P RNA

Gezeigt sind alternative Darstellungen der RNase P RNA für *E. coli* und *B. subtilis*. Durchgezogene Linien verbinden benachbarte Nukleotide der Sequenz, wobei die 5'-3'-Richtung der RNAs durch Pfeile gegeben ist. Nukleotide, die tertiäre Wechselwirkungen eingehen, sind eingerahmt und durch dünne gepunktete Linien verbunden. Bekannte nicht-kanonische Basenpaarungen sind durch offene Kreise symbolisiert. Die dicke gepunktete Linie zwischen P5 und P7 markiert die Trennung von Domäne I und Domäne II. Die Farben der Helices entsprechen denen des Raummodells in Abb. 1-4 (Massire *et al.*, 1998).

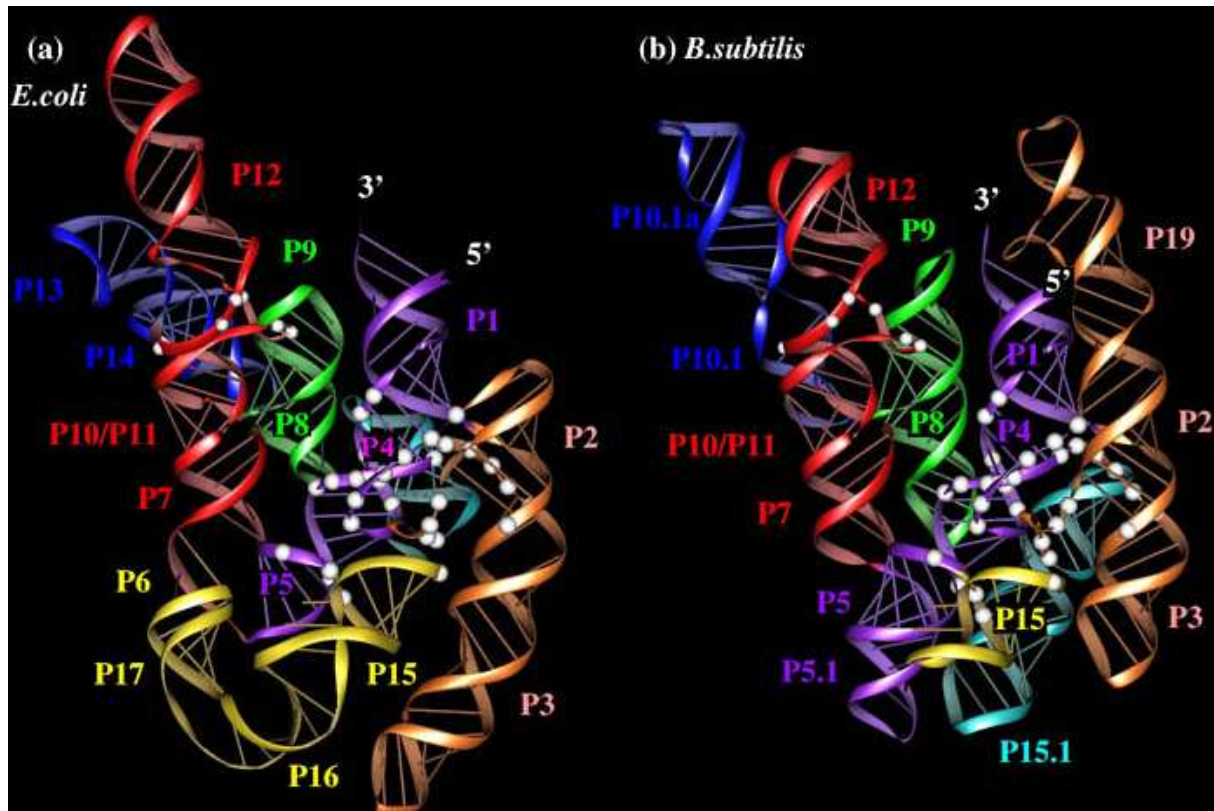


Abb. 1-4: *E. coli* und *B. subtilis* RNase P RNA-Raumstrukturmodelle

Gezeigt sind Raumstrukturmodelle der RNase P RNA für *E. coli* (a) und *B. subtilis* (b). Helices der Domäne I sind jeweils rot, grün und dunkelblau gefärbt; die der Domäne II türkis, gelb, orange und hellblau. Hoch konservierte Nukleotide im katalytischen Zentrum sind als große weiße Kugeln dargestellt. Kleine weiße Kugeln repräsentieren konservierte Nukleotide der pre-tRNA T-Schleifen-Erkennungsstelle (Massire *et al.*, 1998).

Für einzelne Domänen der *E. coli* RNase P RNA konnte die Struktur durch NMR-Versuche bestimmt werden. So lösten Easterwood und Harvey (1997) die Struktur der J15/16 Domäne, während dies Schmitz und Tinoco (2000) für die P4-Helix gelang. Krasilnikov *et al.* (2003) lösten erst kürzlich die Struktur der Domäne I für *B. subtilis* durch Kristallstrukturanalyse. Hierbei zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung mit dem oben im Detail beschriebenen postulierten Raumstrukturmodell von Massire *et al.* (1998).

1.3.2. Substraterkennung und Reaktionsmechanismus

1.3.2.1. Substraterkennung durch bakterielle RNase P

RNase P prozessiert *in vivo* alle pre-tRNAs einer gegebenen Zelle oder Organelle. Unter *in vitro* Bedingungen ist das Enzym zusätzlich in der Lage, pre-tRNAs der verschiedensten Spezies korrekt heterolog umzusetzen (Baer *et al.*, 1988; Pace und Smith, 1990; Darr *et al.*, 1992; Loria und Pan, 1998; Loria *et al.*, 1998). Wegen den nur geringen Sequenzähnlichkeiten der tRNAs in einem Organismus, insbesondere der pre-tRNA-5'-Flanken, muss sich die Substraterkennung auf allgemeine Tertiärstrukturmerkmale, unspezifisches Binden frei zugänglicher pre-tRNA Regionen und spezifische

Interaktionen mit den wenigen absolut konservierten tRNA-Nukleotiden beschränken. Dies gilt umso mehr für die interspezifische pre-tRNA Erkennung. Für ein tieferes Verständniss der pre-tRNA-Substraterkennung durch RNase P bildet deshalb das ausführliche Wissen über Sekundär- und Tertiärstrukturen der tRNAs eine unabdingbare Grundlage. Durch Interaktionsexperimente mit pre-tRNA-Substraten konnte der tRNA-Akzeptor-Stamm und die T ψ C-Schleife bzw. Stamm als entscheidende Elemente der Substraterkennung identifiziert werden (Kahle *et al.*, 1990; Holm *et al.*, 1992; Christian *et al.*, 2002). Anticodon- und Dihydrouracilschleife (DHU) können zusätzliche, jedoch nicht essentiell notwendige, Wechselwirkungen zur pre-tRNA ausbilden (McClain *et al.*, 1987).

Der Akzeptor-Stamm nahezu aller pre-tRNAs wird von einer kurzen Helix mit sieben Basenpaaren gebildet. Eine Ausnahme bilden tRNA^{His} und tRNA^{Sec}, deren Akzeptor-Stamm acht Basenpaare lang ist (Steebhorn *et al.*, 1995). Die Länge und Primärstruktur des Akzeptor-Stammes sind für die Erkennung der richtigen Schnittstelle zwischen 5'-Flanke und tRNA durch RNase P von entscheidender Bedeutung (Holm und Krupp, 1992; Kirsebom und Svärd, 1992). Für die pre-tRNA^{His}, welche über ein zusätzliches G an Position -1 verfügt, kommt der Diskriminatorbase eine besondere Bedeutung hinsichtlich der Schnittstellenfestlegung zu. Diese tRNA besitzt als einzige ein Cytosin als Diskriminatorbase. Dieses C ist nicht in der Lage, mit dem U der GGU-Sequenz der RNase P RNA zu paaren und die gesamte tRNA wird um ein Nukleotid in der Bindungstasche verschoben, so dass die Prozessierung korrekt ausgeführt werden kann. Die Insertion zweier Basenpaare in den Akzeptor-Stamm einer Hefe pre-tRNA₁^{Leu} verschiebt die Schnittstelle um 2 Basen in Richtung 3'-Ende, um so den 7-Basenpaar-Akzeptor-Stamm zu erhalten. RNase P aus *Xenopus laevis* ist offensichtlich fähig, die Akzeptor-Stamm-Länge zu messen, um so die richtige Position der Schnittstelle zu lokalisieren (Carrara *et al.*, 1989).

Für RNase P aus *E. coli* konnte sowohl für das Holoenzym als auch für die isolierte RNA-Untereinheit die Bedeutung einzelner konservierter Nukleotide für eine korrekte Prozessierung gezeigt werden (Svärd und Kirsebom, 1992). Die meisten dieser Nukleotide befinden sich in räumlicher Nähe zum katalytischen Zentrum oder in Strukturbereichen, für welche Interaktionen mit dem Substrat diskutiert werden. Es wird eine mögliche Wechselwirkung zur pre-tRNA über exozyklische Aminogruppen der Nukleotide diskutiert (Kufel und Kirsebom, 1996; Meinnel und Blanquet, 1995; Tallsjö *et al.*, 1996).

1.3.2.2. Substratbindung durch bakterielle RNase P

Für T ψ C-Stamm und T ψ C-Schleife der pre-tRNA konnte ein eindeutiger Beitrag zur Substratbindung durch RNase P RNA aus *E. coli* und *B. subtilis* gezeigt werden. Insbesondere der T ψ C-Stamm interagiert dabei mit P9, einer Helix des RNase P RNA *Kruziform*-Sekundärstrukturelements. Einzelne Nukleotide treten dabei über ihre 2'-OH-Gruppen mit dem Ribozym in Kontakt (Abb. 1-5: Pan *et al.*, 1995; Loria und Pan, 1997; Chen *et al.*, 1998). Insgesamt kann der entscheidende Sekundärstrukturbereich P7-P11 (Kleeblattstruktur) in allen bakteriellen RNase P RNAs sowohl in der

Sequenz als auch strukturell als hoch konserviert bezeichnet werden (Abb. 1-2). Lediglich einige cyanobakterielle RNase P RNAs und solche aus Plastiden bilden hier eine Ausnahme (Brown, 1998).

Untersuchungen zur RNase P Prozessierung von zirkular permutierten Substraten zeigen, dass Unterbrechungen im Zucker-Phosphatrückgrat innerhalb des Akzeptor-Stammes und der T Ψ C-Stamm-Schleife vom Enzym nicht toleriert werden. Es findet keine Hydrolyse statt.

Durch Mutations- und Crosslink-Experimente konnte gezeigt werden, dass zwischen einem konservierten Adenosin in J5/15 und dem N(-1) Nukleotid des Substrates eine direkte Basenpaarung gebildet wird (Abb. 1-5). Hier zeigte sich, dass die Position N(-1) einen Beitrag zur Substratspezifität und Prozessierungseffizienz hat, wobei Uridin an dieser Position des Substrates das optimale Nukleotid ist (Zahler *et al.*, 2003).

Bereits in frühen Arbeiten zur Substraterkennung durch RNase P wurde der Einfluss des pre-tRNA 3'-CCA-Endes erkannt. Das 3'-CCA-Ende tritt dabei mit der sowohl in RNase P RNA Typ A als auch Typ B konservierten Erkennungssequenz 5'-GGU-3' in Wechselwirkung (Abb. 1-5). Mutation oder Deletion des CCA-Endes führt zu einer Erhöhung von K_M und in einigen Fällen zu einer Positionsverschiebung der Schnittstelle. Dies unterstreicht die Bedeutung des Bindungsmotivs für die Enzym-Substrat-Komplexbildung (Guerrier-Takada *et al.*, 1988; Krupp *et al.*, 1991; Kirsebom und Svärd, 1994; LaGrandeur *et al.*, 1994; Oh und Pace, 1994; Hardt *et al.*, 1995; Svärd *et al.*, 1996; Tallsjö *et al.*, 1996). Die beiden Cytosine der pre-tRNA bilden Watson-Crick Basenpaare mit zwei Guanidin-Basen der RNase P RNA aus. Diese Enzym-Substrat-Wechselwirkung wird zusätzlich durch eine *Wobble*-Basenpaarung verstärkt. Sie bildet sich zwischen dem verbleibenden Uracil des 5'-GGU-3'-Motivs und der einzelsträngigen pre-tRNA Diskriminatorbase (Purin 73) aus (Kirsebom und Svärd, 1994). Für RNase P RNA vom Typ A liegt das 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv in J15/16; für Typ B in L15. Durch die relativ stabile Wasserstoffbrückenbindung soll der Akzeptor-Stamm der pre-tRNA teilweise aufgeschmolzen werden, so dass die korrekte Schnittstelle vom Ribozym einfacher festgelegt werden kann. Die Vorstellung der 3'-CCA RNase P Substrat-Wechselwirkung wird durch NMR und Modellierungsexperimente gestützt (Glemarec *et al.*, 1996; Easterwood und Harvey, 1997).

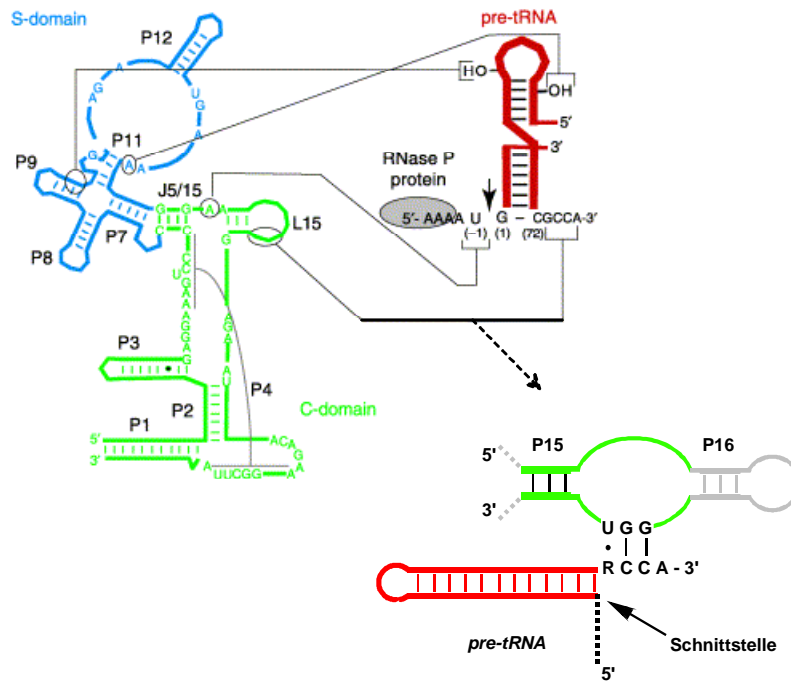


Abb. 1-5: Substraterkennung durch RNase P RNA

Gezeigt ist im linken Teil die bakterielle Konsensusstruktur der RNase P RNA. Konservierte Nukleotide sind durch Großbuchstaben gegeben. Die Domäne I ist blau und Domäne II ist grün dargestellt. Oben rechts sind der Acceptor- und T-Stamm des Substrates, die von RNase P erkannt werden, schematisch gezeigt. Spezifische Elemente des Substrates, die von RNase P erkannt werden, sind in Großbuchstaben angegeben. Die Prozessierungsstelle ist durch einen Pfeil angegeben. Bekannte Interaktionen zwischen der RNase P RNA und dem Substrat sind durch Linien gezeigt, die die jeweiligen Interaktionspunkte verbinden. Die Interaktion zwischen RNase P Protein und der 5'-Flanke ist durch ein Oval angedeutet (entnommen aus Harris *et al.*, 2003). Unten rechts ist schematisch die Bindung von pre-tRNA (rot) mit dem 3'-CCA-Ende an das 5'-GGU-Bindungsmotiv der P15/P16-Bindungsregion der RNase P RNA (grün) gezeigt. Die Purin-Diskriminatorbase (N73) der pre-tRNA wird durch R dargestellt. Die Watson-Crick-Basenpaarungen sind durch schwarze Linien (|), die Wobble-Basenpaarung durch einen schwarzen Punkt (•) dargestellt (Schön, 1999).

Das 5'-GGU-3'-Substratbindungsmotiv wird in den meisten bakteriellen Spezies gefunden. Sein Auftreten lässt sich bis zu einem gewissen Grad mit der Anwesenheit von codierten 3'-CCA-Enden in den tRNA Genen des jeweiligen Organismus erklären. Alle tRNA Gene aus *E. coli* und die meisten aus *B. subtilis* codieren für dieses Motiv. Konsequenterweise enthält die RNase P RNA aus beiden Spezies das 5'-GGU-3'-Substratbindungsmotiv. Im Gegensatz dazu stehen die tRNA-Gene von Archaea, den Chloroplasten und anderer photosynthetischer Organellen sowie deren phylogenetische Vorläufer, den Cyanobakterien. In der Regel codieren ihre Genome nicht für die tRNA 3'-CCA-Enden (Reith und Munholland, 1995 a,b; Löffelhardt *et al.*, 1997; Kowallik, 1997; Sprinzl *et al.*, 1998; Pannucci *et al.*, 1999). In erstaunlicher Übereinstimmung verfügt die RNase P RNA primitiver Plastiden und der meisten Cyanobakterien über kein 5'-GGU-3'-Substratbindungsmotiv, obwohl dieses in Bakterien als hoch konserviert gilt (Vioque, 1992; Baum *et al.*, 1996; Vioque, 1997; Fingerhut und Schön, 1998). Überraschender Weise zeigt die RNase P RNA des Cyanobakteriums *Prochlorococcus marinus* CCMP1375 eine deutlich höhere Affinität für Substrate mit 3'-CCA-Ende, obwohl die

RNase P RNA über kein 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv verfügt. Der Erkennungsmechanismus ist noch nicht geklärt (Hess *et al.*, 1998; Gimple und Schön, 2001).

Einige RNase P RNAs aus Archaea ohne 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv zeigen unter Hochsalzbedingungen *in vitro* keine katalytische Aktivität. Hier wird eine Übertragung der Substratfixierungsfunktion von RNase P RNA auf die Protein-Untereinheit(en) im Holoenzym diskutiert (Pannucci *et al.*, 1999; Hall und Brown, 2002). Dieser Hypothese stehen allerdings RNase P RNAs aus Cyanobakterien und anderen Archaea gegenüber. Sie verfügen ebenfalls nicht über ein 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv, prozessieren unter Hochsalzbedingungen *in vitro* aber dennoch pre-tRNAs korrekt (Baum *et al.*, 1996; Haas und Brown, 1998; Pannucci *et al.*, 1999).

Neben den pre-tRNAs erkennt RNase P als Holoenzym *in vivo*, aber auch als Ribozym *in vitro* eine Reihe weiterer natürlicher Substrate. Beispielsweise wird die 4.5S RNA aus *E. coli* von RNase P als Substrat akzeptiert und umgesetzt. Diese RNA bildet Strukturelemente aus, die der räumlichen Anordnung des pre-tRNA Akzeptor-Stammes gleicht (Peck-Miller und Altman, 1991). Die 10Sa RNA (tmRNA) sowie einige virale RNAs aus Pflanzen bilden an ihren Enden ebenfalls pre-tRNA Strukturelemente aus und können RNase P als Substrat dienen (Guerrier-Takada, 1984; Mans *et al.*, 1990; Komine *et al.*, 1994; Gimple und Schön, 2001). Dabei wird die pre-tRNA ähnliche Domäne der 10Sa RNA von RNase P prozessiert, um eine Wechselwirkung der 10Sa RNA mit dem Ribosom und ihrer Rolle beim Abbau von Polypeptidbruchstücken zu ermöglichen.

Ein Minimalsubstrat für RNase P leitet sich aus der pre-tRNA^{Phe} ab (McClain *et al.*, 1987). Es besteht nur aus einem Akzeptor-Stamm mit kleiner Schleife, dem 3'-CCA-Ende und einer 5'-Flanke. Forster und Altman (1990) konzipierten erstmals ein bipartites Minimalsubstrat, welches sich lediglich aus zwei teilweise gepaarten Oligoribonukleotiden zusammensetzt. Aktuelle Arbeiten zeigen, dass ein durch RNase P prozessiertes Minimalsubstrat lediglich über eine vier Basenpaare lange Region und eine ein-Nukleotid 5'-Flanke verfügen muss (Abb. 1-6; Hansen *et al.*, 2001; Zuleeg *et al.*, 2001).

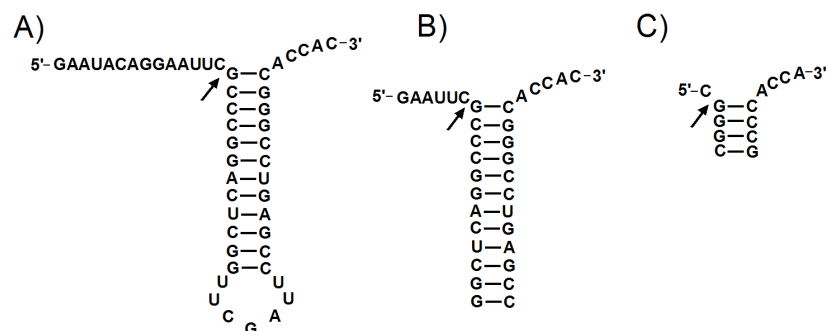


Abb. 1-6: Synthetische Minimalsubstrate für *E. coli* RNase P

Die Substrate sind entnommen aus A) McClain *et al.*, 1987 B) Forster und Altman, 1990 C) Hansen *et al.*, 2001. Die Schnittstelle ist jeweils durch einen Pfeil angezeigt.

1.3.2.3. Der Reaktionsmechanismus der bakteriellen RNase P

RNase P katalysiert eine direkte Hydrolyse (Smith und Pace, 1993), für die ein Metallionen-abhängiger S_N2 -Mechanismus diskutiert wird (Reich *et al.*, 1988; Steitz und Steitz, 1993; Warnecke *et al.*, 1999). Guerrier-Takada *et al.* (1986) postulieren einen S_N2 -Mechanismus, in welchem der nukleophile Angriff eines H_2O -Moleküls auf das Phosphatrückgrat durch einen Komplex aus Magnesiumionen und 6 H_2O -Molekülen unterstützt wird (Abb. 1-7). An der Katalyse durch M1-RNA sind mindestens zwei Magnesiumionen beteiligt, von denen eines an die M1-RNA koordiniert. Das zweite Ion bindet an das Substrat und aktiviert dieses, bevor es zur Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes kommt (Perreault und Altman, 1992). Reich *et al.* (1988) gehen vom direkten Eingriff einer Hydroxylgruppe der M1-RNA in die Katalysereaktion aus.

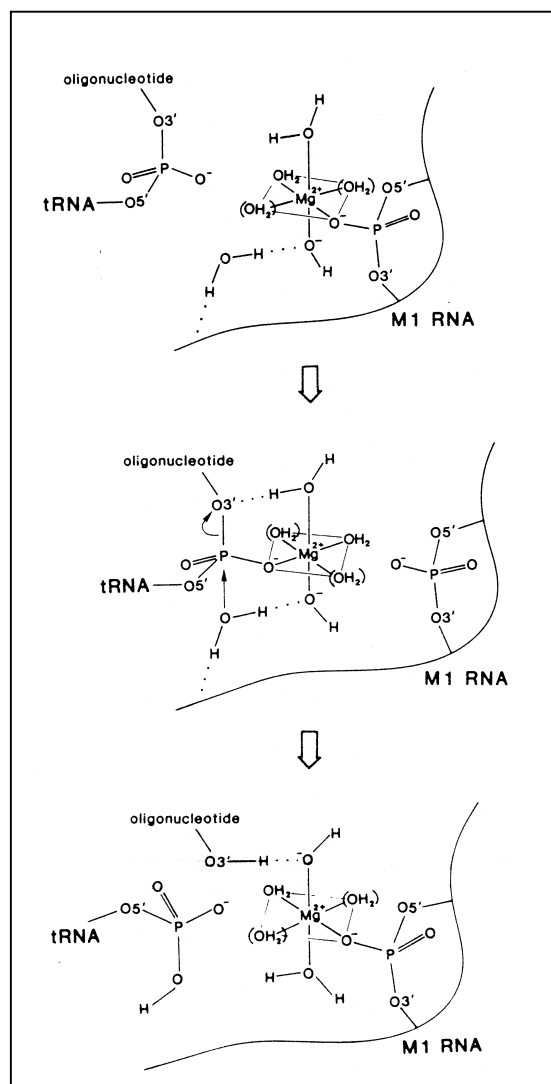


Abb. 1-7: Mechanismus der RNase P-Reaktion nach Guerrier-Takada *et al.* (1986)

Beebe und Fierke (1994) schlagen, basierend auf kinetischen Parametern, die für *B. subtilis* RNase P RNA und pre-tRNA^{Asp} gewonnen wurden, einen vierstufigen Mechanismus vor. Der Katalysezyklus beginnt mit rascher irreversibler Bindung der pre-tRNA durch RNase P RNA und anschließender Hydrolyse der entscheidenden Phosphodiesterbindung. Die Reaktion erfolgt mit zwölfmal höherer Geschwindigkeitskonstante (6 s^{-1}) gegenüber der Dissoziationskonstanten des Enzym-Substrat-Komplexes ($0,5 \text{ s}^{-1}$). Die Produktfreisetzung erfolgt kinetisch kontrolliert. Zuerst verlässt die pre-tRNA-5'-Flanke das katalytische Zentrum. Im geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt dissoziiert dann die reife tRNA ab. Im abschließenden vierten Schritt bildet sich ein zweites Ribozymkonformer, welches pre-tRNA wesentlich schlechter bindet.

Das beschriebene RNase P Ribozym ist strikt Mg^{2+} -Ionen abhängig. Die Mg^{2+} -Ionen werden für die Katalyse benötigt, nicht jedoch für die Ausbildung des Enzym-Substratkomplexes: Ein Mg^{2+} -Ion wird dabei durch die 2'-Hydroxylgruppe der Phosphodiesterbindung direkt an der Schnittstelle gebunden. Die Geschwindigkeit der Katalyse steigt mit zunehmender Mg^{2+} -Konzentration solange an, bis die gesteigerte Affinität zwischen RNase P RNA und reifer tRNA zu verzögerter Produktfreisetzung führt. Für eine optimale katalytische Aktivität sind mindestens drei Mg^{2+} -Ionen pro RNase P RNA notwendig. (Smith und Pace, 1993). Insgesamt übernehmen bivalente Kationen während der Reaktion drei Aufgaben: Durch Koordination ermöglichen sie die Deprotonierung von H_2O -Molekülen; sie polarisieren Phosphorylsauerstoffatome und ermöglichen so einen nukleophilen Angriff auf das korrespondierende Phosphoratom bei gleichzeitiger Stabilisierung des Übergangszustands. Bei Substitution von Mg^{2+} -Ionen durch Ca^{2+} findet nahezu kein Substratumsatz statt (Smith *et al.*, 1992; Pomeranz-Krummel und Altman, 1999). Wird Mg^{2+} durch Mn^{2+} ersetzt, zeigt Mn^{2+} wegen seiner größeren Nukleotidaffinität bei niedrigen Salzkonzentrationen eine größere Effektivität. Für höhere Konzentrationen kommt es wegen der starken Wechselwirkungen von Mn^{2+} mit den Nukleotiden zu reduzierter Substratbindung und verzögerter Katalyse (Smith *et al.*, 1992; Rossmann und Karwan, 1998).

Der Einfluss monovalenter Kationen auf die Ribozym-Reaktion liegt in einer Verminderung elektrostatischer Abstoßung zwischen RNase P RNA und pre-tRNA und dadurch wesentlich vereinfachter Substratbindung. Optimale Reaktionsbedingungen können durch den Zusatz von Cs^+ , K^+ , Rb^+ und NH_4^+ erreicht werden. Der ähnliche Radius dieser Ionen spielt dabei die entscheidende Rolle (Smith *et al.*, 1992). Polyamine wie Spermin oder Spermidin können die durch Metall-Ionenzugabe erreichten Katalyseeffekte nicht erzielen (Pannucci *et al.*, 1999).

1.3.3. Das bakterielle RNase P Protein

Trotz der Ribozym-Eigenschaften bakterieller RNase P *in vitro* ist die Protein-Untereinheit *in vivo* essentiell (Kirsebom und Vioque, 1996). Durch eine Verminderung der elektrostatischen Abstoßung zwischen den negativ geladenen Ribonukleinsäuren erniedrigt sie die zur *in vitro* Hydrolyse

notwendige Salzkonzentration und ermöglicht so eine effiziente Katalyse unter physiologischen Bedingungen (Guerrier-Takada *et al.*, 1983; Reich *et al.*, 1988).

Das durch das *mnpA*-Gen codierte RNase P Protein weist eine außerordentlich hohe Sequenzvariabilität auf (Brown, 1999). Seine Genstruktur ist allerdings hochkonserviert: es tritt stets in einem Operon mit dem für das ribosomale Protein L34 codierende *rpmH*-Gen auf. Bis auf nur wenige Ausnahmen befindet sich dieses Operon in Nähe zur *dnaA* Region. Die Protein-Untereinheit des Holoenzym ist durchschnittlich 120-140 Aminosäuren lang, wobei sich nur wenige konservierte Aminosäuren bestimmen lassen. Die Aminosäure-Konsensussequenz beschränkt sich auf einen sehr kleinen Bereich, der auffallend viele aromatische und basische Aminosäurereste besitzt (Brown, 1998). Da sich aber RNase P Proteine und RNA-Untereinheiten im Verhältnis 1:1 heterolog rekonstituieren lassen (Guerrier-Takada *et al.*, 1983; Rivera-Leon *et al.*, 1995; Pascal und Vioque, 1996), kann davon ausgegangen werden, dass die Protein-RNA-Interaktion hauptsächlich auf Erkennung der dreidimensionalen Proteinstruktur beruht.

Die Aufklärung der Kristallstruktur für das RNase P-Protein aus *B. subtilis* (Abb. 1-8) ermöglichte es, die Funktion des Proteins aus struktureller Sicht zu verstehen (Stams *et al.*, 1998). Die Raumstruktur lässt drei mögliche RNA-Bindungsdomänen erkennen: Eine Bindungs-Furche für einzelsträngige RNA bildet sich zwischen einer α -Helix und der zentralen β -Faltblatt-Struktur aus. Die Protein-RNA-Interaktionen beruhen hier vermutlich sowohl auf ionischen Wechselwirkungen mit basischen Aminosäuren als auch auf Stapelung aromatischer Aminosäuren (Talbot und Altman, 1994; Stams *et al.*, 1998). Diese auf aromatischen und basischen Aminosäuren beruhende Protein-RNA-Interaktion wird auch durch zusätzliche spektroskopische Daten und Funktionsanalysen mit Proteinmutanten der Arbeitsgruppe um Gopalan (1997 a,b) gestützt. Niranjanakumari *et al.* (1998) konnten durch *Crosslink*-Experimente einen direkten Kontakt zwischen den Positionen -4 bis -8 der 5'-Flanke des Substrats und der Protein-Untereinheit nachweisen (Abb. 1-5; Abb. 1-9). Die zweite Domäne fixiert in einer frei exponierten Schleife eine Reihe konservierter basischer Aminosäurereste zwischen Helix B (rot) und der zentralen β -Faltblattstruktur. Die dritte RNA-Bindungsregion wird durch eine der ersten Bindungsdomäne gegenüberliegende Schleife (grün) gebildet. Hier sind die wenigen sauren Aminosäuren des Proteins lokalisiert. Durch die so erhöhte Metallaffinität könnte diese Domäne bei metallunterstützter RNA-Bindung eine Rolle spielen.

Die *B. subtilis* Protein-Struktur wurde durch Röntgenstruktur-Analyse für das RNase P Protein aus *Thermotoga maritima* (Kazantsev *et al.*, 2003) und NMR-Untersuchungen am RNase P-Protein aus *Staphylococcus aureus* bestätigt (Spitzfaden *et al.*, 2000). Die Topologie des Proteins ähnelt stark derjenigen zweier universell konservierter Proteine des Translationsapparates (EF-G, S5) und deutet auf einen gemeinsamen evolutiven Ursprung hin (Stams *et al.*, 1998).

Im Holoenzym werden mehrere Regionen der RNase P RNAs aus *E. coli* und *B. subtilis* durch die Protein-Untereinheit vor chemischer Modifikation oder Nukleasehydrolyse geschützt (Vioque *et al.*, 1988; Talbot und Altman, 1994; Loria *et al.*, 1998). Da sich die vor Modifikation oder Abbau geschützten RNA-Abschnitte über größere Bereiche erstrecken als von der Sekundärstruktur

ausgehend erwartet werden kann, wird eine Konformationsänderung der RNA–Untereinheit durch Binden des RNase P Proteins postuliert. Biswas *et al.* (2000) klonierten spezielle *E. coli* Proteinmutanten, wobei sie einzelne Aminosäuren chemisch so modifizierten, dass sie Nuklease-Charakter besaßen. Bei der Rekonstitution mit mutiertem Protein zum Holoenzym wurde eine spezifische Hydrolyse der RNase P RNA innerhalb der Regionen P3, P4, J2/4 und J18/2 beobachtet. In Übereinstimmung mit der Funktion des Proteins als substratbindende Untereinheit, zeigen diese Daten die räumliche Nähe von Protein und katalytischem Zentrum im Holoenzym.

Trotz der nur geringen Sequenzähnlichkeiten können RNase P RNA-Untereinheiten und Protein-Untereinheiten heterolog zu aktivem Holoenzym rekonstituiert werden (Talbot und Altman, 1994; Pascual und Vioque, 1996). Die Stöchiometrie der Protein- und RNA-Untereinheiten im Holoenzym ist 1:1 (Rivera-Leon *et al.*, 1995; Niranjankumari *et al.*, 1998). Für RNase P aus *B. subtilis* wird eine Tetramerstruktur des Holoenzym diskutiert (Fang *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zum Verhalten der RNase P RNA *in vitro* zeigt das Holoenzym keine Diskriminierung gegenüber Substraten ohne 3'-CCA-Ende und kann verschiedene Substrate prozessieren. Vorläufer-Moleküle der 4,5 S RNA, eine polycistronische mRNA, phagen-codierte antisense RNA oder auch tmRNA-Vorläufer (Kirsebom und Altman, 1989; Peck-Miller und Altman, 1991; Alifano *et al.*, 1994; Komine *et al.*, 1994; Hartmann *et al.*, 1995; Gimple und Schön, 2001). Die Anwesenheit der Proteinuntereinheit erhöht die Affinität der RNase P für pre-tRNAs signifikant; nicht jedoch für tRNAs. Es wird weiterhin angenommen, dass das Protein die Produktfreisetzung aus dem Enzym-Substrat-Komplex erleichtert (Crary *et al.*, 1998).

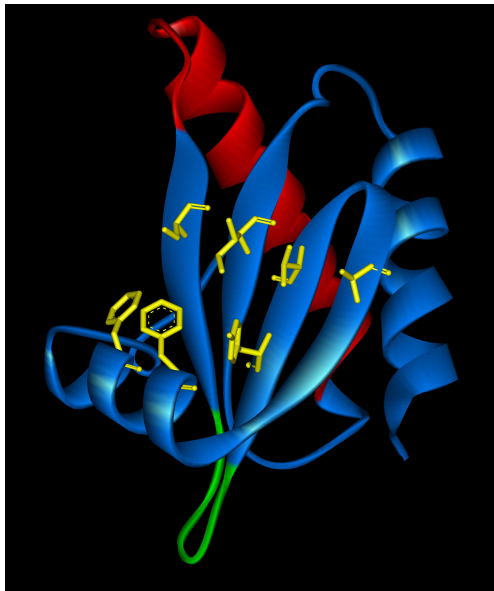


Abb. 1-8: Struktur des RNase P Proteins in *Bacillus subtilis*

Die Topologie des Proteins wird als $\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$ -Struktur angegeben. Die Abbildung zeigt das ungewöhnliche Strukturmotiv des RNase P Proteins: eine linksgängige $\beta\alpha\beta$ kreuzende Verbrückung von β -Strang 3 über Helix B zu β -Strang 4.

Die die konservierten Aminosäuren enthaltende Helix ist rot dargestellt. Für sie wird wie für die Schleife mit sauren Aminosäuren (grün) eine RNA-Bindungsfunktion postuliert. Aminosäuren, welche zur Wechselwirkung mit dem pre-tRNA-Substrat beitragen, sind gelb hervorgehoben. Die Dimensionen des Proteins im Kristall betragen 40 x 35 x 30 Å (Stams *et al.*, 1998).

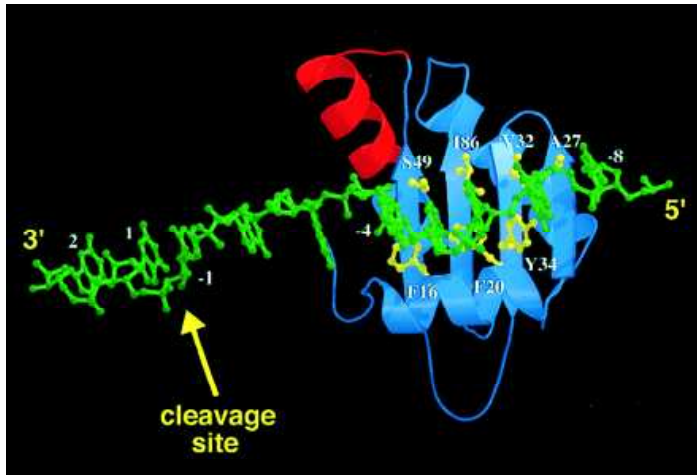


Abb. 1-9: Wechselwirkung der 5'-pre-tRNA-Flanke mit dem RNase P Protein

Die einzelsträngige 5'-pre-tRNA-Flanke ist grün, das RNase P Protein blau bzw. rot dargestellt. Die aromatischen Aminosäuren, die über Stapelungseffekte mit dem Substrat wechselwirken, sind entsprechend ihrer Position im Protein gelb nummeriert. Die konservierte basische Helix des Proteins ist rot dargestellt (Niranjanakumari *et al.*, 1998).

1.3.4. Ein Modell der dreidimensionalen Struktur des RNase P Holoenzym

Basierend auf RNase P RNA Modellen (1.3.1.), der gelösten Struktur der Protein-Untereinheit (1.3.3.) sowie zusätzlichen *Footprinting*- und Modellierungsexperimenten präsentierten Tsai *et al.* (2003) erstmals das vollständige Modell eines bakteriellen RNase P Holoenzym mit pre-tRNA-Substrat.

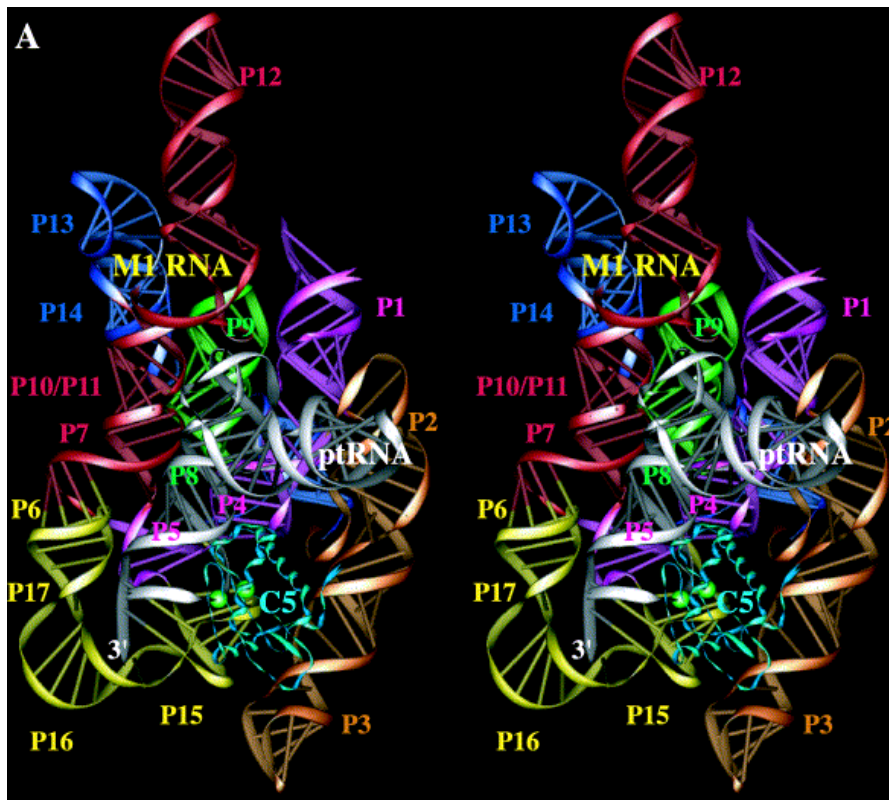


Abb. 1-10: Modell des *E. coli* RNase P Holoenzym

Stereoansicht des dreidimensionalen *E. coli* RNase P Holoenzym Substrat Komplexes. Das Farbschema der RNA entspricht dem aus Abb. 1-4. Die Protein-Untereinheit ist in türkis, die pre-tRNA in elfenbein dargestellt (Tsai *et al.*, 2003).

1.4. Vorkommen, Morphologie und phylogenetische Stellung von *P. marinus* CCMP1375

Prochlorococcus marinus gehört zur Gruppe der Cyanobakterien. Er wurde erst vor weniger als 10 Jahren in tropischen und subtropischen Regionen der Weltozeane, zwischen den Breitengraden 40°S und 40°N, entdeckt (Chisholm *et al.*, 1988). Der dieser Arbeit zugrunde liegende Organismus *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375 (SS120) wurde ursprünglich in der Sargasso See in einer Tiefe von 120 m isoliert. An allen Orten, an denen er zu finden ist, ist er der Hauptbestandteil des Phytoplanktons. Er weist eine sehr breite Verteilung in unterschiedlichen Wassertiefen (100-200 m) auf, in denen gravierende Unterschiede der Umweltbedingungen auftreten.

Die Architektur des Organismus ist typisch für Cyanobakterien, und ist am besten zu vergleichen mit der des anderen dominanten ozeanischen photosynthetischen Prokaryoten *Synechococcus*.

Mit seiner Größe von 0,5-0,7 µm ist *P. marinus* der kleinste bekannte photosynthetische prokaryotische Organismus. Zusammen mit *Synechococcus* wird er deshalb als marines Picophytoplankton bezeichnet.

Aufgrund von 16S rRNA-Vergleichen zeigte sich, dass diese Adaption an verschiedene Wassertiefen auf die Existenz verschiedener Unterarten zurückzuführen ist. Diese Unterarten sind durch unterschiedliche Verhältnisse ihrer Photosynthese-Pigmente (*Chl a₂/Chl b₂*) an die verschiedenen Lichtverhältnisse, die von der Wassertiefe abhängen, angepasst (Moore, 1998). Die Übereinstimmung der 16S rRNA-Sequenzen dieser Spezies beträgt hierbei 97-98%. Populationen einer bestimmten Wassertiefe verschiedener Fundorte sind dabei zueinander genetisch näher verwandt, als zu der Population am gleichen Fundort, welche sich in einer anderen Tiefe befindet.

Eine alternative phylogenetische Untersuchung auf der Basis des *rnpB*-Gens, das für RNase P RNA codiert, erbrachte eine Variation von 74-99 % innerhalb der Sequenzen und liefert damit eine bessere Auflösung des Stammbaumes von *Prochlorococcus* und *Synechococcus* (Schön *et al.*, 2002).

Der Photosyntheseapparat von *P. marinus* besitzt die einzigartige Pigment-Zusammensetzung aus Divinyl-Derivaten von Chlorophyll (*Chl a* und *b*), welche als *Chl a₂* und *b₂* bezeichnet werden. *Chl a* wurde bei *P. marinus* nicht nachgewiesen, wohingegen *Chl b* bei Unterarten gefunden wurde, die intensiverem Licht ausgesetzt sind. Zusätzlich wurde auch Phycobiliprotein nachgewiesen. Die Kombination in den Cyanobakterien von *Chl a* und *b* mit einem Phycobiliprotein ist eine Besonderheit innerhalb des Pflanzenreiches (Partensky *et al.*, 1999).

Im Cytoplasma besitzt *P. marinus* neben DNA-Fibrillen auch Carboxysomen, die Aggregate von Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase darstellen. Diese Carboxysomen im Inneren der Zelle liegen bei oder zwischen den Thylakoiden, welche parallel zur Zellmembran verlaufen.

Das Genom von *P. marinus* CCMP 1375 besteht aus einem einzigen zirkularen Chromosom von 1,751 Mbp und einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 36,4 %. Es beinhaltet 1884 Gene, die für Proteine codieren, ein rRNA-Operon und 40 tRNA-Gene. Zusammen mit dem Genom von *Prochlorococcus* MED4 (1,66 Mbp) ist es eines der zwei kleinsten bekannten Genome photosynthetischer Organismen (Dufresne *et al.*, 2003). Durch seine bemerkenswerte Kompaktheit

stellt das Genom von *P. marinus* wohl eine Annäherung an den minimalen Genaufbau eines photosynthetischen Organismus dar.

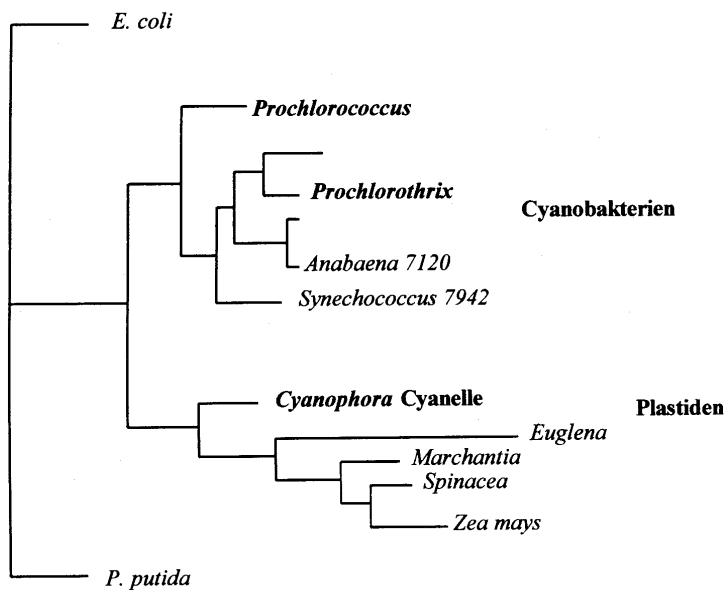


Abb. 1-11: Phylogenetische Position von *Prochlorococcus marinus*

Gezeigt ist ein aus Sequenzvergleichen DNA-abhängiger RNA-Polymerasen aufgestellter phylogenetischer Stammbaum (Palenik und Haselkorn, 1992).

1.4.1. RNase P von *P. marinus*

1.4.1.1. RNase P RNA von *P. marinus*

Die RNase P-codierende Region von *P. marinus* CCMP1375 enthält außer dem Gen für die RNase P RNA (*rnpB*) neben einem offenen Leserahmen und mehreren *inverted repeats* (IRs) strangaufwärts noch das benachbarte Gen (*trnR*) für eine tRNA Arginin (tRNA^{Arg}_{CCU}) in entgegengesetzter Orientierung (Hess *et al.*, 1998). Diese Gen-Anordnung steht dem Arrangement in den Plastiden *Cyanophora* und *Porphyra* (Baum *et al.*, 1996; Reith und Munholland, 1995) näher als dem anderer Cyanobakterien.

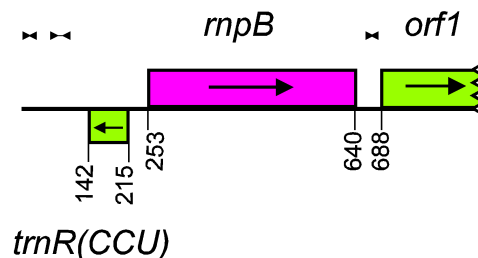


Abb. 1-12: Schematische Representation der *rnpB* Region von *P. marinus*

Gezeigt sind die Position und Orientierung (Pfeile) des RNase P RNA-Gens (*rnpB*; pink), des stromabwärts gelegenen *ORF1* (grün) und des tRNA^{Arg}_{CCU}-Gens (*trnR*; grün), welches stromaufwärts auf dem Gegenstrang codiert ist. Inverse Repeats (IR) sind durch entgegengesetzt gerichtete Dreiecke gekennzeichnet (Hess *et al.*, 1998).

In Übereinstimmung mit tRNA-Genen von Cyanobakterien und Plastiden ist, im Unterschied zu denen aus *E. coli*, das 3'-CCA-Ende in *P. marinus* nicht codiert. Die RNase P RNA besitzt konsequenterweise in der asymmetrischen Schleife zwischen P15 und P16, die durch J15/16 und J16/15 gebildet wird, wie die meisten Cyanobakterien kein 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv für das 3'-CCA-Ende der Substrate (Abb. 1-13).

Die Sekundärstruktur der RNase P RNA von *P. marinus* gehört zum Typ A (Abb. 1-2). Sie weist allerdings einige Besonderheiten auf. So ist die Anwesenheit von drei aufeinanderfolgenden U-U Fehlpaarungen in P16 innerhalb der Cyanobakterien einzigartig. Im Gegensatz dazu enthalten alle anderen cyanobakteriellen RNase P RNAs an dieser Stelle einen 2-4 Basen grossen *Bulge* in einer ansonsten korrekt gepaarten Helix P16 (Abb. 1-13)

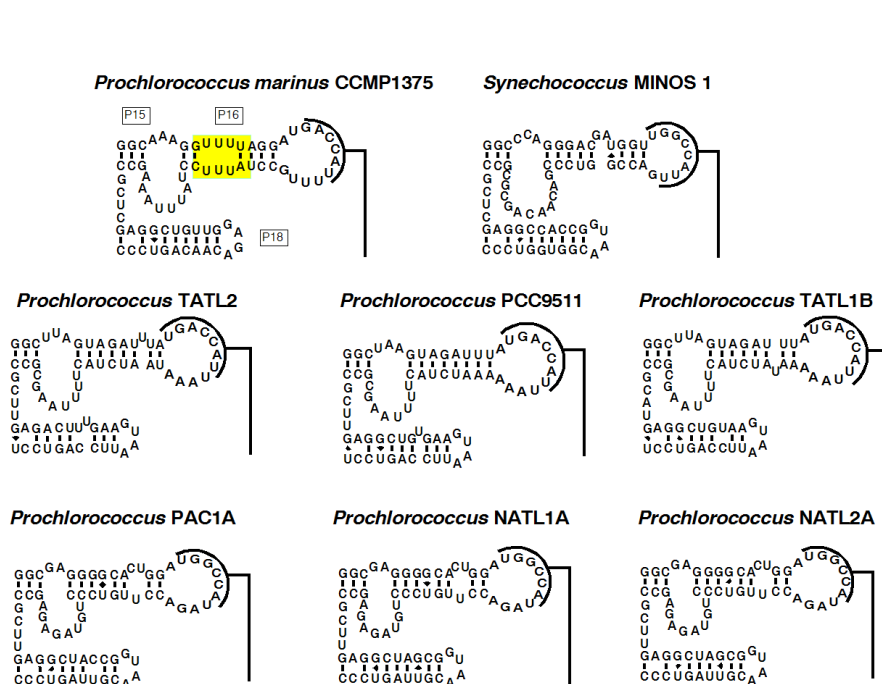


Abb. 1-13: Strukturvergleich der P15/P16 Helices verschiedener cyanobakterieller RNase P RNAs.

Die charakteristischen U•U Basenpaare in *P. marinus* sind gelb hinterlegt. Die an P6 beteiligten Nukleotide in L16 sind durch schwarze Halbbögen dargestellt (Schön *et al.*, 2002).

Die Struktur der *P. marinus* RNase P RNA wurde *in vitro* durch chemische Strukturuntersuchungen mit Dimethylsulfat (DMS) und N-Cyclohexyl-N'-[2-(N-methylmorpholino)-ethyl]-carbodiimid-4-toluolsulfonat (CMCT) sowie durch enzymatische Untersuchungen mit RNase T1, RNase V1 sowie RNase 1, als Typ A bestätigt (Gimple, 1999).

Es zeigten sich im Detail allerdings unerwartete Besonderheiten in der Sekundärstruktur dieser RNA (Abb. 1-14). So wird die Fernbasenpaarung P6 nicht wie bei den meisten Cyanobakterien von maximal 6 bp gebildet, sondern deutlich reduziert auf 2-4 bp (G265-C268). Die Basenpaarungen G236/U93 und G237/C91 in Helix P7, die das einzelne *Bulge*-Nukleotid U92 umrahmen, sind teilweise geöffnet.

In P9 konnte gezeigt werden, dass die Helix an A124 nicht gepaart vorliegt, sondern dieses Adenosin jetzt J9/10 bildet. Zusätzlich kann in dieser Helix ein neues Basenpaar G123/U110 diskutiert werden. In P11 ist das Basenpaar U131/A231 teilweise geöffnet. Die Schleife L12 steht mit ihren postulierten 3 nt im Gleichgewicht mit einer 5 nt-Schleife. Des weiteren liegen in der Mitte der Helix P12 (nt 151-153 bzw. nt 166-168) nicht-kanonische Basenpaarungen vor (A/C bzw. G/A). Durch *stacking* wird aber eine Stabilisierung dieses Bereiches erreicht (Lockard und Kumar, 1981; Tranguch und Engelke, 1994). In den ansonsten einzelsträngigen Verbindungen J15/16 bzw. J16/15 liegt zwischen A253 und U284 teilweise eine Basenpaarung vor.

In der Helix P16 mit seinen einzigartigen aufeinanderfolgenden drei U-U-Fehlpaarungen zeigt sich, dass sie über die Fehlpaarungen hinaus in Richtung L16 viel weiter geöffnet ist. Abschließend konnte festgestellt werden, dass P18 am Helixende partiell geöffnet ist.

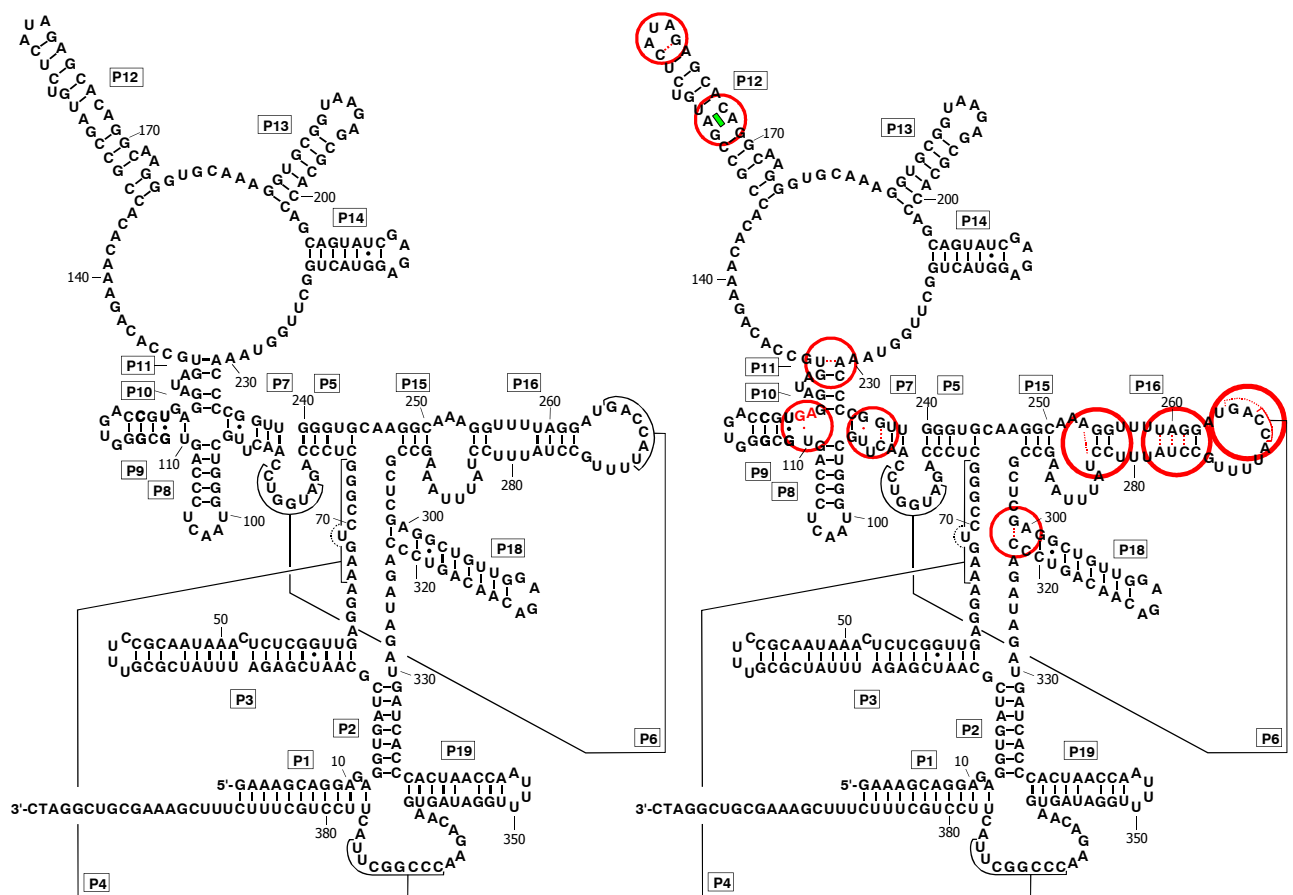


Abb. 1-14: Sekundärstrukturen von *P. marinus* RNase P RNA

Gezeigt ist links die postulierte Sekundärstruktur (Hess *et al.*, 1998). In der rechten Sekundärstruktur sind Ergebnisse der chemischen und enzymatischen Untersuchungen eingezeichnet. Rote Kreise kennzeichnen die Position der im Text genannten Abweichungen. Rot gestrichelte Linien und kleine rote Punkte symbolisieren partiell geöffnete Bindungen. Stabilisierungseffekte durch Stacking sind durch einen grün gefüllten Balken angedeutet. Rote Grossbuchstaben zeigen einen Wechsel in der Ausbildung einer Basenpaarung von ungepaarten und gepaarten Nukleotiden (Gimple, 1999).

Bei durchgeführten *in vitro* Untersuchung der katalytischen Aktivität der RNase P RNA von *P. marinus* wurde festgestellt, dass sie zur Prozessierung von pre-tRNAs unter *steady-state*-Bedingungen hohe Konzentrationen an Mg^{2+} (250 mM $MgCl_2$) und monovalenten Kationen (2-3 M NH_4Cl) benötigt (Hess *et al.*, 1998). Zusätzlich ist das Vorhandensein des 3'-CCA-Endes der tRNAs die Voraussetzung für eine effiziente Substraterkennung und Reifung. Für *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} wurde eine K_M von $0,57 \pm 0,13 \mu M$ und eine k_{cat} von $0,58 \pm 0,15 \text{ min}^{-1}$ festgestellt. Chloroplasten pre-tRNA^{Glu} (wt), die das für Cyanobakterien und Chloroplasten typische T-Stamm-Basenpaar A53/U61 besitzt, sowie ihre GC-Mutante, bei der das Basenpaar A53/U61 zum tRNA-Konsensus G53/U61 zurückmutiert wurde, erbrachten K_M - und k_{cat} -Werte von $1,34 \pm 0,05 \mu M$ und $0,077 \pm 0,002 \text{ min}^{-1}$ bzw. $1,20 \pm 0,19 \mu M$ und $0,103 \pm 0,009 \text{ min}^{-1}$. Der kinetische Parameter k_{cat} spiegelt dabei wieder, dass für die GC-Mutante eine leicht erhöhte Produktbildung stattfindet. Eine Mutante (ΔCCA) von pre-tRNA^{Glu}, bei der das 3'-CCA-Ende fehlt, zeigte kaum messbare Produktbildung, so dass hier keine kinetischen Parameter bestimmt werden konnten (Hess *et al.*, 1998).

Diese Bevorzugung von pre-tRNA-Substraten mit korrektem 3'-CCA-Ende wurde auch für *Prochlorococcus hollandica* festgestellt. Dieses Cyanobakterium besitzt allerdings im Gegensatz zu *P. marinus* das 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv. Auch mit dieser RNase P RNA zeigte sich eine Bevorzugung der GC-Mutante von pre-tRNA^{Glu} (Fingerhut und Schön, 1998).

Mit dem ungewöhnlichen Substrat pre-tmRNA aus *C. paradoxa* wurde ebenfalls der Einfluss des 3'-CCA-Endes auf die *in vitro* Prozessierung durch *P. marinus* RNase P RNA untersucht. Auch hier wurde bevorzugt das Substrat mit 3'-CCA-Ende prozessiert, was im Einklang mit den Ergebnissen für heterologe tRNA-Substrate steht (Gimple, 1999).

Durch Mutagenese der RNase P RNA aus *P. marinus* PCC1375 an Position G20 und G240 weg vom vorhandenen bakteriellen Konsensus, hin zur Sequenz von *C. paradoxa* Cyanellen RNase P RNA, sollte der Einfluss dieser Positionen auf die Katalyse untersucht werden (Heubeck, 2003).

So wurden die RNase P RNA-Transkripte mit den Mutationen A20, A240, A20/A240, T79/A240 und A20/T79/A240 in die *in vitro* Prozessierung von *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} eingesetzt. Für alle Mutanten wurde katalytische Aktivität festgestellt. Da mutationsbedingte Konformationsstörungen durch eine erhöhte Mg^{2+} -Konzentration ausgeglichen werden können, wurde bei konstanter Konzentration von monovalenten Ionen (2-3 M NH_4^+) die Mg^{2+} -Abhängigkeit der Ribozymreaktion der RNase P RNA Mutanten bestimmt. Es zeigte sich, dass der Wildtyp und alle Mutanten unter nahezu vollständigem Umsatz ein Aktivitätsmaximum bei 50-75 nM Mg^{2+} erreichen.

1.4.1.2. RNase P-Protein von *P. marinus* PCC9511

Durch die Überexpression und Aufreinigung des rekombinanten RNase P-Proteins aus *P. marinus* PCC9511 war es möglich, den Einfluss dieses Proteins auf die Prozessierung von tRNAs durch heterolog und homolog rekonstituierte Holoenzyme zu untersuchen (Heubeck, 2003).

Das *Prochlorococcus marinus* PCC9511 RNase P-Protein (16,5 kDa) unterscheidet sich von der Mehrzahl der anderen bakteriellen Proteinuntereinheiten durch ein zusätzliches etwa zehn Aminosäuren langes Fragment (Lys41-His50), welches zwischen den β -Faltblattstrukturelementen β_2 und β_3 liegt. Da RNase P-Proteine aus Cyanobakterien mit pre-tRNA-3'-CCA-Bindungsmotiv (z.B. *Synechocystis* und *Pseudoanabaena*) dieses Sequenzelement nicht besitzen, wird durch diese zusätzliche Aminosäuresequenz möglicherweise das fehlende 3'-CCA-Bindungsmotiv der zugehörigen RNase P RNA kompensiert. Stams *et al.* (1998) postulieren in *B. subtilis* für den β_2 - β_3 verbindenden Loop eine Metallionen-Bindungsfunktion. Der Unterschied in der Primärstruktur des *P. marinus* PCC9511 Proteins führt vermutlich zu einer vom bakteriellen Strukturkonsensus abweichenden Faltung des Proteins.

Die heterologe Rekonstitution von RNase P Holoenzymen aus *P. marinus* PCC9511 RNase P Protein und *Synechocystis* RNase P RNA, *C. paradoxa* RNase P sowie *C. paradoxa* RNase P RNA-Mutanten erbrachte katalytisch aktive chimäre Holoenzyme. Sie waren in der Lage Cyanellen pre-tRNA^{His} sowie andere pre-tRNA Substrate korrekt zu prozessieren (Heubeck, 2003).

Die homologe Rekonstitution von *P. marinus* CCMP1375 RNase RNA und *P. marinus* PCC9511 RNase P Protein erbrachte ein katalytisch aktives *P. marinus* Holoenzym, welches *P. marinus* pre-tRNA^{Arg} prozessierte. Hierbei wurde die pre-tRNA mit und ohne das 3'-CCA-Ende eingesetzt (pre-tRNA^{Arg}_{CCA}; pre-tRNA^{Arg} _{Δ CCA}), aber keinerlei Bevorzugung für eines der beiden Substrate festgestellt, was im Einklang mit anderen untersuchten Holoenzymen steht. Bei der Prozessierung dieser beiden Substrate durch das heterologe Holoenzym aus *C. paradoxa* RNase P RNA und *P. marinus* PCC9511 RNase P Protein wurde allerdings das Substrat mit 3'-CCA-Ende effektiver umgesetzt (Heubeck, 2003).

1.5. Morphologie und phylogenetische Stellung von *Cyanophora paradoxa*

Moderne Chloroplasten und Cyanobakterien gehen auf einen gemeinsamen Ursprung zurück. Die primitiven photosynthetischen Organellen der einzelligen Alge *Cyanophora paradoxa* gelten als "Übergangsstadien" zwischen Cyanobakterien und modernen Chloroplasten.

C. paradoxa ist eine eukaryotische Alge, die zur Klasse der Glaucophyceae zählt. Die 15 μ m lange, dorsiventrale Zelle besitzt zwei unterschiedlich lange Geißeln, die direkt hinter dem Zellvorderpol inserieren (van den Hoek, 1993). Im Inneren der Zelle befinden sich 1-4 photosynthetische Zellorganellen, die Cyanellen, die aus phylogenetischer Sicht ein echtes Intermediat zwischen Cyanobakterien und modernen Chloroplasten darstellen.

Die Cyanellen werden von einer Peptidoglycanschicht nach außen hin abgrenzt (Herdman und Stanier, 1977; Aitken und Stanier, 1979) und besitzen im Inneren zentral liegende Carboxysomen, die als Speicher für Ribulose-1,5-Biphosphat-Carboxylase dienen. Des weiteren verfügen sie über an der Zellwand anliegende, konzentrisch angeordnete Thylakoide. Neben Chlorophyll a dienen auch

Phycobiliproteine als Photosynthesepigmente. Während den Cyanellen alle diese Eigenschaften mit den Cyanobakterien gemeinsam sind, entsprechen die Größe und die Organisation ihres Genoms eher den in Chloroplasten vorliegenden Verhältnissen (Bohnert *et al.*, 1982; Lambert *et al.*, 1985). Mit ca. 135 kb ist das Cyanellen-Chromosom etwa so groß wie ein typisches Chloroplasten-Genom, aber zehnmal kleiner als das Genom freilebender Cyanobakterien. Wie im Chloroplasten-Genom finden sich im Cyanellen-Genom zwei invers angeordnete repetitive Sequenzen, die durch zwei unterschiedliche lange Regionen mit *single copy*-Genen voneinander getrennt sind (Stirewalt *et al.*, 1995). Die *inverted repeats* enthalten die Gene für die ribosomalen RNAs, die durch Verdopplung und Inversion diese chloroplastenspezifische Organisation erhielten. In Cyanobakterien und dem sehr ursprünglichen Rotalgen-Chloroplasten aus *Porphyra purpurea*, der ebenfalls für RNase P RNA codiert, liegen die für ribosomale RNAs codierenden Gene nicht als *inverted repeats* vor.

Neben der Gemeinsamkeiten in der Genomorganisation zwischen Cyanellen und Chloroplasten wird durch den Vergleich der Anzahl der Gene die Abstammung der Cyanellen von den Cyanobakterien deutlich. So besitzt das Cyanellen-Genom proteincodierende Gene, die zwar im Chromosom der Cyanobakterien, nicht aber im Chloroplasten-Genom gefunden werden können. Die Vorläufer der modernen Chloroplasten wurden endosymbiotisch von einer heterotrophen Zelle aufgenommen und verloren im Laufe der Evolution bis zu 90 % ihres Genoms an den Kern.

Die intermediäre Stellung der Cyanellen innerhalb der Chloroplasten-Evolution wird durch Sequenzvergleiche konservierter Gene, wie z. B. 16S rRNA, bestätigt (Turner *et al.*, 1989; Palenik und Haselkorn, 1992).

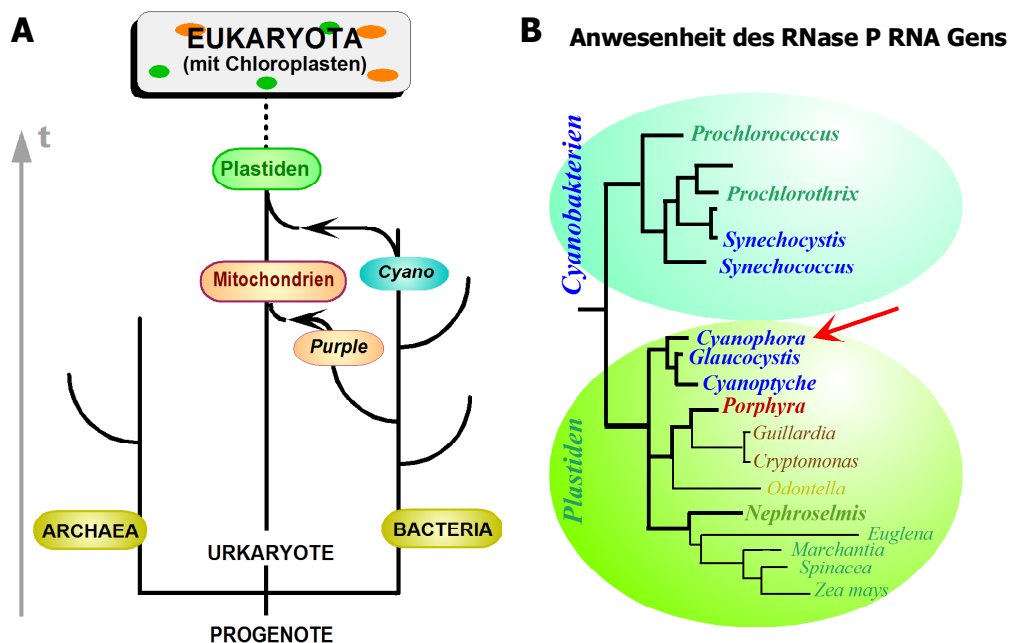


Abb. 1-15: Phylogenetische Stellung von *Cyanophora paradoxa*.

A) Allgemeiner phylogenetischer Stammbaum zur Veranschaulichung der Brückenstellung von Plastiden zwischen Cyanobakterien und Eukaryoten. B) Der Stammbaum wurde Sequenzvergleich DNA-abhängige RNA-Polymerase erstellt (Palenik und Haselkorn, 1992). Die Position von *C. paradoxa* ist durch einen roten Pfeil hervorgehoben. Die Anwesenheit eines RNase P RNA codierenden Gens wird durch dicke schwarze Linien angezeigt.

1.5.1. Funktionelle und strukturelle Eigenschaften der Cyanellen-RNase P von *C. paradoxa*

Baum und Schön (1996) konnten für die Cyanellen der *C. paradoxa* die erste RNA-Untereinheit einer RNase P aus photosynthetischen Organellen nachweisen. Diese RNA ist im Cyanellen-Genom codiert. Sowohl die Sequenz als auch die postulierte Typ A Sekundärstruktur der RNA zeigt große Homologien zu cyanobakteriellen RNase P RNAs (Abb. 1-16).

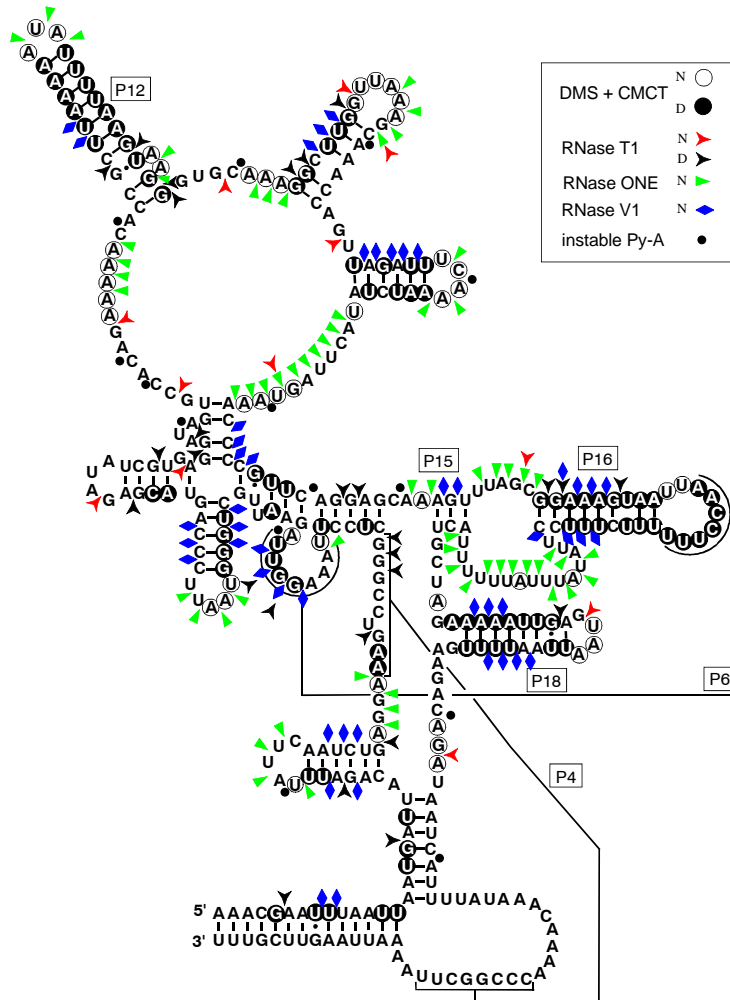


Abb. 1-16: Sekundärstruktur und Ergebnisse von chemischer und enzymatischer Strukturuntersuchung der *C. paradoxa* RNase P RNA

Gezeigt ist die Sekundärstruktur, die auf der Basis der bakteriellen Konsensusstruktur erstellt wurde (Haas *et al.*, 1994). Nukleotide die in der chemischen Strukturuntersuchung sensitiv unter nativen (N) und denaturierenden (D) Bedingungen waren, sind durch offene oder gefüllte schwarze Kreise gekennzeichnet. Phosphodiesterbindungen, welche für Nukleasen unter nativen Bedingungen zugänglich waren, sind durch rote Dreiecke (RNase T1), grüne Dreiecke (RNase 1) und blaue Rauten (RNase V1) markiert. Spaltungen durch RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen sind durch schwarze Dreiecke dargestellt (Cordier und Schön, 1999).

In den Plastomen höherer Pflanzen können hingegen keine Sequenzhomologien zu RNase P RNAs gefunden werden. In Analogie zur Mehrzahl der Cyanobakterien, jedoch im Gegensatz zu den meisten anderen Bakteriengruppen, enthält die Cyanellen-RNase P RNA keine Bindungsstelle für das pre-tRNA 3'-CCA-Ende in J15/16. Ihre Sequenz weicht an zwei sonst voll konservierten Positionen vom bakteriellen Konsensus ab (A213, A22). Durch chemische (mit DMS und CMCT) und enzymatische (mit RNase 1, RNase T1 und RNase V1) Strukturuntersuchungen des *in vitro* Transkriptes, konnte die postulierte Sekundärstruktur vom Typ A bestätigt werden (Abb. 1-16; Cordier und Schön, 1999).

Die beobachtete Fragmentierung der RNA während der Aufreinigung des Holoenzym führt nicht zu einer signifikanten Abnahme der Enzymaktivität. Insbesondere die Fragmentierung der

einzelsträngigen Schleife J15/16 im katalytisch aktiven Holoenzym schliesst eine Beteiligung dieser Region an der Substraterkennung, wie sie für alle bisher untersuchten bakteriellen RNase P RNAs gezeigt wurde, aus.

Da die Behandlung mit einer exogenen Nuklease die RNase P-Aktivität jedoch irreversibel zerstört, muss die identifizierte RNA-Untereinheit dennoch eine essentielle Komponente für die katalytische Aktivität des Enzyms sein (Cordier und Schön, 1999). Trotz dieser Ergebnisse und der großen Ähnlichkeit der Cyanellen-RNase P RNA zum Cyanobakterien-Typ, zeigt *in vitro* synthetisierte RNA auch unter Hochsalzbedingungen keine Ribozym-Aktivität. Wie durch Mutationsanalyse gezeigt wurde, ist die Abweichung vom bakteriellen Ribozymkonsensus in den Positionen A22 und A213 hierfür nicht verantwortlich (Cordier, 1998; Heubeck, 2003). Das Fehlen des CCA-Bindungsmotivs in nahezu allen cyanobakteriellen RNase P RNAs schließt eine hierdurch verhinderte Substratbindung als Grund für die fehlende Cyanellen-Ribozym-Aktivität ebenfalls aus (Hess *et al.*, 1998).

Um weitergehend zu untersuchen, ob die fehlende Ribozymaktivität von *C. paradoxa* RNase P RNA auf das Fehlen der Fähigkeit zur Substratbindung zurückzuführen ist, wurde eine zirkular permutierte *C. paradoxa* RNase P RNA mit kovalent verknüpfter pre-tRNA (pre-tRNA^{Glu}, pre-tRNA^{Tyr}) konstruiert. Hierbei zeigte keines der Konstrukte *in vitro* Prozessierungsaktivität. Heterologe Rekonstitution dieser Konstrukte mit rekombinantem *Synechocystis* RNase P Protein zum Holoenzym, erbrachte hingegen eine erfolgreiche intramolekulare Prozessierung von pre-tRNA^{Tyr} (Heubeck, 2003). Im Gegensatz zur RNA-Untereinheit kann im Cyanellen-Genom keine zum bakteriellen *rnpA*-Gen homologe codierende Sequenz identifiziert werden. Dies gilt für alle bekannten Genome primitiver Plastiden (Reith und Munholland, 1995; Löffelhardt *et al.*, 1997, Kowallik, 1997).

Da die geringe Dichte im Cs₂SO₄-Gradienten der Cyanellen-RNase P auf einen nur geringen RNA-Anteil und die durch Gelfiltration bestimmte Größe des Enzyms auf einen Protein-Anteil von mehr als 50 % hinweist, lässt sich folgern, dass Cyanellen-RNase P einen wesentlich höheren Protein-Anteil als bakterielle Enzyme besitzt (Cordier, 1998).

C. paradoxa RNase P RNA lässt sich mit den rekombinanten cyanobakteriellen Proteinen aus *Synechocystis* PCC6803 und *P. marinus* PCC9511 zum katalytisch aktiven Holoenzym rekonstituieren. Als Substrate wurden *E. coli* pre-tRNA^{Tyr}, Cyanellen pre-tRNA^{His} und *P. marinus* pre-tRNA^{Arg} sowie pre-tRNA^{Arg} ohne 3'-CCA-Ende erkannt (Heubeck, 2003). Eine Rekonstitution des aktiven Holoenzymes mit *B. subtilis* Protein hingegen erfolgt sehr ineffizient, mit *E. coli* RNase P Protein gar nicht (Cordier, 1998). Die trotz der grossen Homologie zu bakteriellen RNase P RNAs fehlende Ribozymaktivität von *C. paradoxa* spricht für weitergehende Aufgaben der Protein-Untereinheit, als dies für das bakterielle Protein der Fall ist. Da aber die heterologe Rekonstitution von *C. paradoxa* RNase P RNA und cyanobakteriellen RNase P Proteinen zum aktiven Holoenzym möglich ist, muss dennoch davon ausgegangen werden, dass keine essentiellen Katalyseaufgaben auf die *C. paradoxa* Protein-Untereinheit übergegangen sind.

1.6. Nukleotidyltransferase

Die Nukleotidyltransferase (Ntase, ATP(CTP):tRNA Nukleotidyltransferase, CCCase) ist am komplexen Prozess der 3'-Prozessierung von tRNAs beteiligt.

In allen genetischen Systemen werden tRNAs als Vorläufermoleküle transkribiert, die neben überhängenden Sequenzen an 5'- und 3'-Ende, vereinzelt auch Introns, aufweisen. Damit die tRNA ihre volle biologische Funktion in der Translation erfüllen kann, muss sie an beiden Enden prozessiert und gegebenenfalls auch gespleißt werden. Während die endonukleolytische Prozessierung am 5'-Ende durch die RNase P in allen biologischen Reichen einheitlich verläuft, ist die Entfernung der 3'-Flanke von Organismus zu Organismus verschieden. Am Ende dieser beiden Prozessierungen sind weitere Prozessierungsschritte nötig, um eine funktionelle tRNA zu erhalten. So wird posttranskriptionell am 3'-Ende die konservierte Sequenz CCA angehängt sowie gelegentlich auch Basen innerhalb der tRNA gegen ungewöhnliche Nukleotide ausgetauscht bzw. einzelne Seitengruppen addiert oder ausgetauscht. In einigen tRNAs kann zusätzlich durch Editing der Einbau oder Austausch einzelner Nukleotide stattfinden. Hat die tRNA die verschiedenen Prozessierungsschritte durchlaufen, wird sie am 3'-CCA-Ende mit der für sie spezifischen Aminosäure beladen und kann ihre Funktion in der Proteinbiosynthese einnehmen.

In *E. coli*, wo das CCA-Ende bereits in den tRNA-Genen codiert ist, beginnen Endonukleasen (RNase III und RNase E) am 3'-Ende mit der Prozessierung, gefolgt von Exonukleasen (RNase II, BN, D, PH, T und PNPase). Auf die anschließende Prozessierung der 5'-Flanke durch RNase P folgt die Reifung des 3'-Endes durch Exonukleasen bis zur Sequenz CCA (Deutscher, 1995). Die in *E. coli* vorhandene Ntase hat folglich nur die Aufgabe, defekte CCA-Enden zu reparieren.

Die Prozessierung der beiden Enden findet bei Eukaryoten, bei denen für die tRNAs das CCA-Ende nicht codiert ist, welche aber teilweise Introns enthalten, im Kern statt. Die 3'-Reifung geschieht hier meist durch Endonukleasen, obwohl auch vereinzelt die zusätzliche Beteiligung von Exonukleasen festgestellt wurde (Papadimitriou und Gross, 1996).

Sind Introns in den tRNAs enthalten, kann die Konzentration an pre-tRNA die Reihenfolge von Spleißen und Prozessierung beeinflussen. Die Reihenfolge von 5'- und 3'-Prozessierung ist ebenfalls von der Vorläufer-tRNA-Konzentration abhängig (Castano *et al.*, 1985; Han und Kang, 1997). Allen Eukaryoten ist aber gemein, dass das 3'-CCA-Ende durch die Nukleotidyltransferase angehängt wird.

In Organellen besitzen die tRNAs nach der Transkription lange flankierende Sequenzen und im Allgemeinen kein 3'-CCA-Ende. Auch Introns sind kaum vorhanden (Marechal-Drouard *et al.*, 1993).

Die 3'-Prozessierung in Organellen spiegelt mehr den endonukleolytischen Pfad der Eukaryoten wider, und weniger den bakteriellen Prozessierungsweg. In Archaea ist die 3'-Reifung von tRNAs zwar weniger gut untersucht, sie scheint aber ebenfalls mehr dem eukaryotischen Mechanismus der Prozessierung durch Endonukleasen zu gleichen. Das CCA-Ende ist lediglich bei der Hälfte der tRNA-Gene codiert, so dass es durch die Ntase angehängt oder repariert werden muss. Die 5'-

Prozessierung findet dabei vor der 3'-Reifung statt, gefolgt von der CCA-Addition durch Ntase (Palmer *et al.*, 1994).

Die Überfamilie der Nukleotidyltransferasen wird anhand der Sequenzen in zwei Klassen unterteilt (Yue *et al.*, 1996). In der Klasse I sind das CCA-Enzym aus Archae, DNA-Polymerase β (Pol β), eukaryotische Poly(A) Polymerase (PAP), terminale Deoxynukleotidyltransferase (TdT), Kanamycin Ntase und Streptomycin Adenyltransferase. Klasse II Enzyme beinhalten das eukaryotische und eubakterielle CCA-Enzym und eubakterielle PAP.

Die Fähigkeit der Ntase, als RNA-Polymerase ohne Nukleinsäure-Matrize Nukleotide zu addieren, teilt sie nur mit PAP und TdT. Der Primer, an den die Nukleotide angehängt werden, muss dabei lediglich die richtige chemische Zusammensetzung aufweisen (Martin *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu PAP und TdT weist die Ntase aber eine höhere Spezifität auf, da sie nur tRNA-ähnliche Strukturen erkennt und lediglich die definierte Sequenz CCA addiert (Shi *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2002).

Wie neueste Kristallstrukturen des Enzym-Substrat-Komplexes von Klasse I (Xiong und Steitz, 2004) und Klasse II Enzymen (Tomita *et al.*, 2004) belegen, findet die metallkatalysierte Nukleotidaddition in einer einzigen Bindungsstelle statt. Zwei tRNA Moleküle binden an ein Ntase-Dimer, indem jede tRNA jeweils nur an die große Furche einer Proteineinheit mit ihrem Acceptor-Stamm und der T ψ C-Schleife bindet. Somit kann das 3'-Ende der tRNA in das aktive Zentrum ragen. Während der CCA-Addition verbleibt der Acceptor-Stamm, der durch elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen seines Rückgrates am Protein bindet, sowie die Diskriminatorbase A73 am Protein fixiert. Der wachsende 3'-Terminus hingegen faltet sich nach jedem Additionsschritt neu, um das als Primer fungierende terminale Nukleotid immer in die optimale Position der Bindungstasche zu bringen. Somit können die hereinkommenden NTPs immer in einer einzigen Bindungstasche addiert werden. Die Substratspezifität wird erreicht, indem Aminosäuren und Primer als Kollektiv die optimale Bindungstasche für das als nächstes einzubauende Nukleotid bereitstellen. Durch die Ausbildung basenspezifischer Wasserstoff-Bindungen für CTP und ATP werden somit UTP und GTP für den Einbau in das CCA-Ende diskriminiert und CTP und ATP in der richtigen Reihenfolge addiert. Ist das CCA-Ende komplett, nimmt es eine stabilisierte gestapelte Form an, die verhindert, dass A76 eine katalytisch aktive Geometrie aufweist, um weitere NTPs zu addieren (Xiong und Steitz, 2004).

Die Ntase ist zusätzlich fähig, auch Nukleotid-Analoga in das 3'-Ende der tRNAs einzubauen. So konnte von Sprinzl *et al.* (1977) gezeigt werden, dass Nukleotidyltransferase aus Hefe unter nicht physiologischen Konzentrationen an Enzym und Nukleotid basen- und ribosemodifizierte ATP- und CTP-Analoga sowie ATP-Phosphorothioate einbaut (Sprinzl *et al.*, 1977; Cho *et al.*, 2003).

Durch die Verwendung von Phosphorothioaten (R_p-NTP α S, S_p-NTP α S) konnte festgestellt werden, dass ausschließlich das S_p-Isomer unter Inversion der Konfiguration eingebaut wird (Eckstein *et al.*, 1977; Cho *et al.*, 2003).

1.7. Aufgabenstellung

Die *P. marinus* RNase P RNA zeigt im heterologen *in vitro* Prozessierungssystem eine einzigartige Substratspezifität für pre-tRNAs, die ein 3'-CCA-Ende besitzen. Dieses Verhalten widerspricht den Erwartungen, da tRNAs in *P. marinus* nicht mit dem CCA-Ende codiert sind und die RNase P RNA auch nicht das Bindungsmotiv für CCA-Enden aufweist. Um zusätzliche enzymkinetische Daten für die Substratspezifität der RNase P RNA von *P. marinus* zu gewinnen, sollte *P. marinus* pre-tRNA^{Arg} im homologen *in vitro* System prozessiert werden. Um den inkrementellen Beitrag der einzelnen Nukleotide des 3'-CCA-Endes zur Reaktion zu bestimmen, sollten am 3'-Ende variierte Substrate eingesetzt werden.

Crosslink-Methoden werden erfolgreich zur Untersuchung von RNase P eingesetzt. Durch sie können die Orientierung von spezifischen Elementen der RNA und Protein-Untereinheit, die Struktur des Ribozym-Substrat-Komplexes und die Substraterkennung untersucht werden. Da die *P. marinus* RNase P RNA *in vitro* katalytisch aktiv ist und kein GGU-Bindungsmotiv für das 3'-CCA-Ende der tRNAs besitzt, sollten durch verschiedene Crosslink-Strategien die Kontaktstellen des Ribozym-Substrat-Komplexes und die Bindungsstelle des 3'-CCA-Endes ermittelt werden. Hierzu sollte das photoinduzierbare Nukleotidanalogen s⁴U in die RNase P RNA eingebaut und diese modifizierte RNA mit dem Substrat kovalent vernetzt werden.

Als alternativer Ansatz sollte durch Modifizierung von pre- und mat-tRNA^{Arg} am 5'- und 3'-Ende mit verschiedenen Crosslink-Reagentien weitere Kontaktstellen zwischen RNase P RNA und tRNA im homologen *P. marinus*-System ermittelt werden.

Die RNase P RNA aus den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa* ist *in vitro* katalytisch inaktiv. Ein möglicher Grund für diese fehlende Ribozymeigenschaft könnte die Unfähigkeit zur Substratbindung sein. Durch entsprechende Crosslink-Experimente mit modifizierten tRNAs sollte die Ausbildung des Komplexes aus RNase P RNA und Substrat untersucht und damit mögliche Ursachen für die fehlende Ribozym-Aktivität dieser Organellen-RNase P RNA ermittelt werden.

2. Materialien

2.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der Qualität p.a. oder in der Qualität für Molekularbiologie eingesetzt.

2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Serva, Heidelberg
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal)	Roche Diagnostics, Mannheim
Acrylamid (AA)	Serva, Heidelberg
Agarose	Serva, Heidelberg
Ammoniak	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Grüssing, Filsum
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Detroit, USA
Borsäure	Riedel-de Haën, Seelze
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumacetat	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Riedel-de-Haën, Seelze
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Blau (G250)	Serva, Heidelberg
Coomassie Blau (R250)	Serva, Heidelberg
D(+)-Saccharose	Merck, Darmstadt
Dichlormethylsilan	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid (DMF)	Fluka, Neu-Ulm
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Roche Diagnostics, Mannheim
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt

Glycerin	Henkel, Düsseldorf
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Imidazol	BIOMOL, Hamburg
Iod	Riedel-de-Haën, Seelze
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isobuttersäure	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Fluka, Neu-Ulm
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche Diagnostics, Mannheim
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Grüssing, Filsum
L-Glycin	Roth, Karlsruhe
Magnesium(II)-Chlorid	Merck, Darmstadt
Magnesium(II)-Sulfat	Riedel-de Haën, Seelze
Mangan(II)-Chlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis)	Merck, Darmstadt
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat (NaOAc)	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumazid	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumcarbonat	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Riedel-de Haën, Seelze
ortho-Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Riedel-de Haën, Seelze
4'-Azido-2-brom-acetophenon (p-Azidophenacyl-Bromid, APA-Br)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Phenol	Riedel-de Haën, Seelze
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Dignostics, Mannheim
Polyethylenglykol 4000	Merck, Darmstadt
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Spermidin	Roche Diagnostics, Mannheim
Toluidinblau	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxy-methyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg

Wasserstoffperoxid (30 %)	Serva, Heidelberg
Xylencyanol FF (XCFF)	Serva, Heidelberg

2.2. Nukleotide und Oligonukleotide

2'-Deoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Ribonukleosid-5'-triphosphate (ATP, CTP, GTP, UTP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Hefe-tRNA	Roche Diagnostics, Mannheim
2-Thio-Cytosin-5'-triphosphat (s ² CTP)	IBA, Göttingen
4-Thio-Uridin-5'-triphosphat (s ⁴ UTP)	IBA, Göttingen
Adenosin-5'-(α -thio)-triphosphat, SP-Isomer (Sp-ATP α S)	Amersham, Braunschweig
Cytosin-5'-(α -thio)-triphosphat, SP-Isomer (Sp-CTP α S)	Amersham, Braunschweig
Guanosin-5'-monophosphat (GMP)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Guanosin-5'-monophosphorothioat (GMPS)	Biolog, Bremen

Radiochemikalien:

Adenosin-5' [γ ³² P]-triphosphat ([γ ³² P]-ATP) (spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig
Guanosin-5' [α ³² P]-triphosphat ([α ³² P]-GTP) (spezifische Aktivität: 400 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxyadenosin-5' [α ³² P]-triphosphat ([α ³² P]-dATP) (spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig
2'-Desoxycytosin-5' [α ³² P]-triphosphat ([α ³² P]-dCTP) (spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig

Oligonukleotid	Oligonukleotidsequenz	T _m
EcoT7Pmr	5'-GCG AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAA TCC TTC CAG TG-3'	118 °C (50 °C)
Pmr3-1	5'-CGC GGA TCC GGA TGT GAC GCC CTG GCG GGG CTG GCG GG-3'	136 °C (50 °C)
Pmr3-2	5'-CGC GGA TCC GGA TGG ACG CCC TGG CGG GGC TGG CGG G-3'	134 °C (50 °C)
Pmrmat	5'-pGGG GCT GTA GCT CAG TAG G-3'	62 °C
PmrT72	5'-TAT AGT GAG TCG TAT TAG AAT TC-3'	60 °C
PmrmatT7Eco	5'-GCG AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GGC TGT AGC TCA G-3'	118 °C (50 °C)

Univ.-Primer	5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'	48 °C
Rev.-Primer	5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'	68 °C
PmarGSP4	5'-CCA ACA GCC TCG AGC GGC-3'	62 °C
PmarGSP5	5'-GTG GGT GAT CAT CTA TCT G-3'	56 °C
PmarGSP6	5'-GGT TTA CCA AGC CAG TAC-3'	54 °C
PmarGSP7	5'-GGT GTG TTT CTG TGG C-3'	50 °C
PmarGSP8	5'-GAT CCG ACG CTT TCG AAA G-3'	58 °C
PmarGSP9	5'-GGG ACT GTT GTC TCC-3'	48 °C
PmarGSP10	5'-GCA AAA TGG TCA TCC-3'	44 °C
PmarGSP11	5'-CCT TGC ACC CAA CC-3'	46 °C
Arg1	5'-CGG GGC TGG CGG GAT TC-3'	60 °C
Arg2	5'-GAA ACC GTC GCT CTA TCC TAC-3'	64 °C
Arg3	5'-GTT TCC TAA ACC GTA GGT CG-3'	60 °C
CyGSP2a	5'-GTG TTT TTC TGT GGC ACT ATC CTC-3'	70 °C
CyGSP6a	5'-CGA ACT TAA TTT TAA GCC GGG-3'	53 °C
CyGSP7a	5'-GAA AAA AGG TTA ATT ACT TTC CG-3'	49 °C
CyGSP8a	5'-GTA TAG ATT TTG AAA TCT AAC TGG-3'	44 °C
CyCprpOL	5'-GTA AGC CGG GTT CTG TT-3'	52 °C
M1GSP1	5'-GTA AAG GTG AAA CTG ACC G-3'	56 °C
SplintDis1	5'-GAA GGA TTC CCC GGG GCT GGC G-3'	76 °C
SplintC1	5'-GAA GGA TTC CCG CGG GGC TGG C-3'	76 °C
SplintCC1	5'-GAA GGA TTC CCG GCG GGG CTG G-3'	76 °C
SplintCCA1	5'-GAA GGA TTC CCT GGC GGG GCT G-3'	74 °C

2.3. Enzyme und Proteine

AMV Reverse Transkriptase (AMV-RT)	Promega, Mannheim
<i>Bam</i> HI	NEB, Schwalbach
<i>Bst</i> NI	NEB, Schwalbach
CIP	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Dpn</i> I	NEB, Schwalbach
<i>Eco</i> RV	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Eco</i> RI	NEB, Schwalbach
<i>Fok</i> I	NEB, Schwalbach
<i>Hga</i> I	NEB, Schwalbach
<i>Hind</i> III	NEB, Schwalbach
Nukleotidyltransferase	Eigene Präparation
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	NEB, Schwalbach

Protein Längenstandard	Dr. A. Schön, Leipzig
<i>Pvu</i> II	Pharmacia, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V)	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase A	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase-Inhibitor (RNasin)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase T2	Roche Diagnostics, Mannheim
Sequenase 2.0	Amersham, Braunschweig
<i>Sma</i> I	NEB, Schwalbach
<i>Sna</i> BI	Roche Diagnostics, Mannheim
T4 DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
T4 RNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
T7 RNA-Polymerase	Dr. A. Schön, Leipzig
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	NEB, Schwalbach
<i>Tth</i> -DNA-Polymerase	Biozym, Oldendorf

2.4. Plasmide

pCCA	Prof. A. Weiner, New Haven USA
pCyEH4.3	M. Baum, Würzburg
pDW27	Dr. D. Waugh, Boulder USA
pPmarE2.4	Dr. A. Schön, Leipzig
pSu3-wt	Dr. G. Krupp, Kiel
pT7CyRPR-wt	C. Fingerhut, Würzburg
pT7Pmk	O. Gimple, Würzburg
pUC19	C. Fingerhut, Würzburg

2.5. Biologisches Material

Bakterienstämme zur Klonierung

<i>E. coli</i> DH5 α	Dr. A. Schön, Leipzig
<i>E. coli</i> JM109	Dr. A. Schön, Leipzig

Bakterienstamm zur Überexpression im T7-System

BL21(DE3)	Invitrogen, Paisley UK
<u>Eigenschaften:</u> $recA^-$, $endA^-$, dcm^- , gal^+ , lac^- , lon^+ , F^- , uvr^- , rne^- $hsdS_B(r_B-m_B^-)$, (DE3)	

2.6. Chromatographiemedien

Cellulose Dünnschichtplatte	Merck, Darmstadt
-----------------------------	------------------

F254 fluoreszierende Kieselgel-Dünnschichtplatte	Merck, Darmstadt
Nickel-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nucleobond AX5	Macherey und Nagel, Düren
Nucleobond AX500	Macherey und Nagel, Düren
PEI-Cellulose Dünnschichtplatte	Merck, Darmstadt

2.7. Gebrauchsfertige Analyse-Reagentiensätze

ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Ready Reaktion	Perkin Elmer, Foster City, CA, USA
JETprep Plasmid DNA Isolation und Purification Kit	Genomed, Bad Oyenhausen
JETquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed, Bad Oyenhausen
JETquick PCR Purification Spin Kit	Genomed, Bad Oyenhausen
QIAquick-Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick-spin PCR-Purification Kit	Qiagen, Hilden
Sequenase 2.0 Sequencing Kit	Amersham, Braunschweig

2.8. Geräte und sonstige Materialien

Abi PRISM Genetic Analyser	Perkin Elmer, Foster City, CA, USA
Aluminiumplatten	Eigenbau des Instituts für Biochemie, Würzburg
<i>amber tubes</i> (dunkelbraun gefärbte Reaktionsgefäße)	Eppendorf, Hamburg
Apparaturen für die horizontale Gelelektrophorese	Pharmacia, Freiburg
Apparaturen für die vertikale Gelelektrophorese	Eigenbau des Instituts für Biochemie, Würzburg
Corex Zentrifugenröhrchen	Corning Inc., Acton, USA
Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Faltenfilter	Macherey und Nagel, Düren
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher und Schüll, Dassel
Geltrockner Modell 223	BIO-RAD, München
Gene Pulser	BIO-RAD, München
Glasplatten	Eigenbau des Instituts für Biochemie, Würzburg
Hybaid Omni Gene	MWG-Biotech, Ebersberg
Kolbenhubpipetten	Gilson/Abimed, Langenfeld
	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Biofuge 28 RS	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge Hermle ZK400	Hermle, Gosheim
Rotoren AS6.9, AS8.4	

Kühlzentrifuge J2-21	Beckman Instruments, München
Rotoren JA-20, SS34, GSA, GS-3	
Kühlzentrifuge J-6B	Beckman Instruments, München
Rotoren JA-10, JA-13.1	
Kühlzentrifuge TJ-6	Beckman Instruments, München
Rotor JS 4.2	
Magnetrührer	IKA-Labortechnik, Staufen
Membran-Vakuumpumpe MZ2C	Vacubrand, Wertheim
Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrowellenherd R-8200E	Sharp-Elektronik, Hamburg
Parafilm „M“	American National Can, Greenwich USA
PhosphorImager	Molecular Dynamics, Kent, GB
Photometer Novaspec II	Pharmacia, Freiburg
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm Retina XBD	Photochemische Werke, Berlin
Rundschüttelinkubator HT	Infors, München
Sonificator	Branson, Denberry USA
Shutter-Brille	StereoGraphics, San Rafael, USA
SGI Octane Graphikrechner	Silicon Graphics, Gasbrunn
Spannungsgerät LKB ECPS 3000/150	Pharmacia, Freiburg
Speed Vac Concentrator SVC 100	Savant Instruments, Farmingdale, USA
Sterilbank HA 2458 GS	Heraeus, Hanau
Sterilfilter, Porengröße 0,22/0,45 µm	Schleicher und Schüll, Dassel
Szintillationszähler LS 5000 TD	Beckman Instruments, München
Thermoschüttelinkubator	Eppendorf, Hamburg
Tischschüttler Ika-Vibrax-VXR	IKA-Labortechnik, Staufen
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Rotor F45-18-11	
Tischzentrifuge Mikroliter	Hettich, Tuttlingen
UV-Auflichtlampe UVLMS38	UVP, Cambridge, GB
Verstärkerfolie Dr. Goos Spezial	Hartenstein, Würzburg
Vortexgerät	Bachofer, Reutlingen
Wasserbad	Ges. f. Laboratoriumsgeräte, Burgwedel

3. Methoden

3.1. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

3.1.1. Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA (Plasmide, PCR-Produkte) wird die horizontale Agarosegel-Elektrophorese verwendet (Sambrook und Russel, 2001).

Die aus D- und L-Galaktose alternierend linear aufgebaute Agarose wirkt hierbei als Molekularsieb für die bei neutralem pH negativ geladenen DNA-Moleküle, die im angelegten Spannungsfeld in Richtung der Anode wandern. Bei einer angelegten Spannung von weniger als 5 V/cm Elektrodenabstand verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit linearer, doppelsträngiger DNA umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl an Basenpaaren, wodurch bei gleichzeitiger Auftrennung eines Längenstandards die Größe der DNA-Fragmente durch Vergleich ermittelt werden kann. Die Trennleistung der Agarose ist dabei abhängig von ihrer eingesetzten Konzentration. Man verwendet je nach zu analysierender Probe Agarosekonzentrationen von 0,6 % bis 2,0 % (w/v) für Trennbereiche von 20 kbp bis zu 0,1 kbp.

Durch den Zusatz von Ethidiumbromid zu Gel- und Laufpuffer kann die Nukleinsäure nach erfolgter Elektrophorese im langwelligen UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden, da das Ethidiumbromid zwischen GC-Paare interkaliert und nach entsprechender Anregung fluoresziert. Die Nachweisgrenze für DNA liegt bei etwa 50-100 ng.

Parameter für die Agarose-Gelelektrophorese	
Gelmaß	Länge: 10 cm, Breite: 7 cm
Volumen der Gellösung	30 ml
Volumen des Puffers	450 ml
Spannung	60-90 V/1-2 h
Elektrodenabstand	15 cm

Mit einem breiten Klebeband wird die Gelkammer an den offenen Stirnseiten abgedichtet. Die Agarose (% w/v = Gelkonzentration) wird durch mehrmaliges Aufkochen im gewünschten Volumen Elektrophoresepuffer (1× TBE) vollständig gelöst. Die auf 60°C abgekühlte Lösung wird mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0.5 µg/ml) supplementiert, in die Gelkammer gegossen und der Taschenformer zügig eingesetzt. Nach dem Erstarren der Gelmatrix wird das Klebeband entfernt und die Gelkammer so in eine mit 1× TBE und Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0.5 µg/ml) gefüllte Apparatur gelegt, dass das Gel vollständig mit Puffer überschichtet ist. Erst jetzt wird der Taschenformer herausgezogen. Die aufzutragenden Proben werden mit 0,6 Volumen 2,5× Probenpuffer versetzt, in die Taschen pipettiert und schließlich durch Anlegen einer Spannung von 60-90 V elektrophoretisch aufgetrennt. Das Bandenmuster kann aufgrund der Fluoreszenz des Ethidiumbromids im langwelligen UV-Durchlicht sichtbar gemacht und fotografiert werden.

10× TBE			2,5× Probenpuffer		
	Endkonzentration	Einwaage/L		Endkonz.	Menge/10 ml
Tris	890 mM	107,8 g	Saccharose	25% (w/v)	2,5 g
H ₃ BO ₄	890 mM	55,02 g	Na ₂ EDTA (0,5 M)	50 mM	1,0 ml
Na ₂ EDTA	20 mM	7,44 g	BPB (1 %)	0,05 % (w/v)	500 µl
ddH ₂ O	ad 1000 ml		XCFE (1 %)	0,1 % (w/v)	1,0 ml
			ddH ₂ O	ad 10 ml	

3.1.2. Polyacrylamid-Elektrophorese zur Analyse von Nukleinsäuren

Die Stärke von Polyacrylamidgelen liegt in ihrer hervorragenden längenspezifischen Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten von 15-1000 bp. Hierzu kann die große Konzentrationsspanne von 20-3.5 % eingesetzt werden. Zusätzlich besitzen sie eine höhere Proben-Kapazität als Agarosegele.

Man unterscheidet zwischen nicht-denaturierenden Polyacrylamidgelen, mit denen doppelsträngige DNA- und RNA-Fragmente aufgrund ihrer nativen intra- und intermolekularen Wechselwirkungen aufgetrennt werden können, und denaturierenden Gelen, die man zur längenspezifischen Auftrennung von RNA und einzelsträngiger DNA benutzt. Denaturierende Gele enthalten 8 M Harnstoff, der die Ausbildung von Basenpaarungen und Sekundärstrukturen in den Nukleinsäuren verhindert, so dass diese nur nach ihrer Länge aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich denaturierende Polyacrylamid-gele verwendet.

Stammlösungen für denaturierende Polyacrylamidgele (500 ml)

Konzentration	6 %	7 %	8 %	10 %	15 %	20 %
AA/Bis (29:1) 40 %	75 ml	87,5 ml	100 ml	125 ml	187,5 ml	250 ml
10× TBD	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
Harnstoff	240,8 g	240,8 g	240,8 g	240,8 g	240,8 g	240,8 g
ddH ₂ O	ad 500 ml	ad 500 ml	ad 500 ml	ad 500 ml	ad 500 ml	ad 500 ml

Gelmaße	20 × 20 cm	20 × 40 cm	20 × 60 cm
Volumen der Gellösung	25 ml	45 ml	90 ml
TEMED/APS(10 % (w/v)) 6-8% -Gele	30 µl/ 300 µl	40 µl/ 300 µl	80 µl/ 200 µl
TEMED/APS(10 % (w/v)) 9-12% -Gele	30 µl/ 250 µl	40 µl/ 200 µl	80 µl/ 150 µl
TEMED/APS (10 % (w/v)) 15-20% -Gele	30 µl/ 200 µl	40 µl/ 150 µl	80 µl/ 100 µl
Trennleistung	10 W/ 20 W	10 W/ 40 W	20 W/ 60 W
Abstandshalter	0,035 cm, 0,040 cm 0,045 cm, 0,1 cm (40 ml)	0,035 cm, 0,040 cm 0,045 cm, 0,1 cm (80 ml)	0,040 cm 0,1 cm (200 ml)

Für ein Gel mit den Maßen 20 × 40 × 0,04 cm werden 45 ml Gellösung benötigt. Nach Zugabe von 40 µl TEMED und 300-150 µl 10 % APS, welche die Polymerisation induzieren, wird die Lösung luftblasenfrei zwischen zwei durch Abstandshalter getrennte Glasplatten gegossen und der

Taschenformer eingesetzt. Man lässt das Gel in horizontaler Lage polymerisieren, bevor es, nach Entfernung des Taschenformers und des ihm gegenüberliegenden Abstandshalters, in vertikaler Position mit den Taschen nach oben in eine geeignete Apparatur mit Elektrophoresepuffer (1× TBD) eingespannt wird. Die hintere Glasplatte wird mit einer 1-3 mm dicken Aluminiumplatte bedeckt, um eine gleichmäßige Wärmeverteilung zu gewährleisten.

Die zu analysierenden Proben befinden sich in Harnstoffpuffer (RNA) oder Formamidpuffer (DNA) und werden direkt vor dem Auftragen durch Erhitzen (90 °C, 2 min) denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt und das Kondenswasser kurz abzentrifugiert. Unmittelbar vor dem Auftragen der denaturierten Proben werden die Taschen mehrmals gründlich mit Elektrophoresepuffer gespült.

Zum Einlaufen der Proben wird eine Leistung von 10 W gewählt, bis sich die beiden Farbstoffe BPB und XCFE getrennt haben. Die weitere Elektrophorese wird mit maximaler Leistung von 40 W durchgeführt. Nach der Auftrennung können die Nukleinsäuren durch Fluoreszenzlöschung (3.1.3.2.), Anfärben mit Toluidinblau (3.1.3.3.), oder wenn sie radioaktiv markiert sind, durch Autoradiographie (3.1.3.1.) sichtbar gemacht werden.

Harnstoffpuffer			Formamidpuffer		
	Endkonz.	Volumen/ 10 ml		Endkonz.	Volumen/ 10 ml
Harnstoff (9 M)	8 M	8,89 ml	Formamid	90 %	9,0 ml
BPB (1 %, (w/v))	0,03 %	0,3 ml	Na ₂ EDTA (0,5 M)	20 mM	0,4 ml
XCFE (1 %, (w/v))	0,03%	0,3 ml	BPB (1 %)	0,03 %	0,3 ml
ddH ₂ O	ad 10 ml		XCFE (1 %)	0,03%	0,3 ml
			ddH ₂ O	ad 10 ml	

10× TBD		
	Endkonzentration	Einwaage/ l
Tris	900 mM	109,0 g
H ₃ BO ₄	900 mM	55,6 g
Na ₂ EDTA	25 mM	9,3 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

3.1.3. Lokalisierung von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen

3.1.3.1. Lokalisierung durch Autoradiographie

Für die Autoradiographie von aufgetrennten radioaktiv markierten Nukleinsäuren wird eine der beiden Glasplatten abgehoben und das auf der anderen Platte haftende Gel auf ein Whatman 3MM-Filterpapier übertragen, mit Haushaltsfolie bedeckt und auf einem Gelrockner bei 80 °C für 45 min getrocknet. Das Gel wird bei RT auf einem Röntgenfilm exponiert. Die optimalen Expositionsbedingungen sind von der eingesetzten Menge an Radioaktivität abhängig. Neben der Expositionsdauer des Röntgenfilmes können Signale durch die Verwendung von Verstärkerfolie (Dr. Goos Spezial), vorsensibilisiertem Film und Lagerung bei -80 °C verstärkt werden. Wahlweise kann das Bandenmuster auch über Exponierung in einer PhosphorImager-Kassette sichtbar gemacht werden.

Zur Autoradiographie von radioaktiv markierten Nukleinsäuren im präparativen Maßstab wird das Gel mit Haushaltsfolie abgedeckt, mit Fluoreszenzmarkern versehen, ein Röntgenfilm aufgelegt und mit einer Glasplatte abgedeckt. Nach der Exposition und Entwicklung des Röntgenfilmes ist durch die Fluoreszenzmarker eine eindeutige Positionierung des Films relativ zum Gel möglich. Die so lokalisierten Banden können nun mit einem Skalpell ausgeschnitten werden.

3.1.3.2. Lokalisierung durch Fluoreszenzlöschung

Größere Mengen an Nukleinsäuren, die in präparativen Gelen aufgetrennt wurden, können durch Fluoreszenzlöschung leicht lokalisiert werden.

Das beidseitig mit Haushaltsfolie bedeckte PAA-Gel wird nach der Elektrophorese auf eine im UV-Licht fluoreszierende DC-Platte (F254) gelegt und mit UV-Aufflicht (254 nm) bestrahlt. Größere Nukleinsäuremengen löschen bei Licht dieser Wellenlänge die Fluoreszenz der Platte und sind als blau-graue Schatten sichtbar. Die entsprechenden Banden werden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Nukleinsäuren nach (3.1.4.2.) eluiert. Diese Methode ist allerdings weitaus weniger sensitiv als die Autoradiographie und kann nur bei Nukleinsäure-Mengen ab 1 µg eingesetzt werden.

3.1.3.3. Lokalisierung durch Anfärben mit Toluidinblau

Toluidinblau ist ein kationischer Farbstoff, der sich an Nukleinsäuren anlagert und diese nach der Gelentfärbung so sichtbar macht. Die Nachweisgrenze für diese Methode liegt bei 50 - 100 ng an Nukleinsäure. Zur Anfärbung wird das Polyacrylamidgel von beiden Glasplatten getrennt und in einer Färbelösung ca. 30 min vorsichtig geschüttelt. Die Färbelösung wird abgegossen und das Gel mit einer Entfärbelösung, welche mehrmals gewechselt wird, überschichtet. Das Gel wird solange entfärbt bis die Nukleinsäurebanden deutlich sichtbar werden und die Hintergrundfärbung nahezu verschwunden ist. Analytische PAA-Gele können auf Whatman 3MM-Filterpapier getrocknet und so archiviert werden. Bei präparativen Gelen werden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die Nukleinsäuren eluiert (3.1.4.2.).

Toluidinblau-Färbelösung			Entfärbelösung		
	Endkonz.	Menge/ 1 L		Endkonz.	Menge/ 1 L
Toluidinblau	0,4 % (w/v)	4,0 g	Methanol	35 % (v/v)	350 ml
Methanol	50 % (v/v)	500 ml	Essigsäure	1 % (v/v)	10 ml
Essigsäure	1 % (v/v)	10 ml	ddH ₂ O	ad 1000 ml	
ddH ₂ O	ad 1000 ml				

3.1.4. Elution von gelelektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren aus der Gelmatrix

3.1.4.1. Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Isolierung werden die durch Ethidiumbromid gefärbten Nukleinsäure-Fragmente unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm lokalisiert und zügig ausgeschnitten. Die weitere Aufarbeitung erfolgt mit Hilfe des *JETquick Gel Extraction Spin Kits (Genomed)* nach der Herstellervorschrift. Dabei werden die Nukleinsäuren bei hoher Salzkonzentration an die Oberfläche einer Silikamatrix-Suspension gebunden und bei niedrigerer Konzentration wieder abgelöst. Durch die Verwendung von vorgewärmtem (65 °C) TE-Puffer (pH 8,0) kann die Ausbeute erhöht werden.

TE-Puffer		
	Endkonz.	Einwaage/ 1 L
Tris-HCl (1 M; pH 7,2)	10 mM	10 ml
Na ₂ EDTA (0,5 M)	1 mM	2 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

3.1.4.2. Elution von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Nach der Lokalisierung der gelelektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren wird der entsprechende Gelbereich mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten, zerkleinert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl Elutionspuffer wird die Probe 20 min bei -20 °C eingefroren, um die Gelmatrix aufzubrechen. Nach Elution über Nacht (RT, IKA-Vibrax-VXR, 1600 UpM) wird der Überstand abgenommen und nochmals mit 200 µl Elutionspuffer für 3 h eluiert. Die Nukleinsäurefraktionen werden anschließend vereinigt und präzipitiert (3.2.1.).

Elutionspuffer		
	Endkonz.	Volumen/ 500 ml
Tris-HCl (1 M; pH 7,0)	500 mM	250 ml
Na ₂ EDTA (0,5 M)	1 mM	1 ml
SDS (10 % (w/v))	0,1 % (w/v)	5 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml	

-Die Zugabe des SDS erfolgt erst nach dem Autoklavieren der Lösung –

3.2. Isolierung von Nukleinsäuren

3.2.1. Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren können durch Zugabe von Ethanol aus wässrigen Lösungen nahezu quantitativ ausgefällt werden.

Die Alkalisalze von DNA und RNA sind in 70 % Ethanol praktisch unlöslich, da die geladenen Phosphat- und Phosphatdiestergruppen nicht mehr ausreichend hydratisiert vorliegen und somit die

Aggregation erleichtert wird. Dieser Effekt kann durch Zusatz gut löslicher Salze (NaOAc, NH₄OAc, LiCl, KCl), die mit den Nukleinsäuren um die Hydrathülle konkurrieren, zusätzlich verstärkt werden. Man gibt zur wäßrigen Nukleinsäurelösung 2,5 Vol. Fällungslösung, mischt gut und inkubiert 30 min bei -70 °C oder 1 h bei -20 °C. Durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge 28 RS, 4 °C, 17000 UpM, 30 min) werden die Nukleinsäuren sedimentiert.

Das Präzipitat wird nach der Abnahme des Überstandes zur Entfernung ausgefallener Salze mit 1 Vol. 70 % Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 28 RS, 4 °C, 17000 UpM, 20 min).

Nach quantitativem Entfernen des Überstandes wird das Nukleinsäuresediment im Exsikkator getrocknet und anschließend in einem geeigneten Volumen ddH₂O oder Puffer aufgenommen.

Die Konzentration der Nukleinsäure kann nach (3.2.2.) bestimmt bzw. bei radioaktiver Markierung im Szintillationszähler vermessen werden.

Fällungslösung	
	Volumen/ 50 ml
NaOAc (2 M; pH 5,5)	2 ml
Ethanol (96%)	ad 50 ml

3.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wäßriger Lösung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt spektralphotometrisch durch Bestimmung der Absorption bei 260 und 280 nm. Als Referenz wird das Photometer (Novaspec II, Pharmacia) auf das entsprechende Lösungsmittel bzw. Puffer geeicht.

Die A₂₆₀-Einheiten geben Aufschluß über die in der Lösung vorhandene Nukleinsäurekonzentration, da hier das Absorptionsmaximum der Purin- und Pyrimidinbasen von Nukleinsäuren liegen und somit durch den direkten Zusammenhang zwischen Absorption und Basen-Konzentration die Konzentrationsbestimmung möglich ist.

Bedingt durch den Hypochromie-Effekt unterscheiden sich die Extinktionskoeffizienten für doppel- und einzelsträngige Nukleinsäuren. Eine A₂₆₀-Einheit entspricht 50 µg/ml für dsDNA und 40 µg/ml für ssDNA sowie dsRNA, bzw. 33 µg/ml für ssRNA bzw. einzelsträngiges Oligonukleotid.

Durch die Messung der Absorption bei 280 nm (A₂₈₀), dem Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäurereste, kann zusätzlich eine Aussage über den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren gemacht werden. Hierzu wird das Verhältnis von A₂₆₀/A₂₈₀ gebildet. Dieses beträgt für reine DNA 1,8 und 2,0 für RNA. Eventuell vorhandene Verunreinigungen durch Proteine oder organische Lösungsmittel (z.B. Phenol) verschieben diese Verhältnisse nach unten (Sambrook *et al.*, 2001).

3.2.3. Abtrennung von Proteinen aus wässrigen Nukleinsäurelösungen

Zum Entfernen von Proteinen aus wässrigen Protein-Nukleinsäurelösungen wird die Lösung mit 1 Vol. TE-gesättigtem Phenol (pH 8,0) gründlich gemischt. Nach Zentrifugation (Eppendorf 5415 C,

Rotor F45-18-11, 12000 UpM, RT, 5 min) enthält die obere wässrige Phase die Nukleinsäuren und wird vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Phenolphase wird mit 1 Vol. ddH₂O gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden anschließend zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und die Nukleinsäuren mit EtOH ausgefällt (3.2.1.).

3.2.4. Isolierung von Plasmid-DNA

3.2.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab und Anlegen von Glycerinkulturen

Nach Ligation eines PCR-Fragments in den gewünschten Vektor, der Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen und der Selektion durch Antibiotika auf LB-Platten werden diskrete Klone von der LB-Platte abgenommen und in 5 ml antibiotikahaltigem (Ampicillin; 50 µg/ml) LB-Medium 6 h bei 37 °C unter Schütteln (Infors Rundschüttler HT, 160 UpM) inkubiert.

Von dieser Vorkultur wird eine Glycerinkultur angelegt. Hierzu werden 800 µl der Bakteriensuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 500 µl steriles 86 % Glycerin hinzugefügt. Die Glycerinkultur wird nach gründlichem Mischen bei -20 °C aufbewahrt. Die übrige Kulturlösung wird zur Isolierung der Plasmid-DNA mit dem *JET Prep Plasmid Miniprep Kit* der Firma *Genomed* aufgearbeitet.

Das Prinzip dieser Isolierung basiert auf alkalischer Lyse der Bakterien (Birnboim und Doly, 1979), Fällung verunreinigender Proteine und anschließende Bindung der Plasmid-DNA an eine Glaspartikelmatrix unter Hochsalzbedingungen.

Nach mehrfachem Waschen erfolgt die Elution mit zweimal 30 µl vorgewärmtem (37 °C) ddH₂O. Die durchschnittliche Ausbeute beträgt 15-20 µg DNA pro Ansatz.

Zur Kontrolle der Klonierung kann das Plasmid mit Restriktions-Endonukleasen (z.B. *Pvu II*) linearisiert und anschließend auf einem Agarosegel kontrolliert werden. Hierbei gewinnt man die Aussage, ob die Fremd-DNA in den Vektor ligiert wurde. Eine Sequenzierung bringt die eindeutige Kenntnis über Orientierung und Sequenz der Fremd-DNA.

3.2.4.2. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Wie bei der Plasmidisolierung im analytischen Maßstab werden die Nukleinsäuren im ersten Schritt durch alkalische Lyse freigesetzt, dann aber über Anionenaustauscher-Säulenchromatographie aufgereinigt. Hierzu werden Chromatographie-Säulen der Firma *Macherey & Nagel* (Nucleobond AX500, AX1000, AX2000) nach Herstellervorschrift verwendet.

Zunächst werden 500 ml antibiotikahaltiges LB-Medium (Ampicillin; 50 µg/ml) mit einer Vorkultur des betreffenden Klons angeimpft und 15-20 h bei 37 °C geschüttelt (Infors Inkubationsrundschtüttler HT, 120 UpM). Nach dem Ernten (Beckman Kühlzentrifuge J-6B, Rotor JA10, 4000 UpM, 4 °C, 10 min) wird der Überstand abdekantiert und das Bakteriensediment in 12 ml Puffer S1 resuspendiert. Durch Zusatz von 12 ml frisch zubereitetem Puffer S2 werden die Bakterien aufgeschlossen. Das

Lysat inkubiert 10 min bei RT. Dabei werden die Nucleinsäuren freigesetzt und die RNA hydrolysiert. Vorhandene Proteine und das proteinassoziierte Bakterienchromosom werden durch Zugabe von 10 ml Puffer S3 gefällt. Die in S3 enthaltenen Kaliumionen bilden mit SDS aus Puffer S2 das schwer lösliche Kaliumsalz des Dodecylsulfats. Alle Proteine, an die sich SDS angelagert hatte, werden mit dem organischen Salz ausgefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J-6B, Rotor JA10, 10000 UpM, 4 °C, 20 min) und der Überstand auf eine mit 5 ml Puffer N2 äquilibrierte Säule AX500 der Firma *Macherey-Nagel* gegeben. Nachdem die beladene Säule mit dreimal 12 ml Puffer N3 gewaschen wurde, wird die Plasmid-DNA mit dreimal 3 ml Puffer N5 in ein steriles Corex-Röhrchen eluiert.

Die Nucleinsäuren werden durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol bei RT (60 min) aus dem Eluat ausgefällt. Durch Zentrifugation (Beckman Kühlzentrifuge J-6B, Rotor: JA13.1, 10000 UpM, 4 °C, 20 min) wird die Plasmid-DNA sedimentiert und das Präzipitat mit 10 ml 70 % EtOH gewaschen. Es wird abermals wie zuvor zentrifugiert und das Nucleinsäuresediment im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Die DNA wird in 300 µl TE-Puffer (3.1.4.1.) aufgenommen und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (3.2.2.).

S1-Puffer			S2-Puffer		
	Endkonz.	Volumen/ 500 ml		Endkonz.	Volumen/ 500 ml
Tris (1 M)	50 mM	25 ml	NaOH (2 M)	200 mM	50 ml
Na ₂ EDTA (0,5 M)	10 mM	10 ml	SDS (10 %)	1 % (w/v)	50 ml
ad 500 ml ddH ₂ O; pH 8,0 (HCl); -autoklavieren-			ddH ₂ O ad 500 ml		
RNase A (100 mg/ml)	100 µg/ml	500 µl			

S3-Puffer			N2-Puffer		
	Endkonz.	Einwaage/ 500 ml		Endkonz.	Menge/ 500 ml
KOAc	2,8 M	137,4 g	Tris (1 M)	100 mM	50 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml; pH 5,1 (AcOH)		KCl	900 mM	33,5 g
			ddH ₂ O	ad 422 ml; pH 6,3 (H ₃ PO ₄)	
-autoklavieren-					
			EtOH (96 %)	15 % (v/v)	78,1 ml

N3-Puffer			N5-Puffer		
	Endkonz.	Menge/500 ml		Endkonz.	Volumen/500 ml
Tris (1 M)	100 mM	50 ml	Tris (1 M)	100 mM	50 ml
KCl	1150 mM	42,9 g	KCl	1000 mM	37,3 g
ddH ₂ O	ad 422 ml; pH 6,3 (H ₃ PO ₄)		ddH ₂ O	ad 422 ml; pH 6,3 (H ₃ PO ₄)	
-autoklavieren-					
EtOH 96 %	78,1 ml	15 %	EtOH 96 %	78,1 ml	15 %

3.3. Amplifizierung von DNA durch die Polymerasekettenreaktion

Die Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen ermöglicht es, eine DNA-Matrize in einer zyklischen Reaktion beliebig oft zu amplifizieren. Diese Polymerasekettenreaktion besteht im Wesentlichen aus 3 sich wiederholenden Schritten:

- 1) Denaturierung: Bei 94 °C wird die doppelsträngige DNA-Matrize in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen.
- 2) Hybridisierung (Annealing): Beim Hybridisierungsschritt binden die Plus- bzw. Minusstrang-Startsequenzen (Primer) an die DNA-Matrize. Dabei wird die Reaktionstemperatur 3-5 °C niedriger als die T_m des Matrizen/Oligodesoxynukleotid-Hybrids gewählt. Die primerspezifische Hybridisierungstemperatur kann nach der Schmelzpunkt-Formel (3.3.1.) berechnet werden. Die optimalen Reaktionsbedingungen sind dabei für jedes Primerpaar neu zu bestimmen.
- 3) Polymerase-Reaktion: Im Elongationsschritt werden die zuvor hybridisierten Oligodesoxynukleotide verlängert. Die dabei verwendeten Polymerasen besitzen ein Temperaturoptimum von 72-78 °C.

In dieser Arbeit wurden zur Amplifikation von DNA die hitzestabilen Enzyme *Tth*-DNA-Polymerase (aus dem Eubakterium *Thermus thermophilus*) und *Pfu*-DNA-Polymerase (aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*) verwendet. Die PCR-Reaktionen erfolgen in einem Thermocycler mit Heizdeckel (Hybaid, *Omnigene*). Um Kontamination zu vermeiden, wird ausschließlich mit aerosoldichten Spitzen gearbeitet.

3.3.1. Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von DNA-Matrizen

Wird bei der Amplifizierung von DNA-Fragmenten eine hohe Genauigkeit angestrebt, so wird bevorzugt *Pfu*-DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991; Cline *et al.*; 1996) verwendet, da dieses Enzym zusätzlich über 3'→5' Exonukleaseaktivität (*proof-reading*-Funktion) verfügt. Analytische PCR-Reaktionen werden in Mikroreaktionsgefäßen in einem Volumen von 20 µl, präparative Ansätze in 50 µl durchgeführt.

Amplifizierung von DNA durch PCR

Reaktionsansatz (20 µl)	Endkonzentration
1-10 µl Plasmid DNA (1 ng/µl)	0,1-1 ng/µl
2 µl 5'-Startoligonukleotid (10 µM)	1 µM (2,5 ng/µl)
2 µl 3'-Startoligonukleotid (10 µM)	1 µM (2,5 ng/µl)
2 µl dNTP-Mix (2 mM)	200 µM
2 µl 10× <i>Pfu</i> -Puffer	1×
1 µl <i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)	125 mU/µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Erfolgt die PCR direkt aus genomischer DNA, so werden 10-100 ng DNA eingesetzt. Als Kontrolle wird stets ein Ansatz ohne Matrizen-DNA durchgeführt.

Für eine Standardreaktion werden dabei die folgenden Programmparameter gewählt, wobei die Hybridisierungs-Reaktion 2-4 °C unter der T_m liegen sollte:

	<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Zyklenzahl</i>
Stufe 1	Denaturierung	94 °C	120 s	1
Stufe 2	Denaturierung	94°C	30 s	30-40
	Hybridisierung	T_m -(2-4 °C)	30 s	
	Elongation	72 °C	45 s*	
Stufe 3	Abschlussphase	72 °C	300 s	1
		25 °C	Hold	

Als Faustregel für die Bestimmung der Elongationsdauer rechnet man für *Taq*- und *Tth*-DNA-Polymerase mit 1 min/1000 bp zu amplifizierender DNA. Bei der Verwendung von *Pfu*-DNA-Polymerase hingegen mit 2 min/1000 bp. Die T_m wird dabei nach der Schmelzpunktformel $T_m (°C) = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ berechnet.

Nach der PCR wird jeweils ein Aliquot jedes Ansatzes (5-10 µl) mit 2,5× Agarosegelpuffer versetzt und zur Analyse in einem geeigneten Agarosegel aufgetrennt (3.1.1.).

3.3.2. Oligodesoxynukleotid-vermittelte bidirektionale Mutagenese

Durch PCR-gestützte bidirektionale Mutagenese können DNA-Sequenzen *in vitro* gezielt verändert werden. Hierbei sind Punktmutationen, Insertionen und Deletionen alleine durch das „Primer-Design“ möglich. In dieser Arbeit wurden ausschliesslich Deletionen in existierende Transkriptions-Plasmide eingeführt.

Dazu wird zirkuläre *dam*⁺-Plasmid-DNA, welche das zu deletierende Insert trägt, mit zwei gegenläufigen *Primern*, zwischen deren 5'-Enden die gewünschte Deletionsstelle liegt, in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Einer der beiden Primer muss bereits am 5'-Ende phosphoryliert eingesetzt werden. Da die Startsequenzen durch die *Pfu*-DNA-Polymerase verlängert werden, entsteht eine lineare Kopie der Plasmid-DNA, welche die Deletion enthält. Durch anschließende Zugabe von *Dpn* I, einem Restriktionsenzym, welches methylierte DNA hydrolysiert (Erkennungssequenz = 5'-Gm⁶ATC-3'), wird das ursprüngliche Plasmid abgebaut.

Im Anschluss wird dem Reaktionsgemisch *Pfu* DNA-Polymerase zugegeben und somit Basen entfernt, die fälschlicherweise bei der PCR-Reaktion am 3'-Ende angehängt wurden.

Die resultierenden linearen, zueinander komplementären DNA-Moleküle können zu einem doppelsträngigen Molekül hybridisieren und mit T4 DNA-Ligase intramolekular zum zirkulären Plasmid ligiert werden. Die Plasmide werden dann direkt in kompetente Zellen transformiert.

Für das Gelingen der Deletion ist die Konzipierung der Oligonukleotid-Startsequenzen ein wichtiger Punkt. Die verwendeten *Primer* müssen an verschiedenen Strängen des gleichen Moleküls hybridisieren und somit gegenläufig orientiert sein. Zusätzlich muss einer der beiden Primer am 5'-Ende phosphoryliert sein. Die gewünschte Deletionsstelle muss exakt zwischen den 5'-Enden der Primer liegen. Für die Ausbeute an mutierter DNA ist das Verhältnis von DNA-Matrize zur Startsequenz von entscheidender Bedeutung. Für jeden Ansatz ist deshalb die Konzentration der Templat-DNA variabel.

Bidirektionale Mutagenese-PCR

Reaktionsansatz (50 μ l)	Endkonzentration
1-10 μ l Plasmid DNA (5 ng/ μ l)	0,1-1 ng/ μ l
1 μ l 5'-Startoligonukleotid (10 μ M)	0,2 μ M (2,5 ng/ μ l)
1 μ l 3'-Startoligonukleotid (10 μ M)	0,2 μ M (2,5 ng/ μ l)
1 μ l dNTP-Mix (10 mM)	200 μ M
5 μ l 10 \times <i>Pfu</i> -Puffer	1 \times
1 μ l <i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/ μ l)	50 mU/ μ l
ddH ₂ O	ad 50 μ l

Die Zyklenzahl des PCR-Programms ist ebenfalls von Templat und Startsequenzen abhängig. Für das Einfügen einer Deletion sind 18 PCR-Zyklen ausreichend:

PCR Programm für Thermo-Cycler

	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Stufe 1	Denaturierung	95 °C	120 s	1
Stufe 2	Denaturierung	95°C	30 s	18
	Hybridisierung	T _m -(3-5 °C)	60 s	
	Elongation	68 °C	120 s/kb	
Stufe 3	Abschlussphase	68 °C	480 s	1

Nach der PCR-Reaktion wird der Ansatz kurz im Eisbad abgekühlt und danach direkt je 10 U *Dpn* I Restriktionsendonuklease und 1,25 U *Pfu*-DNA-Polymerase zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wird das Reaktionsgemisch für weitere 30 min bei 72 °C inkubiert, bevor 100 μ l ddH₂O, 10 μ l *Pfu*-Puffer (10 \times) und 5 μ l ATP (10 mM) zugegeben werden. Zu einem Aliquot (10 μ l) dieses Ansatzes werden 4 U T4 DNA-Ligase gegeben und bei 14 °C über Nacht inkubiert. Mit 2 μ l dieses Ansatzes können kompetente Zellen direkt transformiert werden (3.6.6.). Zur Kontrolle der einzelnen Reaktionsschritte werden jeweils entsprechende Aliquots entnommen und auf

Agarosegele (3.1.1.) aufgetragen. Die Plasmid-DNA (3.2.4.1.) der transformierten Klone wird durch Sequenzierung (3.5.2.) auf die gewünschte Deletion hin untersucht.

3.3.3. Analyse und Aufreinigung von PCR-Produkten

Der Erfolg einer PCR-Reaktion wird durch elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel (3.1.1.) kontrolliert. Wurde das gewünschte Fragment amplifiziert, so wird der Ansatz mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)* durch reversible Bindung an eine Silica-Matrix gereinigt. Soll nur ein spezielles DNA-Fragment aus dem PCR-Reaktionsgemisch isoliert werden, so wird die gewünschte Bande aus einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wird dann mit dem *QIAquick Gel Extraktion Kit* aus der Gelmatrix eluiert (3.1.4.1.).

3.4. *In vitro* Transkription mit T7-RNA-Polymerase

Mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus dem T7 Phagen können DNA-Sequenzen, die unter Kontrolle des T7-Promotors stehen, *in vitro* transkribiert werden (Milligan und Uhlenbeck, 1989). Hierzu sind folgende Schritte notwendig:

- Die zu transkribierende DNA-Sequenz muß unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen.
- Da die Effizienz der T7-RNA-Polymerase erhöht ist, wenn die Startbasen des zu transkribierenden Gens Guanosine sind, beginnen alle konstruierten Gene mit drei konsekutiven Guanosinen.
- Das die RNA codierende Plasmid wird durch eine geeignete Restriktions-Endonuklease linearisiert (z.B. *Fok I*), um eine „Endlos-Transkription“ zu vermeiden und den Terminationsort für die Polymerase festzulegen.
- Anschließend erfolgt die Synthese der RNA in einer *run off*-Transkription.

3.4.1. Herstellung von RNase-freiem ddH₂O

RNasen sind häufig resistent gegen Denaturierung durch Hitze oder Detergenzien und somit schwer inaktivierbar. Zur irreversiblen Inhibierung vieler RNasen kann Diethylpyrocarbonat (DEPC) verwendet werden. DEPC bewirkt eine Ethylierung von primären und sekundären Aminen und damit auch an die für die katalytische Funktion wichtigen His-Seitenketten im katalytischen Zentrum vieler RNasen. Da DEPC als Ethylierungsmittel kanzerogene Eigenschaften besitzt, werden alle Arbeiten unter einem Abzug ausgeführt.

1 ml DEPC wird mit 1000 ml ddH₂O in einer sauberen Glasflasche bei geöffnetem Schraubverschluss über Nacht gerührt. Nach entsprechender Verteilung in die zur längeren Lagerung gewünschten Aliquots wird abschließend autoklaviert, um überschüssiges DEPC zu hydrolysieren.

3.4.2. Linearisierung der Matrizen-DNA durch Restriktionshydrolyse

Für eine erfolgreiche *run-off*-Transkription müssen die Plasmide, die für die RNA codieren, linearisiert eingesetzt werden.

Plasmid-Linearisierung

Reaktionsansatz (100 µl)

25 µg Plasmid

10 µl 10× Reaktionspuffer

40 - 50 U Restriktions-Endonuklease

ad 100 µl ddH₂O

Der Ansatz wird für 3 h bei der jeweils vorgeschriebenen Temperatur inkubiert. Zur Kontrolle, ob die Restriktionshydrolyse erfolgreich war, werden 5 µl des Ansatzes mit einem geeigneten Längenstandard und nicht-linearisiertem Plasmid als Referenz auf einem 1,2 % Agarosegel aufgetrennt (3.1.1.).

War die Restriktionshydrolyse vollständig, wird der Reaktionsansatz phenolisiert (3.2.3.), das Phenol mit TE extrahiert und die vereinigten Überstände bei -70 °C für 30 min mit Ethanol präzipitiert und anschließend zentrifugiert (Heraeus, 17000 UpM, 4 °C, 30 min). Das Sediment wird in 250 µl TE-Puffer (pH 7,2) aufgenommen.

3.4.3. Präparative T7-Transkription

Zur präparativen T7-Transkription linearisierter DNA (3.4.2.) nach Milligan und Uhlenbeck (1989) wird nachfolgender Ansatz verwendet. Da die verwendete T7-Polymerase selbst überproduziert und aufgereinigt wurde, kann die hierfür angegebene Menge Schwankungen unterliegen.

Präparative T7-Transkription

Reaktionsansatz (250 µl)	Endkonzentration
125 µl Plasmid, linearisiert	50 ng/µl
25 µl 10× T7-Puffer	1×
25 µl rNTP-Mix (ATP, CTP, GTP, UTP, je 20 mM)	je 2 mM
2,5 µl T7-RNA-Polymerase (3,7 µg/µl)	37 ng/µl
ad 250 µl ddH ₂ O	

Um eine Zerstörung des synthetisierten Transkripts durch RNasen zu unterbinden, kann dem Ansatz zusätzlich 1 µl RNasin-Lösung (4 U/µl) beigelegt werden.

Der Ansatz wird über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 13 µl 0,5 M Na₂EDTA gestoppt, indem die für die enzymatische Reaktion essentiellen Mg²⁺-Ionen komplexiert

werden. Der Ansatz wird phenolisiert (3.2.3.) und die aus der wässrigen Phase ausgefällten Nukleinsäuren (3.2.1.) werden in Harnstoffpuffer aufgenommen und zur Reinigung über ein 6 % denaturierendes Polyacrylamidgel ($20 \times 20 \times 0,1$ cm) aufgetrennt (3.1.2.). Die Lokalisierung der RNA im Gel erfolgt mittels Fluoreszenzlöschung bei 254 nm (3.1.3.2.) oder durch Anfärben mit Toluidinblau (3.1.3.3.).

Anschliessend wird die RNA aus dem Gel eluiert (3.1.4.2.). Das getrocknete Transkript wird in insgesamt 300 μ l TE (pH 7,2) oder ddH₂O gelöst und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (3.2.2.).

10× T7-Puffer		
	Endkonzentration	Volumen/ 10 ml
Tris-HCl (1 M ; pH 8,0)	400 mM	4,0 ml
DTT (1 M)	50 mM	0,5 ml
Spermidin (200 mM)	10 mM	0,5 ml
MgCl ₂ (1 M)	120 mM	1,2 ml
ddH ₂ O	ad 10 ml	

3.4.4. Präparation radioaktiv markierter Transkripte

Als Matrizen-DNA wird der Vektor, der das Transkript codiert, linearisiert eingesetzt (3.4.2.). Zur Darstellung radioaktiv markierter Transkripte wird folgender Ansatz verwendet:

Analytische T7-Transkription radioaktiv markierter Transkripte

<i>Reaktionsansatz (20 μl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
6 μ l Plasmid linearisiert	30 ng/ μ l
2 μ l 10× T7-Puffer	1×
2 μ l rNTP-Mix (ATP, CTP, UTP, je 10 mM)	je 1 mM
2 μ l GTP (2mM)	0,2 mM
2 μ l [α - ³² P]-GTP (20 μ Ci)	1 μ Ci/ μ l
1 μ l T7-RNA-Polymerase (0,3 μ g/ μ l)	15 ng/ μ l
ad 20 μ l ddH ₂ O	

Dieser Ansatz wird für 2 h bei 37 °C inkubiert, mit kaltem ddH₂O auf 100 μ l aufgefüllt, phenolisiert, präzipitiert und das getrocknete Sediment in 10 μ l Harnstoffpuffer gelöst. Zur Aufreinigung wird das radioaktiv markierte Transkript auf ein denaturierendes 8 % Polyacrylamidgel ($20 \times 20 \times 0,04$ cm) aufgetragen (3.1.2.). Das Transkript wird durch Autoradiographie lokalisiert (3.1.3.1.), ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (3.1.4.2.). Das Präzipitat wird in einem entsprechenden Volumen ddH₂O gelöst, so dass sich eine Konzentration von 10×10^3 cpm/ μ l ergibt. Durch Zugabe von 0,02 % (w/v) Triton X-100 kann die Löslichkeit des Sedimentes erhöht werden.

3.4.5. Initiation der T7-Transkription mit GMPS und GMP

Durch die Zugabe von Nukleotid-Monophosphaten (NMP) in den Transkriptionsansatz erhält man die Ziel-RNA, welche am 5'-Ende mit einem Monophosphat beginnt. Dies ist möglich, da die verwendete T7-RNA-Polymerase NMPs als Substrate erkennt. Da aber nur mit Nukleotid-Triphosphaten eine Kettenverlängerung möglich ist, können die vorhandenen Monophosphate lediglich als Startnukleotid durch die T7-Polymerase verwendet werden. Die so gewonnene RNA kann in einer Ligationsreaktion z.B. zyklisiert oder intermolekular verknüpft werden oder am 5'-Ende radioaktiv markiert werden.

Eine zusätzliche Variante ist die Verwendung von Nukleotid-Monophosphorothioat (NMPS) als Zugabe in den Transkriptionsansatz. Hierbei wird eine RNA erhalten, bei der am 5'-Monophosphat ein Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt ist. Dieses Phosphorothioat bietet die Möglichkeit am Schwefelatom durch eine Substitutionsreaktion eine zusätzliche funktionelle Gruppe anzuhängen. Es kann z.B. ein p-Azidophenacyl (APA) angehängt werden (3.10.3.). Mit dieser funktionellen Gruppe können durch photochemische Anregung kovalente RNA-RNA Vernetzungen (Crosslinks) herbeigeführt werden (3.10.4.).

Dem Transkriptionsansatz werden GMP (Guanosine-5'-monophosphat; molares Verhältnis GTP:GMP 1:4) bzw. GMPS (Guanosine-5'-monophosphorothioat; *Biolog*; molares Verhältnis GTP:GMPS 1:5) zugesetzt.

Präparative T7-Transkription mit GMP

<i>Reaktionsansatz 250 µl</i>	<i>Endkonzentration</i>
125 µl Plasmid, linearisiert	50 ng/µl
25 µl 10× T7-Puffer	1×
25 µl rNTP-Mix (ATP, CTP, GTP, UTP; je 25 mM)	je 2,5 mM
20 µl rGMP (100 mM)	8 mM
2,5 µl T7-RNA-Polymerase (3,7 µg/µl)	37 ng/µl
ad 250 µl ddH ₂ O	

Präparative T7-Transkription mit GMPS

<i>Reaktionsansatz 250 µl</i>	<i>Endkonzentration</i>
125 µl Plasmid, linearisiert	50 ng/µl
25 µl 10× T7-Puffer	1×
20 µl rNTP-Mix (ATP, CTP, UTP, je 25 mM)	je 2 mM
1 µl GTP (100 mM)	0,4 mM
10 µl GMPS (50 mM)	2 mM
2,5 µl T7-RNA-Polymerase (3,7 µg/µl)	37 ng/µl
ad 250 µl ddH ₂ O	

Die Durchführung der präparativen Transkription mit GMP bzw. GMPS entspricht der in (3.4.3.) beschriebenen. Bei der Elution (3.1.4.2.) der 5'-Monophosphorothioat-Transkripte aus der Gelmatrix wird allerdings 1 µl DTT (0,1 M) zugesetzt. DTT dient hierbei als Oxidationsschutz und verhindert die Ausbildung von Disulfidbrücken.

3.4.6. Präparative T7-Transkription mit s⁴UTP

Soll die zu synthetisierende RNA mit s⁴UTP intern markiert werden, so wird dieses Nukleotid dem *in vitro* T7-Transkriptionsansatz zugesetzt. Mit dieser modifizierten RNA können Crosslink-Experimente (3.10.4.) durchgeführt werden, bei denen kovalente intra- und intermolekulare RNA-RNA Vernetzungen erhalten werden. Um statistisch nur eine Vernetzung pro RNA-Molekül zu erhalten, wird im Syntheseansatz eine Mischung von rUTP und s⁴UTP eingesetzt, so dass statistisch nur 5-10 % der möglichen UTPs durch s⁴UTP substituiert sind (Podar und Perlman, 1999). Das molare Verhältniss s⁴UTP:UTP variiert dabei zwischen 1:7 und 1:50 und ist von der Einbau- und Crosslink-Effizienz abhängig. Es muss daher für jede zu transkribierende RNA optimiert werden. Für die in dieser Arbeit verwendete *Prochlorococcus marinus* RNase P RNA wurde ein optimales molares Verhältnis von 1:9 (s⁴UTP:UTP) bestimmt und im T7-Transkriptionsansatz eingesetzt.

Zusätzlich können die intern eingebauten s⁴UTPs am Schwefelatom modifiziert werden, indem durch eine Substitutionsreaktion eine zusätzliche funktionelle Gruppe angehängt wird. Es kann z.B ein p-Azidophenacyl (APA) angehängt werden (3.10.3.). Mit dieser funktionellen Gruppe können durch photochemische Anregung kovalente RNA-RNA Vernetzungen (Crosslinks) herbeigeführt werden.

Um das photosensitive Nukleotid nicht frühzeitig durch Tageslicht anzuregen, wird die gesamte Synthese und die sich anschließende Aufreinigung in lichtdichten Reaktionsgefäßen (*amber tubes*) und möglichst unter Lichtausschluss durchgeführt.

Präparative T7-Transkription mit s⁴UTP

Reaktionsansatz (250 µl)	Endkonzentration
125 µl Plasmid, linearisiert	50 ng/µl
25 µl 10× T7-Puffer	1×
20 µl rNTP-Mix (ATP, CTP, GTP, je 25 mM)	je 2 mM
4,5 µl UTP (100 mM)	1,8 mM
5 µl s ⁴ UTP (10 mM)	0,2 mM
2,5 µl T7-RNA-Polymerase (3,7 µg/µl)	37 ng/µl
ad 250 µl ddH ₂ O	

Bis auf die oben genannten Unterschiede ist die Durchführung identisch zu der in 3.4.3. beschriebenen präparativen T7-Transkription

Die Lokalisierung der s⁴UTP-markierten RNA im Gel erfolgt mittels Fluoreszenzlöschung bei 254 nm (3.1.3.2.) und ist allerdings sehr zügig durchzuführen, da das hierfür verwendete Licht bei 254 nm

viel energiereicher ist als das für die photochemische Anregung von $s^4\text{UTP}$ Eingesetzte (3.10.4.1.). Eine zu langwierige Lokalisierung kann deshalb zu unerwünschten Vernetzungen führen. Der erfolgreiche Einbau von $s^4\text{UTP}$ in die Ziel-RNA kann neben erfolgreichen Crosslink-Experimenten auch durch Analyse mittels Dünnschicht-Chromatographie (3.11.2.) nachgewiesen werden.

3.5. Sequenzanalyse von Nukleinsäuren

3.5.1. Sequenzanalyse von DNA nach der Didesoxy-Kettenterminations-Methode

Die Nukleotidsequenz von Plasmid-inserterter DNA kann mit Hilfe der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977) ermittelt werden. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, an die zu sequenzierende einzelsträngige DNA ein Oligonukleotid (Primer) als Startsequenz zu hybridisieren und anschließend in vier getrennten Ansätzen eine Zweitstrangsynthese mit Hilfe einer DNA-Polymerase durchzuführen. Die 4 Reaktionsansätze enthalten jeweils neben den vier Desoxyribonukleotiden noch jeweils ein 2'-3'-Didesoxyribonukleotid (ddNTP). Durch den statistischen Einbau von ddNTPs kommt es zu sequenzabhängigen Syntheseabbrüchen, wobei ein Gemisch von DNA-Fragmenten verschiedener Länge mit identischem 5'-Ende entsteht. Ferner enthalten die Ansätze zusätzlich $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$, wodurch die entstehenden Fragmente radioaktiv markiert werden. Bei der Sequenzierung von doppelsträngiger DNA muß diese vor der Hybridisierung denaturiert werden. Die Fragmente werden nach der Sequenzierungsreaktion auf einem denaturierenden 6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Autoradiogramm sichtbar gemacht. Die Sequenzierung erfolgt mit dem *Sequenase 2.0 Sequencing Kit* der Firma *USB*.

Alkalische Denaturierung der Plasmid-DNA

4 μg Plasmid-DNA werden in 8 μl ddH₂O mit 2 μl 2 M NaOH 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die DNA durch Zugabe von 70 μl Fällungslösung (3.2.1.) gefällt. Das Präzipitat wird nach dem Trocknen in 7 μl ddH₂O aufgenommen.

Hybridisierung der Startsequenz

Zur denaturierten DNA-Lösung werden 2 μl 5 \times Sequenase-Reaktionspuffer sowie 1 μl 0,5 μM Startsequenz zugefügt. Der Ansatz wird 2 min bei 65 °C inkubiert, bis auf RT langsam abgekühlt und dann auf Eis gestellt.

Sequenzierreaktion

In vier 1,5 ml Reaktionsgefäßen werden je 2,5 μl der Terminationsmische „A“, „C“, „G“, „T“, die die jeweiligen Didesoxynukleotide enthalten, vorgelegt und auf 37 °C vorgewärmt. Der eiskalte Ansatz aus der Hybridisierungsreaktion wird mit 1 μl 100 mM DTT, 2 μl Markierungsgemisch (1:5 verdünnt), 0,5 μl $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$ (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) und 2 μl T7-DNA-Polymerase (1:8 verdünnt, *Sequenase*

2.0) versetzt und 2 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit beginnt die Zweitstrangsynthese und die DNA-Fragmente werden radioaktiv markiert. Man gibt dann 3,5 µl des Ansatzes zu jedem Terminationsmix und inkubiert 5 min bei 37 °C, bevor die Reaktion durch Zugabe von je 4 µl Stopplösung beendet wird. Die Proben können nach 2 min Erhitzen bei 85 °C und Abkühlen auf Eis sofort auf ein 6 % Polyacrylamidgel aufgetragen werden (je 2 µl einer Reaktion). Die Auftragsreihenfolge findet immer in der Reihenfolge A, C, G, T statt.

Sequenzanalyse für die Primer-Extension-Reaktion

Das Prinzip dieser Sequenzanalyse ist dem der oben beschriebenen identisch, allerdings wird die Radioaktivität nicht durch [α - 32 P]-dATP, sondern durch das Oligonukleotid, das am 5'-Ende radioaktiv markiert ist (3.10.1.), in den Reaktionsansatz eingebracht.

Das getrocknete Sediment der alkalischen Denaturierung wird in 2 µl 5× Sequenase-Reaktionspuffer sowie 8 µl Oligonukleotid (6×10^5 cpm 5'-radioaktiv markiertes Oligodesoxyribonukleotid (3.10.1.) aufgenommen und die Hybridisierung durchgeführt.

Für die Sequenzierreaktion wird dem Hybridisierungsansatz 1 µl 100 mM DTT und 2 µl T7-DNA-Polymerase (1:8 verdünnt, *Sequenase 2.0*) zugegeben und gut gemischt. Man gibt dann 3 µl dieses Ansatzes zu jedem Terminationsmix und inkubiert 5 min bei 37 °C. Die weitere Aufarbeitung erfolgt analog der Sequenzierung mit [α - 32 P]-dATP.

3.5.2. Sequenzierung von DNA mit "AmpliTaq Polymerase FS Big Dye Terminator"

Die maschinelle Sequenzierung mit dem *Abi PRISM Genetic Analyzer* beruht auf der Markierung der Terminationsbasen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (*BigDye Terminator*). Die Fluoreszenzfarbstoffe besitzen dabei eine unterschiedliche Emissionswellenlänge. Die templatabhängige Startsequenzverlängerung findet mit AmpliTaq Polymerase FS im PCR-Block statt. Im Reaktionsansatz wird dGTP durch dITP ersetzt, um Gelkompression zu vermeiden. Standardansatz zur Sequenzierung:

**Sequenzierreaktion mit
*AmpliTaq Polymerase FS BigDye Terminator***

<i>Sequenzieransatz (10 µl)</i>	<i>Menge/10 µl</i>
DNA	1-7 µl
Startsequenz (3,2 µM)	1 µl
<i>BigDye-Terminator-Mix</i>	2 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Die entsprechende Menge DNA (5-100 ng für PCR-Produkte, 100 ng ssDNA bzw. 500 ng dsDNA) wird mit 1 µl Startsequenz hybridisiert, mit 2 µl BigDye-Terminator-Mix versetzt und anschließend die unidirektionale PCR-Reaktion gestartet:

PCR Programm zur Sequenzierung mit *AmpliTaq Polymerase*

	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Zyklenzahl</i>
Denaturierung	96 °C	30 s	25×
Hybridisierung	50 °C	15 s	
Elongation	60 °C	240 s	

Der Reaktionsansatz wird mit 25 µl eiskalter Fällungslösung 10 min auf Eis präzipitiert (3.2.1.), anschließend sedimentiert (Hereaus Biofuge 28 RS, 4 °C, 17 000 UpM, 30 min) und zweimal mit je 250 µl kaltem 70 % EtOH gewaschen (Hereaus Biofuge 28 RS, 4 °C, 17 000 UpM, 10 min).

Das getrocknete Präzipitat wird in 12 µl TSR-Lösung aufgenommen, denaturiert (95 °C, 2 min) und bis zur Analyse mit Hilfe des *Genetic Analyzers* (ABI) auf Eis bzw. bei 4 °C gelagert. Nach Aufnahme in TSR ist die Probe bis zu 48 h stabil.

3.5.3. Nachweis von Reaktionsprodukten durch Primer-Extension-Analyse

Durch diese Methode kann das 5'-Ende einer RNA bestimmt werden. Dazu wird ein am 5'-Ende radioaktiv markiertes Oligonukleotid (3.10.1.) an die Ziel-RNA hybridisiert. Dieser *Primer* wird nun durch Reverse Transkriptase (AMV) mit dNTPs entsprechend der Matrize verlängert (Extension). Es entsteht eine cDNA. Am Ende der RNA-Matrize oder bei kovalenten Vernetzungen zu einem weiteren RNA-Molekül (Crosslink) bricht die reverse Transkription ab. Um das 5'-Ende exakt bestimmen zu können, wird mit dem gleichen Oligonukleotid eine Sequenzierung des Plasmids, welches die Sequenz der Ziel-RNA trägt, durchgeführt (3.5.1.). Die Primer-Extension-Reaktionen werden parallel zur Sequenzreaktion auf einem denaturierenden 6 % Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Die Reaktion wird in folgendem Ansatz durchgeführt:

Hybridisierungsansatz

<i>Reaktionsansatz (9 µl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
200 ng Ziel-RNA (getrocknet)	
9 µl Oligonukleotid ($1-6 \times 10^5$ cpm)	6666-40000cpm/µl

Der Ansatz wird 2 min bei 65 °C inkubiert, und im Heizblock langsam auf RT abgekühlt (30-45 min). Im Anschluss wird der Hybridisierungsansatz im gleichen Reaktionsgefäß für die Extension-Reaktion komplettiert.

Extension-Reaktion

<i>Reaktionsansatz (15 µl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
3 µl 5× AMV-RT-Puffer	1×
2 µl dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 5 mM)	0,66 mM
0,3-1,0 µl AMV-RT (10 U/µl)	0,2-0,66 U/µl
ad 15 µl ddH ₂ O	

Der Ansatz wird 1,5 h bei 42 °C inkubiert. Die RNA wird durch Zugabe von RNase A (20 µg, RT, 10 min) hydrolysiert. Das Reaktionsgemisch wird mit ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt, phenolisiert (3.2.3.) und präzipitiert (3.2.1.). Das Sediment wird zuletzt in 15 µl Formamidpuffer aufgenommen.

Es werden 5 µl der Proben nach der Denaturierung (85 °C; 2 min) auf ein denaturierendes 6 % Polyacrylamidgel (20 × 40 × 0,04 cm) (3.1.2.) parallel zu einer Sequenzierungsreaktion (3.5.1.) aufgetragen.

Die Dauer der Elektrophorese richtet sich nach der gewünschten optimalen Auflösung einzelner Sequenzbereiche. Eine „normale“ Elektrophorese wird beendet, wenn BPB den unteren Gelrand erreicht hat. „längere“ Elektrophoresen werden anhand der Laufstrecke von XCFB oder nachträglich aufgetragenem BPB durchgeführt. Wurde das Sediment der Primer-Extension-Reaktion in 15 µl Formamid-Puffer gelöst, so ist von der gleichen Reaktion jeweils eine Serie von „normalen“, „längeren“ und „sehr langen“ Gelaufentrennungen möglich.

3.6. Klonierung von Fremd-DNA in Plasmid-Vektoren

3.6.1. Präparation von Plasmidvektoren durch Restriktionshydrolyse

Zur Präparation eines Klonierungsvektors werden 25 µg entsprechendes Plasmid mit geeigneten Restriktionsendonukleasen linearisiert und mit dem *Jetquick PCR Purification Spin Kit* nach Herstellervorschrift aufgereinigt. Die Vollständigkeit der Spaltung wird durch ein Agarosegel überprüft (3.1.1.).

Die große Mehrzahl der Restriktionsendonukleasen spaltet doppelsträngige DNA spezifisch innerhalb einer 4-8 Nukleotide langen, palindromen Erkennungssequenz; dabei werden, abhängig von der Nuklease, kohäsive oder glatte Enden erzeugt.

Eine der für molekularbiologisches Arbeiten wichtigen Ausnahmen stellt *Fok I* dar. Das Enzym schneidet innerhalb einer beliebigen Sequenz, die sich in definiertem Abstand zu seiner Erkennungssequenz befindet.

Plasmid-Restriktionshydrolyse

<i>Reaktionsansatz (100 µl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
25 µg Plasmid	0,25 µg/µl
10 µl 10× Reaktionspuffer	1×
50 U Restriktionsendonuklease	0,5 U/µl
ddH ₂ O	ad 100 µl

Die Temperatur und Dauer der Inkubation sowie der jeweilige Reaktionspuffer sind vom verwendeten Enzym abhängig und richten sich nach den Herstellerangaben. Die Qualität der Hydrolyse wird durch ein Agarosegel (3.1.1.) kontrolliert. Ein Aliquot des Ansatzes wird neben Längenstandard und nicht hydrolysiertem Plasmid zum Vergleich auf das Gel aufgetragen.

3.6.2. Dephosphorylierung linearisierter Plasmide mit alkalischer Phosphatase

Eine Eigen-Ligation eines nur mit einem Restriktionsenzym linearisierten Vektors wird durch dessen Dephosphorylierung am 5'-Ende verhindert (Sambrook und Russel, 2001). Die Reaktion wird direkt im Plasmid-Linearisierungsansatz (3.6.1.) durchgeführt:

Dephosphorylierung von DNA durch CIP

<i>Reaktionsansatz (111 µl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
100 µl Linearisierungsansatz	0,25 µg/µl Plasmid-DNA
10 µl 10× CIP-Reaktionspuffer	1× Reaktionspuffer
0,5 µl CIP (0,5 U/µl)	0,0025 U/µl CIP (ca. 10 mU/pmol 5'-Enden)

Die Inkubation des Ansatzes erfolgt für 30 min bei 37 °C. Es wird dann abermals ein Aliquot CIP-Enzym zugesetzt und die Inkubation wiederholt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Präzipitation mit EtOH (3.2.1.) oder Zugabe von 7 µl 40 mM NTA und Inkubation für 15 min bei 68 °C und anschließender Präzipitation. Das Sediment wird in TE-Puffer (3.1.4.1.) zu einer Konzentration von 100 ng/µl aufgenommen. Zur Überprüfung der Vektor-Dephosphorylierung wird dieser später in einem gesonderten Ligationsansatz ohne DNA-Fragment eingesetzt.

10× CIP-Reaktionspuffer

	Endkonzentration
NaCl	1 M
DTT	10 mM
MgCl ₂	100 mM
Tris-HCl (pH 7,9)	500 mM
ddH ₂ O	ad 10 ml

3.6.3. Erzeugung glatter Enden und 5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten

Während der PCR können durch das Anhängen einzelner Nukleotide durch die DNA-Polymerase 3'-überhängende Enden entstehen. Um eine erfolgreiche Ligation von Fragmenten mit glatten Enden (*blunt-end*-Ligation) durchführen zu können, werden deshalb am 5'-Ende des komplementären Strangs mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase die entsprechenden Nukleotide aufgefüllt.

Erzeugung glatter Enden mit T4 DNA-Polymerase

Reaktionsansatz (10 μ l)	Endkonzentration
Aufgereinigtes PCR-Produkt	
1 μ l 10 \times PNK-Puffer	1 \times
1 μ l 100 μ M dNTP-Mischung	10 μ M
1 μ l T4 DNA-Polymerase (1 U/ μ l)	0,1 U/ μ l
ddH ₂ O	ad 10 μ l

Die Reaktion wird für 15 min bei 14 °C durchgeführt. Anschließend wird das Enzym 10 min bei 74 °C hitzeinaktiviert.

Aufgrund der Synthesemethode der *Primer* besitzen PCR-Produkte kein 5'-Phosphat und müssen daher vor der Ligation in einen dephosphorylierten Vektor phosphoryliert werden. Diese Reaktion kann direkt im selben Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Der Ansatz wird zusätzlich mit ATP (3 mM Endkonzentration) und T4 Polynukleotid-Kinase (PNK; 0,05 U/ μ l) supplementiert und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wird für 10 min bei 68 °C inaktiviert und der Ansatz mit Hilfe des *JETquick PCR purification spin kit* aufgereinigt.

Phosphorylierung glatter Enden mit PNK

Reaktionsansatz (20 μ l)	Endkonzentration
10 μ l PCR-Reaktion	
3 μ l ATP (20 mM)	3 mM
1 μ l PNK (10 U/ μ l)	0,5 U/ μ l
ddH ₂ O	ad 20 μ l

3.6.4. Ligation von DNA-Fragmenten mit Plasmidvektoren

Fremd-DNA-Fragmente können in einen linearisierten Vektor mit kompatiblen Enden ligiert werden. Die T4 DNA-Ligase katalysiert dabei die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe zweier benachbarter Nukleotide

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten der Ligation, die davon abhängen, mit welchen Restriktionsendonukleasen das Plasmid vorbereitend gespalten wurde. Während bei der *blunt-end* Ligation DNA-Fragmente mit glatten Enden verknüpft werden, werden bei der zweiten Art der

Ligation, der *sticky-end*-Ligation, DNA-Fragmente mit komplementären 3'- bzw. 5'-kohäsiven Enden miteinander verknüpft. Ein großer experimenteller Vorteil der *sticky-end*-Ligation liegt darin, dass es bei der Spaltung des Vektors mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen und entsprechender Präparation der Fremd-DNA möglich ist, ein Insert mit gerichteter Orientierung ins Plasmid einzubauen. Zusätzlich ist die Ligations-Effizienz höher als bei *blunt-end* Ligationen.

Für eine effektive Ligation sollte das zu insertierende DNA-Fragment im 10-fachen molaren Überschuss zum Vektor vorliegen (ca. 0,05 pmol Vektor zu 0,5 pmol Insert).

Ligation von Fragmenten mit kohäsiven Enden

Reaktionsansatz (10 μ l)	Endkonzentration
1 μ l DNA-Fragment	ca. 100 ng bzw. 0,05 pmol
1 μ l dephosphorylierter Vektor	ca. 100 ng bzw. 0,5 pmol
10 \times T4 DNA-Ligase-Puffer	1 \times
1 μ l T4 DNA Ligase (1 U/ μ l)	0,1 U/ μ l
ddH ₂ O	ad 10 μ l

Für *blunt-end*-Ligationen gilt derselbe Ansatz, allerdings bei 50-facher Enzymmenge. Dabei sollte die Ligation von glatten Enden in jedem Fall bei niedrigen Temperaturen über ein großes Zeitintervall durchgeführt werden. Als Standard gelten Inkubationszeiten von 24 h bei 14 °C oder 48 h bei 4 °C. Bei Fragmenten mit überstehenden Enden ist eine Inkubation von 12 h bei 14 °C ausreichend.

Der Ligationsansatz kann ohne Aufreinigung direkt zur Transformation chemokompetenter Zellen eingesetzt werden (3.6.6.1.). Soll der ligierte Vektor zur Elektrotransformation verwendet werden, muss der Ansatz zuvor über das *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt werden. Hierbei wird eine salzarme Lösung mit geringer Leitfähigkeit erhalten.

In dieser Arbeit wurde als Vektor für Transkriptionsplasmide das „high copy number“-Plasmid pUC19 (2686 nt) eingesetzt. pUC19 enthält die Gene für β -Lactamase (*ampR*) sowie β -Galactosidase (*lacZ*) und erlaubt so die Selektion der Transformanden durch Ampicillinresistenz und α -Komplementation. Der Vektor wird mit adäquaten Restriktions-Endonukleasen linearisiert (*Eco* RI/*Bam* HI) und dann mit der Fremd-DNA ligiert.

3.6.5. Präparation kompetenter *E. coli* Zellen

3.6.5.1. Präparation chemokompetenter Zellen

Ein Verdünnungsausstrich des zu präparierenden *E. coli* -Stammes wird 36 h bei 37 °C auf Minimal-Platte inkubiert. Man impft dann 1 ml SOB-Medium mit einer der Bakterienkolonien an und lässt die Kultur unter Schütteln über Nacht wachsen (Infors Rundschüttler HT, 180 UpM, 37 °C). Mit 1 ml dieser Vorkultur werden 100 ml SOC-Medium in einem 1 l-Erlenmeyerkolben angeimpft und bis zu einer optischen Dichte $OD_{600} = 0,5$ weitergeschüttelt (Hanahan, 1983). Um eine hohe Transformationsrate zu erreichen, ist es wichtig für alle folgenden Schritte die angegebenen

Temperaturen exakt einzuhalten und zügig zu arbeiten. Hat die Kultur die geforderte Zelldichte erreicht, wird die Zellsuspension auf Eis abgekühlt, in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 15 min auf Eis gelagert und anschließend zentrifugiert (Beckman J6-B, Rotor JA-10, 2500 UpM, 1100 g, 4 °C, 10 min). Der Überstand wird verworfen und das Sediment vorsichtig in 33,3 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 15 min auf Eis werden die Zellen erneut sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 8 ml eisgekühlter RF2-Lösung aufgenommen. Nach 5 min auf Eis werden 280 µl 2,25 M DTT-Lösung hinzugegeben; dann lässt man die Zellen weitere 10 min auf Eis ruhen. Die Zellen werden zu 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können so mehrere Jahre bei -80 °C gelagert werden.

Die Kompetenz der präparierten Zellen wird durch Transformation eines Aliquots mit einer definierten Menge pUC19 Plasmid-DNA (1-10 ng) festgestellt. Sie errechnet sich aus der Anzahl der erhaltenen Klone pro µg DNA. "Gute" Zellen besitzen eine Kompetenz von 10^7 - 10^9 Kolonien pro µg DNA.

SOC-Medium			SOB-Medium		
	Endkonz.	Einwaage/ 500 ml		Endkonz.	Einwaage/ 500 ml
NaCl	10 mM	0,292 g	NaCl	5 mM	0,146 g
KCl	2,5 mM	0,093 g	KCl	2,5 mM	0,093 g
Bacto-Trypton	2 % (w/v)	10 g	Bacto-Trypton	2 % (w/v)	10 g
Bacto-Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)	2,5 g	Bacto-Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)	2,5 g
<i>Die Lösung wird autoklaviert, die folgenden Lösungen steril filtriert und dann zugeben</i>		Volumen/ 500 ml	<i>Die Lösung wird autoklaviert, die folgenden Lösungen steril filtriert und dann zugeben</i>		Volumen/ 500 ml
MgSO ₄ (1 M)	10 mM	5 ml	MgSO ₄ (1 M)	10 mM	5 ml
MgCl ₂ (1 M)	10 mM	5 ml	MgCl ₂ (1 M)	10 mM	5 ml
CaCl ₂ (5 M)	50 mM	5 ml			
Glucose (1 M)	20 mM	10 ml			

RF1-Lösung			RF2-Lösung		
	Endkonz.	Menge/ 50 ml		Endkonz.	Menge/ 50 ml
RbCl	100 mM	0,605 g	RbCl	10 mM	60,5 mg
MnCl ₂ (1 M)	50 mM	2,5 ml	MOPS (1 M)	10 mM	500 µl
KOAc (1 M)	30 mM	1,5 ml	CaCl ₂ (5 M)	75 mM	750 µl
CaCl ₂ (5 M)	10 mM	100 µl	Glycerin (86% (v/v))	15 % (v/v)	8,72 ml
Glycerin (86% (v/v))	15 % (v/v)	8,72 ml	ddH ₂ O	pH 6,8 (NaOH)	ad 50 ml
ddH ₂ O	pH 5,8 (AcOH)	ad 50 ml	<i>-steril filtrieren, nicht autoklavieren;</i>		
			<i>Lagerung bei 4 °C-</i>		

-steril filtrieren, nicht autoklavieren;

Lagerung bei 4 °C-

3.6.5.2. Präparation elektrokompeter Zellen

1 l SOC-Vollmedium (3.6.5.1.) wird in einem 2,5 l Erlenmeyerkolben mit 10 ml einer stationären Vorkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (Infors Inkubationsrundschtler HT, 120 UpM) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6-0,8 erreicht wird. Die Kultur wird 15-30 min auf Eis gekühlt, in vorgekühlte Stahlbecher überführt und abzentrifugiert (Beckman J-6B, 4000 UpM, 4 °C, 15 min).

Die sedimentierten Zellen werden in 1 l 10 % Glycerin vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wird einmal mit 500 ml 10 % Glycerin wiederholt. Das Bakteriensediment wird in 20 ml 10 % Glycerin aufgenommen, in 2 PP-Zentrifugengefäße (15 ml) überführt und 15 min zentrifugiert. Die Sedimente werden in jeweils 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen und in Aliquots zu 50 µl auf vorgekühlte Mikroreagiergefäße verteilt. Die Proben werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können bei -80 °C über mehrere Monate gelagert werden.

3.6.6. Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

3.6.6.1. Hitzeschocktransformation

Zu 200 µl chemokompetenten Zellen (3.6.5.1.), die langsam auf Eis aufgetaut wurden, werden 1-10 ng Plasmid-DNA bzw. 5 µl Ligationsansatz gegeben. Man mischt vorsichtig und inkubiert den Ansatz für 45 min auf Eis. Nach einem Hitzeschock (42 °C, 90 s), durch den die an der Bakterienoberfläche anhaftenden Plasmide inkorporiert werden, werden die Zellen abermals 10 min auf Eis inkubiert. Das Aliquot wird in einem 15 ml-PS Röhrchen mit 1,5 ml SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C geschüttelt (160 UpM). Dieser Schritt gibt den transformierten Bakterien Zeit, die für ihre jeweilige Antibiotikaresistenz verantwortlichen Enzyme zu exprimieren.

Es werden Aliquots zu 20, 100 und 500 µl auf LB-Agar-Platten ausplattiert (3.7.2.) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.6.6.2. Elektroporation

Die elektrokompeteren Zellen (3.6.5.2.) werden auf Eis aufgetaut und mit 0,5 bis 1 µl Plasmid-DNA-Lösung (ca. 100 ng DNA) versetzt. Diese Suspension wird in eine Elektroporationsküvette überführt und einem 2,5 kV Elektropuls ausgesetzt (*Gene-Pulser*, *Bio-Rad*). Anschließend wird die Suspension in 1 ml Vollmedium aufgenommen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wird in ein Mikroreagiergefäß überführt, kurz zentrifugiert (Tischzentrifuge, 4000 UpM, RT) und in 200 µl Restmedium ausplattiert (3.7.2.).

3.7. Kultivierung von *E. coli*

3.7.1. Kultivierung von *E. coli* in Flüssigkultur

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgt im Allgemeinen in LB-Medium. Die Bakterienkultur wird, soweit nicht anders angegeben, bei der für *E. coli*-Zellen optimalen Temperatur von 37 °C bei 150 UpM (Infors Inkubationsrundschtüttler HT) geschüttelt. Zur Kontrolle des Wachstums kann die Zelldichte durch Messen der Absorption bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt werden.

LB-Medium		
	Endkonzentration	Einwaage/500 ml
Bacto-Trypton	10 g/l	5 g
Bacto-Hefe-Extrakt	5 g/l	2,5 g
NaCl	5 g/l	2,5 g

Plasmid-transformierte *E. coli*-Zellen verfügen über eine vom Plasmid abhängige Antibiotikaresistenz. Zur Selektion auf plasmid-tragende Zellen werden der Kulturlösung die entsprechenden Antibiotika zugesetzt. Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide codieren alle für Ampicillin-Resistenz, welches dem Medium nach dem Autoklavieren (120 °C, 20 min) bei einer maximalen Temperatur von 50 °C zugegeben wird (Endkonzentration: 50 µg/ml).

3.7.2. Kultivierung von *E. coli*-Zellen als Plattenkultur

Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wird LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 50 °C erfolgt der Zusatz des entsprechenden Antibiotikums und das Gießen der Platten unter sterilen Bedingungen. Nach dem Aushärten werden die Platten im Luftstrom einer Sterilbank getrocknet und können dann über mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.

E. coli-Zellen aus Transformationsansätzen (3.6.6.) oder Glycerinkulturen (3.2.4.1.) werden unter sterilen Bedingungen mit dem Drygalski-Spatel bzw. einer Impföse ausgestrichen und je nach *E. coli*-Stamm bis zu 18 h bei 37 °C inkubiert. Die meisten Bakterienkulturen können bei 4 °C über mehrere Wochen als Plattenkultur gelagert werden.

Selektion durch Antibiotikaresistenz

Das bei der Transformation eingesetzte Plasmid pUC19 trägt ein Resistenzgen. Das Gen-produkt, eine β -Lactamase, verleiht den transformierten Bakterien Resistenz gegenüber β -Lactamantibiotika wie zum Beispiel Ampicillin. Durch den Zusatz von Ampicillin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zum LB-Agar werden Bakterien, die kein Plasmid erhalten haben, am Wachstum gehindert. Demgegenüber sind Transformanden aufgrund der plasmidcodierten β -Lactamase in der Lage, das Ampicillin durch Spaltung des β -Lactamrings zu inaktivieren und bleiben in ihrem Wachstum unbeeinflusst

Selektion durch α -Komplementierung

Die pUC-Vektoren verleihen transformierten *E. coli*-Zellen neben der Antibiotikaresistenz noch ein weiteres Selektionskriterium. Die Polylinker-Region des Plasmids liegt im Leserahmen des α -Peptids der β -Galactosidase. Enthält das pUC-Plasmid kein Insert, so bleibt das *LacZ*-Gen, welches den N-Terminus der β -Galactosidase codiert, intakt. Das Bakterium kann nach IPTG-Induktion durch intrallelische Komplementation der chromosomalen, defizienten Kopie des *LacZ*-Gens das Farbstoffvorläufermolekül X-Gal spalten. Die Bakterienkolonie färbt sich blau. Durch Ligation von Fremd-DNA in das *LacZ* α -Genfragment ist dessen Expression nicht mehr möglich und die Bakterienkolonie bleibt farblos. Die Selektion auf α -Komplementierung setzt den Zusatz von IPTG (24 μ g/ml) als Induktor und X-Gal (40 μ g/ml) als Farbstoffsubstrat für die β -Galactosidase zum LB-Agar voraus.

3.8. Charakterisierung von Proteinen

3.8.1. Dialyse einer Enzymlösung

Eine Proteinlösung wird dialysiert, um hohe Salzkonzentrationen in der Lösung zu entfernen oder um einen Pufferwechsel vorzunehmen.

Die in der Dialyse verwendeten Dialyseschläuche müssen vor Gebrauch einmal in 1 % (w/v) Na_2CO_3 mit 1 mM Na_2EDTA und anschließend 3-4 mal mit frischem ddH_2O zur Neutralisation gekocht werden. Danach werden die Schläuche in einer 0,1 mM Na_2EDTA -Lösung 20 min bei 120 °C autoklaviert und bis zur Benutzung bei 4 °C aufbewahrt.

Die Proteinlösung wird in die Dialyseschläuche gefüllt und diese in 100 Vol. Dialysepuffer gehängt. Nach 1 h Dialyse unter ständigem Rühren wird der Dialysepuffer erneuert und die Dialyse bei 4 °C mehrere Stunden fortgesetzt.

In dieser Arbeit wurde ein überexprimiertes Protein mit einer hohen Imidazol-Konzentration von einer Ni^{2+} -NTA-Agarose eluiert. Um dieses Imidazol aus der Enzympräparation zu entfernen, wurde nach Zugabe des Proteaseinhibitors PMSF (0,1 mM) gegen Puffer D dialysiert. Da für eine längere Aufbewahrung der Enzympräparation ein glycerinhaltiger Lagerpuffer sinnvoll ist, wurde direkt im Anschluss gegen Puffer E dialysiert. Als Zusatzeffekt findet hierbei durch den Entzug von Wasser eine Volumenverkleinerung und somit eine Konzentrierung der Proteinlösung statt.

Puffer D			Puffer E		
	Endkonz.	Einwaage/ 1 l		Endkonz.	Menge/ 1 l
Tris	20 mM	2,423 g	Tris-HCl (1M;pH 8,0)	20 mM	20 ml
NaCl	50 mM	2,922 g	NaCl (5 M)	50 mM	10 ml
ddH_2O (pH 8,0; HCl)	ad 1000 ml		Glycerin (86 %)	50 % (v/v)	581,5 ml
			ddH_2O	ad 1000 ml	

3.8.2. Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Diese 1976 von M.M. Bradford veröffentlichten Färbemethode steht der blaue saure Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250. Im sauren Milieu verschiebt sich in Gegenwart von Proteinen das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 zu 595 nm. Grund dafür ist die Stabilisierung in der unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung zwischen Protein und Farbstoff. Dabei bindet der Farbstoff recht unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten des Proteins. Die wichtigste Rolle spielen dabei Wechselwirkungen mit dem basischen, unter den Testbedingungen am terminalen Stickstoff protonierten, Arginin. Weniger wichtig sind Wechselwirkungen mit Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Daher ist die Lichtabsorption der Lösung bei 595 nm annähernd proportional zur Proteinkonzentration in der Lösung. Die Vorteile des Bradford-Tests zur Proteinkonzentrationsbestimmung liegen in seiner einfachen Durchführung und seiner Unempfindlichkeit gegenüber Reduktionsmitteln. Der wohl größte Nachteil besteht darin, dass gleiche Massen an verschiedenen Standardproteinen aufgrund unterschiedlichen Arginingehalts erhebliche Differenzen in ihren resultierenden Absorptionskoeffizienten aufweisen können.

Bradford-Färbelösung		
	Endkonzentration	Menge/l
Coomassie Brilliant Blue G250	0,1 g/l	100 mg
EtOH (96 %)	4,8 % (v/v)	50 ml
H ₃ PO ₄ (86 %)	8,6 % (v/v)	100 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

Die Lösung wird durch drei Lagen Filterpapier filtriert und kann bei 4 °C über mehrere Monate gelagert werden.

Messung einer unbekanntten Proteinkonzentration:

10 µl Proteinlösung werden mit 1 ml Bradford-Färbelösung gemischt und nach fünf Minuten die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Referenz wird mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration (0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/ml) kalibriert. Bei der Auswertung ist dabei zu beachten, dass nur im linearen Bereich der Eichkurve zuverlässige Werte erhalten werden. Die zu vermessenden Proben sind deshalb entsprechend zu verdünnen.

3.8.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die grundlegende Idee der (diskontinuierlichen) SDS-Polyacrylamidelektrophorese besteht darin, alle Proteine nach kompletter Denaturierung in einheitliche, vollständig entfaltete Polypeptidketten mit gleichen Ladungseigenschaften zu überführen (Laemmli, 1970).

Dabei wird das Aggregieren von Proteinen beim Eintritt ins Gel verhindert und eine größere Bandenschärfe erreicht. Hierzu wird die Gelmatrix in zwei Bereiche eingeteilt: das engporige

Trenngel und das weitporige Sammelgel. Das zugesetzte SDS (engl. Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat) überdeckt als anionisches Detergenz die Proteineigenladung so effektiv, dass sich Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit ausbilden. Dabei ist die elektrophoretische Beweglichkeit der SDS-Polypeptid-Micellen dem Logarithmus ihrer Masse proportional. Die Molekulargewichte der zu bestimmenden Proteine werden durch Vergleich mit geeigneten Standards ermittelt.

Für ein Gel ($16 \times 14 \times 0,5$ cm) werden 30 ml Gellösung benötigt. Unmittelbar nach der Zugabe von SDS, TEMED und APS wird die Lösung luftblasenfrei zwischen zwei durch Silikonabstandshalter getrennte Platten bis zu einer Höhe von 2 cm vom oberen Rand her gegossen. Die Gellösung wird sofort mit ddH₂O vorsichtig überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels (30 min) wird das H₂O vollständig entfernt und das Sammelgel nach Zugabe von SDS, TEMED und APS auf das Trenngel gegossen. Nach Einpassen des Taschenformers lässt man das Gel in vertikaler Lage polymerisieren (20 min). Nach Entfernen des unteren Silikonstreifens und des Taschenformers wird das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Der zwischen Silikonstreifen und Gelmasse nach Polymerisation auftretende Spalt wird mit Silikonfett abgedichtet und die Apparatur mit Elektrophoresepuffer befüllt. Vor dem Auftragen der Proben werden die Geltaschen gründlich mit Puffer gespült.

Die zu analysierenden Proben (10 µl) werden mit 10 µl 2× Probenpuffer versetzt und direkt vor dem Auftragen denaturiert (3 min, 95 °C). Die Elektrophorese beginnt bei 50 V; wenn BPB das Trenngel erreicht hat, wird die Spannung auf 150 V erhöht und die Elektrophorese gestoppt, nachdem BPB das Gel verlassen hat.

Parameter für die SDS-Gelelektrophorese	
Gelmaße	16 × 14 × 0,05 cm
Volumen der Gellösung	30 ml Trenngel
	15 ml Sammelgel
Volumen des Elektrophoresepuffers	1000 ml
Trennspeisung	50 V Sammelgel
	150 V Trenngel

Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel zur SDS-PAGE Elektrophorese				
Reagentien	Sammelgel (5 % (v/v))		Trenngel (12,5 % (v/v))	
	Volumen/ 15 ml	Endkonz.	Volumen/ 30 ml	Endkonz.
AA-Bis (29:1) 40 %	1,9 ml	5 %	9,4 ml	12,5 %
Tris pH 6,8 ; 0,5 M	3,7 ml	123 mM	-	-
Tris pH 8,8 ; 1,5 M	-	-	7,5 ml	375 mM
ddH ₂ O	8,5 ml	-	12,7 ml	-
SDS (20 % (w/v))	75 µl	0,1 %	150 µl	0,1 %
APS (10 % (w/v))	200 µl	-	200 µl	-
TEMED	10 µl	-	20 µl	-

2x Probenpuffer			Elektrophorese-Puffer		
	Endkonzentration	Menge/10 ml		Endkonzentration	Menge/l
Tris pH 6,8; 1 M	100 mM	1 ml	Tris	44 mM	5,33 g
SDS (20 % (w/v))	4 % (w/v)	2 ml	Glycin	200 mM	15 g
Glycerin (86 % (w/v))	17 % (w/v)	1,98 ml	SDS (20 % (w/v))	0,15 % (w/v)	7,5 ml
2-Mercaptoethanol	0,1 % (v/v)	10 µl	ddH ₂ O	ad 1000 ml	
Bromphenolblau (1 %)	0,1 % (w/v)	1 ml			
ddH ₂ O	ad 10 ml				

3.8.4. Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteingelen ist eine schnelle und einfache Methode zum Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen. Der Farbstoff (Serva Blue R-250) ist unter den sauren Bedingungen der Färbelösung negativ geladen und lagert sich durch elektrostatische Wechselwirkungen an positiv geladene Aminosäurereste an. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 100 ng Protein pro Gelbande.

Das Proteingel (3.8.3.) wird nach der Elektrophorese mindestens 30 min bei RT in Färbelösung geschüttelt (IKA-Vibrax-VXR, 40 UpM). Anschließend wird das Gel unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung für mindestens 1 h entfärbt. Die aufgetrennten Proteine erscheinen im Gel als blaue Banden. Abschließend wird das Gel zwischen zwei Cellophanfolien bei 80 °C auf dem Geltrockner getrocknet.

Coomassie-Färbelösung			Entfärbelösung		
	Endkonz.	Menge/ 1 L		Endkonz.	Volumen/1 L
Serva Blue R-250	0,2 % (w/v)	2 g	Methanol	35 % (v/v)	350 ml
Methanol	45 % (v/v)	450 ml	AcOH	7 % (v/v)	70 ml
AcOH	10 % (v/v)	100 ml	ddH ₂ O	ad 1000 ml	
ddH ₂ O	ad 1000 ml				

3.8.5. Silanisieren von Plastikgefäßen

Um Verluste durch Adsorptionseffekte an der Oberfläche von Plastik- oder Glasgefäßen zu minimieren, werden diese silanisiert. Alle Arbeitsschritte werden unter einem Abzug ausgeführt, da das verwendete Dichlormethylsilan hochflüchtig und giftig ist. Die zu silanisierenden Gegenstände werden neben einem 10 ml Becherglas, welches 1 ml Dichlormethylsilan enthält, in einem Exsikkator platziert. Anschließend wird der Exsikkator solange evakuiert, bis das Dichlormethylsilan seinen Siedepunkt erreicht hat. Der Glashahn am Exsikkator wird geschlossen und erst wieder geöffnet, wenn alles Dichlormethylsilan verdampft ist. Die Plastikgefäße sind nun vollständig silanisiert und können autoklaviert werden.

3.9. Präparation und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Viele Proteinexpressionsstrategien basieren auf dem Prinzip, das Zielprotein als rekombinantes Fusionsprodukt mit einer speziellen N- oder C-terminalen Aminosäuresequenz zu exprimieren. Mit dem Ziel einer vereinfachten Proteinaufreinigung kann diese zusätzliche Aminosäuresequenz anschließend als Bindungsstelle (*Tag*) verwendet werden. Der *Tag* ermöglicht die spezifische reversible Bindung an eine feste Phase und erleichtert so chromatographische Aufreinigungen wesentlich.

Das in dieser Arbeit exprimierte rekombinante Protein ist als Fusionsprodukt mit 6 konsekutiven Histidin-Resten (*6×-His-Tag*) am C-Terminus konzipiert. Die Aufreinigung des Zielproteins erfolgt hier durch reversible Bindung des *His-Tag* an immobilisierte Ni^{2+} -Ionen. Der verwendete *His-Tag* ist relativ klein, nur schwach immunogen, bei physiologischem pH-Wert ungeladen und bindet unabhängig von der Konformation der Proteine sehr stark an Ni^{2+} -Ionen.

3.9.1. Das T7-Expressionssystem

Die *high-copy* pET-Vektoren (*Novagen*) sind gekoppelte Transkriptions-Translationsvektoren und verfügen über einen Bakteriophagen T7-Promotor. Das T7-System ist das zur Zeit wohl am erfolgreichsten verwendete Expressionssystem. Das zu exprimierende Gen befindet sich hierbei unter der Kontrolle des „späten“ Bakteriophagen T7-Promotors, der ausschließlich von der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 erkannt und transkribiert wird. Eine Kopie des T7 RNA-Polymerase-Gens befindet sich als λ -Lysogen (DE3) auf der chromosomalen DNA der verwendeten Bakterienstämme und steht unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors. Durch Zugabe von IPTG kann die Synthese der T7 RNA-Polymerase induziert werden. Da diese ausschließlich die mRNA des Zielproteins transkribiert, sind die Ribosomen der Zelle nun fast ausschließlich auf die Translation des rekombinanten Proteins programmiert.

3.9.2. Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli* -Stämmen

3.9.2.1. Überexpression im präparativen Maßstab

5 ml YT-Kulturmedium (Ampicillin 50 $\mu\text{l/ml}$) werden mit einer frisch ausgestrichenen Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus dieser Vorkultur werden in einem 2 l Erlenmeyerkolben 500 ml antibiotika-supplementiertes YT-Medium in einer 1:1000 Verdünnung angesetzt. Unter Schütteln (Infors Inkubationsschüttler HT, 120 UpM) lässt man die Bakterienkultur bis zu einer $\text{OD}_{(600)}$ von 0,6 heranwachsen und induziert dann die Proteinexpression durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration 0,6 mM). Die Inkubation wird für 2 h Stunden bei 37 °C fortgesetzt. Die Zellen werden durch Zentrifugation (Beckman J-6B, 15 min, 4000 UpM, 4 °C) geerntet, der Überstand dekantiert und das Zell-Sediment in 50 ml YT-Medium resuspendiert. Nach erneuter

Zentrifugation (Beckman J-6B, 10 min, 4000 UpM, 4 °C) wird das Nassgewicht des Zell-Sedimentes bestimmt. Dabei werden aus 500 ml Kultur etwa 1,0 g feuchte Zellmasse gewonnen.

Zur Analyse auf Erfolg und Quantität der Expression werden vor IPTG-Zugabe und vor der Zellernte jeweils 1 ml Kultur entnommen, sedimentiert und mit SDS-Proben-Puffer für ein SDS-PAGE-Gel vorbereitet (3.8.3.).

YT-Medium		
	Endkonz.	Einwaage/500 ml
Bacto-Trypton	8 g/l	4 g
Bacto-Hefe-Extrakt	5 g/l	2,5 g
NaCl	5 g/l	2,5 g

3.9.2.2. Aufarbeitung von Protein-Einschlußkörperchen

Inclusion Bodies entstehen durch die micellenartige Zusammenlagerung von rekombinanten Proteinmolekülen in der Zelle. Die entstehenden Aggregate bleiben nicht in Lösung und fallen auch in der Zelle aus. In diesen Einschlußkörperchen liegen die Proteine meist entfaltet vor und müssen deshalb nach ihrer Isolierung in jedem Fall renaturiert werden. Für native Aufreinigungsstrategien gilt es deshalb, die Bildung dieser Protein-Aggregate in jedem Fall zu vermeiden. Allerdings bieten sie sich durch ihre relativ einfache Isolierung über Zentrifugation für denaturierende Aufreinigungen an. Da von dem in dieser Arbeit zu exprimierenden Protein bekannt ist, das es nach der Überexpression zu über 90 % in Form von *Inclusion Bodies* vorliegt, bietet sich somit eine denaturierende Aufreinigung über diese Protein-Einschlußkörperchen an.

3.9.2.3. Aufreinigung von Protein-Einschlußkörperchen eines rekombinanten Proteins

Nach jedem Arbeitsschritt werden von der jeweiligen Lösung oder Suspension 100 µl entnommen, um sie später per SDS-PAGE (3.8.3.) analysieren zu können.

Zur Aufreinigung wird das Zellsediment (3.9.2.1.) in 50 ml Lysepuffer resuspendiert, PMSF (0,1 mM) zugegeben und bis zur vollständigen Zellyse sonifiziert (Sonificator; Einstellungen: konstant, Stufe 2-3, 2 min; 4 °C).

Die Suspension wird zentrifugiert (Beckman J2-21, Rotor JA-20, 4 °C, 10 min bzw. 10 000 g) und der Überstand abgenommen. Das Pellet, welches *Inclusion Bodies* des rekombinanten Proteins enthält, wird zweimal mit Lysepuffer (je 50 ml; 0,1 mM PMSF) gewaschen und zentrifugiert (Beckman J2-21, Rotor JA-20, 4 °C, 10 min bzw. 10 000 g).

Die *Inclusion Bodies* werden in 50 ml Puffer A, der 8 M Harnstoff enthält, durch vorsichtiges schütteln (2 h; 4 °C) gelöst. Um ungelöste Zellbestandteile abzutrennen, wird erneut zentrifugiert (Beckman J2-21, Rotor JA-20, 4 °C, 10 min bzw. 12 000 g). Der proteinhaltige Überstand wird abgenommen und kann nun direkt der Affinitätschromatographie (3.9.3.) unterworfen werden.

Lysepuffer			Puffer A		
	Endkonz.	Menge/ 500 ml		Endkonz.	Einwaage/ 250 ml
Tris-HCl (pH 8.0; 1 M)	50 mM	25 ml	Harnstoff	8 M	120,12 g
Na ₂ EDTA (0,5 M)	2 mM	2 ml	Tris	20 mM	0,606 g
Triton-X100	1 % (v/v)	5 ml	NaCl	0,5 M	7,305 g
ddH ₂ O		ad 500 ml	Imidazol	5 mM	85,1 mg
			ddH ₂ O (pH 7,8; HCl)		ad 250 ml

3.9.3. Säulenchromatographie

Chromatographie im Säulenverfahren ist eine wichtige Trennmethode, bei der eine gelöste Substanzmischung mit Hilfe eines Flüssigkeitsstroms über eine stationäre Phase geleitet und dabei in die einzelnen Bestandteile der Mischung aufgetrennt wird.

Die Elution erfolgt je nach Säule in einem Salzkonzentrations-, pH- oder Harnstoff-gradienten. Das Gradientenvolumen sollte in der Regel mindestens das 10-fache Säulenvolumen betragen. Die eluierten Proteine werden abschliessend in Fraktionen geeigneter Größe gesammelt.

3.9.3.1. Denaturierende Aufreinigung eines rekombinanten Proteins über Affinitäts-Chromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Die hier beschriebene Protein-Präparation findet bei RT unter denaturierenden Bedingungen statt. Nach jedem Arbeitsschritt werden von der jeweiligen Lösung oder Suspension 100 µl entnommen, um sie später per SDS-PAGE (3.8.3.) analysieren zu können.

Zum Überstand der Inclusion-Body-Aufreinigung (3.9.2.3.) werden 1,5 ml mit Puffer A äquilibrierter Ni²⁺-NTA-Agarose gegeben. Um ein möglichst vollständiges Binden des rekombinanten Proteins an die Ni²⁺-NTA-Agarose zu gewährleisten, wird die Suspension anschließend 2 h in einem silanisierten 50 ml PP-Röhrchen (3.8.5.) durch langsames Rotieren am KPG-Rührer gemischt und anschließend in eine 15 ml PP-Säule (1,6 × 7,5 cm) gegeben.

Nachdem sich das Säulenmaterial abgesetzt hat, wird der Überstand als Durchlauf aufgefangen. Die Säule wird nun mit je 5 Vol. Puffer A und Puffer B gewaschen (0,5 ml/min). Das Protein ist denaturiert an das Säulenmaterial gebunden und kann durch einen Harnstoffgradienten von 8-0 M im gebundenen Zustand auf der Säule renaturiert werden. Hierzu wird ein Stufen-Gradient von insgesamt 80 Säulen-Vol. verwendet. Die einzelnen Stufen nehmen hierbei jeweils um 0,5 M Harnstoff ab.

Die Elution des Proteins erfolgt mit 3 Säulen-Vol. Puffer C (0,2 ml/min). Das im Eluat enthaltene Enzym wird im Anschluss einer Dialyse (3.8.1.) unterzogen, um es in einen geeigneten Lagerpuffer zu überführen. Die aus den einzelnen Arbeitsschritten entnommenen Proben werden zur Aufreinigungskontrolle auf einem SDS-Polyacrylamidgel (3.8.3.) aufgetragen.

Die Renaturierung des Enzyms kann durch einen Aktivitätstests (3.10.2.) überprüft werden.

Puffer B			Puffer C		
	Endkonz.	Menge/ 250 ml		Endkonz.	Menge/ 250 ml
Harnstoff	8 M	120,12 g	Tris	20 mM	0,606 g
Tris	20 mM	0,606 g	NaCl	0,5 M	7,305 g
NaCl	0,5 M	7,305 g	Imidazol	0,3M	5,106 g
Imidazol	20 mM	0,34 g	ddH ₂ O (pH 7,8; HCl)	ad 250 ml	
ddH ₂ O (pH 7,8; HCl)		ad 250 ml			

3.10. Modifizierung von Nukleinsäuren

3.10.1. Markierung und Aufreinigung von Oligodesoxyribonukleotiden mit [γ -³²P] ATP

Als Startsequenzen bei der Primer-Extension-Reaktion und bei der parallel aufgetragenen Sequenzierungsreaktion werden chemisch synthetisierte Oligonukleotide eingesetzt, die am 5'-Ende radioaktiv markiert werden. Die nach der Phosphoamidit-Methode synthetisierten Oligonukleotide besitzen eine freie 5'-Hydroxylgruppe, auf welche die terminale Phosphatgruppe des [γ -³²P] ATP übertragen wird. Diese Reaktion wird von der T4 Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert.

5'-Markierung von Oligodesoxyribonukleotiden mit [γ -³²P] ATP

Reaktionsansatz (10 μ l)	Endkonzentration
2,5 μ l Oligodesoxyribonukleotid (10 μ M)	2,5 μ M Oligodesoxyribonukleotid
1 μ l 10 \times PNK-Puffer	1 \times PNK-Puffer
4 μ l [γ - ³² P] ATP (10 μ Ci/ μ l)	4 μ Ci/ μ l [γ - ³² P] ATP bzw. 2 μ Ci/1,25 pmol Oligodesoxyribonukleotid
2 μ l ddH ₂ O	
0,5 μ l T4 PNK (10 U/ μ l)	0,5 U/ μ l T4 PNK

Der Ansatz wird 1 h bei 37 °C inkubiert. Um nicht eingebautes [γ -³²P] ATP zu entfernen, muss der Reaktionsansatz nach der Inkubation aufgereinigt werden. Hierzu wird das Reaktionsgemisch auf einem denaturierenden 15 % PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (3.1.2.). Der Reaktionsansatz wird mit 6 μ l Formamidpuffer supplementiert, und die gesamte Probe direkt in eine Proben tasche eines Gels mit den Maßen 20 \times 20 \times 0,045 cm aufgetragen. Die Elektrophorese wird mit 600 V bei maximal 20 W durchgeführt, bis das BPB des Farbstoffpuffers den unteren Gelrand erreicht hat. Nun wird eine Glasplatte abgenommen, das Gel mit Haushaltsfolie bedeckt und Fluoreszenzmarker angebracht.

Durch Autoradiographie (30 sec) wird das markierte Oligodesoxyribonukleotid lokalisiert, anschließend ausgeschnitten und über Nacht eluiert (3.1.4.2.).

Nach einer zweiten Elution (3 h) werden die Eluate vereinigt und mit 96 % EtOH präzipitiert (3.2.1.). Die Radioaktivität des Sedimentes wird durch Messung der Čerenkov-Strahlung im [³²P]-Fenster eines Szintillationszählers bestimmt.

Das markierte Oligodesoxyribonukleotid wird in einem entsprechenden Volumen ddH₂O gelöst, so dass 100000 cpm/μl an Oligodesoxyribonukleotid resultieren. Ist die Löslichkeit des Sedimentes zu gering, so kann diese durch 0,02 % (v/v) Triton X-100 verbessert werden.

3.10.2. Vervollständigung des 3'CCA-Endes von tRNAs durch die Nukleotidyltransferase

3.10.2.1 Analytische Nukleotidyltransferase-Reaktion

Für eine posttranskriptionale Modifizierung von tRNAs am 3'-Ende kann die ATP(CTP):tRNA-Nukleotidyltransferase (Ntase, CCCase, CCA-Adding-Enzyme) verwendet werden. Sie ist eine RNA-Polymerase, die templatunabhängig und hochspezifisch die definierte Sequenz CCA am 3'-Ende von tRNAs anhängt bzw. komplettiert. Durch ihre Spezifität ist sie somit ein elegantes Werkzeug, um positionsspezifisch Modifikationen in das 3'-Ende von tRNAs einzuführen. Dies ist möglich, da sie neben Standard-NTPs auch modifizierte Nukleotide als Substrate erkennt. In dieser Arbeit ist vor allem der Einbau von s²CTP, ATPαS, CTPαS und dCTP in das 3'-CCA-Ende von tRNAs von Interesse. Als zu modifizierende tRNA werden *in vitro* synthetisierte tRNAs eingesetzt, die am 3'-Ende entsprechend unvollständig sind.

Analytische Nukleotidyltransferase-Reaktion

Reaktionsansatz 20 μl	Variationsmöglichkeiten	Endkonz.
10000 cpm radioaktiv markiertes Transkript	3-5 μg unmarkiertes Transkript	500 cpm/μl bzw. 0,3-0,5 μg/μl
1 μl ATP (5 mM)	1 μl ATPαS (5 mM) 1 μl [α ³² P]-ATP (10 μCi)	0,15 mM 0,5 μCi/μl
1 μl CTP (5 mM)	1 μl dCTP (5 mM) 1 μl s ² CTP (5 mM) 1 μl CTPαS (5 mM) 1 μl [α ³² P]-dCTP (10 μCi)	0,15 mM 0,15 mM 0,15 mM 0,5 μCi/μl
2 μl 10× CCA-Puffer		1×
6 μl Nukleotidyltransferase (11 μg)		1,1 μg/μl
ad 20 μl ddH ₂ O		

10× CCA-Puffer

	Endkonzentration	Menge/ 10 ml
Glycin	100 mM	0,751 g
MgCl ₂	10 mM	0,203 g
DTT (0,1 M)	1 mM	1 ml
ddH ₂ O	ad 10 ml	
pH 9,0; NaOH		

Der Ansatz wird 2 h bei 37 °C inkubiert, phenolysiert (3.2.3.) und präzipitiert (3.2.1.).

Ist im Reaktionsgemisch das photosensitive Nukleotid s^2 -CTP vorhanden, so wird die Reaktion und die anschließende Aufreinigung in lichtdichten Reaktionsgefäßen durchgeführt. Die Präzipitate werden in Harnstoffpuffer gelöst und auf denaturierende PAA-Gele aufgetragen. Um eine gute Auftrennung der Reaktionsprodukte zu erzielen, werden 12-15 % Gele mit den Maßen $20 \times 60 \times 0,04$ cm verwendet und die Elektrophorese so lange durchgeführt, bis XCFE 70-80 cm Laufstrecke zurückgelegt hätte. Die Reaktionsprodukte können im Anschluss durch Autoradiographie der getrockneten Gele lokalisiert werden (3.1.3.1.).

3.10.2.2. Präparative Nukleotidyltransferase-Reaktion

Zur präparativen Modifizierung von tRNAs am 3'-CCA-Ende wird ebenfalls die Nukleotidyltransferase eingesetzt. Es wurden in dieser Arbeit letztendlich zwei Modifizierungen von pre- und mat-tRNA^{Arg} präparativ synthetisiert. Ausgehend von aufgereinigten Transkripten, deren 3'-Ende C74 ist (pre-tRNA_C, mat-tRNA_C) werden dCTP und ATP α S angehängt. Zur leichteren Synthesekontrolle und Aufreinigung kann dem Ansatz [α^{32} P]-dCTP zugegeben werden. Durch die Verwendung von dCTP anstelle von CTP soll eine nukleophile Substitutionsreaktion des 2'-OH der Ribose am darauffolgenden Thiophosphat vermieden werden, was einen Strangbruch zur Folge hätte. Durch das Einbringen des Thiophosphats ist eine weitere Modifizierung mit dem Crosslink-Reagenz APA-Br (3.10.3.) möglich.

Präparativer Einbau von α S-ATP durch Nukleotidyltransferase-Reaktion

Reaktionsansatz (200 μ l)	Endkonzentration
130 μ g Transkript (pre-tRNA _C , mat-tRNA _C)	0,65 μ g/ μ l
20 μ l 10 \times CCA-Puffer	1 \times
3 μ l dCTP (10 mM)	0,15 mM
6 μ l ATP α S (5 mM)	0,15 mM
2 μ l [α^{32} P]-dCTP (20 μ Ci)	0,1 μ Ci/ μ l
60 μ l Nukleotidyltransferase (110 μ g)	0,55 μ g/ μ l
ad 200 μ l ddH ₂ O	

Durch den Einbau von s^2 CTP an die Position C74 und C75, kann die modifizierte tRNA direkt in Crosslink-Experimente eingesetzt werden.

Präparativer Einbau von s^2 CTP durch Nukleotidyltransferase-Reaktion

Reaktionsansatz (200 μ l)	Endkonzentration
130 μ g Transkript (tRNA $_{\Delta$ CCA, tRNA $_C$)	0,65 μ g/ μ l
20 μ l 10 \times CCA-Puffer	1 \times
3 μ l ATP (10 mM)	0,15 mM
3 μ l s^2 CTP (10 mM)	0,15 mM
2 μ l [α^{32} P]-ATP (20 μ Ci)	0,2 μ Ci/ μ l
60 μ l Nukleotidyltransferase (110 μ g)	0,55 μ g/ μ l
ad 200 μ l ddH $_2$ O	

Der jeweilige Ansatz wird für 3 h bei 37 °C inkubiert, phenolysiert (3.2.3.) und präzipitiert (3.2.1.). Ist im Reaktionsgemisch das photosensitive Nukleotid s^2 -CTP vorhanden, so wird die Reaktion und die anschließende Aufreinigung in lichtdichten Reaktionsgefäßen durchgeführt (*amber tubes*). Das Präzipitat wird in Harnstoffpuffer gelöst und auf ein 6 % PAA-Gel (20 \times 20 \times 0,1 cm) aufgetragen. Die Elektrophorese wird beendet, wenn BPB den unteren Gelrand erreicht hat. Die Lokalisierung der Reaktionsprodukte erfolgt durch Autoradiographie wie in 3.1.3.1. beschrieben. Die Produktbande wird ausgeschnitten und eluiert (3.1.4.2.).

3.10.3. Modifizierungsreaktion mit APA-Br

Mit p-Azidophenacylbromid (APA-Br) können tRNAs, die bereits NTP α S (3.10.2.), GMPS (3.4.5.), s^4 UTP (3.4.6.) und s^2 CTP (3.10.2.) beinhalten, zusätzlich modifiziert werden. Durch die photochemisch anregbare APA-Gruppe können diese RNA-Moleküle in Crosslink-Experimente (3.10.4.) eingesetzt werden. Durch die Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 302 nm wird die funktionelle Gruppe angeregt und es entsteht ein reaktives Nitren, welches sehr schnell abreagiert, indem es in seiner direkten Umgebung eine kovalente Vernetzung von RNA-Molekülen (intra- und intermolekular) herbeiführt.

Modifizierungsreaktion mit APA-Br

Reaktionsansatz (200 μ l)	Endkonzentration
10 μ l modifizierbares Transkript (36 μ g)	180 ng/ μ l
20 μ l APA-Br (0,1 M in MeOH)	10 mM
170 μ l DMF	85 % (v/v)

Um eine frühzeitige photochemische Anregung der APA-Gruppe zu vermeiden, wird die gesamte Synthese und Aufreinigung in *amber tubes* durchgeführt. Der Ansatz wird entsprechend dem

Pipettierschema komplettiert und für 3-4 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss werden 100 µl NaOAc (0,2 M; pH 7,5) zugegeben. Für eine bessere Phasentrennung bei der Phenolisierung des Reaktionsgemisches werden 100 µl Phenol und 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (29:1) zugegeben und gründlich gemischt. Die weitere Durchführung erfolgt wie in 3.2.3. beschrieben. Die so gewonnene modifizierte RNA kann nun in Crosslink-Experimente eingesetzt werden (3.10.4.) und die Vernetzungsstellen durch Primer-Extension-Analysen lokalisiert werden (3.5.3.).

3.10.4. Photochemisch induzierte RNA-RNA-Verknüpfungen

3.10.4.1. Analytische Crosslink-Reaktion

Um kovalente intermolekulare RNA-RNA-Verknüpfungen (sog. Crosslinks) zwischen RNase P RNA und Substrat herbeizuführen, wird ein Reaktionsgemisch der beiden Reaktanden mit Licht geeigneter Wellenlänge bestrahlt. Die Wahl der verwendeten Wellenlänge richtet sich nach dem jeweilig eingesetzten Vernetzungs-Reagenz. Es kann sowohl die RNase P RNA als auch das Substrat entsprechend markiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Möglichkeiten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Modifizierte RNA	Modifizierungs-Stelle	Vernetzungs-reagenz	Wellenlänge; Belichtung	Synthese; Produktname
RNase P RNA	intern	s ⁴ UTP	366 nm; 60 min	3.4.6. s ⁴ U-RNase P RNA
RNase P RNA	s ⁴ U (intern)	APA	302 nm; 5 min	3.4.6.; 3.10.3. APA-s ⁴ U-RNase P RNA
pre-tRNA _{CCA}	5'-Monophosphorothioat (GMPS; G -15)	APA	302 nm; 5 min	3.4.5.; 3.10.3. 5' APA-pre-tRNA _{CCA}
pre-tRNA _{CCA}	3'-CCA; (ATPαS; A 76)	APA	302 nm; 5 min	3.4.3.; 3.10.2.; 3.10.3. 3' APA-pre-tRNA _{CdCsA}
pre-tRNA _{CCA}	3'-CCA; C 75	s ² CTP	254 nm; 15 min	3.4.3.; 3.10.2. pre-tRNA _{Cs²CA}
pre-tRNA _{CCA}	3'-Cs ² CA; C 75	APA	302 nm; 5 min	3.4.3.; 3.10.2.; 3.10.3. 3' APA-pre-tRNA _{Cs²CA}
mat-tRNA _{CCA}	5'-Monophosphorothioat (GMPS; G 1)	APA	302 nm; 5 min	3.4.5.; 3.10.3. 5' APA-mat-tRNA _{CCA}
mat-tRNA _{CCA}	3'-CCA; (ATPαS; A 76)	APA	302 nm; 5 min	3.4.3.; 3.10.2.; 3.10.3. 3' APA-mat-tRNA _{CdCsA}

Um eine Prozessierung des Substrates zu unterbinden, sind im Reaktionspuffer die hierfür essentiellen Mg²⁺-Ionen durch Ca²⁺-Ionen substituiert. Es bildet sich zwar der aktive Enzym-Substratkomplex, eine Prozessierung durch das Mg²⁺-abhängige Ribozym unterbleibt aber.

Der Reaktionsansatz wird in *amber tubes* nach folgendem Schema komplettiert:

Analytische Crosslink-Reaktion	
Reaktionsansatz 30 μ l	Endkonzentration
RNase P RNA	100 nM
RNase P RNA ($[^{32}\text{P}]$ -markiert; 200 000 cpm)	6666,6 cpm/ μ l
Substrat (trägt Vernetzungsreagenz)	1000 nM
1,5 \times Bindungspuffer 6	1 \times
ddH ₂ O	ad 30 μ l

Das radioaktiv markierte Transkript wird hierbei immer von dem Reaktionspartner eingesetzt, der nicht das Vernetzungsreagenz trägt.

Um die optimale Bildung des Enzym-Substratkomplexes zu fördern, wird der Ansatz für 5 min bei 37 °C inkubiert und dann für weitere 5 min auf Eis gestellt.

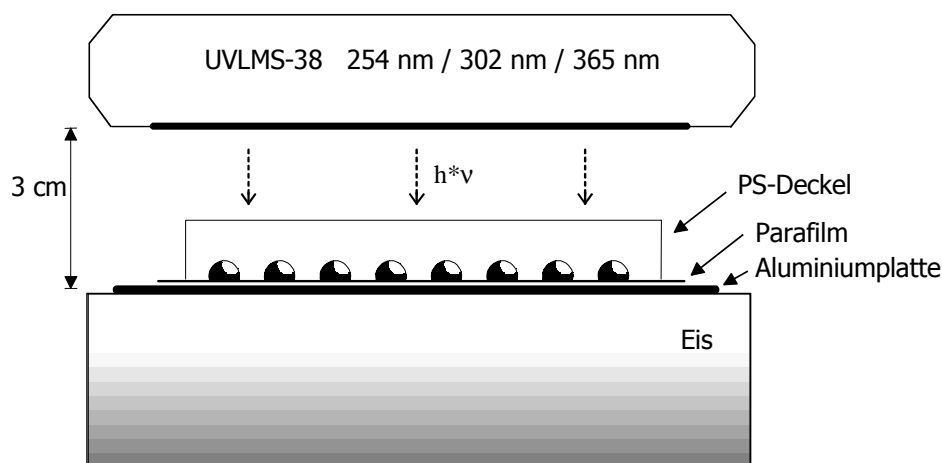


Abb. 3-1: Technischer Aufbau der Crosslink-Reaktion

Der schematische Aufbau mit UV-Lampe, PS-Deckel, Parafilm, Reaktionsaliquots, Aluminiumplatte und Eisbad ist dargestellt.

Ein Streifen sterilen Parafilms wird auf einer Aluminiumplatte befestigt, und diese auf Eis gelegt. Das Reaktionsgemisch wird nun unter Lichtausschluss als Tropfen (30 μ l) auf den Parafilm pipettiert und mit einem PS-Deckel einer Kulturplatte, welcher nur Licht mit Wellenlängen > 300 nm hindurchlässt, abgedeckt (keine Abdeckung bei der Verwendung von 254 nm). Die Belichtung bei der entsprechenden Wellenlänge erfolgt wie oben angegeben mit einer Auflichtlampe (UVLMS-38, UVP). Im Anschluss wird die Probe in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, präzipitiert (3.2.1.) und gründlich gewaschen.

Zur Analyse der Crosslinkreaktion werden die Sedimente in Harnstoffprobenpuffer gelöst, und nach einer Denaturierung auf ein 7 % PAA-Gel (20 \times 40 \times 0,04 cm) aufgetragen. Die Elektrophorese wird so lange durchgeführt, bis XCFF den unteren Gelrand erreicht hat. Durch Autoradiographie (3.1.3.1.) des getrockneten Gels können die Crosslinks lokalisiert werden.

1,5× Bindungspuffer 6		
	Endkonzentration	Volumen/ 50 ml
MOPS (1 M; pH 7,5)	0,075 M	3,75 ml
NH ₄ OAc (10 M)	4,5 M	22,5 ml
Ca(OAc) ₂ (1 M)	0,375 M	18,75
ddH ₂ O		ad 50 ml

3.10.4.2. Präparative Crosslink-Reaktion und Aufreinigung der Komplexe

Für eine präparative Crosslink-Reaktion wird der in 3.10.4.1. beschriebene analytische Ansatz auf das 20fache hochskaliert. Der Reaktionsansatz wird in einem lichtdichten Reaktionsgefäß (*amber tube*) nach folgendem Schema komplettiert:

Präparative Crosslink-Reaktion	
<i>Reaktionsansatz (600 µl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
RNase P RNA	100 nM
RNase P RNA radioaktiv markiert (4×10^5 - 4×10^6 cpm)	666,6 cpm/ µl
Substrat (trägt Vernetzungsreagenz)	1000 nM
1,5× Bindungspuffer 6	1×
ddH ₂ O	ad 600 µl

Das radioaktiv markierte Transkript wird hierbei immer von dem Reaktionspartner eingesetzt, der nicht das Vernetzungsreagenz trägt.

Um die optimale Bildung des Enzym-Substratkomplexes zu fördern, wird der Ansatz für 5 min bei 37 °C inkubiert und dann für weitere 5 min auf Eis gestellt.

Ein Streifen sterilen Parafilms wird auf einer Aluminiumplatte befestigt, und diese auf Eis gelegt. Das Reaktionsgemisch wird nun unter Lichtausschluss in 30 µl-Aliquots in Reihe auf den Parafilm pipettiert und mit einem PS-Deckel einer Kulturplatte, welcher nur Licht mit Wellenlängen > 300 nm hindurchlässt, abgedeckt (keine Abdeckung bei der Verwendung von 254 nm). Die Belichtung bei der entsprechenden Wellenlänge erfolgt wie in Abb. 3-1 angegeben. Im Anschluss werden die Aliquots in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vereinigt und durchmischt. Zur Reaktionskontrolle auf einem analytischen Gel wird 1/10 des Ansatzes entnommen und präzipitiert (3.2.1.). Der Hauptteil der Probe wird auf zwei Reaktionsgefäße aufgeteilt, präzipitiert und gewaschen. Die in ddH₂O gelösten Präzipitate werden in einem Reaktionsgefäß wieder vereinigt und erneut präzipitiert und gewaschen.

Zur Analyse der Crosslinkreaktion werden die Sedimente in Harnstoffprobenpuffer gelöst, und nach einer Denaturierung auf ein 7 % PAA-Gel (20 × 40 × 0,1 cm) aufgetragen. Die Elektrophorese wird so lange durchgeführt, bis XCFF den unteren Gelrand erreicht hat. Durch Autoradiographie (3.1.3.1.) des mit Haushaltsfolie abgedeckten Gels können die Crosslinks lokalisiert werden. Mit einem sterilen Skalpell werden die Crosslink-Produkt- und Edukt-Banden ausgeschnitten und in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, in denen die RNA-Elution durchgeführt wird (3.1.4.2.). Aufgrund der

Größe der ausgeschnittenen Gelstücke, kann es hierbei mitunter nötig sein, 2×800 ml Elutionspuffer zu verwenden oder die Gelstücke auf mehrere Reaktionsgefäße zu verteilen.

Die isolierten und aufgereinigten RNAs werden dann zur Identifizierung der Vernetzungsstellen in Primer-Extension-Reaktionen (3.5.3.) eingesetzt.

3.10.5. RNA-Ligation durch T4 DNA-Ligase

Sollen RNA-Moleküle intra- oder intermolekular ligiert werden, stehen hierfür mit der T4 RNA-Ligase und der T4 DNA-Ligase zwei Enzyme zur Verfügung. Beiden ist gemein, dass sie in einer ATP-abhängigen Reaktion ein 3'-Donor-Molekül, welches ein 5'-Monophosphat besitzt, und ein 5'-Acceptor-Molekül, das eine freie 3'-Hydroxy-Gruppe trägt, zu einer 3'-5'-Phosphodiesterbindung ligieren. Für die T4 RNA-Ligase müssen die beiden Substrate um die Verbindungsstelle herum einzelsträngig vorliegen. Die T4 DNA-Ligase hingegen verbindet nur doppelsträngige DNA-Substrate und DNA/RNA-Hybride. Diese Eigenschaft kann für eine höhere Ligationspezifität ausgenutzt werden, indem ein sequenzspezifisches komplementäres DNA-Oligonukleotid die beiden zu verbindenden RNA-Enden überbrückt. Es werden mit Hilfe dieses „Splint“-Oligonukleotids folglich nur die durch den Primer selektierten RNA-Enden ligiert. Durch Variation der Splint-Konzentration kann zusätzlich die Ligation zwischen Zyklisierung (niedrige Konz.) und intermolekularer Ligation (hohe Konz.) gesteuert werden.

Auch durch den Einsatz eines sog. „Disruptors“ kann eine Cyclisierung favorisiert werden. Dieser zusätzliche Primer wird für interne ausgeprägte Sekundärstrukturen konzipiert, und erleichtert durch seine Hybridisierung an diese Stellen die bessere Zusammenführung der Moleküleenden für die Splint-Ligation.

Hybridisierung des Splint-Oligonukleotides für eine intramolekulare Ligation (Zyklisierung)

<i>Reaktionsansatz (300 μl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
60-100 pmol RNA (5'-Monophosphat; 3'-OH)	0,2-0,33 μ M
30 μ l 10 \times Hybridisierungspuffer	1 \times
6 μ l Splint-Oligonukleotid (10 μ M)	0,2 μ M
ddH ₂ O	ad 300 μ l

Der Hybridisierungsansatz wird für zwei Minuten bei 90 °C inkubiert und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wird präzipitiert, und das Sediment zu folgendem Ansatz komplettiert:

RNA-Zyklisierung durch Splint-Ligation mit T4 DNA-Ligase

<i>Reaktionsansatz (15 µl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
Präzipitat des Hybridisierungsansatzes	
1,5 µl 10× T4 DNA-Ligase-Puffer	1×
1,5 µl PEG 4000 (50 % (w/v))	5 % (w/v)
1 µl ATP (10 mM)	0,66 mM
4 µl T4 DNA-Ligase (5U/µl)	1,33 U/ µl
ddH ₂ O	ad 15 µl

Der Ligationsansatz wird 2 Stunden bei 37 °C oder über Nacht im Ligationsbad (14 °C) inkubiert. Danach wird präzipitiert und das Sediment auf ein PAA-Gel aufgetragen. Soll mit der ligierten RNA eine Primer-Extension-Analyse durchgeführt werden, muss das evtl. störende Oligonukleotid allerdings zuvor durch DNase I (30 min; 37 °C; RNase-frei) hydrolysiert werden. Im Anschluß wird phenolysiert, präzipitiert und das Sediment in der Primer-Extension-Reaktion eingesetzt.

10× Hybridisierungspuffer

	Endkonzentration	Volumen/ 1 ml
Tris-HCl (1 M ; pH 7,5)	100 mM	100 µl
NaCl (5 M)	1 M	200 µl
Na ₂ EDTA (0,5 M)	1 mM	2 µl
ddH ₂ O		ad 15 µl

Für eine RNA-Ligation mit T4 RNA-Ligase wird folgender Ansatz verwendet:

RNA-Zyklisierung durch Splint-Ligation mit T4 RNA-Ligase

<i>Reaktionsansatz (20 µl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
60-100 pmol RNA (5'-Monophosphat; 3'-Hydroxyl)	3-5 µM
2 µl 10× T4 RNA-Ligase-Puffer	1×
1 µl ATP (10 mM)	0,5 mM
1 µl T4 RNA-Ligase (10 U/µl)	0,5 U/ µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Der Ansatz wird über Nacht bei 14 °C inkubiert, phenolysiert und präzipitiert.

3.11. Analyse von Nukleinsäure-Modifikationen

3.11.1. Enzymatische Totalhydrolyse von RNA

Zur Analyse der Nukleotid-Zusammensetzung von RNA wird diese durch Hydrolyse vollständig in die Nukleotide zerlegt. Für eine enzymatische Hydrolyse ergeben sich hierfür mehrere Möglichkeiten.

Durch Nuklease P1 erhält man Nukleoside mit einem 5'-Monophosphat (pN). Ein Gemisch aus RNase T2 und RNase A hydrolysiert RNA zu 3'-Nukleosid-Monophosphaten (Np), wobei RNase T2 sequenzunabhängig aktiv ist, während RNase A nur pyrimidinspezifisch hydrolysiert.

In dieser Arbeit wurde ausschliesslich ein Gemisch von RNase T2 und RNase A zur Erzeugung von 3'-Nukleosid-Monophosphaten verwendet. Die zu untersuchenden RNAs werden radioaktiv markiert (3.4.4.) in die Hydrolyse eingesetzt.

Enzymatische Totalhydrolyse von RNA

Reaktionsansatz (10 μ l)	Endkonzentration
7 μ l Transkript ($1-5 \times 10^4$ cpm)	1000- 5000 cpm/ μ l
2 μ l NH_4OAc (50 mM, pH 4,5)	10 mM
1 μ l Enzym-Mix (50 mU/ μ l RNase T2; 0,1 μ g/ μ l RNase A)	5 mU/ μ l RNase T2 0,1 μ g/ μ l RNase A

Der Ansatz wird bei 37 °C für 4 Stunden inkubiert und im Anschluss im Exsikkator eingetrocknet. Das Reaktionsgemisch wird durch Lösen in 2 μ l 3'-Nukleosid-Monophosphat-Lösung (Ap, Cp, Gp, Up; je 2,5 μ g/ μ l) für die Dünnschichtchromatographie (3.11.2.) vorbereitet. Die zugegebenen nicht radioaktiv markierten Nps dienen hierbei als interner Standard.

3.11.2. Dünnschichtchromatographie

Zur Analyse von RNA-Totalhydrolysaten (3.11.1.) wird die aufsteigende zweidimensionale Dünnschichtchromatographie verwendet. Sie wird auf Cellulose- oder Polyethylenimin-Cellulose-Platten (PEI-Cellulose) ausgeführt. Die Chromatographie mit Cellulose (Macherey Nagel; CEL 300) ist die Methode der Wahl für Basen, Nukleoside und Nukleotid-Monophosphate wohingegen die Chromatographie mit Anionenaustauscher-Schichten (Macherey Nagel; CEL 300 PEI) für die Auftrennung von Nukleotid-Mono- Di- und Triphosphaten bevorzugt wird.

Die Probe wird mit einer Mikropipette in 1 μ l Portionen punktförmig auf eine Platte (20 \times 20 cm) 1,5 cm vom unteren und linken Rand entfernt aufgetragen. Um einen zu großen Auftragungsfleck zu vermeiden, wird bei Cellulose-Platten zwischen den einzelnen Portionen mit einem Fön getrocknet. Bei PEI-Cellulose ist dies nicht nötig, da hier die Probe durch den Anionenaustauscher auf einen kleinen Punkt konzentriert bleibt. Nach der Auftragung muss das Lösungsmittel restlos verdampft sein, bevor die Platte in die Chromatographie-Kammer gestellt werden kann.

Die Chromatographie wird in einem rechteckigen Glasktank durchgeführt, der bis zur Höhe von 0,8 cm mit dem entsprechenden Laufmittel befüllt wird. Um eine Luftsättigung der Kammer mit dem Solvenz zu erhalten, wird der Tank vorher zusätzlich an den Wänden mit Filterpapier ausgekleidet.

Die Cellulose-Platten werden in der 1. Dimension mit Laufmittel A entwickelt, bis die Lösungsmittelfront die Oberkante der Platte erreicht hat. Die Platte wird im Abzug getrocknet, bevor sie in der zweiten Dimension mit Laufmittel B entwickelt wird. Auch hier wird die Auftrennung beendet, wenn die Laufmittelfront den oberen Plattenrand erreicht hat. Die Platte wird getrocknet, mit Haushaltsfolie abgedeckt, und autoradiographiert. Die Spots des internen Standards werden durch Fluoreszenz bei 254 nm sichtbar gemacht und auf der Platte markiert. Durch Vergleich des internen Standards mit dem Autoradiogramm können die vier Hauptnukleotide identifiziert werden und ausgehend von ihrer Lokalisation Modifizierungen anderer Nukleotide identifiziert werden.

Laufmittel A		Laufmittel B	
	Volumen/ 100 ml		Volumen/ 100 ml
Isobuttersäure	57,7 ml	Isopropanol	70 ml
Konz. NH ₃	3,8 ml	Konz. HCl	15 ml
ddH ₂ O	38,5 ml	ddH ₂ O	15 ml

3.11.3. Nachweis von Thioketonen und Thiolen

Das Vorhandensein von Thioketonen und Thiolen als funktionelle Gruppen in organischen Molekülen kann durch einen einfachen Test nachgewiesen werden (Feigl, 1960). Die eigentlich langsame Redox-Reaktion: $2 \text{NaN}_3 + \text{J}_2 \rightarrow 2 \text{NaJ} + 3 \text{N}_2$ wird sowohl durch anorganische Sulfide, Thiosulfate und Thiocyanate als auch durch organische Verbindungen, die Thioketone und Thiole enthalten, katalysiert. Die spontane Bildung von gasförmigem N₂ dient hierbei als Nachweis der genannten Verbindungen und Gruppen. In dieser Arbeit wurden mit diesem Test der Nachweis für s²CTP und s⁴UTP sowie der Einbau von GMPS in Transkripte (3.4.5.) und dessen Modifizierung mit APA-Br (3.10.3.) dokumentiert.

In eine 1,5 ml Messküvette werden 200 µl der Iod-Azid-Lösung vorgelegt. Ein Aliquot der zu untersuchenden Probe wird in die Mitte des Küvettenbodens pipettiert und die Lösung auf die Bildung von N₂-Gasbläschen beobachtet und evtl. photographisch dokumentiert.

Iod-Azid-Lösung	
	Menge/ 1,5 ml
NaN ₃	1 Spatelspitze (EtOH; 50 %)
I ₂	Körnchen element. I ₂

Da die Lösung bei längerer Lagerung ihre Reaktivität verliert, empfiehlt es sich für eine schnelle Durchführung des Nachweises kleine Volumina der Iod-Azid-Lösung frisch anzusetzen. Zu 1,5 ml 50 % (v/v) EtOH wird eine Spatelspitze NaN₃ gegeben, von der trotz kräftigen Mischens ein ungelöster Teil am Boden verbleibt. Im Anschluss werden einige Körnchen elementares Iod zugegeben, so dass

sich nach erneutem kräftigem Mischen eine orangefarbige Lösung ergibt. Die Färbung der Lösung durch das Iod sollte aber nicht zu intensiv sein, so dass mögliche feine Gasblasen bei der Durchsicht zu erkennen sind.

3.12. Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P RNA

RNase P ist ein Enzym, welches an der Reifung von Vorläufer-tRNA (pre-tRNA) durch endonukleolytische Abspaltung der 5'-Flanke beteiligt ist. Als *in trans*-agierendes Ribozym ist bakterielle RNase P-RNA unter bestimmten Salzbedingungen *in vitro* katalytisch aktiv (Guerrier-Takada *et al.*, 1983), wobei diese Reaktion stark von mono- und divalenten Kationen (NH_4^+ , Mg^{2+}) abhängig ist.

Zur Untersuchung der 5'-Prozessierung von pre-tRNAs aus *Prochlorococcus marinus* im homologen System wird als Substrat pre-tRNA^{Arg} aus *P. marinus* verwendet. Zur Bestimmung des jeweiligen Substratumsatzes kommen *in vitro* synthetisierte pre-tRNA^{Arg}-Spezies (3.4.3.) zum Einsatz, die sich lediglich am 3'-Ende voneinander unterscheiden (pre-tRNA_{ΔCCA}, pre-tRNA_C, pre-tRNA_{CC} bzw. pre-tRNA_{CCA}).

Zur Bestimmung des Substratumsatzes wird das Substrat/Produkt-Verhältnis nach einem Aktivitätstest am PhosphoImager aus dem Autoradiogramm ermittelt.

3.12.1. *In vitro* Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P RNA

Zur Untersuchung der *in vitro* 5'-Prozessierung von pre-tRNA^{Arg} durch *P. marinus* RNase P RNA wird der jeweilige zeitabhängige Substratumsatz bestimmt. Um den Einfluss des 3'-CCA-Endes auf die Prozessierung zu ermitteln, werden Substrate der gleichen tRNA eingesetzt, die sich lediglich am 3'-Ende voneinander unterscheiden (pre-tRNA_{ΔCCA}, pre-tRNA_C, pre-tRNA_{CC} bzw. pre-tRNA_{CCA}). Die möglichen Unterschiede der Substratumsätze können somit in einen direkten Zusammenhang mit dem Vorhandensein der einzelnen Nukleotide des 3'-CCA-Endes gebracht werden.

***In vitro* Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P RNA**

Reaktionsansatz (50 μl)	Endkonzentration
5 μl RNase P RNA	6,25-25 nM
10,7 μl pre-tRNA	0,2-6,4 μM
1 μl pre-tRNA (100 000 cpm/ μl)	2000 cpm/ μl
33,3 μl Puffer P2 (1,5 \times)	1 \times

Von der RNase P RNA wird eine 10 \times Stammlösung (250 nM) hergestellt, von der ausgehend alle benötigten Verdünnungen hergestellt werden. Der Reaktionsansatz wird bis auf das Ribozym komplettiert und bei 37°C für zwei Minuten vorinkubiert. Von der RNase P RNA wird eine 10 \times

Lösung der gewünschten Konzentration hergestellt und diese ebenfalls für 2 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgt durch Zugabe von 5 µl der Ribozym-Lösung der sekundengenaue Start der Reaktion, die bei 37 °C für 0-10 min inkubiert wird. Zu den jeweiligen Zeiten wird je ein Aliquot (10 µl) entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 40 µl EDTA-Lösung (50 mM) zum sofortigen Reaktionsstopp vorgelegt wurden. Dieses wird bis auf weiteres auf Eis gestellt. Nach Entnahme aller Zeitwerte werden diese präzipitiert (3.2.1.).

Das getrocknete Sediment wird in 10 µl Harnstoffpuffer aufgenommen und nach Hitzedenaturierung (94 °C, 2 min) zur Analyse auf ein 10 % PAA-Gel (Gelmaße: 20 × 20 × 0,04 cm) aufgetragen (3.1.2.). Die Elektrophorese wird solange durchgeführt, bis BPB 1 cm vom unteren Gelrand entfernt ist. Die Reaktionsprodukte werden auf einem Röntgenfilm oder im PhosphorImager sichtbar gemacht und quantifiziert (3.13.1.).

1× Puffer P2		
	Endkonzentration	Menge/ 10 ml
Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	50 mM	0,5 ml
NH ₄ Cl (4 M)	3 M	7,5 ml
MgCl ₂ (2 M)	250 mM	1,25 ml
ddH ₂ O	ad 10 ml	

3.13. Bestimmung enzymkinetischer Parameter

3.13.1. Quantifizierung von Autoradiographien

Mit dem PhosphorImager ist es möglich, Banden eines Autoradiogrammes zu quantifizieren. Anstelle eines Röntgenfilmes wird eine Platte (screen) durch die radioaktiv markierten Moleküle belichtet. Der screen ist mit BaFBr:Eu-Kristallen beschichtet, die durch die Strahlung in einen angeregten stabilen Zustand gebracht werden ($\text{Eu} \rightarrow \text{Eu}^{2+}$). Nach der Exposition werden die Kristalle durch einen Laserstrahl abgetastet und in einen energetisch höheren, aber instabilen Zustand ($\text{Eu}^{2+} \rightarrow \text{Eu}^{3+}$) angeregt. Die Elektronen fallen unter messbarer Lichtemission in ihren Grundzustand ($\text{Eu}^{3+} \rightarrow \text{Eu}$) zurück. Die Methode ist 10-100 mal empfindlicher als die Verwendung von Röntgenfilmen. Zusätzlich ist das System weniger schnell gesättigt, so dass sich ein sehr viel grösserer linearer Signalbereich ergibt, der zur Quantifizierung besser geeignet ist als der von Röntgenfilmen.

Zur Quantifizierung einzelner Banden in benachbarten Spuren werden diese getrennt mit identischen Messbereichen abgedeckt (Kreise; Rechtecke) und die Signalintensitäten dieser Flächen gemessen und miteinander verglichen.

Zur Messung mehrerer Banden in einer Spur (z.B. bei Prozessierungs-Kinetiken) werden mehrere Geraden gelegt, die jeweils alle Banden der betreffenden Spur schneiden. Die Intensität der einzelnen Banden wird automatisch für jede Gerade ermittelt und quantifiziert ([%] bezogen auf die von der Geraden gemessenen Gesamt-Intensität).

3.13.2. Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} von RNase P RNA

Für die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante (K_M) der Prozessierung von pre-tRNAs durch RNase P RNA (3.12.1.), werden bei gleicher Enzymkonzentration von 4 verschiedenen Substratkonzentrationen je 5 Zeitwerte der Reaktion analysiert.

Mit der in 3.13.1. beschriebenen Quantifizierung des Reaktionsgemisches am PhosphorImager wird der absolute Umsatz (%) aus den Werten für Edukt, Produkt und Flanke ermittelt. Bei einer Auftragung gegen die Zeit ergibt sich eine hyperbolische Kurve für jede Konzentration. Aus dem absoluten Umsatz berechnen sich weitere Größen, die für die K_M -Bestimmung nötig sind

Zur Bestimmung der K_M wird die doppeltreziproke Auftragung der Michaelis-Menten-Gleichung verwendet. Bei dieser sogenannten Lineweaver-Burk Auftragung wird $1/S$ gegen $1/V$ aufgetragen. Man erhält für jeden Zeitwert eine Gerade mit der Steigung K_M/V_{max} , die bei $1/V_{max}$ die Ordinate und bei $-1/K_M$ die Abszisse schneidet. Somit lässt sich K_M sehr leicht bestimmen.

Wird jeder Zeitwert am PhosphorImager mehrfach vermessen, werden in die Lineweaver-Burk-Auftragung alle berechneten Werte eingezeichnet und eine lineare Ausgleichsgerade 1. Ordnung berechnet ($Y = Y_0 + a X$). Aus ihren Parametern lässt sich somit K_M berechnen.

Zur Absicherung der ermittelten Werte, werden für jedes Substrat 3-4 identische Kinetiken durchgeführt, so dass der endgültig bestimmte K_M -Wert eine Mittelung aus mehreren getrennten Datensätzen ist.

Zur K_M -Bestimmung benötigte Parameter

Grösse	Einheit	Berechnung
Absoluter Umsatz	[%]	(Produkt + Flanke) / (Edukt + Produkt + Flanke) (Die Werte entstammen d. Quantifizierung der entsprechenden Banden)
Substratumsatz	[nM]	Absol. Umsatz [%] × Substratkonz. [nM]
Geschwindigkeit V	[nM/min]	Substratumsatz [nM] / Zeit[min]
Reziproke Geschwindigkeit 1/V	[min/nM]	1 / Geschwindigkeit [nM/min]
Reziproke Substratkonz. 1/S	[1/nM]	1 / Substratkonz. [nM]

3.14. Modelling von RNA mit dem Programm ERNA-3D

In dieser Arbeit sollte die RNase P RNA aus *P. marinus* dreidimensional modelliert werden.

Dies ist mit dem Computer-Programm ERNA-3D möglich. Mit ihm lassen sich große Makromoleküle aus DNA, RNA und Aminosäuren dreidimensional modellieren.

Die technischen Voraussetzungen sind Grafikrechner von Silicon Graphics, auf denen das Betriebssystem IRIX 5.1 (und neuere Varianten) installiert ist. Die praktische Arbeit wird durch die

Verwendung einer sog. Shutter-Brille mit Infrarot-Emitter erleichtert. Mit ihrer Hilfe kann das Molekül dreidimensional am Monitor betrachtet und modelliert werden.

Mit ERNA-3D ist es möglich eine Fülle von RNA-Doppelhelices mit komplizierten Strukturen wie Pseudoknoten, innere Schleifen (*Internal Loops*), *Bulges* und Haarnadelschleifen (*Hairpin Loops*) aufzubauen. Für den Aufbau wird eine Strukturdefinitionsdatei benötigt, die Informationen über die Primärsequenz und Sekundärstruktur des Moleküls enthält. Das Programm übersetzt die Atome in räumliche atomare Koordinaten und baut anschließend die helikalen Strukturen auf. ERNA-3D besitzt die Fähigkeit, Molekülteile in einer dynamischen und realistischen Weise zu modifizieren. Einzelstränge können mit Hilfe der Computermause gezogen und in eine „natürliche“ Form gebracht werden. Hierfür besitzt das Programm den sog. Kettentranslationsalgorithmus, der die Rotationen von molekularen Gruppen um Einzelbindungen entlang des Rückgrades in Echtzeit simuliert, so dass die Kette wie ein natürliches Molekül geformt werden kann. Wird z. B eine Doppelhelix gezogen, dann folgen die mit ihr verbundenen Stränge der Bewegung. Von Hand lassen sich folglich einzelne Atome, Einzelstränge und Helices translatieren und rotieren, bis die gewünschte dreidimensionale Ausrichtung erreicht ist. So ist es möglich, die gewünschte räumliche Struktur des Gesamtmoleküls nach und nach manuell zu modellieren.

Zur leichteren Arbeit an großen und damit unübersichtlichen Makromolekülen besitzt das Programm weitere Funktionen, die hier aber nicht näher erläutert werden können.

Eines der Ein- und Ausgabeformate von ERNA-3D sind pdb-Dateien, mit denen in vielen Visualisierungsprogrammen gearbeitet werden kann.

4. Ergebnisse

4.1. Konstruktion von tRNA^{Arg}_{CCU} T7-Transkriptionsklonen

4.1.1. Konstruktion von pre-tRNA^{Arg}_{CCU} T7-Transkriptionsklonen

Die RNase P-codierende Region des Cyanobakteriums *P. marinus* enthält außer dem *rnp B*-Gen neben einem offenen Leserahmen und mehreren *Inverted Repeats* strangaufwärts noch das für eine Arginin-tRNA (tRNA^{Arg}_{CCU}) codierende Gen *trnR* in entgegengesetzter Orientierung (Hess *et al.*, 1998). Diese Genanordnung steht dem Arrangement in den Plastiden aus *C. paradoxa* und *P. purpurea* näher als dem anderer Cyanobakterien (Baum *et al.*, 1996; Reith und Munholland, 1993). In Übereinstimmung mit tRNA-Genen von Cyanobakterien und Plastiden ist das 3'-CCA-Ende nicht codiert. Konsequenterweise besitzt die RNase P-RNA kein 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv für 3'-CCA-Enden. Da die RNase P RNA dennoch katalytisch aktiv ist (Hess *et al.*, 1998) sollte die *in vitro* Prozessierung im homologen *P. marinus* System mit tRNA^{Arg}_{CCU} untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten T7-Transkriptionsklone der tRNA^{Arg}_{CCU} hergestellt werden, die durch Enzymvariation bei der Restriktionshydrolyse der Plasmide nach einer anschließenden T7-Transkription unterschiedliche 3'-Enden der resultierenden Transkripte aufweisen.

Ausgehend von 10 ng Plasmid pPmarE2.4 wurde das *trnR*-Gen durch PCR mit *Pfu*-Polymerase (3.3.3.) mit den Primern EcoT7Pmr und Pmr3-1 amplifiziert.

EcoT7Pmr verfügt neben einer *Eco* RI Restriktionsschnittstelle zur Klonierung, auch über einen T7 RNA-Polymerase Promotor, der direkt vor dem 5'-Ende der tRNA-Flanke inseriert wird und unter dessen Kontrolle somit das *trnR*-Gen gestellt ist. Da die codierende Region bereits mit drei Guanosinen beginnt, mussten keine zusätzlichen Guanosine zur besseren Transkriptions-Initiierung zwischen T7-Promotor und der codierenden Region eingeführt werden.

Pmr3-1 besitzt neben einer *Bam* HI-Schnittstelle zur Klonierung zusätzliche Erkennungssequenzen für *Hga* I, *Fok* I und *Bst* NI. Sie ermöglichen eine spätere Linearisierung des Transkriptionsklons und somit eine nachfolgende run-off-Transkription. Durch Linearisierung mit *Hga* I erhält man bei der Transkription die pre-tRNA ohne 3'-CCA-Ende (pre-tRNA_{ΔCCA}). Plasmidhydrolyse mit *Fok* I resultiert in einem 3'-CC-Ende des Transkriptes (pre-tRNA_{CC}). Eine Linearisierung mit *Bst* NI führt zu einem vollständigen 3'-CCA-Ende (pre-tRNA_{CCA}) des *in vitro*-Transkriptes.

Um pre-tRNA Transkripte mit einem 3'-C-Ende (pre-tRNA_C) zu erhalten, wurde eine weitere PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden EcoT7Pmr und Pmr3-2 durchgeführt.

Pmr3-2 verfügt über die gleichen Erkennungssequenzen wie Pmr3-1 bis auf den Unterschied, dass ein Nukleotid zwischen den Erkennungsstellen von *Hga* I und *Fok* I fehlt (Abb. 4-1). Dadurch ist die hydrolytische Spaltung durch *Fok* I um ein Nukleotid *upstream* verschoben und resultiert in der anschließenden Transkription in pre-tRNA_C.

Die beiden PCR-Ansätze wurden anschließend mit *Eco* RI und *Bam* HI hydrolysiert, über ein Agarosegel aufgereinigt (3.1.1.) und direkt zur Ligation mit T4-DNA-Ligase eingesetzt.

Nach der gerichteten Ligation (3.6.4.) des jeweiligen Fragmentes über die Restriktionsschnittstellen *Eco* RI und *Bam* HI in pUC19 wurden die Plasmide in elektrokompetente *E. coli* JM 109-Zellen transformiert (3.6.6.2.). In Plattenkultur (3.7.2.) wurden über Ampicillinresistenz und α -Komplementierung jeweils 20 Klone vorselektiert, die durch Kolonie-PCR (3.3.3.) mit den Oligonukleotiden EcoT7Pmr und Pmr3-1 bzw. Pmr3-2 auf das klonierte Insert hin untersucht wurden. Positiv identifizierte Klone wurden sequenziert (3.5.2.). Die Plasmide mit der korrekten Sequenz (Abb. 4-1) wurden als pPmtRNAArg1 und pPmtRNAArg2 bezeichnet, die DNA in präparativem Maßstab isoliert (3.2.4.2.), Glycerinkulturen angelegt und die Plasmide durch Restriktionshydrolyse mit *Hga* I, *Fok* I und *Bst* NI (3.4.2.) zur präparativen *in vitro* T7-Transkription (3.4.3.) vorbereitet. Mit pPmtRNAArg1 lassen sich folglich die Transkripte pre-tRNA_{ΔCCA}, pre-tRNA_{CC} und pre-tRNA_{CCA} synthetisieren. Der Transkriptionsklon pPmtRNAArg2 dient zur Herstellung der Transkripte pre-tRNA_{ΔCCA}, pre-tRNA_C und pre-tRNA_{CCA}.

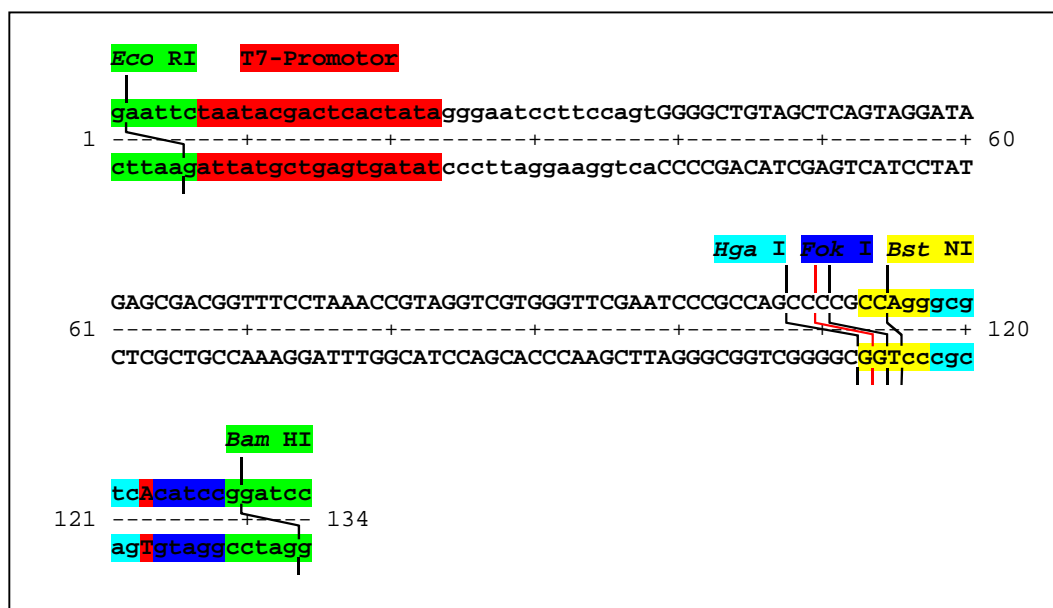


Abb. 4-1: Konstruktion und Sequenz der Transkriptionsklone pPmtRNAArg1 und pPmtRNAArg2

Gezeigt ist die in pUC19 insertierte Sequenz mit den Erkennungs- und Schnittstellen für *Eco* RI (grün), *Bam* HI (grün), *Hga* I (Cyan), *Fok* I (blau) und *Bst* NI (gelb). Der T7-Promotor (rot), das in pPmtRNAArg2 nicht vorhandene Nukleotid (rot) sowie die daraus resultierende verschobene *Fok* I-Schnittstelle (rot) sind ebenfalls gekennzeichnet. Die 5'-Flanke ist durch Kleinbuchstaben gezeigt.

4.1.2. Konstruktion von mat-tRNA^{Arg}_{CCU} T7-Transkriptionsklonen

Ausgehend von den Transkriptionsklonen pPmtRNAArg1 und pPmtRNAArg2 für die pre-tRNA^{Arg}_{CCU} wurden Transkriptionsplasmide für die reifen tRNAs erstellt, welche die analogen Variationsmöglichkeiten am 3'-Ende der tRNA aufweisen.

Die Deletion der 5'-Flanke der tRNAs wurde mit der Oligodesoxynukleotid-vermittelten bidirektionalen Mutagenese nach Standardvorschrift (3.3.4.) mit den Startsequenzen Pmrm (5'-phosphoryliert) und PmrT72 erreicht und durch Sequenzierung (3.5.2.) bestätigt. Mit dem Plasmid pPmtRNAArg1 für die pre-tRNA wurde das Plasmid pPmtRNAArg3 gewonnen, mit dem sich die Transkripte für mat-tRNA_{ΔCCA}, mat-tRNA_{CC} und mat-tRNA_{CCA} synthetisieren lassen. Die Verwendung von pPmtRNAArg2 führt zu dem Transkriptionsklon pPmtRNAArg4, mit dem sich die Transkripte für mat-tRNA_{ΔCCA}, mat-tRNA_C und mat-tRNA_{CCA} synthetisieren lassen. pPmtRNAArg3 und pPmtRNAArg4 (Abb. 4-2) besitzen folglich am 3'-Ende des tRNA-Gens die selbe Anordnung der Restriktionsschnittstellen (*Hga* I, *Fok* I, *Bst* NI) wie ihre jeweiligen Ausgangsplasmide. Von den in *E. coli* JM109-Zellen transformierten Transkriptionsplasmiden (3.6.6.) wurden Glycerinkulturen angelegt (3.2.4.1.), die DNA in präparativem Maßstab isoliert (3.2.4.2.) und nach entsprechenden Restriktionshydrolysen (3.4.2.) in *in vitro* T7-Transkriptionen (3.4.3.) eingesetzt.

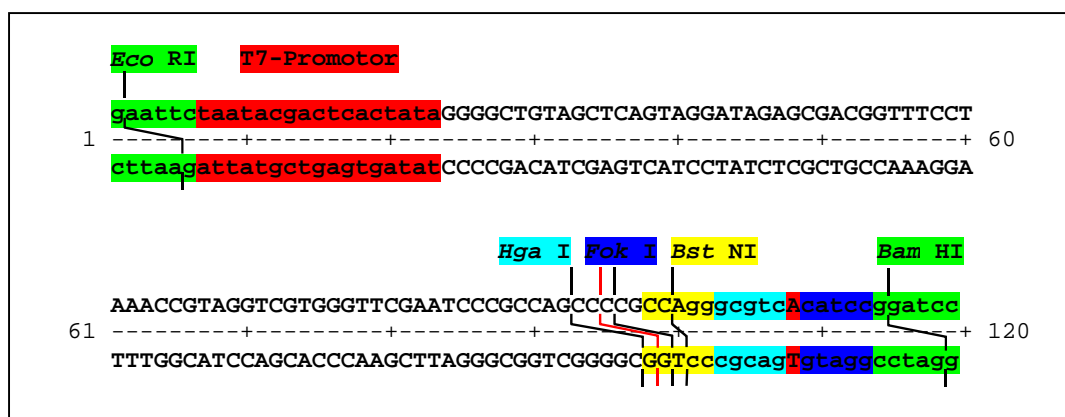


Abb. 4-2: Konstruktion und Sequenz der Transkriptionsklone pPmtRNAArg3 und pPmtRNAArg4

Gezeigt ist die in pUC19 insertierte Sequenz mit den Erkennungs- und Schnittstellen für *Eco* RI (grün), *Bam* HI (grün), *Hga* I (Cyan), *Fok* I (blau) und *Bst* NI (gelb). Der T7-Promotor (rot), das in pPmtRNAArg4 nicht vorhandene Nukleotid (rot) sowie die daraus resultierende verschobene *Fok* I-Schnittstelle (rot) sind ebenfalls gekennzeichnet.

4.1.3. Sequenzanalyse des Transkriptionsklons pPmT7k

Der für diese Arbeit essentielle Transkriptionsklon pPmT7k (Gimple, 1999), der das Gen für die *P. marinus* RNase P RNA trägt (Abb. 4-3), wurde einer Sequenzanalyse (3.5.2.) unterzogen und die DNA im präparativen Maßstab isoliert (3.2.4.2.).

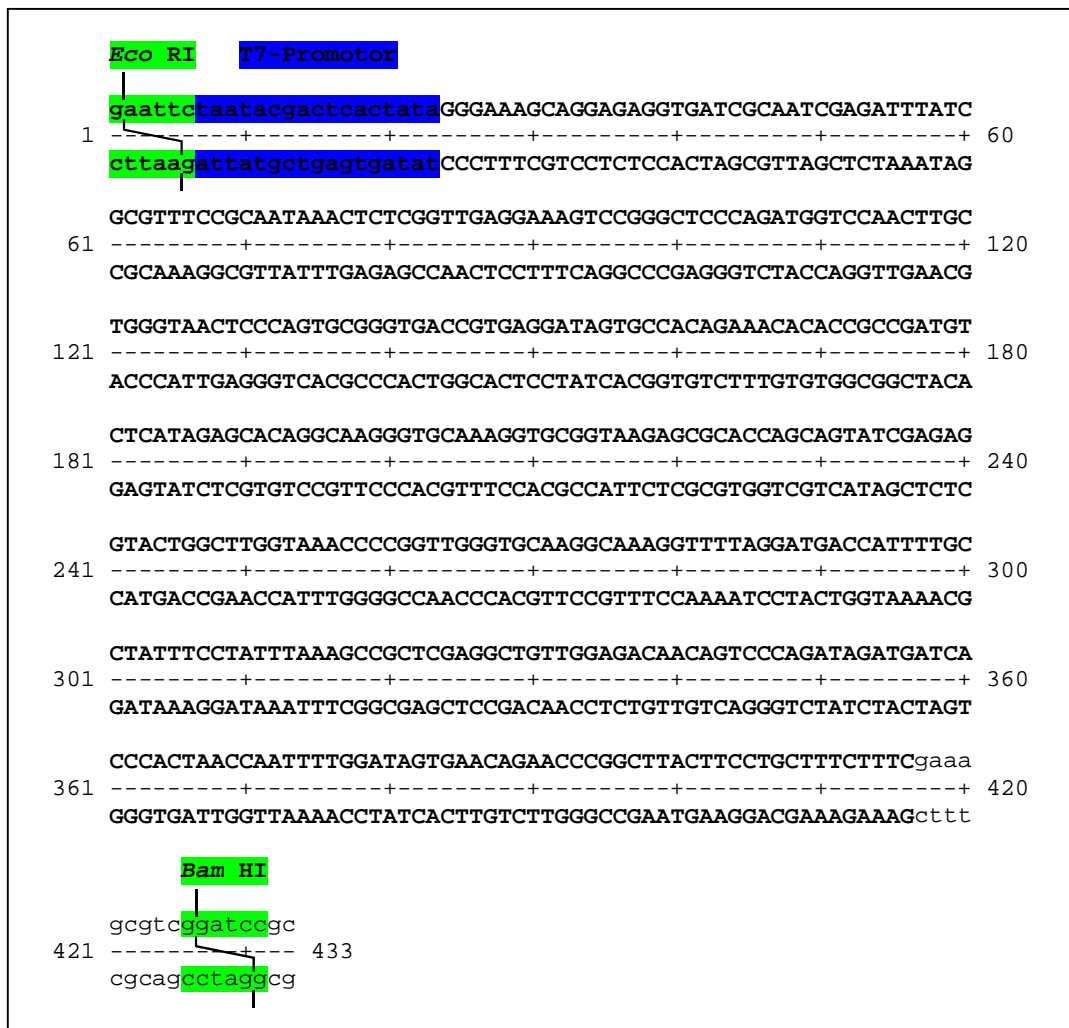


Abb. 4-3: Konstruktion und Sequenz des Transkriptionsklons pPmT7k

Gezeigt ist die in pUC19 insertierte Sequenz mit den Erkennungs- und Schnittstellen für *Eco* RI (grün), *Bam* HI (grün) sowie der T7-Promotor (blau).

4.2. Prozessierung von $tRNA^{\text{Arg}}_{\text{CCU}}$ mit *P. marinus* RNase P RNA und Bestimmung von Michaelis-Menten-Konstanten

Zur Untersuchung der *in vitro* 5'-Prozessierung von *P. marinus* pre- $tRNA^{\text{Arg}}_{\text{CCU}}$ durch *P. marinus* RNase P RNA im homologen System wurde der jeweilige zeitabhängige Substratumsatz bestimmt, da sich aus ihm die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) ermitteln lässt. Diese Konstante ist für jeden Enzym-Substrat-Komplex, wie er sich bei der pre-tRNA-Prozessierung zwischen der RNase P RNA und dem jeweilig eingesetzten Substrat ausbildet, eine individuelle Naturkonstante, die Aussagen über die Bildung, Stärke und Dissoziation des Komplexes liefert. Die K_M -Bestimmung erfolgte hier unter einer *steady-state*-Bedingung, bei der die Substratkonzentration sehr viel größer ist, als die Enzymkonzentration ($[S] \gg [E]$). Um den Einfluss des 3'-CCA-Endes auf die Prozessierung zu ermitteln, wurden Substrate der gleichen tRNA eingesetzt, die sich lediglich am 3'-Ende voneinander unterscheiden (pre- $tRNA_{\Delta\text{CCA}}$, pre- $tRNA_{\text{C}}$, pre- $tRNA_{\text{CC}}$ bzw. pre- $tRNA_{\text{CCA}}$).

Die für diese Kinetiken verwendeten RNAs wurden *in vitro* mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase von den Transkriptionsplasmiden pPmtRNAArg1, pPmtRNAArg2 und pPmT7k synthetisiert (3.4.3.). Die genaue Durchführung der Kinetiken erfolgte dabei wie sie in 3.12.1. beschrieben ist. Die Ermittlung der K_M -Werte erfolgte nach 3.13.2..

Als Ausgangsbedingung wurde eine RNase P RNA-Konzentration von 25 nM gewählt, und von den Substraten pre-tRNA_C (Abb. 4-6), pre-tRNA_{CC} (Abb. 4-8) und pre-tRNA_{CCA} (Abb. 4-10) eine Konzentrationsreihe von 50, 100, 200 und 400 nM eingesetzt. Aus dem Reaktionsgemisch wurden Aliquots nach 0, 5, 10, 15, 20 und 30 Minuten entnommen. Für pre-tRNA_{CCA} (Abb. 4-4) hingegen wurden die Konzentrationen 200, 400, 800 und 1600 nM eingesetzt und Reaktionsaliquots nach 2, 3, 4, 5 und 7 Minuten entnommen. Es zeigte sich, dass eine getrennte Vorinkubation (2 min; 37 °C) von Enzym und Substrat für eine reproduzierbare Genauigkeit der Prozessierung unabdingbar ist.

Die erhaltenen Umsatzkurven zeigten ein schnelles Erreichen des Umsatz-Maximums bereits nach 10-15 Minuten (pre-tRNA_C, pre-tRNA_{CC}, pre-tRNA_{CCA}) bzw. 5-7 Minuten bei pre-tRNA_{CCA}. Zusätzlich waren die hieraus ermittelten K_M -Werte um einiges größer als die eingesetzten Substratkonzentrationen.

Da eine K_M -Bestimmung nur im linearen Anfangsbereich der Umsatz-Steigungskurve sinnvoll ist, wurde die Konzentration der RNase P RNA im Folgenden auf 6,25 nM reduziert und parallel die Zeitpunkte der Aliquotentnahme auf 2, 3, 4 und 5 Minuten festgelegt. Zusätzlich wurden die verwendeten Substratkonzentrationen erhöht auf 800, 1600, 3200 und 6400 nM für pre-tRNA_C (Abb. 4-7), pre-tRNA_{CC} (Abb. 4-9) und pre-tRNA_{CCA} (Abb. 4-11). Für die sehr schnelle Prozessierung von pre-tRNA_{CCA} (Abb. 4-5) war lediglich eine Reduzierung der RNase P RNA-Konzentration auf 6,25 nM und eine Änderung der Aliquotentnahme bei 2, 3, 4, und 5 Minuten nötig.

Die Reaktionsprodukte wurden elektrophoretisch aufgetrennt (3.1.2.) und die Autoradiogramme quantifiziert (3.13.1.). Aus dem ermittelten absoluten Umsatz wurde der Substratumsatz sowie die Reaktionsgeschwindigkeit errechnet und doppeltreziprok gegen die Substratkonzentration nach Lineweaver-Burk aufgetragen (3.13.2.; Abb. 4-4 - Abb. 4-11).

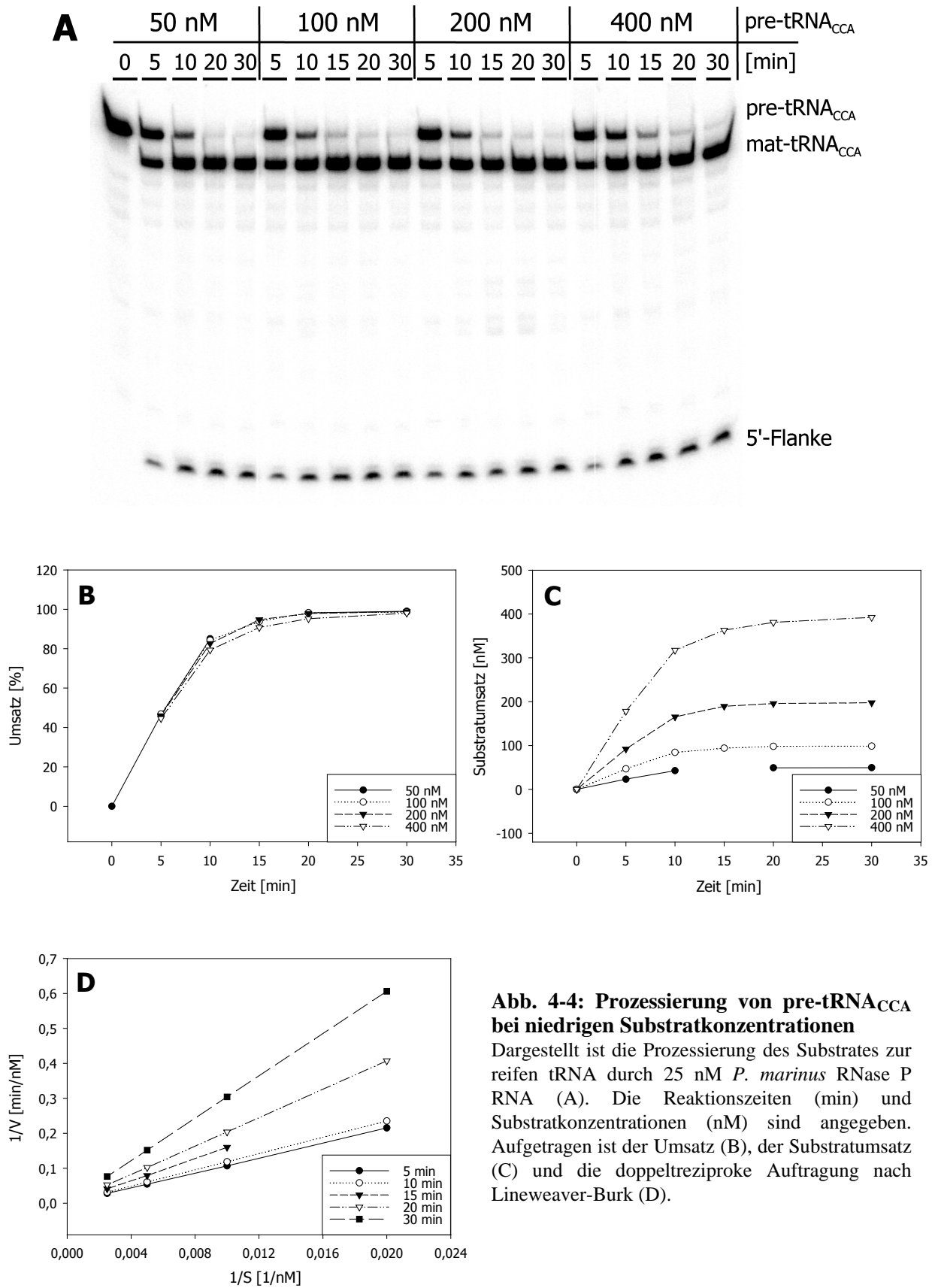
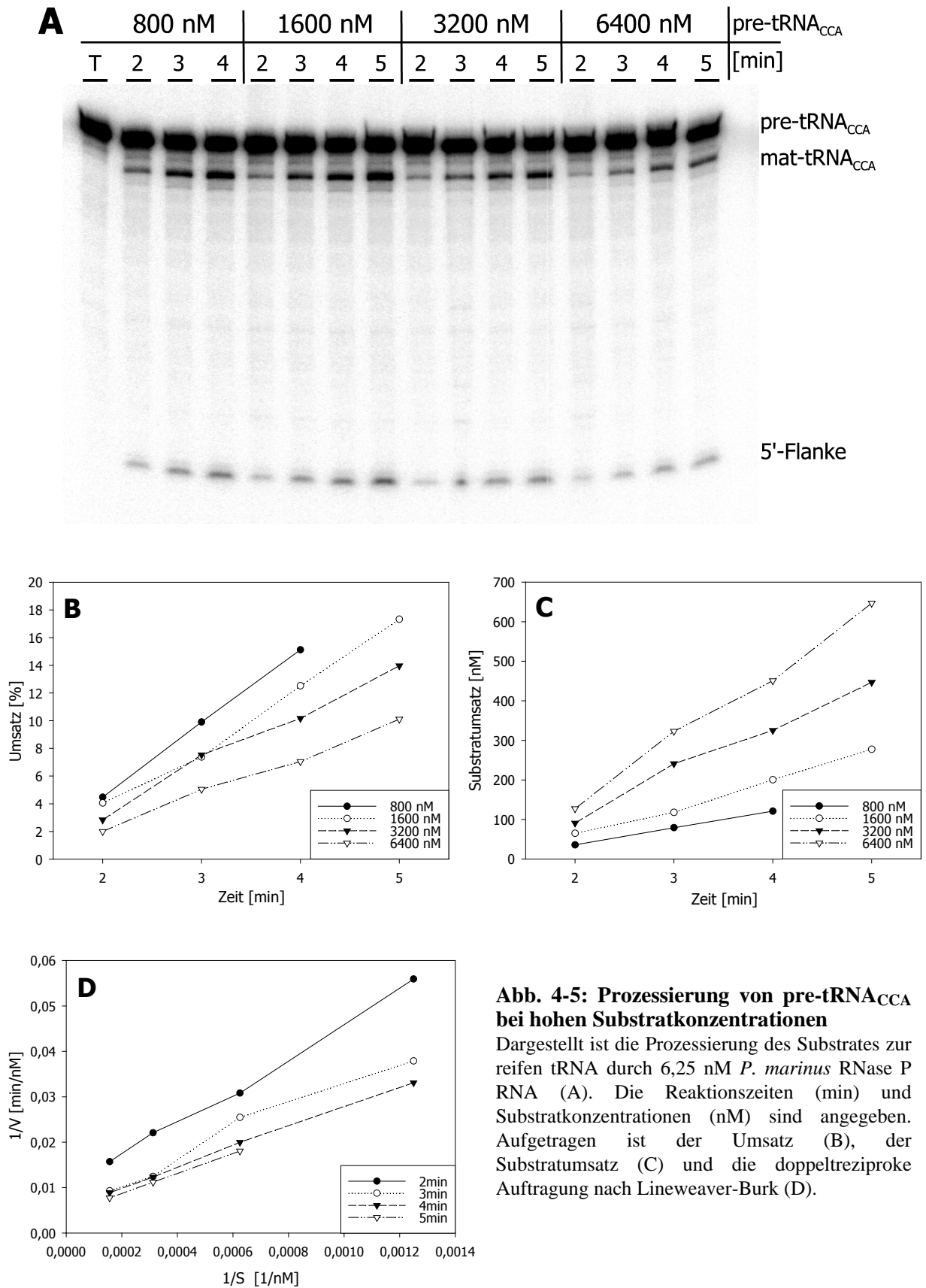


Abb. 4-4: Prozessierung von pre-tRNA_{CCA} bei niedrigen Substratkonzentrationen
 Dargestellt ist die Prozessierung des Substrates zur reifen tRNA durch 25 nM *P. marinus* RNase P RNA (A). Die Reaktionszeiten (min) und Substratkonzentrationen (nM) sind angegeben. Aufgetragen ist der Umsatz (B), der Substratumsatz (C) und die doppeltreziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk (D).



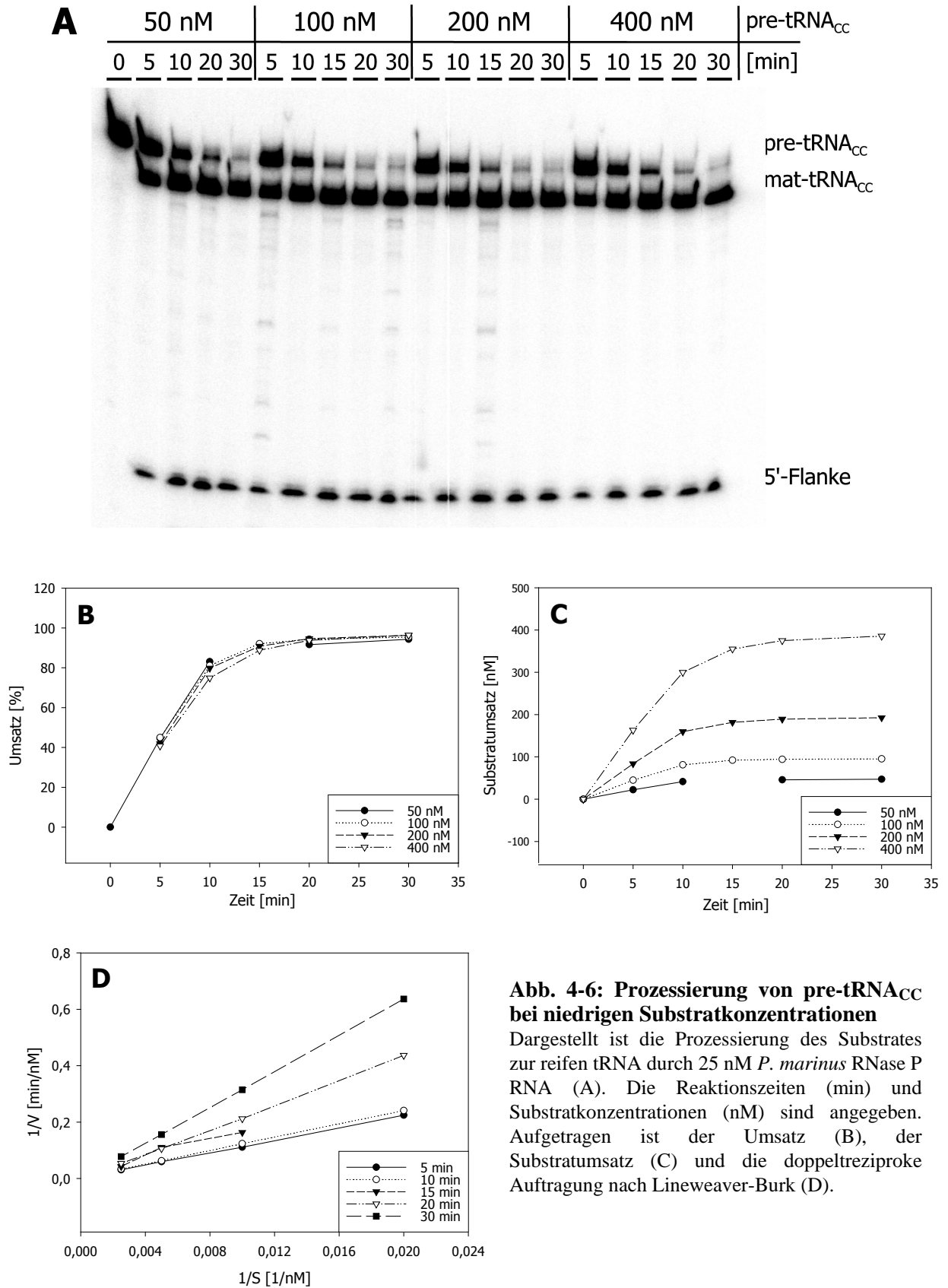


Abb. 4-6: Prozessierung von pre-tRNA_{CC} bei niedrigen Substratkonzentrationen

Dargestellt ist die Prozessierung des Substrates zur reifen tRNA durch 25 nM *P. marinus* RNase P RNA (A). Die Reaktionszeiten (min) und Substratkonzentrationen (nM) sind angegeben. Aufgetragen ist der Umsatz (B), der Substratumsatz (C) und die doppeltreziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk (D).

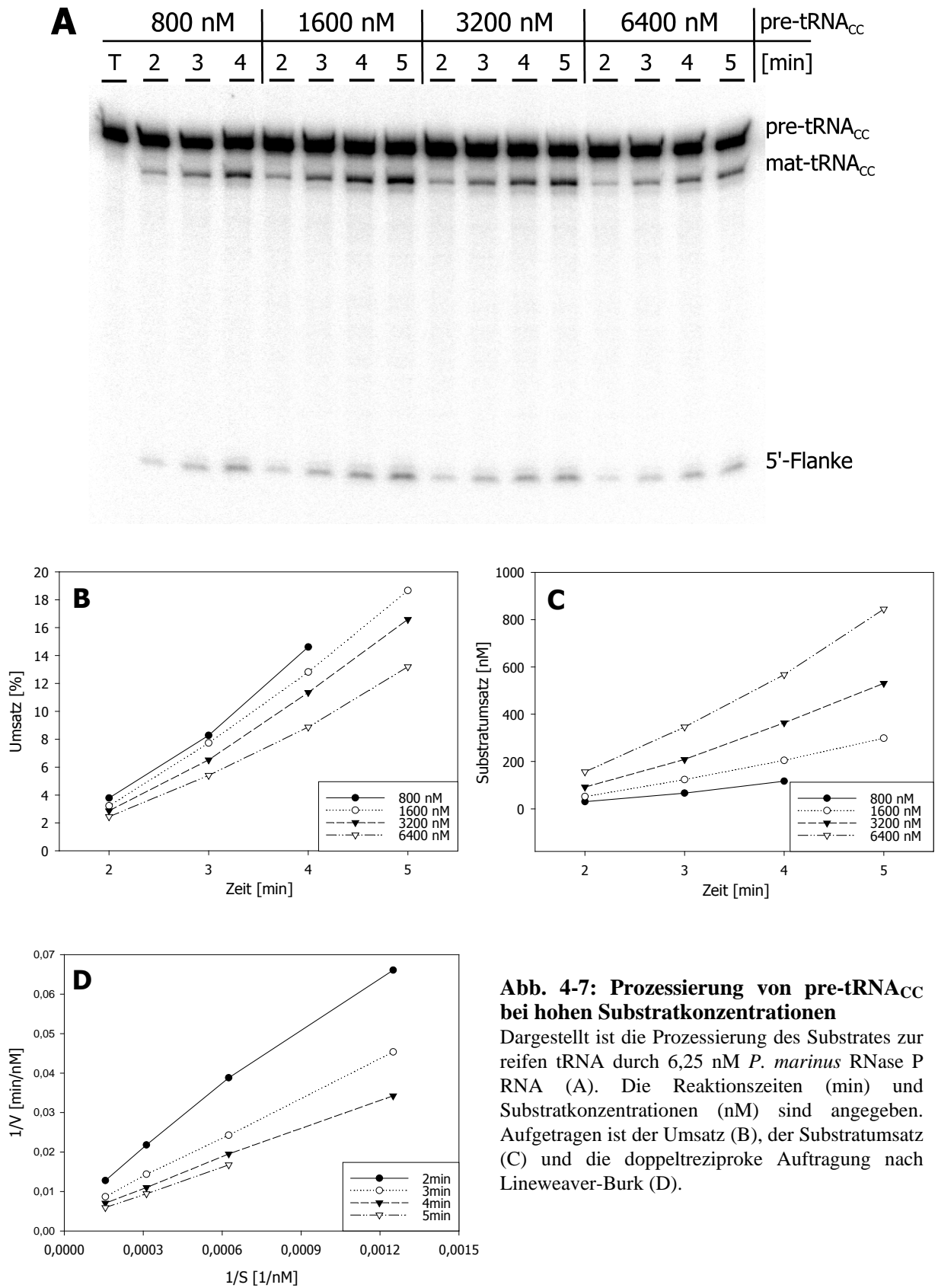


Abb. 4-7: Prozessierung von pre-tRNA_{CC} bei hohen Substratkonzentrationen

Dargestellt ist die Prozessierung des Substrates zur reifen tRNA durch 6,25 nM *P. marinus* RNase P RNA (A). Die Reaktionszeiten (min) und Substratkonzentrationen (nM) sind angegeben. Aufgetragen ist der Umsatz (B), der Substratumsatz (C) und die doppeltreziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk (D).

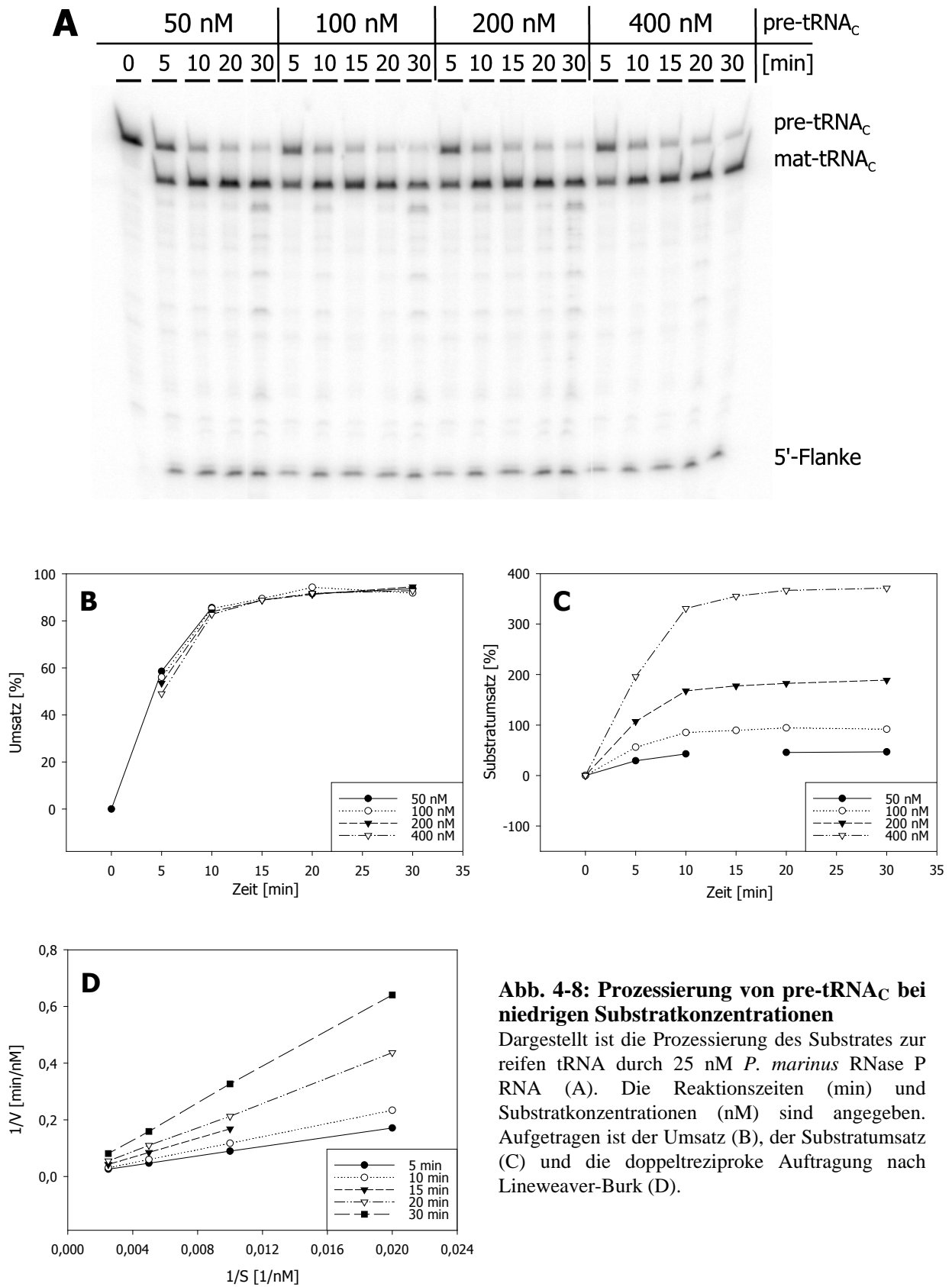
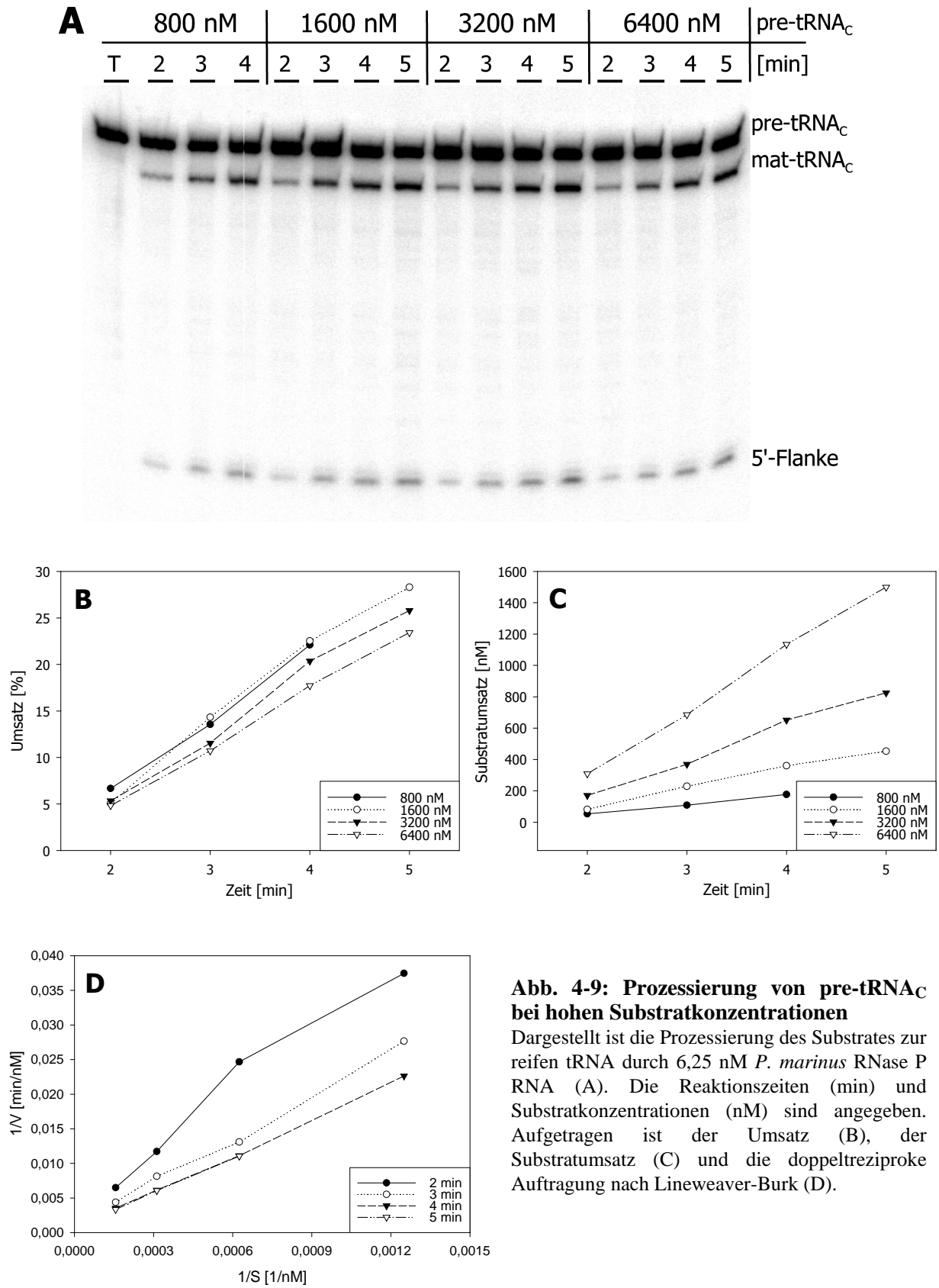


Abb. 4-8: Prozessierung von pre-tRNA_C bei niedrigen Substratkonzentrationen

Dargestellt ist die Prozessierung des Substrates zur reifen tRNA durch 25 nM *P. marinus* RNase P RNA (A). Die Reaktionszeiten (min) und Substratkonzentrationen (nM) sind angegeben. Aufgetragen ist der Umsatz (B), der Substratumsatz (C) und die doppeltreziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk (D).



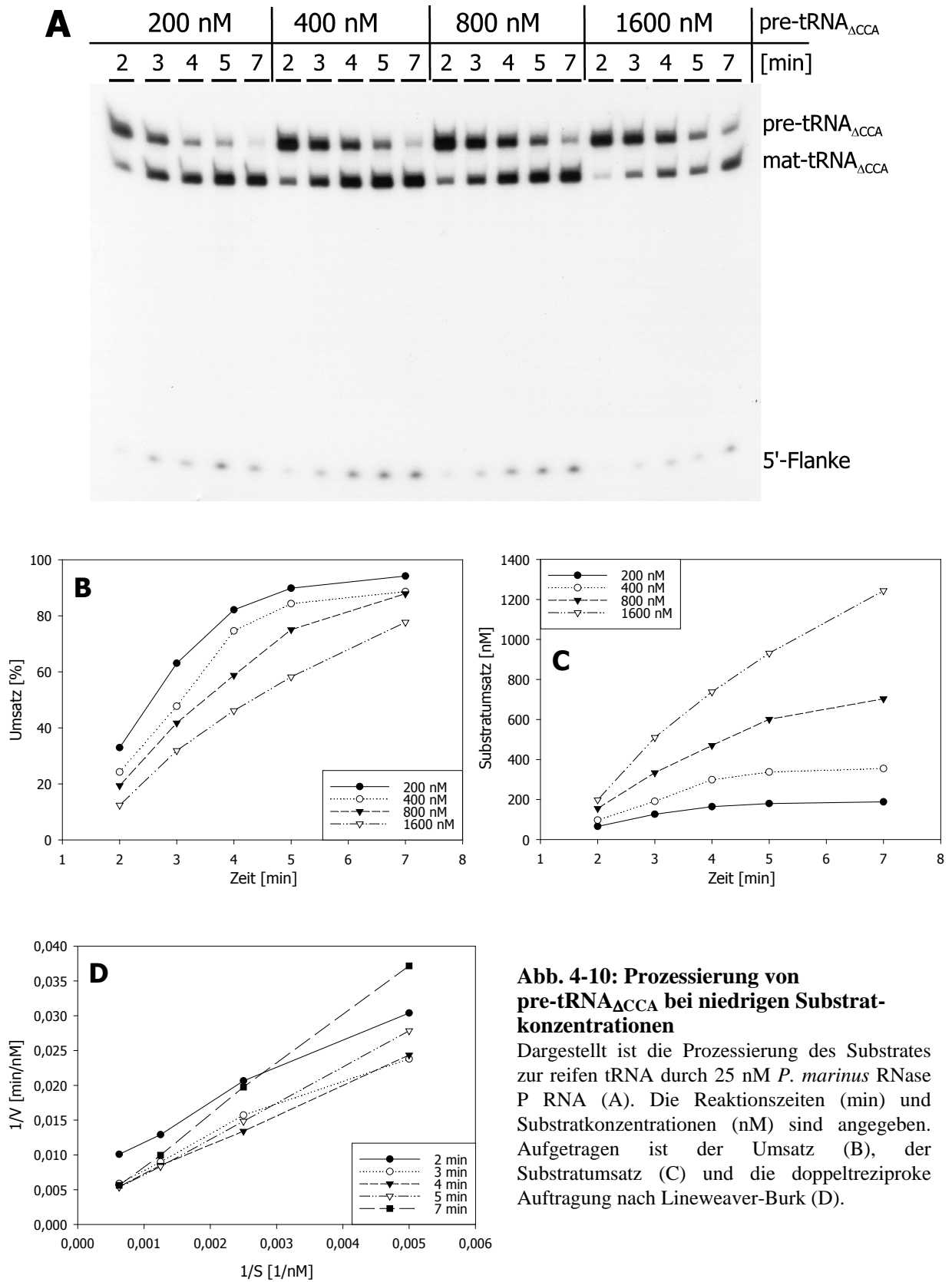


Abb. 4-10: Prozessierung von pre-tRNA_{ΔCCA} bei niedrigen Substratkonzentrationen

Dargestellt ist die Prozessierung des Substrates zur reifen tRNA durch 25 nM *P. marinus* RNase P RNA (A). Die Reaktionszeiten (min) und Substratkonzentrationen (nM) sind angegeben. Aufgetragen ist der Umsatz (B), der Substratumsatz (C) und die doppeltreziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk (D).

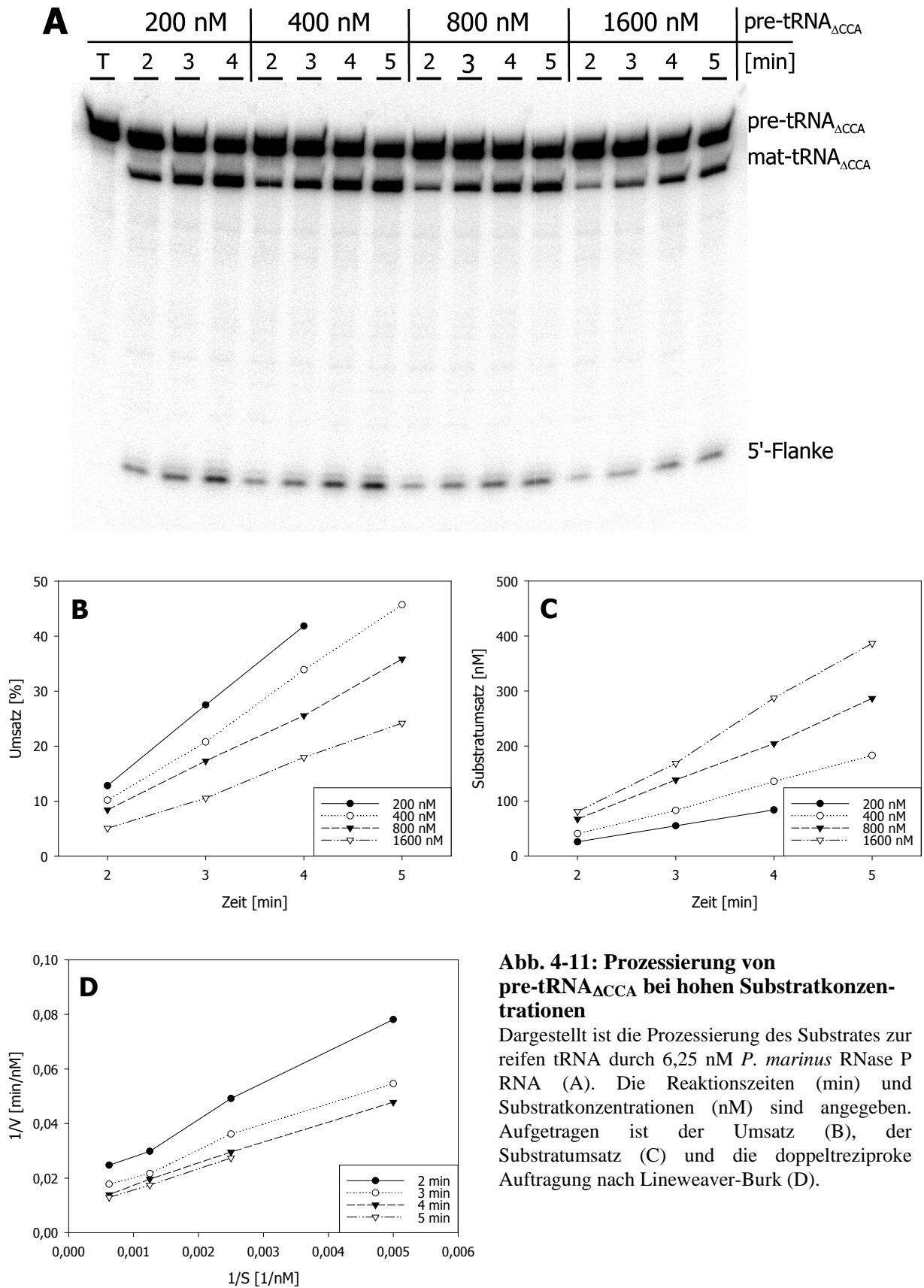


Abb. 4-11: Prozessierung von pre-tRNA_{ΔCCA} bei hohen Substratkonzentrationen

Dargestellt ist die Prozessierung des Substrates zur reifen tRNA durch 6,25 nM *P. marinus* RNase P RNA (A). Die Reaktionszeiten (min) und Substratkonzentrationen (nM) sind angegeben. Aufgetragen ist der Umsatz (B), der Substratumsatz (C) und die doppeltreziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk (D).

Für jede Kinetik wurde für die 2 Minuten Werte der Lineweaver-Burk-Auftragung eine Ausgleichsgerade bestimmt, mit deren Hilfe sich der jeweilige K_M -Wert berechnen lässt (3.13.2.). Aus einem Datensatz von 3-4 Kinetiken für jedes Substrat wurden die K_M -Werte gemittelt und zusätzlich die Standardabweichung errechnet, welche unter als 20% liegen sollte.

Für den Enzym-Substrat-Komplex aus *P. marinus* RNase P RNA und pre-tRNA $_{\Delta CCA}$ ergab sich eine K_M von 825 nM +/- 140 nM (17 %). Für pre-tRNA $_C$ berechnete sich eine K_M von 19679 nM +/- 3435 nM (20,3 %). Bei pre-tRNA $_{CC}$ als Substrat wurde eine K_M von 7132 nM +/- 914 nM (12,8 %) bestimmt. Für pre-tRNA $_{CCA}$ wurde ein K_M -Wert von 6915 nM +/- 1359 nM (19,7 %) errechnet. Abb. 4-12 fasst die ermittelten Werte zusammen.

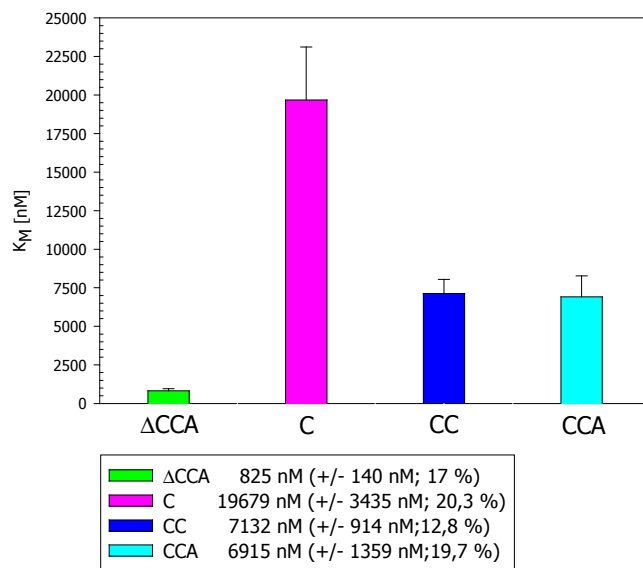


Abb. 4-12: Michaelis-Menten-Konstanten der pre-tRNA Arg -Varianten
Aufgetragen sind die Michaelis-Menten-Konstanten (nM) von pre-tRNA $_{\Delta CCA}$ (ΔCCA), pre-tRNA $_C$ (C), pre-tRNA $_{CC}$ (CC) und pre-tRNA $_{CCA}$ (CCA) bei der Prozessierung durch *P. marinus* RNase P RNA. Zusätzlich angegeben sind die jeweiligen Standardabweichungen (nM; %) der ermittelten K_M -Werte.

4.3. Crosslink-Experimente mit *P. marinus* s 4 U-RNase P RNA

4.3.1. *In vitro* Transkription mit s 4 UTP

Um RNase P RNA kovalent mit der Substrat pre-tRNA vernetzen zu können, kann dem präparativen *in vitro* Transkriptionsansatz der RNase P RNA das photosensitive Nukleotid s 4 UTP zugegeben werden (Podar und Perlman, 1999; Pomeranz-Krummel und Altman, 1999).

Das mit *Sna* BI linearisierte Plasmid pDW27, das für *E. coli* RNase P RNA (M1-RNA) codiert, sowie mit *Bam* HI linearisiertes Plasmid pPmT7k, welches für *P. marinus* RNase P RNA codiert, wurden jeweils in einem präparativen Transkriptionsansatz eingesetzt, in dem s 4 UTP im molaren Verhältnis von 1:9 (s 4 UTP:UTP) vorhanden war (3.4.6.). Das jeweilige Reaktionsprodukt (s 4 U-M1-RNA; *P. marinus* s 4 U-RNase P RNA) wurde aufgereinigt und in Crosslink-Experimenten eingesetzt.

Um den s 4 UTP-Einbau quantitativ zu analysieren, wurde *P. marinus* s 4 U-RNase P RNA einer enzymatischen Totalhydrolyse unterzogen (3.11.1.) und das Reaktionsgemisch in einer zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie (3.11.2.) analysiert (Abb. 4-13). Eine Quantifizierung des Autoradiogramms ergab eine Substitution der statistisch möglichen Positionen durch s 4 UTP von 2,5 %.

Eine direkte Quantifizierung der s^4 UTP-Substitution über Absorptionsmessung bei 260 und 330 nm (Favre *et al.*, 1986) gelang hingegen nicht.

Um den s^4 UTP-Einbau qualitativ zu überprüfen, wurde der Spot Test nach Feigl (Feigl, 1960) durchgeführt (Abb. 4-64).

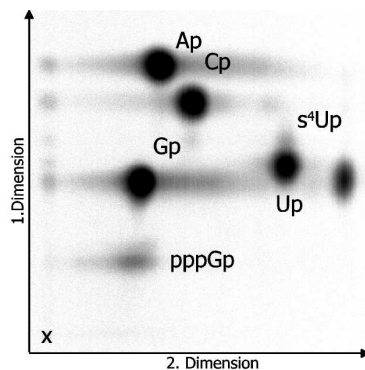


Abb. 4-13: Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie von s^4 U-RNase P RNA

Gekennzeichnet ist der Auftragungspunkt (X) und die Auftrennungsrichtung der 1. und 2. Dimension. Die Spots der Nucleosid-3'-Monophosphate (Ap, Cp, Gp, Up; s^4 Up) sowie das 5'-Tri-3'-Monophosphat des Startnucleosides sind beschriftet.

4.3.2. Crosslink-Reaktion von s^4 U-M1-RNA

Zur Bestimmung der geeigneten s^4 UTP-Crosslink-Bedingungen für das homologe *P. marinus* System wurde zu Beginn auf die bereits publizierte Kombination *E. coli* s^4 U-RNase P RNA/ pre-tRNA^{Tyr} zurückgegriffen (Pomeranz-Krummel und Altman, 1999). Hierfür wurde das mit *Fok* I linearisierte Plasmid pSu3-wt, das für *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} codiert, in einem präparativen Transkriptionsansatz eingesetzt (3.4.3.). Das Reaktionsprodukt wurde aufgereinigt und in die folgenden Crosslink-Experimenten eingesetzt.

Um die entsprechende Wellenlänge für die Crosslink-Reaktion und das Absorptionsmaximum (λ_{\max}) von s^4 UTP zu bestimmen, wurde ein UV-Absorptionsspektrum eines rNTP-Gemisches (ATP, CTP, GTP, UTP, s^4 UTP; je 1 mM) aufgenommen (Abb. 4-14). Für s^4 UTP wurde ein Absorptionbereich zwischen 300 und 370 nm mit $\lambda_{\max} = 331$ nm ermittelt, so dass sich die für UV-Lampen handelsüblichen Wellenlängen von 312 und 366 nm für Crosslink-Experimente mit s^4 UTP eignen.

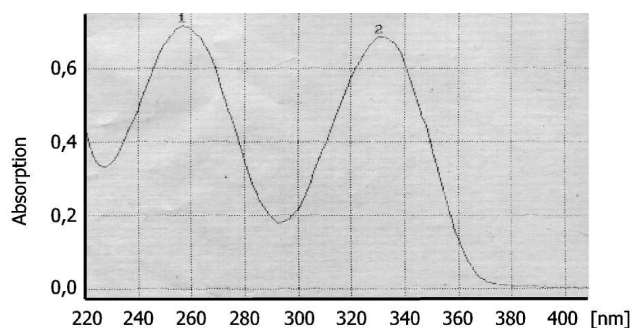


Abb. 4-14: UV-Spektrum eines NTP/ s^4 UTP-Gemisches in Wasser

Aufgetragen ist die Wellenlänge (nm) gegen die Absorption. 1: $\lambda_{\max}(\text{NTP}) = 257$ nm; 2: $\lambda_{\max}(s^4\text{UTP}) = 331$ nm

Analog zur Literatur (Pomeranz-Krummel und Altman, 1999) wurde *E. coli* s^4 U-RNase P RNA (100 nM) im Reaktionspuffer P1 (0,4 M NH_4OAc , 10 mM HEPES, 10 mM $\text{Mg}(\text{OAc})_2$, 5 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) renaturiert (2 min, 65°C) und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Im Anschluss wurde das Substrat mit pre-tRNA^{Tyr} (60 nM; 80000cpm) zugegeben und der Ansatz bei 366 nm für 5-60 min

auf Eis inkubiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Reaktionsprodukte auf einem 6 % PAA-Gel zeigten sich neben den Edukten und den Prozessierungs-Produkten auch spezifische Crosslink-Komplexe (Abb. 4-15). Zusätzlich wurde deutlich, dass für *E. coli* $s^4\text{U}$ -RNase P RNA der Renaturierungsschritt für die Ausbildung von Crosslink-Komplexen essentiell ist. Auch nach dem Austausch von $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ gegen $\text{Ca}(\text{OAc})_2$ (Bindungspuffer 2) wurde bei gleichzeitiger Unterdrückung der Prozessierungsreaktion das identische Muster der Komplex-Banden erhalten (Abb. 4-15). Bei beiden Pufferbedingungen betrug die optimale Belichtungsdauer 60 min.

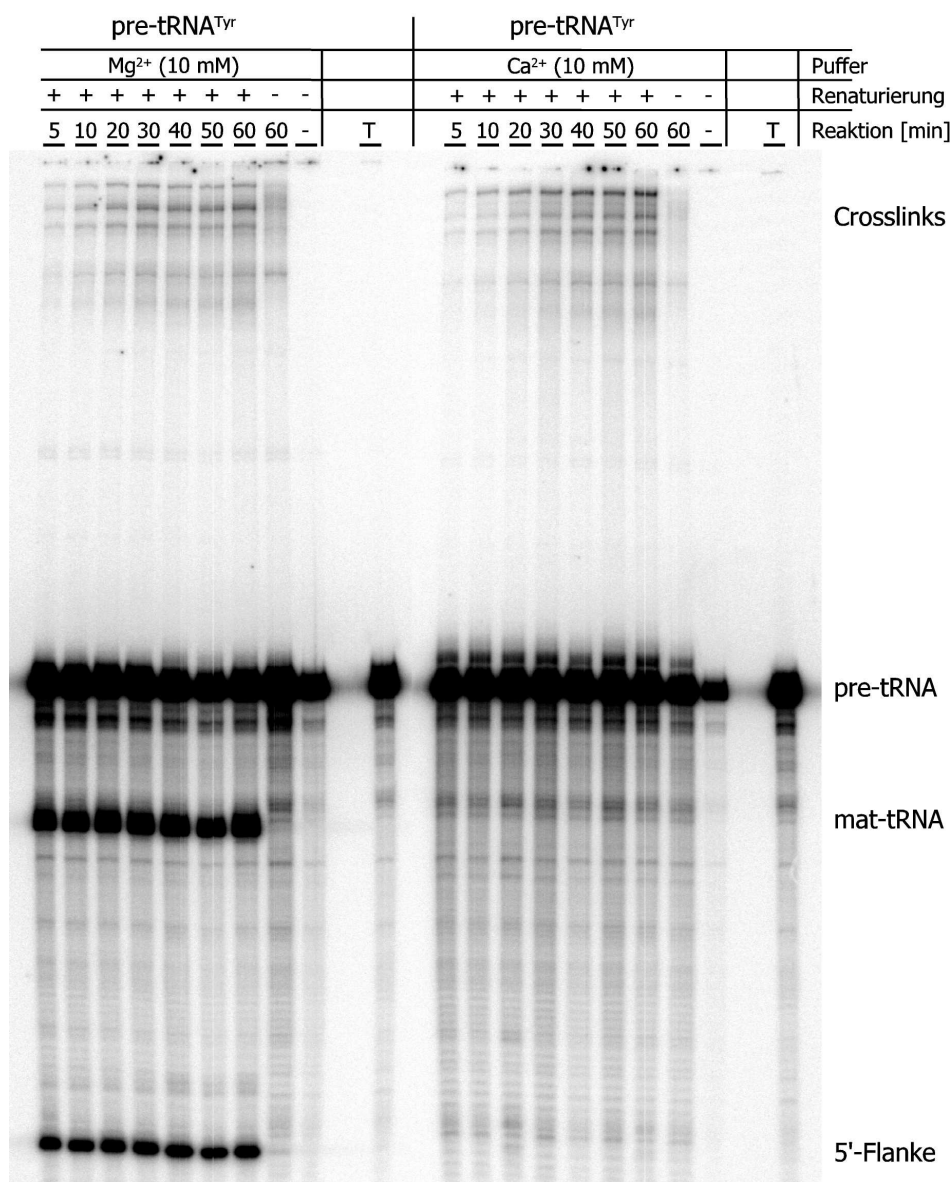


Abb. 4-15: Crosslink Reaktion von *E. coli* $s^4\text{U}$ -RNase P RNA mit pre-tRNA^{Tyr}

Gezeigt sind Crosslink-Reaktionen von $s^4\text{U}$ -RNase P RNA (100 nM) mit pre-tRNA^{Tyr} (60 nM; 80000 cpm) im M1-Reaktionspuffer P1 bei 365 nm. Angegeben ist die sich gegenseitig ausschließende Anwesenheit von Mg^{2+} bzw. Ca^{2+} (Bindungspuffer 2) im Reaktionspuffer, die Durchführung eines Renaturierungsschrittes (+) bzw. dessen Auslassung (-), die jeweilige Dauer der Bestrahlung (min) sowie die Auftragung einer unbehandelten tRNA-Transkriptkontrolle (T). Am rechten Rand sind die Edukte und Produkte der Crosslink- und Prozessierungs-Reaktionen gekennzeichnet.

Der Wechsel des Substrates von pre-tRNA^{Tyr} zur *P. marinus* pre-tRNA^{Arg}, welches mit *E. coli* s⁴U-RNase P RNA unter *E. coli* Reaktionsbedingungen in die Crosslink-Reaktion eingesetzt wird, ist vergleichend in Abb. 4-16 gezeigt. Auch mit dieser tRNA werden Crosslink-Komplexe in Gegenwart von Ca²⁺ anstelle von Mg²⁺ gebildet, die sich allerdings im Banden-Muster von dem der tRNA^{Tyr} unterscheiden. Ein Renaturierungsschritt ist hier für die Ausbildung von Komplexen allerdings nicht nötig.

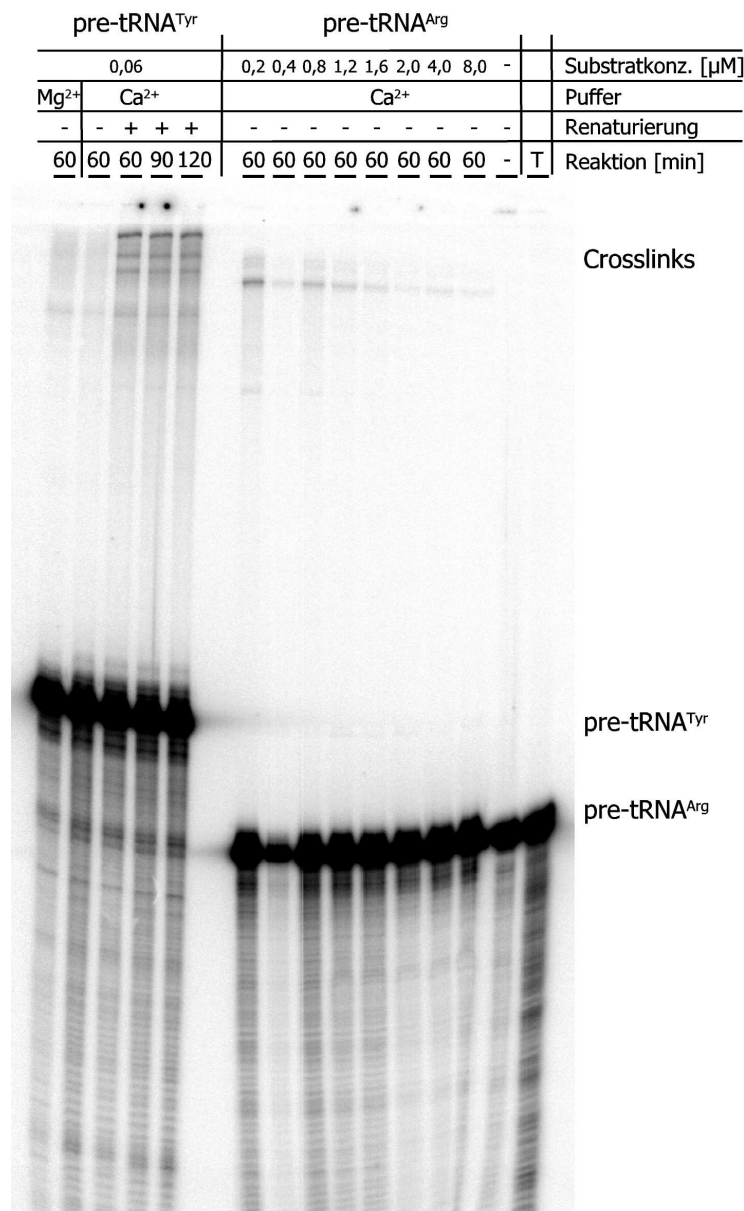


Abb. 4-16: Crosslink Reaktion von *E. coli* s⁴U-RNase P RNA mit pre-tRNA^{Tyr} und pre-tRNA^{Arg}
Gezeigt sind Crosslink-Reaktionen von s⁴U-RNase P RNA (100 nM) mit pre-tRNA^{Tyr} (60 nM; 80000 cpm) und pre-tRNA^{Arg} (0,2-8,0 nM; 80000cpm) im M1-Reaktionspuffer P1 bei 365 nm. Angegeben ist die sich gegenseitig ausschließende Anwesenheit von Mg²⁺ bzw. Ca²⁺ (Bindungspuffer 2) im Reaktionspuffer, die Durchführung eines Renaturierungsschrittes (+) bzw. dessen Auslassung (-), die jeweilige Dauer der Bestrahlung (min) sowie die Auftragung einer unbehandelten tRNA-Transkriptkontrolle (T). Am rechten Rand sind die Edukte und Produkte der Crosslink-Reaktionen gekennzeichnet.

4.3.3. Crosslink-Reaktion von *P. marinus* s⁴U-RNase P RNA

4.3.3.1. Optimierung der Reaktionsbedingungen

Zur Entwicklung der optimalen Bedingungen für die Crosslink-Reaktion von *P. marinus* s⁴U-RNase P RNA mit tRNA^{Arg} im homologen System, wurden mehrere Puffer-Variationen, Renaturierungs-Bedingungen, Lichtwellenlängen und Belichtungszeiten getestet.

Ausgehend vom *P. marinus* RNase P RNA Reaktionspuffer P2 (Hess *et al.*, 1998) wurden die darin enthaltenen und für die Reaktion essentiellen Mg²⁺-Ionen durch Ca²⁺-Ionen (250 mM) ersetzt. Die Konzentrationen an NH₄⁺ (3 M) und der Puffersubstanz (50 mM) sowie der pH-Wert wurden beibehalten. Lediglich die jeweiligen Gegenionen (Cl⁻, OAc⁻) und die Puffersubstanzen (Tris, HEPES, MOPS) wurden variiert. Somit ergaben sich 6 Puffer (Bindungspuffer 3-8) für die *P. marinus* s⁴U-RNase P RNA Crosslink-Reaktion, die im Folgenden zusammengefasst sind:

Zusammenfassung von Prozessierungs- und Crosslink-Puffern		
Puffer (1x)	Zusammensetzung	Verwendung
P1	NH ₄ OAc (0,4 M), HEPES (10 mM), Mg(OAc) ₂ (10 mM), Glycerin (5 % (v/v)), pH 7,5	<i>E. coli</i> Reaktion
Bindungspuffer 2	NH ₄ OAc (0,4 M), HEPES (10 mM), Ca(OAc) ₂ (10 mM), Glycerin (5 % (v/v)), pH 7,5	<i>E. coli</i> Crosslink
P2	NH ₄ Cl (3 M), Tris-HCl (50 mM), MgCl ₂ (250 mM), pH 8,0	<i>P. marinus</i> Reaktion
Bindungspuffer 3	NH ₄ Cl (3 M), HEPES (50 mM), CaCl ₂ (250 mM), pH 8,0	<i>P. marinus</i> Crosslink
Bindungspuffer 4	NH ₄ OAc (3 M), HEPES (50 mM), Ca(OAc) ₂ (250 mM), pH 8,0	<i>P. marinus</i> Crosslink
Bindungspuffer 5	NH ₄ Cl (3 M), MOPS (50 mM), CaCl ₂ (250 mM), pH 8,0	<i>P. marinus</i> Crosslink
Bindungspuffer 6	NH ₄ OAc (3 M), MOPS (50 mM), Ca(OAc) ₂ (250 mM), pH 8,0	<i>P. marinus</i> Crosslink
Bindungspuffer 7	NH ₄ Cl (3 M), Tris-HCl (50 mM), CaCl ₂ (250 mM), pH 8,0	<i>P. marinus</i> Crosslink
Bindungspuffer 8	NH ₄ OAc (3 M), Tris-HOAc (50 mM), Ca(OAc) ₂ (250 mM), pH 8,0	<i>P. marinus</i> Crosslink

Da für die Crosslink-Reaktion von *E. coli* s⁴U-RNase P RNA ein Renaturierungsschritt vor der eigentlichen Crosslink-Reaktion essentiell ist, wurden mehrere Möglichkeiten (Bedingung a-d) der Renaturierung für *P. marinus* s⁴U-RNase P RNA getestet, die im Folgenden zusammengefasst sind:

Bedingungen der Renaturierung für <i>P. marinus</i> s ⁴ U-RNase P RNA			
Bedingung	Schritt 1 (Renaturierung der RNase P RNA)	Schritt 2	Schritt 3 (Inkubation des Reaktionsansatzes)
a	2 min; 65 °C ; Abkühlen auf RT	Zugabe des Substrates	5 min; 37 °C
b	2 min ; 65 °C ; Abkühlen auf RT	Zugabe des Substrates	5 min; Eis
c	5 min ; Eis	Zugabe des Substrates	5 min; 37 °C
d	5 min; Eis	Zugabe des Substrates	5 min; Eis

In Abb. 4-17 und Abb. 4-18 sind die Testreihen der verschiedenen Variationen an Bindungspuffern und Renaturierungsbedingungen zusammenfassend gezeigt.

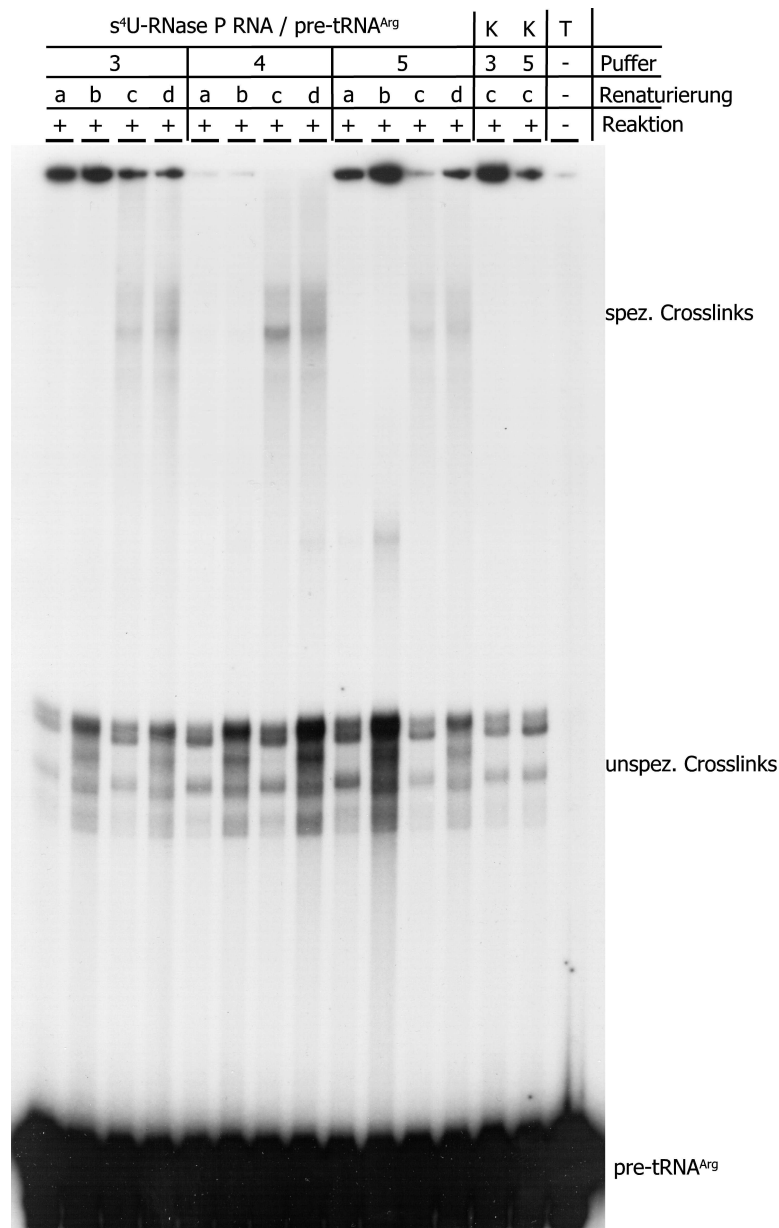


Abb. 4-17: Optimierung der Crosslink-Reaktion von *P. marinus* s⁴U-RNase P RNA mit pre-tRNA^{Arg}

Gezeigt sind Crosslink-Reaktionen von s⁴U-RNase P RNA (100 nM) mit pre-tRNA^{Arg} (1000 nM; 200000 cpm) in verschiedenen Reaktionspuffern (3-5). Die Belichtung bei 302 nm für 40 min ist durch + bzw. – angegeben. Die Durchführung verschiedener Renaturierungsschritte (a-d), Kontrollreaktionen mit unmodifizierter RNase P RNA (K) sowie die Auftragung einer unbehandelten tRNA-Transkriptkontrolle (T) sind gegeben. Am rechten Rand sind die Edukte und Produkte der Crosslink-Reaktionen gekennzeichnet.

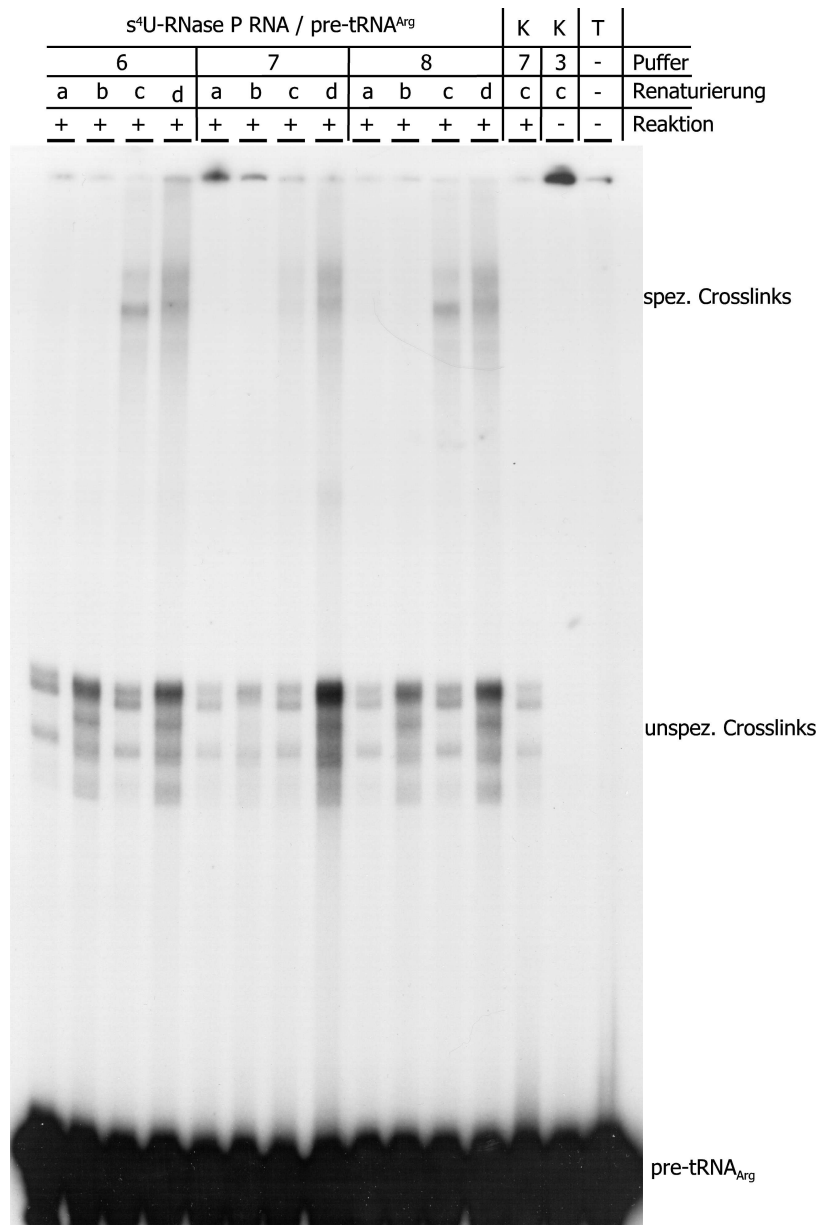


Abb. 4-18: Optimierung der Crosslink-Reaktion von *P. marinus* s⁴U-RNase P RNA mit pre-tRNA^{Arg}

Gezeigt sind Crosslink-Reaktionen von s⁴U-RNase P RNA (100 nM) mit pre-tRNA^{Arg} (1000 nM; 200000 cpm) in verschiedenen Reaktionspuffern (3, 6-8). Die Belichtung bei 302 nm für 40 min ist durch + bzw. – angegeben. Die Durchführung verschiedener Renaturierungsschritte (a-d), Kontrollreaktionen mit unmodifizierter RNase P RNA (K) sowie die Auftragung einer unbehandelten tRNA-Transkriptkontrolle (T) sind gegeben. Am rechten Rand sind die Edukte und Produkte der Crosslink-Reaktionen gekennzeichnet.

Zusätzlich wurden, in Zusammensetzung und Durchführung, identische Crosslink-Ansätze mit Licht der Wellenlänge 302 nm und 365 nm zur Reaktion gebracht und die Crosslink-Produkte verglichen.

Es zeigte sich in mehreren Versuchsreihen, dass mit Bindungspuffer 6 reproduzierbar die intensivsten und schärfsten spezifischen Crosslinkbanden erzielt wurden, wenn zusätzlich die s⁴U-RNase P RNA vor der eigentlichen Reaktion nicht renaturiert wurde. Der komplettierte Crosslink-Ansatz wurde lediglich für 5 min bei 37 °C vorinkubiert (Bedingung c).

Eine komplette Renaturierung der $s^4\text{U}$ -RNase P RNA ist somit im Gegensatz zur $s^4\text{U}$ -M1-RNA nicht geeignet. Es genügt lediglich eine Inkubation von 5 min bei 37 °C um den aktiven Enzym-Substrat-Komplex auszubilden. Dieser Befund steht in Übereinstimmung zur Durchführung der analytischen *in vitro* Prozessierung (3.12.1.), bei der sowohl die RNase P RNA als auch das Substrat für 2 min bei 37 °C vorinkubiert werden.

Der Vergleich der verwendeten Wellenlängen zeigte, dass mit beiden eine Komplexbildung zu beobachten ist (vgl. Abb. 4-14). Allerdings ist bei der Verwendung der energiereicheren Wellenlänge 302 nm ein sehr großer Anteil an unspezifischen Crosslink-Banden zu beobachten. Zusätzlich sind die spezifischen Komplexbanden zwar in der Intensität gleich, aber dafür viel diffuser, als die mit der Wellenlänge von 365 nm erzeugten.

Eine gute Effizienz der Komplexbildung wurde bei dem Einsatz von 100 nM $s^4\text{U}$ -RNase P RNA und 1000 nM pre-tRNA erreicht. Diese Konzentrationen an Enzym und Substrat wurde bei den weiteren Crosslink-Experimenten mit $s^4\text{UTP}$ und APA-modifizierten tRNAs (4.8.) eingesetzt.

4.3.3.2. Crosslink-Reaktion von *P. marinus* $s^4\text{U}$ -RNase P RNA mit pre-tRNA^{Arg}

Um den Einfluss des 3'-CCA-Endes der pre-tRNA^{Arg} auf die Prozessierung durch *P. marinus* $s^4\text{U}$ -RNase P RNA zu untersuchen, sollten die RNA-RNA-Kontaktstellen des dabei gebildeten Enzym-Substrat-Komplexes durch kovalente Vernetzungen (Crosslinks) „eingefroren“ werden. Hierzu werden die *in vitro* synthetisierten Substrate pre-tRNA_{ΔCCA}, pre-tRNA_C, pre-tRNA_{CC} und pre-tRNA_{CCA}, mit $s^4\text{U}$ -RNase P RNA in Crosslink-Reaktionen eingesetzt. Bei allen vier Substraten zeigten sich im PAA-Gel spezifische Komplex-Banden mit dem gleichen Muster und der identischen Laufstrecke (Abb. 4-19), die nur in Reaktionen auftraten, in denen das Crosslink-Nukleotid $s^4\text{U}$ vorhanden war. Unspezifische Banden, die alleine auf das verwendete UV-Licht zurückzuführen sind, traten hingegen auch in den jeweiligen Kontrollreaktionen, in denen $s^4\text{U}$ nicht anwesend war, auf.

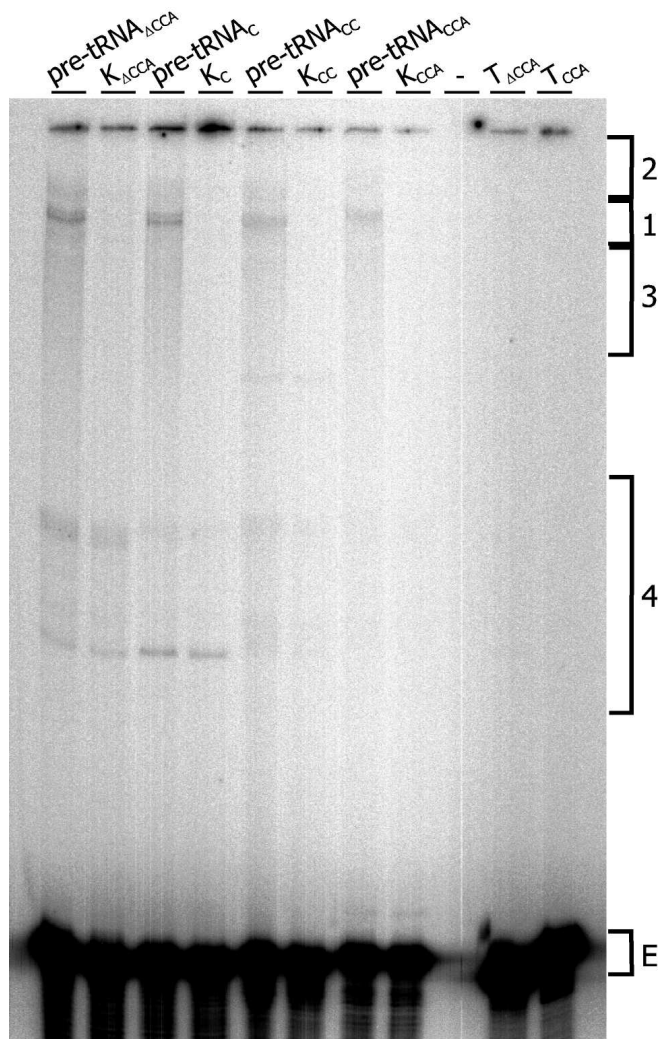


Abb. 4-19: Crosslink Reaktion von *P. marinus* s^4U -RNase P RNA mit pre-tRNAs

Gezeigt sind Crosslink-Reaktionen von s^4U -RNase P RNA (100 nM) mit pre-tRNA $_{\Delta CCA}$, pre-tRNA $_C$, pre-tRNA $_{CC}$ und pre-tRNA $_{CCA}$ (je 1000 nM; 20000 cpm). Die Crosslink-Reaktionen (365 nM; 60 min; Bindungspuffer 6) von s^4U -RNase P RNA mit den jeweiligen pre-tRNAs sind beschriftet. Crosslink-Reaktion von pre-tRNA (ΔCCA , C, CC, CCA) mit unmodifizierter RNase P RNA (K), sowie die Auftragung un behandelter tRNA-Transkriptkontrollen (T $_{\Delta CCA}$, T $_{CCA}$) sind gegeben. Am rechten Rand sind die zur RNA-Isolierung ausgeschnittenen Bereiche (1, 2, 3, 4 und E) gekennzeichnet

Von den gebildeten spezifischen RNA-RNA-Komplexen können mittels Primer-Extension-Analyse sowohl die RNase P RNA-Komponente als auch die tRNA-Komponente auf die Position der jeweiligen vernetzten Nukleotide hin untersucht werden.

Wurden die Komplexe nicht isoliert, so wurde der Ansatz aufgeteilt und durch Primer-Extension-Analysen mit geeigneten Oligonukleotiden die RNase P- und die tRNA-Komponente getrennt untersucht. Die Lokalisierung von vernetzten Nukleotiden ist nur möglich, wenn geeignete Kontrollen in die Primer-Extension eingesetzt werden. Zur Untersuchung der RNase P RNA sind dies Transkripte von s^4U -RNase P RNA und unmarkierte RNase P RNA, die ohne Substrat die Crosslink-Prozedur durchlaufen haben. Sollte die tRNA-Komponente analysiert werden, so sind es unbehandelte Transkripte der jeweiligen tRNA, die ohne RNase P-Komponente bestrahlt wurden. Durch den Vergleich zwischen Kontrolle (intramolekulare Vernetzungen) und Reaktion (intra- und intermolekulare Vernetzungen) lassen sich so Vernetzungsstellen lokalisieren. Abb. 4-20 zeigt exemplarisch eine Primer-Extension, bei der Crosslink-Ansätze von s^4U -RNase P RNA mit allen vier pre-tRNAs mit dem Oligonukleotid PmarGSP8 analysiert wurden. Es konnten mit dieser Methode allerdings keine spezifisch vernetzten s^4U -Nukleotide identifiziert werden.

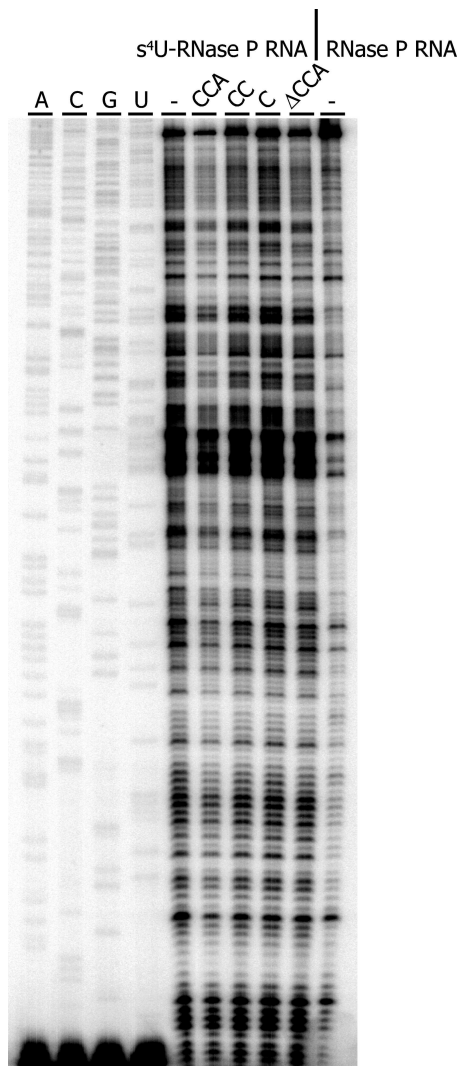


Abb. 4-20: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* s⁴U-RNase P RNA Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmarGSP8

Angegeben ist die jeweilige RNase P RNA (100 nM), die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde, die im jeweiligen Crosslink-Ansatz vorhandene pre-tRNA (CCA, CC, C, ΔCCA, je 2000 nM) und Ansätze ohne pre-tRNA (-). Links ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U).

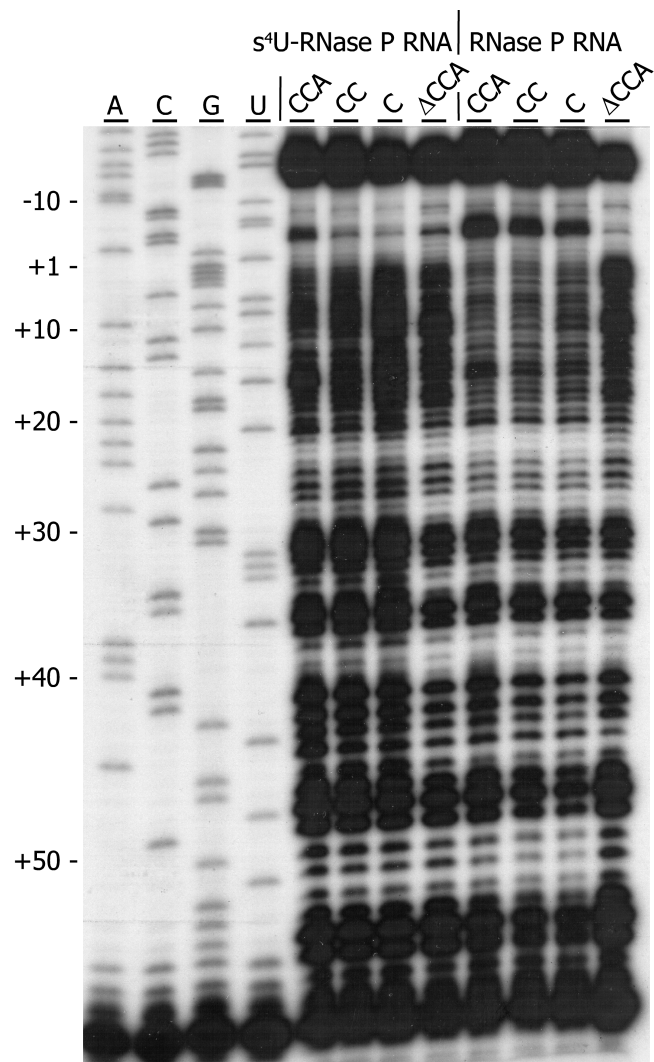


Abb. 4-21: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* s⁴U-RNase P RNA Crosslinks mit dem Oligonukleotid Arg1

Angegeben ist die jeweilige RNase P RNA (100 nM), die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde und die im jeweiligen Crosslink-Ansatz vorhandene pre-tRNA (CCA, CC, C, ΔCCA, je 2000 nM). Links ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am linken Seitenrand geben die Position in der tRNA-Sequenz des Transkriptes an.

Abb. 4-21 zeigt exemplarisch eine Primer-Extension, bei der Crosslink-Ansätze von s⁴U-RNase P RNA mit allen vier pre-tRNAs mit dem Oligonukleotid Arg1 analysiert wurden. Es konnten mit dieser Methode nur wenige spezifisch vernetzte Nukleotide identifiziert werden, da starke Überlagerungen mit natürlichen Abbruchsignalen vorlagen.

Zur eindeutigen Identifizierung vernetzter Nukleotide der tRNAs wurden die spezifischen Crosslink-Komplexe isoliert. Dabei wurden die einzelnen Bereiche wie in Abb. 4-19 angegeben, ausgeschnitten, die RNA isoliert (3.1.4.2.; 3.2.1.) und in Primer-Extension-Analysen (3.5.3.) eingesetzt. Abb. 4-22

zeigt eine solche Primer-Extension, bei der Crosslink-Ansätze von s^4U -RNase P RNA mit pre-tRNA_{CCA} mit dem Oligonukleotid Arg1 analysiert wurden. Es konnten mit dieser Methode eindeutig vernetzte Nukleotide identifiziert werden. Auf diese Weise wurden auch s^4U -RNase P RNA-Komplexe mit pre-tRNA_{CCA} pre-tRNA_C und pre-tRNA_{CC} analysiert. Die Signale unterschieden sich nur geringfügig und wurden deshalb in Abb. 4-23 zusammengefasst.

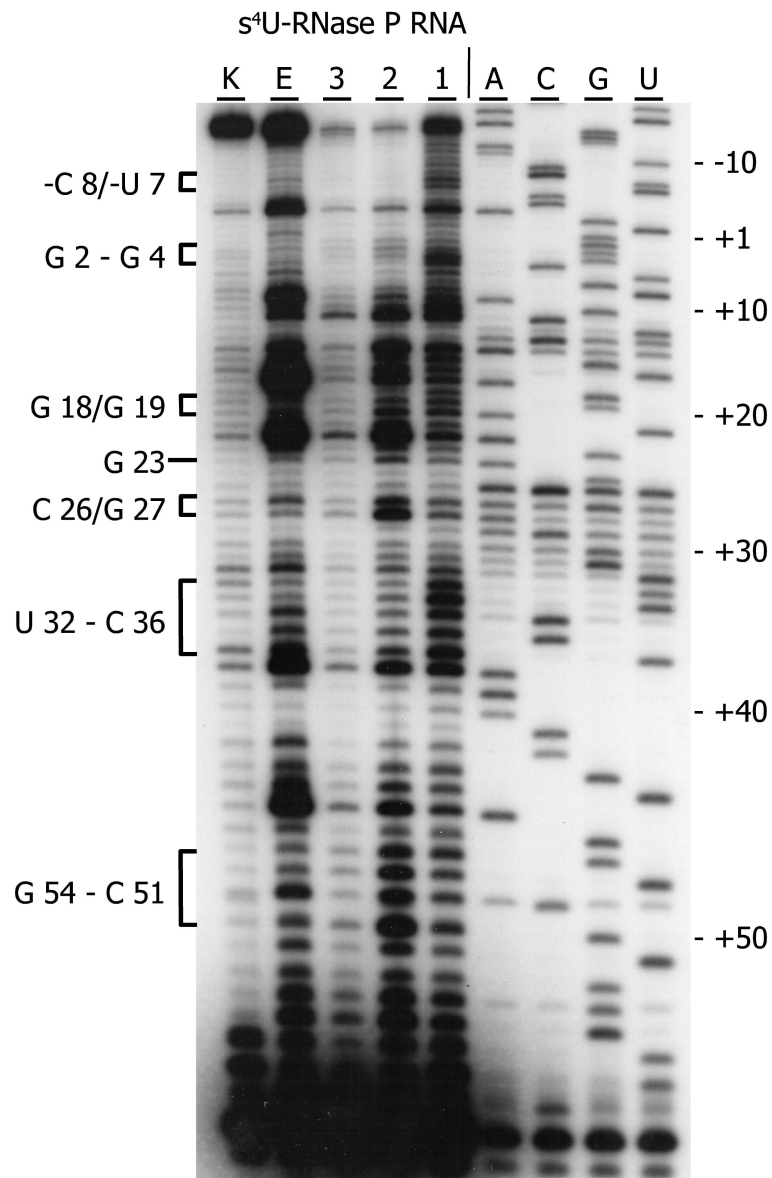


Abb. 4-22: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* s^4U -RNase P RNA Crosslinks-mit dem Oligonukleotid Arg1

Angegeben ist die jeweilige RNase P RNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde, die Reaktion der eluierten Crosslink-Komplexe (1-3) und der eluierten tRNA-Eduktbande (E) sowie eine Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K). Rechts ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die pre-tRNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der pre-tRNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der tRNA-Sequenz markiert.

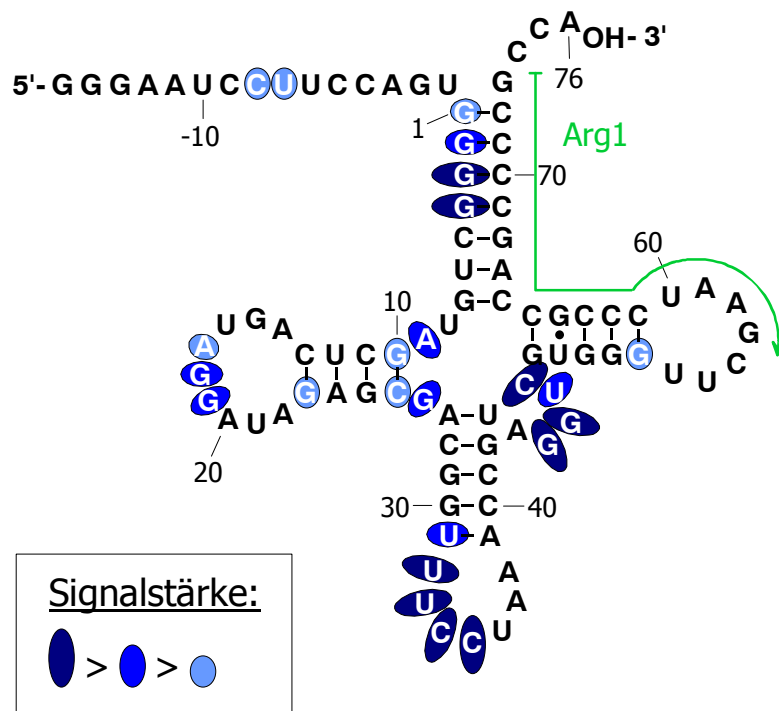


Abb. 4-23: Zusammenfassung der Ergebnisse der Crosslink-Reaktionen von $s^4\text{U}$ -RNase P RNA mit pre-tRNA^{Arg}

Gezeigt ist die Sekundärstruktur der pre-tRNA^{Arg} in der die identifizierten vernetzten Nukleotide mit blauen Ellipsen hinterlegt sind. Die Intensität der Signale der Primer-Extension-Analyse ist durch die Größe und Farbe der Ellipsen wiedergegeben. Das zur Analyse verwendete Oligonukleotid ist eingezeichnet (grün).

4.4. Splint-Ligation von tRNAs

Bei der Crosslink-Reaktion von $s^4\text{U}$ -RNase P RNA mit pre-tRNA^{Arg} und der anschließenden Analyse mittels Primer-Extension (4.3.3.2.) kann über den Sequenzbereich der tRNA, an dem das Oligonukleotid Arg1 hybridisiert, keine Information gewonnen werden. Um dennoch diesen Bereich analysieren zu können, sollte die tRNA nach der Crosslink-Reaktion durch eine Ligrations-Reaktion zirkularisiert werden, so dass mit einem geeigneten Oligonukleotid auch das bisher unzugängliche 3'-Ende der tRNA untersucht werden kann. Damit eine RNA durch T4 RNA-Ligase oder T4 DNA-Ligase zyklisiert werden kann, muss diese eine 5'-Monophosphat- und 3'-Hydroxyl-Gruppe aufweisen (Moore und Query, 2000). Um entsprechende tRNAs zu synthetisieren, wurde die *in vitro* T7-Transkription in Gegenwart von GMP durchgeführt.

4.4.1. *In vitro* Transkription mit GMP

GMP wurde am 5'-Nukleotid der tRNAs durch *in vitro* Transkription eingebaut (3.4.5.). Um einen möglichst kompletten Einbau zu erzielen, wurde GMP im molaren Verhältnis von 1:4 (GTP:GMP) eingesetzt. Zur Überprüfung der Synthese-Effizienz wurden die tRNAs durch enzymatische Totalhydrolyse (3.11.1.) und anschließende zweidimensionale Dünnschichtchromatographie (3.11.2.) analysiert. In den Autoradiogrammen (Abb. 4-24) wurde der GMP-Einbau quantifiziert. Für pre-tRNA_{ΔCCA}, pre-tRNA_C, pre-tRNA_{CC} und pre-tRNA_{CCA} wurden 90, 83, 84 und 89 % 5'-GMP-Einbau ermittelt, so dass diese tRNAs in RNA-Ligations-Reaktionen eingesetzt werden konnten.

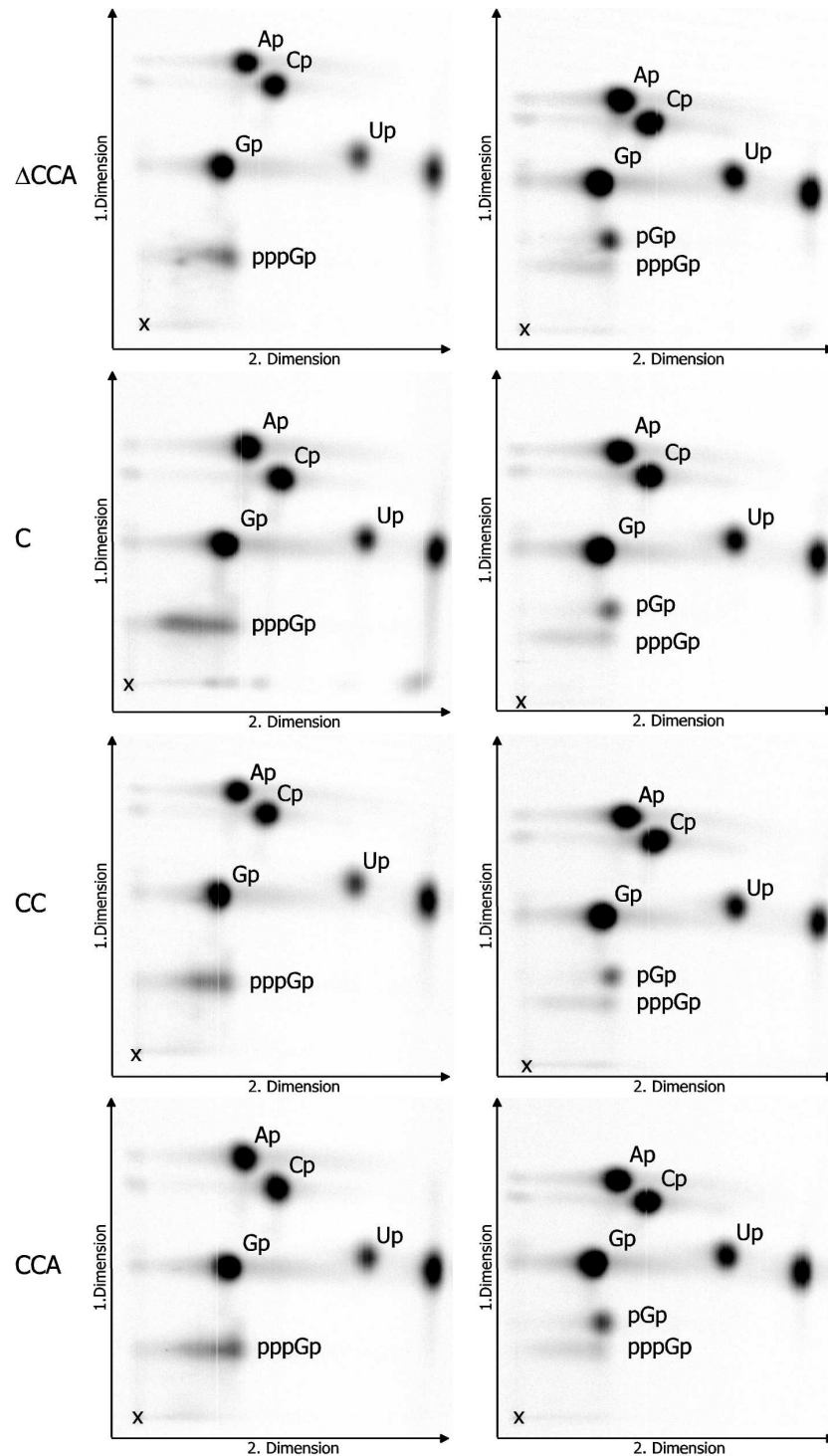


Abb. 4-24: Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie der Hydrolysate von pre-tRNA-Transkripten mit GTP und GMP

Gekennzeichnet ist der Auftragungspunkt (X) und die Auftrennungsrichtung der 1. und 2. Dimension. Die Spots der Nukleotid-3'-Monophosphate (Ap, Cp, Gp, Up), sowie das 5'-Tri-3'-Monophosphat (pppGp) und das 5'-3'-Diphosphat (pGp) der Startnukleotide sind beschriftet. In der linken Spalte sind als Kontrolle die Transkriptionen mit GTP, in der rechten Spalte die Transkriptionen mit zusätzlichem GMP gezeigt. In den einzelnen Zeilen befinden sich die Abbildungen der jeweiligen pre-tRNA (pre-tRNA ΔCCA , pre-tRNA C , pre-tRNA CC , pre-tRNA CCA).

4.4.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen

Da die Ligation der tRNA sowohl mit T4 RNA-Ligase als auch mit T4 DNA-Ligase durchgeführt werden kann (3.10.5.), wurden diese Enzyme vergleichend getestet. Bei beiden war die Ausbeute an zyklisierter RNA gleich, so dass im Weiteren lediglich die T4-DNA-Ligase benutzt wurde, da sie aufgrund eines verwendeten „Splint“-Oligonukleotides eine höhere Sequenzspezifität besitzt (Moore und Query, 2000). Bei der Optimierung der Reaktionsbedingungen (Abb. 4-25) wurde das Volumen des Hybridisierungsansatzes von 300 μ l, bei dem eine Dimerisierung unterdrückt wird, sowie die Zugabe von PEG 4000 zur Ligations-Reaktion, mit der die Ausbeute an zyklisierter RNA erhöht wird, als hilfreich ermittelt. Die Verwendung eines „Disruptor“-Oligonukleotides (3.10.5.), erbrachte dagegen für die Ligation der tRNAs keinen feststellbaren Vorteil. Für die Inkubation der Ligations-Reaktion stellten sich niedrige Temperaturen (22 $^{\circ}$ C; 11 $^{\circ}$ C) bei einer gleichzeitig längeren Inkubation (12 h) für die RNAs als schonend heraus (Abb. 4-25).

120	300	300	300	300	300	300	Volumen [μ l]
5	5	3	3	3	3	3	DNA-Ligase [U]
-	-	-	+	-	-	-	Disruptor
-	-	-	-	+	-	+	PEG
37	37	37	37	37	22	22	Temperatur [$^{\circ}$ C]

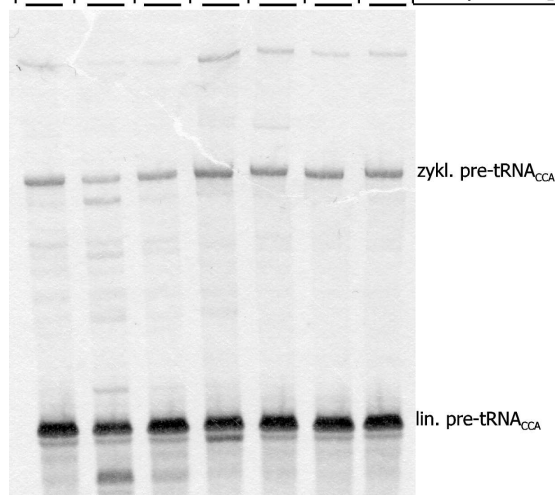


Abb. 4-25: Splint Ligation von tRNAs mit T4-DNA-Ligase

Das toluidinblaugefärbte Gel zeigt verschiedene Ligations-Reaktionen von pre-tRNA_{CCA} bei denen das Splint-Oligonukleotid SplintCCA1 und T4 DNA-Ligase verwendet wurde. Neben dem verwendeten Volumen (μ l) und der Menge an DNA-Ligase (U) unterscheiden sich die Ansätze auch durch die Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) eines Disruptor-Oligonukleotids und PEG 4000 sowie der Temperatur, bei der die Ligation durchgeführt wird.

4.4.3. Splint-Ligation von pre-tRNA^{Arg}

Mit den ermittelten Reaktionsbedingungen wurden pre-tRNA _{Δ CCA}, pre-tRNA_C, pre-tRNA_{CC} und pre-tRNA_{CCA} (4.1.1.) mit Hilfe der jeweiligen Splint-Oligonukleotide (SplintDis1, SplintC1, SplintCC1, SplintCCA1) und T4 DNA-Ligase zyklisiert und in Primer-Extension-Analysen eingesetzt (Abb. 4-26). Es zeigte sich, dass die Ligationseffizienz ausreichend war, um mit dem Oligonukleotid Arg2 das 3'-Ende der tRNAs zu analysieren. Durch die Zyklisierung waren sogar mehrere Umläufe der Reversen Transkriptase um die gesamte tRNA möglich. Eine Behandlung des Ligations-Ansatzes

durch DNase I vor der anschließenden Primer-Extension-Reaktion, die zur Entfernung des Splint-Oligonukleotides dient, war nicht essentiell.

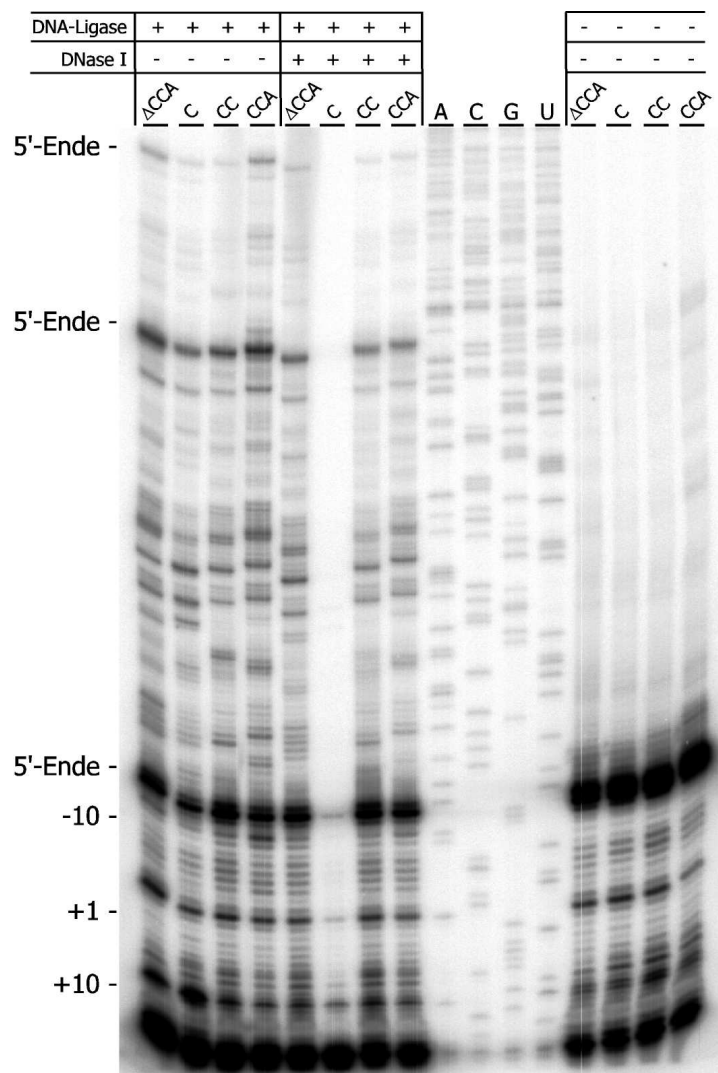


Abb. 4-26: Primer-Extension-Analyse von pre-tRNAs mit dem Oligonukleotid Arg2 nach einer Splint-Ligation

Gezeigt ist eine Primer-Extension-Analyse von pre-tRNAs, die durch eine Splint-Ligation zyklisiert wurden (linker Block) bzw. pre-tRNAs, welche linear eingesetzt wurden (rechter Block). Angegeben ist die jeweilige eingesetzte pre-tRNA (pre-tRNA Δ CCA, pre-tRNA $_C$, pre-tRNA $_{CC}$, pre-tRNA $_{CCA}$). Die Verwendung (+) von T4 DNA-Ligase und DNase I, sowie der Verzicht (-) auf diese Enzyme ist jeweils angegeben. Zentral ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche bis zum Erreichen des ersten 5'-Endes die tRNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Bei den weiteren Umläufen gibt sie lediglich die pUC19 Vektorsequenz des Transkriptionsplasmides wieder. Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der tRNA-Sequenz des Transkriptes an bzw. das Erreichen des 5'-Endes der zyklisierten pre-tRNAs bei weiteren Umläufen.

Diese Methode sollte nun im Folgenden auf die Analyse von Crosslink-Komplexen angewendet werden. In die Crosslink-Ansätze von s^4 U-RNase P RNA und pre-tRNA Arg wurden deshalb tRNAs mit 5'-Monophosphat (4.4.1.) eingesetzt, so dass nach der Aufreinigung der isolierten spezifischen Komplexe (3.10.4.2.) die vernetzte tRNA durch die Splint-Ligation zyklisiert werden konnte (3.10.5.). In den anschließenden Primer-Extension-Analysen mit dem Oligonukleotid Arg2 (3.5.3.) stoppte die

Reverse Transkriptase allerdings bereits am 5'-Ende der tRNA. Eine Extension über die Ligationstelle hinaus fand nicht statt. Somit konnte durch die Splint-Ligation kein zusätzlicher Informationsgewinn über das 3'-Ende der tRNAs gewonnen werden. Aus diesem Grund wurde die Splint-Ligation zur Analyse der Komplexe von s⁴U-RNase P RNA und pre-tRNA^{Arg} nicht weiter angewendet.

4.5. Modifizierung des 3'-CCA-Endes von tRNAs mit der Nukleotidyltransferase

4.5.1. Überexpression und Isolierung der *E. coli* Nukleotidyltransferase

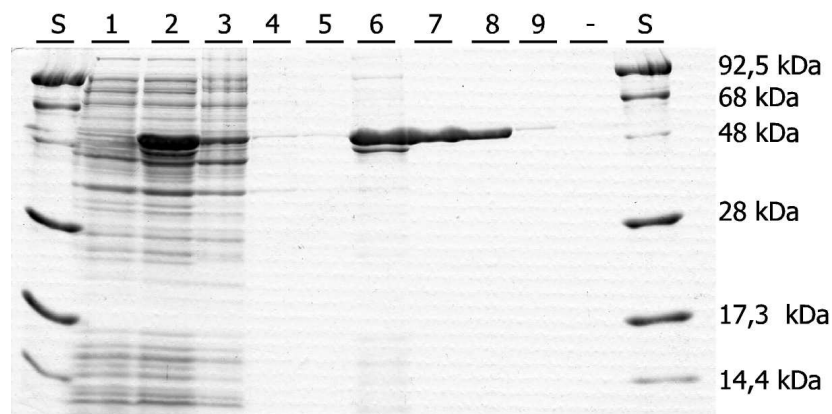
Das für die ATP(CTP):tRNA Nukleotidyltransferase (Nukleotidyltransferase) aus *E. coli* codierende Gen *cca* lag bereits in den Vektor pET-22b(+) kloniert vor (Shi *et al.*, 1997). Der Expressionsklon codiert zusätzlich für ein C-terminales *6x-His-tag*. Das Plasmid pCCA wurde in *E. coli* BL21(DE3) Expressionszellen transformiert. Für eine präparative Expression wurde eine 500 ml Ampicillin-supplementierte YT-Kultur aus einer Vorkultur angesetzt. Nach der erfolgten Induktion und Expression unter optimierten Bedingungen (3.9.2.1.) wurden durchschnittlich 1,0 g Zellsediment gewonnen. Nach der Lyse der Zellen und Sonifikation lag das Protein wie beschrieben zu 90 % in Form von Inclusion Bodies vor (Shi *et al.*, 1997). Diese wurden aufgereinigt, in 8 M Harnstoff denaturierend gelöst (3.9.2.3.) und das Enzym über eine Ni²⁺-NTA-Säule aufgereinigt (3.9.3.1.). Mit einem Harnstoffgradienten (8-0 M) wurde das Protein im gebundenen Zustand renaturiert und anschließend von der Säule eluiert (3.9.3.1.). Zur Entfernung von Imidazol wurde gegen den Lagerpuffer dialysiert (3.8.1.), und die Proteinlösung bei -20 °C gelagert.

Durch Konzentrationsbestimmung nach Bradford (3.8.2.) wurde eine Menge von 4,9 mg aufgereinigtes Protein bestimmt. Da der Durchlauf nach dem Binden an die Säulenmatrix noch sehr viel Nukleotidyltransferase enthielt, wurde er erneut auf eine Säule aufgetragen und somit zusätzlich 7 mg des Enzyms gewonnen. Bei einem zweiten Ansatz zur Überexpression und Isolierung wurden 4,8 mg an Nukleotidyltransferase erhalten. Abb. 4-27 zeigt ein 12,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel (3.8.3.) mit Proben der einzelnen Aufreinigungsschritte.

(nächste Seite)

Abb. 4-27: Aufreinigung von rekombinanter *E. coli* Nucleotidyltransferase

Das Coomassie-Blau gefärbte (3.8.4.) 12,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel zeigt Proben aller Reinigungsstufen. Am rechten Rand sind die Molekulargewichte (kDa) des Protein-Längenstandards gegeben.



S	Protein-Längenstandard	6	Durchlauf nach Binden an Ni ²⁺ -Agarose
1	<i>E. coli</i> BL21(DE3) pCCA vor Induktion	7	Waschfraktion der Säule
2	<i>E. coli</i> BL21(DE3) pCCA nach Induktion	8	1. Enzym-Elution
3	Überstand der Inclusion-Bodies	9	2. Enzym-Elution
4	1. Waschfraktion der Inclusion-Bodies	-	freie Spur
5	2. Waschfraktion der Inclusion-Bodies		

4.5.2. Analytische Nukleotidyltransferase-Reaktion

Die Nukleotidyltransferase (Ntase) als templatunabhängige RNA-Polymerase synthetisiert bzw. komplettiert hochspezifisch die definierte Sequenz CCA am 3'-Ende von tRNAs. Da sie neben den Standard-Nukleotiden auch modifizierte Nukleotide erkennt (Sprinzl *et al.*, 1977), wurde sie in dieser Arbeit verwendet, um Modifikationen gezielt in das 3'-CCA-Ende einzubauen. Dies ermöglicht im weiteren Verlauf durch photochemische Anregung induzierte RNA-RNA-Crosslinks herbeizuführen. Um die Aktivität der denaturierend aufgereinigten Nukleotidyltransferase (4.5.1.) zu überprüfen, wurden bei radioaktiv markierten pre- und mat-tRNA^{Arg} mit den Standard-Nukleotiden (CTP; ATP) die 3'-CCA-Enden komplettiert (3.10.2.1.; Abb. 4-28; Abb. 4-29). Es zeigte sich, dass die Renaturierung durch einen Harnstoffgradienten (8-0 M) erfolgreich war. Mit der Ntase konnte bei allen getesteten tRNAs (pre-/mat-tRNA_{ΔCCA}, pre-/mat-tRNA_C, pre-/mat-tRNA_{CC}) das korrekte CCA-Ende zu 83-98 % hergestellt werden (Abb. 4-27; Abb. 4-28). Da die Ziel-tRNAs ein 3'-CdCsA und ein 3'-Cs²CA aufweisen sollten, wurde der Einbau von dCTP, ATPαS und s²CTP überprüft (Abb. 4-27; Abb. 4-28). Die Ausbeute an Vollängenprodukt (3'-CdCA) in Gegenwart von dCTP und ATP war bei den Edukten pre- und mat-tRNA_C 8,0 bzw. 58,8 %. Der gleichzeitige Einbau von dCTP und ATPαS in das 3'-Ende gelang zu 3,2 und 38,3 % bei pre- und mat-tRNA_C als Edukt. Diese Kombination wurde gewählt, da das verwendete ATPαS in einer weiteren Reaktion am Phosphorothioat mit APA-Br modifiziert werden sollte. Um eine nukleophile Substitutionsreaktion (S_N2) durch die 2'-Hydroxyl-Gruppe des vorangehenden Nukleotides auf die Diesterbindung des Phosphorothioates zu verhindern, wurde das 2'-Desoxycytosin-Triphosphat (dCTP) eingesetzt. Somit ist die Modifizierung durch die APA-Gruppe am Schwefelatom des Phosphorothioates stabil und kann

nicht durch eine nukleophil angreifende 2'-Hydroxyl-Gruppe substituiert werden (Gish und Eckstein, 1988; Konarska, 1999). Der Einbau von s²CTP in das 3'-Ende gelang ebenfalls, so dass sich auch hier eine präparative Reaktion anschließen konnte.

Es bleibt festzuhalten, dass bei allen eingesetzten Nukleotid-Kombinationen die Komplettierung des 3-CCA-Endes durch die Ntase bei mat-tRNAs effektiver als bei pre-tRNAs verlief.

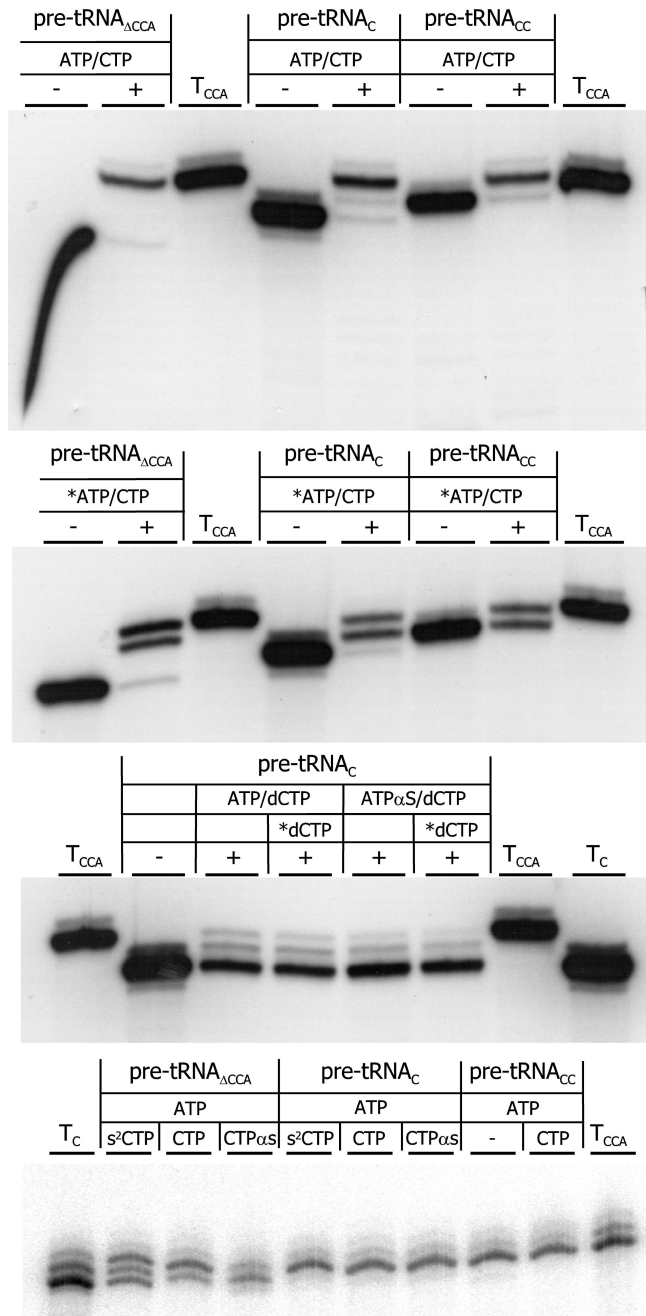


Abb. 4-27: *E. coli* Nukleotidyltransferase-Reaktion mit pre-tRNAs

Gezeigt sind analytische Nukleotidyltransferase-Reaktionen, die auf einem 12 % PAA-Gel (60 cm lang) aufgetrennt wurden. Die Edukt-tRNAs (pre-tRNA_{ΔCCA}, pre-tRNA_C, pre-tRNA_{CC}, pre-tRNA_{CCA}), die im jeweiligen Reaktionsansatz vorhandenen Nucleosid-Triphosphate und die tRNA-Transkriptkontrolle (pre-tRNA_{CCA}, pre-tRNA_C) sind angegeben. Das *-Symbol steht hierbei als Abkürzung für [α³²P]. Die Durchführung der Reaktion (+) und Kontrollansätze ohne Reaktion (-) sind gekennzeichnet.

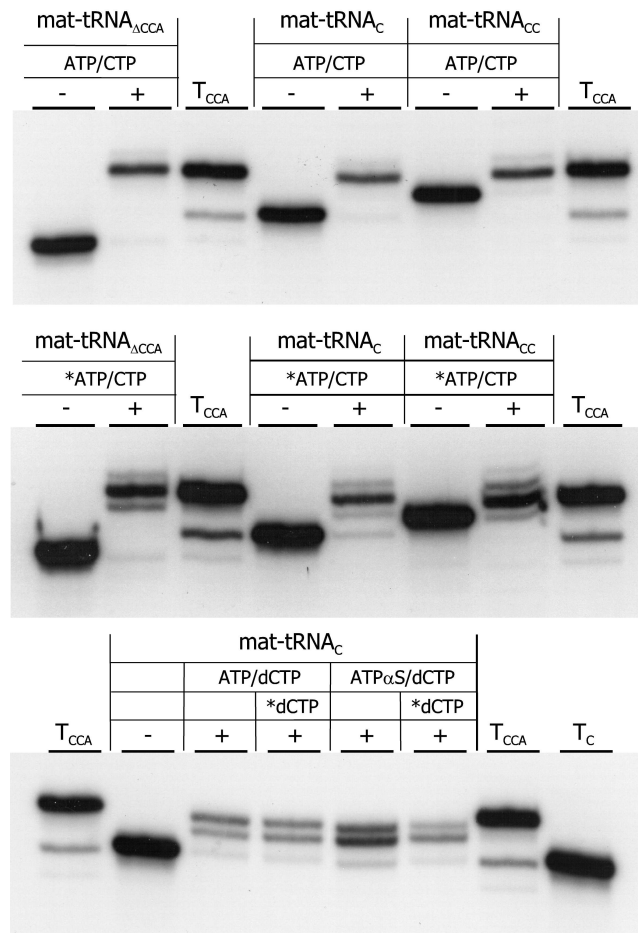


Abb. 4-28: *E. coli* Nukleotidyltransferase-Reaktion mit mat-tRNAs

Gezeigt sind analytische Nukleotidyltransferase-Reaktionen, die auf einem 12 % PAA-Gel (60 cm) aufgetrennt wurden. Die Edukt-tRNAs (mat-tRNA_{ΔCCA}, mat-tRNA_C, mat-tRNA_{CC}, mat-tRNA_{CCA}), die im jeweiligen Reaktionsansatz vorhandenen Nucleosid-Triphosphate und die tRNA-Transkriptkontrolle (mat-tRNA_{CCA}, mat-tRNA_C) sind angegeben. Das *-Symbol steht hierbei als Abkürzung für [³²P]. Die Durchführung der Reaktion (+) und Kontrollansätze ohne Reaktion (-) sind gekennzeichnet.

4.5.3. Präparative Synthese von pre-tRNA_{CdCsA} und mat-tRNA_{CdCsA}

Für die Synthese von pre-tRNA_{CdCsA} und mat-tRNA_{CdCsA} wird als Vorstufe die jeweilige tRNA mit 3'-C-Ende benötigt. Zu ihrer Synthese wird *Fok I* linearisiertes Plasmid pPmtRNAArg2 (pre-tRNA_C) bzw. pPmtRNAArg4 (mat-tRNA_C) in eine präparative T7-Transkription eingesetzt und die erhaltenen Transkripte aufgereinigt (3.4.3.).

Die Edukt-tRNAs (pre-tRNA_C bzw. mat-tRNA_C) wurden zusammen mit den Nucleotiden dCTP und ATP_{αS} in einem präparativen Ansatz der Nucleotidyltransferase-Reaktion (3.10.2.2.) unterzogen. Durch diese Reaktion wurden die 3'-Enden der tRNAs zum gewünschten 3'-CdCsA komplettiert.

Zur leichteren Lokalisierung der Synthese-Produkte im PAA-Gel wurden dem Reaktionsansatz geringe Mengen an [³²P]-dCTP zugegeben. Alternativ wurde die Lokalisation auch mittels Fluoreszenzlöschung (3.1.3.2.) durchgeführt. Die eluierten und aufgereinigten pre- und mat-tRNA_{CdCsA} wurden direkt in eine Reaktion mit APA-Br eingesetzt (4.7.2.). Erst ab diesem Arbeitsschritt, in dem die photosensitiven APA-Gruppe anwesend ist, wurden die Transkripte unter Lichtausschluss gehalten.

4.5.4. Präparative Synthese von pre-tRNA_{Cs²CA}

Als Edukt für die Synthese von pre-tRNA_{Cs²CA} (4.5.2.) wurde ebenfalls pre-tRNA_C eingesetzt. Durch Anhängen von s²CTP und ATP an das unvollständige 3'-CCA-Ende durch die Nukleotidyltransferase wurde die Ziel-RNA hergestellt. Auch hier konnte durch Zugabe von [α ³²P]-ATP die Produktlokalisierung erleichtert werden. Eine Lokalisierung mittels Fluoreszenzlöschung wurde bei dieser tRNA-Mutante vermieden, da die hierfür verwendete Wellenlänge von 254 nm im optimalen Absorptionsbereich des photosensitiven s²CTP liegt.

pre-tRNA_{Cs²CA} kann nach der Aufreinigung direkt für Crosslink-Reaktionen verwendet werden (4.9.). Zusätzlich ist auch bei dieser tRNA eine weitergehende Modifizierung des s²C durch APA-Br möglich (4.7.4.).

4.6. Modifizierung des tRNA-5'-Endes

4.6.1. Präparative Synthese von 5'GMPS-pre-tRNA^{Arg} und 5'GMPS-mat-tRNA^{Arg}

Mit Hilfe der *in vitro* T7-Transkription lassen sich am 5'-Ende von RNAs Nukleotid-Monophosphorothioate (NMPS) positionsspezifisch einbauen, da sie durch die T7-Polymerase lediglich als Startnukleotide verwendet werden können (3.4.5.). Am 5'-Phosphorothioat lässt sich im weiteren Verlauf durch eine Substitutionsreaktion die photosensitive APA-Gruppe an das Schwefelatom anhängen, welche die RNA dazu befähigt mit anderen RNAs photochemisch induzierte Vernetzungen auszubilden.

Zur Synthese wird *Bst* NI linearisiertes Plasmid pPmtRNA^{Arg}1 (pre-tRNA_{CCA}) bzw. pPmtRNA^{Arg}3 (mat-tRNA_{CCA}) in einer präparativen T7-Transkription (3.4.5.) eingesetzt. Im jeweiligen Reaktionsansatz befinden sich GTP und GMPS im molaren Verhältnis von 1:5.

Die Transkription wird wie in (3.4.3.) durchgeführt. Lediglich bei der Elution der Transkripte wird dem Elutionspuffer DTT (0,15 mM) zugesetzt, um eine Dimerisierung der Transkripte über eine Disulfidbrücke zu unterbinden (Abb. 4-29). Die Zugabe dieses Oxidationsschutzes garantiert, dass in der anschließenden Modifizierungsreaktion mit APA-Br (3.10.3.) nur das RNA-Monomer mit der frei zugänglichen Phosphorothioat-Gruppe vorliegt.



Abb. 4-29: Dimerisierung der Transkripte mit 5'-GMPS-Einbau

Aufgetrennt auf einem 12 % PAA-Gel (40 cm) sind hier 5'GMPS-mat-tRNA_{CCA}-Transkripte der tRNA-Synthese mit 5'-GMPS, die bei der Aufreinigung sowohl unbehandelt (-) als auch mit DTT und Mercaptoethanol versetzt wurden. Am rechten Rand sind die tRNAs und das Dimer gekennzeichnet.

4.7. Modifizierung von RNA mit der APA-Gruppe

Um RNA-RNA-Crosslinks herbeizuführen, kann an RNAs, die entweder modifizierte Basen (s^4 UTP, s^2 CTP) oder Phosphate (Phosphorothioat) besitzen, p-Azidophenacyl (APA) an das jeweilige Schwefelatom angehängt werden. Auch an RNAs, die am 3'-Ende durch eine Oxidation und anschließende reduktive Alkylierung mit Ethylendiamin vorbereitet wurden, kann die APA-Gruppe durch eine Substitutions-Reaktion angefügt werden. Durch eine Bestrahlung mit Licht geeigneter Wellenlänge wird die Azido-Gruppe zur Bildung eines hochreaktiven Nitrens angeregt, welches in eine Vielzahl von kovalenten Bindungen insertieren kann (Schuster und Platz, 1992) und somit kovalente RNA-RNA-Vernetzungen herbeiführt. In dieser Arbeit wurde die APA-Gruppe an 5'- und 3'-Enden von pre- und mat-tRNA^{Arg} angehängt. Auch eine Modifizierung von s^2 CTP am 3'-Ende von pre-tRNA^{Arg} und s^4 UTP markierte RNase P RNA wurden mit p-Azidophenacyl-Bromid durchgeführt.

4.7.1. Synthese von 5'APA-pre-tRNA_{CCA} und 5'APA-mat-tRNA_{CCA}

Zur Modifizierung von tRNAs mit der APA-Gruppe am 5'-Ende wurden als Vorstufe 5'GMPS-pre-tRNA_{CCA} und 5'GMPS-mat-tRNA_{CCA} durch T7-Transkription in Gegenwart von GMPS synthetisiert (4.6.1.). Das Schwefelatom der 5'-Phosphorothioat-Gruppe ist somit die einzige Position der tRNAs, die durch APA-Br modifiziert werden kann. Unter Ausschluss von Licht wurden die aufgereinigten Transkripte in DMF mit APA-Br versetzt und bei 37 °C inkubiert (3.10.3.). Nach der Aufreinigung unter Lichtausschluss wurden die Reaktionsprodukte 5'APA-pre-tRNA_{CCA} und 5'APA-mat-tRNA_{CCA} aliquotiert und bei -20 °C gelagert oder direkt in Crosslink-Reaktionen eingesetzt. Die erfolgreiche Modifizierung von 5'GMPS-tRNA mit p-Azidophenacyl konnte durch eine Auftragung auf ein

denaturierendes 12 % (60 cm) PAA-Gel dokumentiert werden. Aufgrund der sehr langen Trennstrecke konnte der Unterschied der Laufstrecken von Edukt und Produkt aufgelöst werden (Abb. 4-30).

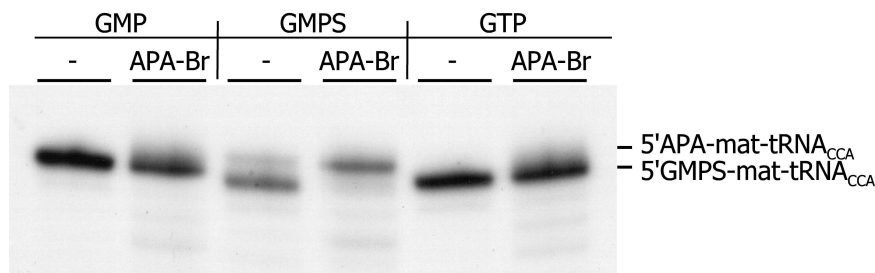


Abb. 4-30: 5'-Modifizierung von tRNAs mit APA-Br

Aufgetrennt sind hier mat-tRNA_{CCA}-Transkripte, die durch die jeweilige T7-Transkription unterschiedliche 5'-Nukleotide besitzen (GMP, GMPS, GTP). Die Durchführung der Modifizierungs-Reaktion (APA-Br) und Kontrollansätze ohne Reaktion (-) sind angegeben. Am rechten Rand sind Edukt (5'GMPS-mat-tRNA_{CCA}) und Produkt (5'APA-mat-tRNA_{CCA}) der APA-Br-Reaktion gekennzeichnet.

4.7.2. Synthese von 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} und 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA}

Da für Crosslink-Experimente tRNA^{Arg} auch am 3'-Ende mit der APA-Gruppe modifiziert werden sollte, wurden die zuvor in zwei Syntheseschritten mit Hilfe der Nukleotidyltransferase aufwendig hergestellten Transkripte pre-tRNA_{CdCsA} und mat-tRNA_{CdCsA} (4.5.3.) unter Lichtausschluss mit APA-Br in DMF zur Reaktion gebracht (3.10.3.). Da durch die Nukleotidyltransferase-Reaktion positionsspezifisch α S-ATP in das 3'-CCA-Ende eingebaut wurde, ist das Schwefelatom des Phosphorothioates die einzige Position der RNA, an die durch nukleophile Substitution p-Azidophenacyl angehängt werden kann. Um diese Modifikation vor einem nukleophilen Rückseitenangriff auf das Phosphoratom zu schützen, wurde zusätzlich dCTP in das 3'-CCA-Ende eingebaut. Nach der Aufreinigung unter Lichtausschluss wurden die Reaktionsprodukte 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} und 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA} aliquotiert und bei -20 °C gelagert oder direkt in Crosslink-Reaktionen eingesetzt.

4.7.3. Synthese von APA-s⁴U-RNase P RNA

Da s⁴UTP an Position 4 der Base anstelle einer Ketoxy- eine Thiocarbonyl-Funktion besitzt, ist diese ebenfalls mit p-Azidophenacyl modifizierbar (Stade *et al.*, 1989). In einer *in vitro* Transkription wurde *P. marinus* RNase P RNA in Gegenwart von s⁴UTP und UTP (molares Verhältnis 1:9) hergestellt (3.4.6.; 4.3.1.) und das aufgereinigte Transkript unter Lichtausschluss mit APA-Br in DMF zur Reaktion gebracht (3.10.3.). Das aufgereinigte Reaktionsprodukt APA-s⁴U-RNase P RNA wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert oder direkt in Crosslink-Reaktionen eingesetzt.

4.7.4. Synthese von 3'APA-pre-tRNA_{Cs²CA}

Die Synthese von 3'APA-pre-tRNA_{Cs²CA} wurde analog der Reaktionen von s⁴U mit APA-Br (Stade *et al.*, 1989) oder Phosphorothioat mit APA-Br (Konarska, 1999 ; Harris und Christian, 1999) geplant. Das durch die Nukleotidyltransferase am 3'-Ende der tRNA eingebaute s²CTP besitzt analog zu s⁴UTP eine Thiocarbonyl-Funktion in der Base und sollte daher ebenso mit APA-Br modifizierbar sein. Diese positionsspezifische Modifikation ist vielversprechend, da durch die APA-Gruppe bei der angestrebten Crosslink-Reaktion ein Wechsel der verwendeten Wellenlänge von 254 nm zu 302 nm möglich ist und zusätzlich ein geometrisch flexibler Crosslinker (APA) Verwendung findet. Ausgehend von aufgereinigter pre-tRNA_{Cs²CA} (4.5.4.) wurde in DMF mit APA-Br das gewünschte Produkt 3'APA-pre-tRNA_{Cs²CA} synthetisiert (3.10.3.) und aufgereinigt. Die gelöste RNA wurde aliquotiert und bei – 20 °C gelagert oder direkt in Crosslink-Reaktionen eingesetzt.

4.8. Crosslink-Experimente von *P. marinus* RNase P RNA mit APA-modifizierten RNAs

Die Verwendung der p-Azidophenacyl-Gruppe für Crosslink-Reaktionen hat im Vergleich zu Nukleotid-Analoga (s⁴UTP; s²CTP; s⁶GMP) als Crosslink-Reagenz den Vorteil, dass sie durch den flexiblen und größeren Aktionsradius (9 Å vom Verknüpfungspunkt) weniger Ansprüche an die Geometrie der Reaktionspartner stellt. Aus dem durch Lichteinstrahlung angeregten Azid entsteht das reaktive Nitren, welches leichter in kovalente Bindungen seiner Umgebung insertieren kann als die starr in die Nukleinsäurekette fixierten Nukleotid-Analoga.

4.8.1. Prozessierung von APA-modifizierten tRNAs

Die Untersuchung des Komplexes aus *P. marinus* RNase P RNA und APA-modifizierter tRNA durch Crosslink-Experimente liefert nur dann eine gültige Aussage, wenn bei der Crosslink-Reaktion der aktive Enzym-Substrat-Komplex ausgebildet wird. Aus diesem Grund wurde die Prozessierung von 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} und ihrer Synthesevorstufe pre-tRNA_{CdCsA} im Vergleich zu pre-tRNA_{CCA} untersucht (Abb. 4-31). Ausgehend von [α -³²P]-rGTP markierter pre-tRNA_C (3.4.4.) wurde durch eine Nukleotidyltransferase-Reaktion im analytischen Maßstab pre-tRNA_{CdCsA} synthetisiert (4.5.3.). Die anschließende 3'-Modifizierung mit APA-Br (3.10.3.) führte zum gewünschten Endprodukt 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA}. Die Prozessierung der pre-tRNAs (1000 nM; 20000 cpm) durch RNase P RNA (100 nM) wurde im Reaktionspuffer P2 (4.3.3.1.; Hess *et al.*, 1998) und dem zur Crosslink-Reaktion konzipierten Bindungspuffer 6 (Ca²⁺) für 5 min bei 37 °C durchgeführt. Es zeigte sich, dass 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} und die Synthesevorstufe pre-tRNA_{CdCsA} genauso effizient prozessiert wurden, wie das Kontrollsubstrat (pre-tRNA_{CCA}). Das unnatürliche 3'-CdCsA-Ende stört die Prozessierung folglich nicht. Auch die zusätzliche Modifizierung durch die APA-Gruppe hat keinen negativen

Einfluss auf die Prozessierung. Die Verwendung von Bindungspuffer 6 unterbindet die Prozessierung hingegen vollständig. Mit APA-modifizierten tRNAs bildet sich folglich der aktive Enzym-Substrat-Komplex aus, so dass diese tRNAs in Crosslink-Experimenten eingesetzt werden können.

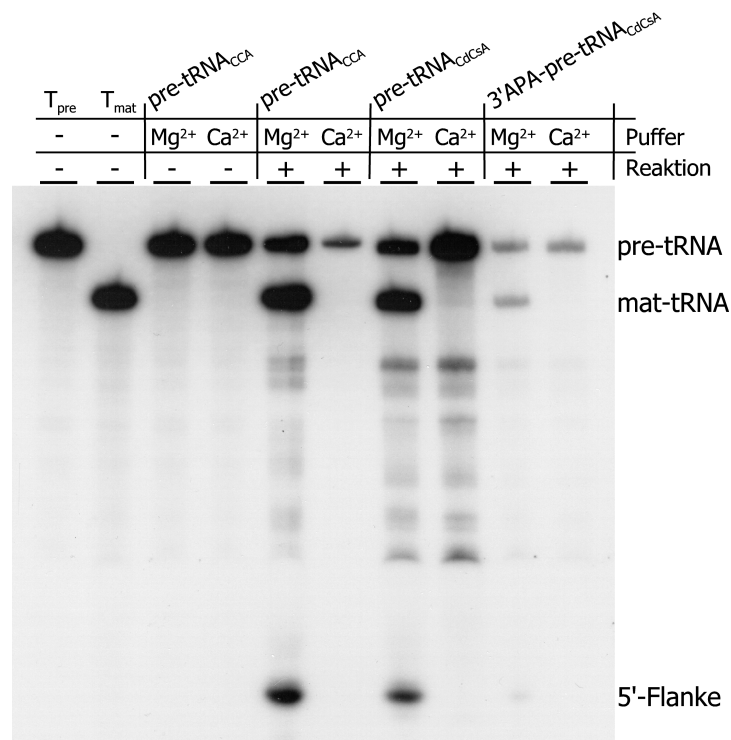


Abb. 4-31: Prozessierung von 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} und pre-tRNA_{CdCsA} durch *P. marinus* RNase P RNA

Gezeigt ist die Reaktion von RNase P RNA (100 nM) und pre-tRNA (1000 nM; 20000 cpm) in Puffer P2 (Mg²⁺) und Bindungspuffer 6 (Ca²⁺). Die Durchführung der Reaktion (5 min; 37 °C) ist durch + bzw. bei deren Auslassen durch – beschrieben. Die im jeweiligen Reaktionsansatz eingesetzten pre-tRNAs (pre-tRNA_{CCA}, pre-tRNA_{CdCsA}, 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA}) und aufgetragene tRNA-Transkriptkontrollen (**pre**-tRNA_{CCA}, **mat**-tRNA_{CCA}) sind angegeben. Am rechten Rand sind die Edukte und Produkte der Prozessierungs-Reaktionen gekennzeichnet.

4.8.2. Optimierung der Reaktionsbedingungen

Auf der Suche nach den optimalen Bedingungen für die Crosslink-Reaktion von p-Azidophenacyl-modifizierter tRNA^{Arg} mit *P. marinus* RNase P RNA wurden einzelne Parameter getestet (Abb. 4-32; Abb. 4-33).

Ausgehend von Erfahrungen aus der Crosslink-Reaktion mit ⁴U-RNase P RNA wurden die Bindungspuffer 3 und 6 (4.3.3.1.), in denen Mg²⁺ durch Ca²⁺ ersetzt wurde, für diese Reaktion getestet. Auch verschiedene Renaturierungs-Bedingungen für RNase P RNA (Bedingung b, c und d; 4.3.3.1.) und die Verwendung der Wellenlänge 302 nm bzw. 366 nm wurden untersucht. Es zeigte sich, dass die Crosslink-Reaktion von RNase P RNA (100 nM; 200000 cpm) mit 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} (1000 nM) in Bindungspuffer 6 durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 302 nm (5 min) die besten spezifischen RNA-RNA-Crosslinks erbrachte. Eine Renaturierung der RNase P RNA vor der Zugabe des Substrates war analog zur Reaktion von ⁴U-RNase P RNA nicht nötig. Die Inkubation des

kompletten Ansatzes für 5 Minuten bei 37 °C (Bedingung c) reichte aus, um den aktiven Enzym-Substrat-Komplex auszubilden. Die Verwendung von 365 nm für 15 Minuten (Abb. 4-33) führte zwar zu dem gleichen Muster der Komplex-Banden, allerdings mit geringerer Intensität als bei 302 nm (Abb. 4-32).

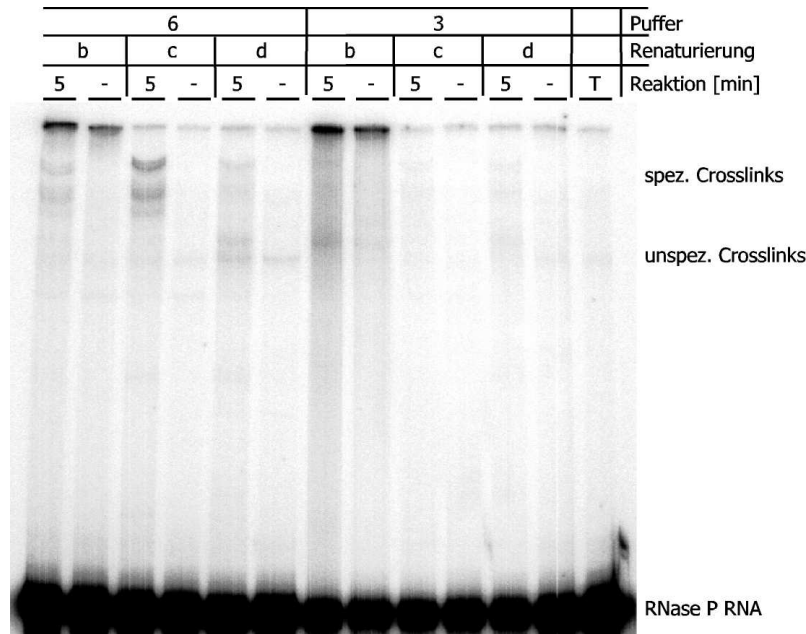


Abb. 4-32: Optimierung der Crosslink-Reaktion von 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} mit *P. marinus* RNase P RNA bei 302 nm

Gezeigt sind Crosslink-Reaktionen von RNase P RNA (100 nM; 200000 cpm) mit 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} (1000 nM) mit Bindungspuffer 3 und 6 (4.3.3.1.). Die Durchführung verschiedener Renaturierungsschritte (b-d), die Reaktionszeit (min) bei 302 nm, Kontrollansätze ohne Crosslink-Reaktion (-) sowie die Auftragung einer unbehandelten tRNA Transkriptkontrolle (T) sind angegeben. Am rechten Rand sind die Edukte und Produkte der Crosslink-Reaktionen gekennzeichnet.

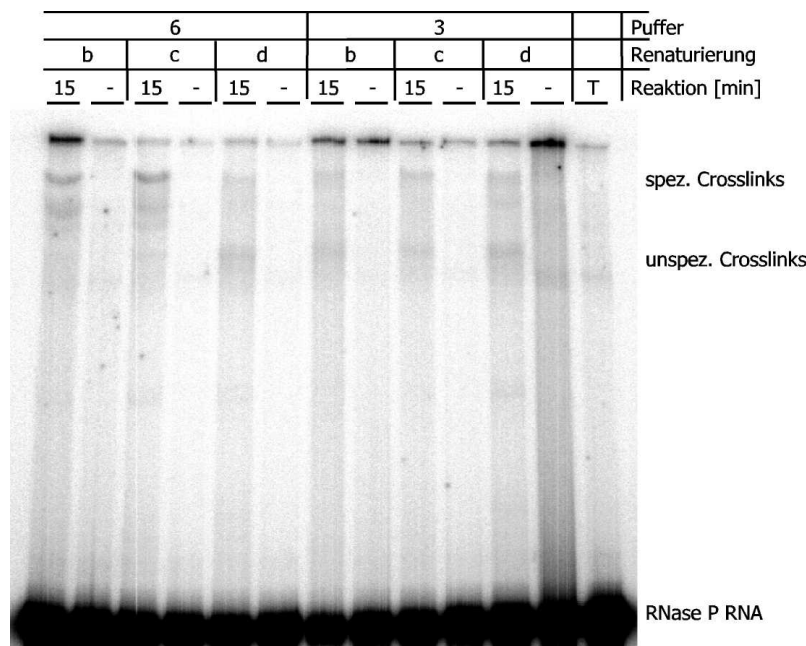


Abb. 4-33: Optimierung der Crosslink-Reaktion von 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} mit *P. marinus* RNase P RNA bei 365 nm

Gezeigt sind Crosslink-Reaktionen von RNase P RNA (100 nM; 200000 cpm) mit 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} (1000 nM) mit Bindungspuffer 3 und 6 (4.3.3.1.). Die Durchführung verschiedener Renaturierungsschritte (b-d), die Reaktionszeit (min) bei 365 nm, Kontrollansätze ohne Crosslink-Reaktion (-) sowie die Auftragung einer unbehandelten tRNA Transkriptkontrolle (T) sind angegeben. Am rechten Rand sind die Edukte und Produkte der Crosslink-Reaktionen gekennzeichnet.

4.8.3. Crosslink-Reaktion von *P. marinus* RNase P RNA mit APA-modifizierten tRNAs

Um den Einfluss des 3'-CCA-Endes der pre-tRNA^{Arg} auf die Prozessierung durch *P. marinus* RNase P RNA zu untersuchen, sollten neben der positionsunspezifischen Verwendung des photosensitiven s⁴UTP in RNase P RNA (4.3.) auch das Substrat modifiziert werden. Da vor allem die Positionierung des 3'-CCA-Endes, aber auch die der 5'-Flanke und des reifen 5'-Endes im Enzym-Substrat-Komplex von Interesse sind, wurden tRNAs spezifisch an diesen Positionen mit der photoreaktiven APA-Gruppe modifiziert und durch Lichtanregung zur Reaktion mit RNase P RNA gebracht.

Hierzu wurden die synthetisierten Substrate 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA}, 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA}, 5'APA-pre-tRNA_{CCA} und 5'APA-mat-tRNA_{CCA} (4.7.2.; 4.7.1.) mit RNase P RNA in präparativen Crosslink-Reaktionen eingesetzt (3.10.4.2.).

Bei allen vier Substraten zeigten sich im PAA-Gel spezifische Komplex-Banden, die nur in Reaktionen auftraten, in denen die photosensitive APA-Gruppe vorhanden war (Abb. 4-34; Abb. 4-35). Unspezifische Banden, die nur auf die Einwirkung des verwendeten UV-Lichtes zurückzuführen sind, traten hingegen auch in den Kontrollreaktionen auf, in denen keine APA-Gruppe anwesend war. Die spezifischen Crosslink-Komplexe (Komplexe 1-2 bzw. 1-3) wurden nach dem in Abb. 4-34 und Abb. 4-35 gezeigten Schema isoliert und aufgereinigt (3.10.4.2.).

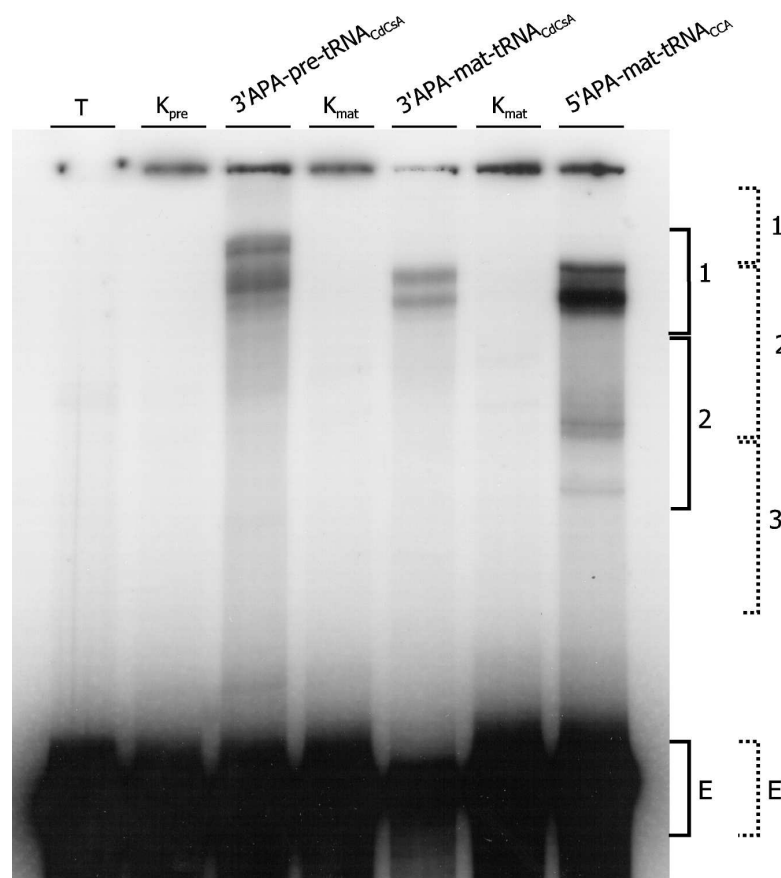


Abb. 4-34: Crosslink-Reaktion von *P. marinus* RNase P RNA mit APA-modifizierten tRNAs

Gezeigt sind Crosslink-Reaktionen von RNase P RNA (100 nM; 200000 cpm) mit APA-modifizierten tRNAs (1000 nM) in Bindungspuffer 6. Die Crosslink-Reaktionen (302 nm; 5 min) mit den jeweiligen APA-modifizierten tRNAs sind beschriftet. Kontrollreaktionen (K) mit unmodifizierter tRNA (pre-tRNA_{CCA}, mat-tRNA_{CCA}) und eine RNase P RNA Transkriptkontrolle (T) sind angegeben. Am rechten Rand sind zur RNA-Isolierung ausgeschnittenen Bereiche (1, 2 und E) für 3'APA-mat-tRNA und 5'APA-mat-tRNA mit durchgehenden Linien gekennzeichnet. Die Bereiche der RNA-Isolierung für 3'APA-pre-tRNA sind mit gestrichelten Linien angezeigt (1, 2, 3 und E).

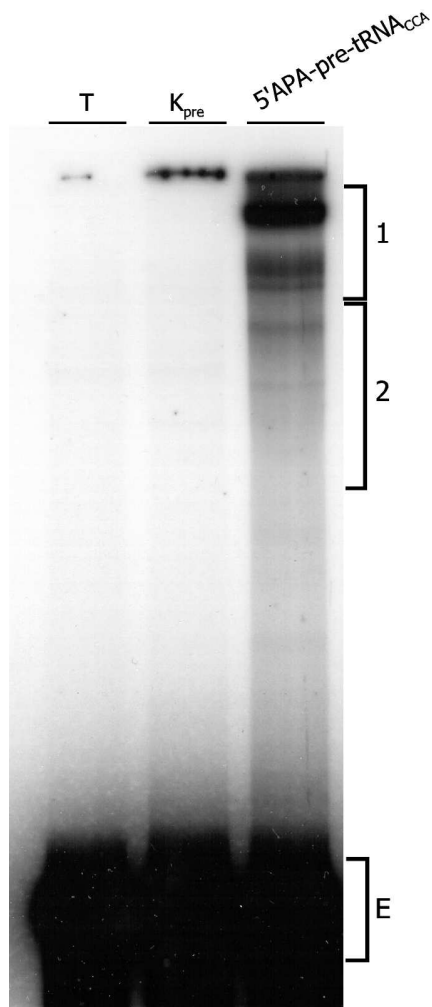


Abb. 4-35: Crosslink-Reaktion von *P. marinus* RNase P RNA mit 5'APA-pre-tRNA_{CCA}

Gezeigt ist die Crosslink-Reaktion von RNase P RNA (100 nM; 200000 cpm) mit 5'APA-pre-tRNA_{CCA} (1000 nM) in Bindungspuffer 6. Die Crosslink-Reaktion (302 nm; 5 min) mit der APA-modifizierte pre-tRNA ist beschriftet. Eine Kontrollreaktion mit unmodifizierter pre-tRNA_{CCA} (K_{pre}) und eine RNase P RNA Transkriptkontrolle (T) sind angegeben. Am rechten Rand sind die zur RNA-Isolierung ausgeschnittenen Bereiche (1, 2 und E) mit durchgehenden Linien gekennzeichnet.

Da auf der Seite der tRNA-Komponenten durch die APA-Modifikationen die Position der Vernetzungsstellen gegeben ist, wurde ausschließlich die RNase P RNA der jeweiligen Komplexe mittels Primer-Extension-Analyse auf vernetzte Nukleotide hin untersucht (3.5.3.). Dafür wurden hauptsächlich die Oligonukleotide PmarGSP6, PmarGSP7 und PmarGSP8 verwendet. Die Oligonukleotide PmarGSP5, PmarGSP9, PmarGSP10 und PmarGSP11 lieferten hingegen weniger gut auswertbare Ergebnisse.

Für die exakte Lokalisierung spezifischer Crosslinks wurde als Kontrolle neben der isolierten Eduktbande der Crosslink-Reaktion (Bande E) auch unbehandeltes Transkript von RNase P RNA in die Primer-Extension eingesetzt. Durch den Signal-Vergleich zwischen den Kontrollen (natürliche und induzierte Strangbrüche) und den Komplexen lassen sich so Vernetzungsstellen lokalisieren. Von jedem verwendeten Substrat wurden mit den Oligonukleotiden PmarGSP6-8 jeweils 2-3 Datensätze ermittelt, von denen mit Abb. 4-36 – 4-49 einige exemplarisch gezeigt sind. Die ermittelten vernetzten Nukleotide der RNase P RNA sind in Tab. 4-2 und in Sekundärstruktur-Darstellungen für jedes verwendete Substrat zusammengefasst (Abb. 4-50 – 4-53). Die Zusammenstellung in Tab. 4-1 dient der besseren Übersichtlichkeit der folgenden Abbildungen.

Substrat	Oligonukleotid	Abbildung	Zusammenfassung
3' APA-pre-tRNA _{CdCsA}	PmarGSP8	4-36 ; 4-37	Tab. 4-2 ; Abb. 4-50
	PmarGSP7	4-38	
	PMarGSP6	4-39	
3' APA-mat-tRNA _{CdCsA}	PmarGSP8	4-40 ; 4-41	Tab. 4-2 ; Abb. 4-51
	PMarGSP7	4-42	
	PMarGSP6	4-39	
5' APA-pre-tRNA _{CCA}	PmarGSP8	4-43; 4-44	Tab. 4-2 ; Abb. 4-52
	PmarGSP7	4-45	
	PMarGSP6	4-46	
5' APA-mat-tRNA _{CCA}	PmarGSP8	4-47 ; 4-48	Tab. 4-2 ; Abb. 4-53
	PMarGSP7	4-49	

Tab. 4-1: Übersicht über Abbildungen der *P. marinus* Crosslink-Reaktionen

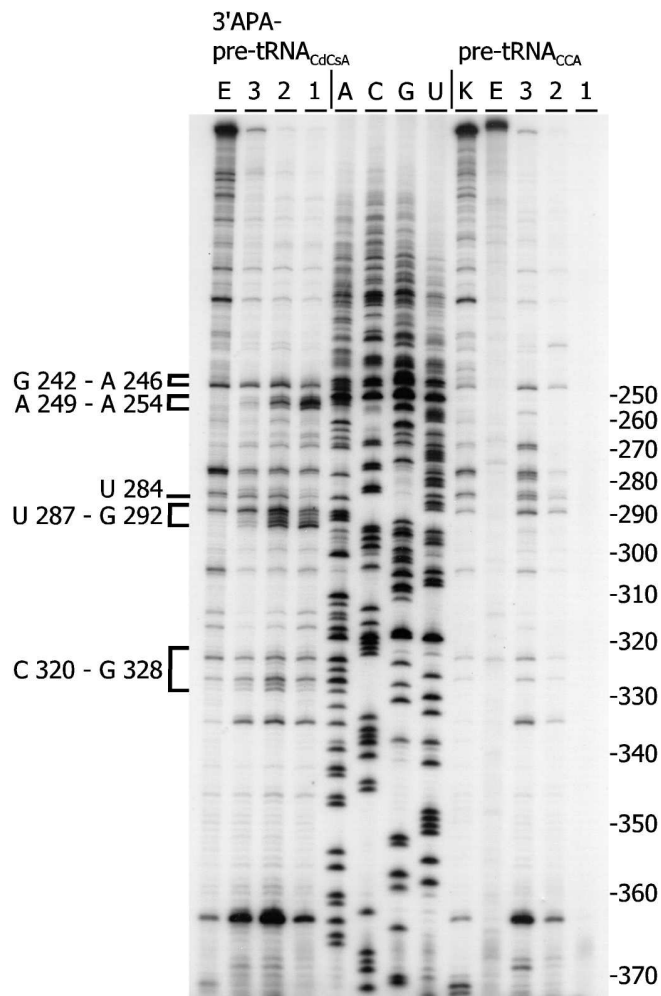


Abb. 4-36: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP8

Angegeben ist die jeweilige pre-tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2, 3), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

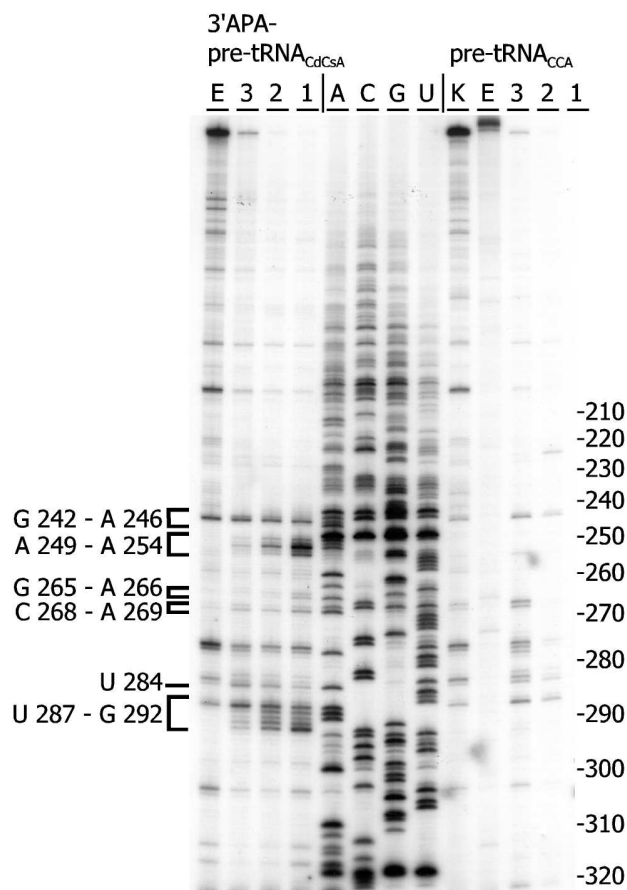


Abb. 4-37: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP8

Angegeben ist die jeweilige pre-tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2, 3), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

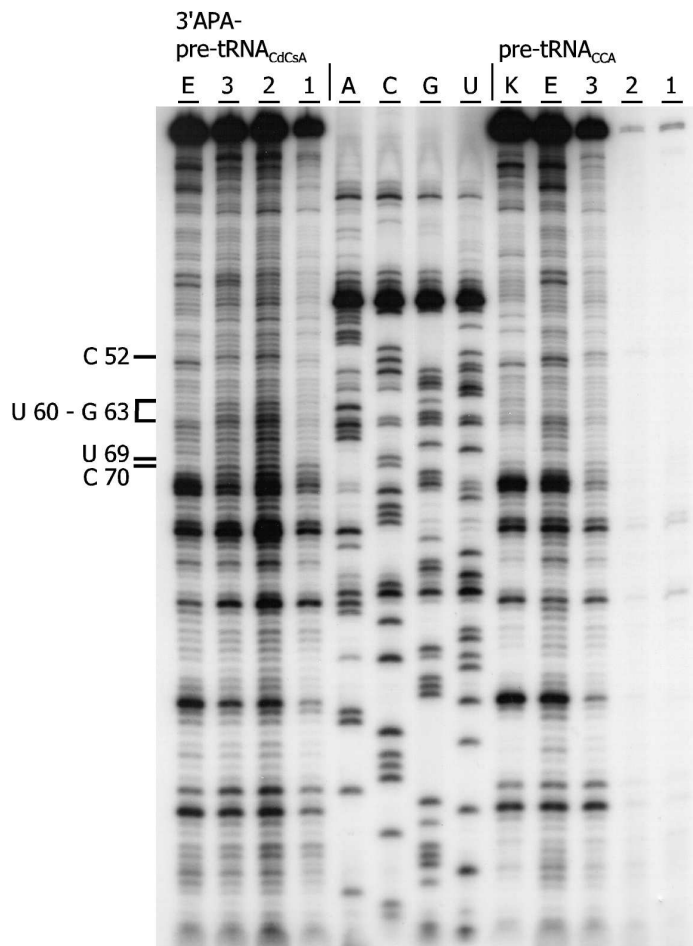


Abb. 4-38: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP7

Angegeben ist die jeweilige pre-tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2, 3), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

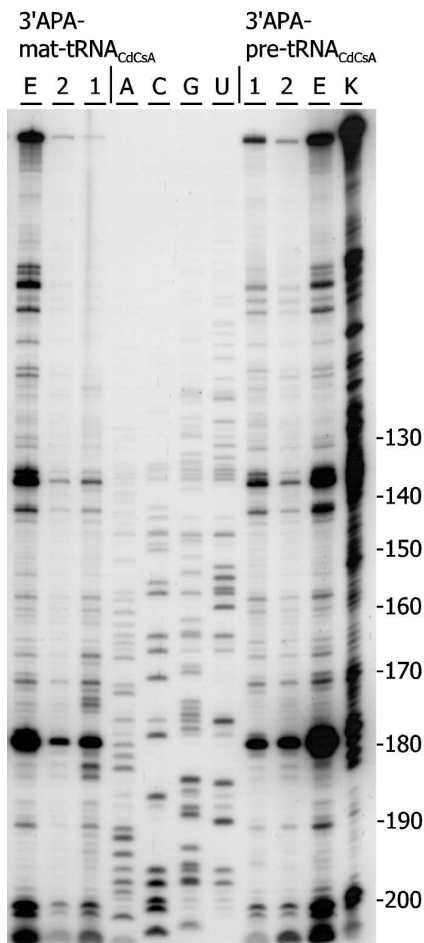


Abb. 4-39: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP6

Angegeben ist die jeweilige APA-modifizierte tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

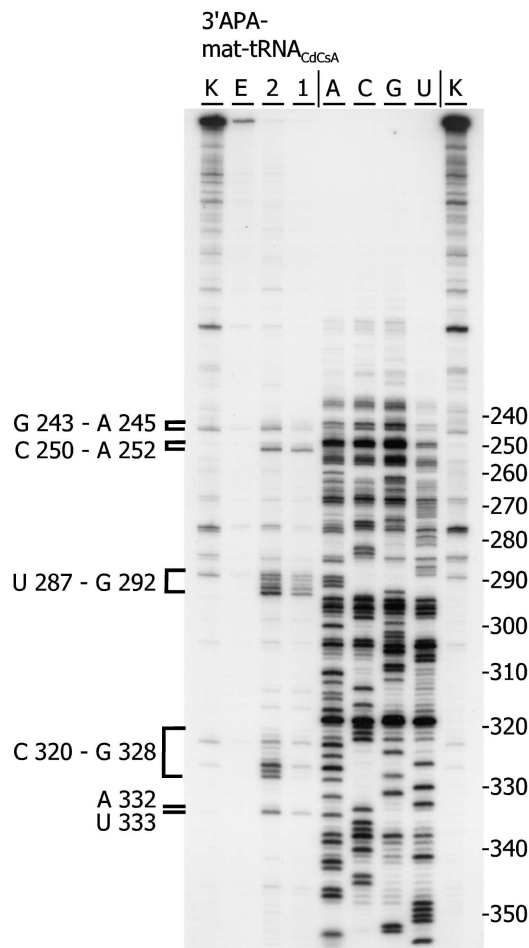


Abb. 4-40: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP8

Angegeben ist die jeweilige APA-modifizierte tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

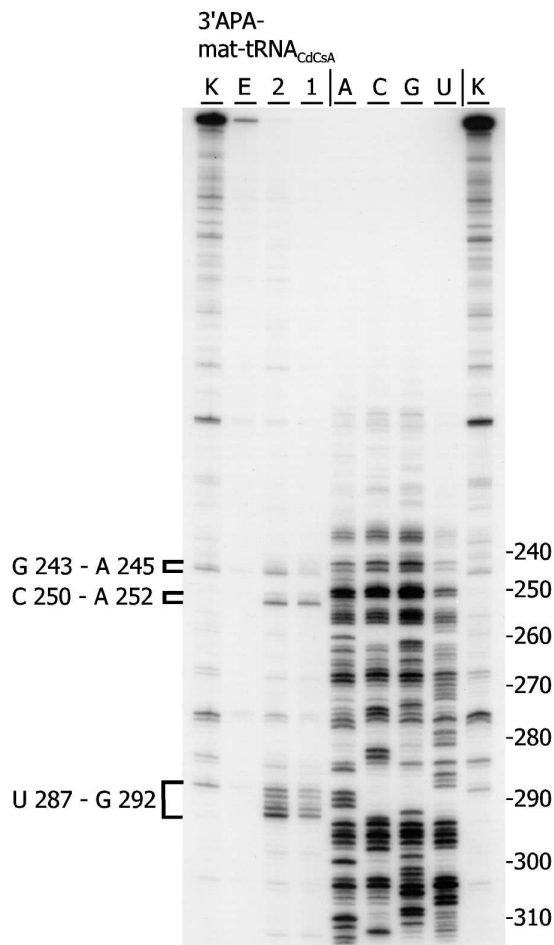


Abb. 4-41: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP8

Angegeben ist die jeweilige APA-modifizierte tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

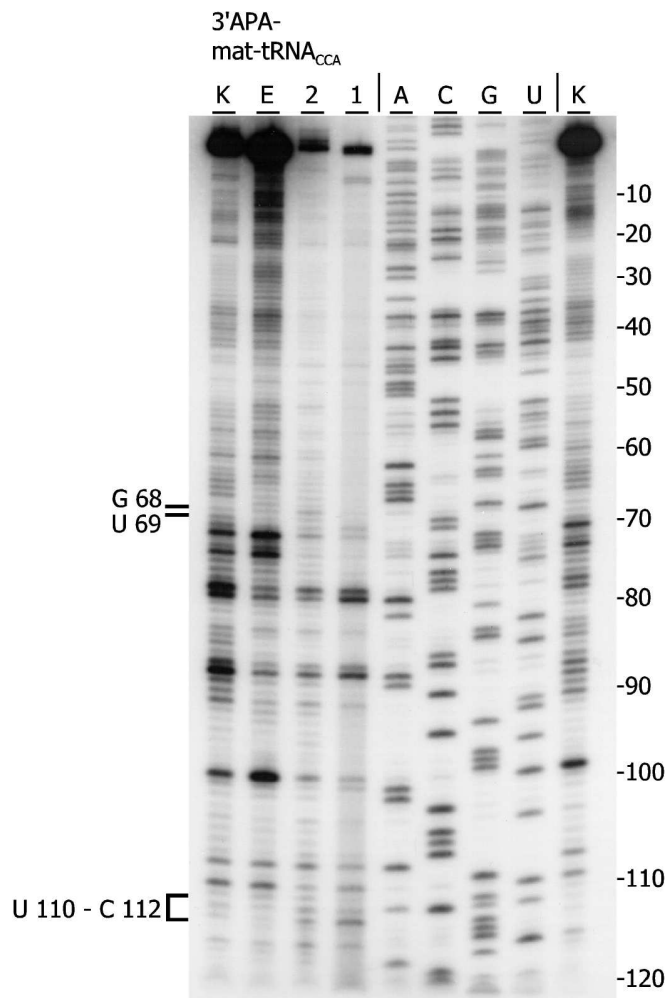


Abb. 4-42: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP7

Angegeben ist die jeweilige APA-modifizierte tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

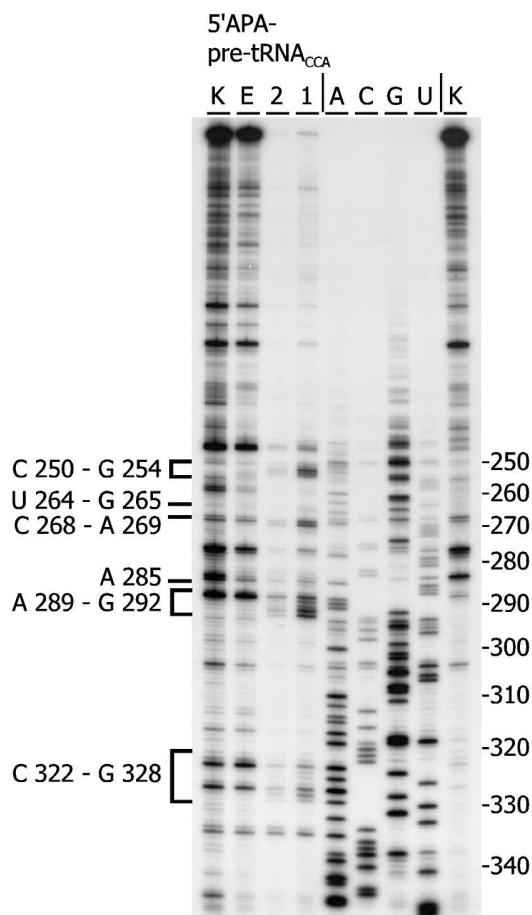


Abb. 4-43: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP8

Angegeben ist die jeweilige APA-modifizierte tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

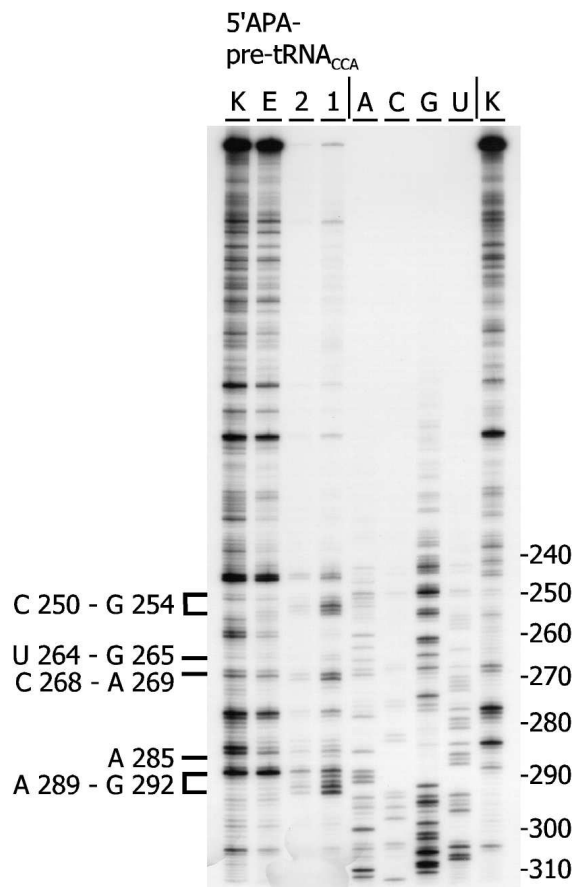


Abb. 4-44: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP8

Angegeben ist die jeweilige APA-modifizierte tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

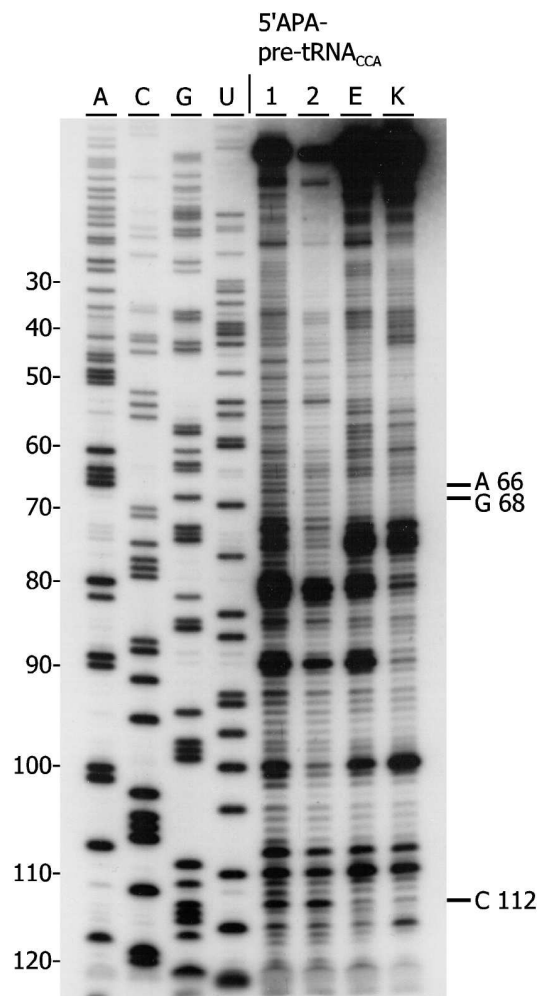


Abb. 4-45: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP7

Angegeben ist die jeweilige APA-modifizierte tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Links ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

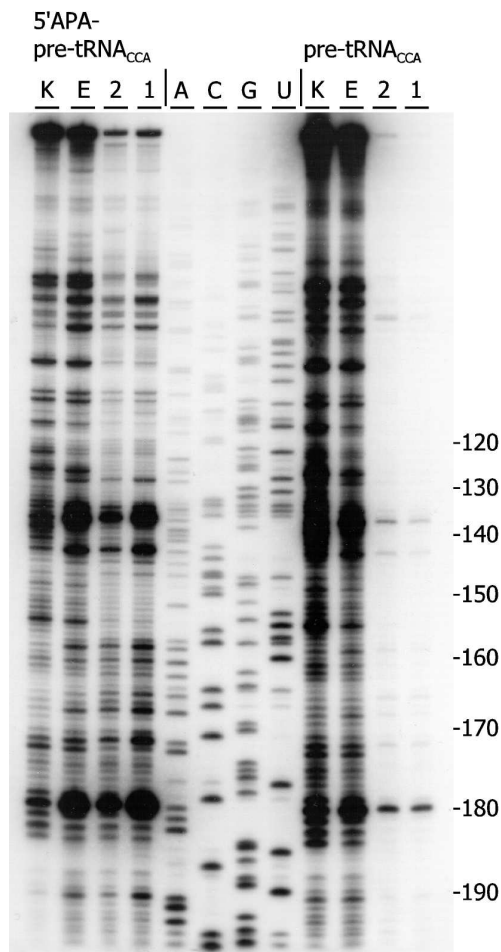


Abb. 4-46: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP6

Angegeben ist die jeweilige pre-tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

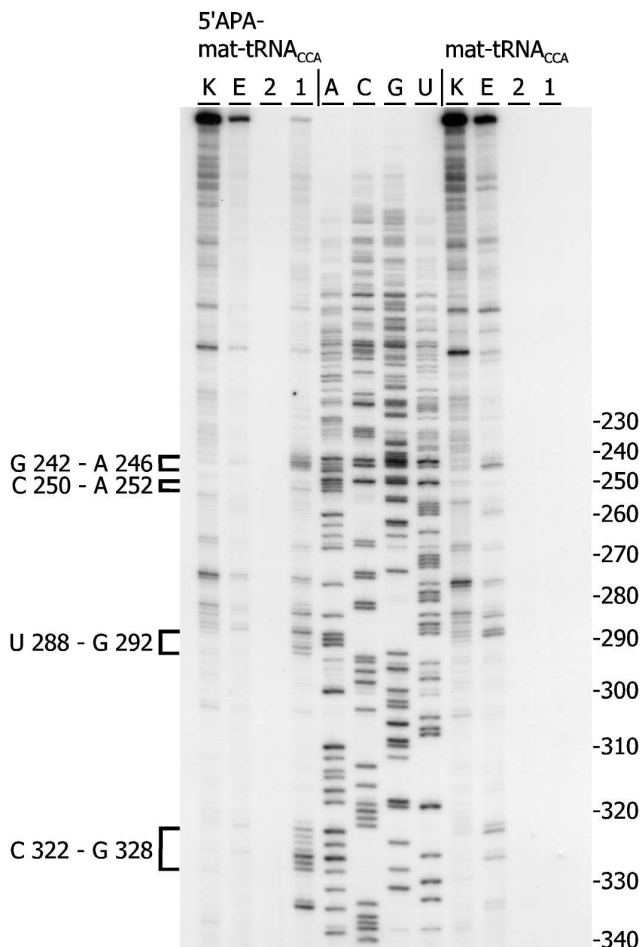


Abb. 4-47: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP8

Angegeben ist die jeweilige pre-tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

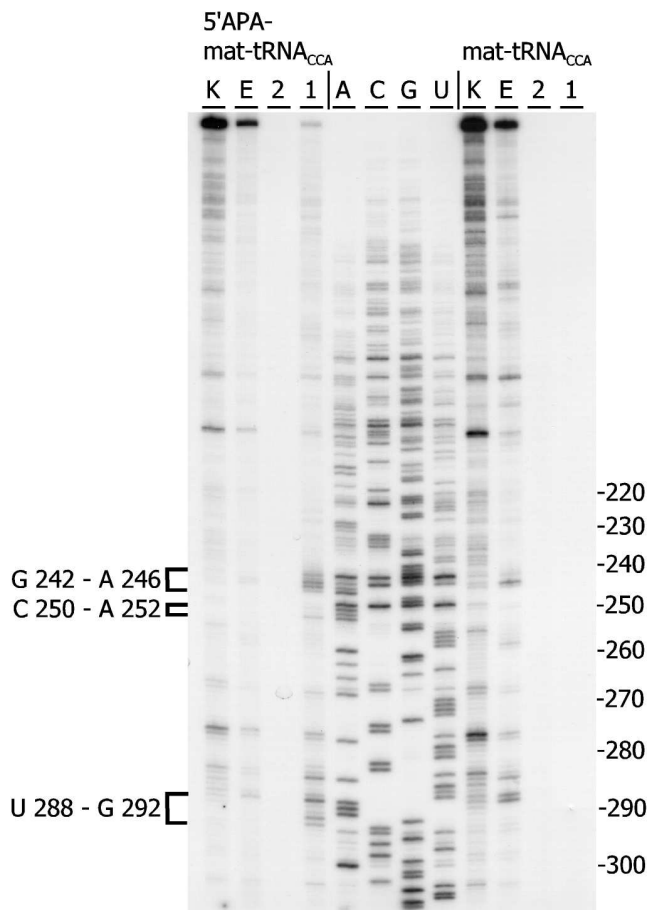


Abb. 4-48: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP8

Angegeben ist die jeweilige pre-tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

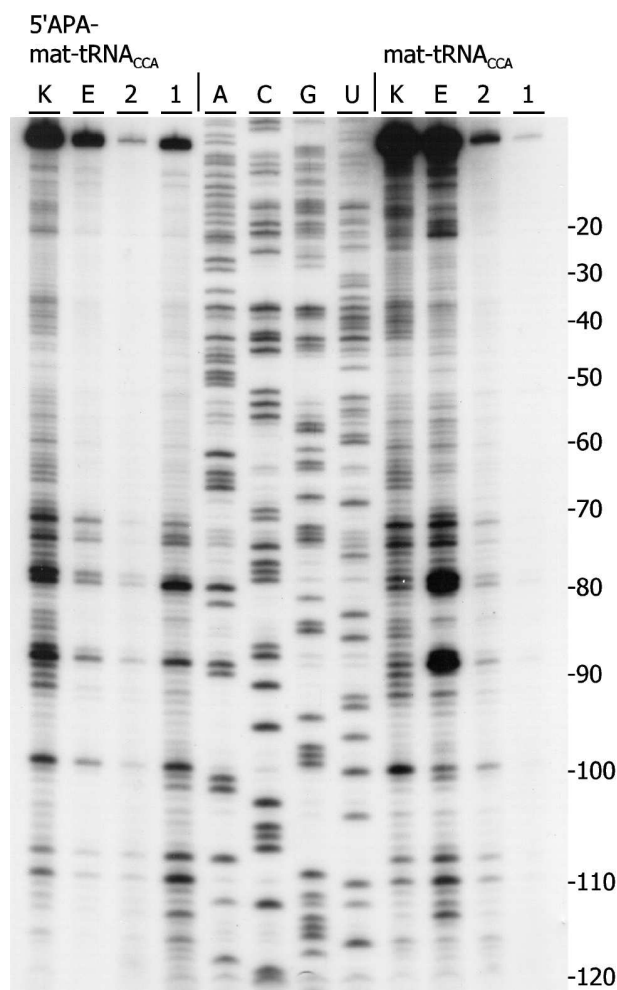


Abb. 4-49: Primer-Extension-Analyse von *P. marinus* Crosslinks mit dem Oligonukleotid PmGSP7

Angegeben ist die jeweilige pre-tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

(folgende Seite)

Tab. 4-2: Zusammenfassung aller vernetzten Nukleotide der *P. marinus* RNase P RNA

Aufgeführt sind für jedes verwendete Substrat die identifizierten Nukleotide mit der Position in der RNase P RNA-Sequenz, wobei die Größe der ausgefüllten Kreise die Signalstärke in den Primer-Extension-Analysen widerspiegelt. Horizontale Linien begrenzen zusammenhängende Bereiche, in denen Nukleotide identifiziert wurden. Nukleotide der einzelnen Bereiche, die nicht identifiziert wurden, sind nicht aufgeführt.

3'APA-pre-tRNA _{CdCsA}	3'APA-mat-tRNA _{CdCsA}	5'APA-pre-RNA _{CCA}	5'APA-mat-tRNA _{CCA}
Signalstärke; Nukleotid	Signalstärke; Nukleotid	Signalstärke; Nukleotid	Signalstärke; Nukleotid
● G 5 ● C 6			
● C 52 ● U 60 ● G 61 ● A 62 ● G 63	● C 45 ● U 48		
● U 69 ● C 70	● G 68 ● U 69	● A 66 ● G 68	
	● U 110 ● G 111 ● C 112	● C 112	
● G 242 ● U 243 ● G 244 ● C 245 ● A 246 ● G 249 ● C 250 ● A 251 ● A 252 ● A 253 ● G 254	● U 243 ● G 244 ● C 245 ● C 250 ● A 251 ● A 252	● C 250 ● A 251 ● A 252 ● A 253 ● G 254	● G 242 ● U 243 ● G 244 ● C 245 ● A 246 ● C 250 ● A 251 ● A 252
● A 260 ● G 265 ● A 266 ● C 268 ● A 269		● U 264 ● G 265 ● C 268 ● A 269	
● U 284 ● U 287 ● U 288 ● A 289 ● A 290 ● A 291 ● G 292	● U 287 ● U 288 ● A 289 ● A 290 ● A 291 ● G 292	● A 285 ● A 289 ● A 290 ● A 291 ● G 292	● U 288 ● A 289 ● A 290 ● A 291 ● G 292
● C 320 ● C 321 ● C 322 ● A 323 ● G 324 ● A 325 ● U 326 ● A 327 ● G 328 ● A 332	● C 313 ● C 316 ● C 320 ● C 321 ● C 322 ● A 323 ● G 324 ● A 325 ● U 326 ● A 327 ● G 328 ● A 332 ● U 333	● C 322 ● A 323 ● G 324 ● A 325 ● U 326 ● A 327 ● G 328	● C 322 ● A 323 ● G 324 ● A 325 ● U 326 ● A 327 ● G 328

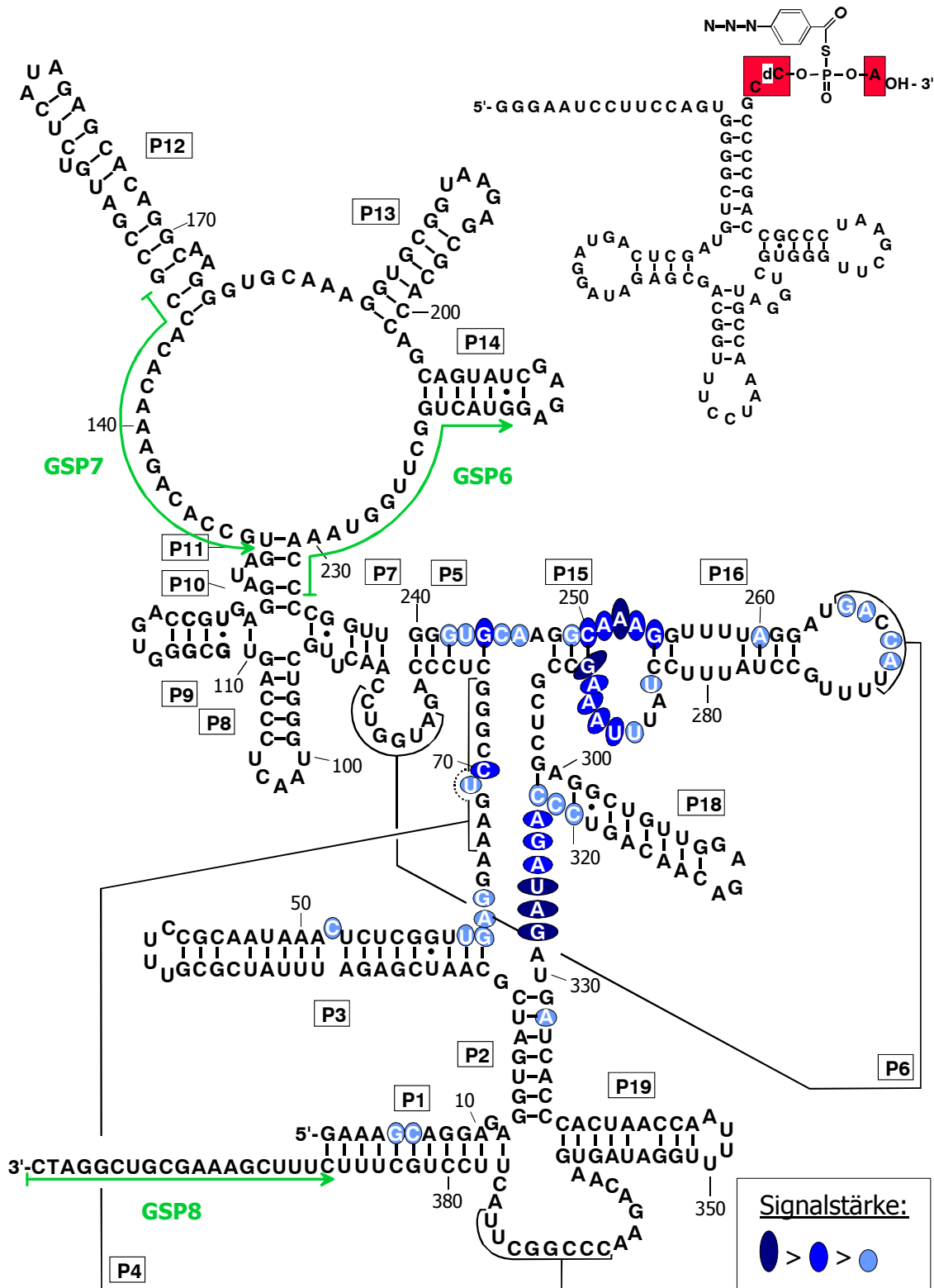


Abb. 4-50: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Crosslink-Reaktionen von *P. marinus* RNase P RNA mit 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA}

Im Sekundärstrukturmodell der RNase P RNA sind die identifizierten vernetzten Nukleotide mit blauen Ellipsen hinterlegt. Die Intensität der Signale der Primer-Extension-Analyse ist durch die Größe und Farbe der Ellipsen wiedergegeben. Die zur Analyse verwendeten Oligonukleotide sind eingezeichnet (grün). Rechts oben ist die Sekundärstruktur des verwendeten Substrates mit den Modifizierungen des 3'-CCA-Endes (rot unterlegt) gezeigt.

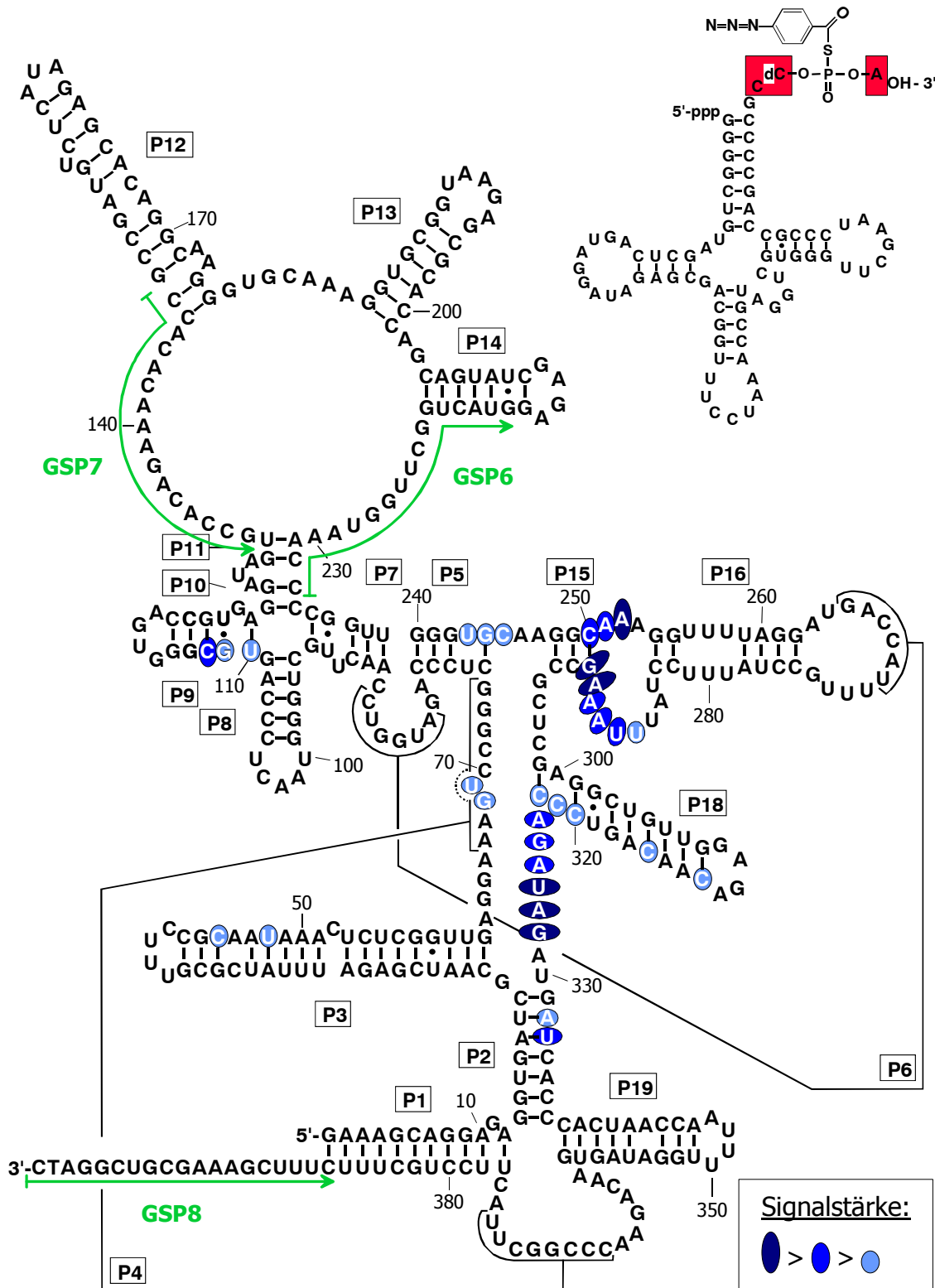


Abb. 4-51: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Crosslink-Reaktionen von *P. marinus* RNase P RNA mit 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA}

Im Sekundärstrukturmodell der RNase P RNA sind die identifizierten vernetzten Nukleotide mit blauen Ellipsen hinterlegt. Die Intensität der Signale der Primer-Extension-Analyse ist durch die Größe und Farbe der Ellipsen wiedergegeben. Die zur Analyse verwendeten Oligonukleotide sind eingezeichnet (grün). Rechts oben ist die Sekundärstruktur des verwendeten Substrates mit den Modifizierungen des 3'-CCA-Endes (rot unterlegt) gezeigt.

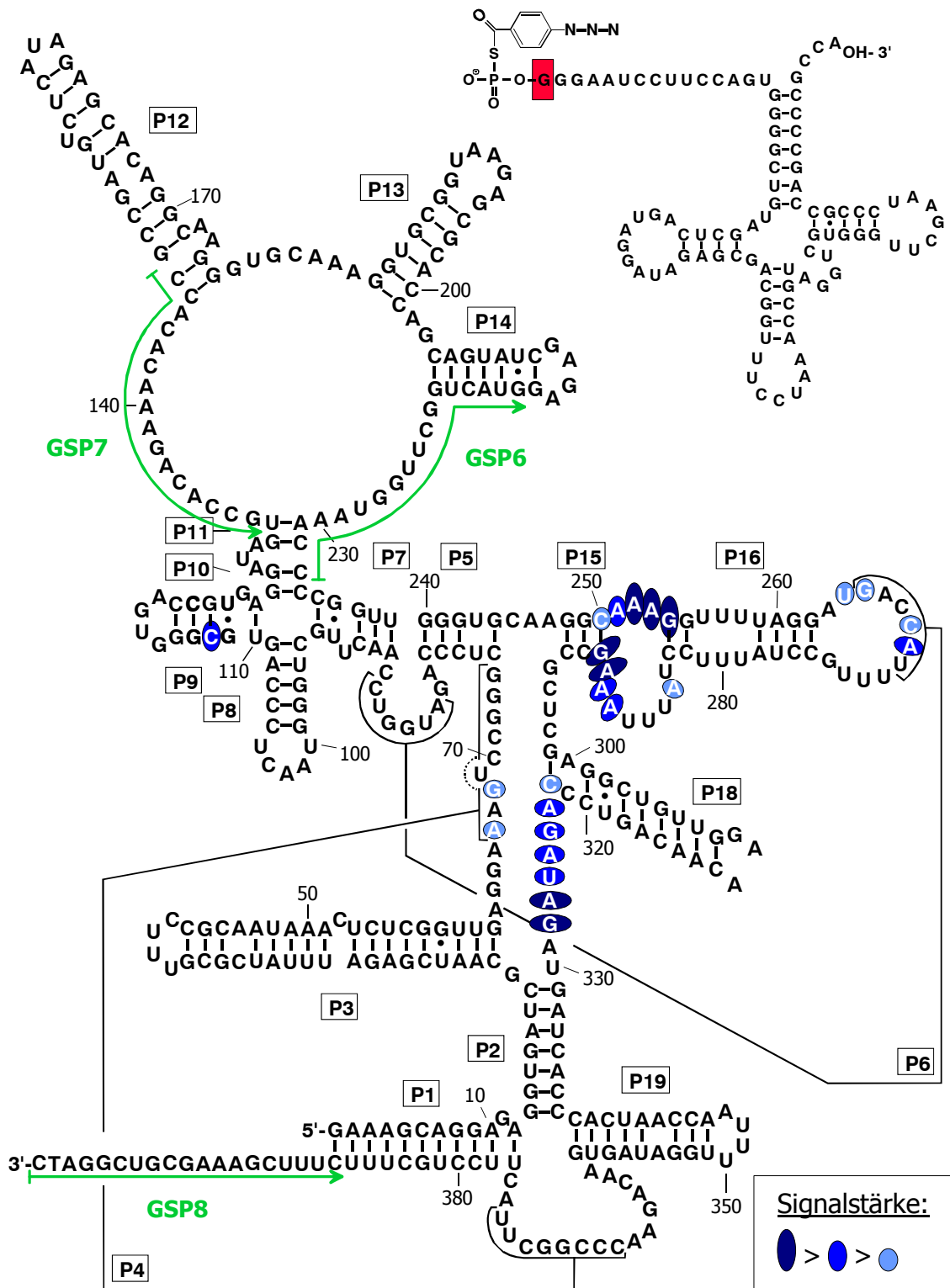


Abb. 4-52: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Crosslink-Reaktionen von *P. marinus* RNase P RNA mit 5'APA-pre-tRNA_{CCA}

Im Sekundärstrukturmodell der RNase P RNA sind die identifizierten vernetzten Nukleotide mit blauen Ellipsen hinterlegt. Die Intensität der Signale der Primer-Extension-Analyse ist durch die Größe und Farbe der Ellipsen wiedergegeben. Die zur Analyse verwendeten Oligonukleotide sind eingezeichnet (grün). Rechts oben ist die Sekundärstruktur des verwendeten Substrates mit den Modifizierungen des 5'-Nukleotides (rot unterlegt) gezeigt.

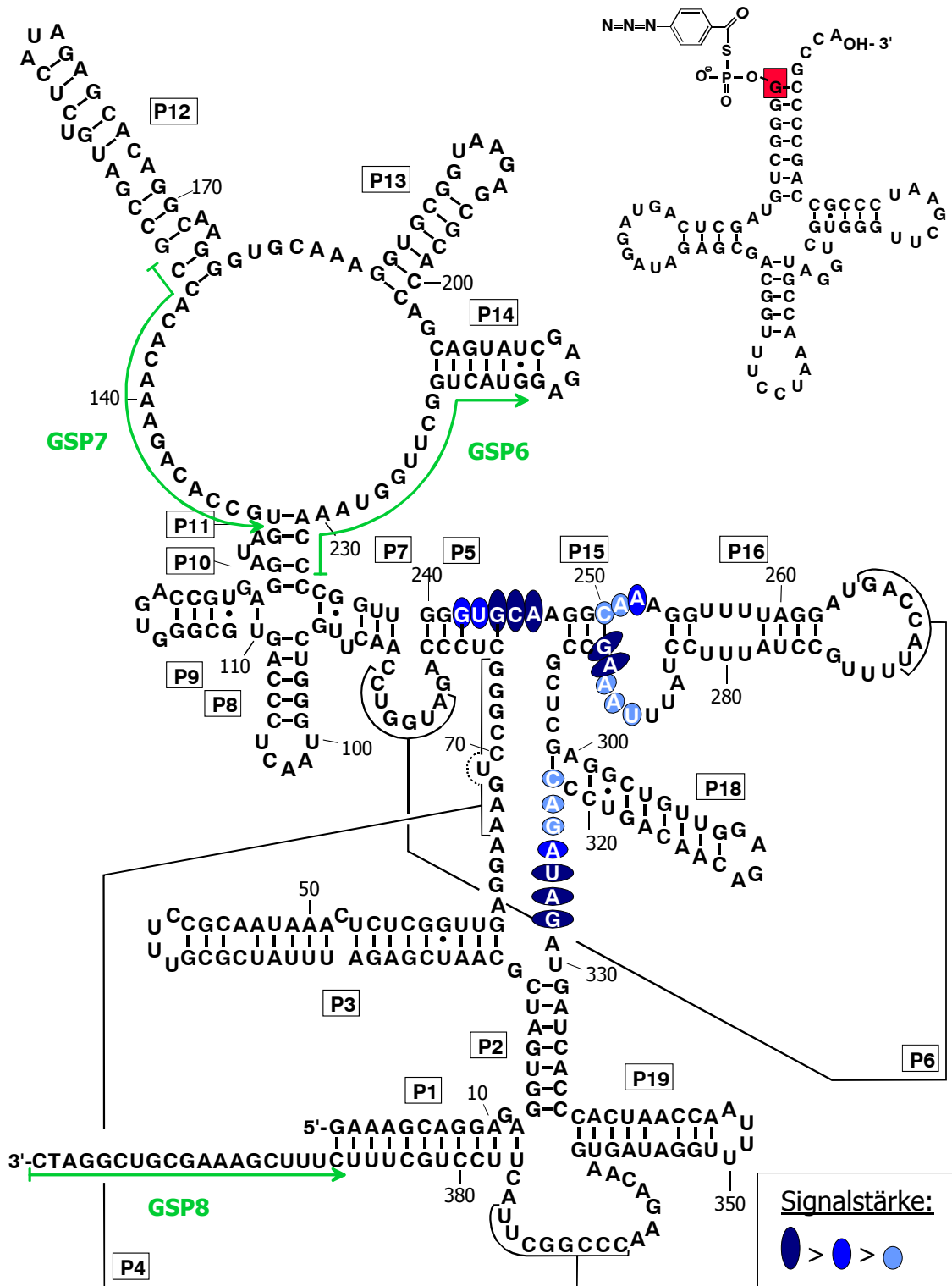


Abb. 4-53: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Crosslink-Reaktionen von *P. marinus* RNase P RNA mit 5'-APA-mat-tRNA_{CCA}

Im Sekundärstrukturmodell der RNase P RNA sind die identifizierten vernetzten Nukleotide mit blauen Ellipsen hinterlegt. Die Intensität der Signale der Primer-Extension-Analyse ist durch die Größe und Farbe der Ellipsen wiedergegeben. Die zur Analyse verwendeten Oligonukleotide sind eingezeichnet (grün). Rechts oben ist die Sekundärstruktur des verwendeten Substrates mit den Modifizierungen des 5'-Nucleotides (rot unterlegt) gezeigt.

4.9. Crosslink-Experimente mit pre-tRNA_{Cs²CA} und 3'APA-pre-tRNA_{Cs²CA}

Eine weitere Möglichkeit, die Kontaktstelle des 3'-CCA-Endes einer tRNA mit der RNase P RNA zu bestimmen, besteht in der Modifikation des 3'-Endes mit s²CTP. Dieses Nukleotid-Analogon ist wie s⁴UTP photochemisch anregbar und sollte deshalb ebenfalls für Crosslink-Experimente einzusetzen sein. Im sauren Milieu hat es zwei Absorptionsmaxima bei $\lambda_{\max} = 231$ nm bzw. 276 nm (Abb. 4-54), die allerdings im Bereich der energiereichen UV-Strahlung liegen.

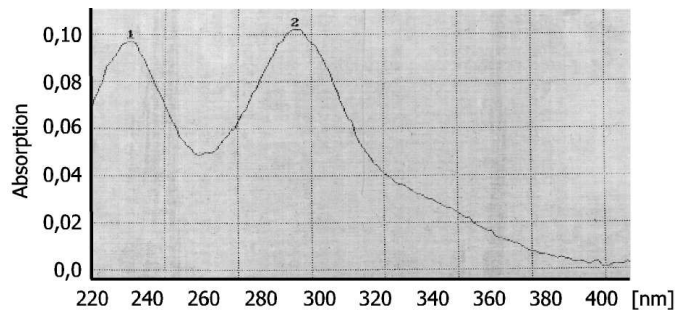


Abb. 4-54: Absorptionsspektrum von s²CTP

Gezeigt ist das Spektrum einer s²CTP-Lösung in Wasser/HCl. Aufgetragen ist die Wellenlänge (nm) gegen die Absorption.

1: Absorptionsmaximum bei 231 nm;

2: Absorptionsmaximum bei 276 nm

Die T7-Polymerase baut s²CTP nicht wie s⁴UTP in einer *in vitro* Transkription in RNAs ein. Deshalb wurde es mit Hilfe der Nukleotidyltransferase, welche s²CTP als Substrat erkennt, in das 3'-Ende der tRNA inseriert (Sprinzl *et al.*, 1977). Das Synthese-Produkt pre-tRNA_{Cs²CA} (4.5.4.) wurde analog zu APA-modifizierten tRNAs (4.8.) in Crosslink-Reaktionen mit *P. marinus* RNase P RNA eingesetzt (3.10.4.2.). Die Anregung des s²C wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm für 5-15 Minuten durchgeführt. Bei der Auftrennung des Reaktionsansatzes auf einem denaturierenden PAA-Gel zeigten sich aber keine spezifischen RNA-RNA-Komplexe. Lediglich unspezifische Banden, welche die erwartete Laufstrecke aufwiesen, fanden sich in identischer Form aber auch in den Kontrollansätzen wieder. Zusätzlich bewirkte die verwendete energiereiche Strahlung, dass die eingesetzten RNAs fast vollständig zerstört wurden. Auch die Verwendung von Strahlung mit der Wellenlänge 302 nm führte zu dem gleichen Ergebnis. Aus diesem Grund wurde die pre-tRNA_{Cs²CA} mit der APA-Gruppe am s²C modifiziert (4.7.4). Das Reaktionsprodukt 3'APA-pre-tRNA_{Cs²CA} wurde in Crosslink-Reaktionen (3.10.4.2.) eingesetzt. Trotz der räumlich flexibleren APA-Gruppe und der energieärmeren Bestrahlung bei 302 nm konnten auch mit dieser tRNA-Modifikation keine spezifischen RNA-RNA-Komplexe erhalten werden. Deshalb wurden s²CTP-modifizierte tRNAs nicht weiter in Crosslink-Reaktionen eingesetzt.

4.10. Crosslink-Experimente mit APA-s⁴U-RNase P RNA

Durch Anhängen von p-Azidophenacyl an die Thiocarbonyl-Gruppe des s⁴U wurde *P. marinus* APA-s⁴U-RNase P RNA erhalten (4.7.3). Mit dieser zusätzlichen Variante wurden parallel zu s⁴U-RNase P RNA (4.3.3.2) Crosslink-Experimente bei 302 nm durchgeführt. Bei der Auftragung der Reaktionsansätze auf PAA-Gele wurde bei beiden Reaktionstypen das identische Muster an spezifischen RNA-RNA-Komplexen gleicher Banden-Intensität gefunden. Diese Komplexe wurden

isoliert und aufgereinigt (3.10.4.2.). Bei den anschließenden Primer-Extension-Reaktionen ergaben die Analysen der RNase P- und der tRNA-Komponente jedoch keine besseren Ergebnisse als jene, die mit s^4U -RNase P RNA erhalten wurden. Weder auf der Seite der RNase P RNA noch bei der tRNA konnten in den Analysen vernetzte Nukleotide identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde APA- s^4U -RNase P RNA nicht weiter in Crosslink-Reaktionen eingesetzt.

4.11. Crosslink-Experimente mit *C. paradoxa* RNase P RNA

Baum und Schön (1996) konnten für die Cyanellen der *C. paradoxa* die erste RNA-Untereinheit einer RNase P aus photosynthetischen Organellen nachweisen. Diese RNA ist im Cyanellen-Genom codiert. Sowohl die Sequenz als auch die postulierte A-Typ 2D-Struktur der RNA zeigt große Homologien zu cyanobakteriellen RNase P RNAs. In Analogie zur Mehrzahl der Cyanobakterien, jedoch im Gegensatz zu den meisten anderen Bakteriengruppen, enthält die Cyanellen-RNase P RNA keine Bindungsstelle für das pre-tRNA 3'-CCA-Ende. Ihre Sequenz weicht an zwei sonst voll konservierten Positionen (A22; A213) vom bakteriellen Konsensus ab. Trotz der großen Ähnlichkeit der Cyanellen-RNase P-RNA zum Cyanobakterien-Typ zeigt *in vitro* synthetisierte RNA auch unter Hochsalzbedingungen keine Ribozym-Aktivität. Die Abweichung vom bakteriellen Ribozymkonsensus in den Positionen A22 und A213 ist hierfür nicht verantwortlich (Cordier, 1998; Heubeck, 2003). Das Fehlen des CCA-Bindungsmotivs in nahezu allen cyanobakteriellen RNase P-RNAs schließt eine hierdurch verhinderte Substratbindung als Grund für die fehlende Cyanellen-Ribozym-Aktivität ebenfalls aus (Hess *et al.*, 1998).

Aus diesem Grund sollte durch Crosslink-Experimente die Substratbindungsstelle der *C. paradoxa* RNase P RNA identifiziert werden. Die verschiedenen p-Azidophenacyl-modifizierten tRNA^{Arg}-Varianten, die erfolgreich im homologen *P. marinus*-System benutzt wurden (4.8.), sollten deshalb auch für diese Untersuchung eingesetzt werden.

4.11.1. Prozessierung von tRNA^{Arg} durch *C. paradoxa* RNase P RNA unter Crosslink-Bedingungen

Um zu überprüfen, wie sich die Crosslink-Bedingungen, die für das homologe *P. marinus*-System optimiert wurden (4.8.2.), auf die Prozessierungseigenschaften der *C. paradoxa* RNase P RNA auswirken, wurden Kinetiken durchgeführt. Das mit *Fok I* linearisierte Plasmid pT7CyRPR-wt wurde in einer präparativen T7-Transkription (3.4.3.) eingesetzt. Das aufgereinigte Transkript der *C. paradoxa* RNase P RNA wurde zusammen mit Transkript der *P. marinus* pre-tRNA^{Arg} in Prozessierungsansätzen eingesetzt. Die Konzentrationen (100 nM Enzym; 1000 nM Substrat) waren dabei den bei Crosslink-Experimenten verwendeten identisch. Als Reaktionspuffer wurde Bindungspuffer 6 (4.3.3.1.) mit Mg²⁺ anstelle von Ca²⁺ verwendet. Es zeigte sich allerdings auch nach einer Inkubation von 20 h keinerlei Prozessierungsaktivität der *C. paradoxa* RNase P RNA (Abb. 4-

55). Um eine möglicherweise geringfügig vorhandene Prozessierungsaktivität sichtbar zu machen, wurden in weiteren Ansätzen lediglich 20000 cpm an Substrat unter den gleichen Bedingungen eingesetzt. Aber auch hier zeigte sich keine Ribozymeigenschaft der RNase P RNA (Abb. 4-55).

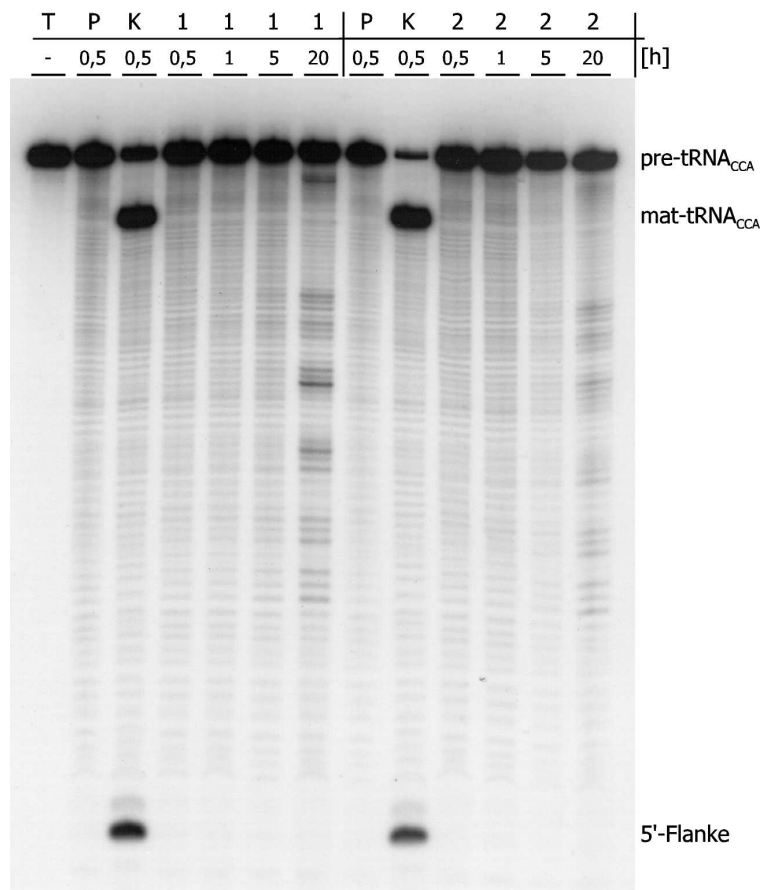


Abb. 4-55: Prozessierung von Arginin pre-tRNA_{CCA} mit *C. paradoxa* RNase P RNA unter Crosslink-Bedingungen

Gezeigt sind die Reaktionen von 1: *C. paradoxa* RNase P RNA (100 nM) und pre-tRNA (1000 nM; 20000 cpm) und 2: RNase P RNA (100 nM) und pre-tRNA (20000 cpm). Die Durchführung der Reaktion im Reaktionspuffer. (3 M NH₄OAc, 50 mM MOPS, 250 mM Ca(OAc)₂, pH 8,0) ist durch die Inkubationszeit (h) bei deren Auslassen durch – angegeben. Eine Prozessierungs-Kontrolle mit *P. marinus* RNase P RNA (K), Pufferkontrolle (P) und Transkriptkontrolle (T) sind angegeben. Am rechten Rand sind die Edukte und Produkte der Prozessierungs-Reaktionen gekennzeichnet.

4.11.2. Crosslink-Reaktion von *C. paradoxa* RNase P RNA mit APA-modifizierten tRNAs

Zur Untersuchung des Enzym-Substrat-Komplexes aus *C. paradoxa* RNase P RNA und tRNA^{Arg} wurden Crosslink-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden die synthetisierten Substrate 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA}, 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA} (4.7.2.), 5'APA-pre-tRNA_{CCA} und 5'APA-mat-tRNA_{CCA} (4.7.1.) verwendet. Durch die Positionierung der APA-Gruppe am 3'-CCA Ende sowie am 5'-Nukleotid von pre- und mat-tRNA können die erhaltenen Crosslink-Komplexe Aufschluss über die Positionierung der tRNA im Komplex geben. Die Bedingungen und die Durchführung der Crosslink-Reaktionen wurden analog zu den Crosslink-Reaktionen mit *P. marinus* RNase P RNA gewählt (4.8.3.).

Mit allen vier Substraten wurden unmittelbar spezifische RNA-RNA-Komplexe erhalten, die nur in Reaktionen auftraten, in denen die photosensitive APA-Gruppe vorhanden war (Abb. 4-56). Unspezifische Banden, die nur auf die Einwirkung des verwendeten UV-Lichtes zurückzuführen sind,

traten hingegen auch in den Kontrollreaktionen auf, in denen keine APA-Gruppe anwesend war. Da die Effizienz der spezifischen Komplex-Bildung nur bei den Substraten 3'APA-pre-tRNA_{CdCSA} und 5'APA-pre-tRNA_{CCA} groß genug war, wurde im Weiteren nur mit ihnen weiter gearbeitet. Die spezifischen Komplexe (Komplexe 1-2) wurden nach dem in Abb. 4-56 angegebenen Schema isoliert und aufgereinigt (3.10.4.2.).

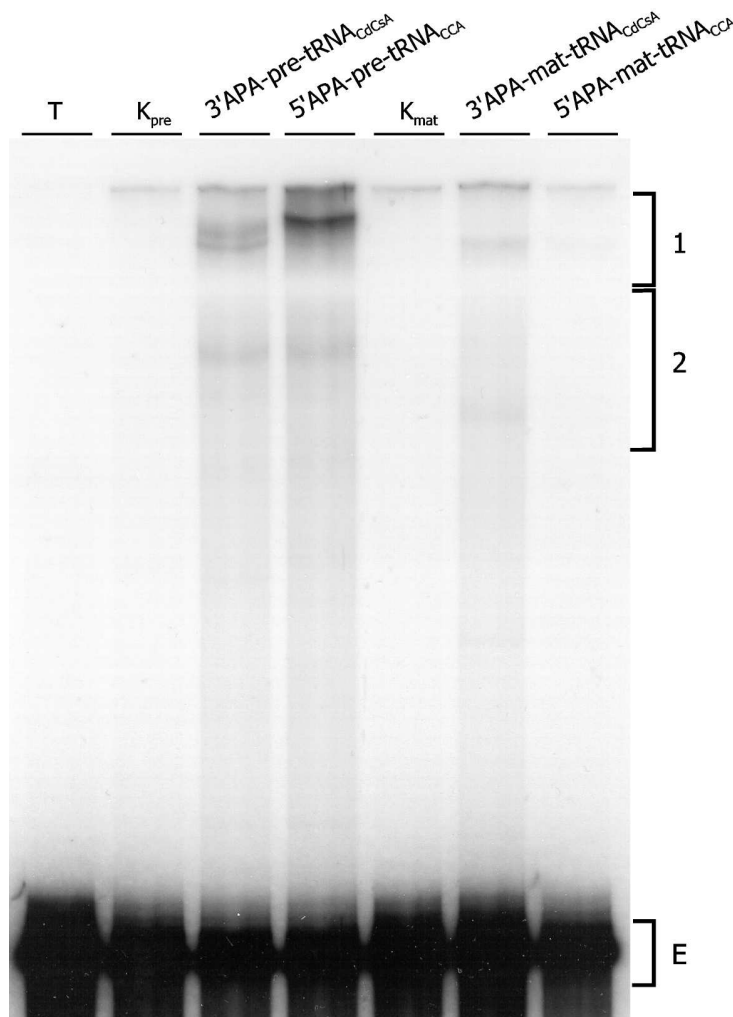


Abb. 4-56: Crosslink Reaktion von *C. paradoxa* RNase P RNA mit APA-modifizierten tRNAs

Gezeigt sind Crosslink-Reaktionen von RNase P RNA (100 nM; 200000 cpm) mit APA-modifizierten tRNAs (1000 nM) in Bindungspuffer 6. Die Crosslink-Reaktionen (302 nm; 5 min) mit den jeweiligen APA-modifizierten tRNAs sind beschriftet. Kontrollreaktionen (K) mit unmodifizierter tRNA (**pre**-tRNA_{CCA}, **mat**-tRNA_{CCA}) und eine RNase P RNA-Transkriptkontrolle (T) sind angegeben. Am rechten Rand sind die zur RNA-Isolierung ausgeschnittenen Bereiche (1, 2 und E) gekennzeichnet.

Da auf der Seite der tRNA-Komponenten durch die APA-Modifikationen die Position der Vernetzungsstellen gegeben ist, wurde ausschließlich die RNase P RNA der entsprechenden Komplexe mittels Primer-Extension-Analyse auf die jeweiligen vernetzten Nukleotide hin untersucht (3.5.3.). Dafür wurden hauptsächlich die Oligonukleotide CyGSP2, CyGSP6 und CyGSP7 verwendet. Die Oligonukleotide CyGSP8 und CyCprpOL waren weniger effizient, so dass sie keine weitergehende Verwendung fanden.

Als Kontrollen wurden neben der isolierten Eduktbande der Crosslink-Reaktion (Bande E) auch unbehandelte Transkripte von RNase P RNA in die Primer-Extension eingesetzt. Durch den Signal-Vergleich zwischen den Kontrollen (natürliche und induzierte Strangbrüche) und den Komplexen lassen sich so Vernetzungsstellen lokalisieren. Von jedem verwendeten Substrat wurden mit den Oligonukleotiden jeweils 2-3 Datensätze ermittelt, von denen einige exemplarisch gezeigt sind (Abb. 4-57 – 4-61). Die identifizierten vernetzten Nukleotide der RNase P RNA sind in Tab. 4-4 und in

Sekundärstruktur-Darstellungen für jedes verwendete Substrat zusammengefasst (Abb. 4-62 – 4-63). Für eine bessere Übersichtlichkeit der folgenden Abbildungen sind diese in Tab. 4-3 aufgeführt.

Substrat	Oligonukleotid	Abbildung	Zusammenfassung
3' APA-pre-tRNA _{CdCsA}	CyGSP6	4-57	Tab. 4-4; Abb. 4-62
	CyGSP7	4-58; 4-59	
	CyGSPs	4-60; 4-61	
5' APA-pre-tRNA _{CCA}	CyGSP6	4-57	Tab. 4-4; Abb. 4-63
	CyGSP7	4-58; 4-59	
	CyGSP8	4-60; 4-61	

Tab. 4-3: Übersicht über Abbildungen der *C. paradoxa* Crosslink-Reaktionen

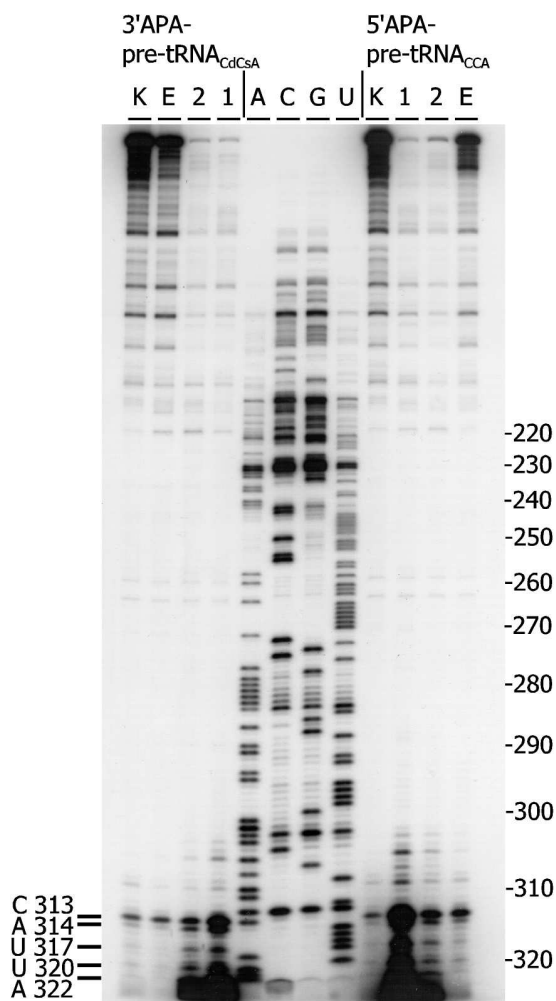


Abb. 4-57: Primer-Extension-Analyse von *C. paradoxa* Crosslinks mit dem Oligonukleotid CyGSP6

Angegeben ist die jeweilige APA-modifizierte tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

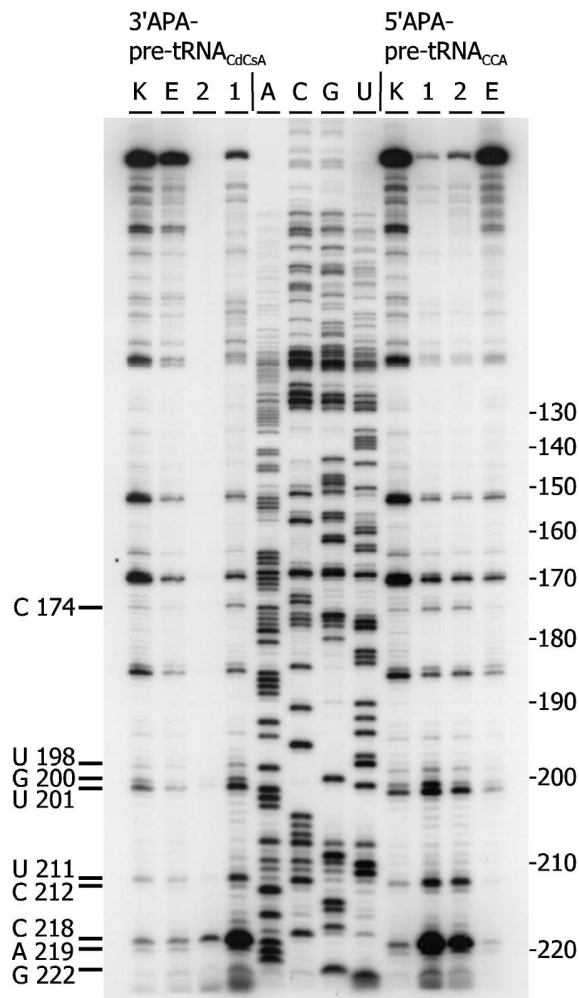


Abb. 4-58: Primer-Extension-Analyse von *C. paradoxa* Crosslinks mit dem Oligonukleotid CyGSP7

Angegeben ist die jeweilige APA-modifizierte tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

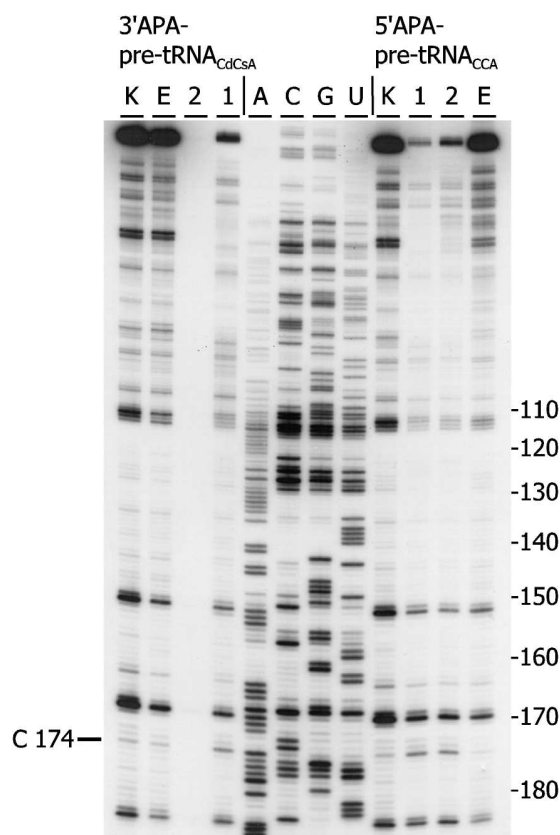


Abb. 4-59: Primer-Extension-Analyse von *C. paradoxa* Crosslinks mit dem Oligonukleotid CyGSP7

Angegeben ist die jeweilige APA-modifizierte tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nukleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

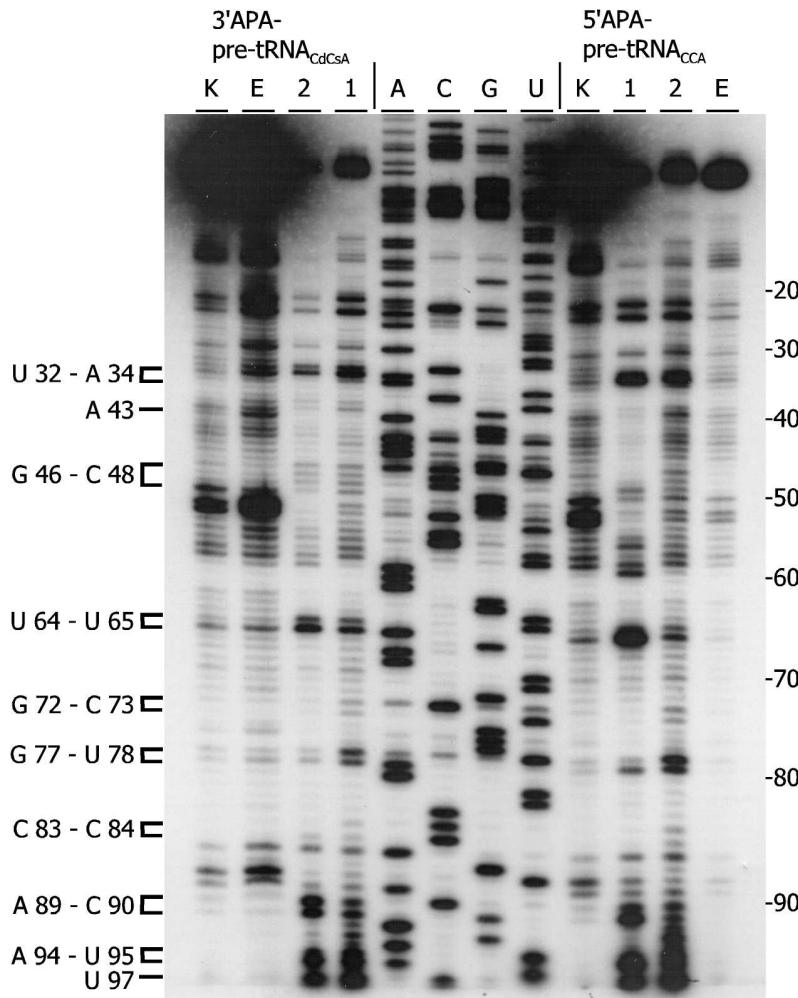


Abb. 4-60: Primer-Extension-Analyse von *C. paradoxa* Crosslinks mit dem Oligonukleotid CyGSP2

Angegeben ist die jeweilige APA-modifizierte tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nucleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

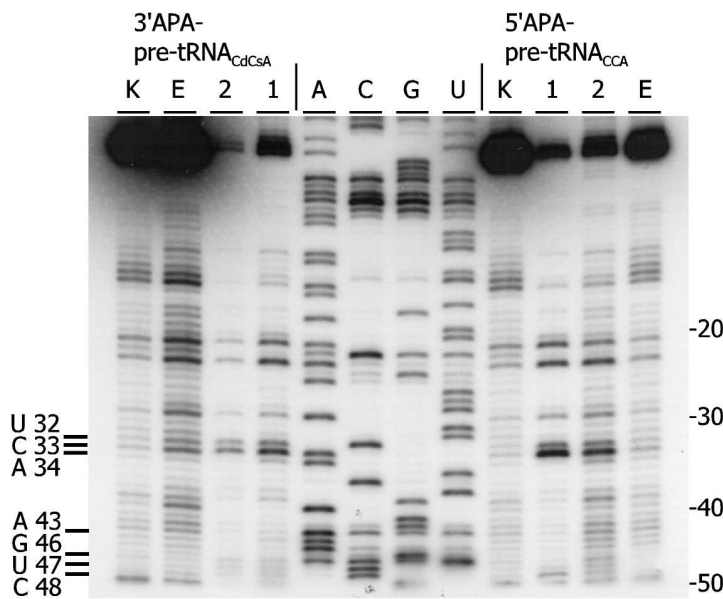


Abb. 4-61: Primer-Extension-Analyse von *C. paradoxa* Crosslinks mit dem Oligonukleotid CyGSP2

Angegeben ist die jeweilige APA-modifizierte tRNA, die zur Crosslink-Reaktion eingesetzt wurde. Die Analyse der eluierten Crosslink-Komplexe (1, 2), der eluierten Crosslink-Eduktbande (E) und Kontrollreaktion mit unbehandeltem Transkript (K) sind beschriftet. Mittig ist eine Sequenzierreaktion aufgetragen, welche die RNA-Sequenz angibt (A, C, G, U). Die Zahlen am seitlichen Rand geben die Position in der RNA-Sequenz des Transkriptes an. Eindeutige Vernetzungsstellen der RNA sind an der Seite mit dem entsprechenden Nucleotid und dessen Position in der RNA-Sequenz markiert.

3'APA-pre tRNA _{CdCsA}	5'APA-pre tRNA _{CCA}	3'APA-pre tRNA _{CdCsA}	5'APA-pre tRNA _{CCA}
Signalstärke; Nukleotid	Signalstärke; Nukleotid	Signalstärke; Nukleotid	Signalstärke; Nukleotid
● U 32	● U 26	● U 198	● U 198
● C 33	● U 28	● G 200	● G 200
● A 34	● U 32	● U 201	● U 201
● A 43	● C 33	● U 211	● U 211
● G 46	● A 34	● C 212	● C 212
● U 47	● A 43	● G 215	● G 215
● C 48	● G 46	● A 216	● A 216
● U 64	● U 58	● C 218	● C 218
● U 65	● U 64	● A 219	● A 219
● G 72	● U 65	● G 222	● G 222
● C 73	● G 72	● U 223	● U 223
● G 77	● C 73	● U 224	● U 224
● U 78	● G 77	● U 225	● U 225
● C 83	● U 78	● C 313	● C 313
● C 84	● C 83	● A 314	● A 314
● A 89	● C 84	● U 317	● U 317
● C 90	● A 89	● U 318	● U 318
● G 91	● C 90	● A 319	● A 319
● A 92	● G 91	● U 320	● U 320
● G 93	● A 92	● A 322	● A 322
● A 94	● G 93	● A 323	● A 323
● U 95	● A 94	● C 324	● C 324
● U 97	● U 95		
	● U 97		

Tab. 4-4: Zusammenfassung aller vernetzten Nukleotide der *C. paradoxa* RNase P RNA

Aufgeführt sind für jedes verwendete Substrat die identifizierten Nukleotide mit der Position in der RNase P RNA-Sequenz, wobei die Größe der ausgefüllten Kreise die Signalstärke in den Primer-Extension-Analysen widerspiegelt. Horizontale Linien begrenzen zusammenhängende Bereiche, in denen Nukleotide identifiziert wurden. Nukleotide der einzelnen Bereiche, die nicht identifiziert wurden, sind nicht aufgeführt.

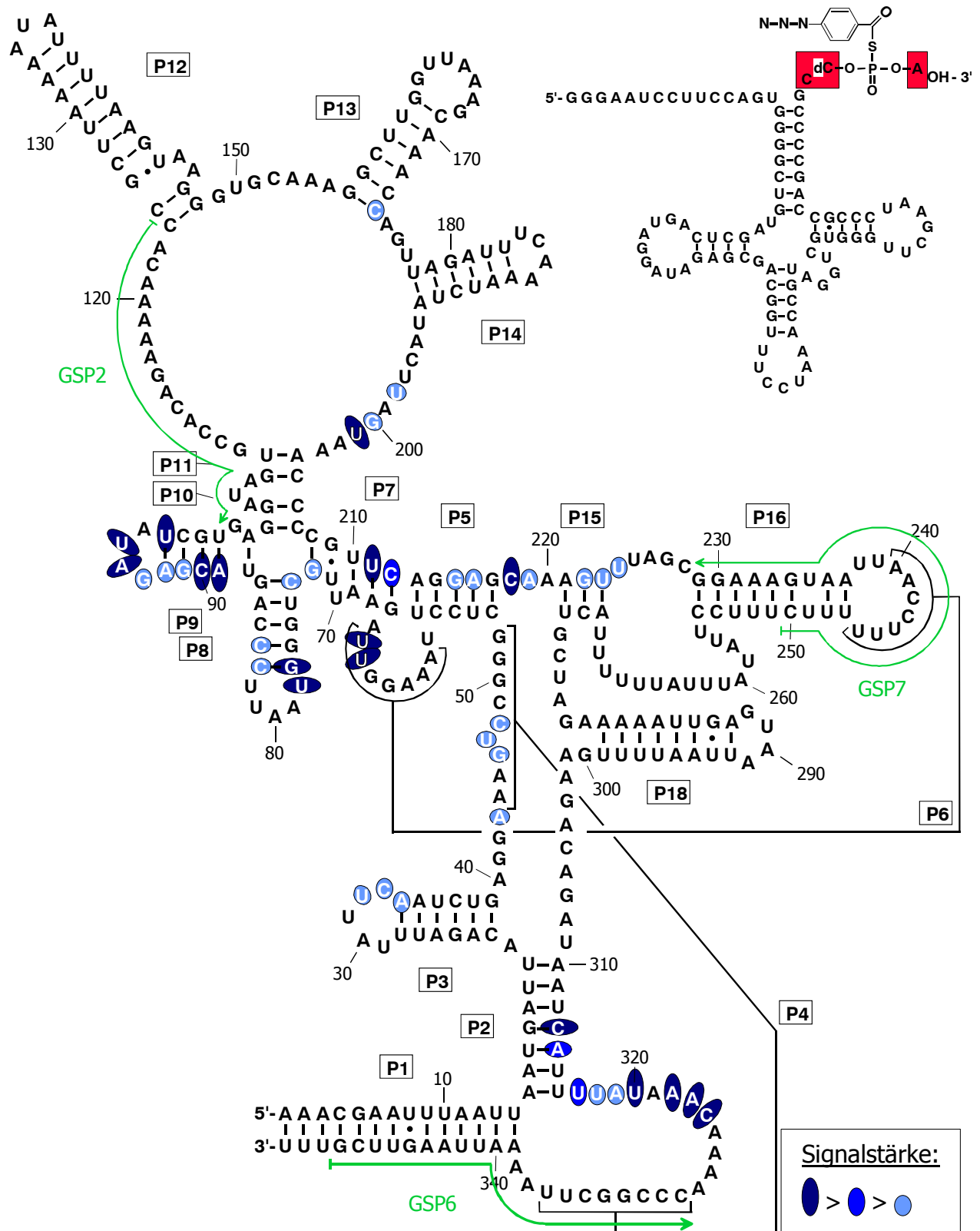


Abb. 4-62: Zusammenfassung der Ergebnisse der Crosslink-Reaktionen von *C. paradoxa* RNase P RNA mit 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA}

Im Sekundärstrukturmodell der RNase P RNA sind die identifizierten vernetzten Nukleotide mit blauen Ellipsen hinterlegt. Die Intensität der Signale der Primer-Extension-Analyse ist durch die Größe und Farbe der Ellipsen wiedergegeben. Die zur Analyse verwendeten Oligonukleotide sind eingezeichnet (grün). Rechts oben ist die Sekundärstruktur des verwendeten Substrates mit den Modifizierungen des 3'-CCA-Endes (rot unterlegt) gezeigt.

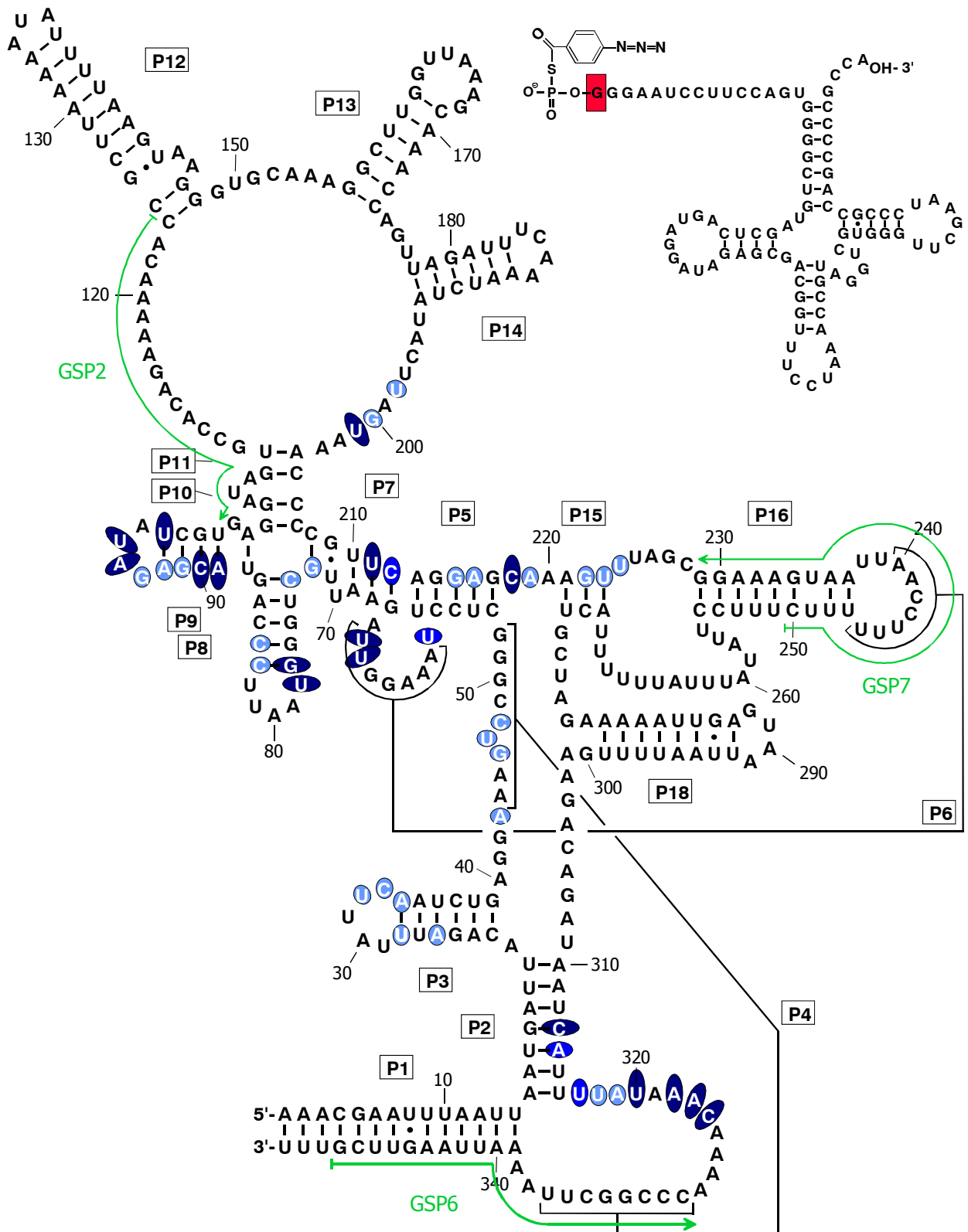


Abb. 4-63: Zusammenfassung der Ergebnisse der Crosslink-Reaktionen von *C. paradoxa* RNase P RNA mit 5'APA-pre-tRNA_{CCA}

Im Sekundärstrukturmodell der RNase P RNA sind die identifizierten vernetzten Nucleotide mit blauen Ellipsen hinterlegt. Die Intensität der Signale der Primer-Extension-Analyse ist durch die Größe und Farbe der Ellipsen wiedergegeben. Die zur Analyse verwendeten Oligonucleotide sind eingezeichnet (grün). Rechts oben ist die Sekundärstruktur des verwendeten Substrates mit den Modifizierungen des 5'-Nucleotides (rot unterlegt) gezeigt.

4.12. Qualitativer Nachweis von Thioketonen und Thiolen in RNA

Durch den Spot Test nach Feigl (3.11.3.) kann qualitativ das Vorhandensein von Thioketonen und Thiolen als funktionelle Gruppe in organischen Molekülen nachgewiesen werden. Diese Möglichkeit wurde auf die einzelnen Stufen der in dieser Arbeit synthetisierten RNAs, die durch die Verwendung der Nukleotide $s^4\text{UTP}$, GMPS, $\text{ATP}\alpha\text{S}$ und $s^2\text{CTP}$ diese funktionellen Gruppen enthalten, angewendet. In Abb. 4-64 sind exemplarisch pro Zeile einzelne Synthesewege dokumentiert. Das Vorhandensein der Thioketon- und Thiol-Gruppen in den modifizierten RNAs wurde mit diesem Test bereits im analytischen Maßstab (0,08-1,4 nmol RNA; Abb. 4-64) eindeutig belegt, indem zu einem vorgelegten Volumen von 400-600 μl der Iod-Azid-Lösung 1-20 μl der Probenlösung zugegeben wurden. Die weitergehende Modifizierung dieser Thio-Gruppen durch die APA-Gruppe unterdrückt hingegen die Reaktion mit der Jod-Azid-Lösung nicht vollständig. Entweder verläuft diese Modifizierung nicht quantitativ, oder die Thio-Gruppen bleiben weiterhin für eine Reaktion mit der Jod-Azid-Lösung zugänglich. Eine deutliche Verringerung der Gasentwicklung ist allerdings zu beobachten, so dass auch für diesen Syntheseschritt eine qualitative Aussage über die Effizienz gemacht werden kann.

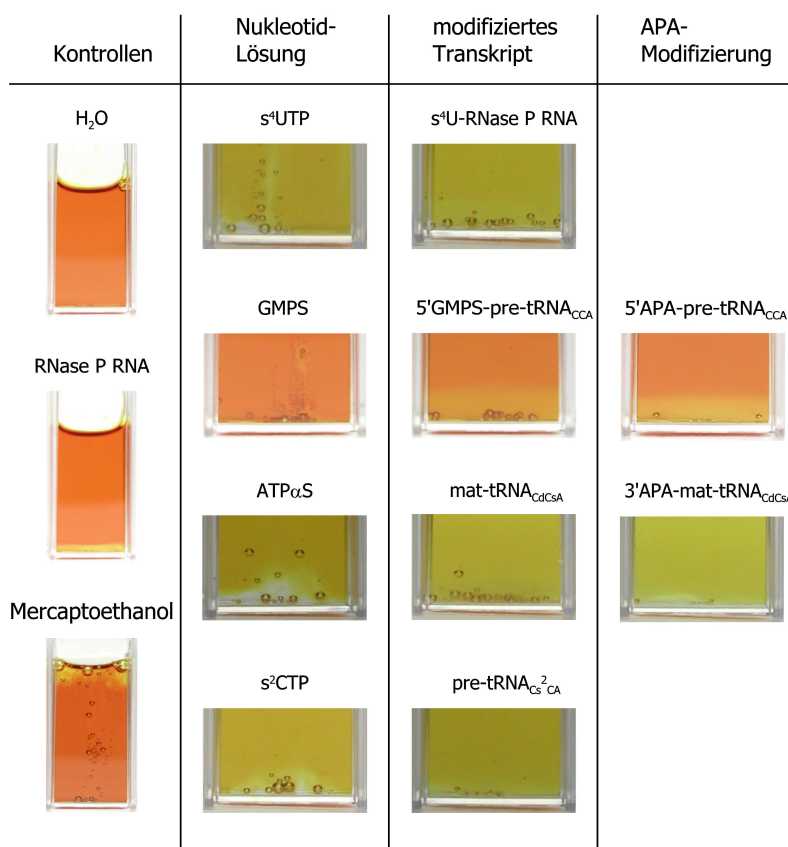


Abb. 4-64: Nachweis von Thioketonen und Thiolen durch den Spot-Test nach Feigl

Gezeigt sind Reaktionen der in Synthesen verwendeten Nukleotide $s^4\text{UTP}$ (10 nmol), GMPS (50 nmol), $\text{ATP}\alpha\text{S}$ (10 nmol) und $s^2\text{CTP}$ (10 nmol). Die Reaktionen der jeweiligen Synthese-Produkte $s^4\text{U-RNase P RNA}$ (0,08 nmol), 5'GMPS-pre-tRNA_{CCA} (0,66 nmol), mat-tRNA_{CdCSA} (1,4 nmol) und pre-tRNA_{CS²CA} (0,2 nmol) und die durch Modifizierung mit APA-Br erhaltenen RNAs 5'APA-pre-tRNA_{CCA} (0,23 nmol) und 3'APA-mat-tRNA_{CdCSA} (0,2 nmol). Als Kontrolle sind Reaktionen mit Wasser, unmodifiziertem RNase P RNA-Transkript (0,15 nmol) und Mercaptoethanol (0,14 μmol) gezeigt.

4.13. Modelling der 3D-Strukturen von *P. marinus* RNase P RNA und tRNA^{Arg}

Da die RNase P RNA aus *P. marinus* eine Sekundärstruktur vom Typ A aufweist (Gimple, 1999) sollte ein Vorschlag für ihre dreidimensionale Struktur auf der Basis von *E. coli* RNase P RNA (Typ A) ermittelt werden.

Ausgehend von der publizierten 3D Struktur der *E. coli* RNase P RNA (Abb. 4-65), welche aufgrund von Sequenz-Alignments und experimentellen Crosslink-Daten erstellt wurde (Massire *et al.*, 1998), sowie der Kristallstruktur von Hefe tRNA^{Asp} (Abb. 4-67; Westhof, 1985) wurden die 3D-Strukturen von *P. marinus* RNase P RNA (Abb. 4-66) und des in dieser Arbeit verwendeten Substrates tRNA^{Arg} (Abb. 4-68) mit dem Programm ERNA-3D manuell modelliert (3.14.). Eine weitergehende Optimierung der Strukturen durch Energieminimierung war allerdings nicht möglich.

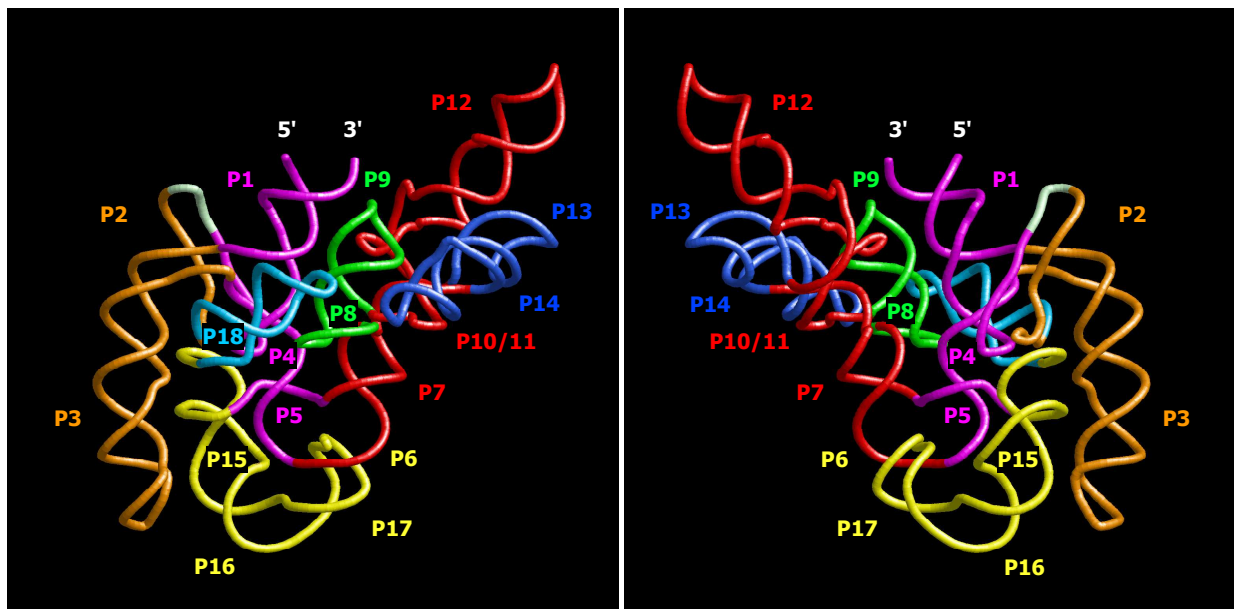


Abb. 4-65: 3D Modell von *E. coli* RNase P RNA

Gezeigt ist die Backbone-Darstellung der Struktur (Massire *et al.*, 1998). In der Ansicht von Vorder- und Rückseite sind die Helices und strukturell zusammenhängende Bereiche durch die Farben pink (P1, P4, P5), orange (P2, P3), gelb (P6, P15, P16, P17), rot (P7, P10/11, P12), grün (P8, P9), blau (P13, P14) und cyan (P18) gekennzeichnet. Die postulierte Position der in *E. coli* nicht vorhandenen Helix P19 ist mintgrün dargestellt.

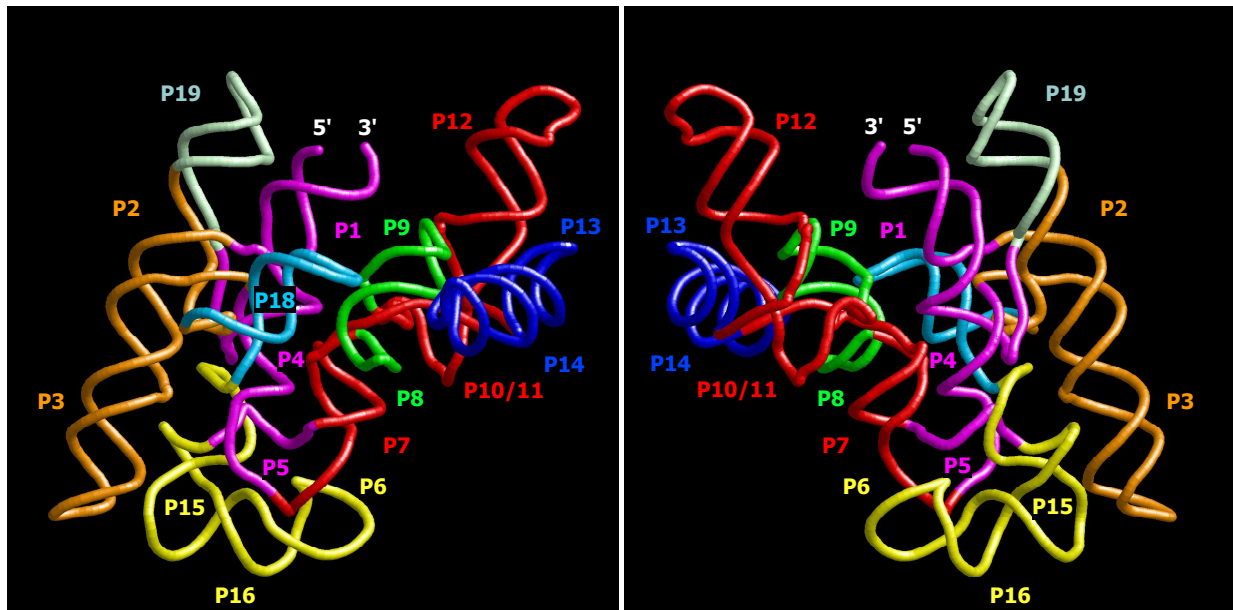


Abb. 4-66: 3D Modell von *P. marinus* RNase P RNA

Gezeigt ist die Backbone-Darstellung der mit ERNA-3D erzeugten Struktur. In der Ansicht von Vorder- und Rückseite sind die Helices und strukturell zusammenhängende Bereiche durch die Farben pink (P1, P4, P5), orange (P2, P3), gelb (P6, P15, P16), rot (P7, P10/11, P12), grün (P8, P9), blau (P13, P14), cyan (P18) und mintgrün (P19) gekennzeichnet.

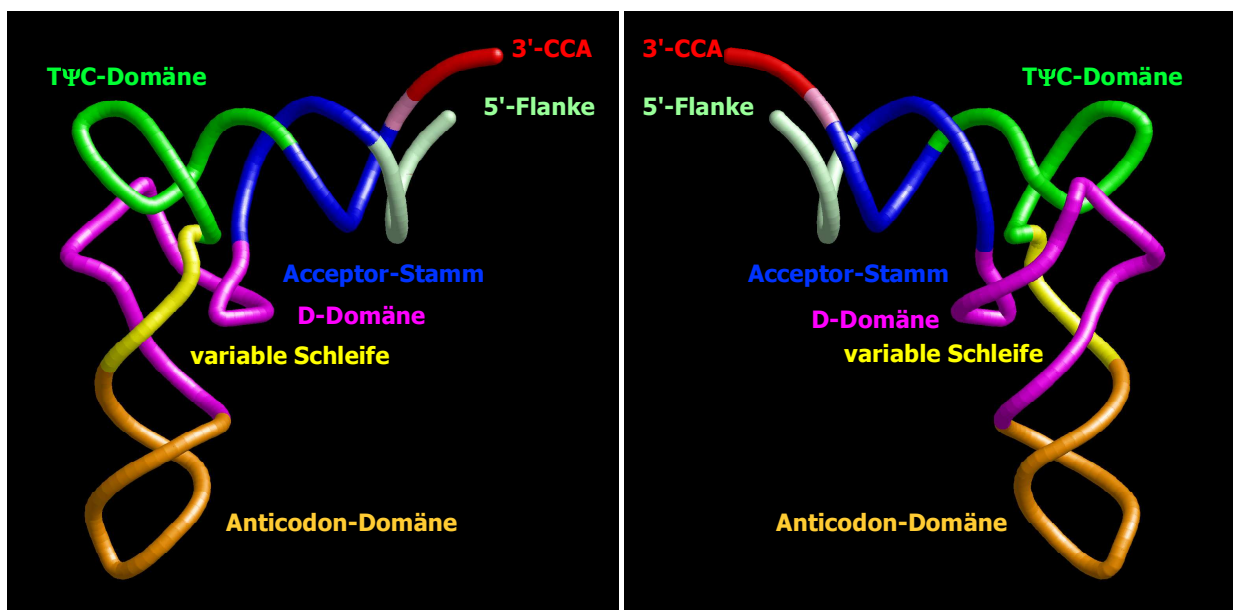


Abb. 4-67: 3D Modell von Hefe pre-tRNA^{Asp}

Gezeigt ist die Backbone-Darstellung der Struktur (Westhof, 1985; Massire *et al.*, 1998). In der Ansicht von Vorder- und Rückseite sind die einzelnen Domänen durch die Farben mintgrün (5'-Flanke), blau (Acceptor-Stamm), pink (D-Domäne), orange (Anticodon-Domäne), gelb (variable Schleife), grün (TΨC-Domäne), hellrot (Diskriminator-Base) und rot (3' CCA-Ende) dargestellt.

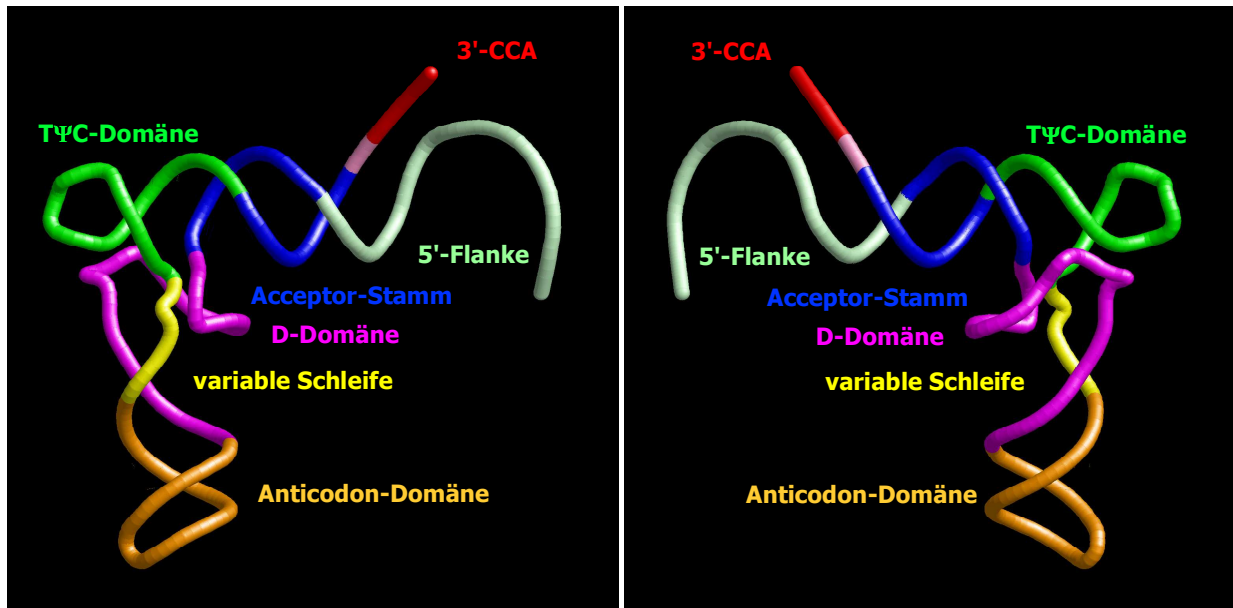


Abb. 4-68: 3D Modell von *P. marinus* pre-tRNA^{Arg}

Gezeigt ist die Backbone-Darstellung der mit ERNA-3D erzeugten Struktur. In der Ansicht von Vorder- und Rückseite sind die einzelnen Domänen durch die Farben mintgrün (5'-Flanke), blau (Acceptor-Stamm), pink (D-Domäne), orange (Anticodon-Domäne), gelb (variable Schleife), grün (TΨC-Domäne), hellrot (Diskriminator-Base) und rot (3'CCA-Ende) gekennzeichnet.

5. Diskussion

Das ubiquitär vorkommende magnesium-abhängige Enzym Ribonuklease P (RNase P) ist für die 5'-Reifung der Vorläufer-tRNA (pre-tRNA) verantwortlich. Die essentielle Endonuklease hydrolysiert die Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Flanke und reifer tRNA des tRNA-Primärtranskriptes (Altman, 1971; Robertson *et al.*, 1972). Das bakterielle Holoenzym besteht aus einer Protein- und einer RNA-Untereinheit. *In vitro* ist die RNA bei hohen Ionenstärken in der Lage, als *trans*-agierendes Ribozym zu fungieren (Guerrier-Takada *et al.*, 1983).

Für diese Arbeit war die Frage nach der Substratbindungsstelle von RNase P RNA aus Cyanobakterien und Cyanellen der Ausgangspunkt. Die Untersuchung der RNase P RNA aus *Prochlorococcus marinus* CCMP1375, die *in vitro* katalytische Aktivität zeigt, und RNase P RNA aus den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa*, welche keine Ribozymeigenschaft aufweist, sollten hierüber Aufschluss bringen.

5.1. RNase P RNA aus *Prochlorococcus marinus* CCMP1375

Die Sekundärstruktur der RNase P RNA von *P. marinus* gehört zum Typ A (Abb. 1-2), was durch chemische und enzymatische Strukturuntersuchungen belegt ist (Gimple, 1999). In Übereinstimmung mit tRNA-Genen von Cyanobakterien und Plastiden ist, im Unterschied zu denen aus *E. coli*, das 3'-CCA-Ende nicht codiert. Die RNase P RNA besitzt konsequenterweise in der asymmetrischen Schleife zwischen P15 und P16, die durch J15/16 und J16/15 gebildet wird, wie die meisten Cyanobakterien kein 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv für das 3'-CCA-Ende der Substrate (Abb. 1-14).

Unter *in vitro* Bedingungen zeigt die RNase P RNA katalytische Aktivität. Allerdings werden hierzu hohe Konzentrationen an Mg^{2+} (250 mM MgCl) und monovalenten Kationen (2-3 M NH_4Cl) benötigt. Zusätzlich ist das Vorhandensein des 3'-CCA-Endes der tRNAs die Voraussetzung für eine effiziente Substraterkennung und Reifung. Diese Erkenntnis wurde allerdings ausschliesslich in heterologen Prozessierungssystemen mit *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} und Chloroplasten pre-tRNA^{Glu} gewonnen (Hess *et al.*, 1998). So zeigte eine Mutante (ΔCCA) von pre-tRNA^{Glu}, bei der das 3'-CCA-Ende fehlt, kaum messbare Produktbildung. Auch mit dem ungewöhnlichen Substrat pre-tmRNA aus *C. paradoxa* wurde bevorzugt das Substrat mit 3'-CCA-Ende prozessiert (Gimple, 1999). Diese Spezifität für pre-tRNA-Substrate mit korrektem 3'-CCA-Ende wurde auch für RNase P RNA des Cyanobakteriums *Prochlorococcus hollandica* festgestellt. Dieses Cyanobakterium besitzt allerdings im Gegensatz zu *P. marinus* das 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv in J15/16 (Fingerhut und Schön, 1998).

Im Gegensatz hierzu stehen kinetische Untersuchungen des Cyanobakteriums *Synechocystis* 6803. Die RNase P RNA weist wie bei den meisten Cyanobakterien eine vergrößerte interne Schleife J15/16 auf, in der allerdings, wie nur in wenigen Cyanobakterien, das 5'-GGU-3' Bindungsmotiv vorhanden ist. Für diese RNase P RNA konnte in homologen Prozessierungssystemen mit *Synechocystis* pre-

tRNA^{Gln} und pre-tRNA^{Glu} festgestellt werden, dass für Substrate ohne 3'-CCA eine höhere Spezifität vorliegt, so dass diese bevorzugt prozessiert werden (Vioque, 1997; Pascual und Vioque, 1999).

5.2. Substratspezifität von *P. marinus* RNase P RNA

5.2.1. Synthese von Transkriptionsklonen

Um die Substratspezifität der *P. marinus* RNase P erstmals im homologen System zu untersuchen, wurde als Substrat tRNA^{Arg}_{CCU} gewählt (1.4.1.1.).

Da der Einfluss des 3'-CCA-Endes des Substrates von Interesse ist, wurden zwei T7-Transkriptionsklone der tRNA^{Arg}_{CCU} hergestellt (pPmtRNAArg1, pPmtRNAArg2), die durch Enzymvariation (*Hga* I, *Fok* I, *Bst* NI) bei der Restriktionshydrolyse der Plasmide nach einer anschließenden run-off-T7-Transkription unterschiedliche 3'-Enden der resultierenden Transkripte aufweisen (4.1.1.) und alle eine 5'-Flanke von 15 nt der genomischen Sequenz enthalten. Mit diesen Transkriptionsklonen können somit die *in vitro*-Transkripte pre-tRNA_{CCA}, pre-tRNA_{CC}, pre-tRNA_C und pre-tRNA_{ΔCCA} synthetisiert werden.

Um auch die Bindung der reifen tRNAs zu untersuchen, wurden ausgehend von diesen Transkriptionsklonen durch Deletion der 5'-Flanke der tRNAs die Plasmide pPmtRNAArg3 und pPmtRNAArg4 gewonnen (4.1.2.). Abgesehen vom Fehlen der 5'-Flanke, weisen sie am 3'-Ende des tRNA-Gens dieselbe Anordnung der Restriktionsschnittstellen für *Hga* I, *Fok* I und *Bst* NI wie ihre jeweiligen Ausgangsplasmide auf. Durch T7-Transkription lassen sich mit ihnen folglich die *in vitro*-Transkripte mat-tRNA_{CCA}, mat-tRNA_{CC}, mat-tRNA_C und mat-tRNA_{ΔCCA} synthetisieren.

5.2.2. Enzymkinetische Untersuchung des homologen *P. marinus* Prozessierungssystems

Die Bestimmung der Substratspezifität und der enzymkinetischen Parameter der Prozessierung von *P. marinus* pre-tRNA^{Arg} durch *P. marinus* RNase P RNA *in vitro*, wurde ausschließlich unter *steady-state*-Bedingungen durchgeführt (3.12.1.). In diesen Kinetiken unter Gleichgewichtsbedingungen (*steady-state*) wird das Substrat in großem Überschuss eingesetzt. Dies hat zur Folge, dass alle Enzym-Moleküle zur gleichen Zeit mit Substrat gesättigt sind, und mehrere Prozessierungszyklen durchlaufen können (*multiple turn-over*). Deshalb ist lediglich die Produktfreisetzung, die durch die Bindungsstärke des Enzym-Substrat-Komplex beeinflusst wird, geschwindigkeitsbestimmend. Dies wird durch die Michaelis-Menten-Konstante (K_M) beschrieben. Eine Erhöhung des K_M -Wertes resultiert auch in einer Erhöhung der Effizienz-Konstante k_{cat} , welche angibt, wie viele Prozessierungszyklen in einer Zeiteinheit mit diesem Substrat möglich sind. Die Spezifitäts-Konstante (k_{cat}/K_M) gibt Ausdruck darüber, welches Substrat vom Enzym bevorzugt umgesetzt wird. Größere Werte dieses Verhältnisses belegen eine gesteigerte Spezifität des Enzyms für dieses Substrat.

Aussagen über die Substratbindung und die Reaktion, die zur Produktbildung führt, sind unter diesen Reaktionsbedingungen nicht möglich. Dies ist nur unter *single turn-over*-Bedingungen möglich, bei

denen das Enzym im Überschuss eingesetzt wird, so dass statistisch von jedem Enzymmolekül nur ein Substratmolekül umgesetzt werden kann (*pre-steady-state*) und die Produktfreisetzung somit keinen geschwindigkeitslimitierenden Beitrag leistet.

Um den inkrementellen Beitrag der einzelnen Nukleotide des 3'-CCA-Endes zu ermitteln, wurden bereits Studien in anderen homologen und heterologen Prozessierungssystemen durchgeführt.

Bei der Prozessierung von *B. subtilis* pre-tRNA^{Asp} durch *B. subtilis* und *E. coli* RNase P RNA (Oh und Pace, 1994) zeigte sich bei der schrittweisen Entfernung der Nukleotide vom 3'-Ende eine stufenweise Zunahme von K_M (Tab. 5-1). Dies zeigt den Beitrag der einzelnen Nukleotide zur Ribozym-Substrat-Interaktion an. Die Entfernung des kompletten CCA-Endes brachte eine 65fache Erhöhung von K_M für das homologe *B. subtilis*-System. Diese geschwächte Bindung durch das fehlende 3'-CCA-Ende erbrachte einen Beitrag von +2-3 kcal/mol an freier Bindungsenthalpie ($\Delta\Delta G$) zur gesamten Interaktion. Die beiden Ribozyme, die jeweils das GGU-Bindungsmotiv besitzen, bevorzugten folglich das Substrat mit komplettem 3'-CCA-Ende. Da der Beitrag der einzelnen Nukleotide zur Bindungsenergie unter optimalen ionischen Bedingungen auf Konformationseffekte und spezifische Wasserstoffbrücken zurückzuführen ist, kann eine Durchführung unter Hochsalzbedingungen konformationelle Beiträge unterdrücken. So konnten Oh und Pace (1994) zeigen, dass C75 und C74 spezifische Bindungen ausbilden, während A76 lediglich einen konformationellen Beitrag liefert. Eine Untersuchung dieses Systems unter *single turn-over*-Bedingungen (Oh *et al.*, 1998) zeigte, dass die schrittweise Entfernung der 3'-Nukleotide sich auch auf die Geschwindigkeit der Produktbildung auswirkt, was durch eine Erniedrigung der Katalysekonstante k_2 belegt wurde. Vor allem C75 hat maßgeblichen Einfluss auf die Reaktion (65fache Erhöhung von k_2) und die Bindung an der Katalyse notwendigen Mg^{2+} -Ionen. Diese Substratspezifität für Substrate mit komplettem CCA-Ende ist in Gegenwart des RNase P Proteins jedoch nicht zu beobachten.

Um den inkrementellen Beitrag der einzelnen Nukleotide des 3'-CCA-Endes zur Reaktion im homologen System von *P. marinus* zu ermitteln, wurden die *in vitro* synthetisierten Transkripte pre-tRNA_{CCA}, pre-tRNA_{CC}, pre-tRNA_C und pre-tRNA_{ΔCCA} in die Ribozym-Reaktion mit *P. marinus* RNase P RNA eingesetzt (4.2.). Da die zu Beginn gewählten Konzentrationen an Ribozym (25 nM) und Substrat (50-400 nM) Umsatzkurven ergaben, die je nach Substrat bereits nach 5-10 Minuten das Maximum erreichten, wurden die Konzentrationsparameter optimiert, um den linearen Anfangsbereich der Umsatzkurve besser aufzulösen. Als optimal wurden die Konzentrationen an Ribozym von 6,25 nM und Substrat von 800-6400 nM für pre-tRNA_{CCA}, pre-tRNA_{CC} und pre-tRNA_C bzw. 200-1600 nM für pre-tRNA_{ΔCCA} ermittelt. Die einzelnen Messpunkte lagen hier bei 2-7 Minuten.

Überraschenderweise zeigte sich im Gegensatz zur Prozessierung in heterologen Systemen (Hess *et al.*, 1998) eine Spezifität der *P. marinus* RNase P RNA für das Substrat mit deletiertem 3'-CCA-Ende (pre-tRNA_{ΔCCA}; Abb. 5-1).

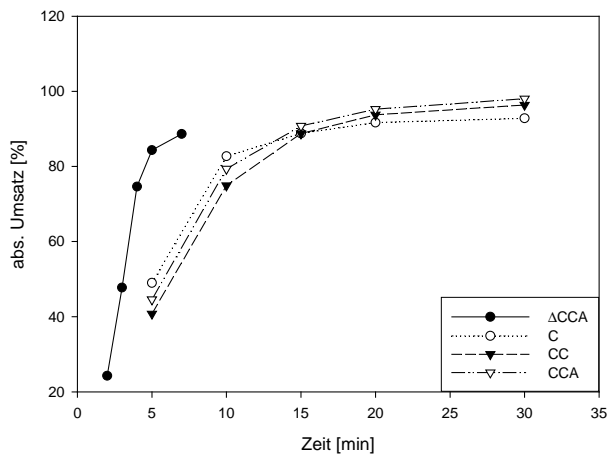


Abb. 5-1: Prozessierung von *P. marinus* pre-tRNA^{Arg} durch *P. marinus* RNase P RNA
Gezeigt sind die Umsatzkurven der Prozessierung von pre-tRNA_{CCA} (CCA), pre-tRNA_{CC} (CC) pre-tRNA_C (C) und pre-tRNA_{ΔCCA} (ΔCCA) bei 400 nM Substratkonzentration und 25 nM *P. marinus* RNase P RNA.

Diese Substratspezifität für pre-tRNA_{ΔCCA} spiegelt sich auch sehr gut in den ermittelten enzymkinetischen Parametern wieder (Tab. 5-1).

RNase P RNA (Referenz)	Substrat	3'-Ende	K _M [μM]	k _{cat} [min ⁻¹]	k _{cat} /K _M [min ⁻¹ μM ⁻¹]	ΔΔG [kcal/mol]
<i>P. marinus</i>	<i>P. marinus</i> pre-tRNA ^{Arg}	CCA	6,92 ± 1,36	26,29 ± 6,17	3,8	0
		CC	7,13 ± 0,91	24,21 ± 2,76	3,4	0,02
		C	19,68 ± 3,44	101,15 ± 26,52	5,1	0,65
		ΔCCA	0,83 ± 0,14	10,44 ± 1,6	12,6	-1,31
<i>Synechocystis</i> (GGU) (1)	<i>Synechocystis</i> pre-tRNA ^{Gln}	CCA	350,6 ± 2,10	0,812 ± 0,012	0,0023	0
		ΔCCA	2,9 ± 0,25	0,008 ± 0,002	0,0028	-2,96
<i>Synechocystis</i> (CCA) (1)	<i>Synechocystis</i> pre-tRNA ^{Gln}	CCA	126,5 ± 1,60	0,060 ± 0,005	0,0005	0
		ΔCCA	2,7 ± 0,45	0,004 ± 0,002	0,0015	-2,37
<i>E. coli</i> (GGU) (1)	<i>Synechocystis</i> pre-tRNA ^{Gln}	CCA	0,13 ± 0,05	0,039 ± 0,002	0,023	0
		ΔCCA	3,0 ± 0,27	0,003 ± 0,0002	0,013	1,93
<i>B. subtilis</i> (GGU) (2)	<i>B. subtilis</i> pre-tRNA ^{Asp}	CCA	0,011 ± 0,007	0,7 ± 0,3	63,64	0
		CC	0,03 ± 0,017	2,2 ± 0,5	73,3	0,6
		C	0,33 ± 0,280	7,8 ± 5,0	23,6	2,1
		ΔCCA	0,71 ± 0,22	10 ± 4,4	14,1	2,6

Tab. 5-1: Kinetische Parameter von steady-state Prozessierungen

Angegeben sind die enzymkinetischen Parameter K_M (μM), k_{cat} (min⁻¹), k_{cat}/K_M (min⁻¹ μM⁻¹) für homologe und heterologe Prozessierungs-Systeme von *P. marinus* (4.2.), *Synechocystis* 6803, *E. coli* sowie für das homologe *B. subtilis* System. Das Vorhandensein des 3'-CCA-Bindungsmotives bei der jeweiligen RNase P RNA ist ebenso angegeben (GGU), wie die Mutation der GGU-Sequenz zu CCA bei *Synechocystis* RNase P RNA. Die freie Bindungsenthalpie ΔΔG wurde durch $\Delta\Delta G = -RT \ln(K_{M, wt}/K_{M, Mutante})$ errechnet. (1) Pascual und Vioque, 1999; (2) Oh und Pace, 1994.

Die Entfernung von A76 (pre-tRNA_{CC}) führte zu einer geringfügigen Erhöhung von K_M (7,13 μM) und $\Delta\Delta G$ (0,02 kcal/mol) im Vergleich zu den Werten bei vollständigem 3'-CCA (K_M 6,92 μM ; k_{cat} 26,29 min^{-1}), die als Bezugspunkt gewählt wurden. Somit steuert A76, in Übereinstimmung mit dem homologen System aus *B. subtilis*, keinen großen Beitrag zur Interaktion mit dem Ribozym bei. Bei dem Substrat pre-tRNA_C, bei dem zusätzlich C75 entfernt wurde, ist eine 2,8fache Erhöhung von K_M (19,68 μM) und eine 3,8fache Erhöhung von k_{cat} (101,15 min^{-1}) festzustellen. Dies belegt, dass C75 einen wesentlichen Beitrag zur Interaktion mit der RNase P RNA erbringt, welcher auch durch den Verlust der freien Bindungsenthalpie von 0,65 kcal/mol belegt ist. Dies steht im Einklang zu den oben genannten Ergebnissen, wie sie für *B. subtilis* und *E. coli* gefunden wurden.

Überraschenderweise erfolgt durch die Entfernung von C74, und somit die Deletion des kompletten CCA-Endes (pre-tRNA _{Δ CCA}), eine Stabilisierung der Ribozym-Substrat-Bindung. Dies wird durch die 8,3fache Erniedrigung von K_M (0,83 μM), die 2,5fache Erniedrigung von k_{cat} (10,44 min^{-1}) und dem Wert der freien Bindungsenthalpie ($\Delta\Delta G$ -1,31 kcal/mol) belegt. Die Entfernung des kompletten 3'-CCA-Endes führt im Gegensatz zu den bakteriellen Systemen folglich nicht zu einer verringerten, sondern zu einer erhöhten Substratspezifität für das Substrat pre-tRNA _{Δ CCA} (Abb. 5-1). Dieser Befund drückt sich zusätzlich in einer 3,3fach gesteigerten Spezifitäts-Konstante ((k_{cat}/K_M)) aus.

Da die optimalen Salzkonzentrationen für die *P. marinus* RNase P RNA äquivalent sind zu den Hochsalzbedingungen anderer RNase P RNAs, ist eine weitergehende Untersuchung unter erhöhten Salzbedingungen, wie sie z.B. für *B. subtilis* durchgeführt wurde (Oh und Pace, 1994), nicht praktikabel. Es kann folglich nicht unterschieden werden, ob die Beiträge der einzelnen Nukleotide zur Interaktion auf konformationelle Effekte oder spezifische Bindungen zurückzuführen sind.

Diese hier festgestellte Bevorzugung des Substrates ohne 3'-CCA-Ende im homologen System, findet sich bisher nur bei Cyanobakterien. Im homologen cyanobakteriellen System aus *Synechocystis* 6803 wurde für die Prozessierung von *Synechocystis* pre-tRNA^{Gln} und pre-tRNA^{Glu} eine analoge Substratspezifität für das Substrat mit fehlendem 3'-CCA-Ende gefunden (Pascual und Vioque, 1999). In Kinetiken unter *steady-state*-Bedingungen (Tab. 5-1) zeigte sich eine 120fache Erniedrigung der K_M und eine 8,4fache Erniedrigung der k_{cat} für das Substrat ohne CCA-Ende. Gleiche Effekte wurden auch unter *single turn-over* Bedingungen gefunden, die belegen, dass sich das Vorhandensein des CCA-Endes auch auf den katalytischen Schritt der Produktbildung auswirkt. Die gleiche Substratspezifität wurde zusätzlich auch in Gegenwart des *Synechocystis* RNase P Proteins gefunden.

Da *Synechocystis* RNase P RNA eines der wenigen cyanobakteriellen Ribozyme ist, welches das GGU-Motiv besitzt, wurde diese Sequenz zu CCA mutiert. Auch für diese Mutante (CCA332), die im Bereich von J15/16 *P. marinus* ähnelt, wurde die gleiche Substratspezifität der Ribozym- und Holoenzym-Reaktion wie für den Wildtyp gefunden (Tab. 5-1).

Prozessierungen dieser Substrate durch die cyanobakteriellen RNase P RNAs von *Anabaena* 7120 und *Pseudanabaena* 6903 zeigten die selbe Substratspezifität im heterologen System. Bei der Prozessierung durch *E. coli* RNase P RNA (Tab. 5-1) und Holoenzym wurden allerdings die Substrate mit vollständigem 3'-CCA-Ende bevorzugt. Diese für *E. coli* „normale“ Substratspezifität schliesst aus, dass die beobachteten cyanobakteriellen Effekte eine Besonderheit der gewählten Substrate ist.

Die cyanobakterielle Spezifität für cyanobakterielle Substrate ohne 3'-CCA-Ende ist scheinbar von genereller Natur.

Diese Ergebnisse deuten zusammen mit denen des homologen *P. marinus* Systems auf einen Mechanismus der Substraterkennung durch cyanobakterielle RNase P hin, der sich von dem anderer bakterieller RNase Ps deutlich unterscheidet. Das 3'-terminale CCA des Substrates, welches ein wichtiges Kriterium für die Substratbindung in *E. coli* ist, hat einen gegensätzlichen Effekt in Cyanobakterien. *E. coli* RNase P RNA oder Holoenzym zeigen eine klare Präferenz für Substrate mit CCA-Ende. Im Gegensatz dazu zeigen cyanobakterielle RNase Ps eine Bevorzugung für Substrate ohne 3'-CCA-Ende. Dies korreliert mit der anomalen Struktur der J15/16 Schleife in Cyanobakterien (Abb. 5-2; Abb. 1-13), die vom Konsensus abweicht, mit wenigen Ausnahmen auch kein GGU-Bindungsmotiv besitzt und in die in einigen Fällen sogar eine Helix insertiert ist (*Pseudanabaena* 6903; *Oscillatoria* 7515). Da J15/16 viel größer ist, könnte ein Substrat mit CCA-Ende sterisch gehindert sein, eine optimale Interaktion mit J15/16 auszubilden.

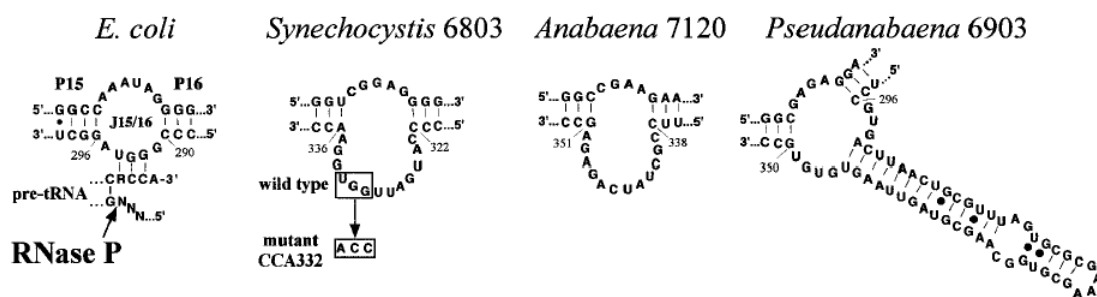


Abb. 5-2: Strukturen der J15/16 Schleife von RNase P RNAs

Gezeigt ist die J15/16 Schleife der RNase P RNAs von *E. coli* und den Cyanobakterien *Synechocystis* 6803, *Anabaena* 7120 und *Pseudanabaena* 6903. In *E. coli* ist die Basenpaarung zwischen dem GGU-Bindungsmotiv und dem 3'-CCA-Ende der pre-tRNA gezeigt. In *Synechocystis* ist die Mutation des GGU Sequenz zu CCA (Mutante CCA332) durch Kästchen dargestellt (Pascual und Vioque, 1999).

Wahrscheinlich werden in Cyanobakterien wie auch in Eukryoten, in denen das CCA-Ende ebenso unbedeutend ist (Altman und Kirsebom, 1999), alternative Kontakte genutzt, um die Schnittstelle festzulegen. Dies könnte auch die große Variabilität in Sequenz und Struktur der J15/16 Schleife erklären, die sich aufgrund einer geringen funktionellen Bedeutung in der Evolution freier entwickeln konnte. Diese alternativen Kontaktstellen würden auch die Präferenz für Substrate mit CCA-Ende bei der heterologen Prozessierung durch *P. marinus* (Hess *et al.*, 1998) und *P. hollandica* (Fingerhut und Schön, 1998) erklären. Da das 3'-CCA-Ende in cyanobakteriellen tRNA-Genen nicht codiert ist, ist es vorstellbar, dass sich die Funktion cyanobakterieller RNase P in einem Zusammenhang entwickelt hat, indem das CCA-Ende nicht anwesend ist.

5.3. Die Methode des Crosslinking zur Analyse von RNA-Struktur und Substraterkennung

Obwohl NMR Untersuchungen und Röntgenkristallstrukturen die Methoden der Wahl sind, um Tertiärstrukturen von RNA und Ribonukleoproteinkomplexe (RNP) zu untersuchen, können viele biologische Systeme aufgrund ihrer Komplexität oder der Verfügbarkeit geeigneten Materials bisher nicht durch sie geklärt werden. In diesen Fällen bietet die Crosslink-Methode die Möglichkeit, Aussagen mit geringerer räumlicher Auflösung über diese Systeme zu erlangen. Crosslink-Experimente werden erfolgreich zur Analyse von RNA Tertiärstrukturen sowie RNA-RNA- und RNA-Protein-Interaktionen eingesetzt. So konnten Kontaktstellen zwischen tRNAs mit ihrer entsprechenden tRNA-Synthetase (Musier-Forsyth und Schimmel, 1994; Moor *et al.*, 2001) und tRNA-Ligase (Tanner *et al.*, 1988) lokalisiert werden.

Die Methode des Crosslinkings wurde auch für die Untersuchung von Ribozymen, wie dem *Hammerhead* (Woisard *et al.*, 1992; Woisard *et al.*, 1994; Wang und Rufner, 1997), *Hairpin*-Ribozym (Dos Santos *et al.*, 1993; Young *et al.*, 1999), HDV-Ribozym (Bravo *et al.*, 1996; Rosenstein und Been, 1996) und RNase P (Burgin und Pace, 1990) verwendet.

Aber auch in komplexen RNPs wie dem Ribosom (Osswald und Brimacombe, 1999; Ofengand *et al.*, 1977) oder dem *Spliceosom* (Sha *et al.*, 1998; Sontheimer und Steitz, 1993).

Speziell bei RNase P werden Crosslink-Methoden erfolgreich eingesetzt, um durch präzisere Bestimmung der Orientierung von spezifischen Elementen der RNA und Protein-Untereinheit, die Struktur des Ribozym-Substrat-Komplexes und die Substraterkennung zu untersuchen.

Neben der direkten UV-Anregung der unmodifizierten Nukleinsäuren, werden hauptsächlich modifizierte RNAs, die photoaktivierbare Nukleotidanaloga oder funktionelle Gruppen enthalten, verwendet.

UV-Crosslinking von unmodifizierten RNAs bietet den Vorteil, bei einer kurzen Anregung (3 min) durch Licht der Wellenlänge 254 nm eine kovalente Vernetzung im Bereich von 2-3 Å auszubilden. Durch die starke Abhängigkeit von der Ausrichtung der angeregten Nukleotide zueinander werden allerdings nur sehr wenige Crosslink-Komplexe erhalten (Guerrier-Takada *et al.*, 1989; Kufel und Kirsebom, 1994).

Viel erfolgreicher werden zufällig oder positionsspezifisch eingebaute Photoaffinitäts-Reagentien verwendet. Hierbei wird zwischen *long-range*- und *short-range*-Reagentien unterschieden. *Long-range*-Reagentien sind photosensible funktionelle Gruppen, die einen Aktivitätsradius von 9-15 Å besitzen, da sie über einen Linker, der entweder am Phosphat oder an der Riboseinheit des Nukleinsäure-Rückgrates, fixiert sind. Als *long-range*-Crosslinker werden hauptsächlich Derivate von Azidophenacyl (APA) eingesetzt, die eine Azid-Gruppe im Abstand von 9 Å vom Verknüpfungspunkt tragen. APA-Reagentien können über eine große Spanne an experimentellen Bedingungen verwendet werden und bleiben inert, bis sie mit Licht (302 nm) angeregt werden. Dies ermöglicht es, dass die RNA vor der Anregung ihre vollständig gefaltete Struktur annehmen kann.

Short-range-Reagentien sind modifizierte Basen, die v. a. durch den Austausch eines Sauerstoffatoms gegen ein Schwefelatom photoinduzierbar werden. Diese Thionukleotide haben einen Aktivitätsradius von 2-3 Å.

5.3.1. Strategien zur Positionierung von photoreaktiven Gruppen in RNase P

Als sehr häufig benutzter *long-range*- Crosslinker wird die APA-Gruppe hauptsächlich an den 5'-und 3'-Enden der RNAs eingebaut.

Durch nahezu quantitative Reaktion von Azidophenacyl-Bromid (APA-Br) mit dem 5'-Phosphorothioat von GMP α S, welches als Startnukleotid in einer T7-Transkription inkorporiert wird (3.4.5.), wird die APA-Gruppe an die RNA gekoppelt.

Um die APA-Gruppe an das 3'-Ende der RNA anzubringen, wird das 2',3'-*cis*-diol der 3'-terminalen Riboseeinheit durch Periodat zum Dialdehyd oxidiert. Reaktion mit aliphatischen Diaminen (Ethylendiamin, Hexamethylendiamin) unter reduzierenden Bedingungen mittels Cyanoborhydrid und Natriumborhydrid, resultiert in einem substituierten Morpholino-Derivat, das eine primäre aliphatische Amino-Gruppe am 3'-Terminus aufweist. Diese Amino-Gruppe kann mit einem N-Succinimidester der Azidobenzoessäure reagieren, so dass das Photoreagenz (4-Azidobenzoat) als Amid am 3'-Ende der RNA positioniert ist.

Die APA-Gruppe kann durch die Verwendung von zirkular permutierter RNase P RNA oder Substrat, bei denen die nativen 5'- und 3'-Enden durch eine kurze Oligonukleotidsequenz verbunden sind, und somit durch die Entstehung neuer beliebiger Enden, an verschiedene Stellen der RNA positioniert werden (Nolan *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 1994).

Long-range-Crosslinker wie die APA-Gruppe wurden auch erfolgreich in RNase P Proteine eingebaut. Die Einführung einzelner Cysteine an spezifischen Positionen des Proteins erlaubt eine Modifizierung der Cystein-Thiol-Gruppe mit einem APA-Reagenz (Niranjanakumari *et al.*, 1998). Dies führte zu dem Beweis, dass die 5'-Flanke des Substrates einen direkten Kontakt mit der zentralen Furche des RNase P Proteins hat.

Short-range-Crosslinking bei RNase P wird hauptsächlich mit den Thionukleotiden ⁴UTP und ⁶GMP durchgeführt. Im Gegensatz zu *long-range*-Reagentien besitzen sie den Vorteil, dass sie die RNA-Struktur kaum beeinflussen. Sie werden durch *in vitro* T7-Transkription entweder zufällig (⁴UTP) oder positionsspezifisch am 5'-Ende, durch die Verwendung von Dinukleotiden (⁴UpG) oder Monophosphaten (⁶GMP) als Startnukleotide, eingebaut (Pomeranz-Krummel und Altman, 1999; Christian *et al.*, 1998).

Eine interne positionsspezifische Modifizierung kann erreicht werden, indem Thionukleotide in kurze chemisch synthetisierte RNA-Oligonukleotide der RNA-Sequenz eingebaut werden, welche durch Oligonukleotid-vermittelte Ligation mit der verbleibenden RNA-Sequenz komplettiert werden (Yu, 2000).

5.4. Experimente mit dem *short-range*-Crosslinker $s^4\text{U}$ in *P. marinus* RNase P RNA

Um die Methode des *Crosslinkens* zu etablieren, und um Kontaktstellen zwischen Ribozym und Substrat feststellen zu können, wurde $s^4\text{U}$ durch *in vitro* Transkription in RNase P RNA von *E. coli* und *P. marinus* eingebracht. Diese Strategie ist analog einer bereits erfolgreich durchgeführten Studie des Prozessierungssystems von *E. coli* RNase P RNA und pre-tRNA^{Tyr} (Pomeranz-Krummel und Altman, 1999). Um den $s^4\text{UTP}$ -Einbau zu überprüfen, der im Idealfall in einer Substitution pro Molekül besteht, wurde neben enzymatischer Totalhydrolyse (Abb. 4-13) auch der qualitative Spot-Test nach Feigl (3.11.3.) durchgeführt.

Mit den modifizierten Transkripten *E. coli* $s^4\text{U}$ -M1-RNA und *P. marinus* $s^4\text{U}$ -RNase P RNA wurden Crosslink-Experimente mit pre-tRNA^{Tyr} und pre-tRNA^{Arg} durchgeführt. Mit dem Referenzsystem $s^4\text{U}$ -M1-RNA/pre-tRNA^{Tyr} konnten die ersten spezifischen Crosslink-Komplexe erhalten werden (Abb. 4-15). Auch mit *P. marinus* pre-tRNA^{Arg} konnte *E. coli* $s^4\text{U}$ -M1-RNA spezifische Crosslink-Komplexe ausbilden (Abb. 4-16).

Durch den Austausch von Mg^{2+} gegen Ca^{2+} im Reaktionspuffer kann die Prozessierungsreaktion unterdrückt werden, so dass ausschließlich die Situation des Ribozym-Substrat-Komplexes und nicht die des Ribozym-Produkt-Komplexes durch eine kovalente Vernetzung analysiert wird. Es ist gut belegt, dass auch in Gegenwart von Ca^{2+} RNase P RNA seine native Struktur einnehmen und das Substrat binden kann, wie es unter optimalen Prozessierungsbedingungen mit Mg^{2+} der Fall ist (Smith *et al.*, 1992). Unter beiden Bedingungen wurde konsequenterweise auch das identische Bandenmuster der spezifischen Komplexe gefunden (Abb. 4-15).

Nach der Optimierung der Reaktionsparameter (4.3.3.1.) wurden auch für das homologe *P. marinus* System (RNase P RNA/pre-tRNA^{Arg}) spezifische Crosslink-Komplexe identifiziert.

Um den Einfluss des 3'-CCA-Endes der pre-tRNA^{Arg} auf den gebildeten Ribozym-Substrat-Komplex zu untersuchen, wurden die *in vitro* synthetisierten Substrate pre-tRNA_{ΔCCA}, pre-tRNA_C, pre-tRNA_{CC} und pre-tRNA_{CCA}, mit $s^4\text{U}$ -RNase P RNA in Crosslink-Reaktionen eingesetzt. Bei allen vier Substraten zeigten sich spezifische Komplex-Banden mit gleichem Muster und identischer Laufstrecke (Abb. 4-19).

Durch Primer-Extension-Analyse kann das 5'-Ende einer RNA bestimmt werden, da am Ende der RNA-Matrize oder bei kovalenten Vernetzungen zu einem weiteren RNA-Molekül, wie sie durch Crosslink-Reaktionen entstehen, die reverse Transkription durch die Reverse Transkriptase abbricht. Dieser interne Abbruch der cDNA-Synthese erfolgt ein Nukleotid vor dem eigentlichen Nukleotid, welches zum Stop der Synthese führt.

Zur eindeutigen Identifizierung vernetzter Nukleotide der RNase P RNA und den verwendeten tRNAs wurden die spezifischen Crosslink-Komplexe isoliert und in Primer-Extension-Analysen eingesetzt.

Auf der Seite der *P. marinus* RNase P RNA konnten keine Positionen identifiziert werden, die kovalente Vernetzungen zum Substrat ausbilden. Dies ist erstaunlich, da durch die Existenz der spezifischen Komplexe das Vorhandensein dieser vernetzten Thionukleotide belegt ist. So konnten

Pomeranz-Krummel und Altman (1999) mit der gleichen Strategie die vernetzten Nukleotide U69, U257 und U294 in *E. coli* s⁴U-M1-RNA identifizieren (Tab. 5-2; Abb. 5-3).

Position in <i>E. coli</i> <i>RNase P RNA</i>	Reagenz	Substrat	Crosslink-Position in tRNA	Referenz
U69	s ⁴ U	pre-tRNA ^{Tyr} (ACCACUCA)	-8, -10	1
U257			3'-Flanke	
U294			-6, -9	
U69	s ⁴ U	pre-tRNA ^{Tyr} (A)	+1, -1, -2, -7, -8, -9	1
U257			-14, -15, -16	
U294			-7, -9	
C92	---	pre-tRNA ^{Tyr} (ACCACUCA)	-3	2
G250	5'-APA	zirk. perm. M1-RNA	-5 - +1	3
G292		pre-tRNA ^{Asp}	+2, +3	4
G332			-4, -5	

Tab. 5-2: Übersicht über vernetzte Nukleotide in *E. coli* RNase P RNA und tRNAs

1) Pomeranz-Krummel u. Altman, 1999; 2) Guerrier-Takada *et al.*, 1989; 3) Harris *et al.*, 1997; 4) Harris *et al.*, 1994.

Auf der Seite der hier eingesetzten Substrate pre-tRNA_{ΔCCA}, pre-tRNA_C, pre-tRNA_{CC} und pre-tRNA_{CCA} konnten mit dieser Methode allerdings eindeutig vernetzte Nukleotide identifiziert werden (Abb. 4-22). Da sich die identifizierten Positionen zwischen den vier tRNAs kaum unterscheiden, sind sie in Abb. 4-23 und Abb. 5-3 zusammengefasst.

Auffällig ist, dass die identifizierten Positionen sich über die ganze pre-tRNA^{Arg} verteilen. Gruppen von starken Signalen finden sich in der variablen Schleife (G45, G46, C48), in der Anticodon-Schleife (U32, U33, C34, C35), in der D-Schleife (G18, G19) sowie im Acceptor-Stamm (G2, G3, G4). Weniger starke Signale finden sich in der 5'-Flanke (C-8, U-7), an der Basis des D-Stammes (A9, G10, C16, G17) und am konservierten G53 des T-Sammes.

Dieses Muster im hier untersuchten *P. marinus* System unterscheidet sich bis auf zwei Regionen grundsätzlich von dem in *E. coli*, in welchem die identifizierten Nukleotide ausschließlich in der 5'- und 3'-Flanke zu finden sind (Tab. 5-2; Abb. 5-3). So konnte in *E. coli* nachgewiesen werden, dass U69 (P4) und U294 (L16/15, GGU-Bindungsmotiv) mit Nukleotiden der 5'-Flanke (-10, -8 bzw. -9, -6) kovalente Bindungen ausbilden. Diese räumliche Nähe der RNase P RNA zur 5'-Flanke wurde mit den schwächeren Signalen bei C-8 und U-7 auch hier für *P. marinus* belegt, allerdings ohne das Vernetzungsnukleotid der RNase P RNA identifiziert zu haben.

Für U257 (L15/16) wurde in *E. coli* eine Vernetzung mit allen Nukleotiden der 3'-Flanke von pre-tRNA^{Tyr} nachgewiesen.

Da bei der Analyse der Crosslink-Komplexe von *P. marinus* mittels Primer-Extension über den 3'-Sequenzbereich der tRNA, an dem das Oligonukleotid hybridisiert, keine Information gewonnen werden konnte, wurde die tRNA nach der Crosslink-Reaktion durch eine Oligonukleotid vermittelte

Ligations-Reaktion (Splint-Ligation) mit T4 DNA-Ligase zirkularisiert. Dadurch kann mit einem geeigneten Oligonukleotid auch das bisher unzugängliche 3'-Ende der tRNA untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden in die Crosslink-Ansätze pre-tRNAs mit 5'-Monophosphat eingesetzt und in den isolierten spezifischen Komplexen die vernetzte tRNA (4.4.) zirkularisiert. In den anschließenden Primer-Extension-Analysen stoppte die Reverse Transkriptase allerdings bereits am natürlichen 5'-Ende der pre-tRNA. Eine Extension über die Ligationsstelle hinaus fand nicht statt, weil die Ligationseffizienz im Komplex nicht ausreichte. Somit konnte kein zusätzlicher Informationsgewinn über das 3'-Ende der tRNAs gewonnen werden.

Mit der Verwendung eines *long-range*-Crosslinkers (APA), der am 5'-Ende zirkular permutterter *E. coli* RNase P RNA positioniert war, konnten Harris *et al.* ebenfalls kovalente Verknüpfungen zum Substrat (pre-tRNA^{Asp}) identifizieren (Tab. 5-2; Harris *et al.*, 1997; Harris *et al.*, 1994). Es wurden Vernetzungen von G250 (P15) und G332 (J18/2) mit Nukleotiden der 5'-Flanke (-5 bis +1 bzw. -4, -5) lokalisiert. G292 (L16/15) hingegen reagierte mit Nukleotiden des Acceptor-Stammes (+2, +3). Dies bestätigt auch die in *P. marinus* gefundenen Crosslink-Positionen des Acceptor-Stammes (G1-G4), obwohl sie durch unterschiedliche Reagentien verschiedener Reichweite ermittelt wurden. Der insgesamt erhebliche Unterschied in den nachgewiesenen Vernetzungsstellen von *E. coli* und *P. marinus* RNase P RNA ist in Abb. 5-3 veranschaulicht.

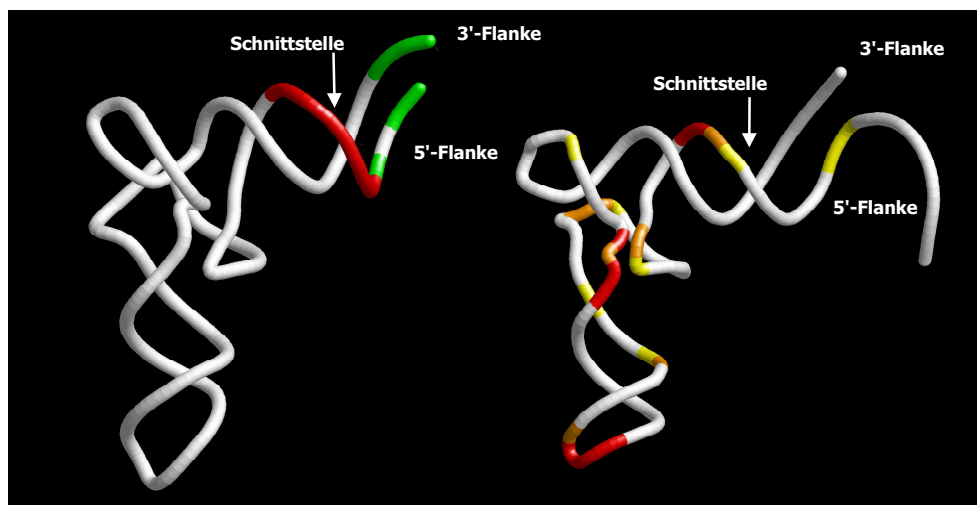


Abb. 5-3: Identifizierte vernetzte Nukleotide der Substrate

Gezeigt sind die Backbone-Darstellungen von Hefe pre-tRNA^{Asp} (links; Massire *et al.*, 1998) und *P. marinus* pre-tRNA^{Arg} (rechts). Durch *short-range*-Crosslinker (s⁴U, grün) und *long-range*-Crosslinker (APA, rot) identifizierte Nukleotide hervorgehoben. Die Stärke der gefundenen Signale in pre-tRNA^{Arg} ist farblich wiedergegeben (stark: rot; mittel: orange; schwach: gelb). Die Prozessierungsstelle ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Im Cyanobakterium *P. marinus* existiert folglich ein anderer Mechanismus der Substratbindung als in Eubakterien. Für die Substratbindung in *E. coli* ist belegt, dass die 5'-Flanke, das 3'-CCA-Ende, der Acceptor-Stamm sowie der T ψ C-Stamm und dessen Schleife wichtige Komponenten sind. Für *P. marinus* konnte hier belegt werden, dass alternative Kontakte zur Substratbindung beitragen. Diese liegen im D-Stamm und D-Schleife, der Anticodon-Schleife und der variablen Schleife. Diese

alternative Substratbindung steht im Einklang mit dem Fehlen des GGU-Bindungsmotives in J16/15 und den Ergebnissen der enzymkinetischen Untersuchung des homologen und heterologen *P. marinus* Prozessierungssystems (5.2.2.).

Erstaunlicherweise konnten mittels kovalenter Vernetzung durch das photosensitive Thionukleotid s^4U keine Unterschiede in Abhängigkeit von den Varianten des 3'-CCA-Endes gefunden werden, wie es die enzymkinetischen Parameter K_M und k_{cat} erwarten lassen. Dies trifft aber nur für den analysierten Bereich der pre-tRNAs zu. Die 3'-Region inklusive des T ψ C-Stammes und der T ψ C-Schleife der verwendeten Substrate konnte durch Primer-Extension nicht analysiert werden, da die Zyklisierung nicht effizient verlief. Da auch die jeweiligen RNase P RNAs der isolierten Komplexe nicht erfolgreich untersucht werden konnten, bleibt es ungeklärt, ob eventuelle Unterschiede auf der Seite des Ribozyms festzustellen sind.

Um eine alternative Modifizierung durch eine photoinduzierbare Gruppe in der RNase P RNA zu erhalten, wurde an die Thiocarbonyl-Gruppe des s^4U der *long-range*-Crosslinker p-Azidophenacyl angehängt (4.10.). Diese Methode wurde bereits erfolgreich zur Modifizierung von natürlichen tRNAs, welche häufig die seltene Base s^4U an Position 8 enthalten, beschrieben. Die so erhaltenen APA-tRNAs zeigten volle Acylierungs-Aktivität und bildeten Crosslinks zu RNA- und Protein-Komponenten des Ribosoms aus (Ofengand *et al.*, 1977). In analoger Weise wurden auch synthetische mRNAs, die an einzelnen Positionen s^4U enthielten, mit Azidophenacyl-Bromid modifiziert, und ebenfalls zur Bindung mit dem *E. coli* Ribosom angeregt (Stade *et al.*, 1989).

Die Modifizierung von *P. marinus* s^4U -RNase P RNA zu APA- s^4U -RNase P RNA wurde erfolgreich durchgeführt (4.7.3). Parallel zu s^4U -RNase P RNA durchgeführte Crosslink-Experimente ergaben ein identisches Muster an spezifischen Ribozym-Substrat-Komplexen gleicher Banden-Intensität. Bei der anschließenden Analyse der isolierten Komplexe mittels Primer-Extension konnten allerdings weder auf der Seite der RNase P RNA noch bei den tRNAs vernetzte Nukleotide identifiziert werden.

5.5. Experimente mit dem *long-range*-Crosslinker Azidophenacyl (APA) in *P. marinus* tRNA^{Arg}

Da bakterielle RNase P neben pre-tRNAs auch viele weitere Substrate wie z. B. 4,5S RNA (Bothwell *et al.*, 1976) und tmRNA (Komine *et al.*, 1994; Gimple und Schön, 2001) prozessiert, stellt sich die Frage nach den allgemeinen Kriterien zur Substraterkennung und Schnittstellenfestlegung für die vielen Substrate unterschiedlicher Struktur und Sequenz. Eine Aufklärung hierzu kann die Identifizierung des aktiven Zentrums der RNase P RNA geben, welches kollektiv durch einzelne Nukleotide und Sequenzbereiche gebildet wird. Durch die Funktion und Struktur von RNase P bedingt, sind die 5'- und 3'-Flanke von pre-tRNAs sowie die 3'-Flanke und das 5'-Ende der gereiften tRNA zwangsläufig in der Nähe des aktiven Zentrums. Durch Anbringen der photoinduzierbaren APA-Gruppe an diese Teile der tRNA ist es mittels Crosslink-Reaktion möglich, Nukleotide der

RNase P RNA zu identifizieren, die sich in räumlicher Nähe zu diesen Bereichen der tRNA befinden und deshalb auch Teil des katalytischen Zentrums sind.

Durch das unterschiedliche *in vitro* Prozessierungsverhalten der *P. marinus* RNase P RNA im heterologen (Hess *et al.*, 1998) und homologen System (5.2.2.) für pre-tRNAs mit und ohne 3'-CCA-Ende ist die Identifizierung des aktiven Zentrums und der Substratbindungsstellen in diesem Ribozym, welches nicht das Bindungsmotiv (GGU) für das 3'-CCA-Ende besitzt, von Interesse. Aus diesem Grund wurden *P. marinus* pre- und mat-tRNAs^{Arg} an 5'- und 3'-Ende mit der photoinduzierbaren APA-Gruppe modifiziert und in Crosslink-Experimenten eingesetzt. Auf diese Weise sollte die Lokalisierung der 5'- und 3'-Flanke sowie das 5'-Ende der gereiften tRNA im homologen *P. marinus* Ribozym-Substrat-Komplex ermittelt werden.

5.5.1. Modifizierung des 3'-Endes

Die Positionierung dieses Crosslink-Reagenzes am 3'-Ende von tRNAs wurde von Oh und Pace (1994) durch chemische post-transkriptionelle Modifizierung an der 3'-terminalen Riboseeinheit erreicht (5.3.1.).

Auf die Oxidation des 2',3'-*cis*-diols zum Dialdehyd folgt dessen Reaktion mit aliphatischen Diaminen unter reduzierenden Bedingungen. Es entsteht ein substituiertes Morpholino-Derivat, an dessen primäre Amino-Gruppe das Photoreagenz 4-Azidobenzoat als Amid angebracht, und damit am 3'-Ende der RNA positioniert wird.

Mit dieser Strategie wurden reife tRNA^{Asp}-Varianten synthetisiert, die je nach eingesetzter Edukt-tRNA die APA-Gruppe an der endständigen Riboseeinheit der Position 73-76 enthielten. In Crosslink-Experimenten konnten mit diesen modifizierten tRNAs Positionen der *E. coli* RNase P RNA identifiziert werden, die in Kontakt mit den variierten 3'-Nukleotiden sind (Tab. 5-2).

Um das 3'-Ende von tRNAs mit der APA-Gruppe zu modifizieren, ohne die Struktur der Nukleinsäure gravierend zu beeinflussen, wie es durch die oben beschriebene Erweiterung der Ribose zum Morpholino-Derivat sicherlich der Fall ist, wurde eine enzymatische Strategie entworfen, welche sich der Nukleotidyltransferase bedient.

Da die Nukleotidyltransferase als templatunabhängige RNA-Polymerase das 3'-CCA-Ende von tRNAs hochspezifisch anhängt oder komplettiert und neben den Standard-Nukleotiden CTP und ATP auch Nukleotid-Analoga, wie basen- und ribosemodifiziertes ATP und CTP sowie ATP-Phosphorothioate einbaut (1.6.), wurde sie als zentrales Werkzeug ausgewählt. Mit ihrer Hilfe sollte ATP α S (Sp-Isomer) an Position 76 in das 3'-Ende von pre- und mat-tRNA^{Arg} eingebracht werden.

Diese Reaktion wurde von Schlimme *et al.*, (1970) erstmals an Hefe tRNA^{Phe} durchgeführt. Für die erhaltene tRNA mit dem 3'-Ende CCsA konnte trotz der Modifikation die natürliche Funktion belegt werden, da sie durch die Aminoacyl tRNA-Synthetase mit Phenylalanin beladen wurde.

Durch Reaktion des Phosphorothioates mit Azidophenacyl-Bromid (APA-Br) ist somit die Modifizierung mit dem *long-range*-Crosslinker möglich. Bei dieser Reaktion entsteht allerdings ein Triester am Phosphorothioat, welcher leicht hydrolysiert werden kann. So konnten Gish und Eckstein

(1988) in Phosphorothioat enthaltender RNA und DNA zeigen, dass eine einfache Alkylierung des Phosphorothioates mit Jodethanol zu einer Hydrolyse dieser Internukleotid-Bindung führt, da der durch die Alkylierung des Phosphorothioates gebildete Triester labil ist. Dieser Strangbruch wird durch einen nukleophilen Substitutions-Angriff (S_N2) der benachbarten 2'-OH-Gruppe auf den Triester bewirkt. Um diese Möglichkeit des Strangbruches, wie sie zur Sequenzierung von RNA und DNA und in Interferenz-Studien Verwendung findet, zu verhindern, sollte dCTP an Position 75 mit Hilfe der Ntase eingebaut werden (Konarska, 1999).

Durch kinetische Studien eines Modellsubstrats (p6AT-1) konnten Perreault und Altman (1992) zeigen, dass die Deletion der 2'-OH-Gruppe des Nukleotides C75 keinen Einfluss auf die Prozessierung durch *E. coli* RNase P RNA hat. Im Gegensatz dazu konnte den 2'-OH-Gruppen der Nukleotide an Position 74, -1, -2 und +1 ein großer Einfluss auf die Prozessierung und Bindung von Mg^{2+} nachgewiesen werden.

So ist für die zu synthetisierenden tRNAs mit den 3'-Enden der Sequenz C-dC-sA die Ausbildung der natürlichen Struktur und Funktion anzunehmen. Nach der Modifizierung dieser 3'-Enden mit der APA-Gruppe, stehen somit erstmals enzymatisch 3'-modifizierte tRNAs natürlicher Struktur für Crosslink-Experimente zur Verfügung.

5.5.1.1. Synthese von 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} und 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA}

Die für die enzymatische 3'-Modifizierung benötigte Nukleotidyltransferase wurde überproduziert und denaturierend aufgereinigt (4.5.1.). Das an die Säulenmatrix (Ni^{2+} -Agarose) gebundene Protein konnte durch eine Renaturierung im Harnstoffgradienten in aktiver Form erhalten werden. Mit der Ntase konnte bei allen getesteten tRNAs (pre-/mat-tRNA _{Δ CCA}, pre-/mat-tRNA_C, pre-/mat-tRNA_{CC}) das korrekte CCA-Ende vervollständigt werden (4.5.2).

Für den gleichzeitigen Einbau von dCTP und ATP α S in das 3'-Ende wurden als Edukte pre- und mat-tRNA_C in die Ntase-Reaktion eingesetzt. Das 3'-CdCsA-Ende konnte auf diesem Weg erfolgreich synthetisiert werden (4.5.3.). Die so präparativ gewonnenen mat-tRNA_{CdCsA} und pre-tRNA_{CdCsA} wurden mit APA-Br zur Reaktion gebracht (4.7.2.) und die Zielmoleküle 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA} und 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} aufgereinigt. Qualitativ konnte durch den Spot-Test nach Feigl (4.12.) der Einbau des Phosphorothioates und die Modifizierung durch die APA-Gruppe belegt werden. Durch eine Prozessierungskontrolle (4.8.1.) konnte gezeigt werden, dass die Prozessierung durch *P. marinus* RNase P RNA in Gegenwart des 3'-CdCsA-Endes und durch die anschließende Modifizierung durch die APA-Gruppe nicht negativ beeinflusst wird.

5.5.2. Modifizierung des 5'-Endes

5.5.2.1. Synthese von 5'APA-pre-tRNA_{CCA} und 5'APA-mat-tRNA_{CCA}

Zur Positionierung der photoinduzierbaren APA-Gruppe am 5'-Ende der tRNAs wurde die gut dokumentierte Reaktion von Azidophenacyl-Bromid (APA-Br) mit dem 5'-Phosphorothioat von GMP α S, welches als Startnukleotid in einer T7-Transkription inkorporiert wird, verwendet (5.3.1.). Auf diese Weise wurden 5'GMPS-pre-tRNA^{Arg} und 5'GMPS-mat-tRNA^{Arg} synthetisiert.

Da bei der Aufreinigung dieser Transkripte in Abwesenheit eines entsprechenden Schutzreagenz (DTT oder Mercaptoethanol) Oxidationsprodukte zu beobachten sind, kann die Ausbildung dieser Disulfidbrücken, die zu tRNA-Dimeren führen (Abb. 4-29), als indirekter Beleg für den erfolgreichen 5'-GMPS-Einbau gesehen werden. Qualitativ konnte der Einbau auch durch den Spot-Test nach Feigl belegt werden (4.12). Die unter Oxidationsschutz aufgereinigten Transkripte wurden mit APA-Br zur Reaktion gebracht (4.6.1.) und die Zielmoleküle 5'APA-pre-tRNA_{CCA} und 5'APA-mat-tRNA_{CCA} aufgereinigt. Ein direkter Beweis für den Einbau von GMPS und die Modifizierung durch APA-Br konnte durch ein Gel-Shift-Experiment geführt werden (Abb. 4-30).

5.5.3. Crosslink-Reaktion und Identifizierung vernetzter Nukleotide der RNase P RNA

Für die Crosslink-Reaktionen mit den p-Azidophenacyl-modifizierten tRNAs wurden die optimalen Bedingungen bestimmt, unter denen sich spezifische Enzym-Substrat-Komplexe bilden lassen. Es zeigte sich, dass die Crosslink-Reaktion von *P. marinus* RNase P RNA (100 nM; 200000 cpm) mit den APA-modifizierten tRNAs (1000 nM) in Bindungspuffer 6 (enthält Ca²⁺ anstelle von Mg²⁺) durch Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 302 nm (5 min) die besten spezifischen RNA-RNA-Crosslinks erbrachte (4.8.2.). Eine Inkubation des kompletten Ansatzes für 5 Minuten bei 37 °C reichte aus, um den aktiven Enzym-Substrat-Komplex auszubilden. 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA}, 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA}, 5'APA-pre-tRNA_{CCA} und 5'APA-mat-tRNA_{CCA} bildeten mit RNase P RNA spezifische Crosslink-Komplexe mit einer Effizienz von 10-30 %, die nur in Reaktionen auftraten, in denen der photoinduzierbare Crosslinker anwesend war. Die Existenz dieser vernetzten Ribozym-Substrat-Komplexe ist somit ein weiterer Beleg für die erfolgreiche Synthese und Modifizierung dieser tRNAs. Die einzelnen isolierten Komplexe wurden in Primer-Extension-Analysen eingesetzt, mit denen die RNase P-Komponente der Komplexe auf die vernetzten Nukleotide hin untersucht wurde (4.8.3.). Die Ergebnisse sind für die einzelnen verwendeten tRNAs in Tab. 4-2 und den Abbildungen 4-50 bis 4-53 zusammengefasst. Für alle vier verwendeten tRNAs lässt sich eine gute Übereinstimmung identifizierten Regionen feststellen. Diese sind die Regionen J18/2, L16/15, L15/16, J5/15, P5 und P4. Weitere Positionen, die sich teilweise nur bei einzelnen tRNAs finden lassen sind P2, P18, P6, P9, J3/4, P3 und P1.

Da mit Cyanobakterien noch keine derartigen Untersuchungen durchgeführt wurden, können die erhaltenen Ergebnisse nur im Vergleich mit Crosslink-Reaktionen und biochemischen Untersuchungen an *E. coli* und *B. subtilis* RNase P RNA diskutiert werden (Tab. 5-3). Da *P. marinus*

und *E. coli* RNase P RNA zum Strukturtyp A gehören, ist v. a. der direkte Vergleich dieser beiden RNAs sinnvoll.

modifizierte Position in tRNA	Reagenz	Substrat	Crosslink-Position in RNase P RNA (Regionen)	Ref.
-10	s ⁴ U	pre-tRNA ^{Asp}	<i>B. subtilis</i> : 36-37, 258-261 (P3, L15)	1
-7			<i>B. subtilis</i> : 259-261 (L15)	
-5			<i>B. subtilis</i> : 258-259, 320 (L15, J18/2)	
-3			<i>B. subtilis</i> : 245-246, 317-319 (J5/15, J18/2)	
-1			<i>B. subtilis</i> : 318-319 (J18/2)	
-1	5'-s ⁶ G	pre-tRNA ^{Asp}	332-333 (J18/2)	2
+1		mat-tRNA ^{Asp}	248 (5/15)	
G1	5'-APA	mat-tRNA ^{Phe}	248, 249, 330-333 (J5/15, J18/2)	3
G18	5'-APA	zirk. perm. tRNA ^{Asp}	233-234 (P11)	4
G53			111-114, 348-349 (P9, J2/4)	
G64			64-67, 77-78, 98-101, 118, 247-249, (253-258, 280-282) (J3/4, P4, P5, L8, P9, L15/16, P17)	5
G69			10, 64-67, 192, 248, 252, 253, 332-334, 341-344 (P1, J3/4, P4, L13, J5/15, P15, J18/2, P2, J2/4)	
73, 74	3'-APA	pre-tRNA ^{Asp}	253-254, 293-294, 296-297, 331-333 (L15/16, L16/15, P15, J18/2)	7
75, 76			259-261, 285-287, 290, 292 (L15/16, P16, L16/15)	

Tab. 5-3: Übersicht über vernetzte Nukleotide in RNase P RNA aus *B. subtilis* und *E. coli*

1) Christian u. Harris, 1999; 2) Christian *et al.*, 1998 ; 3) Burgin u. Pace, 1990; 4) Chen *et al.*, 1998 ; 5) Nolan *et al.*, 1993 ; 6) Harris *et al.*, 1994 ; 7) Oh u. Pace, 1994.

5.5.3.1. Region P2 und J18/2

In P2 lassen sich nur für 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} (A332) und 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA} (A332, U333) Vernetzungen feststellen, die folglich in direktem Zusammenhang mit dem 3'-CCA sind (Abb. 5-4). Pendanten dieser schwächeren Signale finden sich in *E. coli* nur für das Modellsubstrat pSu3-3XGC (Kufel und Kirsebom, 1996). Dies ist eine Variante der Tyrosin-tRNA, in die im Acceptor-Stamm drei zusätzliche Basenpaarungen eingefügt wurden, und die neben der korrekten Prozessierung an Position +1 (65 %) auch zu einem gewissen Anteil an Position +4 (35 %) von der M1-RNA hydrolysiert wird. Durch Positionierung von s⁴U an Position -1 wurden in P2 die Nukleotide 335-337 vernetzt. Durch

Interferenzstudien konnten in Helix P2 jedoch keine Nukleotide und funktionellen Gruppen bestimmt werden, die für Substratbindung und Katalyse wichtig sind.

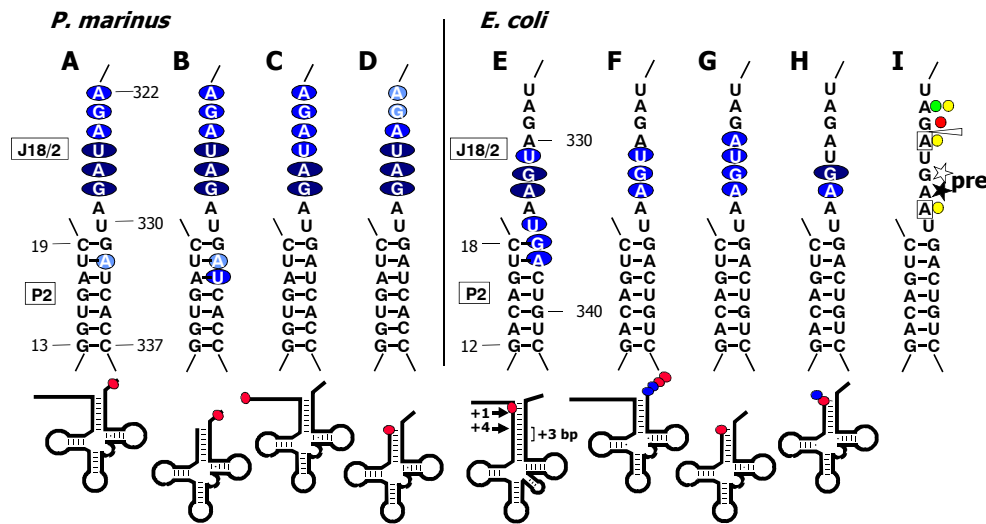


Abb. 5-4: Crosslinks in Region P2 und J18/2

Gezeigt ist der entsprechende Ausschnitt der Sekundärstruktur von *P. marinus* und *E. coli* RNase P RNA, in dem durch Crosslink-Experimente identifizierte Nukleotide blau hervorgehoben sind (A-H). Die Größe und Farbintensität spiegelt dabei die Signalstärke der Primer-Extension-Analyse wieder. Bei den einzelnen Ausschnitten sind die jeweils verwendeten tRNAs und die Positionierung des Crosslinkreagenzes (rot oder blau) schematisch gezeigt. In I sind Interferenzstudien (Phosphorothioat und NAIM) und chemische Footprint-Analysen (★, ☆) in *E. coli* zusammengefasst. Kreise (●: Guanosin 2 NH₂; ●: Ribose 2'OH; ●: Purin N7) und Dreiecke (▷: Phosphorothioat-Effekt; ▶: Phosphorothioat-Effekt mit Mn²⁺-Kompensation) kennzeichnen Nukleotide, die auf die Substratbindung Einfluss haben. Eingerahmte Nukleotide haben Einfluss auf die Katalyse.

Die Region J18/2 hingegen konnte bisher in allen durchgeführten Crosslink-Studien als wichtiger Bestandteil des aktiven Zentrums nachgewiesen werden. So konnte mit oben genanntem Modellsubstrat pSu3-3XGC (s⁴U an Position -1) die stärksten Signale bei nt 331-333 erhalten werden (Abb. 5-4, E). Durch einen weiteren *short-range*-Crosslinker, s⁶G an Position -1 von pre-tRNA^{Asp} (Abb. 5-4, H) konnten Christian *et al.* (1998) ebenso die Nähe von G332 und A333 zur 5'-Flanke zeigen. Mit dem *long-range*-Crosslinker APA an Position 73 und 74 am 3'-Ende von *B. subtilis* pre-tRNA^{Asp} konnten Oh und Pace (1994) die Nukleotide 331-333 vernetzen (Abb. 5-4, F). Dies gelang mit der APA-Gruppe auch Burgin und Pace (1990), die diesen Crosslinker an Position +1 von mat-tRNA^{Phe} anbrachten, und mit dieser modifizierten tRNA für die Nukleotide 330-333 die Nähe zur Prozessierungsstelle nachwiesen (Abb. 5-4, G). Ergänzt werden diese Erkenntnisse durch die Ergebnisse von Interferenzstudien (Phosphorothioat-Interferenz und NAIM), die für viele Nukleotide in J18/2 einen Beitrag zur Substratbindung und Katalyse belegen (Abb. 5-4, I; Hardt *et al.*, 1995; Hardt *et al.*, 1996; Heide *et al.*, 1999; Heide *et al.*, 2001; Kaye *et al.*, 2002). Durch eine Footprint-Studie konnten LaGrandeur *et al.*, (1994) für G332 einen Schutz vor der Modifizierung durch Kethoxal in Gegenwart von pre-tRNA zeigen. A333 hingegen konnte in Gegenwart von pre-tRNA verstärkt durch DMS methyliert werden (Abb. 5-4, I). Diese Befunde belegen eine Nähe von J18/2 zur 5'-Flanke des Substrates. Dies konnte auch durch Harris *et al.* (1994) festgestellt werden. Sie

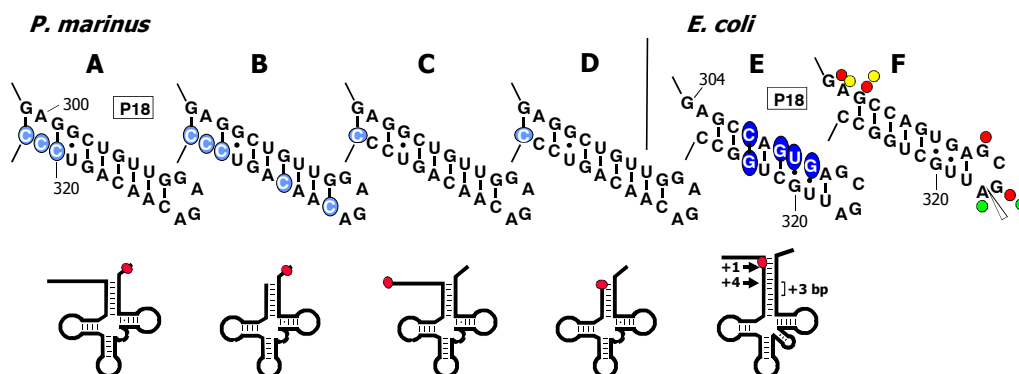
positionierten Azidophenacyl am 5'-Ende von zirkular permutierter M1-RNA und konnten mit dieser Strategie eine Vernetzung von G332 mit Nukleotiden der 5'-Flanke (-4, -5) von pre-tRNA^{ASP} nachweisen.

Mit den identifizierten Nukleotiden A322-G327 in J18/2 von *P. marinus* RNase P RNA (Abb. 5-4, A-D) durch Crosslink-Reaktion mit 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA}, 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA}, 5'APA-pre-tRNA_{CCA} und 5'APA-mat-tRNA_{CCA} ist somit eine sehr gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen für M1-RNA festzustellen. Ein gravierender Unterschied zwischen den eingesetzten tRNAs ist in *P. marinus* nicht zu erkennen. Dies belegt, dass J18/2 auch in *P. marinus* RNase P RNA für alle eingesetzten tRNAs ein Bestandteil des aktiven Zentrums ist.

5.5.3.2. Die Helix P18

Die Helix P18 ist in den postulierten Raumstrukturmodellen (Massire *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1997) in der Rückseite positioniert, und deshalb nicht ein Bestandteil der Substrat- und Produkt-Bindungsfläche. Durch die Wechselwirkung des Tetraloop L18 mit P8 (Brown *et al.*, 1996) wird der Zusammenhalt der S- und C-Domäne unterstützt. Trotz dieser externen Lokalisation von P18 konnten Kufel und Kirsebom (1996) in ihr schwache Crosslinks identifizieren (Abb. 5-5, E), die darauf zurückzuführen sind, dass tRNAs im Laufe eines funktionellen Zyklus in Kontakt mit Nukleotiden von P18 kommen können. Durch NAIM konnten Nukleotide ermittelt werden (Abb. 5-5, F), die Einfluss auf die Substratbindung haben. Dieser Effekt wird aber vermutlich durch ihre Rolle, die dreidimensionale Struktur des Ribozyms zu unterstützen, hervorgerufen und weniger durch einen direkten Kontakt mit den tRNAs.

Die in *P. marinus* ermittelten quervernetzten Nukleotide C320-C322 (Abb. 5-5, A-D) sind noch der Bindung an J18/2 zuzuordnen, da sich dieser Bereich bei allen vier verwendeten tRNAs lückenlos bis zu diesen Nukleotiden erstreckt. Dies erklärt sich mit der Charakteristik des verwendeten *long-range*-Crosslinkers, da mit ihm ganze Bereiche, und weniger einzelne isolierte Nukleotide detektiert werden. Die nur für 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA} zusätzlich sehr schwach identifizierten Nukleotide C313 und C316 (Abb. 5-5, B) dagegen stehen im Einklang mit den für pSu3-3XGC gefundenen, und lassen sich auch für *P. marinus* kaum interpretieren.



(vorherige Seite)

Abb. 5-5: Crosslinks in Helix P18

Gezeigt ist der entsprechende Ausschnitt der Sekundärstruktur von *P. marinus* und *E. coli* RNase P RNA, in dem durch Crosslink-Experimente identifizierte Nukleotide blau hervorgehoben sind (A-E). In F) sind Interferenzstudien (Phosphorothioat und NAIM) und chemische Footprint-Analysen in *E. coli* zusammengefasst. Legende wie in Abb. 5-4 beschrieben.

5.5.3.3. Region P15 und P16

Die Region zwischen P15 und P16 ist in *E. coli* eine der zentralen Kontaktstellen mit tRNAs, da sich in J16/15 das GGU-Bindungsmotiv befindet, mit dem die zwei Cytosine des 3'-CCA-Endes von tRNAs und die Diskriminatorbase Watson-Crick bzw. Wobble-Basenpaarungen ausbilden können (Kirsebom und Svärd, 1994). Durch NAIM (Abb. 5-6, F) und NMR-Untersuchungen konnte sogar die Ausbildung von gestapelt koplaren Basen-Triplets zwischen G259/G291/A76 G292/A258/C75 belegt werden (Heide *et al.*, 1999; Easterwood und Harvey, 1997). Durch diese Bindung des CCA-Endes wird die tRNA im Ribozym verankert, was dazu führt, dass der Ribozym-Substrat-Komplex zur aktiven Konformation rearrangiert wird (Kufel und Kirsebom, 1996).

Dieser Kontakt zwischen RNase P RNA und tRNA konnte von LaGrandeur *et al.* (1994) zusätzlich bestätigt werden, da A254, A255, G259, G292 und G293 durch die Anwesenheit von pre- und mat-tRNA mit vollständigem CCA-Ende vor chemischer Modifizierung durch DMS und Kethoxal geschützt sind (Abb. 5-6, F). Durch Crosslink-Experimente konnte die Nähe des CCA-Endes zu dieser Region ebenfalls belegt werden. So wurden von Oh und Pace (1994) mit dem *long-range*-Crosslinker APA an den Positionen 73-76 am 3'-Ende von pre-tRNA^{Asp} vernetzte Nukleotide in P15, J15/16, P16 und J16/15 detektiert (Abb. 5-6, E).

Die Beteiligung dieser Region am katalytischen Zentrum wurde auch mit dem Modellsubstrat pSu3-3XGC (s⁴U an Position -1) belegt (Abb. 5-6, G). Mit ihm konnten Nukleotide in P15, J15/16, P16 und J16/15 identifiziert werden. Dies gelang auch Christian und Harris (1999) mit s⁴U, welches an verschiedenen Positionen der 5'-Flanke von *B. subtilis* pre-tRNA^{Asp} positioniert war. Mit diesen Substraten wurden in *B. subtilis* RNase P RNA Vernetzungen mit J16/15 (enthält GGU-Bindungsmotiv) herbeigeführt und damit die Nähe der 5'-Flanke zu dieser Region belegt.

Eine andere Strategie verfolgten Pomeranz-Krummel und Altman (1999), die s⁴U in M1-RNA einbrachten, und Vernetzungen von U257 mit dem kompletten CCA-Ende sowie zwischen U294 und Nukleotiden der 5'-Flanke (-6, -9) feststellten (Tab. 5-3). Harris *et al.* (1997) positionierten Azidophenacyl am 5'-Ende von zirkular permutierter M1-RNA und konnten mit dieser Strategie eine Vernetzung zwischen G250 und der gesamten 5'-Flanke von pre-tRNA^{Asp} inklusive G+1 feststellen.

Durch Crosslink-Experimente mit s⁶G am 5'-Ende von pre- und mat-tRNA^{Asp} (Christian *et al.*, 1998) wurden allerdings keinerlei Nukleotide dieser Region identifiziert. Auch die Verwendung von Azidophenacyl am 5'-Ende von mat-tRNA^{Phe} (Burgin und Pace, 1990) ergab keine Vernetzungen mit dieser Region (Abb. 5-6, H). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen mit *P. marinus* RNase P RNA. Durch 5'APA-mat-tRNA_{CCA}, welches dem Konstrukt von Burgin und Pace (5'APA-mat-tRNA) gleicht, wurden vernetzte Nukleotide in P15, J15/16, P16 und J16/15 identifiziert (Abb. 5-6, D). Dies

belegt, dass in *P. marinus* RNase P RNA ein anderer Modus der Produkt-Bindung stattfindet als in *E. coli* M1-RNA.

Ein analoges Muster an vernetzten Nukleotiden konnte auch für die anderen eingesetzten tRNA-Varianten (3'APA-pre-tRNA_{CdCsA}, 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA} und 5'APA-pre-tRNA_{CCA}) ermittelt werden (Abb. 5-6, A-C). Vor allem für 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} (Abb. 5-6, A), welches dem Konstrukt von Oh und Pace (3'APA-pre-tRNA_{CC/CCA}; Abb. 5-6, E) ähnlich ist, wurde ein vergleichbares Muster an identifizierten Nukleotiden gefunden.

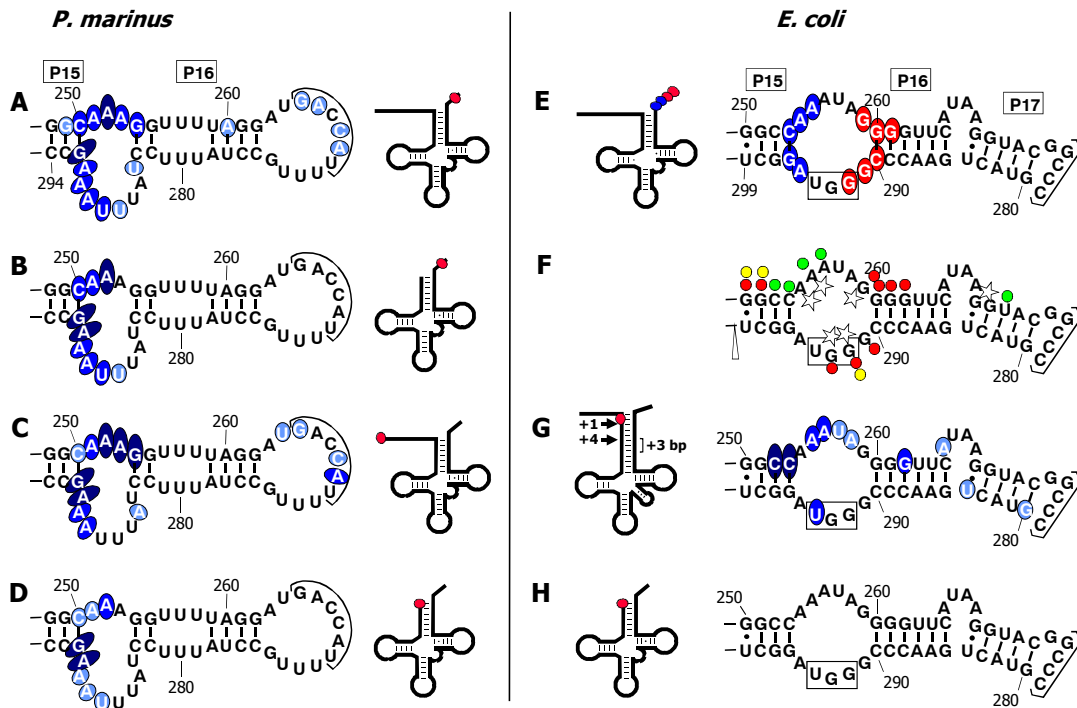


Abb. 5-6: Crosslinks in Region P15 und P16

Gezeigt ist der entsprechende Ausschnitt der Sekundärstruktur von *P. marinus* und *E. coli* RNase P RNA, in dem durch Crosslink-Experimente identifizierte Nukleotide blau (bzw. rot und blau) hervorgehoben sind (A-E, G-H). Das GGU-Bindungsmotiv in *E. coli* ist umrandet. In F) sind Interferenzstudien (Phosphorothioat und NAIM) und chemische Footprint-Analysen in *E. coli* zusammengefasst. Legende wie in Abb. 5-4 beschrieben.

Im Vergleich der Ergebnisse für *P. marinus* untereinander fällt auf, dass die Anzahl und Intensität der Signale für 5'APA-mat-tRNA_{CCA} geringer ist, als für die anderen tRNAs. Zusätzlich zeigen die beiden Substrate mit 5'-Flanke schwache Vernetzungen im Bereich von P6, die bei den Produkt-tRNAs nicht festzustellen sind. So kann insbesondere aus dem Vergleich von 3'-APA-pre- und mat-tRNA geschlossen werden, dass bei *P. marinus* ein unterschiedlicher Substratbindungsmodus für Vorläufer- und Produkt-tRNA existiert.

5.5.3.4. Region von P5 und J5/15

Für die Region J5/15 konnte in *E. coli* RNase P RNA gezeigt werden, dass sie Teil des katalytischen Zentrums von Ribozym-Substrat und Ribozym-Produkt-Komplexen ist. Durch s⁶G an Position +1 von mat-tRNA^{Asp} konnte ein *short-range*-Crosslink mit A248 herbeigeführt werden (Abb. 5-7, F; Christian

et al., 1998). Durch den *long-range*-Crosslinker Azidophenacyl an Position +1 von mat-tRNA^{Phe} (Burgin und Pace, 1990) konnten die beiden, in allen bakteriellen RNase P RNA Sequenzen hoch konservierten Nukleotide A248 und A249, vernetzt werden (Abb. 5-7, H). Dies gelang auch Kufel und Kirsebom (1996) mit dem Modellsubstrat pSu3-3XGC (s⁴U an Position -1) durch einen zusätzlichen Crosslink an A245 in P5 (Abb. 5-7, G). In *B. subtilis* konnten mit s⁴U an Position -3 der 5'-Flanke von pre-tRNA^{Asp} (Christian *et al.*, 1998) ebenfalls zwei Nukleotide in J5/15 vernetzt werden (A245, A246). Diese Ergebnisse zusammen belegen die Nähe dieser Region zur Prozessierungsstelle, die durch den Nachweis einer direkten Basenpaarung zwischen A248 und N-1 des Substrates einen definitiven Beweis findet (Zahler *et al.*, 2003).

Durch Interferenzstudien konnten Nukleotide und Phosphate dieser Region als wichtig für die Substratbindung und Katalyse identifiziert werden (Abb. 5-7, I). So wurden für die Phosphate (*pro*-R_p-Sauerstoff) der beiden konservierten Nukleotide A248 und A249 der Einfluss auf die Substratbindung und für funktionelle Gruppen von A249 der Einfluss auf die Katalyse belegt (Hardt *et al.*, 1995; Hardt *et al.*, 1996; Heide *et al.*, 1999 ; Heide *et al.*, 2001 ; Kaye *et al.*, 2002).

Ein weiterer Beleg für die Nähe zum katalytischen Zentrum konnte durch die 5'-APA-Modifizierung von zirkular permutierter RNase P RNA erzielt werden (Harris *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1997), indem intramolekulare Vernetzungen von G68 (P4) und G332 (J18/2), die beide in Regionen des katalytischen Zentrums liegen, mit Nukleotiden in J5/15 festgestellt wurden.

Auch von Nukleotiden des Acceptor- und TψC-Stammes der mat-tRNA wurden Crosslinks mit J5/15 beschrieben. Durch die Verwendung von zirkular permutierten reifen tRNAs, und Positionierung von Azidophenacyl am 5'-Ende der RNAs konnten Vernetzungen der Position 64 (TψC-Stamm) und 69 (Acceptor-Stamm) mit A248/A249 bzw. A248 erzielt werden.

Mit Azidophenacyl an den Positionen 73-76 von pre-tRNA^{Asp} (Oh und Pace, 1994) wurde diese Region allerdings nicht identifiziert (Abb. 5-7, E). In *P. marinus* hingegen konnte mit 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA}, welches in der Positionierung der APA-Gruppe vergleichbar ist, die Nukleotide 242-246 identifiziert werden (Abb. 5-7, A). Diese Vernetzung des 3'-CCA-Endes mit P5 und J5/15 ist ein Beleg für einen neuartigen Substratbindungsmodus in *P. marinus*, wie er aufgrund des Fehlens des GGU-Bindungsmotives zu erwarten war. Mit der reifen tRNA, welche am 3'CCA-Ende den Crosslinker trägt (3'APA-mat-tRNA_{CdCsA}), ist eine deutlich schwächere Vernetzung festzustellen (Abb. 5-7, B). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der P15/P16-Region ist also auch hier eine veränderte tRNA-Bindung bei Ab- und Anwesenheit der 5'-Flanke festzustellen. Die Positionierung des Crosslinkers an Nukleotid -15 der 5'-Flanke (5'APA-pre-tRNA_{CCA}) führt zu keinen Crosslinks in dieser Region. Dies steht allerdings nicht im Gegensatz zu Untersuchungen zu *E. coli* und *B. subtilis*, da Crosslinker in der 5'-Flanke bislang lediglich an Position -1 bis -10 Verwendung fanden. Mit diesen Konstrukten konnte für *B. subtilis* RNase P RNA gezeigt werden, dass die 5'-Flanke auf einer Oberfläche zu liegen kommt, die sich von J5/15 (Crosslinks mit nt +1, -1 und -3) über J18/2 (Crosslinks mit nt -1, -3 und -5) und J16/15 (Crosslinks mit nt -5, -7 und -10) bis hin zum peripheren Element P3 (Crosslinks mit nt -10) erstreckt (Christian und Harris, 1999). Die APA-Gruppe an Position -15 in 5'APA-pre-tRNA_{CCA} ist somit nicht in der Nähe der J5/15 Region. Es ist aber

anzunehmen, dass Nukleotide der 5'-Flanke, die sich näher an der Prozessierungsschnittstelle (+1) befinden, sich analog zu den Ergebnissen in *E. coli* und *B. subtilis* auch in der Nähe von J5/15 befinden. Diese Annahme gründet sich auf den sehr starken Crosslinks (A242-A246), die mit 5'APA-mat-tRNA_{CCA}, welches den Crosslinker an Position +1 trägt, erhalten werden. Dies zeigt, dass auch in *P. marinus* RNase P RNA die J5/15 Region zum aktiven Zentrum gehört, und sich wie in *E. coli* in der Nähe zur Prozessierungsstelle befindet. Durch das Fehlen des GGU-Bindungsmotives in *P. marinus* und die damit fehlende Fixierung des 3'-CCA-Endes, wird die tRNA anders gebunden, als es bei Vorhandensein dieser Wechselwirkung (wie z. B. in *E. coli*) möglich ist.

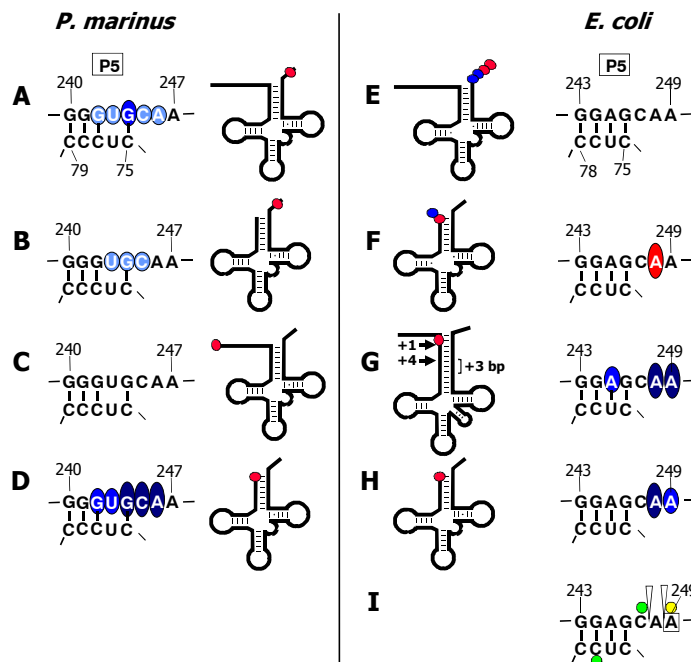


Abb. 5-7: Crosslinks in Region P5 und J5/15

Gezeigt ist der entsprechende Ausschnitt der Sekundärstruktur von *P. marinus* und *E. coli* RNase P RNA, in dem durch Crosslink-Experimente identifizierte Nukleotide blau (bzw. rot und blau) hervorgehoben sind (A-H). In I) sind Interferenzstudien (Phosphorothioat und NAIM) und chemische Footprint-Analysen in *E. coli* zusammengefasst. Legende wie in Abb. 5-4 beschrieben.

5.5.3.5. Region von P3 und P4

Die Region von J3/4 und P4 ist der universell am höchsten konservierte Bereich aller RNase P RNAs und ist eingebettet in die dicht gepackte Kernstruktur der RNA. Durch Interferenzstudien und NAIM konnte ihm eine große Bedeutung in Substratbindung und Katalyse zugeordnet werden (Abb. 5-8, E). So konnte in M1-RNA durch Phosphorothioat-Interferenz an den nicht verbrückenden Phosphat-Sauerstoffatomen (Rp-Sauerstoff) der nt 68-71 und 352-354 ein Einfluss auf die Substratbindung nachgewiesen werden, welcher bei den Nukleotiden 68 und 69 durch Mn^{2+} wieder kompensiert werden konnte. Für diese beiden Nukleotide wird deshalb eine Mg^{2+} -Bindungsstelle diskutiert (Hardt *et al.*, 1995). Durch Selbstspaltungs-Experimente zirkular permutierter M1-RNA, die mit pre-tRNA^{ASP} verknüpft ist, konnte für die Nukleotide 66-68 und 352 der Einfluss des *pro*-Rp-Sauerstoffs, und für A67 zusätzlich der des *pro*-Sp-Sauerstoffes, auf die Katalyse gezeigt werden. Durch Wiederherstellung der katalytischen Aktivität in Gegenwart von Mn^{2+} ist für *pro*-Rp- und *pro*-Sp-Sauerstoff von A67 jeweils die direkte Koordination eines Mg^{2+} -Ions anzunehmen (Harris und Pace, 1995; Christian *et al.*, 2002). Die Koordination der Mg^{2+} -Ionen für Substratbindung und Katalyse wird

hierbei durch den konservierten *Bulge* (U69) unterstützt, dessen definierte Position in P4 für die Ausbildung der optimalen lokalen Geometrie sorgt (Kaye *et al.*, 2002).

Durch NAIM konnten zusätzliche funktionelle Gruppen und Positionen von Nukleotiden in P4 und J3/4 bestimmt werden (Abb. 5-8, E), die durch ihren Beitrag zum Netzwerk der Wasserstoffbrücken und Struktur Einfluss auf die Substratbindung und Prozessierung ausüben (Kazantsev und Pace, 1998; Heide *et al.*, 2001; Heide *et al.*, 1999; Hardt *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse unterstreichen die große Bedeutung von P4 und J3/4 für die Substratbindung und Katalyse durch das Ribozym.

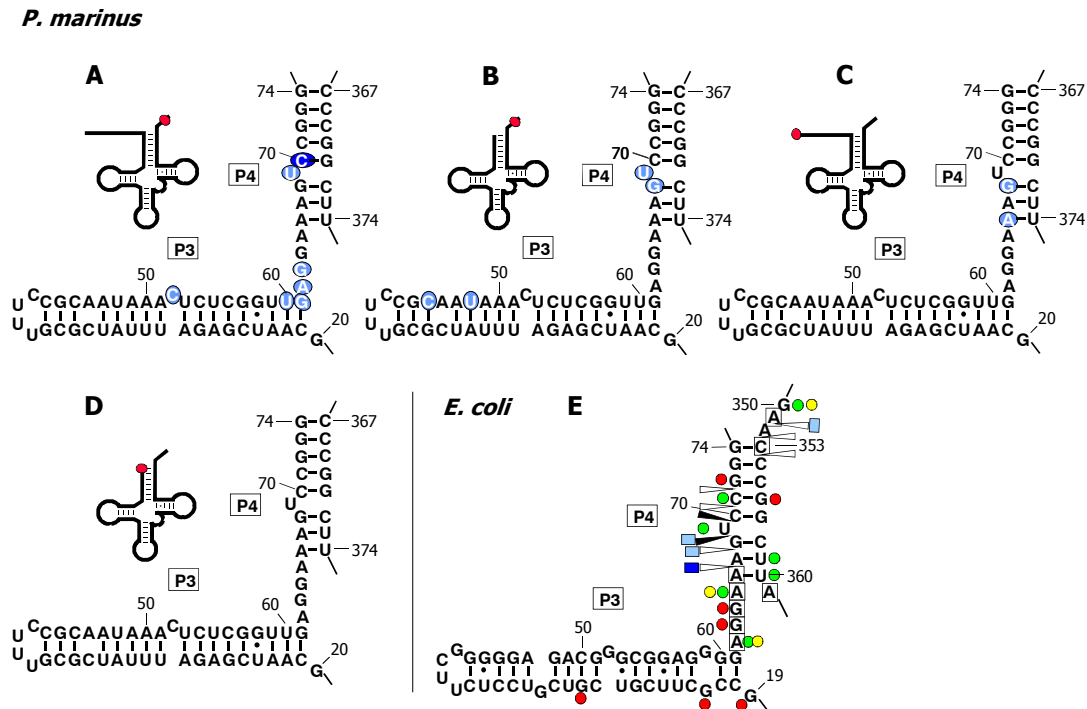


Abb. 5-8: Crosslinks in Region P3 und P4

Gezeigt ist der entsprechende Ausschnitt der Sekundärstruktur von *P. marinus* RNase P RNA, in dem durch Crosslink-Experimente identifizierte Nukleotide blau hervorgehoben sind (A-D). In F) sind Interferenzstudien (Phosphorothioat und NAIM) und chemische Footprint-Analysen in *E. coli* zusammengefasst. Legende wie in Abb. 5-4 beschrieben. Zusätzlich haben Nukleotide in Boxen und Phosphate (◻▷: Phosphorothioat-Effekt; ◻▷: Phosphorothioat-Effekt mit Mn^{2+} -Kompensation) Einfluss auf die Katalyse.

Durch intramolekulare Crosslinks mit 5'- und 3'-APA-Modifizierungen der zirkular permutierten M1-RNA konnte G68 (P4) mit Nukleotiden in P5, J5/15, P15, L15/16 und L16/15 vernetzt werden, was die Zugehörigkeit dieser Region zum aktiven Zentrum belegt (Harris *et al.*, 1997).

Obwohl somit auch die Nähe von P4 zur pre-tRNA-Prozessierungsstelle nahe liegt, konnte diese Helix bisher nicht durch Crosslink-Experimente mit der Schnittstelle oder dem 3'-Ende von pre- und mat-tRNAs vernetzt werden. Mit s^4U modifizierter M1-RNA konnten jedoch Crosslinks von U69 mit den Nukleotiden -8 und -10 der 5'-Flanke von pre-tRNA^{Tyr} erhalten werden (Tab. 5-2; Pomeranz-Krummel und Altman, 1999).

Weitere Crosslinks mit P4 und J3/4 konnten bislang nur mit dem Acceptor- und TψC-Stamm erhalten werden. Nolan *et al.* (1993) verwendeten eine zirkular permutierte tRNA^{Asp}, an die an Position 64 (TψC-Stamm), dem 5'-Ende dieser reifen tRNA, Azidophenacyl positioniert war. Eine Vernetzung

konnte mit G64-A67 detektiert werden. Harris *et al.* (1994) positionierten den Crosslinker in einer entsprechend zirkular permutierten tRNA an nt 69 (Acceptor-Stamm) und identifizierten die selben Nukleotide der RNase P RNA.

Mit den hier gezeigten Crosslinks in *P. marinus* RNase P RNA konnte erstmals eine Verknüpfung zwischen P4 und dem 3'-CCA-Ende und der 5'-Flanke nachgewiesen werden. Für 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} (Abb. 5-8, A) und 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA} (Abb. 5-8, B) konnten Crosslinks mit U69-C70 bzw. G68-U69 festgestellt werden. Für 5'APA-pre-tRNA_{CCA} (Abb. 5-8, C) wurden Vernetzungen mit A66 und G69 identifiziert. Mit 5'APA-mat-tRNA_{CCA} (Abb. 5-8, D) konnten allerdings in dieser Region keine Crosslinks ermittelt werden.

Nur für 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} und 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA} wurden auch Crosslinks in P3 festgestellt (C52 bzw. C45 und U48). 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} (Abb. 5-8, A) ergab sogar zusätzliche Vernetzungen in J3/4 (U60-G63), was wiederum ein Indiz dafür ist, dass pre- und mat-tRNA in *P. marinus* RNase P RNA unterschiedlich gebunden werden.

Crosslinks von tRNAs mit P3 konnten bislang nur in *B. subtilis* RNase P RNA gezeigt werden. Mit s⁴U an Position -10 der 5'-Flanke von pre-tRNA^{Asp} wurden A36 und U37 in der bei *B. subtilis* sehr verkürzten Helix P3 vernetzt.

Durch intramolekulare Crosslinks der APA-modifizierte zirkular permutierte M1-RNA konnte G52 mit Nukleotiden von P15, L15/16, P16 und L16/15 (Chen *et al.*, 1998) sowie im umgekehrten Ansatz G250 (in P15) mit Nukleotiden in P3 (Harris *et al.*, 1997) vernetzt werden. Diese intramolekularen Crosslinks belegen die Nähe dieses etwas peripheren Elementes zu Regionen des aktiven Zentrums, so dass die in *P. marinus* erhaltenen Crosslinks in P3 und J3/4 (Abb. 5-8, A-B) eine Erklärung finden.

5.5.3.6. Die Region von P7 bis P11 (Kruziform)

Die Helices P7 bis P11, die zusammen das Kruziform-Sekundärstrukturelement bilden, treten mit dem TψC-Stamm und TψC-Schleife der pre-tRNA in *E. coli* und *B. subtilis* in Kontakt.

Insbesondere im TψC-Stamm interagieren dabei Nukleotide mit ihrer 2'-OH-Gruppe mit P9 (Pan *et al.*, 1995; Loria und Pan, 1997). Ein weiterer Kontakt konnte durch Crosslinks des in tRNAs konservierten G18 mit A232 und A233 in P11 gezeigt werden (Chen *et al.*, 1998). Hierzu wurde zirkular permutierte tRNA^{Asp} mit 5'-Azidophenacyl an G18 verwendet. Mit der gleichen Strategie konnten auch die Nukleotide 64 und 53 des TψC-Stammes mit Nukleotiden in den Schleifen L8 und L9 vernetzt werden (Nolan *et al.*, 1993). Durch direkte UV-Bestrahlung konnte in M1-RNA ein Crosslink zwischen C92 und dem Nukleotid -3 der 5'-Flanke von pre-tRNA^{Tyr} erhalten werden (Guerrier-Takada *et al.*, 1989).

In Gegenwart von pre- und mat-tRNA sind A118 in P9 und A233 in P11 vor chemischer Modifikation durch DMS geschützt, und belegen damit zusätzlich einen Kontakt dieser Region mit dem Substrat (LaGrandeur *et al.*, 1994). Durch NAIM wurden hauptsächlich Nukleotide in P8 und P9 ermittelt, die einen Beitrag zur Substratbindung liefern (Heide *et al.*, 2001; Heide *et al.*, 1999). Ein sehr schwacher Crosslink zwischen G+1 in mat-tRNA^{Phe} und U231 (Burgin und Pace, 1990) sowie ein Crosslink

zwischen Nukleotid -1 im Modellsubstrat pSu3-3XGC (s⁴U) und C235 in P11 (Abb. 5-9, E) sind bislang die einzigen Interaktionen in diesem Bereich, die in direkter Nähe zur Prozessierungsschnittstelle zu sehen sind.

Die in *P. marinus* beobachteten Crosslinks in P9 von 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA} (Abb. 5-9, B) und 5'APA-pre-tRNA_{CCA} (Abb. 5-9, C) belegen die Nähe des 3'-CCA-Endes von reifer tRNA und 5'-Flanke der pre-tRNA zu P9. Auch hier ist wieder eine unterschiedliche Orientierung des 3'-CCA-Endes von pre- und mat-tRNA auf der Oberfläche des Ribozyms festzustellen. Mit 5'APA-mat-tRNA_{CCA} konnten die in *E. coli* festgestellten Crosslinks von G+1 (mat-tRNA^{Phe}) und Nukleotid -1 (pSu3-3XGC) nicht bestätigt werden.

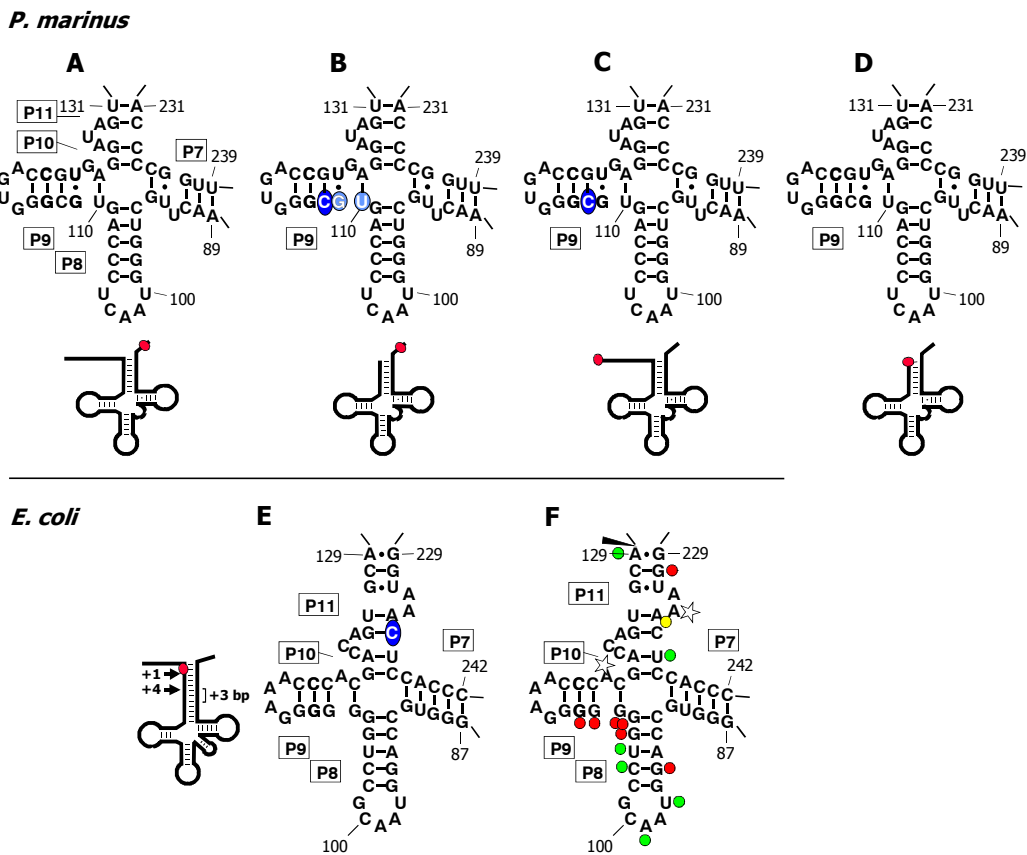


Abb. 5-9: Crosslinks in Region P7 bis P11

Gezeigt ist der entsprechende Ausschnitt der Sekundärstruktur von *P. marinus* und *E. coli* RNase P RNA, in dem durch Crosslink-Experimente identifizierte Nukleotide blau hervorgehoben sind (A-E). In F sind Interferenzstudien (Phosphorothioat und NAIM) und chemische Footprint-Analysen in *E. coli* zusammengefasst. Legende wie in Abb. 5-4 beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch Crosslink-Experimente im homologen *P. marinus* System pre- und mat-tRNA^{Arg} mit den gleichen Regionen des katalytischen Zentrums (J18/2, Region P15/P16, J5/15) interagieren, wie sie in *E. coli* und *B. subtilis* RNase P RNA bestimmt wurden. Dies bedeutet, dass tRNAs auf einer vergleichbaren Oberfläche (Lage und Orientierung) gebunden werden. Durch die fehlende Fixierung des 3'-CCA-Endes durch Basenpaarungen, wie sie mit dem GGU-Motiv in J16/15 von M1-RNA stattfindet, werden die tRNAs in *P. marinus* RNase P RNA weniger starr an

das Ribozym gebunden. Dies führt dazu, dass nicht einzelne definierte Nukleotide erkannt werden, sondern größere zusammenhängende Bereiche (J18/2, J16/15, J15/16, J5/15). Zusätzlich konnten auch zu erwartende Interaktionen identifiziert werden, die in bisherigen Crosslink-Experimenten nicht oder nur geringfügig auftraten. So stellen die Crosslinks mit P4, J3/4 und P3 eine Besonderheit dar, die aus verschiedenen biochemischen Untersuchungen (z. B. Mutationsanalysen, Phosphorothioat-Interferenz, NAIM) zu erklären sind. Die Crosslinks der 3'-APA-markierten tRNAs mit P5 und J5/15 (Abb. 5-9, A-B) im Vergleich zu 3'-APA modifizierten pre-tRNA^{Asp} (Abb. 5-9, E; Oh und Pace, 1994), die in dieser Region keine Crosslinks zeigen, belegen die zu erwartende flexiblere Positionierung des 3'-CCA-Endes in *P. marinus* RNase P RNA.

Durch 5'APA-mat-tRNA_{CCA}, welches der 5'APA-mat-tRNA^{Phe} von Burgin und Pace (1990) gleicht, wurden vernetzte Nukleotide in P15, J15/16, P16 und J16/15 identifiziert (Abb. 5-9, D), die in M1-RNA nicht gefunden wurden. Dies belegt, dass in *P. marinus* RNase P RNA ein anderer Modus der Produkt-Bindung stattfindet als in *E. coli*.

Durch unterschiedliche Crosslinks in P6, P18, J5/15 und J3/4 konnte gezeigt werden, dass pre-tRNAs durch einen anderen Modus an das *P. marinus* Ribozym gebunden werden, als reife tRNAs. Ein unterschiedlicher Bindungsmodus für tRNAs wurde auch in *E. coli* in Abhängigkeit von der Interaktion zwischen GGU-Motiv und 3'-CCA-Ende postuliert. So konnten Pomeranz-Krummel und Altman (1999) durch ⁴U-Crosslinks feststellen, dass pre-tRNA^{Tyr} in Anwesenheit des 3'-CCA-Endes anders gebunden wird, als in dessen Abwesenheit. Einen unterschiedlichen Substratbindungsmodus postulierten auch Kufel und Kirsebom (1996). Sie stellten fest, dass Wildtyp M1-RNA das Modellsubstrat pSu3-3XGC in einem anderen Modus bindet, als M1_{C292}-RNA, bei der das GGU-Motiv zu CGU mutiert wurde, und somit die Wechselwirkung mit dem 3'-CCA-Ende gestört ist.

Es ist auffällig, dass die Muster der erhaltenen Crosslinks in *P. marinus* RNase P RNA für alle vier verwendeten tRNAs dem des Modellsubstrates pSu3-3XGC sehr ähnlich sind. Da für dieses Substrat in M1-RNA zwei verschiedene Bindungsmodi existieren, die zur Prozessierung an Position +1 und +4 führen, liegt die Vermutung nahe, dass in *P. marinus* RNase P RNA auch zwei unterschiedliche Bindungsmodi existieren, die sich zwar im Muster der Crosslinks widerspiegeln, von denen aber nur einer zur korrekten Prozessierung an Position +1 führt.

Durch NAIM von pre- und mat-tRNAs konnten Heide *et al.* (2001) zusätzlich zeigen, dass sich Substrat- und Produktbindung für tRNA^{Gly} in M1-RNA unterscheiden.

Zur besseren Veranschaulichung der diskutierten Crosslinks in *P. marinus* und *E. coli* RNase P RNA sind diese in Raumstrukturmodelle eingezeichnet, und für die verwendeten tRNAs in Abb. 5-10 und Abb. 5-11 vergleichend gegenübergestellt. Das hierzu verwendete Modell von *P. marinus* RNase P RNA wurde mit dem Programm ERNA-3D in Anlehnung an die M1-RNA-Struktur (Massire *et al.*, 1998) erstellt (4.13.).

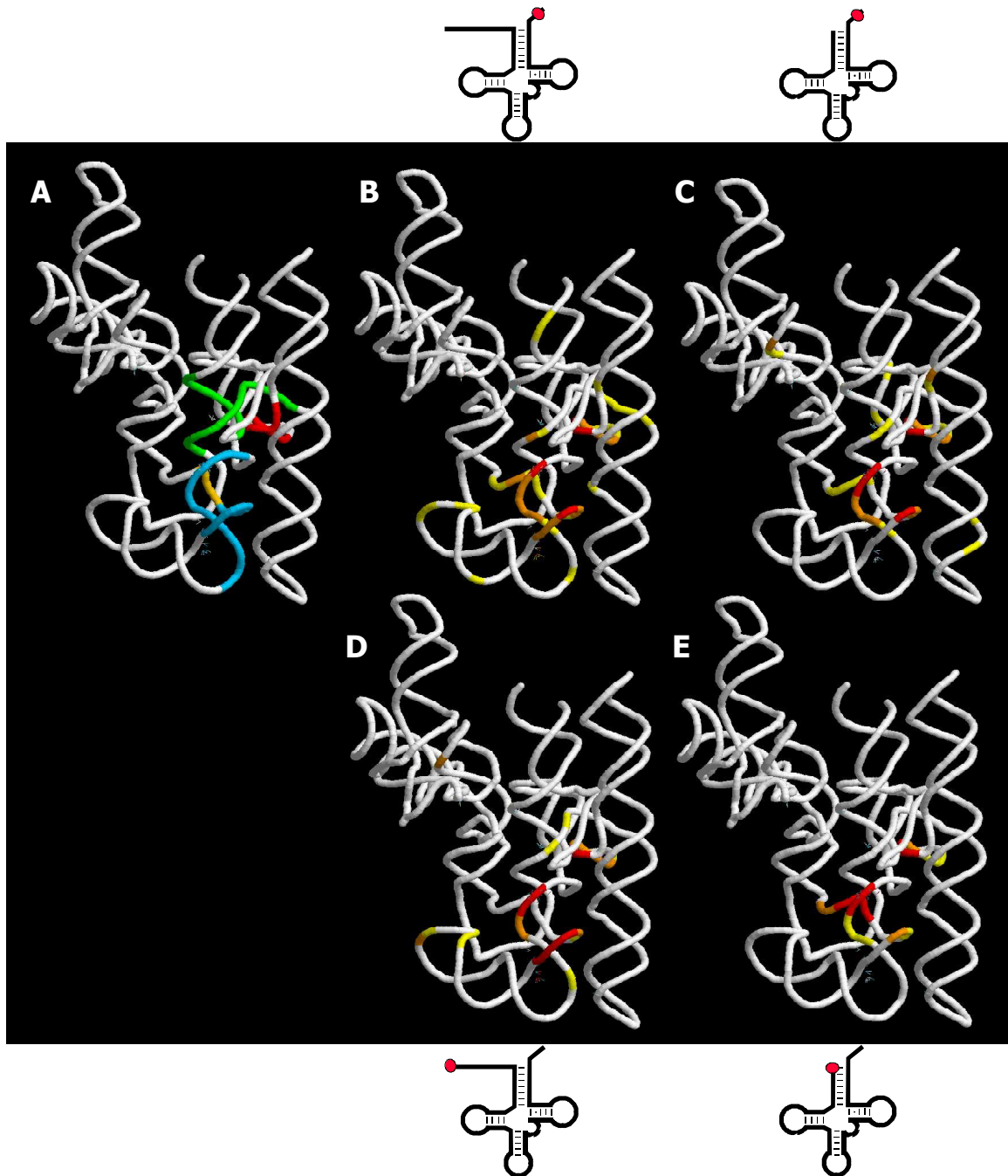


Abb.:5-10: Crosslinks in *P. marinus* RNase P RNA im Raumstrukturmodell

Gezeigt ist das postulierte Raumstrukturmodell von *P. marinus* RNase P RNA (4.13.). In A) sind die Regionen des katalytischen Zentrums (J18/2 (rot); P15, L15/16, L16/15 (hellblau); J5/15 (gelb); P4, J3/4 (grün)) hervorgehoben. In B-E) sind die ermittelten Crosslinks eingezeichnet (rot: sehr starke Signale; orange: starke Signale; gelb: schwache Signale), die mit den jeweiligen modifizierten tRNAs (schematisch gezeigt, mit Position des Crosslinkers) erhalten wurden.

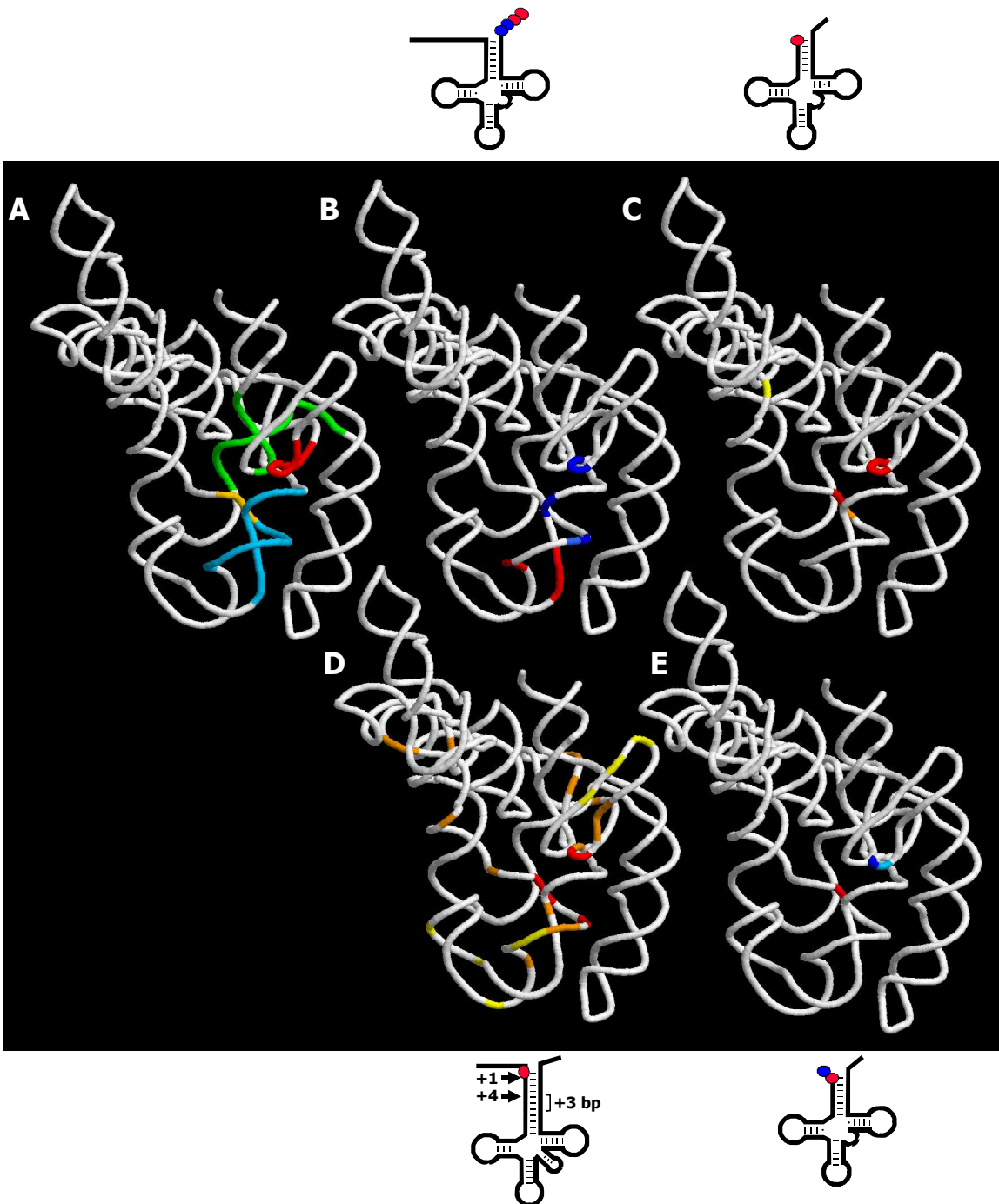


Abb.:5-11: Crosslinks in *E. coli* RNase P RNA im Raumstrukturmodell

Gezeigt ist das postulierte Raumstrukturmodell von *E. coli* RNase P RNA (Massire *et al.*, 1998). In A sind die Regionen des katalytischen Zentrums (J18/2 (rot); P15, L15/16, L16/15 (hellblau); J5/15 (gelb); P4, J3/4 (grün)) hervorgehoben. In B-E sind die ermittelten Crosslinks eingezeichnet (rot und dunkelblau: sehr starke Signale; orange und hellblau: starke Signale; gelb: schwache Signale), die mit den jeweiligen modifizierten tRNAs (schematisch gezeigt, mit Position des Crosslinkers) erhalten wurden.

5.6. Experimente mit dem *short-range*-Crosslinker s^2C in *P. marinus* tRNA^{Arg}

Der künstliche Einbau von s^2CTP , welches als natürliches CTP-Analogon in prokaryotischen tRNAs im Anticodon und T ψ C-Loop gefunden wurde, in das 3'-CCA-Ende von Hefe tRNA^{Phe} wurde erstmals 1973 von Sprinzl *et al.* beschrieben. Die mit Hilfe von Hefe Nukleotidyltransferase modifizierte tRNA_{Cs²CA} zeigte ein natürliches Acylierungsverhalten (Baksht *et al.*, 1977). Da s^2C (2-Thiocytydin) durch UV-Licht (Wellenlängen >254 nm) anregbar ist, kann es als Crosslinker verwendet werden. Diese Eigenschaft nützten Wang und Rufner (1997) erfolgreich für Crosslink-Untersuchungen des Hammerhead-Ribozyms.

Um ein natürlicheres 3'-CCA-Ende der *P. marinus* pre-tRNA^{Arg} zu erhalten, wurde mit der überexprimierten *E. coli* Nukleotidyltransferase (4.5.1.) das 3'-CCA-Ende von pre-tRNA_C zu pre-tRNA_{Cs²CA} vervollständigt (4.5.4.). Eine weitergehende Modifizierung der Thiocarbonyl-Gruppe mit Azidophenacyl (4.7.4.) führte zu 3'APA-pre-tRNA_{Cs²CA}. In Crosslink-Experimenten mit *P. marinus* RNase P RNA konnte allerdings mit keinem dieser beiden 3'-modifizierten tRNAs spezifische Ribozym-Substrat-Komplexe erzeugt werden (4.9.). Dieses Ergebnis überrascht, da mit den verwendeten Wellenlänge von 254 bzw 302 nm die Ausbildung kovalenter Verknüpfung möglich sein sollte.

5.7. RNase P RNA aus Cyanellen von *C. paradoxa*

C. paradoxa ist eine eukaryotische Alge, die zur Klasse der Glaucophyceae zählt. Im Inneren der Zelle befinden sich 1-4 photosynthetische Zellorganellen, die Cyanellen, die aus phylogenetischer Sicht ein echtes Intermediat zwischen Cyanobakterien und modernen Chloroplasten darstellen. Für sie konnten Baum und Schön (1996) die erste RNA-Untereinheit einer RNase P aus photosynthetischen Organellen nachweisen. Diese RNA ist im Cyanellen-Genom codiert und zeigt große Homologie zu cyanobakteriellen RNase P RNAs. Die Sekundärstruktur vom Typ A konnte durch Strukturuntersuchungen bestätigt werden (Cordier und Schön, 1999). *In vitro* ist sie im Gegensatz zu anderen cyanobakteriellen RNase P RNAs aber katalytisch inaktiv.

Das Abweichen ihrer Sequenz an zwei sonst voll konservierten Positionen (A213, A22) vom bakteriellen Konsensus ist nicht der Grund für die fehlende Ribozym-Eigenschaft (Cordier, 1998; Heubeck, 2003).

Ebenso wie die Mehrzahl der cyanobakteriellen RNase P RNAs verfügt die Cyanellen RNA nicht über das GGU-Motiv als Bindungsstelle für das 3'-CCA-Ende von tRNAs. Substrate mit 3'-CCA-Ende werden von *C. paradoxa* RNase P aber effizienter umgesetzt als Substrate ohne CCA-Ende (Gimple, 1999; Gimple und Schön, 2001). Das Fehlen des CCA-Bindungsmotivs in nahezu allen cyanobakteriellen RNase P RNAs schließt eine hierdurch verhinderte Substratbindung als Grund für die fehlende Cyanellen-Ribozym-Aktivität ebenfalls aus (Hess *et al.*, 1998).

Um weitergehend zu untersuchen, ob die fehlende Ribozymaktivität von *C. paradoxa* RNase P RNA auf das Fehlen der Fähigkeit zur Substratbindung zurückzuführen ist, wurde eine zirkular permutierte *C. paradoxa* RNase P RNA mit kovalent verknüpfter pre-tRNA (pre-tRNA^{Glu}, pre-tRNA^{Tyr}) konstruiert (Heubeck, 2003). Hierbei zeigte keines der Konstrukte *in vitro* Prozessierungsaktivität. Heterologe Rekonstitution dieser Konstrukte mit rekombinantem *Synechocystis* RNase P-Protein zum Holoenzym erbrachte hingegen eine erfolgreiche intramolekulare Prozessierung von pre-tRNA^{Tyr}.

Die trotz der grossen Homologie zu bakteriellen RNase P RNAs fehlende Ribozymaktivität von *C. paradoxa* spricht für weitergehende Aufgaben der Protein-Untereinheit, als dies für das bakterielle Protein der Fall ist. Da aber die heterologe Rekonstitution von *C. paradoxa* RNase P RNA und cyanobakteriellen RNase P-Proteinen zum aktiven Holoenzym möglich ist, muss dennoch davon ausgegangen werden, dass keine essentiellen Katalyseaufgaben auf die *C. paradoxa* Protein-Untereinheit übergegangen sind. Da die Behandlung mit einer exogenen Nuklease die RNase P-Aktivität jedoch irreversibel zerstört, muss die identifizierte RNA-Untereinheit also eine essentielle Komponente für die katalytische Aktivität des Enzyms sein (Cordier und Schön, 1999).

Der Ausgangspunkt für eine weitergehende Untersuchung der RNase P RNA aus den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa* war die Frage nach der Substratbindung dieser *in vitro* katalytisch inaktiven RNase P RNA. Dies sollte durch Crosslink-Experimente mit modifizierten tRNAs, die den long range Crosslinker Azidophenacyl am 5'-Ende von pre- und mat-tRNA^{Arg} tragen, analog zu den Untersuchungen im homologen *P. marinus* System aufgeklärt werden.

5.7.1. Crosslink-Experimente mit *C. paradoxa* RNase P RNA

In Crosslink-Reaktionen mit 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA}, 3'APA-mat-tRNA_{CdCsA}, 5'APA-pre-tRNA_{CCA} und 5'APA-mat-tRNA_{CCA}, die analog zu den Reaktionen mit *P. marinus* RNase P RNA durchgeführt wurden, bildete auch RNase P RNA aus *C. paradoxa* spezifische Crosslink-Komplexe. Da die Effizienz der Komplex-Bildung nur für die beiden Vorläufer-tRNAs groß genug war, wurden nur diese aufgereinigt und analysiert. Die in der RNase P RNA identifizierten vernetzten Nukleotide sind in Tab. 4-4, Abb. 4-62 sowie Abb. 4-63 zusammengefasst.

Es zeigt sich, dass sich die Substratbindungs-Oberfläche in *C. paradoxa* grundlegend von der in *E. coli* und *P. marinus* unterscheidet. Starke Signale finden sich in den Regionen P2, J2/4, J5/15, P6, P7, P8, P9 und J14/11. Schwächere Signale finden sich zusätzlich in P3, J3/4, P4, P15 sowie J15/16. Die Muster sind für die beiden verwendeten Substrate 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} und 5'APA-pre-tRNA_{CCA} nahezu identisch. Lediglich in vier Nukleotiden (A26, U28, U58, C174) ist ein Unterschied festzustellen. Da mit katalytisch inaktiven RNase P RNAs bisher keine Crosslink-Untersuchungen durchgeführt wurden, können die erhaltenen Ergebnisse nur mit den in 5.5.3. diskutierten verglichen werden.

5.7.1.1. Die Region J18/2, P2 und J2/4

Einer der auffälligsten Unterschiede zwischen der katalytisch aktiven *P. marinus* RNase P RNA und der katalytisch inaktiven *C. paradoxa* RNase P RNA ist in dieser Region festzustellen. Es finden sich bei *C. paradoxa* in J2/4 sehr starke Crosslinks (U317-C324), die bei der Verwendung der gleichen Substrate in *P. marinus* nicht auftreten (Abb. 5-12, B-C). In *E. coli* wurden in diesem Bereich lediglich bei dem Modellsubstrat pSu3-3XGC (s⁴U an Position -1) Crosslinks festgestellt (Abb. 5-12, D; Kufel und Kirsebom, 1996). In diesem Bereich sind durch Interferenzstudien (Abb. 5-12, E) lediglich die Nukleotide A347 und A351 sowie der nichtverbrückende Sauerstoff (*pro*-Rp) des 5'-Phosphates von A352 als wichtig für die Katalyse und A349 und A351 als einflussreich auf die Substratbindung identifiziert worden (Kaye *et al.*, 2002; Hardt *et al.*, 1995; Hardt *et al.*, 1996; Heide *et al.*, 2001; Heide *et al.*, 1999). Zusätzlich konnte durch Mutationsanalysen für G350, welches in 92 % aller Eubakterien konserviert ist, die Beteiligung an einer Mg²⁺ Koordination in direkter Nähe zum katalytischen Zentrum gezeigt werden (Rasmussen und Nolan, 2002). Andere ribozymaktive RNase P RNAs, wie die aus *P. marinus* oder *Synechocystis*, besitzen an der entsprechenden Position ebenfalls dieses konservierte Guanosin. *C. paradoxa* RNase P RNA verfügt an der entsprechenden Position über ein Adenosin. Aufgrund des HSAB-Prinzips (*hard and soft acids and bases*) besitzt dessen NH₂-6-Gruppe keine so stark ausgeprägte Affinität und somit Koordinierungseigenschaften zu Mg²⁺-Ionen wie O6 des Guanosin. Die deshalb verringerten Fähigkeiten der RNase P RNA zur Koordination von essentiellen Mg²⁺-Ionen in direkter räumlicher Nähe zum katalytischen Zentrum könnten für die fehlenden Ribozymeigenschaften verantwortlich sein. Durch die experimentelle Durchführung bedingt, konnte dieses Nukleotid (A326) in den Primer-Extension-Reaktionen allerdings nicht analysiert werden.

Für die beobachteten Crosslinks in P2 (C313-A314) gibt es, wie bereits in 5.5.3.1. erläutert, wenig Vergleichsdaten für diese ansonsten funktionell unbedeutende Helix.

In allen bisher untersuchten katalytisch aktiven RNase P RNAs ist die ungepaarte Region J18/2 ein essentieller Teil des katalytischen Zentrums und der Substratbindungsoberfläche (5.5.3.1.). Im auffälligen Gegensatz hierzu finden sich in *C. paradoxa* keinerlei vernetzte Nukleotide in J18/2. Dieser Befund für J18/2 und das Auftreten der starken Crosslinks in J2/4 zeigen sehr klar, dass die gleichen Substrate (3'APA-pre-tRNA_{CdCsA}, 5'APA-pre-tRNA_{CCA}) von *P. marinus* und *C. paradoxa* unterschiedlich gebunden werden.

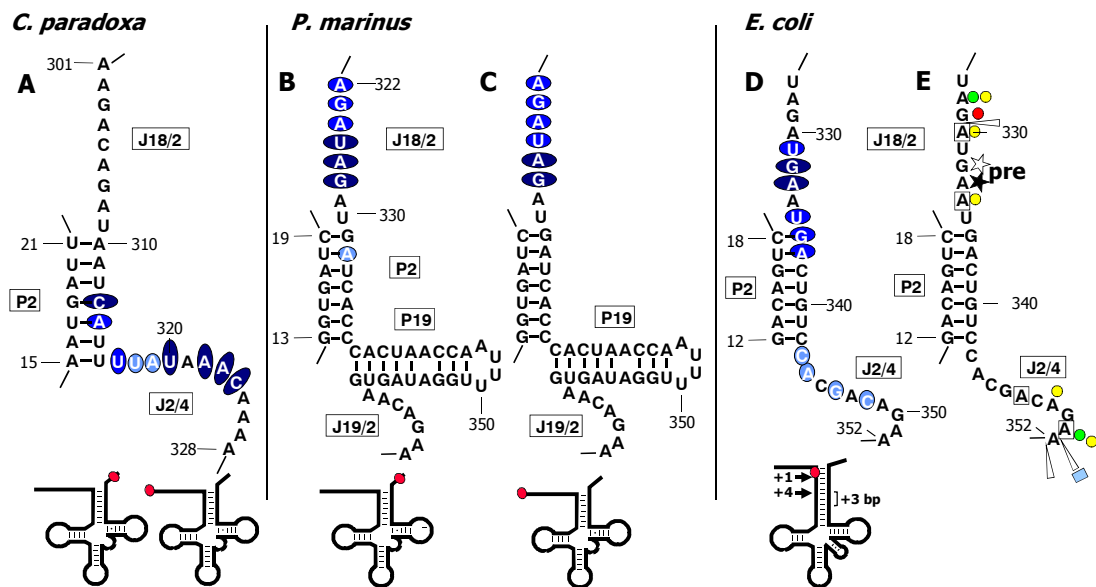


Abb. 5-12: Crosslinks in der Region J18/2, P2 und J2/4

Gezeigt ist der entsprechende Ausschnitt der Sekundärstruktur von *C. paradoxa*, *P. marinus* und *E. coli* RNase P RNA, in dem durch Crosslink-Experimente identifizierte Nucleotide blau hervorgehoben sind (A-D). Die Größe und Farbintensität spiegelt dabei die Signalstärke der Primer-Extension-Analyse wieder. Bei den einzelnen Ausschnitten sind die jeweils verwendeten tRNAs und die Positionierung des Crosslinkreagenzes (rot) schematisch gezeigt. In E) sind Interferenzstudien (Phosphorothioat und NAIM) und chemische Footprint-Analysen (★, ☆) zusammengefasst. Kreise (●: Guanosin 2 NH₂; ●: Ribose 2'OH; ●: Purin N7) und Dreiecke (▷: Phosphorothioat-Effekt; ▶: Phosphorothioat-Effekt mit Mn²⁺-Kompensation) kennzeichnen Nucleotide, die auf die Substratbindung Einfluss haben. Nucleotide in Boxen und Phosphate (▷: Phosphorothioat-Effekt; ▶: Phosphorothioat-Effekt mit Mn²⁺-Kompensation) haben Einfluss auf die Katalyse.

5.7.1.2. Die Region von P15 und P16

In dieser Region, die für katalytisch aktive RNase P RNAs zum katalytischen Zentrum gehört (5.5.3.3.), lassen sich lediglich schwache Crosslinks (G222-U224) in P15 und L15/16 lokalisieren. Dies könnte durch die anomale Struktur von J15/16, welche wie für die meisten Cyanobakterien vom Konsensus abweicht und auch kein GGU-Bindungsmotiv besitzt, erklärt werden. Pascual und Vioque (1999) begründeten die Präferenz von *Synechocystis* RNase P RNA für Substrate ohne 3'-CCA mit der sehr großen J16/15-Schleife, die durch sterische Hinderung eine Interaktion mit dem 3'-CCA-Ende unterbindet. Aus diesem Grund könnten auch in *C. paradoxa* die Substrate durch einen anderen Modus und alternative Kontakte gebunden werden. Vielleicht werden auch durch das Fehlen der Interaktionen mit J18/2 und J16/15 die Prozessierungsstelle der Substrate nicht optimal auf dem Ribozym positioniert, so dass eine Prozessierung unterbleibt.

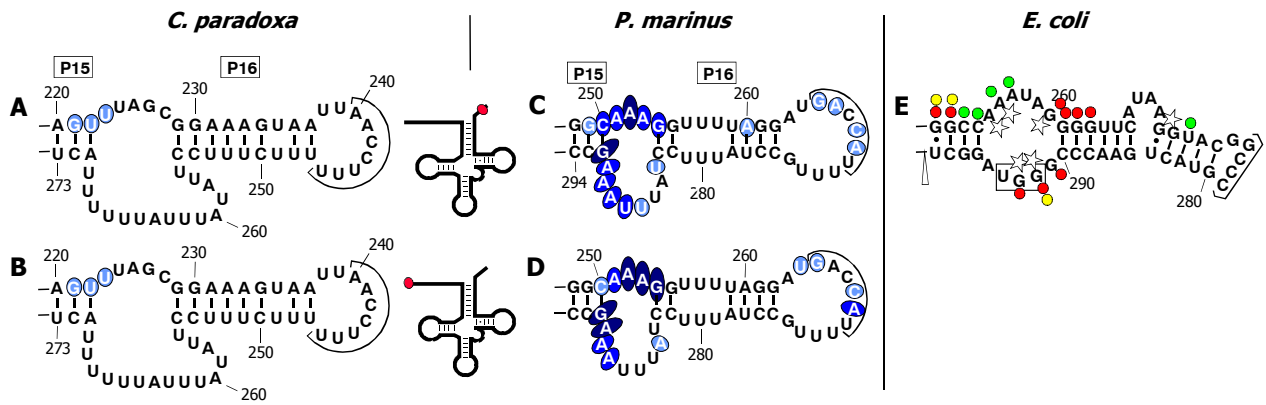


Abb. 5-13: Crosslinks in der Region P15 und P16

Gezeigt ist der entsprechende Ausschnitt der Sekundärstruktur von *C. paradoxa*, *P. marinus* und *E. coli* RNase P RNA, in dem durch Crosslink-Experimente identifizierte Nukleotide hervorgehoben sind (A-D). In E) sind Interferenzstudien (Phosphorothioat und NAIM) und chemische Footprint-Analysen in *E. coli* zusammengefasst. Legende wie in Abb. 5-12 beschrieben.

5.7.1.3. Die Region von P5 und J5/15

3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} hat in *C. paradoxa* nahezu den gleichen Kontakt mit J5/15 und P5 (Abb. 5-14, A) wie *P. marinus* (Abb. 5-14, C; 5.5.3.4.). 5'APA-pre-tRNA_{CCA} hingegen wird von *P. marinus* RNase P RNA durch einen anderen Modus gebunden und zeigt in dieser Region keine Signale (Abb. 5-14, B, D; 5.5.3.4.). Zusätzlich finden sich für beide Substrate in der 5'-Hälfte von P6 starke Signale. Lediglich in *P. marinus* konnten in der 3'-Hälfte von P6 ebenfalls Signale gefunden werden (Abb. 5-13). Diese neuartigen spezifischen Interaktionen der pre-tRNA mit den beiden verschiedenen Strängen von P6 in *C. paradoxa* bzw. *P. marinus* RNase P RNA könnte durch die ungewöhnliche Struktur von J15/16 und J16/15 im cyanobakteriellen Typ der RNase P RNAs begründet sein.

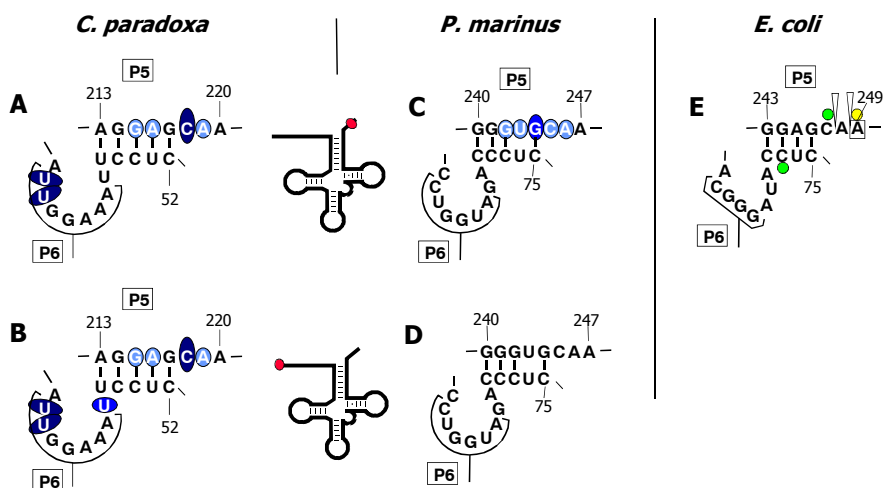


Abb. 5-14: Crosslinks in der Region P5 und J5/15

Gezeigt ist der entsprechende Ausschnitt der Sekundärstruktur von *C. paradoxa*, *P. marinus* und *E. coli* RNase P RNA, in dem durch Crosslink-Experimente identifizierte Nukleotide hervorgehoben sind (A-D). In E) sind Interferenzstudien (Phosphorothioat und NAIM) und chemische Footprint-Analysen in *E. coli* zusammengefasst. Legende wie in Abb. 5-12 beschrieben.

5.7.1.4. Die Region von P4 und P3

In P4 und J3/4, welche als die Kernregion des katalytischen Zentrums angesehen werden, finden sich wie in *P. marinus* (5.5.3.5.) auch in *C. paradoxa* Crosslinks, die in keiner anderen Untersuchung, in der tRNAs an äquivalenten Positionen modifiziert wurden, gezeigt werden konnten (Abb. 5-15, A-D). Dies ist ein Indiz dafür, dass die Substrate in beiden RNase P RNAs zumindest die Nähe zu P4 gemeinsam haben. Der Verlust der Ribozymeigenschaft muss deshalb auf fehlende Interaktionen mit anderen Regionen zurückzuführen sein.

Durch intramolekulare Crosslinks von zirkular permutierter M1-RNA, die Azidophenacyl am 5'-Ende trägt, konnten G63 (J3/4) und G68 (P4) unter anderen auch mit Nukleotiden aus J2/4 vernetzt werden, was eine Nähe dieser beiden Regionen belegt (Harris *et al.*, 1994; Harris *et al.*, 1997). G68 bildete im *E. coli* system zusätzlich Crosslinks mit Nukleotiden aus P5, J5/15, P15 und J15/16 und den in *C. paradoxa* vernetzten Nukleotiden in P15 und J15/16 aus. Da in *C. paradoxa* G46, das Pendant zu G68 aus *E. coli*, im Zusammenhang mit Nukleotiden dieser Regionen vernetzt wurde, ist anzunehmen, dass die RNase P RNA eine ähnliche Tertiärfaltung einnimmt wie in katalytisch aktiven Ribozymen.

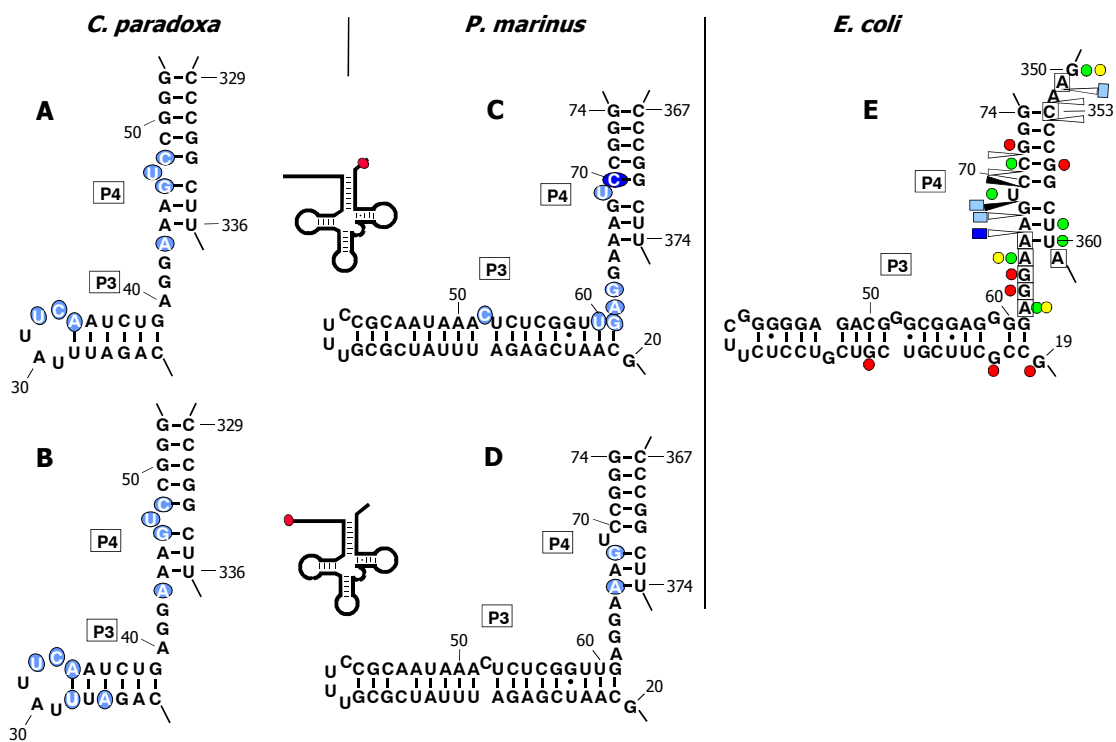


Abb. 5-15: Crosslinks in der Region von P4 und P3

Gezeigt ist der entsprechende Ausschnitt der Sekundärstruktur von *C. paradoxa*, *P. marinus* und *E. coli* RNase P RNA, in dem durch Crosslink-Experimente identifizierte Nukleotide hervorgehoben sind (A-D). In E) sind Interferenzstudien (Phosphorothioat und NAIM) und chemische Footprint-Analysen in *E. coli* zusammengefasst. Legende wie in Abb. 5-12 beschrieben.

5.7.1.5. Die Region von P7 bis P11 (Kruziform)

Die für beide Substrate erhaltenen starken Crosslinks mit dem Kruziform, welches zur Substratbindungsdomäne gehört, sind einzigartig. Diese starken Vernetzungen mit P7, P8, P9 und zusätzlich mit J14/11 belegen eindeutig, dass das 3'-CCA-Ende und die 5'-Flanke der pre-tRNAs auf einer anderen Oberfläche der RNase P RNA gebunden werden, als dies für Substrate in *P. marinus* und anderen katalytisch aktiven RNase P RNAs der Fall ist (5.5.3.6.).

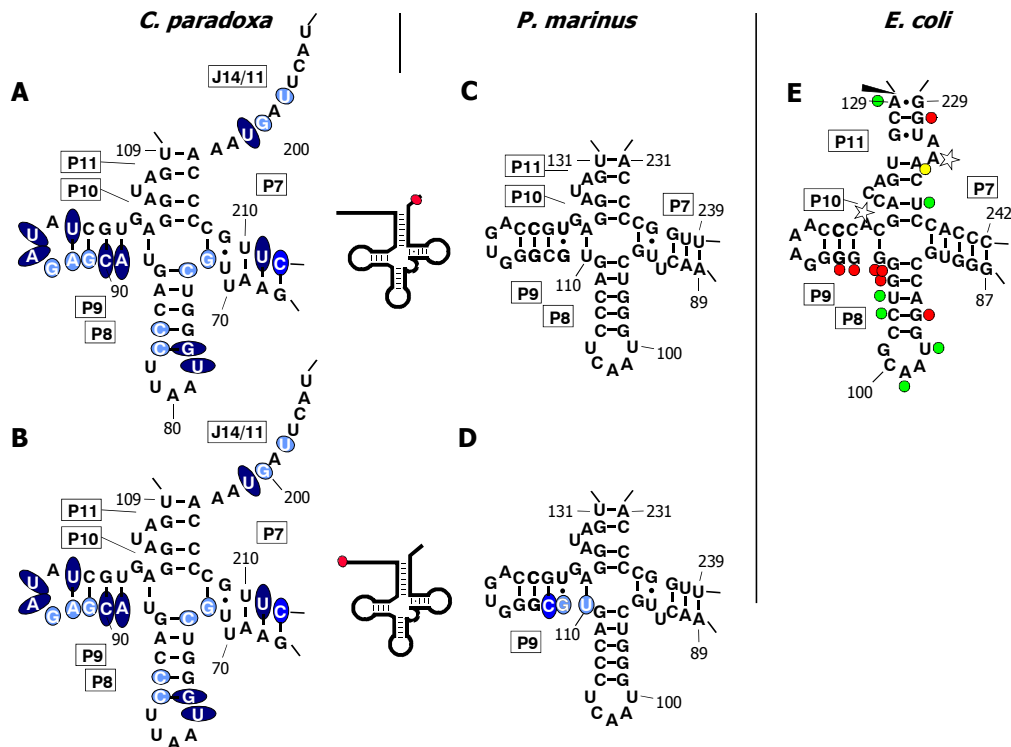


Abb. 5-16: Crosslinks in der Region von P7 bis P11

Gezeigt ist der entsprechende Ausschnitt der Sekundärstruktur von *C. paradoxa*, *P. marinus* und *E. coli* RNase P RNA, in dem durch Crosslink-Experimente identifizierte Nukleotide hervorgehoben sind (A-D). In E) sind Interferenzstudien (Phosphorothioat und NAIM) und chemische Footprint-Analysen in *E. coli* zusammengefasst. Legende wie in Abb. 5-12 beschrieben.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *C. paradoxa* RNase P RNA die Substrate 3'APA-pre-tRNA_{CdCsA} und 5'APA-pre-tRNA_{CCA} in einem anderen Modus bindet als die katalytisch aktive *P. marinus* RNase P RNA.

Sehr auffällig ist hierbei das nahezu identische Muster der identifizierten vernetzten Nukleotide für beide pre-tRNAs, die das Crosslink-Reagenz an den voneinander entfernten 3'- und 5'-Enden enthalten. Dies könnte allerdings mit einer möglichen Ausbildung einer *Hairpin*-Struktur in der 5'-Flanke begründet sein. Diese mit 3,6 kcal/mol begünstigte Struktur würde das 5'-Ende der Flanke näher an die Prozessierungsstelle und das 3'-CCA-Ende heranführen, so dass die Modifizierung am 5'- und 3'-Ende der pre-tRNA zu identischen Crosslinks führt.

Mit den hier gewonnenen Informationen lässt sich die Ursache für die fehlende Ribozym-Eigenschaft der *C. paradoxa* RNase P RNA allerdings nicht ermitteln.

Da die RNase P RNA vom Struktur-Typ A alle Kriterien für eine erfolgreiche Katalyse erfüllt, kann vermutet werden, dass sich die RNA korrekt faltet, und lediglich aufgrund der ungewöhnlichen Struktur der P15/P16-Region (5.2.2.) die Substrate auf einer anderen Oberfläche gebunden werden, wie sie für katalytisch aktive RNase P RNAs festgestellt wurde. Durch diese andersartige Interaktion im Komplex wird die Prozessierungsstelle des Substrates nicht optimal im aktiven katalytischen Zentrum positioniert, was in einer ausbleibenden Prozessierung resultiert. Erst durch die Wechselwirkung mit der Protein-Untereinheit findet die korrekte Platzierung der Schnittstelle im aktiven Zentrum statt, und die Substrate werden hydrolysiert. Crosslinks mit reifer tRNA könnten zusätzliche Daten für eine detailliertere Aussage über die Substratbindung liefern.

Eine alternative Erklärung wäre die fehlerhafte Faltung der *C. paradoxa* RNase P RNA in einer katalytisch inaktiven Konformation, welche zu der hier festgestellten Substratbindung führt. Erst durch die Interaktion der RNase P RNA und der pre-tRNA mit der Protein-Komponente wird die Faltung der RNase P RNA zur aktiven Konformation und die korrekte Positionierung des Substrates bewirkt. Durch *structure-probing*-Experimente und Bleispaltung in An- und Abwesenheit des Proteins könnte geklärt werden, ob die Anwesenheit des Proteins zu einer Konformationsänderung führt.

Es ist allerdings auch nicht ausgeschlossen, dass lediglich die Abweichung des Nukleotides A326 vom konservierten Guanosin (Position 350 in *E. coli*), für welches die Beteiligung an einer Mg^{2+} Koordination in direkter Nähe zum katalytischen Zentrum gezeigt wurde (Rasmussen und Nolan, 2002), für die fehlende Ribozym-Eigenschaft verantwortlich ist. Diese Fragestellung könnte durch entsprechende Mutationsanalysen geklärt werden.

5.8. Ausblick

Der Ausgangspunkt für diese Arbeit war die Frage nach der Prozessierung und Substratbindung von tRNAs durch *P. marinus* RNase P RNA im homologen System sowie die Substratbindung durch die katalytisch inaktive RNase P RNA aus den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa*.

Möglicherweise könnten durch Kinetiken von *P. marinus* RNase P RNA unter *single turn-over* Bedingungen zusätzliche Aussagen gewonnen werden, da hier zwischen dem Einfluss von Substratbindung, Katalyse-Reaktion und Freisetzung des Produktes besser unterschieden werden kann. Um die Substratbindung und Katalyse durch *P. marinus* RNase P RNA weitergehend zu untersuchen, könnten Interferenzstudien mit Phosphorothioat- und Nukleotidanaloga (NAIM) im homologen und heterologen Prozessierungssystem durchgeführt werden. Auch würden analoge Crosslink-Experimente mit modifizierter *P. marinus* tRNA^{Arg} und *E. coli* RNase P RNA die hier gewonnenen Ergebnisse verifizieren. Zusätzlich könnten tRNAs mit deletiertem CCA-Ende in Crosslink-Reaktionen mit

P. marinus RNase P RNA eingesetzt werden. Durch Crosslink-Experimente im heterologen Prozessierungssystem könnten mögliche Unterschiede der Substratbindung in Abhängigkeit vom 3'-CCA-Ende untersucht werden.

Da *C. paradoxa* RNase P RNA an Position A326 vom bakteriellen Konsensus (Guanosin) abweicht, könnten Mutationsanalysen im Bereich von J2/4 Aufschluss darüber geben, ob in dieser Region einzelne Nukleotide für die fehlende Ribozym-Aktivität verantwortlich sind.

Durch Bleispaltungs-Experimente könnten Mg²⁺-Bindungsstellen und die Struktur der RNA-Untereinheit noch detaillierter bestimmt werden. Mit chemischen und enzymatischen Strukturuntersuchungen an heterolog rekonstituierter RNase P kann eine mögliche Strukturänderung der *C. paradoxa* RNase P RNA festgestellt werden, die durch die Anwesenheit der Proteinuntereinheit induziert wird. Quervernetzungsversuche zwischen *C. paradoxa* RNase P RNA und cyanobakteriellem Protein könnten weiteren Aufschluss über die Bedeutung der Protein-Untereinheit für die Katalyse geben.

Durch Mutationsanalyse der J16/15 Region könnte ein möglicher Zusammenhang dieses ungewöhnlich großen einzelsträngigen Bereiches mit der fehlenden katalytischen Aktivität untersucht werden. Insbesondere eine Verkleinerung dieses J16/15 Bereiches wäre ein interessanter Ansatzpunkt, um die Ursache für die fehlende katalytische Aktivität durch die nackte RNA zu klären.

6. Zusammenfassung

Ribonuklease P (RNase P) ist eine essentielle Endonuklease, welche die 5'-Flanke von pre-tRNAs entfernt. Die RNase P RNA des Cyanobakteriums *Prochlorococcus marinus* ist *in vitro* katalytisch aktiv und bevorzugt in heterologen Prozessierungssystemen Substrate mit vollständigem 3'-CCA-Ende. Diese Substratspezifität widerspricht den Erwartungen, da tRNAs in *P. marinus* nicht mit dem CCA-Ende codiert sind und die RNase P RNA auch nicht das GGU-Bindungsmotiv für diese CCA-Enden aufweist.

Um die Substratspezifität und Aufbau des Ribozym-Substrat-Komplex von *P. marinus* RNase P RNA im homologen System untersuchen zu können, wurden Transkriptionsklone für *P. marinus* pre- und mat-tRNA^{Arg}_{CCU} konstruiert, mit denen nach entsprechender Restriktionshydrolyse Transkripte mit stufenweise verkürzten 3'-CCA-Ende synthetisiert werden können.

Durch enzymkinetische Untersuchungen der Prozessierung durch *P. marinus* RNase P RNA wurde unter *steady-state*-Bedingungen für pre-tRNA_{CCA} eine Michaelis-Menten Konstante von 6,92 μM ermittelt. Die Entfernung von A76 und C75 des 3'-CCA-Endes führt zu einer Erhöhung der K_M (7,13 μM bzw. 19,68 μM). Diese Substrate werden folglich weniger stark gebunden, was sich auch in der freien Bindungsenthalpie $\Delta\Delta G$ von 0,02 und 0,65 kcal/mol ausdrückt. Die Entfernung des vollständigen 3'-CCA-Endes führt zu einer erheblichen Erniedrigung der K_M (0,83 μM) und zu einer energetisch begünstigten, stärkeren Substratbindung ($\Delta\Delta G -1,31$ kcal/mol).

P. marinus RNase P RNA zeigt folglich bei der *in vitro* Prozessierung im homologen System unter *steady-state*-Bedingungen eine Substratspezifität für das Substrat mit deletiertem 3'-CCA-Ende (pre-tRNA _{Δ CCA}).

Durch die Methode des *Crosslinking*, die in dieser Arbeit etabliert und optimiert wurde, können RNA-Protein und RNA-RNA Interaktionen nachgewiesen werden. Mit ihr wurde die Bindung von Substrat und Produkt im Komplex mit der RNase P RNA untersucht.

Durch interne Modifizierung der *P. marinus* RNase P RNA-Komponente mit dem photosensiblen Nukleotidanalogen s⁴U wurden Kontaktstellen in 5'-Flanke, Acceptor-Stamm, D-Stamm, D-Schleife, Anticodon-Schleife und in der variablen Schleife der *P. marinus* pre-tRNA^{Arg} identifiziert. Diese lokalisierten Kontaktstellen stehen denen in der 5'-Flanke, dem Acceptor-Stamm und der 3'-Flanke, wie sie für den Ribozym-Substrat-Komplex mit *E. coli* RNase P RNA identifiziert wurden, gegenüber. In *P. marinus* RNase P RNA werden folglich alternative Kontaktstellen zur Substratbindung benutzt.

Mit Hilfe der hier überexprimierten *E. coli* Nukleotidyltransferase, konnte pre- und mat-tRNA^{Arg} durch eine neue Synthesestrategie am 3'-CCA-Ende mit dem Crosslink-Reagenz Azidophenacyl (APA) modifiziert werden. Durch die Positionierung von APA am 5'-Terminus von pre- und mat-tRNA^{Arg} wurden weitere modifizierte tRNAs synthetisiert.

Durch Crosslink-Experimente im homologen *P. marinus* System mit diesen modifizierten pre- und mat-tRNA^{Arg}-Varianten wurden die selben Regionen des katalytischen Zentrums (J18/2, Region P15/P16, J5/15) der RNase P RNA identifiziert, wie sie von *E. coli* und *B. subtilis* RNase P RNA bekannt sind. Dies bedeutet, dass die 5'-Flanke, die Prozessierungsstelle und das 3'-CCA-Ende der tRNAs auf einer vergleichbaren Oberfläche positioniert werden wie in anderen Ribozymen. Durch die fehlende Fixierung des 3'-CCA-Endes über Basenpaarungen mit dem GGU-Bindungsmotiv werden die tRNAs in *P. marinus* RNase P RNA weniger starr an das Ribozym gebunden und das 3'-CCA-Ende besitzt eine flexiblere Positionierung im Komplex mit dem Ribozym.

Die Existenz unterschiedlicher Crosslink-Muster in P6, P18, J5/15 und J3/4 zeigt, dass pre-tRNAs und reife tRNAs durch verschiedene Modi an das *P. marinus* Ribozym gebunden werden. Die Identifizierung von vernetzten Nukleotiden in P15, J15/16, P16 und J16/15, die mit vergleichbaren modifizierten tRNAs in *E. coli* RNase P RNA nicht gefunden wurden, belegen, dass in *P. marinus* RNase P RNA ein anderer Produkt-Bindungs-Modus existiert als in *E. coli*.

Erstmals konnten in dieser Arbeit auch zu erwartende Interaktionen mit dem katalytischen Zentrum identifiziert werden, die in bisherigen Crosslink-Experimenten in *E. coli* und *B. subtilis* RNase P RNA nicht oder nur geringfügig auftraten. So stellen die Crosslinks mit P4, J3/4 und P3 eine Besonderheit dar, die aus verschiedenen biochemischen Untersuchungen wie Mutationsanalysen, Phosphorothioat-Interferenz und NAIM zu erklären sind.

Um die erhaltenen Ergebnisse besser veranschaulichen zu können, wurde mit dem Programm ERNA-3D ein Raumstrukturmodell für *P. marinus* RNase P RNA und tRNA^{Arg} erstellt.

Die RNase P RNA der Cyanellen von *Cyanophora paradoxa*, ist *in vitro* katalytisch inaktiv. Um zu klären, ob die fehlende Ribozym-Aktivität dieser RNase P RNA auf eine fehlerhafte Substratbindung zurückzuführen ist, sollten Crosslink-Experimente mit den modifizierten *P. marinus* tRNA^{Arg} durchgeführt werden. Es konnte gezeigt werden, dass 5'- und 3'-modifizierte pre-tRNAs in *C. paradoxa* in einem anderen Modus gebunden werden, als durch die katalytisch aktive *P. marinus* RNase P RNA.

Summary

Ribonuclease P (RNase P) is the essential endonuclease responsible for the removal of the 5'-flank of precursor tRNAs. The RNase P RNA from the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* shows *in vitro* catalytic activity and specificity for heterologous substrates containing the complete 3'-CCA end. This preference is in contrast to the fact that the *P. marinus* RNase P RNA does not possess the binding motif for the CCA terminus, which is not encoded in tRNA genes in this organism.

To analyse the substrate specificity and architecture of the ribozyme-substrate-complex of *P. marinus* RNase P RNA in a homologous system, transcription clones for *P. marinus* pre- and mat-tRNA^{Arg} were generated to obtain different transcripts with stepwise shortened 3'-CCA ends.

In the kinetic analysis of *P. marinus* RNase P RNA, the Michaelis constant (K_M) for pre-tRNA_{CCA} was 6,92 μ M, as determined under steady-state conditions. The subsequent deletion of A76 and C75 from the 3'-CCA end results in an increase of K_M (7,13 μ M and 19,69 μ M, respectively). These substrates are bound less strongly, which is expressed in loss of binding energy ($\Delta\Delta G$ 0,02 and 0,65 kcal/mol, respectively). The removal of the complete CCA end results in a considerable decrease of K_M (0,83 μ M) and an energetically favoured and stronger binding of substrate ($\Delta\Delta G$ -1,31 kcal/mol). In conclusion, in the homologous *in vitro* system, *P. marinus* RNase P RNA has a preference for substrate lacking the 3'-CCA end (pre-tRNA _{Δ CCA}).

The method of *Crosslinking*, which was established and optimised in this work, is generally used to determine RNA-protein and RNA-RNA interactions. This method was used to examine the binding of substrate and product in the complex composed with RNase P RNA. *P. marinus* RNase P RNA was internally modified with the photoinducible nucleotide analogue s⁴U. With this modified RNA, interactions of the 5'-flank, acceptor stem, D-stem and loop, anticodon loop and variable loop of pre-tRNA^{Arg} with RNase P RNA were detected. These contacts are in contrast to signals in the 5'-flank, acceptor stem and 3'-flank which have been identified in the ribozyme-substrate-complexes of *E. coli* RNase P RNA. Thus, in *P. marinus* RNase P RNA, alternative interactions are used for substrate binding.

Using purified recombinant *E. coli* Nucleotidyltransferase, pre- and mat-tRNA^{Arg} were modified at the 3'-CCA end by a new strategy using the crosslink-reagent azidophenacyl (APA). Additional modified tRNAs were obtained by positioning the APA-reagent at the 5'-end.

In the homologous *P. marinus* system, crosslinking experiments with the modified tRNAs identified the same regions of the catalytic centre (J18/2, region P15/P16, J5/15) which have been established in *E. coli* and *B. subtilis* RNase P RNA. This observation indicates that 5'-flank, cleavage site and 3'-CCA end are positioned on a similar surface, as in the other ribozymes. Due to the missing interaction between the GGU motif and the CCA end, tRNAs are bound less rigid to the ribozyme in *P. marinus* and the 3'-CCA end is more flexible in the complex.

Different crosslink patterns in P6, P18, J5/15 and J3/4 indicate that pre-tRNAs and mat-tRNAs are bound in a different mode by *P. marinus* RNase P RNA. The identification of crosslinked nucleotides in P15, J15/16, P16 and J16/15 which are not observed with analogous modified tRNAs in *E. coli* RNase P RNA, show that a different mode of product binding exists in *P. marinus* RNase P RNA.

For the first time, interactions within the catalytic centre could be identified which had been anticipated, but were only weakly detectable in the *E. coli* and *B. subtilis* RNase P RNAs. The crosslinks in P4, J3/4 and P3 are a distinctive feature, which is supported by mutational studies, phosphorothioate interference and NAIM analysis.

To obtain a good visualization of the crosslinking results, a 3D-model of *P. marinus* RNase P RNA and tRNA^{Arg} was created with the program ERNA-3D.

RNase P RNA from the cyanelles of *Cyanophora paradoxa* does not show catalytic activity *in vitro*. To establish whether the lack of substrate binding ability is the reason for the missing ribozyme activity, crosslinking experiments with the modified *P. marinus* tRNA^{Arg} were done. 5'- and 3'-modified pre-tRNA^{Arg} are bound by cyanelle RNase P RNA in a different mode than by the catalytically active *P. marinus* RNase P RNA.

7. Literaturverzeichnis

- Aitken, A. und Stanier, R.Y. (1979). Characterization of peptidoglycan from cyanelles of *Cyanophora paradoxa*. *J. Gen. Microbiol.* **212**, 218-223.
- Alifano, P., Rivellini, F., Piscitelli, C., Arraiano, C.M., Bruni, C.B. und Carlomagno, M.S. (1994). Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease P-dependent processing of polycistronic mRNA. *Genes Dev.* **8**, 3021-2031.
- Altman, S. (1971). Isolation of tyrosine tRNA precursor molecules. *Nature New Biol.* **229**, 19-21.
- Altman, S. (1990). Nobel lecture. Enzymatic cleavage of RNA by RNA. *Biosci. Rep.* **10**, 317-337.
- Altman, S. und Kirsebom, L. (1999). Ribonuclease P. In: *The RNA World*, 2nd ed. (Gesteland, R.F., Cech, T.R., Atkins, J.F., Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 351-380.
- Baer, M.F., Reilly, R.M., McCorkle, G.M., Hai, T.-Y., Altman, S. und RajBhandary, U.L. (1988). The recognition by RNase P of precursor tRNAs. *J. Biol. Chem.* **263**, 2344-2351.
- Baksht, E.K., Gal, A., de Groot, N., Hochberg, A.A., Sprinzl, M. und Cramer, F. (1977). Properties of phenylalanine transfer ribonucleic acid with modified 3'-terminal end in protein biosynthesis using a rabbit reticulocyte cell-free system: effect of the replacement of cytidine residues from the CpCpA end of tRNA by 5-iodocytidine or 2-thiocytidine. *Nucleic Acids Res.* **4**, 2205-12.
- Bartkiewicz, M., Gold, H. und Altman, S. (1989). Identification and characterization of an RNA molecule that copurifies with RNase P activity from HeLa cells. *Genes Dev.* **3**, 488-499.
- Baum, M., Cordier, A. und Schön, A. (1996). RNase P from a photosynthetic organelle contains an RNA homologous to the cyanobacterial counterpart. *J. Mol. Biol.* **257**, 43-52.
- Baum, M. und Schön, A. (1996). Localization and expression of the closely linked cyanelle genes for RNase P RNA and two transfer RNAs. *FEBS Lett.* **382**, 60-64.
- Beebe, J.A. und Fierke, C.A. (1994). A kinetic mechanism for cleavage of precursor tRNA^{Asp} catalyzed by the RNA component of *Bacillus subtilis* ribonuclease P. *Biochemistry* **33**, 10294-10304.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-23.
- Biswas, R., Ledman, D.W., Fox, R.O., Altman, S. und Gopalan, V. (2000). Mapping RNA-protein interactions in ribonuclease P from *Escherichia coli* using disulfide-linked EDTA-Fe. *J. Mol. Biol.* **296**, 19-31.
- Blount, K.F. und Uhlenbeck, O.C. (2002). The hammerhead ribozyme. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1119-1122.
- Bohnert, H.J., Crouse, E.J., Pouyet, J., Mucke, H. und Löffelhardt, W. (1982). The subcellular localization of DNA components from *Cyanophora paradoxa*, a flagellate containing endosymbiotic cyanelles. *Eur. J. Biochem.* **126**, 381-388.
- Bothwell, A.L., Garber, R.L. und Altman, S. (1976). Nucleotide sequence and *in vitro* processing of a precursor molecule to *Escherichia coli* 4.5 S RNA. *J. Biol. Chem.* **251**, 7709-16.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

- Bravo, C., Lescure, F., Laugâa, P., Fourrey, J.L. und Favre, A. (1996). Folding of the HDV antigenomic ribozyme pseudoknot structure deduced from long-range photocrosslinks. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1351–1359.
- Brown, J.W. (1999). The ribonuclease P database. *Nucleic Acids Res.* **27**, 314.
- Brown, J.W., Nolan, J.M., Haas, E.S., Rubio, M.A.T., Major, F. und Pace, N.R. (1996). Comparative analysis of ribonuclease P RNA using gene sequences from natural microbial populations reveals tertiary structural elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 3001-3006.
- Burgin, A.B. und Pace, N.R. (1990). Mapping the active site of ribonuclease P RNA using a substrate containing a photoaffinity agent. *EMBO J.* **9**, 4111-4118.
- Carrara, G., Calandra, P., Fruscoloni, P., Doria, M. und Tocchini-Valentini, G.P. (1989). Site selection by *Xenopus laevis* RNAase P. *Cell* **58**, 37-45.
- Castano, J.G., Tobian, J.A. und Zasloff, M. (1985). Purification and characterization of an endonuclease from *Xenopus laevis* ovaries which accurately processes the 3' terminus of human pre-tRNA^{Met} (3'pre-tRNase). *J. Biol. Chem.* **260**, 9002-8.
- Cech, T.R., Zaug, A.J. und Grabowski, P.J. (1981). *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* **27**, 487-496.
- Chamberlain, J.R., Lee, Y., Lane, W.S. und Engelke, D.R. (1998). Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzym complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes Dev.* **12**, 1678-1690.
- Chen, J.-L., Nolan, J.M., Harris, M.E. und Pace, N.R. (1998). Comparative photocross-linking analysis of the tertiary structure of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* RNase P RNAs. *EMBO J.* **17**, 15515-1525.
- Chen, J.-L. und Pace, N.R. (1997). Identification of the universally conserved core of RNase P RNA. *RNA* **3**, 557-560.
- Chisholm, S.W. (1988). A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature* **334**, 340-343.
- Cho, H.D., Oyelere, A.K., Strobel, S.A. und Weiner, A.M. (2003). Use of nucleotide analogs by class I and class II CCA-adding enzymes (tRNA nucleotidyltransferase): Deciphering the basis for nucleotide selection. *RNA* **9**, 970-981.
- Cho, H.D., Tomita, K., Suzuki, T. und Weiner, A.M. (2002). U2 Small Nuclear RNA Is a Substrate for the CCA-adding Enzyme (tRNA Nucleotidyltransferase). *J. Biol. Chem.* **277**, 3447-3455.
- Christian, E.L. und Harris, M. (1999). The Track of the Pre-tRNA 5'-Leader in the Ribonuclease P Ribozyme-Substrate Complex. *Biochemistry* **38**, 12629-12638.
- Christian, E.L., Kaye, N.M. und Harris, M.E. (2000). Helix P4 is a divalent metal ion binding site in the conserved core of the ribonuclease P ribozyme. *RNA* **6**, 511-519.
- Christian, E.L., Kaye, N.M. und Harris, M.E. (2002). Evidence for a polynuclear metal ion binding site in the catalytic domain of ribonuclease P RNA. *EMBO J.* **21**, 2253-2262.
- Christian, E.L., McPheeters, D.S. und Harris, M.E. (1998). Identification of Individual Nucleotides in the Bacterial Ribonuclease P Ribozyme Adjacent to the Pre-tRNA Cleavage Site by Short-Range Photo-Cross-Linking. *Biochemistry* **37**, 17618-17628.

- Christian, E.L., Zahler, N.H., Kaye, N.M. und Harris, M.E. (2002). Analysis of substrate recognition by the ribonucleoprotein endonuclease RNase P. *Methods* **28**, 307-322.
- Cline, J., Braman, J.C. und Hogrefe, H.H. (1996). PCR fidelity of *pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3546-3551.
- Cordier, A. (1998). Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der RNase P aus den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa*. Dissertation, Institut für Biochemie, Universität Würzburg.
- Cordier, A. und Schön, A. (1999). Cyanelle RNase P: RNA structure analysis and holoenzyme properties of an organellar ribonucleoprotein enzyme. *J. Mol. Biol.* **289**, 9-20.
- Crary, S.M., Niranjankumari, S. und Fierke, C.A. (1998). The protein component of *Bacillus subtilis* ribonuclease P increases catalytic efficiency by enhancing interactions with the 5' leader sequence of pre-tRNA^{Asp}. *Biochemistry* **37**, 9409-9416.
- Darr, S.C., Brown, J.W. und Pace, N.R. (1992). The varieties of ribonuclease P. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 178-182.
- Darr, S.C., Zito, K., Smith, D. und Pace, N.R. (1992). Contributions of phylogenetically variable structural elements to the function of the ribozyme ribonuclease P. *Biochemistry* **31**, 328-333.
- Deutscher, M.P. (1995). tRNA Processing Nucleases. In: tRNA: Structure, Biosynthesis and Function (Söll, D., RajBhandary, U.L., Hrsg.), ASM Press, Washington, DC, USA. pp. 51-65.
- Doherty, E.A. und Doudna, J.A. (2001). Ribozyme structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 457-475.
- Dos Santos, D.V., Vianna, A.L., Fourrey, J.L. und Favre, A. (1993). Folding of DNA substrate-hairpin ribozyme domains: use of deoxy 4-thiouridine as an intrinsic photolabel. *Nucleic Acids Res.* **21**, 201-207.
- Dufresne, A., Salanoubat, M., Partensky, F., Artiguenave, F., Axmann, I.M., Barbe, V., Duprat, S., Galperin, M.Y., Koonin, E.V., Le Gall, F., Makarova, K.S., Ostrowski, M., Oztas, S., Robert, C., Rogozin, I.B., Scanlan, D.J., Tandeau de Marsac, N., Weissenbach, J., Wincker, P., Wolf, Y.I. und Hess, W.R. (2003). Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 10020-5.
- Easterwood, T.R. und Harvey, S.C. (1997). Ribonuclease P RNA: Models of the 15/16 bulge from *Escherichia coli* and the P15 stem loop of *Bacillus subtilis* RNA **3**, 577-585.
- Eckstein, F., Sternbach, H. und von der Haar, F. (1977). Stereochemistry of internucleotidic bond formation by tRNA nucleotidyltransferase from baker's yeast. *Biochemistry* **16**, 3429-32.
- Fang, X.W., Yang, X.J., Littrell, K., Niranjankumari, S., Thiyagarajan, P., Fierke, C.A., Sosnick, T.R. und Pan, T. (2001). The *Bacillus subtilis* RNase P holoenzyme contains two RNase P RNA and two RNase P protein subunits. *RNA* **7**, 233-241.
- Favre, A., Bezerra, R., Hajnsdorf, E., Lemaigre Dubreuil, Y. und Expert-Bezancon, A. (1986). Substitution of uridine *in vivo* by the intrinsic photoactivable probe 4-thiouridine in *Escherichia coli* RNA. Its use for *E. coli* ribosome structural analysis. *Eur. J. Biochem.* **160**, 441-9.
- Feigl, F. (1960). Thioketones and Mercaptanes (Thiols). In: Spot tests in organic analysis, 6th ed. Elsevier, New York, pp. 242-247.
- Fingerhut, C. und Schön, A. (1998). Sequence and functional characterization of RNase P RNA from the chl a/b containing cyanobacteria *Prochlorothrix hollandica*. *FEBS Lett.* **428**, 161-163.

- Forster, A.C. und Altman, S. (1990). Similar cage-shaped structures for the RNA components of all ribonuclease P and ribonuclease MRP enzymes. *Cell* **62**, 407-409.
- Forster, A.C. und Altman, S. (1990). External guide sequences for an RNA enzyme. *Science* **249**, 783-786.
- Frank, D.N., Adamidi, C., Ehringer, M.A., Pitulle, C. und Pace, N.R. (2000). Phylogenetic-comparative analysis of the eukaryal ribonuclease P RNA. *RNA* **6**, 1895-1904.
- Gilbert, W. (1986). The RNA World. *Nature* **319**, 618.
- Gimple, O. (1999). Struktur und Substratspezifität der RNase P-RNA von *Prochlorococcus marinus*. Diplomarbeit, Institut für Biochemie, Universität Würzburg.
- Gimple, O. und Schön, A. (2001). *In vitro* and *in vivo* processing of cyanelle tmRNA by RNase P. *Biol. Chem.* **382**, 1421-1429.
- Gish, G. und Eckstein, F. (1988). DNA and RNA sequence determination based on phosphorothioate chemistry. *Science* **240**, 1520-2.
- Glemarec, C., Kufel, J., Foldesi, A., Maltseva, T., Sandstrom, A., Kirsebom, L.A. und Chattopadhyaya, J. (1996). The NMR structure of 31mer RNA domain of *Escherichia coli* RNase P RNA using its non-uniformly deuterium labelled counterpart. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2022-2035.
- Gopalan, V., Baxevanis, A.D., Landsman, D. und Altman, S. (1997). Analysis of the functional role of conserved residues in the protein subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **267**, 818-829.
- Gopalan, V., Golbik, R., Schreiber, G., Fersht, A.R. und Altman, S. (1997). Fluorescence properties of a tryptophan residue in an aromatic core of the protein subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **267**, 765-769.
- Groom, K.R., Dang, Y.L., Gao, G.J., Lou, Y.C., Martin, N.C., Wise, C.A. und Morales, M.J. (1996). Genetic and biochemical approaches for analysis of mitochondrial RNase P from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **264**, 86-99.
- Guerrier-Takada, C. und Altman, S. (1984). Structure in solution of M1 RNA, the catalytic subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **23**, 6327-6334.
- Guerrier-Takada, C., van Belkum, A., Pleij, C.W. und Altman, S. (1988). Novel reactions of RNAase P with a tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA. *Cell* **53**, 267-272.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. und Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**, 849-857.
- Guerrier-Takada, C., Haydock, K., Allen, L. und Altman, S. (1986). Metal ion requirement and other aspects of the reaction catalyzed by M1 RNA, the RNA subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **25**, 1509-1515.
- Guerrier-Takada, C., Lumelsky, N. und Altman, S. (1989). Specific interactions in RNA enzyme-substrate complexes. *Science* **246**, 1578-84.
- Guerrier-Takada, C., McClain, W.H. und Altman, S. (1984). Cleavage of tRNA precursors by the RNA subunit of *E. coli* ribonuclease P (M1 RNA) is influenced by 3'-proximal CCA in the substrates. *Cell* **38**, 219-224.
- Haas, E.S., Armbruster, D.W., Vucson, B.M. Daniels, C.J. und Brown, J.W. (1996). Comparative analysis of ribonuclease P RNA structure in Archaea. *Nucleic Acids. Res.* **24**, 1252-1259.

- Haas, E.S. und Brown, J.W. (1998). Evolutionary variation in bacterial RNase P RNAs. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4093-4099.
- Haas, E.S., Brown, J.W., Pitulle, C. und Pace, N.R. (1994). Further perspectives on the catalytic core and secondary structure of ribonuclease P RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 2527-2531.
- Haas, E.S., Morse, D.P., Brown, J.W., Schmidt, F.J. und Pace, N.R. (1991). Long-range structure in ribonuclease P RNA. *Science* **254**, 853-856.
- Hall, T.A. und Brown, J.W. (2002). Archaeal RNase P has multiple protein subunits homologous to eukaryotic nuclear RNase P proteins. *RNA* **8**, 296-306.
- Han, S.J. und Kang, H.S. (1997). Purification and characterization of the precursor tRNA 3'-end processing nuclease from *Aspergillus nidulans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 354-8.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hansen, A., Pfeiffer, T., Zuleeg, T., Limmer, S., Ciesiolka, J., Feltens, R. und Hartmann, R.K. (2001). Exploring the minimal substrate requirements for trans-cleavage by RNase P holoenzymes from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **41**, 131-143.
- Hardt, W.-D., Erdmann, V.A. und Hartmann, R.K. (1996). Rp-deoxy-phosphorothioate modification interference experiments identify 2'-OH groups in RNase P RNA that are crucial to tRNA binding. *RNA* **2**, 1189-1198.
- Hardt, W.-D., Schlegl, J., Erdmann, V.A. und Hartmann, R.K. (1995). Kinetics and thermodynamics of the RNase P RNA cleavage reaction: Analysis of tRNA 3'-end variants. *J. Mol. Biol.* **247**, 161-172.
- Hardt, W.-D., Warnecke, J.M., Erdmann, V.A. und Hartmann, R.K. (1995). R_p-phosphorothioate modifications in RNase P RNA that interfere with tRNA binding. *EMBO J.* **14**, 2935-2944.
- Harris, M.E. und Christian, E.L. (1999). Use of Circular Permutation and End Modification to Position Photoaffinity Probes for Analysis of RNA Structure. *Methods* **18**, 51-59.
- Harris, M.E. und Christian, E.L. (2003). Recent insights into the structure and function of the ribonucleoprotein enzyme ribonuclease P. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 325-333.
- Harris, M.E., Kazantsev, A.V., Chen, J.-L. und Pace, N.R. (1997). Analysis of the tertiary structure of the RNase P ribozyme-substrate complex by site-specific photoaffinity crosslinking. *RNA* **3**, 561-576.
- Harris, M.E., Nolan, J.M., Malhotra, A., Brown, J.W., Harvey, S.C. und Pace, N.R. (1994). Use of photoaffinity crosslinking and molecular modeling to analyze the global architecture of ribonuclease P RNA. *EMBO J.* **13**, 3953-3963.
- Harris, M.E. und Pace, N.R. (1995). Identification of phosphates involved in catalysis by the ribozyme RNase P RNA. *RNA* **1**, 210-218.
- Hartmann, R., Heinrich, J., Schlegl, F. und Schuster, H. (1995). Precursor of C4 antisense RNA of bacteriophages P1 and P7 is a substrate for RNase P of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5822-5826.
- Heide, C., Busch, S., Feltens, R. und Hartmann, R.K. (2001). Distinct modes of mature and precursor tRNA binding to *Escherichia coli* RNase P RNA revealed by NAIM analyses. *RNA* **7**, 553-564.
- Heide, C., Feltens, R. und Hartmann, R.K. (2001). Purine N7 groups that are crucial to the interaction of *Escherichia coli* RNase P RNA with tRNA. *RNA* **7**, 958-968.

- Heide, C., Pfeiffer, T., Nolan, J.M. und Hartmann, R.K. (1999). Guanosine 2-NH₂ groups of *Escherichia coli* RNase P RNA involved in intramolecular tertiary contacts and direct interactions with tRNA. *RNA* **5**, 102-116.
- Herdman, M. und Stanier, R.Y. (1977). The cyanelle: Chloroplast or endosymbiotic prokaryote? *FEMS Microbiol. Lett.* **1**, 7-12.
- Hess, W.R., Fingerhut, C. und Schön, A. (1998). RNase P RNA from *Prochlorococcus marinus*: The contribution of substrate domains to recognition by a cyanobacterial ribozyme. *FEBS Lett.* **431**, 138-142.
- Heubeck, C. (2003). Zusammensetzung eukaryotischer RNase P aus pflanzlichen Zellkernen und Plastiden. Dissertation, Institut für Biochemie, Universität Würzburg.
- Holm, P.S. und Krupp, G. (1992). The acceptor stem in pre-tRNAs determines the cleavage specificity of RNase P. *Nucleic Acids Res.* **20**, 421-423.
- Jarrous, N. und Altman, S. (2001). Human ribonuclease P. *Methods Enzymol.* **342**, 93-100.
- Jarrous, N., Eder, P.S., Guerrier-Takada, C., Hoog, C. und Altman, S. (1998). Autoantigenic properties of some protein subunits of catalytically active complexes of human ribonuclease P. *RNA* **4**, 407-417.
- Kahle, D., Wehmeyer, U., Char, S. und Krupp, G. (1990). The methylation of one specific guanosine in a pre-tRNA prevents cleavage by RNase P and by the catalytic M1 RNA. *Nucleic Acids Res.* **18**, 837-844.
- Kaye, N.M., Christian, E.L. und Harris, M.E. (2002). NAIM and Site-Specific Functional Group Modification Analysis of RNase P RNA: Magnesium Dependent Structure within the Conserved P1-P4 Multihelix Junction Contributes to Catalysis. *Biochemistry* **41**, 4533-4545.
- Kaye, N.M., Zahler, N.H., Christian, E.L. und Harris, M.E. (2002). Conservation of Helical Structure Contributes to Functional Metal Ion Interactions in the Catalytic Domain of Ribonuclease P RNA. *J. Mol. Biol.* **324**, 429-442.
- Kazantsev, A.V., Krivenko, A.A., Harrington, D.J., Carter, R.J., Holbrook, S.R., Adams, P.D. und Pace, N.R. (2003). High-resolution structure of RNase P protein from *Thermotoga maritima*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 7497-7502.
- Kazantsev, A.V. und Pace, N.R. (1998). Identification by modification-interference of purine N-7 and ribose 2'-OH groups critical for catalysis by bacterial ribonuclease P. *RNA* **4**, 937-47.
- Kirsebom, L.A. und Altman, S. (1989). Reaction in vitro of some mutants of RNase P with wild-type and temperature-sensitive substrates. *J. Mol. Biol.* **207**, 837-840.
- Kirsebom, L.A. und Svärd, S.G. (1992). The kinetics and specificity of cleavage by RNase P is mainly dependent on the structure of the amino acid acceptor stem. *Nucleic Acids Res.* **20**, 425-432.
- Kirsebom, L.A. und Svärd, S.G. (1994). Base pairing between *Escherichia coli* RNase P RNA and its substrate. *EMBO J.* **13**, 4870-4876.
- Kirsebom, L.A. und Vioque, A. (1996). RNase P from bacteria. Substrate recognition and function of the protein subunit. *Mol. Biol. Rep.* **22**, 99-109.
- Kole, R., Baer, M., Stark, B. und Altman, S. (1980). *E. coli* RNase P has a required RNA component in vivo. *Cell* **19**, 881-887.

- Komine, Y., Kitabake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. und Inokuchi, H. (1994). A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 9223-9227.
- Konarska, M.M. (1999). Site-specific derivatization of RNA with photocrosslinkable groups. *Methods* **18**, 22-28.
- Kowallik, K.V. (1997). Origin and evolution of chloroplasts: Current status and future perspectives. In: Eukaryotism and Symbiosis (Schenk H.E.A., Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E. und Schwemmler, W., Hrsg.), Springer, Berlin, Germany. pp. 3-23.
- Krasilnikov, A.S., Yang, X., Pan, T. und Mondragon, A. (2003). Crystal structure of the specificity domain of ribonuclease P. *Nature* **421**, 760-764.
- Krupp, G., Cherayil, B., Frendewey, D., Nishikawa, S. und Söll, D. (1986). Two RNA species copurify with RNase P from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **5**, 1697-1703.
- Kufel, J. und Kirsebom, L.A. (1994). Cleavage site selection by M1 RNA, the catalytic subunit of *Escherichia coli* RNase P, is influenced by pH. *J. Mol. Biol.* **244**, 511-21.
- Kufel, J. und Kirsebom, L.A. (1996). Residues in *Escherichia coli* RNase P RNA important for cleavage site selection and divalent metal ion binding. *J. Mol. Biol.* **263**, 685-698.
- Kufel, J. und Kirsebom, L.A. (1996). Different cleavage sites are aligned differently in the active site of M1 RNA, the catalytic subunit of *Escherichia coli* RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 6085-6090.
- Kurz, J.C. und Fierke, C.A. (2000). Ribonuclease P: a ribonucleoprotein enzyme. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **4**, 553-558.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LaGrandeur, T.E., Darr, S.C., Haas, E.S. und Pace, N.R. (1993). Characterization of the RNase P RNA of *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* **175**, 5043-5048.
- LaGrandeur, T.E., Hüttenhofer, A., Noller, H.F. und Pace, N.R. (1994). Phylogenetic comparative chemical footprint analysis of the interaction between RNase P RNA and tRNA. *EMBO J.* **13**, 3945-3952.
- Lambert, D.H., Bryant, D.A., Stirewalt, V.L., Dubbs, J.M., Stevens, S.E. Jr. und Porter, R.D. (1985). Gene map for the *Cyanophora paradoxa* cyanelle genome. *J. Bacteriol.* **164**, 659-664.
- Lee, J.-Y. und Engelke, D.R. (1989). Partial characterization of an RNA component that copurifies with *Saccharomyces cerevisiae* RNase P. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2536-2543.
- Lee, Y.C., Lee, B.J., Hwang, D.S. und Kang, H.S. (1996). Purification and characterization of mitochondrial ribonuclease P from *Aspergillus nidulans*. *Eur. J. Biochem.* **235**, 289-296.
- Lee, Y.C., Lee, B.J. und Kang, H.S. (1996). The RNA component of mitochondrial ribonuclease P from *Aspergillus nidulans*. *Eur. J. Biochem.* **235**, 297-303.
- Lockard, R.E. und Kumar, A. (1981). Mapping tRNA structure in solution using double-strand-specific ribonuclease V1 from cobra venom. *Nucleic Acids Res.* **9**, 5125-40.
- Löffelhardt, W. et al. (1997). The complete sequence of the cyanelle genome of *Cyanophora paradoxa*: The genetic complexity of a primitive plastid. In: Eukaryotism and Symbiosis (Schenk, H.E.A., Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E. und Schwemmler, W., Hrsg.), Springer, Berlin, Germany. pp. 40-48.

- Loria, A., Niranjanakumari, S., Fierke, C.A. und Pan, T. (1998). Recognition of a pre-tRNA substrate by the *Bacillus subtilis* RNase P holoenzyme. *Biochemistry* **37**, 15466-15473.
- Loria, A. und Pan, T. (1996). Domain structure of the ribozyme from eubacterial ribonuclease P. *RNA* **2**, 551-563.
- Loria, A. und Pan, T. (1997). Recognition of the T stem-loop of a pre-tRNA substrate by the ribozyme from *Bacillus subtilis* ribonuclease P. *Biochemistry* **36**, 6317-6325.
- Loria, A. und Pan, T. (1998). Recognition of the 5' leader and the acceptor stem of a pre-tRNA substrate by the ribozyme from *Bacillus subtilis* RNase P. *Biochemistry* **37**, 10126-10133.
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A. und Mathur, E.J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6.
- Mans, R.M., Guerrier-Takada, C., Altman, S. und Pleij, C.W. (1990). Interaction of RNase P from *Escherichia coli* with pseudoknotted structures in viral RNAs. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3479-3487.
- Marechal-Drouard, L., Weil, J.H. und Dietrich, A. (1993). Transfer RNAs and Transfer RNA Genes in Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**, 13-32.
- Martin, G., Jenö, P. und Keller, W. (1999). Mapping of ATP binding regions in poly(A) polymerases by photoaffinity labeling and by mutational analysis identifies a domain conserved in many nucleotidyltransferases. *Protein Sci.* **8**, 2380-2391.
- Martin, G., Keller, W. und Doublé, S. (2000). Crystal structure of mammalian poly(A) polymerase in complex with an analog of ATP. *EMBO J.* **19**, 4193-4203.
- Massire, C., Jaeger, L. und Westhof, E. (1997). Phylogenetic evidence for a new tertiary interaction in bacterial RNase P RNAs. *RNA* **3**, 553-556.
- Massire, C., Jaeger, L. und Westhof, E. (1998). Derivation of the three-dimensional architecture of bacterial ribonuclease P RNAs from comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* **279**, 773-793.
- Mattsson, J.G., Svärd, S.G. und Kirsebom, L.A. (1994). Characterization of the *Borrelia burgdorferi* RNase P RNA gene reveals a novel tertiary interaction. *J. Mol. Biol.* **241**, 1-6.
- McClain, W.H., Guerrier-Takada, C. und Altman, S. (1987). Model substrates for an RNA enzyme. *Science* **238**, 527-530.
- Meinzel, T. und Blanquet, S. (1995). Maturation of pre-tRNA^{Met} by *Escherichia coli* RNase P is specified by a guanosine of the 5'-flanking sequence. *J. Biol. Chem.* **270**, 15908-15914.
- Milligan, J. und Uhlenbeck, O. (1989) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Meth. Enzymol.* **180**, 51-62.
- Moor, N.A., Ankilova, V.N., Lavrik, O.I. und Favre, A. (2001). Determination of tRNA^{Phe} nucleotides contacting the subunits of *Thermus thermophilus* phenylalanyl-tRNA synthetase by photoaffinity crosslinking. *Biochim. Biophys. Acta* **1518**, 226-36.
- Moore, L.R., Rocap, G. und Chisholm, S.W. (1998). Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature* **393**, 464-467
- Moore, M.J. und Query, C.C. (2000). Joining of RNAs by splinted ligation. *Methods Enzymol.* **317**, 109-23.
- Morales, M.J., Wise, C.A., Hollingsworth, M.J. und Martin, N.C. (1989). Characterization of yeast mitochondrial RNase P: an intact RNA subunit is not essential for activity *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6865-6881.

- Musier-Forsyth, K. und Schimmel, P. (1994). Acceptor helix interactions in a class II tRNA synthetase: photoaffinity cross-linking of an RNA miniduplex substrate. *Biochemistry* **33**, 773-779.
- Nieuwlandt, D.T., Haas, E.S. und Daniels, C.J. (1991). The RNA component of RNase P from the archaeobacterium *Haloferax volcanii*. *J. Biol. Chem.* **266**, 5689-5695.
- Niranjanakumari, S., Kurz, J.C. und Fierke, C.A. (1998). Expression, purification and characterization of the recombinant ribonuclease P protein component from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3090-3096.
- Niranjanakumari, S., Stams, T., Crary, S.M., Christianson, D.W. und Fierke, C.A. (1998). Protein component of the ribozyme ribonuclease P alters substrate recognition by directly contacting precursor tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 15212-15217.
- Nolan, J.M., Burke, D.H. und Pace, N.R. (1993). Circularly permuted tRNAs as specific photoaffinity probes of ribonuclease P RNA structure. *Science* **261**, 762-5.
- Ofengand, J., Schwartz, I., Chinali, G., Hixson, S.S. und Hixson, S.H. (1977). Photoaffinity-probe-modified tRNA for the analysis of ribosomal binding sites. *Methods Enzymol.* **46**, 683-702.
- Oh, B.K., Frank, D.N. und Pace, N.R. (1998). Participation of the 3'-CCA of tRNA in the binding of catalytic Mg²⁺ ions by ribonuclease P. *Biochemistry* **37**, 7277-7283.
- Oh, B.K. und Pace, N.R. (1994). Interaction of the 3'-end of tRNA with ribonuclease P RNA. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4087-4097.
- Osswald, M. und Brimacombe, R. (1999). The environment of 5S rRNA in the ribosome: cross-links to 23S rRNA from sites within helices II and III of the 5S molecule. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2283-90.
- Otter, S. (2001). Funktioneller Nachweis eines neuen Strukturelementes in Phytoplasma RNase P RNA durch Mutationsanalyse. Diplomarbeit, Insitut für Biochemie, Universität Würzburg.
- Pace, N.R. und Smith, D. (1990). Ribonuclease P: function and variation. *J. Biol. Chem.* **265**, 3587-3590.
- Palenik, B. und Haselkorn, R. (1992). Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll b-containing prokaryotes. *Nature* **355**, 205-267.
- Palmer, J.R., Nieuwlandt, D.T. und Daniels, C.J. (1994). Expression of a yeast intron-containing tRNA in the archaeon *Haloferax volcanii*. *J. Bacteriol.* **176**, 3820-3823.
- Pan, T., Loria, A. und Zhong, K. (1995). Probing of tertiary interactions in RNA: 2'-hydroxyl-base contacts between the RNase P RNA and pre-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 12510-12514.
- Pannucci, J.A., Haas, E.S., Hall, T.A., Harris, J.K. und Brown, J.W. (1999). RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7803-7808.
- Papadimitriou, A. und Gross, H.J. (1996). Pre-tRNA 3'-processing in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of exo- and endoribonucleases. *Eur. J. Biochem.* **242**, 747-59.
- Partensky, F., Hess, W.R. und Vaultot, D. (1998). *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 106-127.
- Pascual, A. und Vioque, A. (1996). Cloning, purification and characterization of the protein subunit of ribonuclease P from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* **241**, 17-24.

- Pascual, A. und Vioque, A. (1999). Substrate binding and catalysis by ribonuclease P from cyanobacteria and *Escherichia coli* are affected differently by the 3' terminal CCA in tRNA precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 6672-6677.
- Peck-Miller, K.A. und Altman, S. (1991). Kinetics of the processing of the precursor to 4.5 S RNA, a naturally occurring substrate for RNase P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **221**, 1-5.
- Perreault, J-P. und Altman, S. (1992). Important 2'-hydroxyl groups in model substrates for M1 RNA, the catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **226**, 399-409.
- Pitulle, C., Garcia-Paris, M., Zamudio, K.R. und Pace, N.R. (1998). Comparative structure analysis of vertebrate ribonuclease P RNA. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3333-3339.
- Podar, M. und Perlman, P.S. (1999). Photocrosslinking of 4-thio-uracil-containing RNAs supports a side-by-side arrangement of domains 5 and 6 of a group II intron. *RNA* **5**, 318-29.
- Pomeranz-Krummel, D.A. und Altman, S. (1999). Multiple binding modes of substrate to the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *RNA* **5**, 1021-1033.
- Pomeranz-Krummel, D.A. und Altman, S. (1999). Verification of phylogenetic predictions *in vivo* and the importance of the tetraloop motif in a catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11200-11205.
- Rasmussen, T.A. und Nolan, J.M. (2002). G350 of *Escherichia coli* RNase P RNA contributes to Mg²⁺ binding near the active site of the enzyme. *Gene* **294**, 177-185.
- Reich, C., Olsen, G.J., Pace, B. und Pace, N.R. (1988). Role of the protein moiety of ribonuclease P, a ribonucleoprotein enzyme. *Science* **239**, 178-181.
- Reith, M. und Munholland, J. (1993). The ribosomal RNA repeats are non-identical and directly oriented in the chloroplast genome of the red alga *Porphyra purpurea*. *Curr. Genet.* **24**, 443-50.
- Reith, M. und Munholland, J. (1995). Complete Nucleotide Sequence of the *Porphyra purpurea* Chloroplast Genome. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**, 333-335.
- Rivera-Leon, R., Green, C.J. und Vold, B. (1995). High-Level Expression of Soluble Recombinant RNase P Protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 2564-2566.
- Robertson, H.D., Altman, S. und Smith, J.D. (1972). Purification and properties of a specific *Escherichia coli* ribonuclease which cleaves a tyrosin transfer ribonucleic acid precursor. *J. Biol. Chem.* **247**, 5243-5251.
- Rosenstein, S.P. und Been, M.D. (1996). Hepatitis Delta Virus Ribozymes Fold To Generate a Solvent-Inaccessible Core with Essential Nucleotides Near the Cleavage Site Phosphate. *Biochemistry* **35**, 11403-11413.
- Rossmannith, W. und Karwan, R.M. (1998). Characterization of human mitochondrial RNase P: Novel aspects in tRNA processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 234-241.
- Rossmannith, W. und Karwan, R.M. (1998). Impairment of tRNA processing by point mutations in mitochondrial tRNA^{Leu}_{UR} associated with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.* **433**, 269-274.
- Sambrook, J. und Russel, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed., CSH Press, Cold Spring Harbor NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Schlimme, E., von der Haar, F., Eckstein, F. und Cramer, F. (1970). Chemically modified phenylalanine transfer ribonucleic acid from yeast. Synthesis and properties of tRNA Phe-C-Cs-A

- and the effect of adenosine 5'-O-(1-thiotriphosphate) on the activation of phenylalanine. *Eur. J. Biochem.* **14**, 351-6.
- Schmitz, M. und Tinoco, I. Jr. (2000). Solution structure and metal-ion binding of the P4 element from bacterial RNase P RNA. *RNA* **6**, 1212-1225.
- Schön, A. (1999). Ribonuclease P: the diversity of a ubiquitous RNA processing enzyme. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 391-406.
- Schön, A. (2000). RNase P from cyanobacteria and chloroplasts: A key to the understanding of ribozyme evolution? In: *Ribozymes: Biochemistry and Biotechnology* (Krupp, G. and Gaur, R.K., Hrsg.), Eaton Publishing, Natick, MA. pp. 133-148.
- Schön, A., Fingerhut, C. und Hess, W.R. (2002). Conserved and variable domains within divergent RNase P RNA gene sequences of *Prochlorococcus* strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1383-1389.
- Schuster, G.B. und Platz, M.S. (1992). Photochemistry of phenyl azide. *Adv. Photochem.* **17**, 69-143.
- Sha, M., Levy, T., Kois, P. und Konarska, M.M. (1998). Probing of the spliceosome with site-specifically derivatized 5' splice site RNA oligonucleotides. *RNA* **4**, 1069-1082.
- Shi, P.Y., Maizels, N. und Weiner, A.M. (1997). Recovery of soluble, active recombinant protein from inclusion bodies. *Biotechniques* **23**, 1036-8.
- Shi, P.Y., Weiner, A.M. und Maizels, N. (1998). A top-half tDNA minihelix is a good substrate for the eubacterial CCA-adding enzyme. *RNA* **4**, 276-284.
- Siegel, R.W., Banta, A.B., Haas, E.S., Brown, J.W., und Pace N.R. (1996). *Mycoplasma fermentans* simplifies our view of the catalytic core of ribonuclease P RNA. *RNA* **2**, 452-462.
- Siew, D., Zahler, N.H., Cassano, A.G., Strobel, S.A. und Harris, M.E. (1999). Identification of Adenosine Functional Groups Involved in Substrate Binding by the Ribonuclease P Ribozyme. *Biochemistry* **38**, 1873-1883.
- Smith, D., Burgin, A.B., Haas, E.S. und Pace, N.R. (1992). Influence of metal ions on the ribonuclease P reaction. Distinguishing substrate binding from catalysis. *J. Biol. Chem.* **267**, 2429-2436.
- Smith, D. und Pace, N.R. (1993). Multiple magnesium ions in the ribonuclease P reaction mechanism. *Biochemistry*. **32**, 5273-5281.
- Sontheimer, E.J. und Steitz, J.A. (1993). The U5 and U6 small nuclear RNAs as active site components of the spliceosome. *Science* **262**, 1989-96. Erratum in: (1994) *Science* **263**, 739.
- Spitzfaden, C., Nicholson, N., Jones, J.J., Guth, S., Lehr, R., Prescott, C.D., Hegg, L.A. und Eggleston, D.S. (2000). The structure of ribonuclease P protein from *Staphylococcus aureus* reveals a unique binding site for single-stranded RNA. *J. Mol. Biol.* **295**, 105-115.
- Sprinzi, M., Horn, C. Brown, M., Ioudovitch, A. und Steinberg, S. (1998). Compilation of tRNA and tRNA gene sequences. *Nucleic Acid Res.* **264**, 148-153.
- Sprinzi, M., Scheit, K.H. und Cramer, F. (1973). Preparation in vitro of a 2-thiocytidine-containing yeast tRNA Phe -A 73 -C 74-S 2 C 75 -A 76 and its interaction with p-hydroxymercuribenzoate. *Eur. J. Biochem.* **34**, 306-10.
- Sprinzi, M., Sternbach, H., von der Haar, F. und Cramer, F. (1977). Enzymatic incorporation of ATP and CTP analogues into the 3' end of tRNA. *Eur. J. Biochem.* **81**, 579-89.
- Stade, K., Rinke-Appel, J. und Brimacombe, R. (1989). Site-directed cross-linking of mRNA analogues to the *Escherichia coli* ribosome; identification of 30S ribosomal components that can

- be cross-linked to the mRNA at various points 5' with respect to the decoding site. *Nucleic Acids Res.* **17**, 9889-908.
- Stams, R., Niranjanakumari, S., Fierke, C.A. und Christianson, D.W. (1998). Ribonuclease P protein structure: evolutionary origins in the translational apparatus. *Science* **280**, 752-755.
- Stark, B., Kole, R., Bowman, E.J. und Altman, S. (1978). Ribonuclease P: An enzyme with an essential RNA component. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 3717-3721.
- Steebhorn, C., Steinberg, S., Hübel, E. und Sprinzl, M. (1995). Compilation of tRNA and tRNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **24**, 68-72.
- Steitz, T.A. und Steitz, J.A. (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 6498-6502.
- Stirewalt, V.L., Michalowski, C.B., Löffelhardt, W., Bohnert, H.J. und Bryant, D.A. (1995). Nucleotide Sequence of the Cyanelle Genome from *Cyanophora paradoxa*. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**, 327-332.
- Svärd, S.G., Kagardt, U. und Kirsebom, L.A. (1996). Phylogenetic comparative mutational analysis of the base-pairing between RNase P RNA and its substrate. *RNA* **2**, 463-472.
- Svärd, S.G. und Kirsebom, L.A. (1992). Several regions of a tRNA precursor determine the *Escherichia coli* RNase P cleavage site. *J. Mol. Biol.* **227**, 1019-1031.
- Talbot, S.J. und Altman, S. (1994). Gel retardation analysis of the interaction between C5 protein and M1 RNA in the formation of the ribonuclease P holoenzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 1399-1405.
- Tallsjö, A., Kufel, J. und Kirsebom, L.A. (1996). Interaction between *Escherichia coli* RNase P RNA and the discriminator base results in slow product release. *RNA* **2**, 299-307.
- Tanner, M.A. und Cech, T R. (1995). An important RNA tertiary interaction of group I and group II introns is implicated in gram-positive RNase P RNAs. *RNA* **1**, 349-350.
- Tanner, N.K., Hanna, M.M. und Abelson, J. (1988). Binding interactions between yeast tRNA ligase and a precursor transfer ribonucleic acid containing two photoreactive uridine analogues. *Biochemistry* **27**, 8852-61.
- Tomita, K., Fukai, S., Ishitani, R., Ueda, T., Takeuchi, N., Vassilyev, D.G. und Nureki, O. (2004). Structural basis for template-independent RNA polymerization. *Nature* **430**, 700-4.
- Tranguch, A.J. und Engelke, D.R. (1993). Comparative structural analysis of nuclear RNase P RNAs from yeast. *J. Biol. Chem.* **268**, 14045-14055.
- Tsai, H.Y., Masquida, B., Biswas, R., Westhof, E. und Gopalan, V. (2003). Molecular modeling of the three-dimensional structure of the bacterial RNase P holoenzyme. *J. Mol. Biol.* **325**, 661-675.
- Turner, S., Burger-Wiersma, T., Giovannoni, S.J., Mur, L.R. und Pace, N.R. (1989). The relationship of a prochlorophyte *Prochlorothrix hollandica* to green chloroplasts. *Nature* **337**, 380-2.
- van den Hoek, C., Jahns, H.M. und Mann, D.G. (1993). Algen. Thieme Verlag, Stuttgart.
- Vioque, A. (1992). Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acid Res.* **20**, 6331-6337.
- Vioque, A. (1997). The RNase P RNA from cyanobacteria: Short tandemly repeated repetitive sequences are present within the RNase P RNA gene in heterocyst-forming cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3471-3477.

- Vioque, A., Arnez, J. und Altman, S. (1988). Protein-RNA interactions in the RNase P holoenzyme from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **202**, 835-848.
- Wang, L. und Ruffner, D.E. (1997). An ultraviolet crosslink in the hammerhead ribozyme dependent on 2-thiocytidine or 4-thiouridine substitution. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4355-61.
- Warnecke, J.M., Held, R., Busch, S. und Hartmann, R.K. (1999). Role of metal ions in the hydrolysis reaction catalyzed by RNase P RNA from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **290**, 433-445.
- Westhof, E. und Altman, S. (1994). Three-dimensional working model of M1 RNA, the catalytic subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5133-5137.
- Westhof, E., Dumas, P. und Moras, D. (1985). Crystallographic refinement of yeast aspartic acid transfer RNA. *J. Mol. Biol.* **184**, 119-45.
- Westhof, E., Wesolowski, D. und Altman, S. (1996). Mapping in three dimensions of regions in a catalytic RNA protected from attack by an Fe(II)-EDTA reagent. *J. Mol. Biol.* **258**, 600-613.
- Woisard, A., Favre, A., Clivio, P. und Fourrey, J.L. (1992). Hammerhead ribozyme tertiary folding: intrinsic photolabeling studies. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10072-10074.
- Woisard, A., Fourrey, J.L. und Favre, A. (1994). Multiple folded conformations of a hammerhead ribozyme domain under cleavage conditions. *J. Mol. Biol.* **239**, 366-70.
- Xiao, S., Scott, F., Fierke, C.A. und Engelke, D.R. (2002). Eukaryotic Ribonuclease P: A Plurality of Ribonucleoprotein Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 165-189.
- Xiong, Y. und Steitz, T.A. (2004). Mechanism of transfer RNA maturation by CCA-adding enzyme without using an oligonucleotide template. *Nature* **430**, 640 – 645.
- Young, K.J., Vyle, J.S., Pickering, T.J., Cohen, M.A., Holmes, S.C., Merkel, O. und Grasby, J.A. (1999). The role of essential pyrimidines in the hairpin ribozyme-catalysed reaction. *J. Mol. Biol.* **288**, 853-866.
- Yu, Y.-T. (2000). Site-specific 4-Thiouridine Incorporation into RNA Molecules. *Methods Enzymol.* **318**, 71-88.
- Yue, J., Maizels, N. und Weiner, A.M. (1996). CCA-adding enzymes and poly(A) polymerases are all members of the same nucleotidyltransferase superfamily: characterization of the CCA-adding enzyme from the archaeal hyperthermophile *Sulfolobus shibatae*. *RNA* **2**, 895-908.
- Zahler, N.H., Christian, E.L. und Harris, M.E. (2003). Recognition of the 5' leader of pre-tRNA substrates by the active site of ribonuclease P. *RNA* **9**, 734-45.
- Zuleeg, T., Hansen, A., Pfeiffer, T., Schubel, H., Kreutzer, R., Hartmann, R.K. und Limmer, S. (2001). Correlation between processing efficiency for ribonuclease P minimal substrates and conformation of the nucleotide -1 at the cleavage position. *Biochemistry* **40**, 3363-3369.

Abkürzungen

ATP α S	Adenosin-5'-(α -thio)-triphosphat	g	Gramm
CTP α S	Cytosin-5'-(α -thio)-triphosphat	GMP	Guanosin-5'-monophosphat
A	Adenosin	GMPS	Guanosin-5'-mono-phosphorothioat
Abb.	Abbildung	h	Stunde
AcOH	Essigsäure	HCl	Salzsäure
ADH	Alkoholdehydrogenase	HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Amp	Ampicillin	I	Inosin
APA-Br	p-Azidophenacyl-Bromid	Δ I	codierende Region ohne Intron
APS	Ammoniumperoxodisulfat	IPTG	1-Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Arg	Arginin	kb	Kilobase(n)
Asp	Asparagin	kbp	Kilobasenpaar(e)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat	kDa	Kilodalton
A _x	Absorption bei Wellenlänge x nm	K _M	Michaelis-Menten-Konstante
bp	Basenpaare	l	Liter
BPB	Bromphenolblau	M	molar (mol/l)
BSA	Albumin aus Rinderserum	M1	<i>E. coli</i> RNase P-RNA
C	Cytosin	mA	Milliampere
°C	Grad Celcius	mat-tRNA	reife tRNA
C5	<i>E. coli</i> RNase P-Protein	mg	Milligramm
CdCsA	3'-CCA-Ende von tRNAs, bestehend aus CMP, dCMP u. ATP α S	MG	Molekulargewicht
Ci	Curie	min	Minute(n)
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberserum	ml	Milliliter
<i>C. paradoxa</i>	<i>Cyanophora paradoxa</i>	mM	Millimolar
cpm	counts per minute	MOPS	3-(N-Morpholino)-propan-sulfonsäure
Cy	Cyanelle	mRNA	messenger-RNA
Δ CCA	nicht vorhandenes CCA-Ende	μ g	Mikrogramm
D	Dalton	μ l	Mikroliter
d	Tag(e)	n	Nano-, 10 ⁻⁹
DC	Dünnschichtchromatographie	nm	Wellenlänge in Nanometer
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser	nt	Nukleotid(e)
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat	NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat	OAc	Acetat
DMF	Dimethylformamid	³² P	radioaktives Phosphorisotop
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)	PAA	Polyacrylamid
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
ds	doppelsträngig	PCR	polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
DTT	Dithiothreitol	PE	Polyethylen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	pH	neg. dekadischer Logarithmus d. Protonenkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetic acid)	<i>P. marinus</i>	<i>Prochlorococcus marinus</i>
EtBr	Ethidiumbromid	PMSF	Phenylmethansulfonylchlorid
EtOH	Ethanol	PNK	T4 Polynukleotidkinase
f	Femto-, 10 ⁻¹⁵	PP	Polypropylen
G	Guanin	PP	RNase P-Protein

pre-tRNA	Vorläufer-tRNA
PS	Polystyrol
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RPR	RNase P RNA
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
s ² CTP	2-Thio-Cytosin-5'-triphosphat
s ⁴ UTP	4-Thio-Uridin-5'-triphosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
sec	Sekunden
ss	einzelsträngig
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)- Aminomethan
tRNA	transfer-RNA
tRNA _C	transfer-RNA mit 3'-C-Ende
tRNA _{CC}	transfer-RNA mit 3'-CC-Ende
tRNA _{CCA}	transfer-RNA mit 3'-CCA-Ende
tRNA _{ΔCCA}	transfer-RNA ohne 3'-CCA-Ende
Tyr	Tyrosin
U	Unit der Enzymaktivität
U	Uracil
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
W	Watt
% (v/v)	Volumenprozente (volume per volume)
% (w/v)	Gewichtsprozente (weight per volume)
XCFF	Xylencyanol FF
× g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
X-Gal	5'-Brom-4'-Chlor-3'-Indolyl-β- D-Galaktopyranosid

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Olaf Gimple
Geburtsdatum: 7. Mai 1971
Geburtsort: Werneck

Schulbildung

9/1977 - 7/1981 Grundschule Höchberg, Bayern
9/1981 - 7/1982 Hauptschule Höchberg, Bayern
9/1982 - 7/1991 Deutschhaus-Gymnasium Würzburg
7/1991 Abitur

Wehrdienst

7/1991- 6/1992 Grundwehrdienst

Hochschulausbildung

10/1992 - 3/1999 Studium der Chemie (Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
5/1995 Diplom-Vorprüfung
5/1998 Diplom-Prüfung
6/1998 - 3/1999 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, unter Anleitung von PD Dr. Astrid Schön mit dem Thema „Struktur und Substratspezifität der RNase P-RNA von *Prochlorococcus marinus*“
3/1999 Abschluss des Studiums mit Erlangung des Grades „Diplom-Chemiker“
6/1999 - 11/2004 Anfertigung der Dissertation am Institut für Biochemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg, unter Anleitung von PD Dr. Astrid Schön mit dem Thema „Substratbindung und Katalyse in RNase P RNA vom cyanobakteriellen Typ“