

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 RNA-Welt

Ribonukleinsäuren (RNA) stellen das Bindeglied zwischen der genetischen Information der DNA und der exprimierten Funktion der Proteine dar. Diese Schlüsselstellung in der Zelle und die essentielle Bedeutung der RNA für das Leben spiegeln sich in ihren Aufgaben als Informationsüberträger (mRNA), Adapter (tRNA), Gerüstmolekül und Katalysator (rRNA) wider. Alle genannten Klassen der RNA sind in die Proteinbiosynthese involviert: Die genetische Information wird in *messenger*-RNA transkribiert und zum Ribosom transportiert, an dem sie als Matrize für die Translation dient. Die Bausteine der Proteine sind kovalent mit *transfer*-RNAs verknüpft, die jedem Basentriplett der mRNA eine Aminosäure zuordnen. Die Ribosomen bestehen zu zwei Dritteln ihrer Masse aus ribosomaler RNA, die strukturelle Funktionen beim Aufbau des Ribosoms und der Initiation der Translation ausübt sowie die Knüpfung der Peptidbindung katalysiert (Stryer, 1994; Nissen *et al.*, 2000).

Mit der Entdeckung der katalytischen Eigenschaften von Ribonukleinsäuren und der RNA-Klasse der Ribozyme (Kruger *et al.*, 1982; Guerrier-Takada *et al.*, 1983) wurde die Vision einer RNA-Welt in einer frühen Evolutionsphase des Lebens postuliert, in der RNA-Moleküle zuerst ihre eigene Replikation bewirkten und ein Repertoire von enzymatischen Aktivitäten entwickelten (Gilbert, 1986).

Die Entstehung sich selbst reproduzierender, biologischer Einheiten wird durch die chemische Evolution gestützt. In einer reduzierten, sauerstofffreien Atmosphäre könnte sich vor etwa vier Milliarden Jahren aus anorganischen Substanzen ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2$ ) unter Einwirkung von UV-Strahlung und elektrischen Entladungen organisches Material gebildet haben. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der primitiven Erdatmosphäre entstanden RNA-Basen und Zucker oder Aminosäuren (Schlesinger & Miller, 1983). Die Akkumulation großer organischer Mengen führte sukzessiv zu komplexen biochemischen Verbindungen, die möglicherweise eine RNA-Welt begründeten.

Auf ihrer nächsten Entwicklungsstufe begannen die RNA-Moleküle Proteine zu synthetisieren, die sich aufgrund einer größeren Vielfalt der Aminosäurebausteine als die besseren biochemischen Katalysatoren erwiesen. Durch reverse Transkription entstand schließlich aus der RNA die DNA, deren Doppelhelix einen stabileren Speicher der genetischen Information darstellt (Stryer, 1994).

Die Hypothese einer RNA-Welt wird durch die Tatsache bekräftigt, daß es sich beim „antiken“ Ribosom um ein Ribozym handelt (Nissen *et al.*, 2000), das auch zu einer zellfreien Proteinsynthese befähigt ist (Stiege & Erdmann, 1995).

Die konservierte ursprüngliche Struktur der ribosomalen RNA, deren Basensequenz weder durch die Degeneration des genetischen Codes noch durch Suppressor-Mutationen beeinflusst wird, erfüllt die Anforderungen eines phylogenetischen Markers. Die rRNA-Analyse einer Vielzahl von Bakterien führte nicht nur zur Aufspaltung der Prokaryoten in Eubakterien und Archaeobakterien, sondern unterstützte auch die Endosymbiontentheorie (Schwarz & Dayhoff, 1978; Wolters & Erdmann, 1986).

Weitere RNA-Klassen sind die *small nuclear* RNAs (snRNA) im eukaryotischen Spleißosom (Stryer, 1994) und die am *protein targeting* beteiligten RNAs (*small cytoplasmatic* RNA [scRNA], 4.5S RNA, 7S RNA und 7SL-RNA; Lorberboum *et al.*, 1986; Bald *et al.*, 1992).

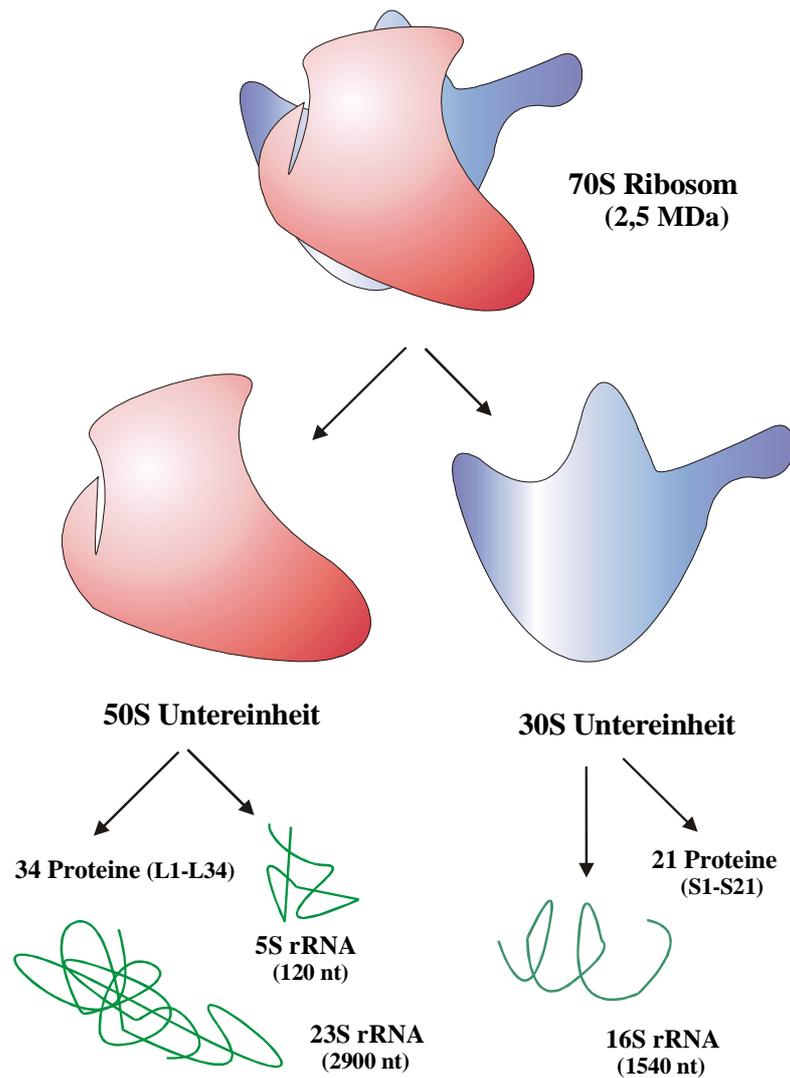
## 1.2 Ribosomale 5S RNA

Im Einklang mit den ribosomalen Proteinen hat die 5S rRNA eine Ko-Evolution von über drei Milliarden Jahren durchlaufen, an deren heutigen Punkt eine effiziente und korrekte Proteinsynthese des Ribosoms steht. Das ubiquitäre Vorkommen der 5S rRNA in Pro- und Eukaryoten und ihr hoher Konservierungsgrad implizieren, daß sie eine essentielle Funktion im Ribosom besitzt. Abb. 1.1 zeigt den schematischen Aufbau eines bakteriellen Ribosoms: Es setzt sich aus einer großen 50S und einer kleinen 30S Untereinheit zusammen, von denen jede aus einer Anzahl Proteinen sowie RNA-Komponenten besteht. Die 5S rRNA befindet sich in der großen ribosomalen Untereinheit und liegt dort assoziiert mit verschiedenen Bindungsproteinen vor.

### ***Proteinsynthese***

In einer Bakterienzelle translatieren rund 20.000 Ribosomen die mRNA in Proteine.

Die Proteinsynthese verläuft in den drei Stufen Initiation, Elongation und Termination. Die Paarung der purinreichen Shine-Dalgarno-Sequenz der mRNA mit dem 3'-Ende der 16S rRNA und die Bindung des Startcodons der mRNA (AUG) an das Anticodon der fMet-Initiator-tRNA, die die P-(Peptidyl-)Stelle des Ribosoms besetzt, initiieren den Syntheseprozess. Am Entstehen des 70S Initiationskomplexes sind die Initiationsfaktoren IF1, IF2 und IF3 beteiligt.

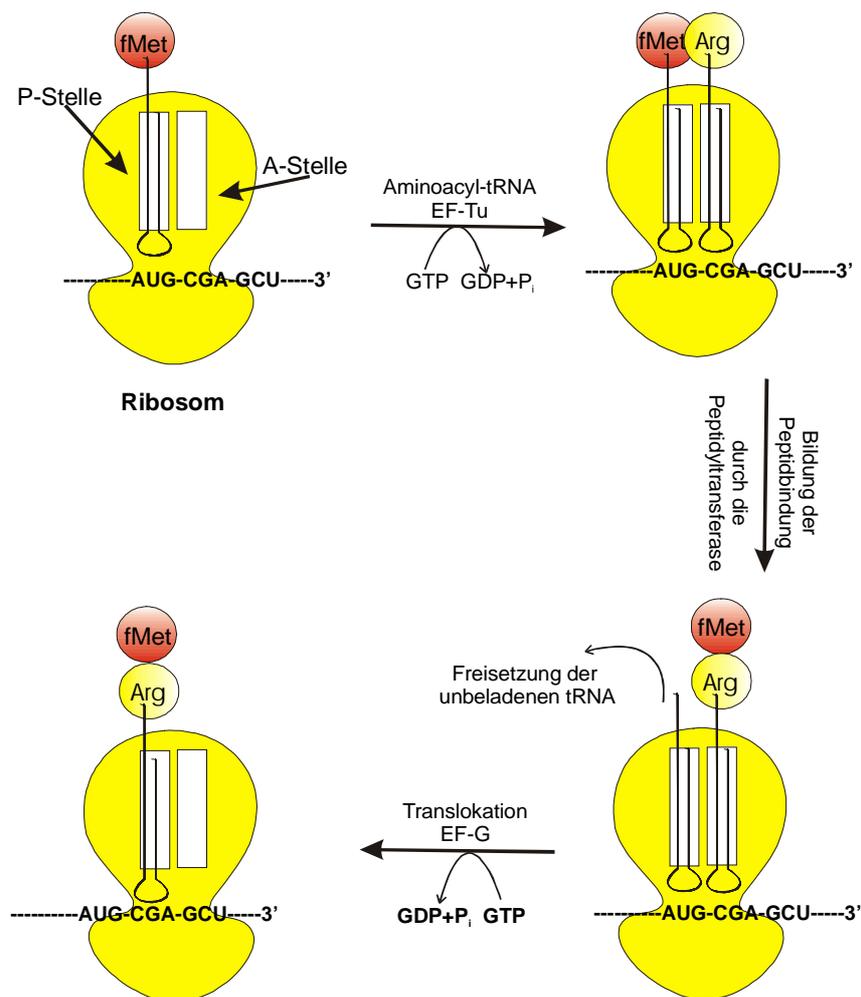


**Abb. 1.1 Zusammensetzung des prokaryotischen Ribosoms.**

Im ersten Schritt der Elongation wird die zum mRNA-Codon komplementäre Aminoacyl-tRNA vom Elongationsfaktor EF-Tu an die zweite tRNA-Bindungsstelle, die A-(Aminoacyl-)Stelle transportiert (Abb. 1.2). EF-Tu durchläuft einen GTP-GDP-Zyklus: Nach erfolgtem Transport wird GTP hydrolysiert, und die GDP-Form des Faktors dissoziiert vom Ribosom ab. GDP wiederum dissoziiert durch Einwirkung von EF-Ts von EF-Tu ab, der anschließend ein neues GTP und eine neue Aminoacyl-tRNA binden kann (Stryer, 1994).

Eine enzymatische Aktivität der 50S Untereinheit ist die Peptidyltransferase. Sie katalysiert die Knüpfung der Peptidbindung zwischen Aminosäuren durch die Übertragung einer aktivierten Peptidkette in der P-Stelle auf die Aminogruppe der Aminoacyl-tRNA in der A-Stelle. In Rekonstitutionsexperimenten, d. h. dem *in-vitro* Zusammenbau des Ribosoms, konnte der Einfluß der 5S rRNA auf die Peptidyltransferase-Aktivität gezeigt werden. Fehlte

die 5S rRNA, wiesen Ribosomen eine deutlich verringerte Aktivität auf (Nomura & Erdmann, 1970; Erdmann *et al.*, 1971a; Hartmann *et al.*, 1988). Aufgrund der großen Entfernung vom Peptidyltransferase-Zentrum ist die 5S rRNA jedoch nicht direkt an Wechselwirkungen mit ribosomalen Liganden beteiligt (Ban *et al.*, 2000). Stattdessen wird eine Funktion der ribosomalen 5S RNA im Zusammenbau der ribosomalen Peptidyltransferase bestehen. Hier ist festzuhalten, daß die Abwesenheit der 5S rRNA weder mit dem effizienten Aufbau kompakter ribosomaler 50S Untereinheiten interferiert, noch das Fehlen essentieller Proteine (L2, L3, L13, L17, L18, L21 und L22) für den aktiven Peptidyltransferase-Partikel bedingt. Folglich dürfte die 5S rRNA für die korrekte Positionierung funktionell wichtiger Segmente der Domänen II und V der 23S rRNA verantwortlich sein (Khaitovich & Mankin, 1999). Trotz Strukturdaten der großen ribosomalen *Haloarcula marismortui* Untereinheit bleibt die exakte Wirkungsweise der 5S rRNA im Dunkeln (Ban *et al.*, 2000). Erst verschiedene Konformationen im isolierten und komplexierten Zustand sowie innerhalb eines dynamischen Ribosoms werden tiefere Einblicke in ihre Funktionen geben.



**Abb. 1.2 Schema der Elongation während der Proteinbiosynthese.**

Im letzten Schritt der Elongation treibt die GTP-Form der Translokase EF-G die Bewegung der mRNA und der Peptidyl-tRNA von der A- zur P-Stelle an. Die unbeladene tRNA verläßt die P-Stelle, und ein weiterer Elongationszyklus startet mit der Bindung einer neuen Aminoacyl-tRNA an die A-Stelle.

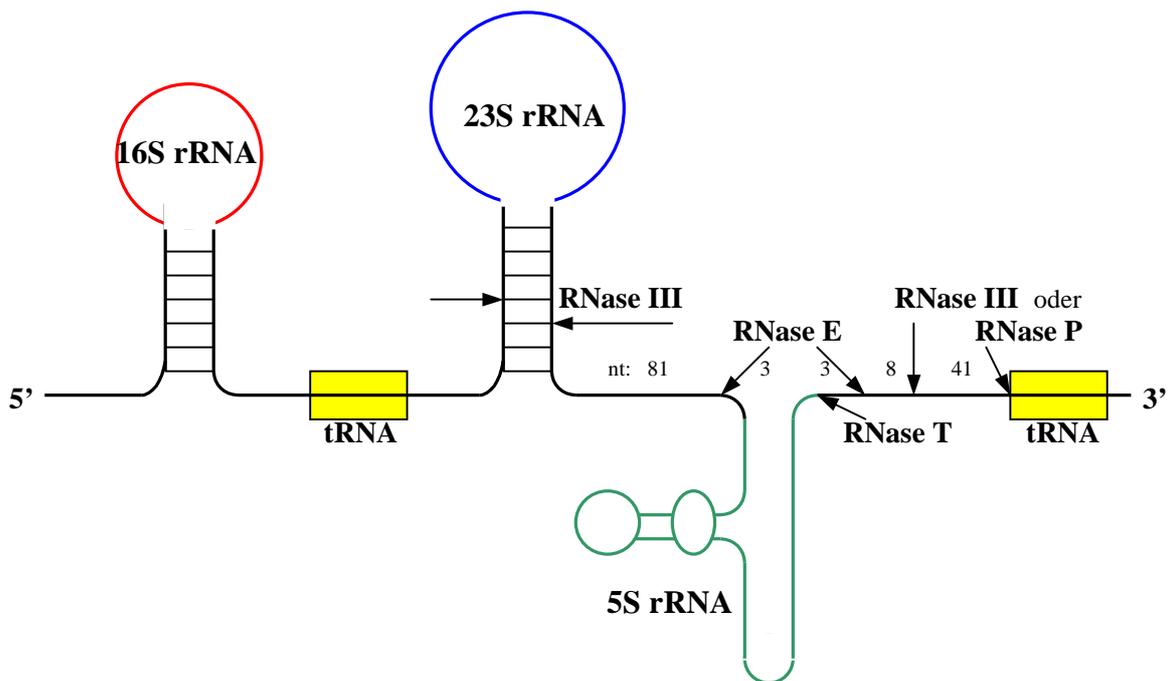
Bei der Termination werden Stopcodons durch die Proteinfaktoren RF1 und RF2 erkannt. Das führt zur Hydrolyse der Bindung zwischen dem Polypeptid und der tRNA, indem Wasser anstelle der Aminogruppe als Akzeptor des aktivierten Peptids fungiert. Das synthetisierte Protein sowie die tRNA und die mRNA werden freigesetzt, und das Ribosom dissoziiert in seine Untereinheiten (Stryer, 1994).

**rDNA-Genanordnung und 5S rRNA-Prozessierung**

Die generelle Genanordnung in eubakteriellen rDNA-Operons ist

$$5' - 16S\ rDNA - tDNA(s) - 23S\ rDNA - 5S\ rDNA - (tDNA) - 3'$$

In *E. coli* wurden sieben *rrn*-Operons (A bis F, X, Abb. 1.3) gefunden (Brosius *et al.*, 1981). Durch die Aktivitäten der RNase III hinter den 3'-Enden der 23S rRNA und 5S rRNA (*rrnB*) bzw. der RNase P am 5'-Ende einer nachfolgenden tRNA (*rrnC*, D und F) wird ein 5S rRNA-Primärtranskript aus dem 30S Primärtranskript ausgeschnitten (Apirion & Miczak, 1993), das anschließend durch die RNase E zur p5 RNA mit drei zusätzlichen Nukleotiden an beiden Enden prozessiert wird (Ray *et al.*, 1982; Szeberenyi *et al.*, 1984).



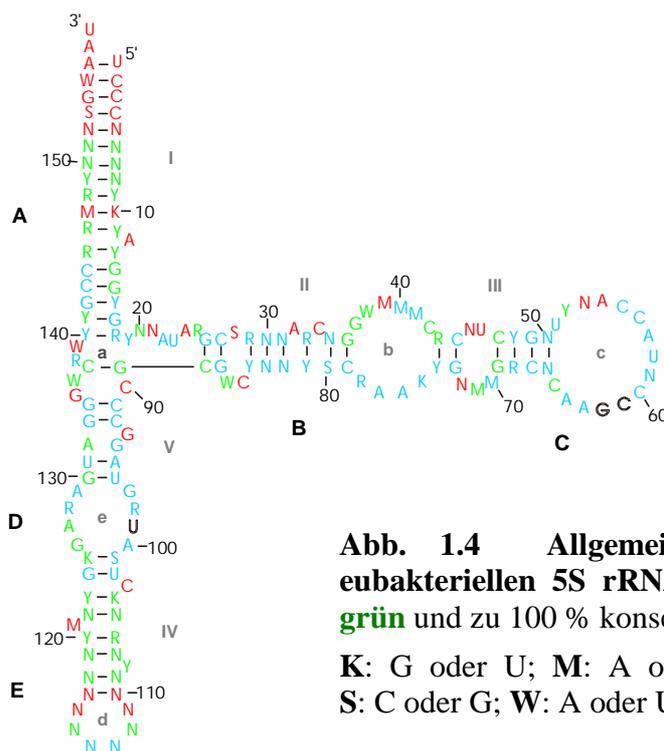
**Abb. 1.3 30S Primärtranskript des *E. coli* rDNA Operons.**

RNase T katalysiert die finale Reifung des 3'-Endes der 5S rRNA; die Exonuklease für das 5'-Ende konnte bisher nicht identifiziert werden (Zhongwei *et al.*, 1998). Ein anderer Prozessierungsweg wurde *in-vitro* für *Bacillus subtilis* aufgezeigt. Der RNase M5-Komplex, bestehend aus dem katalytischen  $\alpha$ -Protein und dem Stützprotein BL16 (Pace *et al.*, 1984), bewirkt die terminale Reifung der 5S rRNA-Precursor p5<sub>A</sub> und p5<sub>B</sub>. Als Erkennungsmerkmal für die simultane, endonukleolytische Abspaltung wurde eine zweifache Rotationssymmetrie von Precursor und 5S rRNA postuliert (Sogin *et al.*, 1977).

Im Kontrast zur allgemeinen rDNA-Genorganisation existieren in *Thermus thermophilus* nur zwei Kopien der rRNA-Gene. Es besteht eine deutliche Trennung der 16S rDNA vom 23S/5S rDNA Fragment, deren Transkriptionen entkoppelt sind (Hartmann *et al.*, 1987).

### 5S rRNA-Strukturmodelle

In der Primärstruktur der 5S rRNA wurden nur wenige modifizierte Nukleoside ermittelt, wie 2'-O-Methylcytidin in der Domäne C von *Sulfolobus acidocaldani* (Kirpekar *et al.*, 2000).



**Abb. 1.4** Allgemeines Sekundärstrukturmodell der eubakteriellen 5S rRNA. Insertionen sind rot, Deletionen grün und zu 100 % konservierte Basen schwarz dargestellt.

**K:** G oder U; **M:** A oder C; **N:** beliebige Base; **R:** Purin; **S:** C oder G; **W:** A oder U; **Y:** Pyrimidin.

Phylogenetische, chemische, enzymatische und spektroskopische Studien (Übersicht in Barciszewska *et al.*, 1996) erlaubten die Konstruktion eines Sekundärstrukturmodells, das in fünf Domänen A – E unterteilt ist (u. a. Specht *et al.*, 1990). (Daneben existiert eine andere Nomenklatur mit den Helices I – V sowie den Loops a – e [Barciszewska *et al.*, 2000]). Es postuliert eine Stuhlform „h“, in der die Domänen A–D–E eine langgezogene Helix bilden, während die Domänen B und C als Gelenkarm zur Seite stehen (Abb. 1.4).

Weitere Untersuchungen zur Zugänglichkeit von Nukleotiden und von tertiären Interaktionen mit o. g. Methoden schlagen ein dreidimensionales Y-Modell mit zwei kurzen und einer langen Helix vor (Brunel *et al.*, 1991) – teilweise ergänzt um Quervernetzungen zwischen den Domänen C und E (Pieler & Erdmann, 1982).

### ***5S rRNA-Bindungsproteine***

Die Erkenntnis, daß es sich beim Ribosom um eine Ribozym handelt, reduziert die essentielle Funktion der ribosomalen Proteine auf die Ausrichtung und Fixierung der relativen Orientierung angrenzender RNA-Domänen sowie die Stabilisierung der RNA-Tertiärstruktur. Anhand der Struktur der großen ribosomalen Untereinheit von *Haloarcula marismortui* wird das Ausfüllen der Lücken zwischen den RNA-Bausteinen durch die Proteine deutlich (Ban *et al.*, 2000). Daraus resultieren ungewöhnlich langgezogene Proteinkonformationen, die im isolierten Zustand nicht zu beobachten sind (Brimacombe, 2001).

Sowohl die proteinvermittelten als auch direkten Kontakte der ribosomalen 5S RNA zur 23S rRNA, deren Domäne V das katalytische Zentrum des Ribosoms darstellt, sind sehr intensiv. In Abhängigkeit vom Organismus interagiert die 5S rRNA mit einer unterschiedlichen Anzahl von Proteinen. In *Escherichia coli* wurden EcoL5, EcoL18 und EcoL25 als 5S rRNA-bindend identifiziert (Horne & Erdmann, 1972). In *Bacillus stearothermophilus* konnten nur zwei Proteine, BL5 und BL16 (bzw. BL22), mit Homologie zu EcoL5 und EcoL18 charakterisiert werden (Horne & Erdmann, 1972; Pace *et al.*, 1984; Kimura & Kimura, 1987). Darüber hinaus existiert in *Bacillus subtilis* das Streßprotein CTC mit einer 28 %-igen Identität zu EcoL25 (Gryaznova *et al.*, 1996). In der Kristallstruktur der ribosomalen 50S Untereinheit von *Haloarcula marismortui* wurden Interaktionen der 5S rRNA mit L5, L10e, L18, L21e und L30 beobachtet (Ban *et al.*, 2000). In Eukaryonten bindet dagegen ausschließlich L5 (Gross *et al.*, 1985).

L5<sup>1</sup> lagert sich an die 5S rRNA Domäne A (Gross *et al.*, 1985; Nakashima *et al.*, 2001), L18<sup>1</sup> besitzt eine zweiseitige Bindungsstelle im Bereich der Domäne B (Egebjerg *et al.*, 1989), und L25<sup>1</sup> komplexiert die Domäne D (Stoldt *et al.*, 1999; Lu & Steitz, 2000).

Steitz *et al.* (1988) vermuten, daß der 5S rRNA-L5-Komplex einen Vorläufer beim Zusammenbau des eukaryotischen Ribosoms darstellt, der in der Lage ist, zwischen Nukleus und Cytoplasma zu migrieren. Im Prokaryoten *E. coli* stimuliert erst L18 eine kooperative Bindung von L5 und L25 an die 5S rRNA. L5 verbindet den Loop C der *H. marismortui* 5S rRNA mit der Domäne V der 23S rRNA, und L18 lagert die 5S rRNA-Helices I, II und III

---

<sup>1</sup> Die allgemeinen Bezeichnungen L5, L18 und L25 beziehen sich auf sämtliche Proteine aus verschiedenen Mikroorganismen mit einer Homologie zu EcoL5, EcoL18 und EcoL25.

an die Helix 87 der 23S rRNA (Ban *et al.*, 2000). Bekannt ist auch eine interessante Stützfunktion von BL16 in *B. stearothermophilus*, das als Bestandteil des RNase M5-Komplexes die Prozessierung des 5S rRNA-Primärtranskripts fördert (Pace *et al.*, 1984).

Vier benachbarte Transkriptionseinheiten, das *str*-, *S10*-, *spc*- sowie das  $\alpha$ -Operon, beinhalten die Gene für 28 ribosomale *E. coli* Proteine. Die Gene für die 5S rRNA Bindungsproteine L5 und L18 befinden sich auf dem *spc*-Operon (Vysotskaya *et al.*, 1997).

Die 5S rRNA tritt auch mit nicht-ribosomalen Proteinen in Wechselwirkung, wie dem Transkriptionsfaktor TF IIIA aus *Xenopus laevis*, der die Transkription durch Bindung an das 5S rRNA-Gen reguliert und die 5S rRNA als Ribonukleoprotein vor dem ribosomalen Zusammenbau lagert (Barciszewska *et al.*, 1996). Als Kofaktor steigert die 5S rRNA die Methionyl- und Isoleucyl-tRNA-Synthetaseaktivität durch direkte Interaktionen mit Enzym und tRNA im makromolekularen Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Komplex (Ogata *et al.*, 1996). Bessarab *et al.* (1998) lokalisierten die 5S rRNA auch im Degradosom.

Insgesamt gesehen stellt die ribosomale 5S RNA ein geeignetes Modellsystem dar, aus dem fundamentale Aufgaben der RNA-Konformation und der RNA-Protein-Wechselwirkung abzuleiten sind. Ihre beschriebenen vielfältigen Interaktionen werden erst durch Bilder ihrer dreidimensionalen Struktur verständlich. Obwohl die 5S rRNA nur eine Länge von 120 nt hat, macht das Molekulargewicht von 40 kDa NMR-Untersuchungen schwierig, so daß auf die Röntgenstrukturanalyse zurückgegriffen werden muß.

### 1.3 RNA-Strukturaufklärung

Wie aus der Brookhaven Protein Data Bank (PDB) hervorgeht, gelang es seit der Strukturaufklärung des Myoglobins im Jahr 1957 eine große Anzahl von dreidimensionalen Proteinstrukturen zu lösen. Diese Strukturen ermöglichen nicht nur ein gezieltes *Drug Design*, sondern mit steigender Zahl bekannter Faltungsmotive werden auch theoretische Strukturvorhersagen für pharmazeutisch interessante Target-Moleküle präziser. Die Fortschritte in der Proteinkristallographie erleichtern heutzutage ein schnelles Screening neuer Moleküle auf Kristallisierbarkeit, worauf ehrgeizige Projekte, wie die Lösung einer Struktur pro Tag in der Berliner Proteinstrukturfabrik, basieren (Heinemann *et al.*, 2000)

Mit dem Aufkommen der RNA-Technologien in den letzten Jahren wurde die Bedeutung der Ribonukleinsäure als strukturelles Molekül entdeckt. 1998 waren lediglich 30 RNA-Strukturen publiziert, woraus sich das wachsende Interesse nach Faltungsmotiven für das

funktionelle RNA-Design ableitet. Neben dem Strukturentwurf zählen dazu die korrekte räumliche Positionierung von chemischen Modifikationen zur Verbesserung des pharmakokinetischen Profils oder der Einbau von Reportergruppen in hochaffine, diagnostische RNAs, die für die applikative Funktionalisierung benötigt werden (Butler *et al.*, 1997; Tucker *et al.*, 1999). Das Auftreten von RNA als einzelsträngiges Molekül und die Existenz von Basenpaarungen, die keine klassischen Watson-Crick-Wasserstoffbrücken ausbilden, bedingen eine strukturelle Vielfalt, in der die funktionelle Diversität der RNA begründet liegt. Diese Flexibilität der RNA-Faltung erschwert die Kristallisation langer RNA-Moleküle, so daß lediglich vier große RNA-Strukturen bekannt sind: die tRNA (Holbrook & Kim, 1997), das Hammerhead-Ribozym (Pley *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1995), die P4-P6 Domäne (160 nt) des *Tetrahymena thermophila* Gruppe I Introns (Cate *et al.*, 1996) und ein 62 nt Fragment der *E. coli* 5S rRNA (Correll *et al.*, 1997a).

Darüber hinaus gelang die Kristallisation der ribosomalen Untereinheiten mit hervorragenden Auflösungen der Kristalle von 2,4 Å für die 50S Untereinheit von *H. marismortui* (Ban *et al.*, 2000) und 3,1 Å für die 30S Untereinheit von *Th. thermophilus* (Ogle *et al.*, 2001). In diesem Kontext werden die 23S rRNA, 5S rRNA und 16S rRNA durch komplexierende Bindungsproteine stabilisiert.

## 1.4 Kristallisation & Diffraktion der *Thermus flavus* 5S rRNA

Bereits 1982 gelangen Morikawa *et al.* die Kristallisation der nativen *Th. thermophilus* 5S rRNA, deren dreieckige Kristallplättchen bis 25 Å diffraktierten. Ein systematisches Screening ribosomaler 5S RNAs aus 18 verschiedenen Organismen auf ihr Kristallisations- und Diffraktionsverhalten resultierte in einer maximalen Auflösung von 8,0 Å für einen Kristall der *Th. flavus* 5S rRNA (Lorenz *et al.*, 1991). Möglicherweise ist die Thermophilie als Ursache für diese kompakteste tertiäre 5S rRNA-Struktur anzusehen. Durch ein *genetic engineering* der 5'- und 3'-Enden und die Kristallisation unter Mikrogravitationsbedingungen konnte die Auflösung der zylinderförmigen Kristalle auf 7,4 Å gesteigert werden (Lorenz *et al.*, 2000). Die für eine Strukturlösung unzureichende Auflösung legt die Vermutung nahe, daß die Moleküle partiell ungeordnet im Kristallgitter vorliegen und einzelne Molekülbereiche frei beweglich sind. Für diese intrinsische Flexibilität gibt es zwei Gründe:

1. Unter der realistischen Annahme von zwei Molekülen je asymmetrischer Einheit ist der Solventanteil von 54 % als sehr hoch einzustufen.
2. Anhand des Sekundärstrukturmodells der 5S rRNA (Abb. 4.1a) ist eine interne „Atmung“ der Domänen B und C wahrscheinlich.

Die Fixierung der Domäne C an die Domäne E mittels kurzer RNA-Oligonukleotide und die nachfolgende Kokristallisation führten jedoch zu keiner Verbesserung der Diffraktionseigenschaften. Auch eine Variation der Kristallisationsbedingungen ergab ausschließlich Kristalle gleicher Morphologie und Auflösung mit der Raumgruppe *R32*.

Neben neuen Ansätzen zum RNA-Moleküldesign sowie der stabilisierenden Kokristallisation mit Bindungsproteinen, wie sie Gegenstand dieser Arbeit sind, wurde in den letzten Jahren die Strategie verfolgt, zunächst einzelne Domänen komplexer Moleküle zu untersuchen (Lorenz *et al.*, 1993; Förster *et al.*, 1999). Damit erhält man die Möglichkeit, Teilstrukturen sukzessiv zu einer vorläufigen Gesamtstruktur zusammenzusetzen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die kurzen Fragmente einer chemischen Synthese zugänglich sind, die das Problem der Heterogenität von *in-vitro* Transkripten umgeht (Bald *et al.*, 1992). Die Domäne A der *Th. flavus* 5S rRNA war die erste chemisch hergestellte native RNA, die kristallisiert (Abb. 1.5) und deren Struktur gelöst wurde (Betzel *et al.*, 1994). Weitere Kristallstrukturen der Domäne E aus *Th. flavus* (Perbandt *et al.*, 1998) und eines 62 nt Fragments der *E. coli* 5S rRNA Domänen A–D–E folgten (Correll *et al.*, 1997a).



**Abb. 1.5** Kristall der *Th. flavus* 5S rRNA Domäne A.

NMR-Strukturen der *E. coli* 5S rRNA Domänen A und E sowie der *Th. flavus* 5S rRNA Domäne E ergänzten das Bild (White *et al.*, 1992; Grüne *et al.*, 1996a; Dallas & Moore, 1997).

Von besonderem Interesse war wiederholt die Loopstruktur der Domäne E. Trotz unterschiedlicher Sequenzen des terminalen Hairpin-Loops in den beiden genannten Mikroorganismen sind die Strukturen homolog. Der stabile Tetraloop der *Th. flavus* 5S rRNA gehört zur hochkonservierten 5'-GNRA-3'-Klasse, die bereits in anderem Kontext, am Hammerhead-Ribozym, analysiert wurde (Pley *et al.*, 1994).

## 1.5 Kristallstruktur gegen Lösungsstruktur

Als Kernfrage stellt sich, inwieweit die kristallinen Strukturen mit den nativen Molekülstrukturen übereinstimmen. Mit der NMR-Spektroskopie steht eine Methode zur Verfügung, die für atomare Strukturuntersuchungen von Molekülen in Lösung geeignet ist. Ihre limitierenden Parameter sind die Größe des Moleküls (< 20 kDa) und der gezielte Einbau von

isotopenmarkierten Nukleotiden in bestimmte Positionen der RNA bzw. des Proteins. Während kleine RNA-Moleküle einer Analyse mit der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie zugänglich sind (Grüne *et al.*, 1996a), wird für hochauflösende NMR-Studien komplexer Makromoleküle deren Anreicherung mit  $^{15}\text{N}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Isotopen benötigt (Dallas & Moore, 1997; Stoldt *et al.*, 1999). Der Vergleich multipler Konformationen der *E. coli* 5S rRNA Domäne E im Kristall und in Lösung ergab eine sehr gute Korrelation mit r.m.s.-Abweichungen um 1 Å (Grüne *et al.*, 1996a; Rife *et al.*, 1999). Auch der *E. coli* Komplex aus dem Protein L25 und einem 5S rRNA-Fragment wies mit einer r.m.s.-Abweichung von 2,2 Å zwischen NMR und Röntgenstrukturanalyse eine große Ähnlichkeit auf (Stoldt *et al.*, 1999; Lu & Steitz, 2000). Im nächsten Schritt konnte sogar der Strukturerhalt über Artgrenzen hinaus gezeigt werden. Das in der Kristallstruktur der *Th. flavus* 5S rRNA Domäne E (Perbandt *et al.*, 2001) beobachtete Motiv der G:U-Wobble-Basenpaare in Tandemformation existiert analog in der NMR-Struktur eines 42 nt Fragments der Domänen D und E der *E. coli* 5S rRNA (Dallas & Moore, 1997). Diese übereinstimmenden Ergebnisse erklären sich zwangsläufig mit dem Vorhandensein von Lösungsmittelkanälen im Kristall, die bis zu 80 % des Volumens einnehmen können. Die Hydratation des Makromoleküls im Kristall ist damit der in Lösung ähnlich, so daß sich die molekulare Struktur beim Einbau in das Kristallgitter nicht oder nur unwesentlich ändert.

## 1.6 Grundlagen der Kristallographie

### *Kristallaufbau*

Ein Kristall ist ein homogenes, anisotropes Diskontinuum und besteht aus einer periodischen Anordnung gleichartiger Bausteine, die in allen drei Raumdimensionen streng geordnet vorliegen und ein Kristallgitter aufbauen. Die Bausteine des Kristallgitters verkörpern Atome, Ionen oder Moleküle, deren Gestaltmittelpunkte abstrahiert die Gitterpunkte besetzen. Die räumliche Periodizität der Anordnung der Gitterpunkte spiegelt sich in Gitterkonstanten, den Translationsvektoren  $a$ ,  $b$  und  $c$  sowie den Winkeln  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , wider. Sie definieren die Einheits- bzw. Elementarzelle. Die Elementarzelle kann durch Symmetrieelemente weiter in asymmetrische Einheiten unterteilt werden. Diese können aus mehreren unabhängigen Molekülen, aber auch aus der Untereinheit eines einzelnen homo-oligomeren Moleküls, das eine interne Symmetrie aufweist, bestehen.

Durch Auswahl der Richtungen höchster Symmetrie im Kristallgitter und unter Berücksichtigung möglichst kleiner, gleicher und/oder senkrecht aufeinanderstehender Vektorbeträge für die Kanten der Elementarzelle erhält man neben dem kartesischen bzw. kubischen

Achsensystem sechs verschiedene weitere Achsensysteme. Durch Hinzunahme kürzerer Translationen auf den drei Koordinatenachsen werden aus den sieben Achsensystemen 14 Bravais-Gitter abgeleitet. In Abhängigkeit von diesen Translationen und damit der Besetzung der Gitterpunkte unterscheidet man primitive (P), flächenzentrierte (A, B, C, F) und innenzentrierte Gitter (I). Die Bravais-Gitter stellen einen Ausschnitt des Raumgitters dar, der den inneren Aufbau und die innere Symmetrie charakterisiert (Tab. 1.1).

**Tab. 1.1 Achsensysteme und Bravais-Gitter.**

Achsensystem	Zellkonstanten	Bravais-Gitter
Triklin	$a \neq b \neq c; \alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	• primitiv triklin
Monoklin	$a \neq b \neq c; \alpha = \gamma = 90^\circ, \beta \neq 90^\circ$	• primitiv monoklin • basisflächenzentriert monoklin
Orthorhombisch	$a \neq b \neq c; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	• primitiv orthorhombisch • basisflächenzentriert orthorhombisch • innenzentriert orthorhombisch • allseitig flächenzentriert orthorhombisch
Tetragonal	$a = b \neq c; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	• primitiv tetragonal • innenzentriert tetragonal
Rhomboedrisch	$a = b = c; \alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	• primitiv rhomboedrisch
Hexagonal	$a = b \neq c; \alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$	• primitiv hexagonal
Kubisch	$a = b = c; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	• primitiv kubisch • innenzentriert kubisch • flächenzentriert kubisch

Drehung, Spiegelung, Inversion und Translation sind Symmetrieeoperationen, die ein Objekt (Gitterpunkt) mit sich selbst zur Deckung bringen. Die einmalige oder mehrfache Anwendung einer einzelnen oder verschiedener Operationen wird in einem Symmetrieelement zusammengefaßt. Hierbei wird zwischen Punktsymmetrieelementen (Drehachse, Spiegelachse, Inversionszentrum) und Struktursymmetrieelementen (Punktsymmetrieelemente plus Translation, Schraubenachse und Gleitspiegelebene) unterschieden.

Zwischen der Struktur der Kristalle (innere Symmetrie) und ihrer Morphologie (äußere Symmetrie) gilt das Korrespondenzprinzip. Durch Kombination der Punktsymmetrieelemente in den 14 Bravais-Gittern werden zunächst 32 Kristallklassen (Punktgruppen) erhalten, die die äußere Gestalt repräsentieren. Die Kombination der Struktursymmetrieelemente mit den 14 Bravais-Gittern ergibt 230 Raumgruppen, in denen Substanzen kristallisieren können (Kleber, 1961). Aufgrund des enantiomorphen Aufbaus von Proteinen aus L-Aminosäuren bzw. von Nukleinsäuren aus D-Furanosen sind hier spiegelnde Symmetrieelemente nicht erlaubt, so daß sich die Anzahl der Raumgruppen auf 65 verringert (Tab. 1.2).

**Tab. 1.2 Enantiomorphe Raumgruppen.** Buchstaben beziehen sich auf die Gitterpunkt-Besetzung im Bravais-Gitter, Zahlen auf das Punkt- bzw. Struktursymmetrieelement in der Achsenreihenfolge a, b, c.

Kristallsystem	Raumgruppensymbol
Triklin	$P1$
Monoklin	$P2, P2_1, C2$
Orthorhombisch	$C222, P222, P2_12_12_1, P2_12_12, P222_1, F222, I222, I2_1, I2_12_12_1$
Tetragonal	$P4, P4_1, P4_2, P4_3, I4, I4_1;$ $P422, P42_12, P4_122, P4_12_12, P4_222, P4_22_12, P4_32_12, P4_322, I422, I4_122$
Trigonal	$P3, P3_1, P3_2, R3$ $P312, P321, P3_121, P3_112, P3_212, P3_221, R32$
Hexagonal	$P6, P6_1, P6_2, P6_3, P6_4, P6_5$ $P622, P6_122, P6_222, P6_322, P6_422, P6_522$
Kubisch	$P23, F23, I23, P2_13, I2_13$ $P432, P4_132, P4_232, P4_332, F432, F4_132, I432, I4_132$

### **Röntgendiffraktion**

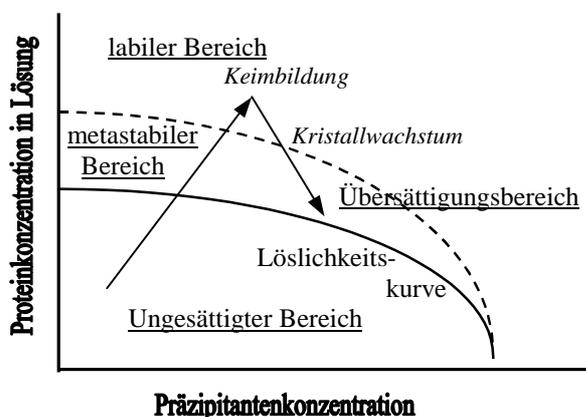
Elektromagnetische Röntgenwellen treten mit Elektronen in Wechselwirkung. Durch die periodische Anordnung der Moleküle im Kristall kommt es zwischen den gebeugten Strahlen zu Interferenzerscheinungen, deren Interferenz konstruktiv ist, wenn der Gangunterschied zweier Wellen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist (Braggsches Gesetz). Jeder Netzebenenschar im realen Raumgitter, deren Raumlage mit den Millerschen Indizes h, k, l beschrieben wird, entspricht ein Reflex auf dem Diffraktionsbild, das als Abbild eines reziproken Raumes definiert und durch die Ewald-Kugel graphisch veranschaulicht wird.

Während die Stärke der Filmschwärzung eine Aussage über die Intensität eines Reflexes macht, geht die Phaseninformation der am Kristallgitter reflektierten Röntgenwellen verloren. Zur Lösung des Phasenproblems der Kristallographie und der nachfolgenden Berechnung der Elektronendichteverteilung werden zwei Methoden angewendet: Der molekulare Ersatz setzt eine bekannte, ähnliche Struktur als Suchmodell voraus. Der isomorphe Ersatz mit Schweratomderivaten kommt bei der Berechnung neuer Strukturen zum Einsatz. Für detaillierte Beschreibungen zur Röntgenstrukturanalyse sei auf die Fachliteratur verwiesen (Drenth, 1994).

### **Kristallisation**

Der Übergang in den kristallinen Zustand geht mit einer Minimierung der freien Energie als treibender Kraft einher. Aus wäßrigen Lösungen entstehen Kristalle durch das Erreichen einer Übersättigung. Voraussetzung für die spontane Keimbildung, deren kritische Nukleations-

größe bei 30 bis 40 Molekülen liegt, ist ein labiler Übersättigungsbereich. Das folgende Kristallwachstum vollzieht sich in einem Gradienten, der die Rückkehr des Systems in den Gleichgewichtszustand und eine sinkende Übersättigung forciert (Abb. 1.6). Makroskopische Kristalle enthalten ungefähr  $10^{15}$  Moleküle (McPherson, 1990; Weber, 1997).



**Abb. 1.6 Phasendiagramm.** Die Pfeile repräsentieren den Konzentrations-Zeit-Verlauf während des Kristallisationsprozesses.

Die fundamentale Frage, warum bestimmte Lösungen Kristalle erzeugen, ist unbeantwortet. Die Antwort könnte in einem Lösungsparameter liegen, der – unabhängig von der Zusammensetzung der Mutterlösung – die Eigenschaft charakterisiert, bimolekulare Wechselwirkungen zur Bildung kristalliner Aggregate zu fördern. Einen ersten Anhaltspunkt boten Messungen des zweiten virialen Koeffizienten  $B_{22}$  durch statische Lichtstreuung. Sie enthüllten einen definierten Bereich von  $B_{22}$  zwischen  $-0,0001$  und  $-0,0008 \text{ mol} \cdot \text{l/g}^2$ , der mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Proteinkristallen führt. Für Oligonukleotide wurden größere negative  $B_{22}$ -Werte des Kristallisationsfensters bestimmt (George *et al.*, 1997).

Die wesentlichen Komponenten einer Kristallisationslösung (Mutterlösung) sind Präzipitant, Gegenionen, Puffer und Polyamin. Als Präzipitanten finden organische Lösungsmittel, Salze und Polymere Verwendung. Die Verringerung der Dielektrizitätskonstanten in Anwesenheit organischer Lösungsmittel (Ethanol, iso-Propanol, 1,6-Hexandiol, MPD) führt zur Vergrößerung der elektrostatischen Anziehung auf der Oberfläche und einer sinkenden Löslichkeit. Proteine und Nukleinsäuren werden als große, polyvalente Ionen betrachtet, die von einer Atmosphäre aus Gegenionen umgeben sind, welche mit Wassermolekülen in Wechselwirkung treten. Während eine niedrig konzentrierte Ionenatmosphäre Interaktionen begünstigt und die Löslichkeit gegenüber Bidest. erhöht (*salting in*), kommt es bei höherer Ionenstärke zur Konkurrenz um die Wassermoleküle (*salting out*). Kleine hochgeladene Ionen wirken hier effektiver ( $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ). Gängige Gegenionen in der RNA-Kristallisation sind Lithium, Natrium, Magnesium oder Kalzium, wobei insbesondere divalente Kationenbrücken einen wichtigen Einfluß auf die Strukturausbildung haben.

Polymere, wie PEG, bewirken sowohl eine Dehydratation von Proteinen und Nukleinsäuren als auch eine Veränderung der Dielektrizitätskonstanten. Darüber hinaus verursacht PEG eine komplexe Restrukturierung des Lösungsmittels, die eine Phasentrennung insbesondere zwischen Lösungsmittel und Proteinen fördert.

Über den pH-Wert des Puffers kann die Nettoladung eines biologischen Makromoleküls beeinflusst werden. Die geringste Löslichkeit liegt bei einer Nettoladung von Null vor. An diesem Punkt ist die Packung im Kristall aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen ohne eine hohe Energieakkumulation möglich. Bereits pH-Differenzen kleiner 0,5 können über den Kristallisationserfolg entscheiden.

Die polyanionische Natur von Nukleinsäuren erlaubt auch die Bindung multivalenter Kationen (wie Polyamine), welche die hohe Nettoladung neutralisieren und eine native Konformation begünstigen. Zwischen Spermidin und monovalenten Kationen konnte keine kompetitive tRNA-Bindung nachgewiesen werden. Stattdessen existieren spezifische Bindungsstellen, die über elektrostatische Interaktionen erkannt werden (McMahon & Erdmann, 1982).

Als wichtigste physikalische Einflußgröße der Kristallisation ist die Temperatur zu nennen, die über Dielektrizitätskonstante, Lösungsenergie und Entropie die Löslichkeit beeinflusst sowie die Diffusionsprozesse kontrolliert.

Eine Übersicht zu weiteren Parametern der Kristallisation sowie zu empirischen Kristallisationsstrategien gibt McPherson (1990).

### ***Kristallisationsmethoden***

Bei der Batch-Methode werden alle Komponenten in einer Lösung vereint, die sich anschließend in der labilen Übersättigungsphase befinden muß.

Die Technik der Freien Grenzflächendiffusion beinhaltet das Übersichten einer Kristallisationslösung mit der Mutterlösung, die das zu kristallisierende Molekül enthält. Die durch Diffusion und Konvektion entstehende Zwischenphase zeichnet sich durch eine hohe, lokale Übersättigung aus.

In der Dialyse bleibt die Konzentration des biologischen Makromoleküls konstant. Durch den Austausch der Mutterlösung gegen Pufferkomponenten und Präzipitant geht die Protein- bzw. Nukleinsäurelösung in den übersättigten Zustand über.

Die Dampfdiffusion – als Methode des Hängenden oder Sitzenden Tropfens durchgeführt – findet in einem geschlossenen System statt. Ein Konzentrationsgradient zwischen Reservoir und Kristallisationstropfen entzieht letzterem Wassermoleküle, so daß ein übersättigtes Niveau erreicht wird (Weber, 1997).