

**Einfluß von Mutationen in der Leader-Region  
eines ribosomalen RNA-Operons  
auf die Faltungskinetik und Assemblierung  
der kleinen ribosomalen Untereinheit**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Oliver Zirwes**

aus Oberhausen

Düsseldorf 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Referent: Prof. Dr. R. H. Wagner

Koreferent: Prof. Dr. H. Bünemann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Juni 2001

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf in der Zeit von September 1997 bis Dezember 2000.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. R. Wagner für die stete Diskussionsbereitschaft und die hilfreichen Anregungen.

Allen Mitarbeitern des Labors danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die auf humorvolle Art und Weise auch schon einmal einen Schicksalsschlag erträglicher machte.

Frau Reinhild Wurm danke ich für die Präparation von TP70 und der in diesem Rahmen bewegten Puffervolumen.

Herrn Dr. Gerhard Steger danke ich für die mathematische Unterstützung in „kinetischen“ Fragen und für so manchen trockenen Kommentar zwischen Tür und Angel.

Herrn Bernd Esters danke ich für die freundliche Gaben an T7-Polymerase.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung und das Verständnis für diese Arbeit.

Meiner Frau Annette danke ich für ihre Geduld und für ihre Hilfe während der ganzen Zeit.

## Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>6</b>
1.1 RNA – EIN MOLEKÜL MIT STRUKTUR UND VIELEN FUNKTIONEN .....	6
1.2 DIE FALTUNG VON RNA-MOLEKÜLEN: EINE WICHTIGE VORAUSSETZUNG IHRER FUNKTION ..	7
1.3 DIVALENTE METALL-IONEN SIND FÜR DIE STRUKTURBILDUNG ESSENTIELL .....	7
1.4 MAGNESIUM-IONEN KÖNNEN AUF ZWEI ARTEN MIT DER RNA INTERAGIEREN.....	8
1.5 DER KINETISCHE 'PARTITION'-MECHANISMUS: EIN MODELL DER RNA-FALTUNG .....	8
1.6 RNA-PROTEIN-WECHSELWIRKUNGEN .....	10
1.7 'INDUCED FIT'-MECHANISMEN.....	11
1.8 RIBOSOMEN – REGULATION UND BIOGENESE .....	12
1.9 DER LEADER-BEREICH – STRUKTUR UND FUNKTION.....	16
1.9.1 <i>Prozessierung</i> .....	16
1.9.2 <i>Antitermination</i> .....	17
1.9.3 <i>Pausierung</i> .....	18
1.9.4 <i>Strukturierung und Assemblierung</i> .....	18
1.10 FRAGESTELLUNG UND KONZEPTION DER ARBEIT .....	20
<b>2 ERGEBNISSE.....</b>	<b>22</b>
2.1 DER EINFLUß DES LEADERS AUF DIE PROTEINBINDUNG VON ASSEMBLIERUNGSVORSTUFEN .....	22
2.2 PROTEINBINDUNG AN DER ISOLIERTEN 5'-REGION.....	24
2.2.1 <i>Ergebnisse</i> .....	29
2.3 PROTEINBINDUNG AN DER VOLLSTÄNDIGEN 16S rRNA.....	30
2.3.1 <i>Ergebnisse</i> .....	33
2.4 DER LEADER UND DIE ASSEMBLIERUNG: EINE FRAGE DER STRUKTUR .....	35
2.5 STRUKTURANALYSE DER ASSEMBLIERTEN 5'-REGION.....	39
2.5.1 <i>Die Leader-Region</i> .....	39
2.5.2 <i>Das 5'-Ende der 16S rRNA</i> .....	41
2.5.3 <i>Die Helices 16,17 und 18</i> .....	42
2.6 STRUKTURANALYSE DER ASSEMBLIERTEN VOLLÄNGENTRANSKRIPTE .....	44
2.6.1 <i>Die Leader-Region</i> .....	45
2.6.2 <i>Das 5'-Ende der 16S rRNA</i> .....	48
2.6.3 <i>Die Helices 16,17 und 18</i> .....	49
2.6.4 <i>Die 3'-Region der 16S rRNA</i> .....	50
2.6.5 <i>Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Modifikationsanalysen</i> .....	52
2.7 DIE LEADERWIRKUNG: AUCH EINE FRAGE DES TIMINGS ? .....	54
2.7.1 <i>Die Methode</i> .....	56

2.8	KINETISCHE FALTUNGSANALYSE DER ISOLIERTEN 5'-REGION.....	59
2.9	KINETISCHE FALTUNGSANALYSE DER VOLLÄNGE .....	63
2.9.1	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse aus den kinetischen Analysen.....</i>	65
<b>3</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>67</b>
3.1.1	<i>bereits bekannte Leader-Informationen .....</i>	67
3.1.2	<i>Ziele dieser Arbeit.....</i>	68
3.1.3	<i>Erwartungen an die experimentellen Befunde.....</i>	68
3.2	ANALYSE DER ASSEMBLIERUNG VON PARTIKELVORSTUFEN .....	69
3.2.1	<i>Für eine Partikelanalyse sind bestimmte experimentelle Voraussetzungen zu erfüllen .....</i>	69
3.2.2	<i>Die isolierte 5'-Region der 16S rRNA läßt sich in vitro assemblieren .....</i>	70
3.2.3	<i>Leadereinflüsse auf die Assemblierung der isolierten 5'-Region .....</i>	71
3.2.4	<i>Einflüsse von Punktmutationen in der t<sub>L</sub>-Region.....</i>	71
3.2.5	<i>Die Temperaturabhängigkeit der „Chaperonfunktion“.....</i>	72
3.2.6	<i>Die „Chaperonfunktion“ des Leaders hilft bereits bei sehr geringer Aktivierungsenergie .....</i>	73
3.2.7	<i>Die Wirkung von Leadermutationen auf die 5'-Region.....</i>	73
3.2.8	<i>Leader-Effekte auf die Assemblierung der vollständigen 16S rRNA.....</i>	73
3.2.9	<i>Die Limitierung der Temperatur ermöglicht die Bildung diskreter Partikelvorstufen.....</i>	74
3.2.10	<i>Die Assemblierung der vollständigen 16S rRNA erfolgt in sequentiellen Schritten.....</i>	75
3.2.11	<i>Der Leader beeinflusst die Bindung von S5 und damit die Strukturbildung im Bereich des zentralen Pseudoknotens.....</i>	75
3.2.12	<i>Einfluß der Temperatur auf die „Chaperonfunktion“ .....</i>	76
3.2.13	<i>Belege für die transiente Natur der „Chaperonfunktion“ .....</i>	77
3.3	STRUKTURELLE UNTERSUCHUNG DER ASSEMBLIERTEN PARTIKEL.....	78
3.3.1	<i>Die Bindung eines ribosomalen Proteins kann eine für die Bindung weiterer Proteine notwendige Strukturänderung induzieren .....</i>	78
3.3.2	<i>Die „Chaperonfunktion“ kann nur über RNA-Kontakte vermittelt werden .....</i>	79
3.3.3	<i>Der Leader besitzt im assemblierten Partikel eine hohe Stabilität.....</i>	79
3.3.4	<i>Die t<sub>L</sub>-Regionen beider Leader nehmen unterschiedliche Konformationen ein .</i>	80
3.3.5	<i>Die Leadermutationen verhindern die Interaktion der t<sub>L</sub>-Region mit der 16S rRNA.....</i>	81
3.3.6	<i>Hinweise auf eine weitere Leader-vermittelte Funktion .....</i>	82
3.3.7	<i>Die Veränderung der S4-Bindung wird indirekt durch den Leader vermittelt.....</i>	83
3.3.8	<i>Der Leader verhindert die Ausbildung des zentralen Pseudoknotens und sorgt dadurch für eine Destabilisierung der 3'-Region.....</i>	84
3.4	FALTUNGSSTUDIEN DER 16S RRNA IN ANWESENHEIT DES LEADERS .....	85

3.4.1	<i>Wie können die Strukturbildungszeiten der untersuchten Guanosine interpretiert werden?</i> .....	85
3.4.2	<i>Beide Leader haben einen unterschiedlichen Einfluß auf die Faltungsgeschwindigkeit von Positionen in der Helix 3 der 16S rRNA</i> .....	87
3.4.3	<i>Der Leader beeinflusst auch die Region der zentralen S4-Bindung durch kinetische Effekte</i> .....	87
3.4.4	<i>Kinetische Analysen der Leaderfunktion am nahen 5'-Ende der 16S rRNA</i> .....	88
3.5	SCHLUßFOLGERUNGEN UND EIN MODELL FÜR DEN MECHANISMUS DER LEADER-VERMITTELTEN „CHAPERONFUNKTION“ .....	89
3.5.1	<i>Die „Chaperonfunktion“ des Leaders erfüllt zwei wichtige Hilfestellungen</i> .....	90
3.5.2	<i>Die „Chaperonfunktion“ verändert den kinetischen Ablauf der Faltung</i> .....	91
3.6	AUSBLICK.....	92
<b>4</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>93</b>
4.1	ALLGEMEINES.....	93
4.2	BAKTERIENSTÄMME UND PLASMIDE.....	93
4.2.1	<i>E. coli Stämme</i> .....	93
4.2.2	<i>Plasmide</i> .....	94
4.3	NUKLEINSÄUREN UND NUKLEOTIDE.....	95
4.4	ENZYME .....	96
4.5	PUFFER UND MEDIEN.....	96
4.6	FEINCHEMIKALIEN .....	97
4.7	VERSCHIEDENES .....	98
<b>5</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>98</b>
5.1	ALLGEMEINE MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	98
5.1.1	<i>Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten</i> .....	98
5.1.2	<i>Haltung und Sicherung von Zellstämmen</i> .....	99
5.1.3	<i>Anzucht von üN-Kulturen</i> .....	99
5.1.4	<i>Herstellung von kompetenten Zellen</i> .....	99
5.1.5	<i>Transformation von Plasmid-DNA in kompetente E. coli-Zellen</i> .....	100
5.2	ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	101
5.2.1	<i>UV/VIS-Spektroskopie</i> .....	101
5.2.1.1	<i>Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren</i> .....	101
5.2.1.2	<i>Konzentrationsbestimmung von Proteinen</i> .....	102
5.2.2	<i>Phenol/Chloroform-Extraktion</i> .....	102
5.2.3	<i>Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren</i> .....	103
5.2.4	<i>Ethanolpräzipitation ribosomaler Untereinheiten und rekonstituierter Partikel</i> ..	103
5.2.5	<i>Dialysen</i> .....	104
5.2.5.1	<i>Mikrotropfendialyse</i> .....	104

---

5.2.5.2	Dialyse von Proteinlösungen im Dialyseschlauch.....	104
5.2.6	<i>Isolation von DNA</i> .....	105
5.2.6.1	Präparative Isolierung von Plasmid-DNA.....	105
5.2.6.2	Isolierung analytischer Mengen von Plasmid-DNA.....	106
5.2.7	<i>Gelelektrophorese</i> .....	107
5.2.7.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	107
5.2.8.1	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (dPAGE).....	108
5.2.8.2	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	108
5.2.8.3	Kombinierte Agarose-Polyacrylamidgelelektrophorese (Mischgele).....	109
5.2.8.4	Zweidimensionale Gelelektrophorese von assemblierten Partikeln.....	112
5.2.9	<i>Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen in Polyacrylamidgelen</i> .....	114
5.2.9.1	Coomassie-Färbung von Proteinen .....	114
5.2.9.2	Toluidinblaufärbung von Mischgelen.....	114
5.2.9.3	Silberfärbung von Proteinen.....	114
5.3	SPEZIELLE METHODEN.....	116
5.3.1	<i>Präparation von Template-DNA</i> .....	116
5.3.2	<i>Phosphorylierung von DNA-Oligonukleotiden</i> .....	116
5.3.3	<i>In vitro Transkription mit T7-RNA-Polymerase</i> .....	117
5.3.4	<i>In vitro Rekonstitution ribosomaler Partikel</i> .....	118
5.3.5	<i>Präparation von Gesamtribosomen</i> .....	119
5.3.6	<i>Präparation ribosomaler Untereinheiten</i> .....	120
5.3.7	<i>Präparation ribosomaler Proteine</i> .....	121
5.3.8	<i>Saccharosegradienten zur Analyse ribosomaler Untereinheiten und rekonstituierter Partikel</i> .....	122
5.3.9	<i>Partikelmapping mit Kethoxal</i> .....	123
5.3.10	<i>kinetische Strukturanalysen mit Kethoxal</i> .....	125
5.3.11	<i>Plasmid-Sequenzierung</i> .....	126
5.3.12	<i>Primer-Extension-Reaktion</i> .....	127
5.3.13	<i>Primer-Extension-Sequenzierung</i> .....	128
5.3.14	<i>PCR</i> .....	129
<b>6</b>	<b>KLONIERUNG DER TRANSKRIPTIONSVEKTOREN</b> .....	<b>130</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>131</b>
	<b>ANHANG</b> .....	<b>140</b>

## Zusammenfassung

Die Biogenese der ribosomalen 30S Untereinheit von *Escherichia coli* wird durch die 5'-seitig kotranskribierte Sequenz beeinflusst. Dieser untranslatierte Sequenzbereich wird als "Leader-Region" bezeichnet und ist an verschiedenen Prozessen regulatorisch beteiligt. Frühere Arbeiten konnten zeigen, daß Elemente in der Leader-Region Einfluß auf die Transkription des dahinter liegenden 16S rRNA-Strukturgens haben. Eine direkte Wechselwirkung der Leader-Region mit dem 5'-Bereich der 16S rRNA konnte ebenso gezeigt werden. Ein Element des Leader-Bereichs ist die sogenannte  $t_L$ -Region. In dieser Region eingeführte Punktmutationen führen *in vivo* zur Ausprägung eines kälte-sensitiven Phänotyps. Die Kältesensitivität konnte auf die Akkumulation defekter ribosomaler Untereinheiten zurückgeführt werden. In dieser Arbeit sollten die Effekte des Leaders auf die Assemblierung der 30S Untereinheit *in vitro* untersucht werden. Dazu wurden folgende Experimente durchgeführt:

- Durch *in vitro*-Assemblierungsstudien mit Vorläufertranskripten wurde der Einfluß des Leaders auf die Proteinzusammensetzung der Partikel sowohl in der Wildtyp- als auch in der mutierten Form der Transkripte untersucht. Assemblierungen unterhalb der Standardtemperatur belegten die positive Hilfestellung des Leaders bei der Proteinbindung.
- Strukturuntersuchungen der assemblierten Partikel durch chemische Modifikation konnten die gewonnenen Daten auf Nukleinsäure-Ebene erweitern. Bereiche, die durch den Leader in seiner jeweiligen Form (Wildtyp oder Mutante) strukturell beeinflusst werden, konnten somit eingegrenzt werden.
- Zeitaufgelöste Faltungsstudien konnten die mögliche kinetische Wirkung des Leaders aufzeigen. Durch die chemische Modifikation renaturierender Transkripte wurde die unterschiedliche Wirkung beider Leaderformen auf die Geschwindigkeit der Faltung einzelner Positionen innerhalb der 16S rRNA deutlich.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit konnten eine positive Beteiligung des Leaders bei der Strukturierung der 5'-Domäne der 16S rRNA zeigen und belegen, daß es sich bei der hier untersuchten Hilfestellung um eine 'transiente' Interaktion handelt, da die Assemblierung der vollständigen 16S rRNA durch den Leader massiv gestört wird. Die Beteiligung des Leaders an der Strukturbildung des zentralen Pseudoknotens der 16S rRNA ließ sich experimentell belegen. Dabei scheint ein Teil des Leader-Bereiches bei der Synthese der frühen 16S-rRNA-Sequenzen als "Platzhalter" zu fungieren, während ein weiterer Teil des Leaders offenbar die positiven Effekte auf die Bindung der ersten ribosomalen Proteine vermittelt.

# 1 Einleitung

## 1.1 RNA – ein Molekül mit Struktur und vielen Funktionen

Crick und Orgel postulierten erstmals die These, RNA könnte als eine Art „Ur-Nukleinsäure“ aus evolutionärer Sicht wesentlich älter als DNA sein und sowohl als Träger der genetischen Information als auch als Katalysator für das Überleben einer Zelle wichtiger Prozesse fungiert haben (Crick, 1968; Orgel, 1968). Seitdem ist das Wissen über die Vielfältigkeit und Variabilität der Eigenschaften von RNA enorm gestiegen. Mittlerweile ist bekannt, daß RNA nicht nur in Form der mRNA als Informationsträger oder als tRNA und rRNA an der Proteinbiosynthese beteiligt ist. In den letzten Jahren wurden zahlreiche zusätzliche Funktionen entdeckt, die durch RNA-Moleküle vermittelt werden. Dafür spricht z.B. die Fülle der neuen in den letzten Jahren bekannt gewordenen RNAs: snRNAs, snoRNAs, tmRNA, gRNA, sowie regulatorische RNAs wie dsRNA, 6S RNA, 4.5S RNA, etc.

Man fand heraus, daß die durch RNAs vermittelten katalytischen Reaktionen genauso zahlreich sind, wie die Variabilität der Struktur motive, die in den verschiedenen RNAs gefunden wurden. Das Spektrum der durch RNA vermittelten katalytischen Reaktionen umfaßt z.B. die Knüpfung von Peptidbindungen (Zhang *et al.*, 1997), die Beteiligung an Spleiß- und Prozessierungsvorgängen in Form von Ribozymen (Cech *et al.*, 1981) und Ribonukleoproteinkomplexen (RNPs, Lee *et al.*, 1996), posttranskriptionelle Modifikationen und chaperonartige Faltungshilfen durch snoRNAs (Filipowicz *et al.*, 1999, Bachellerie *et al.*, 1995), um nur einige zu nennen. Aber auch die Translation kann durch RNAs in Form des Signal-Recognition-Particles (SRP) gesteuert werden (Bovia *et al.*, 1996) um die Faltungs- und Segregationsabläufe bei der Proteinsynthese zu koordinieren (Baldwin, 2000). Um ihre Funktionen erfüllen zu können, muß die katalytische RNA analog zu funktionsvermittelnden Proteinen eine aktive Konformation einnehmen. Der Übergang vom Transkript zur funktionell aktiven Struktur ist daher ein wichtiger und notwendiger Schritt.

## 1.2 Die Faltung von RNA-Molekülen: Eine wichtige Voraussetzung ihrer Funktion

An den vielen mittlerweile sehr gut untersuchten RNA-Spezies kann man den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion einer katalytischen RNA erkennen (Batey and Doudna, 1998). Katalytische RNAs besitzen ebenso wie Proteine, eine aktive Konformation. Nur in dieser aktiven Struktur kann die RNA ihre katalytische Funktion erfüllen. Die Faltung der RNA in die aktive Konformation kann bei kleinen Molekülen sehr rasch erfolgen. Arbeiten von Kim et al. zeigten bereits in den 70er Jahren, daß die Kleeblatt-ähnliche Sekundärstruktur der tRNA eine komplexe Tertiärstruktur ausbildet (Kim *et al.*, 1973, 1978). Während die Ausbildung von lokalen Sekundärstrukturelementen, wie z.B. die Bildung von Helices sehr schnell erfolgt (im Bereich von 10-100  $\mu$ s, Coutts, 1971, Cole *et al.*, 1972), liegt die Ausbildung von Tertiärstrukturen bei der tRNA im Bereich von Millisekunden. Je größer ein RNA-Molekül ist und je komplexer die native Konformation, desto variabler ist auch der Faltungsweg, da mit steigender Komplexität die Anzahl an möglichen co-existierenden Strukturen zunimmt.

Arbeiten, die den Faltungsweg des Gruppe I Ribozyms (1000 bis 2000 nt) von Tetrahymena untersucht haben, stellten fest, daß die Einstellung der aktiven Konformation im Bereich von Minuten bis Stunden lag (Cech, 1993). Weiterhin konnten während dieses Zeitraums partiell gefaltete Intermediate nachgewiesen werden, die über eine lange Lebensdauer verfügten.

## 1.3 Divalente Metall-Ionen sind für die Strukturbildung essentiell

Die Bildung komplexer RNA-Strukturelemente ist auf das Vorhandensein divalenter Kationen angewiesen. Durch die zum Teil sehr kompakte Strukturbildung können in RNA viele Phosphate auf engen Raum zusammenkommen. Dadurch entstehen starke elektrostatisch abstossende Kräfte, die kompensiert werden müssen, um die Struktur zu erhalten.

Dies kann sowohl durch monovalente als auch divalente Ionen erfolgen. Es ist schon lange bekannt, daß monovalente Ionen, wie z.B.  $\text{Na}^+$  die Tertiärstruktur von tRNA stabilisieren (Cole *et al.*, 1972). Magnesium-Ionen spielen eine

wichtige Rolle bei der Stabilisierung von RNA-Strukturelementen und sind essentiell für die Erhaltung sowohl der strukturellen Integrität als auch der biologischen Aktivität der RNA. Verschiedene Arbeiten konnten die wichtige Beteiligung von Magnesium-Ionen an Aufrechterhaltung der aktiven Struktur von Ribozymen zeigen (Pyle *et al.*, 1993; Cate *et al.*, 1996, Pan *et al.*, 1999).

#### **1.4 Magnesium-Ionen können auf zwei Arten mit der RNA interagieren**

Magnesium-Ionen können in hydratisierter und in nicht-hydratisierter Form an RNA binden. Diese beiden Bindungsmodi wurden von Misra beschrieben (Misra und Draper, 1999). In hydratisierter Form interagieren die Magnesium-Ionen über unspezifische elektrostatische 'long-range'-Wechselwirkungen mit der RNA. Diese Art der Bindung wird als 'diffuse binding' bezeichnet. Magnesium-Ionen ohne Hydrathülle dienen als Zentrum für die Bindung anorganische Liganden, die durch die RNA-Faltung entsprechend positioniert wurden und können so als "Ankerpunkte" die lokalen Strukturen stabilisieren (Misra und Draper, 1999).

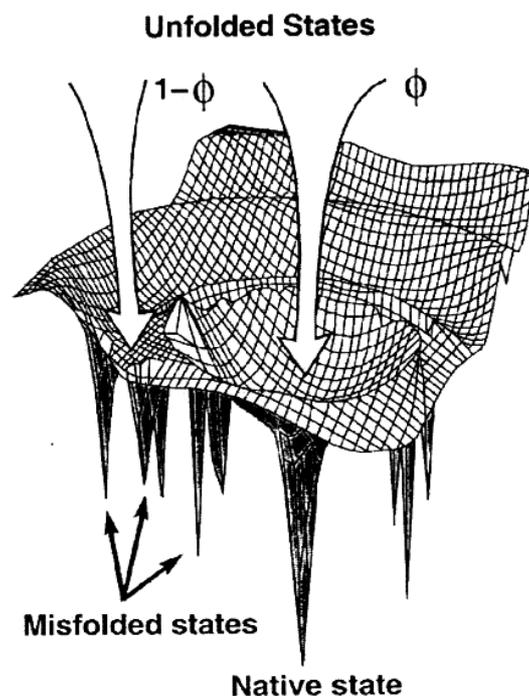
#### **1.5 Der kinetische 'Partition'-Mechanismus: ein Modell der RNA-Faltung**

Die Faltung von Proteinen kann durch verschiedene thermodynamische Modelle beschrieben werden, bei denen die freie Energie der einzelnen Strukturübergänge in Form einer dreidimensionalen "Energiewand" dargestellt wird (Bryngelson *et al.*, 1989, 1995; Thirumalai *et al.*, 1995). Die Faltung eines Proteins verläuft in diesen Modellen innerhalb einer dreidimensionalen Landschaft, die die freie Energie des Moleküls darstellt. Da jede Aminosäure mehrere energetisch günstige Wechselwirkungen ausbilden kann, existieren neben der nativen Struktur viele thermodynamisch ähnlich stabile Konformationen. Woodson hat für die Faltung langer RNA-Moleküle einen ähnlichen Mechanismus postuliert, bei dem ein Teil der RNA-Population direkt und sehr schnell die native Struktur einnimmt (dies entspräche dem globalen Minimum der Energiewand), während sich die übrigen Moleküle der RNA-

Population in fehlgefaltete Intermediate (lokale Minima) umlagern (Woodson, 2000). Woodson postulierte dieses Faltungsmodell als kinetischen Partition-Mechanismus (KPM).

Je länger ein RNA-Molekül ist, desto komplexer ist auch die in **Abb. 1.1** dargestellte Energielandschaft der Strukturbildung. Dieses Modell verdeutlicht auch, warum der Bildungszeitraum der nativen Struktur mit zunehmender Komplexität der RNA zunimmt. Je mehr alternative Konformationen gebildet werden können, die nicht der nativen Struktur entsprechen (in der Abbildung als 'misfolded states' bezeichnet), desto weniger RNA-Moleküle finden direkt die native Struktur. Mit der Komplexität der RNA steigt ebenfalls die Anzahl stabiler koexistierender Intermediate. Nur 5-10% z.B. der Tetrahymena Vorläufer-RNA und ein noch geringerer Anteil des Ribozyms bilden unter physiologischen Bedingungen die native Konformation innerhalb von 30 Sekunden aus (Russel *et al.*, 1999, Pan *et al.*, 1997).

Ein ebenso wichtiger Punkt bei der Strukturbildung ist die Geschwindigkeit der Transkription. Da durch die Polarität des Transkriptionsprozesses die Synthese der RNA sequentiell verläuft, können sich zunächst lokale Strukturen zwischen unmittelbar benachbarten Bereichen ausbilden, bevor die zu einem späteren Zeitpunkt synthetisierten Sequenzbereiche für die Ausbildung von 'long-range'-Wechselwirkungen zur Verfügung stehen. Lewicki und Mitarbeiter konnten zeigen, daß ribosomale 16S rRNA, die *in vivo* durch eine schnelle Phagen-Polymerase transkribiert wurde, nicht in funktionelle 30S Untereinheiten assembliert werden konnte (Lewicki *et al.*, 1993). Wurde die Re-

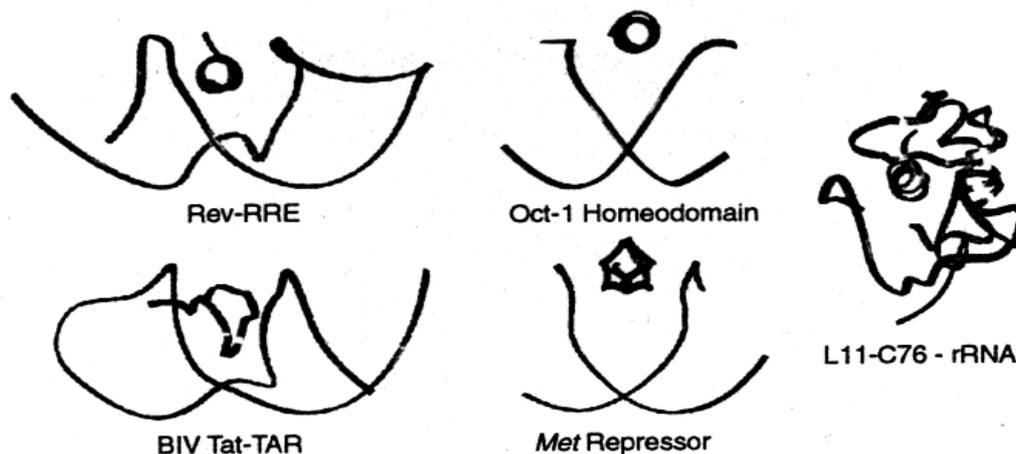


**Abb. 1.1: Darstellung der freien Energie bei RNA-Strukturbildung.** Stabile Intermediate und Alternativstrukturen konkurrieren mit der nativen Konformation (aus Thirumalai und Woodson, 1996).

aktionstemperatur auf 25°C verringert und die Geschwindigkeit der Phagen-Polymerase somit herabgesetzt, war eine Assemblierung der 16S rRNA in funktionelle 30S Untereinheiten möglich.

## 1.6 RNA-Protein-Wechselwirkungen

RNA-bindenden Proteinen präsentiert sich aufgrund der höheren Strukturvielfalt bei RNA ein größeres Spektrum an verschiedenen Bindemotiven als bei DNA. Trotz der enormen Strukturvielfalt, die bei den verschiedensten RNAs zu finden ist, sind die Sequenzen und die nativen Strukturen der ribosomalen RNAs in den verschiedenen Organismen hoch konserviert. In den letzten Jah-



**Abb. 1.2: Geometrie verschiedener RNA-Protein-Komplexe.** Die dargestellten Beispiele verdeutlichen, wie genau sich Proteine durch gezielte Abstimmung der bindenden Aminosäurereste an die lokale Nukleinsäure-Geometrie anpassen können. In der Mitte des jeweiligen Komplexes ist das Bindemotiv der Proteinkomponente dargestellt, wie es die Struktur des als Band dargestellten Nukleinsäurebereiches der Bindung erkennt. Man kann sehr gut die Anpassung der Proteine an die jeweilige Nukleinsäuregeometrie durch die Variation des Bindungsmotives erkennen. Bei den beiden mittleren Komplexen handelt es sich um DNA-Protein-Wechselwirkungen (aus: Draper, 1999).

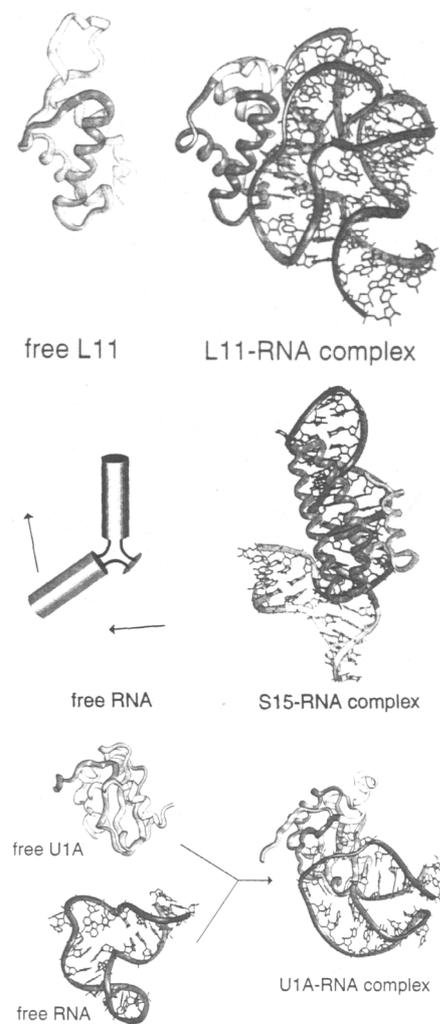
ren liessen sich durch das Studium verschiedener RNA-Protein-Komplexe Informationen über die Erkennungsmotive auf Seiten der RNA gewinnen. Bei den Experimenten wurde jedoch auch deutlich, daß bei der Bildung der verschiedenen Komplexe nicht notwendigerweise nur das Protein eine Konformationsänderung durchlaufen muß.

Bei den mittlerweile mehr als 89 untersuchten und bekannten Komplexen konnten die RNA-bindenden Proteine durch verschiedene Bindungsmotive in zwei Gruppen unterteilt werden (Jones *et al.*, 2001; Draper, 1999). Die erste Gruppe bilden Proteine, die in den Furchen der RNA binden. Dazu werden  $\alpha$ -Helices,  $3_{10}$ -Helices,  $\beta$ -Ketten oder unregelmässige Loops als Bindungsmotive auf Seiten des Proteins ausgebildet. Die Proteine dieser Bindungsklasse erkennen sowohl die Basensequenz als auch die lokale Geometrie der Furche. Durch die Ausbildung dieser angepaßten Motive kann das Protein den Bindungsbereich der RNA sehr präzise erkennen. Das "Auflösungsvermögen" der Erkennungsmotive kann durch den Einbau von Glycinresten verbessert werden. Durch Glycinreste wird nicht nur die "Reichweite" des Erkennungsmotivs vergrößert. Diese Modifikation erlaubt zusätzlich eine bessere Annäherung an die Amid- und Carbonylgruppen des RNA-Rückgrats.

Die zweite Gruppe der Proteine präsentiert Bindungstaschen, die aus  $\beta$ -Faltblättern zusammensetzen. Diese Gruppe von Proteinen bindet an einzelsträngige RNA (Draper, 1999). Wie genau sich Proteine mit den entsprechenden Motiven der Geometrie der Nukleinsäure anpassen können, kann man auf den Beispielen in **Abbildung 1.2** erkennen.

### 1.7 'induced fit'-Mechanismen

Die Bildung von RNA-Protein-Komplexen kann die Struktur beider Bindungspartner auf drei Arten beeinflussen. Entweder ändert sich die Konformation der RNA, die Konformation des Proteins oder die Kon-



**Abb. 1.3:** Konformationsänderungen der Komponenten bei verschiedenen RNA-Protein-Komplexen (aus: Williamson *et al.*, 2000).

formationen beider Moleküle. In **Abb. 1.3** werden alle drei Arten der gegenseitigen Beeinflussung durch die folgenden Komplexe illustriert. Ein Beispiel für eine protein-induzierte Konformationsänderung ist der S15-rRNA-Komplex. S15 bindet an dem Knotenpunkt dreier Helices. Die rRNA durchläuft dabei große Konformationsänderungen, während das Protein seine Konformation kaum ändert (Williamson *et al.*, 2000).

Der L11-rRNA-Komplex dagegen ist ein Beispiel für eine RNA-induzierte Konformationsänderung. L11 bildet einen Teil des Wechselwirkungsbereiches mit den Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu und ist Element der Bindungsstelle für das Antibiotikum Thiostrepton. In diesem Fall muß die RNA das Erkennungsmotiv als Tertiärstruktur in der richtigen Konformation präsentieren. Ein flexibler Loop des Proteins nimmt durch die Bindung an die RNA eine geordnete Struktur ein.

Eine beidseitig induzierte Konformationsänderung erfolgt bei der Bildung des U1A-UTR-Komplexes. Die RNP-Konsensus-Domäne des U1A Proteins bindet an einen internen Loop an der 3'-untranslatierten Region der eigenen mRNA zur Regulation der Polyadenylierung. Dabei verändern beide Bindungspartner ihre Konformation (Williamson *et al.*, 2000).

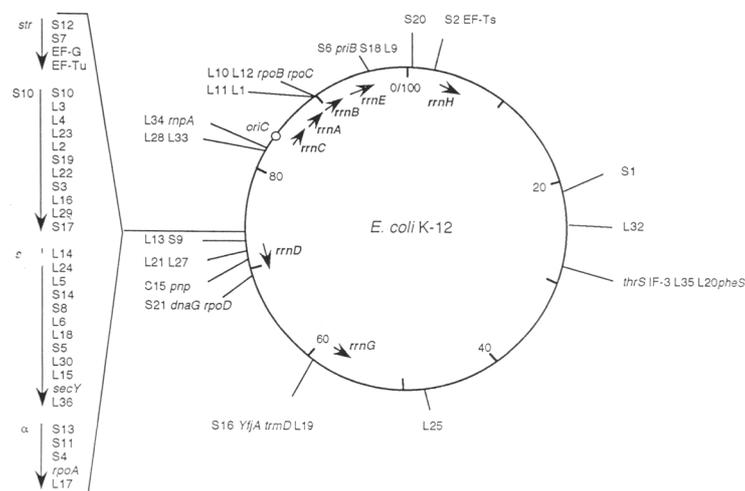
Faktoren, die die Erkennungsregion eines Proteins auf Seiten der RNA strukturell beeinflussen, können somit zu einer Verbesserung oder Verschlechterung der Proteinbindung führen

## 1.8 Ribosomen – Regulation und Biogenese

Ribosomen gehören zu den am besten untersuchten Protein-RNA-Komplexen. Das bakterielle Ribosomen besteht aus 3 ribosomalen RNAs und 55 ribosomalen Proteinen und zählt damit zu den größten in Bakterien vorkommenden Ribonukleoproteinkomplexen. Obwohl dieser Komplex bereits seit mehr als 30 Jahren intensiv erforscht wird, wurde erst 2000 die Röntgenstruktur der ribosomalen 30S-Untereinheit von *Thermus thermophilus* inklusive der ribosomalen Proteine veröffentlicht (Wimberly *et al.*, 2000).

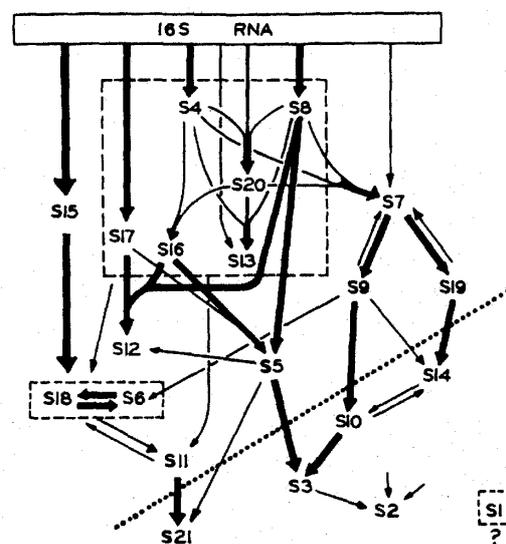
Als zentraler Ort der Proteinbiosynthese sind Ribosomen essentiell für das Wachstum der Zelle. Da gerade in der exponentiellen Wachstumsphase ein großer Anteil der Ressourcen einer Zelle in der Proteinbiosynthese umgesetzt wird, bedarf dieser Prozeß einer sehr genauen Regulation, die auf mehreren Ebenen erfolgt. Die Regulationen der Synthese von ribosomalen Proteinen und ribosomaler RNA sind effizient miteinander verbunden. Die Synthese der ribosomalen Proteine muß koordiniert erfolgen, da die Gene auf unterschiedlichen Transkriptionseinheiten liegen (siehe **Abb. 1.4**, Ellwood and Nomura, 1982). Nomura konnte zeigen, daß einige ribosomale Proteine durch einen als autokatalytische Rückkopplung bezeichneten Mechanismus ihre eigene Synthese regulieren können (Nomura *et al.*, 1984). Zum einen können sie an ihre eigene mRNA binden und fungieren somit als ihr eigener Translationsrepressor (Jinks-Robertson and Nomura, 1982). Zum anderen haben Jinks-Robertson und Gourse außerdem gezeigt, daß die translationelle Rückkopplung der Synthese ribosomaler Proteine ebenfalls über die Menge an freier ribosomaler RNA reguliert wird (Jinks-Robertson *et al.*, 1987; Gourse *et al.*, 1996). Die Synthese der ribosomalen Komponenten wird somit über ein komplexes Regulationsnetzwerk überwacht und gesteuert.

Da die Translationsgeschwindigkeit 20 Aminosäuren pro Sekunde nicht überschreiten kann, muß die Anpassung einer Bakterienzelle an sich verändernde Wachstumsbedingungen über die Ribosomenanzahl erfolgen. Gausing konnte bereits 1977 zeigen, daß die Syntheserate der ribosomalen RNA und damit der Ribosomen mit dem Quadrat der Wachstumsrate ansteigt (Gausing *et al.*, 1977).



**Abb. 1.4:** Position der ribosomalen Operons und der Gene für die ribosomalen Proteine im *E. coli* -Genom.

Die Assemblierung der ribosomalen Untereinheiten erfolgt in einem selbstablaufenden Prozeß, der für die kleine ribosomale Untereinheit *in vitro* erstmals von Held und Nomura 1974 durchgeführt wurde. Bei diesen Experimenten konnten die Bindungsabhängigkeiten der ribosomalen Proteine in der 30S Untereinheit aufgeklärt werden. Die ribosomalen Proteine erkennen Bindungsmotive anhand strukturierter RNA-Regionen. Durch die Bindung erfolgen weitere Umstrukturierungen der ribosomalen RNA, die dadurch Erkennungsmotive für die nachfolgenden Proteine ausbildet, usw. Die Bindungsabhängigkeiten sind auf der Assemblierungskarte in **Abb. 1.5** dargestellt.



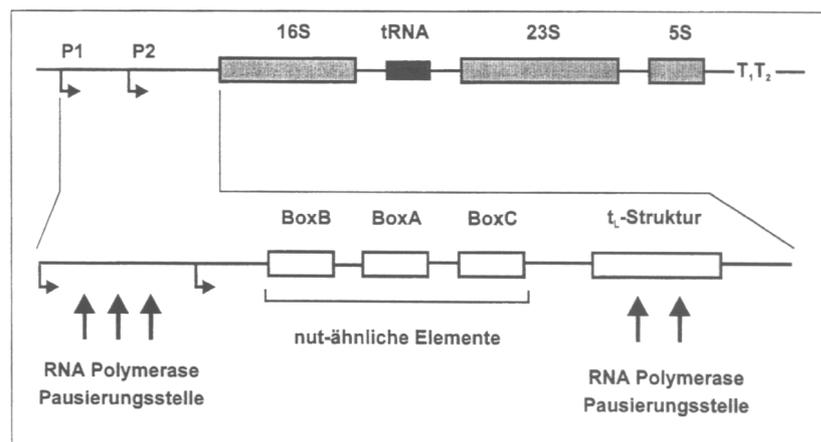
**Abb. 1.5:** „Assemblymap“ der ribosomalen 30S Untereinheit von *E. coli.*, nach Held et al., 1974. Die Interaktionen und Abhängigkeiten zwischen den einzelnen ribosomalen Proteinen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Je stärker der Pfeil, desto stärker ist auch der Effekt auf die Bindung der folgenden Proteine. Proteine oberhalb der punktierten Linie sind zur Bildung eines 30S-Partikels notwendig.

Proteine, die unmittelbar an die 16S rRNA binden können, werden als „primär bindende“ Proteine bezeichnet. Die Erkennungsmotive für diese Proteine werden direkt von der rRNA ausgebildet und sind nicht von der Bindung anderer ribosomaler Proteine abhängig. Diese Proteine (S4, S7, S8, S15, S17 und S20) sind essentiell für den weiteren Assemblierungsverlauf notwendig, da durch ihre Bindung die Erkennungsregionen für die nachfolgend bindenden Proteine ausgebildet werden. Die Faltung in die native Konformation der ribosomalen Untereinheit ist deshalb von der rRNA und von den ribosomalen Proteinen abhängig.

Held und Nomura konnten außerdem zeigen, daß *in vitro* eine Assemblierungstemperatur von 40°C notwendig ist, um native 30S Untereinheiten zu erhalten, die eine vollständige Proteinbesetzung zeigen. Unterhalb dieser kritischen Temperatur werden lediglich sogenannte Rekonstitutions-Intermediate, auch als „RI-Partikel“ bezeichnet, ausgebildet. Diesen Partikeln fehlen die in **Abb. 1.5** unterhalb der gepunkteten Line dargestellten Proteine S2, S3, S10, S14 und S21. Der Vorstellung nach bedarf es der bei 40°C zur Verfügung stehenden Energie, um eine wichtige Konformationsänderung im RI-Partikel zu induzieren, die anschließend dazu führt, daß die noch fehlenden Proteine gebunden werden.

## 1.9 Der Leader-Bereich – Struktur und Funktion

Bei der Leader-Region handelt es sich um einen hochkonservierten Sequenzbereich, der zahlreiche regulatorische Funktionen besitzt. Als Leader-Region wird der 5'-seitig der 16S rRNA liegende Sequenzbereich ab dem P2-Promotor bezeichnet. Innerhalb dieses kotranskribierten Sequenzbereiches liegen die 'nut'-ähnlichen Elemente BoxB, BoxA und BoxC, sowie die  $t_L$ -Region. In der **Abb. 1.6** ist das *rrnB*-Operon als Beispiel für den Aufbau einer ribosomalen Transkriptionseinheit von *E. coli* dargestellt. Die Leader-Region wurde vergrößert, um die im Leader befindlichen regulatorischen Elemente darstellen zu können. Die von dem Leader-Bereich vermittelten regulatorischen Funktionen sollen im folgenden kurz zusammengefaßt werden.

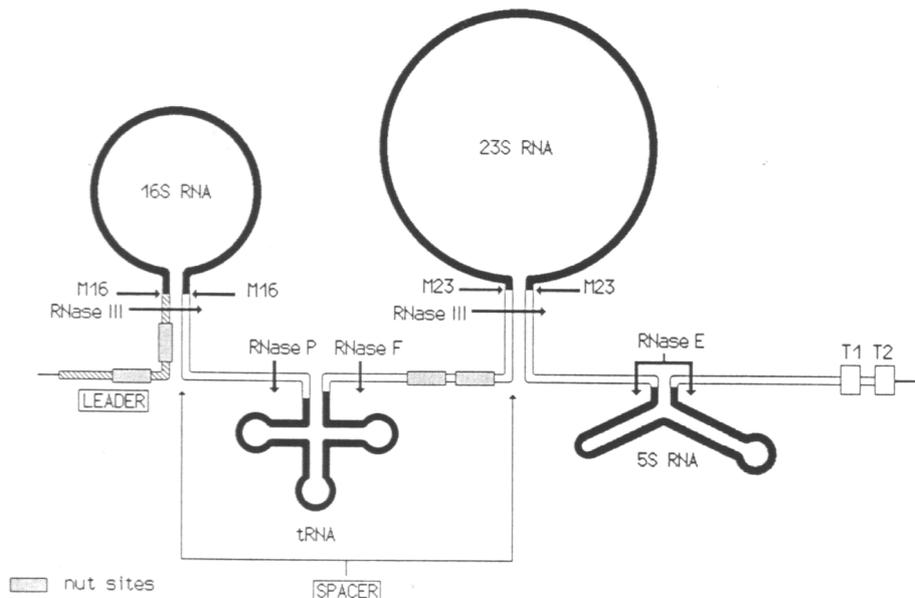


**Abb. 1.6: Aufbau des ribosomalen *rrnB*-Operons von *E. coli*.** Die Strukturgene für die ribosomalen rRNAs stehen unter der Regulation eines Tandem-Promotors. Der vor dem 16S rRNA-Gen liegende Leader-Bereich und dessen regulatorischen Elemente wurden vergrößert dargestellt.

### 1.9.1 Prozessierung

Eine grundlegende Leader-vermittelte Funktion besteht in der Präsentation des initialen Prozessierungssignals bei der Reifung der 16S rRNA. Dabei bildet der Leader-Bereich mit dem Spacer-Bereich zwischen der 16S rRNA und der 23S rRNA eine stabile Wechselwirkung aus, welche das Prozessierungssignal für die RNase III darstellt. Die RNase III ist das erste von mehreren Enzymen (z.B. RNase E, RNase P und RNase F), die an der Reifung der ribo-

somalen RNAs beteiligt sind. Die Schnittstellen der an der Prozessierung beteiligten Enzyme sind in der **Abbildung 1.7** schematisch dargestellt. Die in dieser Arbeit untersuchten Punktmutationen in der  $t_L$ -Region des Leaders haben keinen Einfluß auf die Prozessierung durch die RNase III. Arbeiten von Thelen belegen, daß innerhalb des Leader-Bereichs der  $t_L$ -Mutante die Prozessierung korrekt erfolgt (Theißen *et al.*, 1990a).



**Abb. 1.7:** Schematische Darstellung der Prozessierungspositionen beim *rrnB*-Operon von *E. coli*. Der Leader-Bereich bildet mit dem Spacer-Bereich die Schnittstelle für die RNase III aus (links). Aus: Wagner *et al.*, 1993

### 1.9.2 Antitermination

Der Vorgang der Antitermination ist aus dem Phagen  $\lambda$  bekannt. Das N-Protein des Phagen bindet zusammen mit den wirtseigenen Nus-Faktoren an sogenannte '*nut*-sites' (N-ut-ilization-sites). Dies sind die Boxen A, B und C. Durch Wechselwirkung dieser Faktoren mit der RNA-Polymerase entsteht ein Antiterminationskomplex (Horwitz *et al.*, 1987), der es der Polymerase ermöglicht, über Terminatoren hinwegzulesen. Beim Phagen  $\lambda$  wird so eine zeitgesteuerte Genexpression ermöglicht.

Die im Leader-Bereich gefundenen '*nut*-ähnlichen Elemente BoxB, BoxA und BoxC weisen hohe Homologien zu den '*nut*-sites' des Phagen  $\lambda$  auf. Da ein für diesen Antiterminationsmechanismus wichtiger Faktor, das N-Protein, bis-

her in *E. coli* nicht nachgewiesen werden konnte, eine Beteiligung der Leader-RNA an Antiterminationsprozessen jedoch auch bei *in vitro*-Transkriptionsstudien nachgewiesen werden konnte (Aksoy *et al.*, 1984, Squires *et al.*, 1993), scheint die Leader-vermittelte Funktion der *nut*-ähnlichen Elemente durch andere Mechanismen zu erfolgen.

### 1.9.3 Pausierung

Ein weiterer wichtiger Mechanismus der Genregulation sind Pausierungsergebnisse bei der Transkription. Verschiedene Faktoren können dafür sorgen, daß die RNA-Polymerase an definierten Pausierungstellen die Transkription vorübergehend unterbricht. Im *in vitro*-System konnten die Transkriptionsfaktoren NusA, ppGpp und die DNA-Topologie als pausen-vermittelnde Faktoren identifiziert werden (Theißen *et al.*, 1990a, Krohn *et al.*, 1992, Krohn and Wagner, 1995). Wie auf **Abbildung 1.6** zu erkennen, liegen im Leader-Bereich, unter anderem in der  $t_L$ -Region, einige Pausierungsstellen. Diese könnten z.B. dafür sorgen, daß sich die native Struktur des Leaders ausbilden kann, bevor die Transkription der 16S rRNA beginnt und der Leader seine faltungsunterstützende Hilfsfunktion vermittelt.

### 1.9.4 Strukturierung und Assemblierung

Der für diese Arbeit zentrale Aspekt der Leader-vermittelten Funktionen ist die Rolle des Leaders bei der Strukturierung und Assemblierung der 30S Untereinheit. Sowohl die BoxA als auch die  $t_L$ -Region haben einen Einfluß auf die Strukturbildung der 16S rRNA. Eine Deletion der BoxA führt zu einer verringerten Menge an 16S rRNA und damit zu einer Reduktion des „30S-Pools“ (Theißen *et al.*, 1990b). In dieser Arbeit werden die Auswirkungen von Punktmutationen untersucht, die in der  $t_L$ -Region des Leaders eingeführt wurden. Da die Prozessierung durch die Mutationen nicht betroffen ist (Theißen *et al.*, 1990a) und eine Akkumulation an defekten 30S Untereinheiten beobachtet werden konnte, wurde ein strukturvermittelnder Effekt der  $t_L$ -Region des Leaders auf die Faltung und Assemblierung der 30S Untereinheit postuliert. In weiteren Arbeiten konnte die Ausprägung eines kälte-sensitiven Phä-

notyps auf defekte 30S Untereinheiten zurückgeführt werden, deren Defekte wiederum durch die Punktmutationen im Leader-Bereich der 16S rRNA verursacht werden (Theißen et al., 1993). Nachfolgende Untersuchungen zeigten, daß der Leader direkte Kontakte zur 16S rRNA ausbilden kann, die sich in frühen Bereichen der 5'-Region der 16S rRNA befinden (Pardon *et al.*, 1995). Die Analyse der 16S rRNA in den defekten Partikeln brachte zahlreiche strukturelle Unterschiede zu der 16S rRNA aus intakten 30S Untereinheiten hervor (Balzer *et al.*, 1998). Arbeiten von Besançon konnten zeigen, daß der Leader ausschließlich mit der 5'-Region der 16S rRNA interagieren kann. Diese Wechselwirkung wird zu einem späteren Zeitpunkt durch die wesentlich stabilere Interaktion zwischen Leader und Spacer abgelöst. Der aus Leader- und Spacersequenzen gebildete Doppelstrang enthält die Rnase III-Schnittstelle. Zusätzlich konnte ein kinetischer Einfluß des Leaders auf die Bildungsgeschwindigkeit bestimmter Helices in der 16S rRNA gezeigt werden (Besançon *et al.*, 1999), der Hinweise auf die „chaperonartige“ Hilfsfunktion bei der Biogenese der ribosomalen 30S Untereinheit lieferte. Zu diesem Zeitpunkt waren allerdings noch keine näheren Informationen über den Mechanismus der Leader-vermittelten Einflüsse bekannt. Dieser Informationsstand war der Ausgangspunkt dieser Arbeit, die zu weiteren Erkenntnissen über die Leadereffekte und den strukturellen Mechanismus der „Chaperonfunktion“ führen soll.

## **Fragestellung und Konzeption der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit soll durch *in vitro* Analysen der Einfluß von 5'-seitig zusätzlich transkribierten Sequenzen auf die Strukturbildung und der Reifung der kleinen ribosomalen Untereinheit untersucht werden. Strukturelle Untersuchungen der defekten 30S Untereinheiten zeigten einen Assoziationsdefekt der akkumulierenden 30S Untereinheiten, die somit nicht mehr in der Lage waren, zu intakten 70S Ribosomen zu assoziieren. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen, sollte in dieser Arbeit der Einfluß des Leaders auf die Strukturierung der 16S rRNA und die Assemblierung zur 30S Untereinheit *in vitro* untersucht werden.

Durch *in vitro* Rekonstitutionsexperimente mit beiden Leaderformen (Wildtyp-Leader und Mutante) soll der Einfluß auf die Partikelbildung bei verschiedenen Temperaturen untersucht werden, um Hinweise auf die postulierte transiente Hilfsfunktion des Leaders erhalten zu können. Assemblierungsstudien mit der isolierten 5'-Region und mit der vollständigen 16S rRNA sollen zeigen, ob der Leader eine Rolle bei der Strukturierung des zentralen Pseudoknotens spielt (Brink *et al.*, 1993). Dabei handelt es sich um ein wichtiges tertiäres Strukturelement, welches im Zentrum der 16S rRNA alle Domänen miteinander verbindet.

Eine strukturelle Untersuchung der assemblierten Partikel durch chemische Modifikation soll einen Einblick in die Leader-vermittelten Strukturveränderungen auf RNA-Ebene ermöglichen, die zu einer veränderten Proteinbesetzung führen. Mit dieser Methode soll erstmals die strukturelle Analyse des Leaders im assemblierten aber noch nicht prozessierten Zustand innerhalb des Partikels ermöglicht werden. Dadurch sollen gleichzeitig strukturelle Informationen über den Wirkort (die 16S rRNA) und über den Bereich der chaperonartigen Hilfsssequenz (der Leader) gesammelt und so weitere Einblicke in den Mechanismus der Leader-vermittelten Faltungshilfe gewonnen werden.

In einem letzten Teil soll der Aspekt der kinetischen Beeinflussung der Bildungsgeschwindigkeiten bestimmter Bereiche der 16S rRNA durch den Leader aufgegriffen und durch eine geeignete Methode detaillierter untersucht werden. Durch eine zeitabhängige Modifikation soll die Faltung der denaturierten 16S rRNA in Abwesenheit der Proteine verfolgt werden. Die dadurch ge-

wonnenen Daten sollten einen Blick auf die zeitliche Strukturbildung der Umgebung der untersuchten Bereiche auf Nukleotidebene erlauben. Eine Leader-vermittelte Funktion auf den kinetischen Verlauf der Faltung sollte mit dieser Methode nachzuweisen versucht werden.

Die „chaperonartige“ Hilfsfunktion bei der Assemblierung der 30S Untereinheit ist eine von mehreren regulatorischen Funktionen des Leaders. Bisherige Arbeiten zu dieser Leaderfunktion beschäftigten sich mit der frühen (Struktur des Leaders und der Ort der Wechselwirkung in der 16S rRNA) und der späten (Struktur der defekten 30S Untereinheiten) Leaderwirkung. Aufbauend auf diesen grundlegenden Erkenntnissen soll in dieser Arbeit die Leaderwirkung auf die ersten Assemblierungsschritte untersucht werden, um damit das Bild eines Modellsystems für eine Chaperonfunktion auf RNA-Basis weiter zu vervollständigen.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Der Einfluß des Leaders auf die Proteinbindung von Assemblierungsvorstufen

Der upstream des 16S rRNA-Strukturgens liegende Leader-Bereich hat einen direkten Einfluß sowohl auf die Strukturbildung der 16S rRNA, als auch auf die Assemblierung der ribosomalen 30S Untereinheit. Dies wurde unter anderem durch Arbeiten von Pardon und Besançon gezeigt. Dabei ließ sich durch „Cross-link“-Experimente eine direkte Interaktion des Leaders mit Elementen der 5'-Region der 16S rRNA nachweisen (Pardon *et al.*, 1995). Komplexbildungsanalysen des Leaders mit Teilen der 16S rRNA belegten, daß der Leader nur mit der 16S rRNA interagieren kann, solange die 3'-seitige Spacer-Sequenz noch nicht für die Ausbildung des Prozessierungssignals zur Verfügung steht. Die transienten Leaderkontakte zur 16S RNA erstrecken sich somit auf die 5'-Region. Dies konnte durch die Komplexstudien nachgewiesen werden (Besançon *et al.*, 1999).

Analysen des Verhältnisses ribosomaler Untereinheiten in Wildtypzellen und solchen, die Punktmutationen im Leader beeinhalteten, ergaben, daß der Anteil an intakten 70S Ribosomen und dissoziierten 30S Untereinheiten im Falle des mutierten Leaders drastisch reduziert war. Eine strukturelle Untersuchung der 30S Untereinheiten ergab darüber hinaus zahlreiche Unterschiede im Vergleich zu den 30S Untereinheiten aus den Wildtypzellen. Strukturelle Unterschiede konnten also, obwohl der Leader in reifen Untereinheiten nicht mehr vorhanden ist, *in vivo* bestätigt werden (Balzer *et al.*, 1998).

Da *in vivo* die Assemblierung der 16S rRNA zur funktionellen 30S Untereinheit mit der Prozessierung des Leaders einhergeht und der Leader in der Zelle nur eine geringe Halbwertszeit besitzt, mußte die Assemblierung für eine *in vitro*-Analyse von der Prozessierung entkoppelt werden, um so die durch den Leader vermittelten Effekte auf die Strukturbildung aufklären zu können.

Das von Held und Nomura 1973 entwickelte Rekonstitutionssystem wurde abgewandelt, um ein Studium der Assemblierung *in vitro* zu ermöglichen. Da

auch *in vitro* ein „Einfrieren“ des Assemblierungsprozesses zu definierten Zeitpunkten nicht möglich ist, mußte ein alternativer Weg gefunden werden, um die ersten Faltungsschritte in Anwesenheit des Leaders untersuchen zu können. Eine Möglichkeit bestand darin, das System thermodynamisch zu limitieren.

Die Strukturbildung von RNA ist in starkem Maße von der zur Verfügung stehenden Energie abhängig. Die Arbeiten von Held und Nomura am *in vitro*-Rekonstitutionssystem zeigten, daß ein sogenannter „hitze-aktivierender“ Schritt notwendig ist, um intakte ribosomale Untereinheiten zu assemblieren, die alle ribosomalen Proteine enthalten (Held und Nomura, 1973). Unterhalb einer Temperatur von 40°C bilden sich bei dem selbstablaufenden Assemblierungsprozeß sogenannte RI-Partikel (Reconstitution Intermediates) aus, die nicht alle 21 ribosomalen Proteine enthalten. Erst durch die Inkubation bei 40°C kommt es im RI-Partikel zu einer strukturellen Konformationsänderung, die eine Bindung der noch fehlenden Proteine ermöglicht. Held und Nomura konnten in ihrem System die energetischen Abhängigkeiten bei der Strukturbildung ribosomaler Untereinheiten somit eindeutig zeigen. Es ist vorstellbar, daß während der Transkription und der gleichzeitig stattfindenden Strukturierung der 16S rRNA koexistierende Strukturen ausgebildet werden, die über zahlreiche Konformationsänderungen den korrekten Faltungs- und Assemblierungspfad zum RI-Partikel durchlaufen. Wird die benötigte Aktivierungsenergie bereitgestellt, kann auch die letzte thermodynamische Hürde, der Übergang vom RI-Partikel zur nativen ribosomalen Untereinheit überwunden werden. Bei einer Verringerung der Temperatur sind die zur Faltung benötigten Aktivierungsenergien für einige koexistierende Strukturen größer als die dem System zur Verfügung stehende Energie. Bestimmte Konformationsübergänge, die zum Erreichen der nativen Struktur notwendig sind, können durch die thermodynamische Limitierung nicht erfolgen. Alternative, möglicherweise nicht funktionellen Zwischenstufen des Assemblierungspfades sind auf diese Weise vielleicht „energetisch arretierbar“.

Um unter den oben genannten Gesichtspunkten die Einflüsse des Leaders auf die korrekte Strukturfindung der 16S rRNA zu untersuchen, wurden *in vitro*-Assemblierungsstudien bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Ne-

ben den Studien bei 40°C, der Temperatur, bei der die Ausbildung intakter Partikel möglich ist, wurde die Assemblierung bei 30°C und bei 12°C untersucht. Die für diese Experimente benötigten RNAs wurden durch *in vitro*-Transkriptionen mit den entsprechenden T7-Transkriptionsvektoren hergestellt. Die ribosomalen Proteine wurden aus isolierten Ribosomen in Form von ribosomalem Gesamtprotein (TP70) präpariert (siehe Material & Methoden).

Durch einen Vergleich der bei der jeweiligen Reaktionstemperatur assemblierten Partikel sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluß hat die Anwesenheit des Leaders auf die Partikelbildung *in vitro* im Vergleich zur Assemblierung der Leader-freien 16S rRNA?
2. Können die *in vivo* zur Ausprägung eines kälte-sensitiven Phänotypes führenden Punktmutationen im Leader auch bei einer *in vitro*-Assemblierung strukturelle Unterschiede auslösen?

Im ersten Experiment wurde daher zunächst die Assemblierung von Partikeln mit allen drei Derivaten (leaderfreie Kontrolle, Wildtyp-Leader und mutiertem Leader) untersucht.

## 2.2 Proteinbindung an der isolierten 5'-Region

An der Assemblierung der ribosomalen 30S Untereinheit sind neben der 16S rRNA 21 ribosomale Proteine beteiligt. Bei einem derart komplexen System, scheint es zunächst schwierig, durch den Leader vermittelte Effekte auf die Proteinbindung z. B. von solchen zu unterscheiden, die indirekt durch Wechselwirkung zwischen Proteinen vermittelt werden. Es bedurfte somit zunächst einer Vereinfachung des Systems, um den direkten Leader-Effekt studieren zu können.

Da sich die direkte Wechselwirkung des Leaders auf die 5'-Region der 16S rRNA beschränkt, wurden die Analysen zunächst an verkürzten 16S rRNA-Transkripten durchgeführt, die nur die ersten 614 Nukleotide enthalten. Das Studium der betroffenen Domäne, unabhängig von den Einflüssen der übrigen Domänen, ermöglichte die Analyse eines limitierten Proteinmusters und

dadurch einen einfacheren Zugang zum System. In dieser Region binden die ribosomalen Proteine S4, S5, S16, S17 und S20. Um die Leader-Effekte zuzuordnen zu können, wurde neben den beiden leaderhaltigen 5'-Regionen (Wildtyp- oder mutierter Leader in *cis*) auch die leaderfreie 5'-Region assembliert.

Nach dem Protokoll von Held und Nomura wurden die Transkripte in einer Endkonzentration von 200 nM in die Assemblierung eingesetzt. Um zu gewährleisten, daß alle ribosomalen Proteinen in ausreichenden Mengen im Reaktionsgemisch vorhanden sind, wurden die Assemblierungsreaktionen mit einem 5fach molaren Überschuß an TP70 durchgeführt. Durch diese Vorgehensweise wurde ebenfalls versucht, präparationsbedingte Mengenunterschiede zwischen einzelnen TP70-Präparationen zu minimieren. Die Assemblierungsansätze wurden auf Eis gemischt, durch Zugabe des ribosomalen Proteingemisches gestartet und anschließend eine Stunde bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

Die Reaktionstemperaturen betragen, 12°C, 30°C und 40°C. Bei 40°C handelt es sich um die Standardbedingungen nach Held und Nomura, wohingegen bei 12°C die für die meisten Konformationsänderungen notwendigen Aktivierungsenergien nicht mehr zur Verfügung stehen und die gebildeten Partikel schon sehr früh auf dem Assemblierungspfad „arretiert“ werden.

Zum Stoppen der Reaktion wurden die Proben nach Ablauf der Reaktionszeit für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Um die assemblierten Partikel vom freien Proteinüberschuß zu trennen, wurden die Proben anschließend auf vorbereitete Saccharosegradienten aufgetragen. Der Gradientenverlauf betrug 10% auf 30% Saccharose. Die Partikel wurden über Nacht zentrifugiert. Die Gradienten wurden nach dem Lauf unter Verwendung eines Durchfluß-Spektralphotometers fraktioniert und die Fraktionen in denen sich die Partikel befanden, wurden gesammelt. Durch die Verwendung von TP70 im Überschuß konnte keine freie RNA mehr bei der Fraktionierung detektiert werden. Die Partikel wurden aus der Saccharoselösung gefällt, gewaschen und in 1x Rekonstitutionspuffer resuspendiert. Ein Aliquot des jeweiligen Ansatzes wurde entnommen, um die Bestimmung der RNA-Menge zur Normierung der Proteinsignale zu ermöglichen.

Um die Proben für das 2D-Gelsystem vorzubereiten, wurden alle Partikel mit RNase T1 hydrolysiert. Durch diesen Schritt wird die RNA abgebaut und die Partikel zerfallen in freie Proteine. Diese Hydrolyse ist zwingend notwendig, weil intakte Partikel durch die hohe negative Ladung der RNA nicht in das Gelsystem einlaufen. Da ribosomale Proteine vorwiegend zu den basischen Proteinen gehören, erfolgt die Auftrennung in Richtung Kathode. Parallel zu den Reaktionsansätzen wurde zusätzlich ein Gel mit freiem TP70 beladen, um die Zuordnung der ribosomalen Proteine zu erleichtern und um bei fehlenden Proteinsignalen in den assemblierten Partikeln die Anwesenheit des entsprechenden Proteins im TP70-Extrakt überprüfen zu können. Sollte also die Bindung eines Proteins durch den Leader-Einfluss inhibiert werden, so kann dies aus dem Vergleich mit dem TP70-Kontrollgel leicht erklärt werden. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt (5.2.9.1), über einen Durchlichtscanner elektronisch erfasst und anschließend unter Verwendung einer Quantifizierungssoftware ausgewertet.

Die ermittelten Rohdaten wurden gegen die im Spektral-Photometer bestimmte RNA-Menge, sowie gegen einen als Auftrags- und Färbestandard mit aufgetrennten Proteinmarker rechnerisch normiert. Aus den normierten Werten wurden die jeweiligen Verhältnisse (Wildtyp-Leader zu Leader-freier Kontrolle und mutierter Leader zu Leader-freier Kontrolle) gebildet. Bei der Verhältnisbildung wurde ein experimenteller „Über-alles“-Fehler von 20% veranschlagt und die entsprechenden Effekte ihrer Stärke nach in folgende Kategorien unterteilt:

- Ein Verhältnis von **0.8 bis 0.5** spiegelt eine **starke Bindung** wieder, in den 3D-Strukturen dargestellt in hellgrün. Ein Verhältnis **kleiner als 0.5** steht für eine **sehr starke Bindung** und wird durch dunkelgrün repräsentiert.
- Ein Verhältnis von **1.2 bis 2** weist auf eine **schwache Bindung** hin, die durch orange dargestellt wird, wohingegen ein Verhältnis **größer als 2** auf eine **sehr schwache Bindung** hinweist und durch rot repräsentiert wird.
- Verhältnisse **zwischen 0.8 und 1.2** befanden sich somit **im Bereich der Fehlertoleranz** und wurden als **unverändert** in grau dargestellt.

Nachfolgend sind die 2D-Gele des Leader-freien Partikels bei allen drei Temperaturen abgebildet

In der **Abbildung 2.1** auf Seite 28 werden die Veränderungen im Proteinmuster unter Verwendung der drei-dimensionalen Struktur von Wimberly (Wimberly *et al.*, 2000) dargestellt. In der oberen Reihe sind die Veränderungen bei Anwesenheit des Wildtyp-Leaders im Vergleich zur Leader-freien Kontrolle dargestellt. Die untere Reihe zeigt die Veränderungen bei Anwesenheit des mutierten Leaders im Vergleich zur Leader-freien Kontrolle und kennzeichnet so die Auswirkungen der Punktmutationen. Die Farbcodierung wird in der oberen rechten Ecke erläutert.



### 2.2.1 Ergebnisse

Die Analyse bei 12°C zeigt zunächst, daß die im *in vitro*-System assemblierten Partikel nur Proteine enthalten, die in der 5'-Region binden können. Dies sind S4, S5, S16, S17 und S20. Damit müssen die *in vitro* assemblierten Teilpartikel den nativen Partikeln insofern entsprechen, daß die Bindungsmotive der fünf Proteine in den Teiltranskripten der natürlichen Anordnung sehr nahe kommen müssen. S5 konnte bei den Assemblierungen der isolierten 5'-Region bei keinem der drei Derivate nachgewiesen werden, obwohl es im freien TP70-Gemisch eindeutig zugeordnet werden konnte. Da S16 und S17 auf den Gelen nicht als getrennte Signale aufgelöst werden konnten, wurden sie als ein gemeinsames Signal ausgewertet.

Die Anwesenheit des Leaders sorgt bei 12°C für eine leicht verbesserte Bindung von S4 und S20 (Vergl. **Abb. 2.1**). Die Bindung von S16 und S17 wird durch den Wildtyp-Leader leicht verringert. Die Punktmutationen im mutierten Leader führen im Vergleich zur Leader-freien Kontrolle zu einer sehr starken Bindung von S4, sowie zu leicht erhöhten Bindung von S20.

Bei 30°C zeigt der Leader in der Wildtyp-Form keinen Einfluß auf die Proteinbindung. Die Anwesenheit der Mutationen dagegen erhöht stark die Bindung von S4.

Bei 40°C sorgt die Anwesenheit des Leaders für eine leichte Verbesserung der Proteinbindung von S16 und S17. S20 wird durch den Wildtyp-Leader auch bei 40°C nicht beeinflusst. Die Anwesenheit der Leader-Mutante führt bei 40°C zu einer leicht erhöhten Bindung von S4. S16 und S17 bleiben bei der Mutante bei 40°C unbeeinflusst.

Ein zu berücksichtigender Aspekt ist das Fehlen von S5, obwohl es im TP70-Extrakt nachgewiesen wurde. S5 bindet im Bereich des zentralen Pseudoknotens. Als Domänen-übergreifendes Strukturelement enthält dieser Sequenzelemente sowohl in der 5'-Region, als auch in der 3'-Region. Da die in der 3'-Region liegenden Sequenzelemente in den 16S rRNA-Teiltranskripten für die reguläre Pseudoknotenformation nicht zur Verfügung stehen, wird das Fehlen von S5 in allen drei Partikel-Derivaten dadurch erklärbar, daß sich der Pseudoknoten im Bereich der S5-Bindung befindet. Die unmittelbarer Nähe des 5'-

Endes der 16S rRNA könnte das Fehlen von S5 auch auf einen struktureller Einfluß des Leaders verantwortlich erscheinen lassen.

### 2.3 Proteinbindung an der vollständigen 16S rRNA

Durch die Analysen mit der isolierten 5'-Region konnte die Funktionalität des Rekonstitutionssystems belegt werden. Damit waren für weitere Experimente folgende Voraussetzungen gegeben:

- Die Auswirkungen der beiden Leaderformen auf die isolierte 5'-Region ließen sich mit dem Verfahren der *in vitro*-Assemblierung untersuchen, da nur Signale von Proteinen detektiert wurden, die auch erwartet werden konnten.
- Durch Leader ausgebildete alternative Strukturen konnten durch Verringerung der Assemblierungstemperatur "eingefroren" werden. Dies zeigte sich durch Unterschiede zwischen Partikeln bei gleicher Assemblierungstemperatur. Wenn alle Partikel die gleichen Assemblierungsschritte durchlaufen würden und die Leaderwirkung lediglich kinetischer Natur wäre, würde durch den Leader nur die Geschwindigkeit der Faltungsschritte verändert. In diesem Fall würde sich mit steigender Temperatur lediglich die Zunahme einzelner Proteine verändern. Es wäre aber keine Reduktion einzelner Proteine im Vergleich zu anderen Partikeln der gleichen Reaktionstemperatur zu beobachten.

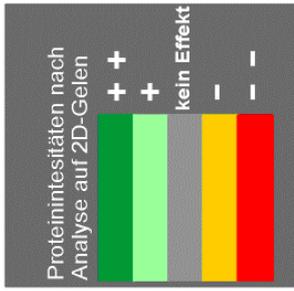
Aufgrund der bisherigen Ergebnisse sollte das *in vitro* Assemblierungssystem daher auch geeignet sein, den Einfluß des Leaders auf die Assemblierung der vollständigen 16S rRNA zu beobachten. Da der zentrale Pseudoknoten ein wichtiges Strukturelement für die korrekte Partikelformation darstellt, und der Leader unmittelbar an dieses Element angrenzt, könnte eine Analyse der assemblierten Vollänge weiteren Aufschluß über eine Leader-vermittelte Veränderung in diesem Bereich geben. Aus der Arbeit von Balzer war bekannt, daß sich unter dem Einfluß des mutierten Leaders gereifte 30S Untereinheiten nicht nur in der 5'-Region strukturell von den intakten Wildtyp-30S Untereinheiten unterschieden. Viele der auftretenden Unterschiede konnten ebenfalls der zentralen, sowie der 3'-Domäne zugeordnet werden (Balzer *et al.*, 1998).

Da sich die strukturell durch den Leader vermittelten Effekte also nicht nur auf die 5'-Region begrenzen, war eine Erweiterung der Analysen auf die übrigen Regionen der 16S rRNA erforderlich.

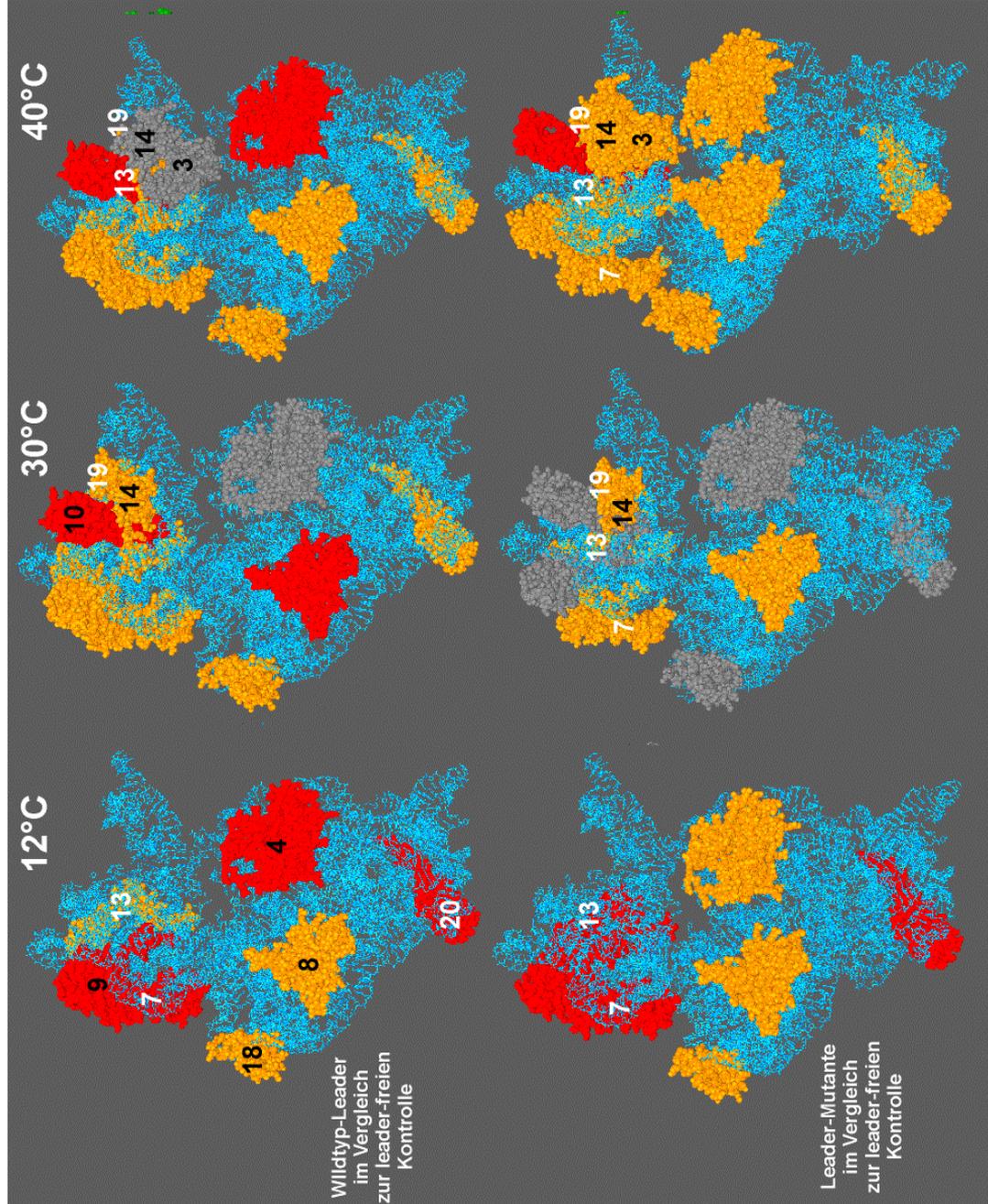
Um den Einfluß der beiden Leaderformen auf die Ausbildung des Pseudoknotens zu untersuchen, mußten die Transkripte um die notwendigen Sequenzen verlängert werden. Um dies zu erreichen, wurden neue Plasmide konstruiert, bei der eine 3'-seitig des 16S rRNA-Strukturgens liegende, ca. 400 bp entfernte, singuläre Restriktionsschnittstelle mittels PCR unmittelbar hinter das 16S rRNA-Gen versetzt wurde. Dadurch konnten Transkripte hergestellt werden, die nur 5 Nukleotide länger waren, als die native 16S rRNA. Da für eine stabile Wechselwirkung des 3'-seitigen Spacer-Bereichs mit dem Leader mehr als 40 Nukleotide notwendig sind, sollten die 5 zusätzlichen Nukleotide die Strukturbildung des restlichen Moleküls nicht beeinflussen.

Auch diese Analysen wurden mit allen drei Derivaten (Leader-freie Kontrolle, 16S rRNA mit Wildtyp-Leader und 16S rRNA mit mutiertem Leader) bei 5fachem Proteinüberschuß durchgeführt (siehe 5.3.4). Die Reaktionen erfolgten bei 12°C, 30°C und 40°C für jeweils 1 h in 1x Rekonstitutionspuffer. Nach der Inkubation wurden die Reaktionen auf Eis gestoppt und von jeder Probe ein Aliquot zur Bestimmung der RNA-Menge entnommen. Anschließend erfolgte die zweidimensionale Auftrennung (5.2.8.3). Die Analyse der Daten erfolgte identisch zu der unter 2.2 beschriebenen Vorgehensweise.

In der **Abbildung 2.2** auf Seite 32 sind wie schon für die Ergebnisse in der assemblierten 5'-Region, die 3D-Strukturen der kompletten 30S Partikel dargestellt.



**Abbildung 2.2:** Veränderungen des Proteinnusters durch Leaderinfluß in der assemblierten Vollänge. In der oberen Reihe sind die Einflüsse des Wildtyp-Leaders im Vergleich zur leader-freien Kontrolle dargestellt. In der unteren Reihe sind die Einflüsse der Leader-Mutante im Vergleich zum Leader-freien Partikel abgebildet. Die Farbcodierung ist in der Legende rechts oben aufgeschlüsselt. Die Assemblierungstemperaturen von links nach rechts sind 12°C, 30°C und 40 °C.



Bei der Auswertung dieses Experimentes mußten folgende Einschränkungen berücksichtigt werden:

1. S5 ließ sich bei 40°C zwar bei allen drei Derivaten nachweisen, das Signal war jedoch zu schwach um quantifiziert zu werden, so daß auf eine numerische Auswertung verzichtet und das S5-Signal nicht in die grafische Darstellung mit einbezogen wurde.
2. Das Signal von S6 war in allen Fällen nicht einheitlich genug, um quantifiziert zu werden, da es am Rande des Gels starke Verbreiterungen zeigte.
3. S11, S12 und S21 ließen sich in keinem Partikel nachweisen, obwohl sie im freien TP70-Gemisch nachgewiesen werden konnten.
4. Die Proteine S15, S16 und S17 ließen sich auch bei diesem Experiment nicht eindeutig in diskrete Signale auflösen. Da S15 in der zentralen Domäne bindet, S16 und S17 jedoch in der 5'-Domäne binden, wurde im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten auf eine gemeinsame Auswertung verzichtet.

### 2.3.1 Ergebnisse

Allgemein läßt sich bei den Analysen der Vollängen-Assemblierungen feststellen, daß sich mit Zunahme der Temperatur die assemblierten Partikel immer mehr dem nativen Zustand nähern. So binden bei 12°C nur einige Proteine, wohingegen bei 40°C alle (unter den oben genannten Einschränkungen) bindenden Proteine vorhanden sind. Auch bei diesen Analysen wurde das leaderfreie Partikel jeweils als Referenz verwendet. Der Assemblierungsfortschritt kann auf den 2D-Gelen im Anhang (siehe A.2) gut verfolgt werden. Einige Proteine, wie z. B. S19 tauchen erst ab 30°C auf. Andere Proteine nehmen von 12°C an mit steigender Temperatur in Ihrer Intensität zu, so z. B. S9.

Im Unterschied zu den Studien an der isolierten 5'-Region sind in Anwesenheit des Leaders im Vergleich zur Leader-freien Kontrolle bei keiner Temperatur Verstärkungen der Proteinsignale zu beobachten. Alle vermessenen Proteine zeigen eine deutlich schwächere Bindung als im Leader-freien Partikel. Allerdings lassen sich trotz der schwächeren Bindung in Anwesenheit bei-

der Leader bei einigen Proteinen leichte Affinitätserhöhungen mit Zunahme der Temperatur erkennen. Die Bindung von S7 wird in Anwesenheit beider Leader bei 12°C stark verringert. Bei 30°C und 40°C kann jedoch eine leichte Verbesserung der Bindung (zu erkennen am Übergang von rot nach orange, Abb. 3.2) beobachtet werden.

Auffällig ist, daß trotz der Reifung des Partikels mit Zunahme der Temperatur alle Proteine in der 3'-Region ebenfalls in inhibitorischer Weise beeinflusst werden, obwohl Leader und 3'-Region nicht in direkter Form miteinander interagieren können.

Vergleicht man die Auswirkungen beider Leader-Derivate miteinander, so lassen sich die Effekte der Leader-Mutante bei allen drei untersuchten Temperaturen klar erkennen. Bei 12°C wird die Bindung von S4 im Falle der Mutante nicht so stark gehemmt, wie in Anwesenheit des Wildtyp-Leaders. Die Bindung von S13 hingegen wird bei der Mutante stärker negativ beeinflusst, als in Anwesenheit des Wildtyp-Leaders. Bei 12°C ist somit nur die Bindung von S4 und S13 direkt durch die Leader-Mutationen betroffen.

Bei 30°C wird die Bindung von S4 in Anwesenheit beider Leader nicht beeinflusst. Die ribosomalen Proteine S10, S14 und S19 sind ab dieser Temperatur vorhanden. Die Anwesenheit der Mutante sorgt im Vergleich zum Wildtyp-Leader außerdem für eine bessere Bindung von S8, S9, S10 und S20.

Bei 40°C kann nun auch S3 nachgewiesen werden. Die Anwesenheit der Mutante führt bei dieser Temperatur im Vergleich zum Wildtyp-Leader zu einer besseren Bindung von S4, sowie zu einer schlechteren Bindung von S3, S14 und S19.

Da der Leader nur mit der 5'-Region der 16S rRNA direkte Wechselwirkungen eingehen kann, erscheint der Einfluß des Leaders auf die Bindung von Proteinen in der 3'-Domäne zunächst überraschend zu sein. Um diese unerwartete Auftreten sogenannter „long-range“-Wechselwirkungen aufklären zu können, sind Informationen über die Struktur der 16S rRNA und des Leaders

in den jeweiligen Partikeln notwendig. Mit Hilfe dieser Informationen sollte es möglich sein, folgende Befunde aufklären zu können:

1. Bei der isolierten 5'-Region hilft die Anwesenheit des Leaders bei der Assemblierung, indem die Anlagerung der dort bindenden ribosomalen Proteine verbessert wird. Der Leader zeigt somit in beiden Formen (Wildtyp und Mutante) einen positiven Einfluß auf die Assemblierung.
2. Bei der 16S rRNA-Volllänge hingegen scheint die Anwesenheit des Leaders einen störenden Einfluß zu haben. Dies äußert sich in einer Verringerung bei allen detektierten Proteine. Die Leader-Mutationen können den inhibitorischen Effekt in einigen Fällen abschwächen oder sogar kompensieren.
3. Auch Proteine in der 3'-Domäne sind mit steigender Temperatur in zunehmender Weise betroffen, obwohl Interaktionen des Leaders nur mit der 5'-Domäne nachgewiesen werden konnten.

#### **2.4 Der Leader und die Assemblierung: eine Frage der Struktur**

Um die Verbindung zwischen der Interaktion des Leaders mit der 16S rRNA und der darauf folgenden Bindung ribosomaler Proteine aufzuklären, bedurfte es einer detaillierten strukturellen Untersuchung der assemblierten Partikel. Die auf Proteinebene gefundenen Einflüsse der Leader-Derivate haben ihre Ursache in einer strukturellen Veränderung der von den Proteinen erkannten Bindungsstrukturen in den entsprechenden Regionen der 16S rRNA.

RNA-bindende Proteine erkennen ihren Bindungsort durch die strukturelle Umgebung. Dies bedeutet daß, im Gegensatz zu z.B. einigen DNA-bindenden Proteinen, die ihren Bindungsort anhand der Basensequenz erkennen, die räumliche Anordnung der zur Bindung benötigten RNA-Sequenz entscheidend ist. Eine strukturelle Untersuchung der Partikel sollte die auf Proteinebene gewonnenen Erkenntnisse bestätigen. Zusätzlich ist es so vielleicht möglich, die scheinbaren Unklarheiten zwischen der Leaderwirkung auf die isolierte 5'-Region und auf die Volllänge aufzuklären.

Die *in vitro*-Assemblierungen wurden wie in den vorangegangenen Analysen (5.3.4) durchgeführt. Lediglich das Reaktionsvolumen wurden aufgrund den für diese Untersuchung benötigten geringeren Mengen entsprechend verkleinert. Auch in diesem Experiment sollte die Temperaturabhängigkeit der Strukturbildung für alle drei Derivate (ohne Leader, Wildtyp und Mutante) untersucht werden. Die Ansätze wurden entsprechend bei 12°C, 30°C und 40°C für jeweils eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte nach einer kurzen Inkubation auf Eis eine Modifikation mit Kethoxal bei 10°C.

Kethoxal ist ein strukturspezifisches Agens, welches einzelsträngige Guanosine durch Bildung eines labilen Fünfrings zwischen den beiden Carbonylgruppen des Kethoxals und den Aminogruppen N1 und N2 des Guanosins modifiziert. Diese Modifikation kann durch Anwesenheit von Borat stabilisiert werden und führt in einer nachfolgenden „Primer Extension“-Reaktion zu einem spezifischen Abbruch an der vor der Modifikation befindlichen Position. Die Strukturformeln von Kethoxal und des gebildeten Guanosin-Adduktes sind in den Materialien und Methoden illustriert (5.3.9).

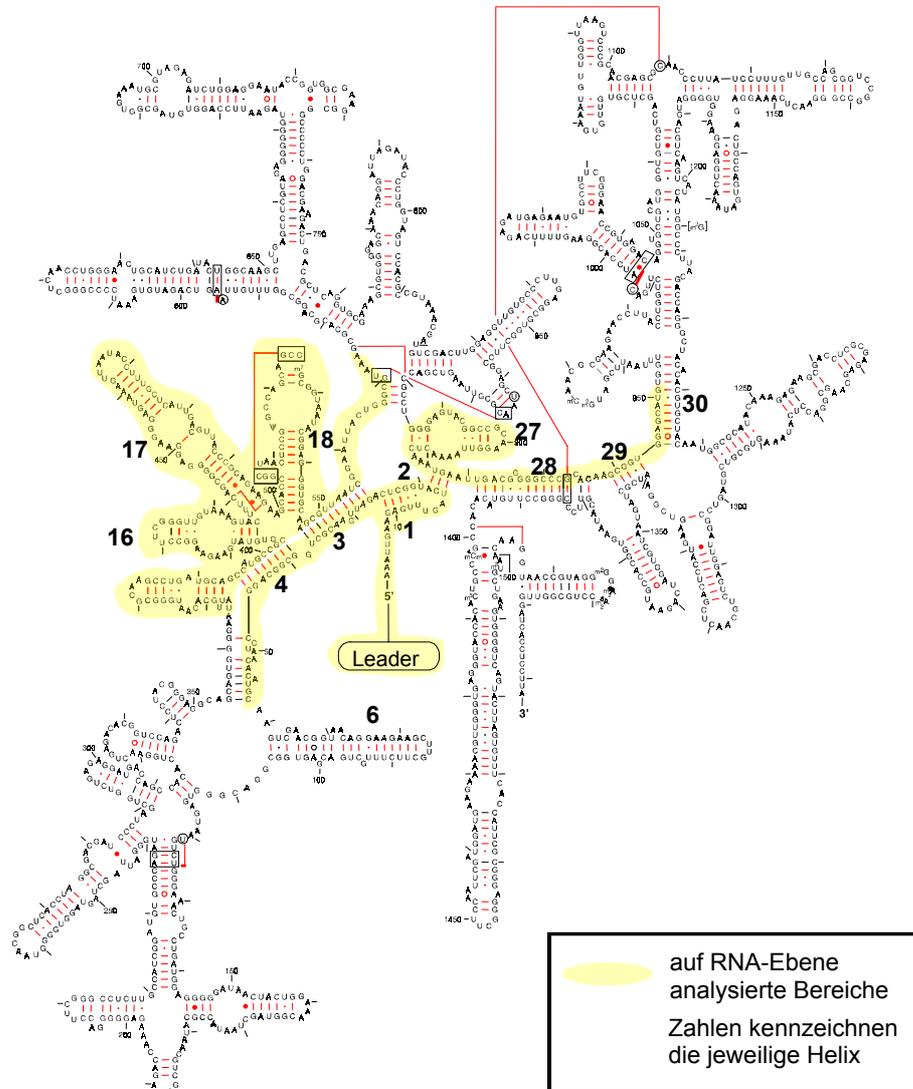
Die Modifikationen wurden bei 10°C für eine Dauer von 30 Min. durchgeführt. Die Modifikationstemperatur wurde so gewählt, daß sie unterhalb der niedrigsten Assemblierungstemperatur liegt, um während der Modifikationsphase weitere Strukturumlagerungen zu unterbinden. Die assemblierten Partikel sollten mit der Struktur, die sie während des Assemblierungszeitraums eingenommen haben, modifiziert werden. Nach der Modifikation wurden sie auf vorbereiteten Saccharosegradienten vom freien Proteinüberschuß getrennt. Vor dem eigentlichen Experiment wurde überprüft, ob die Inkubation mit Kethoxal zu einer Veränderung der Partikelstruktur führt. Dazu wurde die eine Hälfte eines Rekonstitutionsansatzes mit Kethoxal behandelt. Bei der zweiten Hälfte des Ansatzes wurde das entsprechende Volumen in Form von 10% Ethanol zugegeben (siehe 5.3.9). Beide Ansätze wurden bei 10°C inkubiert und anschließend auf Saccharosegradienten aufgetrennt. Die beiden Partikel wiesen im Rahmen der Fehlertoleranz keine Unterschiede im Sedimentationsverhalten auf.

Bei den „Primer Extension“-Analysen wurden die radioaktiv markierten Oligonukleotide so gewählt, daß sie die Beobachtung der Zugänglichkeiten in den

relevanten Bereichen erlaubten. Als relevant für den Leader-Einfluß wurden folgende Bereiche angesehen:

1. **Der Leader selbst.** Die Punktmutationen, die *in vivo* zur Ausprägung eines kältesensitiven-Phänotyps führen, befinden sich in Regionen des Leaders. Somit sollten bei den verschiedenen Assemblierungstemperaturen Strukturunterschiede in beiden Leaderformen zu erwarten sein, die die Faltung der 16S rRNA beeinflussen und so die Bindung der ribosomalen Proteine verändern könnten.
2. **Das unmittelbare 5'-Ende der 16S rRNA.** In diesem Bereich wurden in den „Cross-link“-Experimenten von Pardon, 1995 direkte Interaktionen zwischen Leader und 16S rRNA nachgewiesen. Auch ein Teil des zentralen Pseudoknotens ist am 5'-Ende lokalisiert.
3. **Die Helices 4, 16, 17 und 18** sind die Orte der S4-Bindung. Da S4 als primär bindendes Protein in direktem Kontakt zur 16S rRNA steht und im Assemblierungsverlauf als eines der ersten Proteine binden kann, wären in diesen Regionen ebenfalls strukturelle Unterschiede zu erwarten. Diese Annahmen werden auch durch die Daten der Proteinbindungsanalysen (s.o) unterstützt.
4. **Die Helices 27, 28, 29 und 30.** In diesem Bereich befindet sich das zweite Element des zentralen Pseudoknotens, welches in der 3'-Domäne liegt. Außerdem sollten Bereiche in der 3'-Region auf strukturelle Veränderungen untersucht werden, da die Interaktionen des Leaders nur in der 5'-Domäne erfolgen. Erwartungsgemäß sollten demnach keine Strukturunterschiede in der 3'-Domäne bei Anwesenheit des Leaders zu beobachten sein.

Auf der folgenden Abbildung sind die untersuchten Bereiche farbig hervorgehoben. Die einzelnen Helices sind gemäß der Nomenklatur von Woese *et al.*, 1983 gekennzeichnet.



## 2.5 Strukturanalyse der assemblierten 5'-Region

### 2.5.1 Die Leader-Region

In der nachfolgenden Tabelle sind die Modifikationsergebnisse der Leaderregion zusammengefaßt. Dabei werden die Zugänglichkeiten in Kategorien von schwach (+) bis sehr stark (++++) eingeteilt. Positionen, die keine Zugänglichkeiten zeigten, sind durch graue Kästchen gekennzeichnet.

Helix	Position	Wildtyp			Mutante		
		12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C
IV	BoxC	++			++		
	G239				++		
	G241				+		
	G243				++		
	G245				+		
	A249		++	++++		+	+++
	U252	++++			++++		
	A253	+++			+++		
	U256		+	++++		++	+++
	C257		+	++++		++	+++
	A258	++++			++++		
	A261	+++			+++		
	G263	+++			+++		
	G266	+++			+++		
	U268	+			+++		
	U269	++++			++++		
	A270				+++		
	A271				+++		
	U272				+++		
	U273				+++		
	G278						
	G280						
	G282						
	A286			+			+
	A287		+	++		+	
	C288		++	+++	+	++	+++
	U289		++	+++	+	++	+++
	U290						
U291		+++			+++		
U292	++	+++	++++	+++			

**Tabelle 2.3: strukturelle Analyse des Leaderbereiches der assemblierten 5'-Region.** In der Tabelle sind die durch Primer Extension gewonnenen Signale in Partikeln mit der isolierten 5'-Region aufgeführt. Die zugeordneten Positionen, sowie der entsprechende Helixbereich sind links angegeben. Die Intensitäten der Signale reichen von schwach (+) bis sehr stark (++++). Positionen, die keine Zugänglichkeit zeigten, sind grau hinterlegt. Pfeile weisen auf Positionen, die nur in Anwesenheit der Proteine zugänglich sind.

Die **Tabelle 2.3** zeigt, daß es zwischen den beiden Leader-Derivaten sowohl strukturelle Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten gibt. Beiden Leadern gemeinsam sind die fehlenden Zugänglichkeiten der Positionen G278, G280 und G282. Auch Strukturabbrüche, die durch die Bindung der ribosomalen Proteine erfolgen und demnach nicht auf die Modifikation durch Kethoxal zurückzuführen sind, zeigen an den Positionen U252, A253, A258 und C288 Gemeinsamkeiten zwischen beiden Leadern auf.

Starke strukturelle Unterschiede kann man beim Wildtyp-Leader in den fehlenden Zugänglichkeiten der Positionen G241-G245 und A270-U273 erkennen. Im mutierten Leader dagegen ist die  $t_L$ -Region im Bereich von G241-G245 etwas offener, im Bereich von A270-U273 hingegen viel zugänglicher. Das heißt also, daß sich beide Leader-Derivate bezüglich ihrer Struktur in der  $t_L$ -Region (G245-U275) stark unterscheiden, in der sich auch die Punktmutationen befinden. Die mutierte Form des Leaders zeigt dort einen wesentlich zugänglicheren Bereich.

Die Ergebnisse zeigen jedoch auch die temperaturabhängige Veränderung einiger Positionen (in der **Tabelle 2.3** durch Pfeile gekennzeichnet). Diese temperaturabhängigen Effekte wurden bei allen gekennzeichneten Positionen beobachtet. Mit Zunahme der Temperatur werden die Strukturabbrüche bei der Leader-Derivate an den Positionen A249, U256, C257, A286, U291 und U292 stärker, d.h. mit steigender Temperatur treten verstärkt Proteinvermittelte Signale im Leader unmittelbar vor dem Beginn der 16S rRNA auf. Dies deutet auf die Nähe dieses Bereichs zu einem ribosomalen Protein hin.

### 2.5.2 Das 5'-Ende der 16S rRNA

Die folgende **Tabelle 2.4** faßt die Zugänglichkeiten im Bereich des 5'-Endes der 16S rRNA zusammen. Da sich dieser Bereich in unmittelbarer Nachbarschaft des Leaders befindet, steht er auch bei der nascierenden RNA als erste Interaktionsmöglichkeit zur Verfügung.

Helix	Position	Wildtyp			Mutante			ohne Leader		
		12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C
1	G6	P			P			++		
	G9							+++		
	G11							+++		
	U14		++	+++		++	+++			
	G15							+++		
2	A19	+++			+++			++	+++	+++
	G21	P			P			++		
1	G22							+++		
	A26			+++			+++		+++	+++
3	G27	+			+			+		
	G31	P			P			P		

**Tabelle 2.4: Strukturinformationen über das 5'-Ende der assemblierten 5'-Region.** Die Symbolik entspricht der in Tabelle 2.3. Auch in dieser Tabelle sind nur die Zugänglichkeiten bei Proteinanwesenheit angegeben. Positionen, die im Vergleich zur nicht assemblierten, freien RNA eine proteinabhängige Protektion zeigen, sind mit „P“ gekennzeichnet.

Die Interaktion des Leaders mit Bereichen der 5'-Region kann in diesem Experiment erneut bestätigt werden. In Anwesenheit beider Leader-Derivate werden die Zugänglichkeiten bei G6 und G21 gegenüber dem leaderfreien Partikel erhöht. Zusätzlich ist bei beiden Positionen eine Protektion bei Proteinanwesenheit erkennbar (dies wird beim Vergleich mit den Zugänglichkeiten der jeweils bei gleicher Temperatur mitgeführten freien RNA deutlich, siehe Anhang). Die Positionen G9, G11, G15 und G22 sind in Anwesenheit des Leaders nicht durch Kethoxal modifizierbar. Da dieser Effekt bei allen Temperaturen zu beobachten ist, spricht dies für eine sehr stabile Wechselwirkung zwischen Leader und 16S rRNA, zumal die gleichen Positionen im leaderfreien Partikel gut modifizierbar sind. Die ab 30°C bei U14 und ab 40°C bei A26 beobachteten Strukturabbrüche müssen auf die Wechselwirkung ribosomaler Proteine zurückzuführen sein, das es sich bei diesen Positionen um Nukleotide handelt, die nicht durch Kethoxal modifiziert werden und diese Signale in den Protein-freien Kontrollen nicht auftreten.

### 2.5.3 Die Helices 16,17 und 18

In dieser Region werden die zentralen Struktur motive zur Bindung von S4 ausgebildet. Die nachfolgende **Tabelle 2.5** illustriert die Zugänglichkeiten dieses Bereiches.

Helix	Position	Wildtyp			Mutante			ohne Leader		
		12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C
16	G410		P			P			P	
	G413		P			P			P	
	G416		P			P			P	
	G417		P			P			P	
	A430		P			P			P	
	G433		P			P			P	
17	U437		P			P			P	
	A441		P			P			P	
	G445		P			P			P	
	G449		P			P			P	
	G450		P			P			P	
	G453		P			P			P	
	G454		P			P			P	
	G457									
	A459			++++			+++			++++
	A460			+++			++			+++
A461			+++			++			+++	
18	G505		P			P			P	
	G521		+++			+++			+++	
	G524		++++			++++			+++	
	G527		+++			+++			++++	
	U534			++			++			++
	G548		+++			+++			+++	
3	G550		+++			+++			+++	

**Tabelle 2.5: Zugänglichkeiten im zentralen Bereich der S4-Bindung der assemblierten 5'-Region.** Die Symbolik entspricht den vorangegangenen Tabellen.

Die Tabelle zeigt eine deutliche Protektion im Bereich der Helices 16 und 17 in allen drei Derivaten. Dabei sind alle im Experiment erfaßten Positionen zwischen G410 und G454, in Anwesenheit der Proteinen sehr stark geschützt. Dies läßt auf eine starke Proteinbindung schließen. A441 ist trotz der Protektion noch gut zugänglich. Die Zugänglichkeit von U534 ist bei allen drei Partikeln erst bei 40°C zu beobachten. Da die genannten Strukturabbrüche nicht an Guanosinen beobachtet wurden, müssen sie auf die Bindung von S4 zurückzuführen sein, da sich alle genannten Positionen im Bereich der S4-Bindung befinden. Auch am oberen Ende von Helix 17 kann bei 40°C eine strukturelle Änderung bei allen drei Partikeln beobachtet werden, die ebenfalls nicht auf die Modifikation durch Kethoxal zurückzuführen ist. A459, A460 und

A461 sind auch erst bei 40°C zugänglich. Die Anwesenheit des mutierten Leaders zeigt an diesen Positionen eine etwas schwächere Ausprägung. Diese Signale liegen im Bereich der Bindung von S16. Somit könnten die Abbrüche A459-A461 aus der Bindung von S16 resultieren.

Interessant ist ebenfalls das Verhältnis von G524 zu G527, welche ihre Intensitäten in Abwesenheit beider Leader umkehren. Auch dies ist ein Hinweis auf strukturelle Unterschiede zum Leader-freien Partikel.

Die strukturelle Untersuchung der assemblierten 5'-Region ergibt folgendes Bild:

1. Beide Partikel, die den Leader enthalten, zeigen insbesondere in der  $t_L$ -Region starke strukturelle Unterschiede. Im Falle des Wildtyp-Leaders konnten dort Protein-vermittelte Protektionen gefunden werden. Die mutierte Form hingegen zeigte in diesem Bereich an mehreren Positionen Zugänglichkeiten, die im Wildtyp-Leader nicht vorhanden sind.
2. Am unmittelbaren 5'-Ende konnten auf Seiten der 16S rRNA keine strukturellen Unterschiede zwischen den beiden Leaderformen festgestellt werden.
3. In Anwesenheit des Leaders sind einige Positionen am unmittelbaren 5'-Ende der 16S rRNA auch nach einer Assemblierungsdauer von 1 h nicht durch Kethoxal modifizierbar.

## 2.6 Strukturanalyse der assemblierten Vollängentranskripte

Aus den Proteinbindungs-Analysen ging eindeutig hervor, daß die Wechselwirkungen des Leaders in der 5'-Region auch Einfluß auf die Bindung von Proteinen in der 3'-Region haben. Da der Leader keine Kontakte zur 3'-Region ausbilden kann, muß es ein strukturelles Bindeglied zwischen der 5'- und der 3'-Region geben, über welches die Effekte vermittelt werden können. Zwischen den Helices 27 und 28 liegt der in der 3'-Region befindliche Teil des zentralen Pseudoknotens, der auch räumlich in unmittelbarer Nähe des 5'-Endes der 16S rRNA lokalisiert ist. Sollte der Leader mit Teilen des Pseudoknotens in der 5'-Region interagieren, könnten hier strukturelle Unterschiede erkennbar sein. Die Helices 29 und 30 liegen relativ zentral in der 3'-Region. Signale in diesem Bereich könnten ebenfalls Aufschluß über mögliche indirekte Einflüsse auf die Struktur der 3'-Domäne geben. Aus diesen Gründen wurden die strukturellen Analysen der Partikel mit der vollständigen 16S rRNA um die Helices 27, 28, 29 und 30 erweitert.

Durch den direkten Vergleich der Strukturinformationen beider Partikel sollen zusätzlich Rückschlüsse über die Auswirkungen des Leaders in Anwesenheit der zentralen und der 3'-Region gewonnen werden.

Dieses Experiment wurde unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie die Strukturanalysen an der isolierten 5'-Region. Transkribierte RNA aller drei Derivate wurde mit 5fach molarem Überschuß an TP70 für 1 h bei der jeweiligen Reaktionstemperatur inkubiert. Nach dem Stoppen der Assemblierung auf Eis folgte die anschließende Modifikation durch Kethoxal.

### 2.6.1 Die Leader-Region

In der **Abbildung 2.6** auf Seite 46 sind die strukturellen Zugänglichkeiten im Leader der assemblierten Vollängentranskripte aufgeführt. Auch hier erfolgt die Einteilung in schwache (+) bis sehr starke (++++) Zugänglichkeiten. Nicht zugängliche Positionen sind dunkelgrau unterlegt, Positionen an denen Protektion durch Proteine erfolgt, mit „P“ gekennzeichnet. Um die in der Volllänge auftretenden Effekte mit den Strukturdaten der isolierten 5'-Region besser vergleichen zu können, wurden in den folgenden Abbildungen die Daten aus den zu korrelierenden Bereichen der isolierten 5'-Region jeweils zusätzlich nocheinmal dargestellt.

		isolierte 5'-Region						Vollängentranskripte						
Helix	Position	Wildtyp			Mutante			Position	Wildtyp			Mutante		
		12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C		12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C
IV	BoxC	++			++			BoxC	++			++		
	G239				++			G239				++		
	G241				+			G241						
	G243				++			G243				+		
	G245				+			G245				+		
	A249		++	++++		+	+++	A249		++	+++		++	++
	U252	++++			++++			U252	+++			+++		
	A253	+++			+++			A253	+++			+++		
	U256		+	++++		++	+++	U256						
	C257		+	++++		++	+++	C257			++		+	++
	A258	++++			++++			A258	+++					
	A261	+++			+++			A261	+		++	+++	++	
	G263	+++			+++			G263	+			+		
	G266	+++			+++			G266	+			+		
	U268	+			+++			U268					++	+
	U269	++++			++++			U269	++			++		
	A270				+++			A270			+	+		
	A271				+++			A271				+		
	U272				+++			U272				++		
	U273				+++			U273				+		
	G278							G278						
	G280							G280						
	G282							G282						
	A286			+			+	A286			+			+
	A287		+	++	+			A287		+	++	+		
	C288		++	+++	+	++	+++	C288		++	+++	++		
	U289		++	+++	+	++	+++	U289		++	++++	++		
	U290							U290						
U291		+++				+++	U291		+++	++++	+++			
U292	++	+++	++++			+++	U292	++	+++	++++	++	+++		

**Abb. 2.6: Übersicht über die Zugänglichkeiten der Leader-Bereiche beider assemblierter Transkriptlängen.** Die linke Tabelle faßt die Zugänglichkeiten der assemblierten 5'-Region noch einmal zusammen und wurde für den Vergleich mit den Zugänglichkeiten in den assemblierten Vollängentranskripten (rechte Tabelle) erneut dargestellt. Die Symbolik entspricht den vorangegangenen Tabellen.

Zunächst ist festzustellen, daß sich beim Wildtyp-Leader die Zugänglichkeiten im Leaderbereich der Volllänge auf den ersten Blick nicht von denen der isolierten 5'-Region unterscheiden. Dies ist für die Positionen G241-G245, A270-U273, sowie G278, G280 und G282 der Fall. Die Positionen am 3'-Ende des Leaders A286-U292 zeigen ebenfalls keine strukturellen Unterschiede. Die eigentlichen Auswirkungen zeigen sich in der  $t_L$ -Region, in der sich eine Reihe von Unterschieden feststellen lassen.

Die Positionen A261, G263, G266 und U269 zeigen in den Vollängentranskripten eine deutlich verringerte Zugänglichkeit. Die Position U256 zeigt im Gegensatz zur isolierten 5'-Region nicht mehr die temperaturabhängige Zunahme der Zugänglichkeit. Auch der Strukturabbruch bei C257 tritt nur noch bei 40°C auf. Die Position A270 hingegen zeigt bei 40°C eine leichte Zugänglichkeit.

Die Interaktionen des Leaders mit der vollständigen 16S rRNA scheinen sich im Falle der Volllänge deutlich von denen mit der isolierten 5'-Region zu unterscheiden. Auch die Veränderungen in der Leader-Mutante scheinen sich auf den Bereich der  $t_L$ -Region zu konzentrieren. Der in der assemblierten 5'-Region stark zugängliche Bereich von A261-U273 scheint in der vollständigen 16S rRNA weniger zugänglich zu sein. Zudem zeigt er in den assemblierten Vollängentranskripten an vielen Positionen eine deutlich stärkere Temperaturabhängigkeit. Ebenso auffällig ist, daß A287-U289 bei der Mutante bei 12°C nicht mehr zugänglich sind.

Auch in diesem Bereich scheint die Mutante eine Struktur auszubilden, die sich schon bei 12°C erheblich von derjenigen in der assemblierten 5'-Region unterscheidet.

Die Ergebnisse deuten an, daß Leader und Elemente der 3'-Region der 16S rRNA an der Ausbildung von Strukturen in konkurrierender Form beteiligt sein müssen, auch wenn gezeigt wurde, daß der Leader nur mit Elementen der 5'-Region wechselwirken kann.

### 2.6.2 Das 5'-Ende der 16S rRNA

Vergleicht man das nahe 5'-Ende in beiden assemblierten Partikelvarianten (isolierte 5'-Region, **Tab. 2.4** und Volllänge, **Tab. 2.7**), so fällt auf, daß es im Gegensatz zum Leader-Bereich keine signifikanten Unterschiede gibt. Bis auf kleine Unterschiede in den Strukturabbrüchen an den Positionen A19 und A26, gibt es zwischen den beiden Partikelgruppen keine Unterschiede.

Die fehlenden Zugänglichkeiten der Guanosine G9, G11, G15 und G22 bei Leader-Anwesenheit sind ebenso bei beiden Gruppen vertreten, wie auch die stärkeren Zugänglichkeiten bei G6 und G21. Auch die proteinvermittelte Protektion bei G6, G21 und G31 ist bei allen drei Derivaten in beiden Partikelgruppen vorhanden.

Von den starken Veränderungen im Leader-Bereich beider Leader-Derivate scheinen die Interaktionen am unmittelbaren 5'-Ende der 16S rRNA in beiden Partikelgruppen somit offensichtlich nicht beeinflußt zu werden.

Helix	Position	Wildtyp			Mutante			ohne Leader		
		12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C
1	G6	P			P			++		
	G9							+++		
	G11							+++		
	U14		++	+++		++	+++			
	G15							+++		
2	A19	+++			+++			+++		
	G21	P			P			++		
1	G22							+++		
	A26	+	+++		+	+++		+	+++	
3	G27	+			+			+		
	G31	P			P			P		

**Tab. 2.7: Zugänglichkeiten am 5'-Ende der 16S rRNA in den assemblierten Vollängentranskripten.** Die Symbolik entspricht den vorangegangenen Tabellen.

### 2.6.3 Die Helices 16,17 und 18

Im Gegensatz zum nahen 5'-Ende scheint der zentrale Bereich der S4-Bindung jedoch im Falle der assemblierten Volllänge stärker betroffen zu sein. Als erstes fällt auf, daß die starke, vermutlich durch S4 vermittelte Protektion in den Helices 16 und 17 nicht mehr zu beobachten ist und statt dessen die Positionen an einigen Stellen ein etwas differenziertes Muster zeigen (siehe **Tab. 2.8**).

Helix	Position	Wildtyp			Mutante			ohne Leader			
		12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C	
16	G410	+		P	+		P	+		P	
	G413	+		P	+		P	+		P	
	G416										
	G417										
	A430		++			++			++		
	G433		++			++			++		
	U437		+			+			+		
17	A441		++		P		++		P		
	G445		++			++			++		
	G449		++			++			++		
	G450		++			++			++		
	G453		++			++			++		
	G454		++			++			++		
	G457										
	A459			+++	++++			+++		+++	++++
	A460			++	+++			++		++	+++
	A461			++	+++			++		++	+++
18	G505	+++	+++		P		+++		P		
	G521		+++			+++			+++		
	G524		+++			+++			+++		
	G527		+++			+++			+++		
	U534										
	G548		+++			+++			+++		
3	G550		+++			+++			+++		

**Tab. 2.8: Zugänglichkeiten im zentralen Bereich der S4-Bindung im assemblierten Vollängentranskript.** Die Symbolik entspricht den vorangegangenen Abbildungen. Vergleiche auch Tabelle 2.5.

Es ist zu erkennen, daß im Vergleich zum gleichen Bereich der assemblierten 5'-Region (**Tab. 2.5**) viele Positionen in der Helix 16 des assemblierten Vollängentranskriptes stärker zugänglich zu sein scheinen. Die Proteinvermittelte Protektion ist bei allen drei Partikelformen nur noch an den Positionen G410, G413, A441 und G505 zu beobachten. Insbesondere scheinen alle Partikel bei 12°C an diesen Positionen keine Proteinkontakte mehr auszubilden. Die Positionen G416 und G417 sind im Gegensatz zur isolierten 5'-Region nicht zugänglich. Ebenfalls auffällig ist die Zugänglichkeit am oberen Ende der Helix 17, A459-A461, die in den assemblierten Vollängentranskrip-

ten auch schon bei 30°C in allen Partikeln zu beobachten ist. Dabei tritt auch in der Volllänge das Phänomen auf, daß diese Zugänglichkeiten in dem Partikel mit dem mutierten Leader geringer ausfallen als bei den beiden anderen Partikelformen.

Die Zugänglichkeit von A441 zeigt auch eine gewisse Temperaturabhängigkeit, da die Signale bei 12°C bei allen drei Derivaten, dagegen bei 30°C nur beim Wildtyp-Leader schwächer ausfallen. Die Proteinprotektion setzt ebenfalls erst ab 30°C ein.

Die reziproke Signalintensität von G524 und G527 ist in der assemblierten Volllänge ebenfalls nicht zu beobachten. Auch die ausschließlich bei 40°C bei allen Derivaten der isolierten 5'-Region auftretenden Signale bei U534 fehlen in der Volllänge.

Im Vergleich zur assemblierten 5'-Region weisen die Partikel der Vollängentranskripte insgesamt eine erhöhte Zugänglichkeit in der zentralen S4-Binderegion auf. Die Anzahl der durch S4 vermittelten Protektionssignale beschränkt sich bei den Vollängentranskripten auf wenige Positionen. Die strukturellen Informationen über diesen Bereich machen deutlich, daß es zwar einen generellen Einfluß auf die S4-Binderegion gibt, daß dieser Einfluß aber auf die Anwesenheit der zusätzlichen Sequenzen (zentrale- und 3'-Region) zurückzuführen ist.

Direkte Hinweise auf die spezifische Wirkung einer der beiden Leader-Derivate in dieser Region, lassen sich mit Ausnahme der schwächeren Signale von A459-A461 bei 30°C im Falle der Mutante nicht finden.

#### 2.6.4 Die 3'-Region der 16S rRNA

Die Untersuchung dieses Bereiches war aus mehreren Gründen von großer Bedeutung. Durch die strukturelle Analyse dieser Region sollte erneut belegt werden, daß die 3'-Region durch die fehlende Möglichkeit zur Interaktion mit dem Leader nicht direkt durch Leader-Effekte beeinflußt werden kann. Wie die Proteinanalysen der Partikel zeigten (vergleiche Abschnitt 2.3, sowie **Abbildung 2.2**), haben beide Leader einen inhibitorischen Effekt auf Proteine, die

in der 3'-Region der 16S rRNA binden. Dieser überraschende Befund einer möglicherweise indirekt vermittelten Leaderwirkung aus den Proteinanalysen bedurfte wegen der genannten fehlenden Interaktionsmöglichkeiten der näheren Untersuchung. Die inhibitorische Wirkung beider Leaderformen auf die Bindung von Proteinen in der 3'-Region der assemblierten Volllänge sollte also mit diesem Experiment strukturell detaillierter analysiert werden.

In der nachfolgenden **Abbildung 2.9** sind die in der 3'-Region der assemblierten Vollängentranskripte untersuchten Zugänglichkeiten aufgeführt (oben). Die untere Tabelle zeigt die Zugänglichkeiten der unter den gleichen Bedingungen mitgeführten proteinfreien RNAs. Dadurch können proteinvermittelte Strukturunterschiede von Effekten reiner RNA-RNA-Interaktion, die ohne Einfluß der ribosomalen Proteine erfolgt, unterschieden werden.

Partikel	Helix	Position	Wildtyp			Mutante			ohne Leader		
			12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C
27	27	A892	++			++			++		
		A900	+++			+++			+++		
		A901	+++			+++			+++		
		A913	+++			+++			+++		
28	28	G917	++			++			++		
		G922	+		P	+		P			
30	30	G925			++					++	
		C936	++++			++++			++++		
		C948	+++			+++			+++		

freie RNA	Helix	Position	Wildtyp			Mutante			ohne Leader		
			12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C	12°C	30°C	40°C
27	27	A892	++			++			++		
		A900	+++			+++			+++		
		A901	+++			+++			+++		
		A913	+++			+++			+++		
28	28	G917	++			++			++		
		G922	+	++	+++	+	+++	+++			
30	30	G925									
		C936	++++			++++			++++		
		C948	+++			+++			+++		

**Abb. 2.9: Zugänglichkeiten in der 3'-Region der Vollängentranskripte.** Die Zugänglichkeiten im assemblierten Zustand sind oben aufgeführt, die Tabelle unten zeigt die Zugänglichkeiten der gleichen Positionen in den mitgeführten protein-freien RNAs.

Das Experiment zeigt, daß Helix 27 und Helix 30 an den erfaßten Positionen keinen Leader-Einfluß bezüglich ihrer Struktur erkennen lassen. Auch die Position G917, die das mittlere Basenpaar des zentralen Pseudoknotens bildet, scheint nicht betroffen zu sein.

Ein deutlicher Hinweis auf die Ursache der inhibitorischen Einflüsse beider Leader-Derivate auf die 3'-Region zeigt die Analyse an Position G922. Diese Position liegt in Helix 28, welche die erste Helix der 3'-Region nach dem Pseudoknoten darstellt. Die Strukturdaten der freien RNAs lassen an dieser Position eine Zugänglichkeit erkennen, die mit steigender Temperatur immer stärker wird. Dies könnte ein klarer Hinweis auf eine Destabilisierung der Helix 28 sein, die bei Anwesenheit des Leaders erfolgt.

### 2.6.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Modifikationsanalysen

- Im Leader-Bereich der assemblierten 5'-Region lassen sich zahlreiche Unterschiede zwischen den beiden Leader-Derivaten detektieren. Dabei zeigt die Mutante erhöhte Zugänglichkeiten in der  $t_L$ -Region, also dem Bereich, in dem sich auch die Punktmutationen befinden. Auch in den assemblierten Vollängentranskripten unterscheiden sich beide Leader-Derivate voneinander. Die Unterschiede liegen ebenfalls in der  $t_L$ -Region. Einflüsse der zusätzlich vorhandenen zentralen und 3'-Region auf die Veränderungen in den Leader-Regionen konnten bei der Volllänge ebenfalls klar gezeigt werden.
- Am unmittelbaren 5'-Ende der 16S rRNA gibt es Positionen, die bei Anwesenheit des Leaders nicht zugänglich sind. Dies gilt auch bei Anwesenheit des mutierten Leaders. An zwei Positionen (G6 und G21) gibt es in Anwesenheit der Proteine eine deutliche proteinvermittelte Protektion.
- In den Helices 16 und 17 sind in der assemblierten 5'-Region bei allen drei Partikelformen starke proteinabhängige Protektionen im zentralen Bereich der S4-Bindung nachweisbar, was für eine effiziente S4-Bindung in allen drei Partikeln spricht. Die starken Strukturabbrüche am äußeren Ende von Helix 17, die in Anwesenheit der Proteine im Falle des mutierten Leaders schwächer ausfallen, stehen in guter Übereinstimmung mit den Protein-Analysen, bei denen S16 im Falle der Mutante ebenfalls eine verringerte Bindung zeigt.

Einen möglichen Erklärungsansatz für die Leaderwirkung auf die 3'-bindenden Proteine lieferten die Strukturuntersuchungen in der frühen 3'-Region der assemblierten Vollängentranskripte. Die dort temperaturabhängige Zunahme der Zugänglichkeit von G922 in den freien RNAs könnte auf einen destabilisierenden Effekt beider Leaderformen auf die Helix 28 hinweisen. Dieser könnte zu einer Destabilisierung der gesamten 3'-Region und damit zu einer Verschlechterung der Proteinbindung führen.

## 2.7 Die Leaderwirkung: auch eine Frage des Timings ?

Ein wichtiger Aspekt der Ergebnisse aus den strukturellen Untersuchungen der assemblierten Partikel ist zum Beispiel, daß mehrere Guanosine am Anfang der 5'-Domäne bei Leaderpräsenz nicht modifiziert werden. Da die gleichen Positionen in Abwesenheit des Leaders zugänglich sind, spricht dies für einen neuen, noch nicht bekannten Bereich direkter Interaktion zwischen Leader und 16S rRNA. Diese Kontakte wurden bei allen untersuchten Temperaturen beobachtet, was für eine sehr stabile Wechselwirkung spricht.

Weiterhin werden diese Kontakte auch durch die Anwesenheit der übrigen Regionen (zentrale und 3'-Region) der 16S rRNA nicht beeinflusst, so daß die Interaktion des Leaders am nahen 5'-Ende offensichtlich folgende Eigenschaften besitzen muß:

1. Die Wechselwirkung besitzt zwischen den Positionen G6 und G22 eine hohe Stabilität, da sie bei allen Temperaturen und auch in Anwesenheit der zentralen und 3'-Region erhalten bleibt.
2. Sie erfolgt in einem Bereich, in dem im späteren Faltungsverlauf der strukturell wichtige zentrale Pseudoknoten ausgebildet werden muß. Selbst bei Anwesenheit aller dazu notwendigen Sequenzen wird die Interaktion mit dem Leader der Wechselwirkung mit der komplementären Sequenz der 3'-Region schon bei 12°C in der assemblierten Volllänge vorgezogen. Da dem System bei dieser Temperatur nur wenig Energie zur Verfügung steht, könnten diese Eigenschaften für eine Wechselwirkung sprechen, die zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Faltung ausgebildet wird.

Im Laufe der Prozessierung bildet der Leader mit dem 3'-seitig hinter der 16S rRNA liegenden Spacer-Bereich das Signal für den initialen Schnitt des ersten Enzyms dieser Reaktionskaskade. Somit ist er im reifen 30S Partikel *in vivo* nicht mehr präsent. Wie in Komplexbildungsanalysen gezeigt wurde, besitzen die Interaktionen des Leaders mit dem Spacer-Bereich eine höhere Stabilität, als die Wechselwirkungen mit Sequenzen innerhalb der 5'-Domäne der 16S rRNA, (Besançon *et al.*, 1999). Daraus ergibt sich, daß die Interaktionen zwischen Leader und 16S rRNA von transienter Natur sein müssen und der Strukturbildung im zeitlichen Ablauf nur ein begrenztes Zeitfenster zur Verfü-

gung steht. Spätestens, wenn im Verlauf der Transkription der Spacer-Bereich als Interaktionspartner zur Verfügung steht, wird die Wechselwirkung mit der 5'-Region der 16S rRNA, bedingt durch die geringere Affinität, aufgehoben.

Die bisherigen Experimente konnten nur Aufschlüsse über den Endzustand der Leader-bedingten Einflüsse auf die Strukturierung der Partikel geben. Die initialen Schritte des Faltungsvorgangs blieben bisher unbeachtet. Die bei den jeweiligen Rekonstitutionstemperaturen ausgebildeten Strukturen befanden sich alle, bedingt durch den Reaktionszeitraum von einer Stunde, in einem thermodynamischen Gleichgewicht. Besançon konnte zeigen, daß der Leader ebenfalls Einfluß auf die Geschwindigkeit der Bildung einzelner Helices in der 16S rRNA hat. Unter anderem ließ sich so ein deutlicher Einfluß auf die Bildung der Helix 6 nachweisen.

Kinetische Analysen der 16S rRNA-Faltung in An- und Abwesenheit des Leaders sollten somit Aufschluß darüber geben können, ob der Leader auch den zeitlichen Ablauf der Strukturbildung einzelner untersuchter Bereiche der 16S rRNA beeinflussen kann. Mit anderen Worten:

Beruhet die Auswirkung des Leaders während der Assemblierung auf der Ausbildung und Stabilisierung alternativer Strukturen oder können die beobachteten Befunde auch zum Teil das Ergebnis von kinetischen Einflüssen sein?

Dieses Experiment sollte zudem zeigen, ob die sehr stabilen Leader-Interaktionen am 5'-Ende der 16S rRNA tatsächlich schon zu einem frühen Zeitpunkt der Faltung stattfinden.

Auch die Modulation der Leaderwirkung durch die 3'-Region, die sich sowohl bei der Bindung der Proteine als auch bei der Strukturbildung der Partikel nachweisen ließ, sollte bei der kinetischen Analyse berücksichtigt werden. Aus diesem Grund wurden die Faltungsstudien mit beiden Transkriptlängen (isolierte 5'-Region und 16S-Volllänge) durchgeführt.

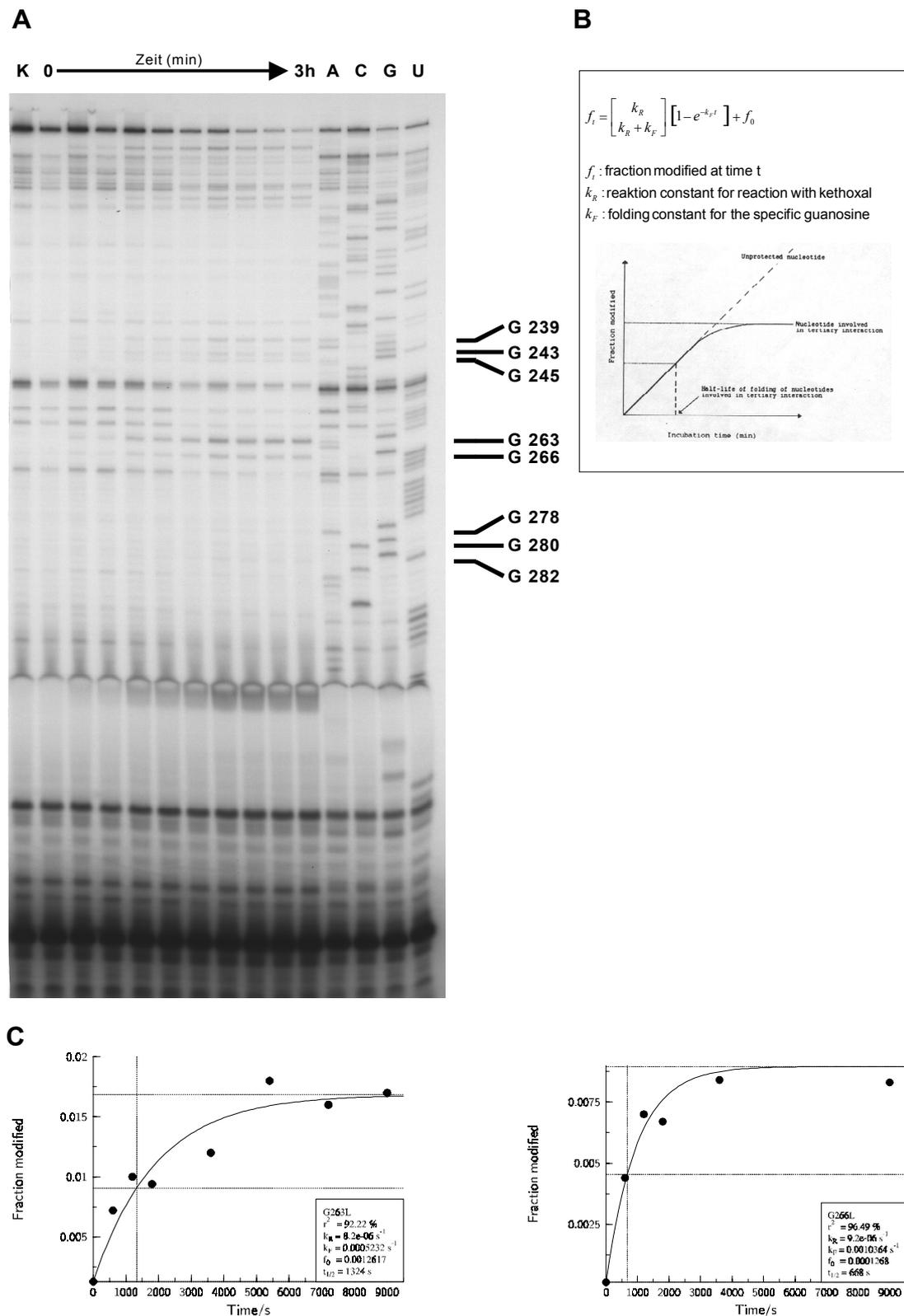
### 2.7.1 Die Methode

Eine von Banerjee *et al.*, 1995 zur Faltungsanalyse von Ribozymen entwickelte Methode wurde für diese Untersuchungen an die experimentellen Bedingungen angepaßt. Mit diesem Verfahren kann die Magnesium-induzierte Faltung einer katalytischen RNA in Anwesenheit von Kethoxal analysiert werden. Die zu untersuchende RNA wird während der Faltung durch Kethoxal modifiziert. Zu bestimmten Zeitpunkten werden Aliquots entnommen. Die darin enthaltene modifizierte RNA wird durch Zugabe von eiskaltem Ethanol gefällt und so die Modifikationsreaktion gestoppt. Ein Anteil unmodifizierter RNA muß somit auch am Ende des Meßzeitraums noch vorliegen, um eine Übermodifikation ausschließen zu können.

Nach einer „Primer Extension“-Analyse zur Identifikation der modifizierten G's bestimmt man den Anteil der jeweiligen Abbruchbande im Verhältnis zur Gesamtaktivität für jeden Zeitpunkt und trägt diese Werte gegen die Zeit auf. Im Idealfall beschreibt der resultierende Kurvenverlauf eine der folgenden Möglichkeiten, die das Faltungsverhalten des jeweiligen Guanosins in seiner Umgebung repräsentieren.

1. Der Anteil des „Primer Extension“-Signals nimmt über die Zeit linear zu. Dies bedeutet, daß das Guanosin über den gesamten Meßzeitraum zugänglich bleibt. Damit befindet sich das Guanosin an einer Position, die über den Zeitraum des Experimentes ungepaart bleibt.
2. Der Anteil des „Primer Extension“-Signals erreicht über die Zeit eine Sättigung. In diesem Falle ist das Guanosin an Faltungsvorgängen beteiligt und wird im Verlauf der Zeit der Modifizierung durch Kethoxal entzogen. Dieser Ablauf würde bei der Beteiligung des Guanosins an Sekundär- und Tertiärstrukturbildung vorliegen.

Diese Methode erlaubt, im Gegensatz zur Untersuchung von Helixbildung durch Hybridisierungsexperimente eine genaue Analyse der strukturellen Entwicklung einzelner Nukleotid-Positionen und ist damit im Auflösungsvermögen um Einiges empfindlicher.



**Abb. 2.10: Datenanalyse der Kethoxal-Kinetiken.** Diese Abbildung verdeutlicht die Auswertung der zeitabhängigen Modifikation ribosomaler RNA-Transkripte während ihrer Renaturierung. **(A)** Primer Extension-Analyse der im Zeitrahmen von 3 Stunden entnommenen Proben. K: unmodifizierte Kontrolle. Die Positionen der modifizierten Guanosine wurden durch Sequenzierung zugeordnet (A, C, G, U). **(B)** Schema des Kurvenverlaufes der nach Banerjee entwickelten Formel. Eine Gerade kennzeichnet ein nicht in Tertiärstrukturbildung involviertes Guanosin. Der Verlauf einer Sättigungskurve signalisiert eine Beteiligung an Tertiärstrukturbildung. **(C)** Plots der quantifizierten Meßwerte von G263L und G266L aus der in A dargestellten Primer Extension. Die durch die Meßwerte gelegte Kurve wurde unter Verwendung der ermittelten Werte mit Hilfe der Formel **(B)** berechnet.

Ein grundlegender Aspekt dieses Verfahrens ist die Tatsache, daß im Zeitfenster der Messung nicht die gesamte RNA modifiziert werden darf. Es muß darauf geachtet werden, daß die Modifikation unter „single-hit“-Bedingungen erfolgt, d. h. jedes RNA-Molekül darf im statistischen Mittel nur an einer Position modifiziert werden. Ist dies nicht der Fall, kann die experimentell bestimmte Kurve im Falle einer Faltung nicht allein auf den Schutz vor der Modifizierung des Guanosins durch die Helixbildung zurückgeführt werden. Dann wäre es auch möglich, die Kurve durch eine Übermodifikation aller Moleküle zu erklären.

Der Ablauf der Datengewinnung ist auf der **Abbildung 2.10** noch einmal exemplarisch dargestellt. In der linken oberen Ecke ist die „Primer-Extension-Analyse“ der Leader-Region abgebildet. Bei dem hier untersuchten Transkript handelt es sich um das Vollängentranskript mit mutiertem Leader. Über der Abbildung sind die Spuren wie folgt gekennzeichnet: links befindet sich die unmodifizierte Kontrolle (K). Anschließend folgen die zu definierten Zeiten entnommenen modifizierten Proben (0 bis 3 Stunden). Rechts befindet sich die Sequenzierung zur Bandenzuordnung. Im Kasten rechts oben ist die Formel nach Banerjee (1995) mit ihren Variablen angegeben. Aus den für jedes ausgewertete Guanosin durch Quantifizierung erhaltenen Werten, wurden unter Verwendung dieser Formel die Reaktionskonstante für Kethoxal  $k_R$ , die Faltungskonstante  $k_F$ , sowie die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  berechnet. Der so ermittelte Kurvenverlauf ist am Beispiel der Guanosine G263 und G266 im unteren Bereich der Abbildung dargestellt.

Da es sich im Gegensatz zu den von Banerjee untersuchten kurzen Ribozymmolekülen in diesem Experiment um lange RNA-Moleküle mit hoher Komplexität handelt, die in ihrer nativen Form auch Tertiärstrukturen ausbilden, mußten die experimentellen Bedingungen angepaßt werden. So konnte die Faltung nicht durch Zugabe von Magnesium gestartet werden. In diesem System wurde die in Anwesenheit von Magnesium erfolgende Rückfaltung eines denaturierten Transkriptes durch Kethoxalmodifikation beobachtet. Vorexperimente ergaben, daß der Faltungszeitraum einiger Positionen, bedingt durch die Tertiärstrukturbildung wesentlich größer war, als bei den von Turner publizierten Daten für das Ribozym. Da die Bildung von Tertiärstrukturen in

der Regel erst nach der Ausbildung von Sekundärstrukturen erfolgt, läßt sich dieser lange Zeitraum auch durch wiederholte Umlagerung in koexistierende Strukturen erklären. Die Anwesenheit von Magnesium-Ionen trug als ein für Tertiärstrukturbildung unerlässlicher Faktor zur Verlängerung des Messzeitraums bei. Experimente in Abwesenheit von Magnesium bestätigten den gerade beschriebenen Befund, daß mit Ausschaltung der Tertiärstrukturbildung die Faltungszeiten erheblich verkürzt werden konnten. Bei Magnesium-Abwesenheit konnte somit nur noch die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen erfolgen.

Die nachfolgenden Experimente mußten in Anwesenheit von Magnesium durchgeführt werden, da zur nativen Strukturbildung der 16s rRNA die Anwesenheit von Magnesium essentiell ist.

Als etwas schwierig erwies sich die genaue Abstimmung des Verhältnisses der Kethoxalkonzentration zu der eingesetzten RNA. Die in eine Faltungsreaktion eingesetzte Gesamtmenge an RNA wurde so gewählt, daß mit jedem Aliquot die gleiche zur Primer Extension benötigten Menge vorlag. Eine Menge von 1,75 µg RNA pro Aliquot ergab gut sichtbare Signale in der Primer Extension. Die Kethoxalkonzentration mußte so gewählt werden, daß einerseits auch nach 3 Stunden noch unmodifizierte RNA im Reaktionsgemisch vorlag, um eine Übermodifikation ausschließen zu können. Andererseits mußte sie hoch genug sein, um nach dem Start der Reaktion so früh wie möglich die Zugänglichkeiten bestimmen zu können. Die verwendete Kethoxalkonzentration wurde durch Konzentrationsreihen mit konstantem RNA-Anteil auf die erforderlichen Randbedingungen optimiert.

## **2.8 Kinetische Faltungsanalyse der isolierten 5'-Region**

Die kinetischen Faltungsanalysen liefern Informationen, die in zweierlei Hinsicht Aussagen über die strukturelle Umgebung der untersuchten Guanosine erlauben.

1. Der Kurvenverlauf selbst läßt Rückschlüsse darüber zu, ob sich z.B. die Umgebung des Guanosins durch einen veränderten Faltungsverlauf in Anwesenheit des Leaders ändert. Eine Helix, in der sich das untersuchte

Guanosin im gefalteten Leader-freien Transkript befindet, könnte durch die Anwesenheit des Leaders in einen offenen, einzelsträngigen Bereich umgewandelt werden. Der Kurvenverlauf des Guanosins würde statt der für eine Helix typischen Sättigungskurve nun einer Geraden entsprechen.

- Die aus dem Kurvenverlauf errechnete Halbwertszeit der Strukturbildung läßt Aussagen über die Bildungsgeschwindigkeit der Umgebung des untersuchten Guanosins zu. Eine Erhöhung der Halbwertszeit an einer bestimmten Position in Anwesenheit des Leaders deutet z. B. auf eine verlangsamte Strukturbildung in diesem Bereich hin. Die Halbwertszeiten der Strukturfindung mehrerer Guanosine in räumlicher Nähe können so den Einfluß der Faltung in dem betreffenden Bereich durch den Leader illustrieren.

In der **Tabelle 2.12** sind die Strukturbildungszeiten der in den Faltungsstudien erfaßten Guanosine für die isolierte 5'-Region aufgeführt. Die Faltungszeiten sind in Minuten angegeben. Der Zeitbereich aller erfaßten Positionen wurde in sechs Zeitfenster unterteilt, um den Faltungsverlauf der Guanosine bezüglich

der Tertiärstrukturbildung zu charakterisieren. Kurze Faltungszeiten zeigen eine rasche Strukturbildung des entsprechenden Guanosins. Je länger die Faltungszeiten werden, desto länger dauert es, bis die endgültige räumliche Anordnung gefunden ist. Längere Faltungszeiten können aber auch ein Indiz für die Zunahme der strukturellen Komplexität sein. Je länger die Faltungszeiten werden, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit, daß während des Faltungsablaufs bereits gebildete Strukturen zugunsten anderer aufgelöst werden. Im Faltungsverlauf eines Guanosins mit einer langen Halbwertszeit können somit wiederholte strukturelle Umlagerungen erfolgt sein, bis die endgültige Struktur erreicht worden ist. Die längeren Faltungszeiten gehen mit einem Abflachen des Kurvenverlaufes einher. Die Unterteilung der Halbwertszeiten erfolgte durch die Analyse der gefitteten Kurven (siehe Anhang A.4). Die Kurven wurden durch Vergleich in sechs Zeitfenster unterteilt:



**Tab. 2.11:** Einteilung der Strukturbildungszeiten der erfaßten Guanosine in sechs Zeitfenster.

Jedes Zeitfenster wird durch eine Farbe symbolisiert, mit der die in den **Tabellen 2.12** und **2.13** aufgeführten Faltungshalbwertszeiten dem entsprechenden Zeitfenster zugeordnet wurden. Dabei wurde die Farbskala dem Verlauf einer Wärmeskala angeglichen. Helle Farben bedeuten hier kurze Halbwertszeiten der Faltung. Je dunkler die Farbe wird, desto länger wird auch die Halbwertszeit der Faltung (**Tab 2.11**).

Nukleotid	614	614Lwt	614Lmu
G263L		25	18
G266L		1	15
G6	9	9	1
G9	10	nicht zugl.	nicht zugl.
G15	8	nicht zugl.	nicht zugl.
G21	13	14	6
G22	14	nicht zugl.	nicht zugl.
G31	23	37	17
G38	offen	offen	22
G41	20	offen	16
G42	22	39	10
G45	29	44	11
G428	39	3	30
G433	offen	17	38
G453	8	24	22
G454	27	40	38
G521	19	39	11
G524	12	15	30
G527	18	26	34
G530	17	31	31
G548	26	53	53
G550	28	87	69
G557	11	27	30
G558	20	36	26

**Tab. 2.12: Strukturbildungszeiten der bei den Transkripten der isolierten 5'-Region vermessenen Guanosine.** Die Einteilung der experimentell bestimmten Zeiten in sechs Zeitfenster erfolgt von sehr schneller Faltung (grün) bis zu sehr langsamer Faltung (dunkelblau). Positionen, die nicht in Strukturbildung involviert sind, sind mit „offen“ gekennzeichnet. Positionen, die in Anwesenheit beider Leader nicht modifiziert werden konnten, sind mit „nicht zugänglich“ gezeichnet. Das Leader-freie verkürzte Transkript ist mit 614 bezeichnet, 614Lwt kennzeichnet das verkürzte Transkript, inklusive des Wildtyp-Leaders. Das Transkript mit dem mutierten Leader trägt die Bezeichnung 614Lmu.

Die Faltungsanalyse zeigt einige Positionen, an denen die Faltungszeiten für beide Leaderderivate im gleichen Zeitfenster liegen, sich jedoch deutlich von denen der Leader-freien Kontrolle unterscheiden (G453, G454, G530, G548, G550 und G557). An diesen Positionen wird die Faltung durch beide Leaderformen im gleichen Maße verlangsamt. Das bedeutet, daß diese Einflüsse auf

die reine Anwesenheit des Leaders zurückzuführen sind und nicht als Auswirkung der Mutationen gedeutet werden können.

Deutliche Hinweise für den Einfluß der Punktmutationen auf die Faltungsdauer finden sich an den Positionen G6, G21, G38 und G524. An diesen Positionen unterscheiden sich die Faltungszeiten der Mutante von denen des Wildtyps und der Leader-freien Kontrolle. Bis auf G524 sorgt der mutierte Leader an den übrigen drei Positionen für eine Beschleunigung der Faltungszeit. Lediglich bei G524 verlangsamt er die Faltung.

Da die Positionen G42 und G45 an den beiden Randbereichen der Helix 4 der 16S rRNA liegen, können Faltungszeiten an diesen Positionen zeigen, daß der Wildtyp-Leader die Faltung dieses Bereiches verlangsamt, während die Mutante eine schnellere Faltung an G42 und G45 katalysiert. Aus den Kurvenverläufen, welche im Anhang (A.4) dargestellt sind, wird ersichtlich, daß sich beide Positionen im Falle der Leader-freien Kontrolle in einer strukturierten Umgebung befinden. Dies trifft auch für die Mutante zu. Im Falle des Wildtyps hingegen scheint der Leader für eine wesentlich offenere Strukturierung dieses Bereiches zu sorgen.

Das Experiment kann außerdem die wichtige Frage nach der Geschwindigkeit der stabilen Wechselwirkung des Leaders mit dem nahen 5'-Ende der 16S rRNA klären. Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, sind die Positionen G9, G15 und G22 in Anwesenheit von Leadersequenzen nicht zugänglich. In diesem Experiment konnten die Zugänglichkeiten zeitaufgelöst untersucht werden. Da sich bei beiden Leader-haltigen Transkripten die Zugänglichkeiten dieser Positionen nicht bestimmen lassen, muß die Interaktion am 5'-Ende der 16S rRNA sehr schnell erfolgen. Alternativ kann dieser Bereich auch unter den denaturierenden Bedingungen gar nicht aufschmelzbar sein, was ebenfalls ein Indiz für eine hohe strukturelle Stabilität wäre.

Die kinetische Analyse zeigen, daß sich der Einfluß der Leadersequenz in der isolierten 5'-Region sowohl am nahen 5'-Ende als auch im zentralen Bereich der S4-Bindung präsentiert (vergleiche Positionen, an denen Wildtyp-Leader und Mutante gleiche Faltungszeiten zeigen). Die Einflüsse der Mutante hingegen konzentrieren sich, mit Ausnahme von G524, auf das nahe 5'-Ende. Weiterhin scheint die Mutante die Faltung im Bereich des nahen 5'-Endes über-

wiegend zu beschleunigen, wohingegen der Wildtyp-Leader eher für einen langsameren Ablauf des Faltungprozesses verantwortlich ist.

## 2.9 Kinetische Faltungsanalyse der Volllänge

Da in den bisherigen Experimenten eine eindeutige Abhängigkeit zwischen der Leaderfunktion und der anwesenden 3'-Region beobachtet wurde, sollte die kinetische Faltungsanalyse der Volllänge unter anderem Aufschluß darüber geben, ob sich die Faltungszeiten in der 3'-Region ebenfalls durch den Leader beeinflussen lassen. Da in der Volllänge auch die Ausbildung des zentralen Pseudoknotens erfolgen kann und dieser im Einflußbereich des Leaders liegt, wäre eine Analyse der Faltungszeiten in diesem wichtigen Strukturelement äußerst aufschlußreich.

Die Faltungszeiten der in der vollständigen 16S rRNA untersuchten Positionen sind in **Tab. 2.13** aufgeführt. Die Unterteilung der ermittelten Werte in Zeitfenster und die damit verbundene Farbskalierung erfolgte analog zu den Daten der isolierten 5'-Region (**Tabelle 2.12**).

Die Faltungszeiten erhöhen sich erwartungsgemäß durch die höhere Komplexität der Volllänge. Der Einfluß des Leaders zeigt sich an den Positionen G404, G550, G557 und G558, da sich hier die Faltungszeiten der beiden Leader-haltigen Transkripte von der Leader-freien Kontrolle unterscheiden.

Im Gegensatz zur isolierten 5'-Region gibt es beim Vergleich mit der Volllänge auch Positionen, die sich in allen drei Transkripten im

Nukleotid	16S	16SLwt	16SLmu
G263L		37	22
G266L		23	11
G6	39	21	37
G9	13	nicht zugl.	nicht zugl.
G15	25	nicht zugl.	nicht zugl.
G21	16	37	76
G22	27	nicht zugl.	nicht zugl.
G31	59	offen	13
G38	offen	47	11
G42	20	19	18
G45	89	68	offen
G46	22	9	2
G404	offen	33	32
G406	14	20	17
G410	36	42	29
G413	44	24	20
G428	30	27	14
G433	15	offen	44
G453	offen	offen	11
G454	offen	71	offen
G548	62	65	55
G550	44	56	62
G557	20	43	41
G558	30	51	55
G902/903	18	33	18
G917	36	19	39
G922	25	70	39
G942	26	23	21
G951	91	88	75
G953	80	offen	70
G954	offen	offen	offen

**Tab. 2.13: Strukturbildungszeiten der bei den Vollängen-Transkripten vermessenen Guanosine.** Farbschema und Bezeichnungen entsprechen der in Tabelle 2.11 verwendeten. Da hier die Vollängentranskripte untersucht wurden, tragen diese die Bezeichnung 16S.

gleichen Zeitbereich der Faltung befinden. Dies sind G42 und G45, G406, G454, G548, G942, G951, G953 und G954. G42 und G45 zeigten in der isolierten 5'-Region hingegen bei allen drei Transkripten ein differenziertes Faltungsmuster. Somit scheint die Präsenz der 3'-Region die kinetischen Einflüsse der beiden Leader-Derivate an diesen Positionen zu unterbinden. Während G454 und G548 im verkürzten Transkript den gemeinsamen kinetischen Einfluß beider Leadersequenzen zeigen, hat keine der beiden Leadersequenzen einen Einfluß auf diese Positionen bei der Faltung der Vollängentranskripte.

Das Fehlen von Unterschieden an G951-954 könnte belegen, daß der Leaderbereich keinen Einfluß auf den zeitlichen Ablauf der Faltung von Sequenzen in dem Pseudoknoten nahen Bereichen der 3'-Domäne hat.

G31, G410, G428 und G453 sind Positionen, an denen sich die Mutante von den anderen beiden Formen unterscheidet. Die leader-freie Volllänge und die Volllänge mit dem Wildtyp-Leader zeigen an diesen Positionen Faltungszeiten im gleichen Zeitfenster, während die Faltung der Mutante an diesen Positionen in anderen Zeitbereichen abläuft. Der Einfluß der Mutationen wird hier durch eine schnellere Faltung sichtbar.

G917 liegt im zentralen Pseudoknoten und zeigt im Falle des Wildtyp-Leaders einen deutlich schnelleren Faltungsverlauf, während diese Position im Falle der Leader-Mutante keinen Unterschied zur Leader-freien Kontrolle zeigt. Interessanterweise führt die Anwesenheit des Wildtyp-Leaders an den Positionen G902/G903, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft des Pseudoknotens befinden, zu einer deutlich langsameren Faltung, während sich Mutante und Leader-freie Kontrolle auch an diesen Positionen gleichen.

Der zeitliche Ablauf der Strukturbildung des zentralen Pseudoknotens wird durch den Wildtyp-Leader beschleunigt. Die Strukturbildung in der benachbarten Helix 27 hingegen wird durch den Wildtyp-Leader stark verlangsamt, bzw. die Positionen G902/G903 bleiben zugänglich und sind nicht in die Strukturierung involviert.

Auch in der Volllänge zeigt sich die schnelle Wechselwirkung des Leaders am nahen 5'-Ende. Die in der 5'-Region betroffenen Positionen G9, G15 und G22

sind ebenfalls nicht zugänglich. Somit kann die rasche Interaktion beider Leaderformen mit dem unmittelbaren 5'-Ende der 16S rRNA auch durch die Anwesenheit der 3'-Region nicht unterbunden werden. Auch in der Volllänge scheint der mutierte Leader also für eine schnellere Faltung an vielen Positionen zu sorgen, wohingegen der Einfluß des Wildtyp-Leaders wie auch in der isolierten 5'-Region zu einer langsameren Faltung in einigen Bereichen führt.

### 2.9.1 Zusammenfassung der Ergebnisse aus den kinetischen Analysen

- Sowohl bei den verkürzten Transkripten als auch bei der Volllänge sind die Faltungszeiten am 5'-Ende bei beiden Transkriptlängen im Mittel kürzer und zum 3'-Ende hin tendenziell länger. Dies weist auf eine Faltungspolarität hin, die demnach nicht nur bei naszierenden Transkripten auftritt, sondern hier auch bei fertigen *in vitro*-Transkripten zu beobachten ist.
- Der Leader zeigt an vielen Positionen einen Einfluß auf die Faltungszeit. Dabei sorgt der Leader an ca. 50% der Positionen in der isolierten 5'-Region für eine Verlangsamung der Faltung. Dies ist sowohl bei der isolierten 5'-Region als auch bei der Volllänge der Fall. Bei der Volllänge konzentriert sich der verlangsamende Effekt des Leaders auf Bereiche der zentralen und der 3'-Region.
- Die Anwesenheit der Mutante führt vermehrt an Positionen am nahen 5'-Ende und im zentralen Bereich der S4-Bindung zu einer schnelleren Faltung. Dieser beschleunigende Effekt läßt sich sowohl bei der isolierten 5'-Region, als auch in etwas eingeschränkter Form, bei der Volllänge beobachten. Bei der Volllänge wird der begünstigende Einfluß der Mutationen im Bereich des nahen 5'-Endes der 16S rRNA im Vergleich zur isolierten 5'-Region jedoch an mehreren Positionen unterbunden. Die kürzeren Faltungszeiten bei Anwesenheit des mutierten Leaders lassen sich hier erst ab Position G31 beobachten.
- Die Position G917 im zentralen Pseudoknoten wird nur durch den Wildtyp-Leader kinetisch beeinflusst. Die Leader-freie Kontrolle und die Mutante zeigen lange Faltungszeiten, während der Wildtyp-Leader den Faltungsablauf stark beschleunigt.

- Helix 27, vor dem zentralen Pseudoknoten wird durch den Wildtyp-Leader entgegengesetzt beeinflusst. In diesem Bereich zeigen die leader-freie Kontrolle und die Mutante beide kurze Faltungszeiten im gleichen Zeitbereich, während der Wildtyp-Leader den Faltungsablauf in diesem Bereich verzögert.

### 3 Diskussion

#### 3.1.1 bereits bekannte Leader-Informationen

Die 5'-seitig der 16S rRNA kotranskribierte Leadersequenz ist an verschiedenen Abschnitten des Reifungsprozesses der ribosomalen 30S Untereinheiten beteiligt. Die Leadersequenz enthält *nut*-ähnliche Sequenzen (BoxB, BoxA und BoxC), die beim Phagen  $\lambda$  wichtige Elemente der Antitermination darstellen. Zum Beispiel konnte Theißen *et al.* (1990b) zeigen, daß die BoxA ein wichtiges regulatorisches Element bei der Biogenese funktioneller 30S Untereinheiten darstellt. Wird die BoxA durch eine nicht-funktionelle Sequenz ersetzt, so führt dies zu einer drastischen Verringerung an ribosomalen 30S Untereinheiten in den Zellen.

Leadersequenzen sind ebenfalls an der Prozessierung der ribosomalen RNAs beteiligt. Die zur Ribosomensynthese notwendigen RNAs werden als 30S Vorläufertranskript synthetisiert. Aus dem Vorläufertranskript werden die ribosomalen RNAs durch die Beteiligung mehrerer endonukleolytischer Nukleasen hergestellt. Ein Teil der Leadersequenz bildet dabei mit dem downstream der 16S rRNA liegenden Spacerbereich das Signal für den ersten nukleolytischen Schnitt durch das Enzym RNase III (King *et al.*, 1983; 1986).

Eine weitere, wichtige regulatorische Funktion der Leadersequenzen sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Leadersequenzen haben die Aufgabe, bei der Strukturfindung der 16S rRNA zu assistieren. Dies erfolgt in Form transienter Wechselwirkungen, die bei den ersten Faltungsschritten der 5'-Region eine chaperonartige Hilfestellung geben können. Die direkte Wechselwirkung zwischen Leader und 16S rRNA (Pardon *et al.*, 1995), sowie die Auswirkung von Mutationen im Leaderbereich, die zur Ausprägung eines kälte-sensitiven Phänotyps führen (Theißen, *et al.*, 1993), waren zu Beginn dieser Arbeit bekannt. Während die Experimente dieser Arbeit durchgeführt wurden, konnte von Balzer gezeigt werden, daß sich unter Beteiligung der Leader-Mutation die 16S rRNA gereifter 30S Untereinheiten an vielen Positionen strukturell von Wildtyp-30S Untereinheiten unterscheidet (Balzer *et al.*, 1998). Weiterhin wurde von Besançon eine direkte Bindung der 16S rRNA durch den Leader nur in der 5'-

Region der 16S rRNA gefunden. Er konnte ebenfalls belegen, daß die Faltungszeiten einiger interner 16S rRNA-Helices durch den Leader beeinflusst werden (Besançon *et al.*, 1999).

### **3.1.2 Ziele dieser Arbeit**

In dieser Arbeit sollten die Einflüsse von mutierten Leader-Regionen auf die Faltung der 16S rRNA und die Assemblierung der kleinen ribosomalen 30S Untereinheit genauer charakterisiert werden. Dazu wurden folgende experimentelle Schritte unternommen:

1. Die Proteinzusammensetzung in Gegenwart des Leaders assemblierter Partikel wurde untersucht. Die Assemblierungsstudien wurden mit Leader-haltigen und Leader-freien 16S rRNA-Transkripten durchgeführt. Sowohl Transkripte mit der gesamten 16S rRNA (1541 Nukleotide) als auch Teiltranskripte, bestehend aus den ersten 614 Nukleotiden, wurden in Gegenwart des Wildtyp-Leaders oder der mutierten Form bei verschiedenen Temperaturen assembliert.
2. Die RNA-Struktur der bei den verschiedenen Temperaturen assemblierten Partikel wurde durch chemische Modifikation mit Kethoxal untersucht.
3. Die Rückfaltung von 16S rRNA-Transkripten wurde in Gegenwart der Leader-Regionen analysiert.

### **3.1.3 Erwartungen an die experimentellen Befunde**

Unter Berücksichtigung der bereits über Leader-rRNA-Mutanten gewonnenen Erkenntnisse, waren folgende Befunde zu erwarten:

1. Der Wildtyp-Leader besitzt eine Chaperonfunktion, daß heißt er übernimmt die Rolle eines Faltungshelfers. Demzufolge sollte die Gegenwart des Wildtyp-Leaders Faltungsschritte der 16S rRNA erleichtern und damit die Assemblierung begünstigen.
2. Mutationen in der  $t_L$ -Region stören die 30S-Biogenese und führen *in vivo* zu defekten Ribosomen. Daraus läßt sich schließen, daß die mutierte Leader-RNA bei *in vitro* durchgeführten Assemblierungsreaktionen im Gegensatz zum Wildtyp-Leader ebenfalls die Partikelbildung stören sollte.

3. Außerdem ist bekannt, daß der negative Einfluß der  $t_L$ -Mutationen *in vivo* bei Temperaturen oberhalb von 37°C nachläßt. Dieser Befund läßt vermuten, daß bei höheren Temperaturen die entsprechenden Aktivierungsenergien zur Verfügung stehen um eventuelle Fehlfaltungen und dadurch verursachte Assemblierungsdefekte verhindern zu können. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen muß jedoch berücksichtigt werden, daß entgegen der Situation *in vivo*, bei der ein sich ständig verlängerndes RNA-Transkript entsteht, hier RNA-Moleküle von definierter Länge eingesetzt wurden. Daher ist nicht von vornherein klar, ob die Erwartungen aus den *in vivo* Beobachtungen auch durch die *in vitro* Analysen erfüllt werden. Tatsächlich zeigen die hier gewonnenen Ergebnisse ein relativ komplexes Bild.

### **3.2 Analyse der Assemblierung von Partikelvorstufen**

#### **3.2.1 Für eine Partikelanalyse sind bestimmte experimentelle Voraussetzungen zu erfüllen**

Die *in vitro*-Rekonstitution ribosomaler Partikel wurde erstmals von Held und Nomura 1973 durchgeführt. Aus isolierter 16S rRNA und freien ribosomalen Proteinen können, in einem ohne zusätzliche Faktoren ablaufenden Prozeß, ribosomale Untereinheiten *in vitro* hergestellt werden, die funktionell reifen 30S Untereinheiten entsprechen. Dieses System bot die Möglichkeit, die Leaderwirkung entkoppelt von der Transkription zu untersuchen. Bei der Analyse mußte jedoch berücksichtigt werden, daß sich strukturelle Einflüsse, die *in vivo* durch die Polarität der Transkription vermittelt werden, bei der *in vitro*-Rekonstitution nicht ausgeprägt werden, da nur vollständige Transkripte assembliert werden konnten. Den veränderten Bedingungen gegenüber der *in vivo* Partikelbildung wurde durch hohe Salzkonzentrationen, der Anwesenheit von 10 mM  $Mg^{2+}$  und einem Temperaturschritt von 40°C Rechnung getragen. Eine Kopplung von Transkription und Assemblierung *in vitro* konnte bis jetzt noch nicht zufriedenstellend etabliert werden (Diplomarbeit M. Hinz, 1992).

Da der Leader offensichtlich nur mit der 5'-Region der 16S rRNA in direkten Kontakt tritt, erschien die Assemblierung einer isolierten 5'-Region der 16S rRNA in Anwesenheit der jeweiligen Leadersequenz (Wildtyp oder Mutante) lohnenswert. Während der Transkription der 16S rRNA kann der Leader schon mit der fertig transkribierten 5'-Region interagieren, wenn die Sequenzen der zentralen und der 3'-Region noch nicht synthetisiert wurden.

Um die für die Experimente notwendigen Transkriptmengen zu erhalten, mußte ein Transkriptionssystem mit einer prozessiven Phagen-Polymerase verwendet werden. Durch eine höhere Transkriptionsgeschwindigkeit wird jedoch die Transkriptfaltung nachhaltig beeinflusst. Für eine verlässliche Analyse der Leadereffekte mußte also sichergestellt sein, daß die höhere Transkriptionsgeschwindigkeit keinen strukturellen Einfluß auf die zu assemblierenden Transkripte hat. Deshalb wurden die Transkripte einem Denaturierungsschritt unterzogen. Die Renaturierung erfolgte erst in Anwesenheit der ribosomalen Proteine.

### **3.2.2 Die isolierte 5'-Region der 16S rRNA läßt sich *in vitro* assemblieren**

Die Ergebnisse zeigten, daß auch durch T7-RNA-Polymerase *in vitro* transkribierte 16S rRNA oder deren Teilfragmente assembliert werden können. Zur Beurteilung der Assemblierungsqualität der Teiltranskripte mit der isolierten 5'-Region und zur Zuordnung von Leader-vermittelten Effekten wurde ein leader-freies Transkript mit 16S rRNA gleicher Länge als Referenz verwendet.

Die assemblierte 5'-Region wies in allen drei Derivaten (ohne Leader, Wildtyp-Leader und Mutante) die potentiell bindenden ribosomalen Proteinen auf. Von den in dieser Region bindungsfähigen Proteinen S4, S5, S16, S17 und S20, konnten bis auf S5 alle Übrigen detektiert und auf zweidimensionalen Gelen zugeordnet werden. Das Fehlen von S5 ist dadurch erklärbar, daß im Teiltranskript der isolierten 5'-Region die zur Ausbildung des zentralen Pseudoknotens notwendigen Sequenzen der 3'-Region der 16S rRNA nicht vorhanden sind. Die Ausbildung dieser „long-range“ Wechselwirkung ist aber Bestandteil des zentralen Pseudoknotens und ein notwendiges Erkennungsmotiv für eine Bindung von S5 (Heilek *et al.*, 1996; Culver *et al.*, 1999).

### **3.2.3 Leadereinflüsse auf die Assemblierung der isolierten 5'-Region**

S4 ist als eines der ersten bindenden Proteine im Assemblierungsprozeß bekannt und dient zusammen mit S7 zur Ausbildung der ersten Nukleationszentren, die in der 5'-Region (S4) und in der 3'-Region (S7) die ersten Komplexbildungen initiieren (Nowotny and Nierhaus, 1988; Garrett *et al.*, 1977). Arbeiten konnten in Assemblierungsstudien ebenfalls zeigen, daß ein 526 Nukleotid langes Fragment der 5'-Region eine Struktur einnehmen kann, die zur Ausbildung der normalen Bindestellen der 4 ribosomalen Proteine S4, S16, S17 und S20 führt. Sie bezeichneten diesen Ribonukleo-Proteinkomplex als einen „Struktur-Kernkomplex“, der als Initiationszentrum für die nachfolgenden Assemblierungsschritte fungiert (Vartikar and Draper, 1989; Weitzmann *et al.*, 1993).

Unter den Standardbedingungen der *in vitro* Assemblierung (40°C) verbessert die Anwesenheit des Wildtyp-Leaders die Bindung von S16/S17. Die Bindung von S4 und S20 werden durch die Anwesenheit des Wildtyp-Leaders nicht beeinflusst. Der Wildtyp-Leader kann demnach auch *in vitro* bei der Bildung des Initiationszentrums die Affinität früh bindender ribosomaler Proteine erhöhen.

### **3.2.4 Einflüsse von Punktmutation in der $t_L$ -Region**

Unter den gleichen Bedingungen führt der mutierte Leader zu einer Verbesserung der S4-Bindung und zeigt damit ein Verhalten, welches nicht den Erwartungen entspricht (siehe oben). Obwohl die Punktmutationen *in vivo* zur Bildung defekter ribosomaler Untereinheiten führen, sorgen sie *in vitro* für einer bessere Bindung des für den Assemblierungsverlauf initialen Proteins S4. Sowohl der Wildtyp-Leader als auch die mutierte Form haben demnach einen begünstigenden Einfluß auf die Assemblierung unter Standardbedingungen.

### **3.2.5 Die Temperaturabhängigkeit der „Chaperonfunktion“**

Eine Verringerung der Assemblierungstemperatur sollte die „Chaperonfunktion“ des Leaders deutlicher erkennbar werden lassen. Durch eine niedrigere Temperatur steht weniger Aktivierungsenergie zur Korrektur des Faltungsweges und dem Vermeiden von thermodynamischen „Faltungs-Fallen“ zur Verfügung. Wenn der Leader den korrekten Faltungsablauf erleichtert, so sollte dies bei niedrigeren Assemblierungstemperaturen erkennbar sein.

Eine Verringerung der Assemblierungstemperatur auf 30°C führt dazu, daß die durch den Wildtyp-Leader vermittelte Verbesserung der Proteinbindung ausbleibt, während die Punktmutationen bei 30°C für eine sehr starke Affinitätserhöhung von S4 sorgt. Auch in diesem Aspekt zeigt der mutierte Leader nicht das erwartete Verhalten. Wird die Assemblierungstemperatur auf 12°C gesenkt, so steht nur noch eine sehr geringe Aktivierungsenergie zur Korrektur von Fehlfaltungen zu Verfügung. Bei dieser Temperatur sollten sowohl die „Chaperonfunktion“ des Leaders als auch die störenden Einflüsse der Punktmutationen besonders klar erkennbar sein.

Die bei dieser niedrigen Aktivierungsenergie verbesserte Bindung von S4 und S20 macht die Beteiligung des Wildtyp-Leaders als erleichternde Faltungshilfe deutlich. Sein inhibierender Effekt auf die Bindung von S16/17 liegt von den Normierungswerten her (Auswertung: siehe Ergebnisse, Seite 26) knapp unterhalb der Fehlertoleranz von 20%. Dadurch muß der inhibitorische Effekt auf die Bindung von S16/S17 durch den Wildtyp-Leader als vorläufig angesehen werden.

Die Region der S4-Bindung wird durch beide Leader-Varianten bei 12°C im besonderen beeinflusst. Die beim Wildtyp-Leader zu beobachtende Affinitätssteigerung der S4-Bindung ist beim mutierten Leader nochmals erhöht. Die strukturelle Beeinflussung der Binderegion von S20 wird bei 12°C durch beide Leader gleichermaßen vermittelt. Um den Einfluß der Temperaturverringerung auf die Leader-Wirkung zu erklären sind zwei Möglichkeiten vorstellbar. Entweder nimmt der Leader (auch in der mutierten Form) bei der jeweiligen Temperatur eine andere Konformation ein und verändert so die Möglichkeiten der Wechselwirkung mit verschiedenen Bereichen der 16S rRNA oder die verän-

dernten Temperaturen sorgen durch unterschiedliche Aktivierungsenergien für einen jeweils anderen Verlauf der Leader-vermittelten Faltungskinetik.

### **3.2.6 Die „Chaperonfunktion“ des Leaders hilft bereits bei sehr geringer Aktivierungsenergie**

Powers und Noller zeigten 1994, daß eine maximale Bindung von S4 *in vitro* erst ab einer Temperatur von 30°C aufwärts erfolgt (Powers *et al.*, 1994). Da der Leader sowohl im Wildtyp als auch in der mutierten Form die Bindung von S4 bereits bei 12°C verbessert, belegen die Befunde die begünstigende Chaperonwirkung auf die Faltung bei niedrigen Aktivierungsenergien. Die größten Unterschiede zwischen beiden Leader-Derivaten sind ebenfalls bei 12°C zu finden. Da die Effekte der Kältsensitivität *in vivo* bei 30°C auftreten, könnte dies bedeuten, daß *in vivo* andere Mechanismen wirksam sind oder, daß die Temperatureffekte *in vivo* und *in vitro* nicht vergleichbar sind.

### **3.2.7 Die Wirkung von Leadermutationen auf die 5'-Region**

Mutationen im Leader, welche *in vivo* zu einer Akkumulation defekter Untereinheiten (30S und 50S) führen, scheinen demnach *in vitro* für eine bessere Bindung einiger Proteine in der 5'-Domäne zu sorgen. Dabei ist das für die initiale Strukturierung der 5'-Domäne verantwortliche Protein S4 im besonderen Maße betroffen. Dies kann bei allen Assemblierungstemperaturen beobachtet werden. Der begünstigende Effekt manifestiert sich am stärksten bei Temperaturen unterhalb von 40°C.

### **3.2.8 Leader-Effekte auf die Assemblierung der vollständigen 16S rRNA**

Bei der Analyse der assemblierten 16S rRNA-Volllänge konnten die Auswirkungen des Leader-Bereiches in Anwesenheit der übrigen rRNA-Domänen der 16S rRNA untersucht werden, die nicht direkt durch den Leader beeinflusst werden. Da der positive Einfluß des Leaders auf die Strukturierung der 5'-Domäne gezeigt werden konnte, sollte eine Durchführung des gleichen experimentellen Ansatzes mit den jeweiligen Vollängentranskripten (ohne Leader,

Wildtyp-Leader und Mutante) Aufschlüsse über die Leaderwirkung auf die Assemblierung der vollständigen 16S rRNA bringen. Die Assemblierung der Volllänge in Anwesenheit des Leaders kann als eine sehr späte Stufe im Reifungsprozeß betrachtet werden. Das Vollängentranskript stellt mit seiner Sequenzlänge das letzte Stadium dar, in dem der Leader noch effizient mit der 5'-Region der 16S rRNA interagieren kann. Unmittelbar nach der 16S rRNA wird der 3'-seitige Spacer-Bereich transkribiert, der unter Beteiligung des Leaders zur Ausbildung des Startsignals für die Prozessierung führt. Sind die dafür notwendigen Sequenzen des Spacer-Bereiches synthetisiert, wird die Leader-Wirkung auf die 5'-Region der 16S rRNA durch eine um mehrere Größenordnungen stabilere Interaktion des Leaders mit dem Spacer unterbunden. Demnach muß die Interaktion zwischen Leader und 16S rRNA Interaktion transien-ter Natur sein.

### **3.2.9 Die Limitierung der Temperatur ermöglicht die Bildung diskreter Partikelvorstufen**

Bei assemblierten Volllänge-Transkripten kann mit steigender Temperatur die graduelle Vervollständigung des Besetzungsgrades der ribosomalen Proteine in den Partikeln beobachtet werden (siehe Abbildung 2.2, sowie A.2 im Anhang). Mit steigender Temperatur nimmt also die Anzahl der in den Partikeln vorhandenen Proteine erwartungsgemäß zu. Dies zeigt, daß *in vitro* beim Assemblierungsprozeß durch die Limitierung der Temperatur die Synthese diskreter Partikelvorstufen möglich ist. Held und Nomura beschrieben 1973 in Ihrer Arbeit auch, daß für die vollständige Assemblierung *in vitro* ein hitzeaktivierender Schritt notwendig ist. Bei einer Temperatur von 40°C kommt es zu einer wichtigen Konformationsänderung des Partikels. Erst das durch diese in Abhängigkeit der Temperatur entstehende „aktivierte“ RI-Partikel kann die noch fehlenden Proteine binden und die 30S Untereinheit erhält so ihre endgültige Struktur (Tam and Hill, 1981).

Auch bei dem in dieser Arbeit verwendeten System sind erst bei einer Temperatur von 40°C unter Berücksichtigung der experimentellen Einschränkungen (siehe Ergebnisse, Seite 33) alle ribosomalen Proteine nachweisbar. Die Zunahme der Zahl gebundener Proteine mit steigender Temperatur kann am Bei-

spiel von S3, S10, S14 und S19 sehr gut verfolgt werden (siehe auch Anhang: A.2).

### **3.2.10 Die Assemblierung der vollständigen 16S rRNA erfolgt in sequenziellen Schritten**

Die Bindung ribosomaler Proteine, die zur Bildung eines initialen Partikelkerns führen, erfolgt durch direkte Interaktion mit der 16S rRNA. Im Gegensatz zu diesen sogenannten „primär“ bindenden Proteinen, ist der Einbau von Proteinen, die erst zu späteren Zeiten im Assemblierungsverlauf gebunden werden können, auch von der korrekten Ausbildung bestimmter Protein-Protein-Kontakte abhängig. Die RNA-Bindungsmotive dieser sogenannten „sekundär“ bindenden Proteine werden erst dann erkannt, wenn die zur Strukturierung notwendigen Proteine im Assemblierungsverlauf bereits in das Partikel integriert wurden oder eventuell notwendige Protein-Protein-Kontakte zu den früher bindenden Proteinen ausgebildet werden können. S9 und S19 können z.B. erst an die 16S rRNA binden, wenn die initiale Strukturierung der 3'-Domäne durch die Bindung von S7 (eines der primär bindenden Proteine) erfolgt ist. Die strukturellen Abhängigkeiten sind in der von Held und Nomura aufgestellten Assemblierungskarte in der Einleitung dargestellt (Held und Nomura, 1974; siehe Einleitung, Seite 14). Demnach kann z.B. das Fehlen von S10, S14 und S19 in beiden Leader-haltigen Partikeln bei 12°C auf die massive Reduktion von S7 und S9 zurückgeführt werden. Auch die Bindung von S10 ist von der Präsenz eines anderen ribosomalen Proteins abhängig. So ist z.B. S9 für die nachfolgende Bindung von S10 notwendig. Da bei 12°C die Bindung von S9 durch beide Leader-Formen sehr stark beeinträchtigt wird, könnte das Fehlen von S10 auf die Verringerung der S9-Bindung in beiden Leader-Derivaten zurückgeführt werden.

### **3.2.11 Der Leader beeinflusst die Bindung von S5 und damit die Struktur- bildung im Bereich des zentralen Pseudoknotens**

Die Ergebnisse mit den Vollängentranskripten zeigen im Gegensatz zu den Untersuchungen an der assemblierten 5'-Region einen überwiegend negativen Einfluß beider Leaderformen. Das Fehlen von S3 bei beiden Leader-haltigen

Partikeln unterhalb von 40°C kann auf das gleichzeitige Fehlen von S5 zurückgeführt werden. S5 konnte bei allen Partikeln der assemblierten Vollänge nur bei 40°C schwach nachgewiesen werden (S5 wurde in der grafischen Darstellung nicht berücksichtigt, es ist aber auf den Gelen im Anhang A.2 zu erkennen). Mandiyan *et al.* (1991) haben in ihren Untersuchungen der Bindungsreihenfolge der ribosomalen Proteine im Verlauf der Assemblierung gezeigt, daß S2 und S3 in ihrer Bindung von S5 abhängig sind. Da S5 bei beiden Leaderhaltigen Derivaten unterhalb von 40°C nicht nachgewiesen werden konnte, kann das Fehlen von S3 durch die Protein-Abhängigkeit zu S5 erklärt werden. Die niedrigere Affinität von S5 bei 40°C bei beiden leaderhaltigen Partikeln kann nur auf einen leader-vermittelten Struktureffekt zurückgeführt werden, da S5 bei der leaderfreien Kontrolle bei 40°C etwas stärker nachgewiesen werden kann. Da das Bindungsmotiv von S5 den zentralen Pseudoknoten beinhaltet, verändern beide Leaderformen in der Vollänge die Region des zentralen Pseudoknotens, so daß die Bindung von S5 nicht mehr mit normaler Intensität erfolgen kann.

### **3.2.12 Einfluß der Temperatur auf die „Chaperonfunktion“**

Obwohl beide Leader die Assemblierung der Vollänge empfindlich zu stören scheinen, ist eine Verbesserung der Bindung von S7, S9 und S20 mit steigender Temperatur in Anwesenheit des Wildtyp-Leaders zu erkennen. Die Anzahl an Proteinen, die bei Leaderanwesenheit eine sehr starke Affinitätsverringering (rot) zeigen, ist beim Wildtyp größer als bei der Mutante. Wie auch schon bei den Untersuchungen der assemblierten 5'-Region scheint der mutierte Leader die Affinitäten einiger Proteine im Vergleich zum Wildtyp-Leader stärker zu erhöhen. Ebenfalls ein überraschendes Ergebnis ist der Befund, daß die Punktmutationen, die bei 30°C *in vivo* zu defekten ribosomalen Untereinheiten führen, *in vitro* bei dieser Temperatur den geringsten negativen Einfluß auf die Assemblierung haben. Die Tatsache, daß der mutierte Leader *in vitro* die Bindung einiger ribosomaler Proteine wesentlich verbessert und *in vivo* zur Ausbildung defekter 30S Untereinheiten führt, kann zweierlei bedeuten. Entweder sorgen *in vivo* andere Effekte für den beobachteten Befund oder die Temperatureffekte *in vitro* und *in vivo* sind nicht direkt vergleichbar.

### **3.2.13 Belege für die transiente Natur der „Chaperonfunktion“**

Die Assemblierungsdaten zeigen, daß beide Leader einen positiven Einfluß auf die Strukturierung der 5'-Region haben. Die isolierte 5'-Region kann *in vitro* ihre native Struktur unabhängig von den übrigen Domänen ausbilden. Dies konnte durch die Proteinbindungsstudien klar gezeigt werden. Die „Chaperonfunktion“ des Leaders führt bei der Assemblierung der isolierten 5'-Region zu einer verbesserten Proteinbindung. S4 als primär bindendes Protein ist dabei in besonderem Maße durch die Leader-Mutante betroffen. Die Leader-Mutante zeigt bei allen untersuchten Temperaturen vom Wildtyp-Leader abweichende Effekte, die auch auf eine vom Wildtyp-Leader abweichende Interaktion hinweisen können.

Bei den Analysen der Volllänge trat das überraschende Ergebnis zu Tage, daß der Leader in Anwesenheit der zentralen und der 3'-Domäne die Proteinbindung inhibiert. Der mutierte Leader führt zwar bei dieser Analyse im Vergleich zum Wildtyp-Leader zu einer Affinitätsverbesserung einiger ribosomaler Proteine, aber auch bei der Mutante bleibt der Leader-vermittelte Einfluß inhibitorischer Natur. Diese Erkenntnis stützt die These einer transienten Hilfsfunktion des Leaders, der zwar im frühen Faltungsstadium der 5'-Region einen positiven Einfluß auf die Strukturfindung hat, jedoch spätestens bei der Strukturierung der 3'-Domäne durch eine starke Interaktion mit dem Spacer seiner Hilfsfunktion „entzogen“ werden muß. Da im Falle der Volllänge Proteine in allen Domänen der 16S rRNA durch die Leaderpräsenz betroffen sind, können die inhibitorischen Effekte des Leaders nicht nur durch die direkten Interaktionen mit der 5'-Region der 16S rRNA vermittelt werden. Ein weiterer Grund kann die Nähe des Leaders zum zentralen Pseudoknoten sein. Der Leader selbst besitzt ebenfalls eine sehr ausgeprägte Sekundärstruktur. Mit einer Länge von 173 Nukleotiden kann er im Zentrum des Partikels, wo alle Domänen einen gemeinsamen Verbindungspunkt besitzen, auch durch seine räumliche Ausrichtung die Strukturierung sterisch behindernd wirken.

### **3.3 Strukturelle Untersuchung der assemblierten Partikel**

### **3.3.1 Die Bindung eines ribosomalen Proteins kann eine für die Bindung weiterer Proteine notwendige Strukturänderung induzieren**

Ribosomale Proteine erkennen ihren Bindungsort an RNA-Molekülen aufgrund räumlich ausgebildeter Strukturen. Die entsprechende Region der RNA muß zur Erkennung des ribosomalen Proteins ein gewisses Erkennungsmotiv A ausbilden, damit die Bindung erfolgen kann. Das Erkennungsmotiv A kann jedoch durch die Bindung des Proteins zu einem RNA-Protein-Komplex in eine Struktur B umgelagert werden. Diese Struktur B ist dann im weiteren Verlauf der Assemblierung unter Umständen das notwendige Erkennungsmotiv für die Bindung des nächsten ribosomalen Proteins.

Mandiyan konnte in seinen Arbeiten zeigen, daß z.B. durch die Bindung von S4 intramolekulare „long-range“-Interaktionen in der 5'-Domäne der 16S rRNA erfolgen, die zu einer Veränderung der Tertiärstruktur im zentralen Bereich der S4-Bindung (Verbindungspunkte der 5-Helices 3, 4, 16, 17 und 18) führen (Mandiyan *et al.*, 1989).

Aus diesen Betrachtungen ergibt sich, daß die Faltung der RNA in ihre native Struktur zum Teil auch durch die Proteine vermittelt wird. Es wurde zwar gezeigt, daß freie 16S rRNA in Lösung auch eine ähnliche Konformation wie in der nativen 30S Untereinheit einnehmen kann (Vasiliev *et al.*, 1978), Arbeiten von Powers und Stern zeigen jedoch, daß die beiden ribosomalen Proteine S4 und S7 in ihrer jeweils bindenden Region der 16S rRNA (S4 in der 5'-Domäne, S7 in der 3'-Domäne) sogenannte „Nukleationskerne“ ausbilden. Sie sorgen in der jeweiligen Region nach den ersten Faltungsschritten für die strukturellen Voraussetzungen zur Bindung der nachfolgenden Proteine (Stern *et al.*, 1986 und Powers *et al.*, 1988).

### **3.3.2 Die „Chaperonfunktion“ kann nur über RNA-Kontakte vermittelt werden**

Die Effekte des Leader-Bereichs auf die Bindungsaffinität der betroffenen ribosomalen Proteine sollten auch nach den Ergebnissen dieser Arbeit *in vitro* nur durch Interaktionen auf RNA-Ebene vermittelt werden. Im Leader selbst können an die dort enthaltenen *nut*-ähnlichen Elemente (BoxB, BoxA, BoxC) nur Nus-Proteine und das ribosomale Protein S1 binden (Mogridge *et al.*, 1998). Da das NusE-Protein indentisch ist mit S10, kämen als potentiell an den Leader bindenden Proteine von den ribosomalen Proteinen nur S1 und S10 in Frage. S1 wird allgemein als lose an das Ribosom assoziierter Faktor angesehen (Laughrea *et al.*, 1977) und konnte in den TP70-Präparationen nicht nachgewiesen werden. Bei den Assemblierungsstudien der isolierten 5'-Region konnte S10 bei keinem der drei Partikel-Derivate (ohne Leader, Wildtyp-Leader und Mutante) auf den 2D-Gelen nachgewiesen werden. Dies gilt für alle Assemblierungstemperaturen. Bei der assemblierten Vollänge konnte S10 erst ab 30°C nachgewiesen werden. Da die am Leader bindungsfähigen Proteine in der assemblierten 5'-Region nicht nachgewiesen werden konnten, scheint der Leader seine Funktion *in vitro* nicht als Ribonukleoproteinkomplex zu vermitteln. Die strukturellen und kinetischen Analysen der Partikel können die direkte Interaktion zwischen Leader und 16S rRNA belegen und zeigen, daß der Leader seine Hilfsfunktion *in vitro* durch Wechselwirkung auf RNA-Ebene ausübt.

### **3.3.3 Der Leader besitzt im assemblierten Partikel eine hohe Stabilität**

Die Untersuchung der assemblierten Partikel auf RNA-Ebene ermöglichte im Gegensatz zu den Experimenten zur Proteinbindung auch die Möglichkeit, die Nukleinsäurestruktur des Leader-Bereiches im assemblierten Partikel zu analysieren. Durch chemische Modifikation der Partikel mit Kethoxal konnten über die Zugänglichkeit von Guanosinen Aussagen über die Struktur erlangt werden. Unabhängig von den strukturellen Befunden war jedoch zunächst von grundlegender Bedeutung, daß der Leader während des Assemblierungszeitraumes nicht durch nukleolytische Aktivitäten abgebaut wird. Die Tatsache, daß beide Leader-Formen auch bei 40°C noch nach einer Stunde im Partikel

durch „Primer Extension“ nachgewiesen werden konnten, spricht für die Ausbildung einer stabilen Struktur und gegen kontaminierende Nukleasen in den TP70-Präparationen.

### **3.3.4 Die $t_L$ -Regionen beider Leader nehmen unterschiedliche Konformationen ein**

Beide Leaderformen unterscheiden sich in der Sekundärstruktur der  $t_L$ -Region, die die Punktmutationen beinhaltet, sehr deutlich voneinander. Im Gegensatz zum Wildtyp-Leader zeigt die Leader-Mutante Zugänglichkeiten im helikalen Stammbereich der Helix IV. Somit scheint die  $t_L$ -Region im Falle der Mutante eine andere Struktur einzunehmen. Im Bereich der Helix 3 und im Bereich der Helix 6 der 16S rRNA befinden sich Sequenzabschnitte, die mit Abschnitten der  $t_L$ -Region des Leaders identisch sind. Die in den Partikeln gefundenen Strukturunterschiede lassen eine jeweils andere Form der Wechselwirkung zwischen Wildtyp-Leader oder Leader-Mutante und der 16S rRNA vermuten, da sowohl die Leadersequenz als auch die der 16S rRNA hochkonserviert ist.

Durch die höhere Zugänglichkeit in der  $t_L$ -Region der Mutante gibt es einen klaren Hinweis auf Unterschiede in der strukturellen Interaktion mit der 16S rRNA, die zu der veränderten Proteinbesetzung bei den jeweiligen Partikeln führen können.

Die  $t_L$ -Region erscheint in den Partikeln der assemblierten 5'-Region über den gesamten Bereich sehr stark zugänglich. Die einfachste Erklärung wäre die fehlende Interaktion mit der 16S rRNA. Während der Wildtyp-Leader in Bereichen der  $t_L$ -Region eine Wechselwirkung mit der 16S rRNA eingeht, bleibt die  $t_L$ -Region der Mutante zugänglich und bildet keine Interaktion mit der 16S rRNA aus. Diese Erklärung erscheint zwar gemäß den Daten einleuchtend, muß jedoch kritisch betrachtet werden. Der Grund dafür liegt in der hohen Anzahl an Strukturabbrüchen, die nicht an durch Kethoxal modifizierten Gunaosinen erfolgen. Der Mechanismus der Protein-induzierten Strukturabbrüche an A's, C's und U's ist im Gegensatz zu dem Mechanismus der Guanosinmodifikation durch Kethoxal in seinen sterischen Auswirkungen unbekannt. Die Protein-vermittelten Strukturabbrüche könnten z.B. auch auf nukleolytische Aktivi-



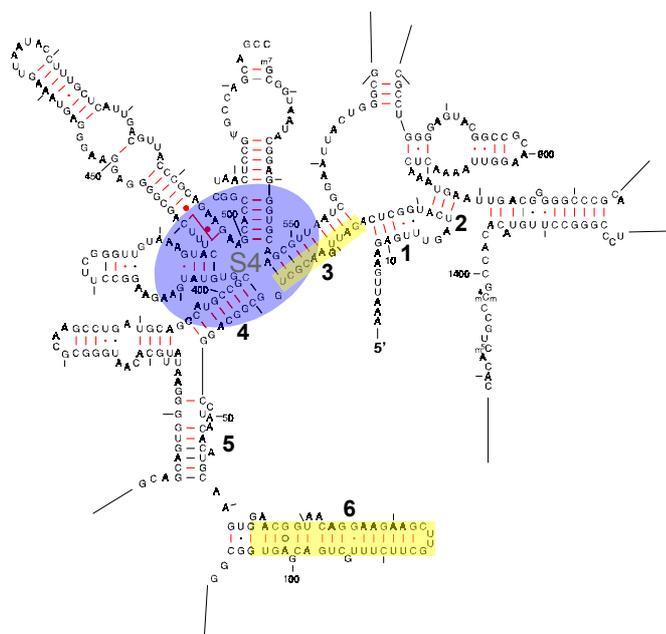
nen zur 16S rRNA von besonderem Interesse. Da in den Proteinbindungsstudien Einflüsse des Leaders auf die S4-Bindung gefunden wurden, sollten im Bereich der S4-Bindung die auslösenden Strukturveränderungen auf RNA-Ebene erkennbar sein.

### 3.3.6 Hinweise auf eine weitere Leader-vermittelte Funktion

In beiden untersuchten Transkriptlängen (isolierte 5'-Region und Volllänge) lassen sich neben der leader-abhängigen Interaktion (siehe oben) auch protein-vermittelte Protektionen in beiden Leadern an Position G21 in der Helix 1 der 16S rRNA erkennen. Die Protektionen können nur durch die Nähe zu einem der vorhandenen ribosomalen Proteine vermittelt werden. Da sich S5 in den Assemblierungsstudien weder bei den verkürzten Transkripten noch bei der Volllänge in Anwesenheit der Leader nachweisen ließ und S4 u. a. Kontakte zur Helix 1 ausbildet (Wimberly *et al.*, 2000), scheint diese Protektion durch S4 vermittelt zu werden (siehe **Abb. 3.1**).

Die fehlenden Zugänglichkeiten der Positionen G9, G11, G15 und G22 am nahen 5'-Ende der 16S rRNA in Anwesenheit beider Leader unterscheiden sich im Gegensatz zu den Zugänglichkeiten der  $t_L$ -Region nicht zwischen den Transkriptlängen (siehe Tab. 2.4 und 2.7). Da diese Protektionen in Anwesenheit beider Leader-Formen auch keine Temperaturabhängigkeiten zeigen und somit auch bei 40°C noch stabil sind, liegt der Schluß nahe, daß es mindestens zwei Interaktionsbereiche des Leaders mit der 16S rRNA geben muß (**Abb. 3.2**).

Der erste Kontakt findet zwischen dem nahen 5'-Ende der 16S rRNA (Position G9



**Abb. 3.2:** Ausschnitt aus der Sekundärstruktur der 16S rRNA. Die Helices 1 bis 6 sind nummeriert. Die Binde-region von S4 ist blau unterlegt, Bereiche, die mit Sequenzen des Leaders identisch sind, sind gelb unterlegt.

bis G22) und dem Leader-Anfang statt und ist von den Mutationen unabhängig. Dieser Kontakt könnte den Leader positionieren und eine räumlich notwendige Ausrichtung zur Ausbildung des zweiten Kontaktes darstellen. Die Protektionen lassen jedoch zwischen beiden Transkriptlängen keine Unterschiede erkennen. Strukturelle Veränderungen in den Helices 1 bis 3 der 16S rRNA können somit nicht die Differenzen in den Bindungsaffinitäten von S4 zwischen den Partikeln der assemblierten 5'-Region und den Partikeln der assemblierten Volllänge erklären.

Demzufolge findet eine weitere Interaktion zwischen der  $t_L$ -Region des Leaders und der 16S rRNA statt, wobei als mögliche Interaktionsbereiche die Helices 3 und 6 durch zum Leader identische Sequenzen in Frage kommen. Diese Interaktion kann durch die unterschiedliche Konformation der  $t_L$ -Region die veränderte Proteinzusammensetzung der Partikel herbeiführen (**Abb. 3.2**).

### ***3.3.7 Die Veränderung der S4-Bindung wird indirekt durch den Leader vermittelt***

Das S4 in Abwesenheit der übrigen 16S rRNA Domänen eine höhere Affinität zeigt, läßt sich bei der Analyse des zentralen S4-Bindungsbereiches in der isolierten 5'-Region erkennen (Tabelle 2.5, Seite 42).

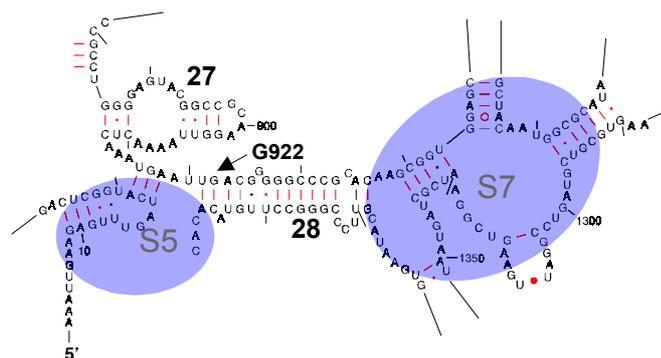
Die "footprint"-ähnliche Protektion von Bereichen der zentralen Regionen der S4-Bindung (G410 bis G454) spiegelt die hohe Affinität von S4 in der isolierten 5'-Region wieder. Der gleiche Bereich ist in den Vollängentranskripten wesentlich zugänglicher. Nur an wenigen Positionen sind noch Protein-vermittelte Protektionen erkennbar (G410, 413, A441 und G505). Diese treten zudem erst ab 30°C auf. Der Vergleich aller Strukturinformationen aus den Helices 1-3, und 16-18 läßt eine Korrelation zu den Proteinbindungsdaten zu. Da die assemblierten Partikel in ihrer endgültigen Struktur untersucht wurden, ist bei der Analyse der gewonnenen Strukturdaten klar zu erkennen, daß es nicht möglich ist, die Wirkung der jeweiligen Leaderform gezielt einzelnen Regionen auf Nukleotidebene zuzuordnen. Gemäß den Vorstellungen über die Orte der direkten Wechselwirkung des Leaders (Helix 3 und Helix 6) mit der 16S rRNA können die strukturellen Effekte in der zentralen S4-Binderegion auch als se-

kundäre Effekte der Interaktion angesehen werden. Sie beruhen unter Berücksichtigung der bisherigen Erkenntnisse (Pardon *et al.* 1995, Besançon *et al.*, 1999) nicht auf einer direkten Leaderwechselwirkung.

### 3.3.8 Der Leader verhindert die Ausbildung des zentralen Pseudoknotens und sorgt dadurch für eine Destabilisierung der 3'-Region

Eine Ursache für den inhibierenden Effekt des Leaders in den Partikeln der assemblierten Volllänge liefert die strukturelle Untersuchung der Region des zentralen Pseudoknotens. Alle drei Partikel unterscheiden sich hinsichtlich der Zugänglichkeiten in den untersuchten Positionen bis einschließlich G917 nicht. Obwohl in diesem Bereich nur wenig Strukturinformationen vorliegen, scheint der in der 3'-Domäne befindliche Bereich des zentralen Pseudoknotens strukturell nicht durch den Leader betroffen zu werden. An Position G922 zeigt sich jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den Partikeln in mehrfacher Hinsicht.

Die Strukturanalyse der freien Vollängentranskripte zeigt eine temperaturabhängige Zunahme der Zugänglichkeit an Position G922, die im Leaderfreien Transkript bei keiner Temperatur zugänglich ist



**Abb.3.3:** Ausschnitt aus der Sekundärstruktur der 16S rRNA. Die Helices sind nummeriert, die Binderegionen der Proteine blau unterlegt. Die Position G922 ist mit einem Pfeil markiert.

(**Abb. 3.3**). Diese Position ist im Falle des mutierten Leaders bei 30°C zugänglicher als beim Wildtyp. In Proteinanwesenheit zeigen beide Leader-haltigen Transkripte bei G922 eine Protein-vermittelte Protektion, die ab 30°C auftritt. Erklärbar ist dieser Effekt durch die Wechselwirkung des Leaders mit den in der 5'-Region befindlichen Teilen des zentralen Pseudoknotens. Durch die Interaktion des Leaders am nahen 5'-Ende der 16S rRNA (siehe Tab. 2.4 und 2.7) erfolgen in dem unmittelbar an den zentralen Pseudoknoten angrenzenden Bereich wesentliche Strukturänderungen. Dadurch gelangt G922 in die räumliche Nähe eines ribosomalen Proteins. G922 liegt am Anfang der Helix 28. S5 und S7 bilden im nativen Partikel Kontakte zur Helix 28 aus. Da S5 in

der assemblierten Vollänge in beiden Leader-haltigen Partikeln nicht nachgewiesen werden konnte, können die Proteinsignale nur durch die Nähe zu S7 verursacht werden. Da G922 im Leader-freien Partikel keine Nähe zu S7 zeigt und alle Proteine auch in der assemblierten Vollänge nachgewiesen werden konnten, kann der Effekt an Position G922 ein eindeutiger Hinweis auf die Verbindung zwischen den Leaderkontakten in der 5'-Domäne und den in den Assemblierungsstudien beobachteten inhibitorischen Effekten der 3'-Domäne zu sein.

### **3.4 Faltungsstudien der 16S rRNA in Anwesenheit des Leaders**

Besaçon konnte in seiner Arbeit zeigen, daß die Bildungskinetik verschiedener Helices der 16S rRNA durch die beiden Leader-Derivate auf unterschiedliche Art beeinflusst wird (Besaçon *et al.*, 1999). Um die Faltung auf struktureller Ebene mit höherer Auflösung und im erweiterten Umfang untersuchen zu können, wurde eine von Banerjee entwickelte Methode zur kinetischen Untersuchung der Faltung von Ribozymen modifiziert (Banerjee *et al.*, 1995). Diese Methode erlaubt, im Gegensatz zu der von Besaçon verwendeten Oligonukleotid-Hybridisierungskinetik, die strukturelle Veränderung der räumlichen Umgebung einzelner Nukleotidpositionen über die Zeit zu verfolgen. Während die Oligonukleotid-Hybridisierungskinetik nur eine Aussage über die Bildungsgeschwindigkeit einzelner Helices erlaubt, kann mit Hilfe der Kethoxal-Kinetik die Tertiärstrukturbildung des gesamten Moleküls untersucht werden. Die Methode ermöglicht die Analyse der strukturellen Umgebung von Guanosinen während der Strukturbildung und erlaubt so, die Kinetik der „Chaperonfunktion“ des Leaders auf Nukleotidebene zu untersuchen.

#### **3.4.1 Wie können die Strukturbildungszeiten der untersuchten Guanosine interpretiert werden?**

Um die ermittelten Faltungszeiten der einzelnen Positionen und die durch die Leader-Derivate verursachten Effekte vergleichen zu können, ist eine Berücksichtigung der strukturellen Umgebung des jeweiligen Guanosins notwendig.

Die von Woese *et al.* 1983 postulierte Sekundärstruktur der 16S rRNA ist allgemein anerkannt und wurde als Struktur-Referenz verwendet. Da unter anderem durch Arbeiten von Weitzmann gezeigt wurde, daß die 5'-Region in der Lage ist, ihre native Struktur auch unabhängig von den restlichen Domänen der 16S rRNA ausbilden zu können (Weitzmann *et al.*, 1993), kann auch der Bereich der 5'-Region der Sekundärstruktur von Woese *et al.* als Referenz für die Analysen der verkürzten Transkripte herangezogen werden. Bei der Analyse der Faltungszeiten in Bezug auf die Leader-vermittelten Effekte wurden die Halbwertszeiten der Leader-freien Kontrollen bei beiden untersuchten Transkriptlängen (isolierte 5'-Region und Volllänge) als Referenzzeiten verwendet.

Die Faltungszeiten der isolierten 5'-Region sind im Vergleich zu den entsprechenden Positionen der Volllänge der 16S RNA um einiges schneller. Dies kann wahrscheinlich dadurch erklärt werden, daß die isolierte 5'-Region den Strukturfindungsprozeß ohne den Einfluß der restlichen Domänen schneller durchlaufen kann.

Ein Vergleich der Faltungszeiten mit der Sekundärstruktur der 16S rRNA ergibt, daß bis auf wenige Ausnahmen Positionen, die in der Sekundärstruktur in helikalen Bereichen liegen, kurze Faltungshalbwertszeiten zeigen. Anhaltende Zugänglichkeiten entsprechen einer sehr langsamen Faltung oder einem permanent ungepaarten Zustand. Zur besseren Anschaulichkeit wurde das strukturelle Verhalten der Guanosine durch verschiedene Farben symbolisierenden Zeitfenstern zugeordnet. Guanosine, die in helikalen Bereichen liegen, welche Zeitfenstern bis ca 30 Minuten zugeordnet wurden, werden durch Gelb und Orange symbolisiert. Positionen, die in der Sekundärstruktur einzelsträngig vorliegen, zeigen Faltungszeiten von 30 Minuten und mehr. In der Farbskala liegen diese Positionen im roten und in den beiden blauen Bereichen.

Es ist wichtig festzuhalten, daß auch die kurzen Faltungszeiten nicht die reine Sekundärstrukturbildung widerspiegeln, da mit der hier angewandten Methode Faltung auf tertiärer Strukturebene erfaßt wird.

### **3.4.2 Beide Leader haben einen unterschiedlichen Einfluß auf die Faltungsgeschwindigkeit von Positionen in der Helix 3 der 16S rRNA**

Die kinetischen Informationen zeigen, daß beide Leader-Derivate die Bildungsgeschwindigkeit von Guanosinen in der Helices 3 und 4 beeinflussen. Während die Anwesenheit des Wildtyp-Leaders für einen Anstieg der Faltungszeiten sorgt, beschleunigt die Leader-Mutante die Faltung der gleichen Positionen (siehe Tabelle 2.1, Seite 61). Die Interaktionsmöglichkeiten des Leaders mit den Helices 3 und 6 wurden schon von Pardon und Besançon vorgeschlagen. Die in dieser Arbeit gemessenen Modifikationskinetiken unterstützen die Vorstellung, daß beide Leader mit der Helix 3 in Wechselwirkung treten können. Da sich aus den strukturellen Daten keine Unterschiede in den Zugänglichkeiten der entsprechenden Positionen ergeben, kann geschlossen werden, daß beide Leader keinen Einfluß auf den strukturellen Endzustand der betroffenen Helices haben. Beide Leadersequenzen beeinflussen demnach die Bildungsgeschwindigkeiten der Helices 3 und 4, aber nicht deren endgültige Struktur.

### **3.4.3 Der Leader beeinflusst auch die Region der zentralen S4-Bindung durch kinetische Effekte**

Die Messungen zeigen, daß der Bereich der zentralen S4-Bindung im verkürzten Transkript ebenfalls in starkem Maße durch beide Leader-Formen betroffen ist. Unter der oben vorgenommenen Einteilung der Faltungszeitbereiche in helikal und einzelsträngig, führen beide Leader zu einer erhöhten Zugänglichkeit in der Region des zentralen S4-Bindungsmotivs (Vergl. Positionen G453-G558 in Tabelle 2.11). Der beschleunigende Effekt der Leader-Mutante auf Regionen der S4-Bindung läßt sich bei der Volllänge ebenfalls im Bereich G410-G433 erkennen (siehe Tabelle 2.12). Diese Positionen liegen in der Helix 16 der 16S rRNA und zeigen im Vergleich zur Leader-freien Kontrolle wesentlich kürzere Faltungszeiten. Die Faltungszeiten der Positionen in dieser Region werden durch den Wildtyp-Leader bis auf G413 nicht beeinflusst. Längere Faltungshalbwertszeiten im Bereich der S4-Bindung könnten jedoch ebenso bedeuten, daß diese Region in Anwesenheit des Leaders viel länger für die Ausbildung der nativen Struktur benötigt. Letztere Deutung der Befunde stände im Ein-

klang mit den strukturellen Daten. Beide Leader-haltigen Partikel zeigten im Strukturmapping keine signifikanten Unterschiede in den Zugänglichkeiten der S4-Bindung der assemblierten 5'-Region. Die Proteinbindungsdaten zeigten jedoch eine höhere Besetzung mit S4 im Falle der Mutante. Versucht man die Befunde aller Experimente für die Analysen bei 30°C miteinander in Einklang zu bringen, so würde dies bedeuten, daß die Unterschiede zwischen den Leader-haltigen Partikeln bezüglich der S4-Bindung unter anderem auf die veränderten Bildungszeiten der Helices 3 und 4 und Bereichen der zentralen S4-Binderegion zurückgeführt werden können.

Aufgrund der strukturellen Informationen der Partikel können keine Rückschlüsse auf die Stärke der S4-Bindung gezogen werden, da die Assemblierung mit einem Überschuß an TP70 erfolgt. Unter diesen Bedingungen werden alle RNA-Moleküle mit Proteinen besetzt. Freie RNA ist nicht mehr nachzuweisen. Durch die Bindung von S4 verursachte Strukturabbruchsignale befinden sich in der „Primer Extension“ mit Ihrer Signalstärke im Sättigungsbereich, da durch den Proteinüberschuß die maximale S4-Bindung forciert wird. Aus diesem Grund kann mit Hilfe der strukturellen Informationen keine Aussage über den Besetzungsgrad an S4 getroffen werden.

#### **3.4.4 Kinetische Analysen der Leaderfunktion am nahen 5'-Ende der 16S rRNA**

Bei den Faltungsanalysen beider Transkriptlängen fiel auf, daß die Zugänglichkeit einiger Positionen am nahen 5'-Ende (G9, G15 und G22) der 16S rRNA in Anwesenheit des Leaders nicht bestimmt werden konnten. Dieser fehlenden Zugänglichkeiten waren in Anwesenheit beider Leader-Varianten festzustellen. Der gleiche Befund konnte auch schon bei den strukturellen Untersuchungen der assemblierten Partikel beobachtet werden (siehe Tabelle 2.4 und 2.7). Da die kinetischen Studien eine zeitliche Auflösung der Strukturierung ermöglichen und selbst mit dieser Methode die drei Guanosine zu keinem Zeitpunkt der Messung erfaßt werden konnten, scheinen das unmittelbare 5'-Ende der 16S rRNA und der Anfang des Leaders eine Wechselwirkung mit einer sehr kurzen Bildungszeit einzugehen. Derart kurze Bildungszeiten sollten nur durch die Strukturbildung auf reiner Sekundärstrukturebene erreicht wer-

den (Helixbildung). Bei einer Analyse der in Frage kommenden Sequenzen auf Komplementarität konnten passende Sequenzbereiche identifiziert werden. Der Bereich A10–A16 der 16S rRNA ist unter Ausbildung klassischer Watson-Crick-Basenpaare komplementär zu dem Bereich U283-U289 in beiden Leader-Derivaten. Die Experimente legen neben den schon bekannten Interaktionsbereichen des Leaders in den Helices 3 und 6 der 16S rRNA einen weiteren Ort der Interaktion am unmittelbaren 5'-Ende der 16S rRNA nahe. Eine ähnliche Wechselwirkung wurde schon von Young and Steitz, 1978 postuliert.

### **3.5 Schlußfolgerungen und ein Modell für den Mechanismus der Leader-vermittelten „Chaperonfunktion“**

- Die Strukturanalysen zeigen, daß sich beide Leader in der  $t_L$ -Region erheblich voneinander unterscheiden, wobei dieser Bereich in der mutierten Form ungepaart vorliegt, während der Wildtyp dort gepaarte Bereiche zeigt.
- Der Leader vermittelt seine „Chaperonfunktion“ bei der Faltung unter Ausbildung einer stabilisierenden Wechselwirkung mit dem nahen 5'-Ende der 16S rRNA. Diese Interaktion ist unabhängig von den Interaktionen der  $t_L$ -Region und damit unabhängig von den Punktmutationen, da beide Leader diesen Kontakt innerhalb der 16S rRNA-Sequenzen ausgebildet.
- Der Wechselwirkungsbereich dieser Interaktion konnte bis zur Position G22 nachgewiesen werden. Er deckt somit den 5'-seitigen Bereich des zentralen Pseudoknotens ab und könnte eine „Platzhalterfunktion“ für den 5'-seitigen Teil dieses essentiellen Tertiärstrukturelementes haben.
- Bei der Volllänge führt die Leader-Anwesenheit zu einer verminderten Bindung fast aller ribosomaler Proteine, wobei nicht nur Proteine der 5'-Region betroffen sind. Da der Leader auch in der Volllänge die Interaktionen mit dem nahen 5'-Ende der 16S rRNA ausbildet, könnte die „Platzhalterfunktion“ hier den 3'-seitigen Teil des zentralen Pseudoknotens an der Ausbildung der nativen Struktur behindern und so zu den strukturellen Defiziten beitragen.

- Die Faltungskinetiken belegen, daß beide Leader die Bildungszeiten der Helices 3 und 4, sowie den Bereichen der zentralen S4-Bindung unterschiedlich beeinflussen.

### **3.5.1 Die „Chaperonfunktion“ des Leaders erfüllt zwei wichtige Hilfestellungen**

Nach den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen vermittelt der Leader bei der Faltung und Assemblierung ribosomaler 30S Partikel mindestens zwei wichtige Funktionen. Durch die Ausbildung einer sehr stabilen Wechselwirkung mit dem unmittelbaren 5'-Ende der 16S rRNA fungiert er als eine Art 'Platzhalter' für die in der 3'-Region befindlichen Sequenzen und scheint eine essentielle Rolle bei der Bildung des zentralen Pseudoknotens zu spielen. Da bei der Ausbildung des Pseudoknotens 'long-range'-Interaktionen ausgebildet werden müssen, scheint er die in der 5'-Domäne liegenden Sequenzelemente des Pseudoknotens vor der Ausbildung fehlerhafter Zwischenstrukturen zu 'schützen', damit die Ausbildung des Pseudoknotens erfolgen kann, sobald die korrekten komplementären Sequenzen synthetisiert worden sind. Zum anderen vermittelt der Leader auch die auch schon von Pardon und Besançon beschriebene Hilfsfunktion bei der Faltung der 16S rRNA und der Assemblierung der ribosomalen 30S Untereinheit (Pardon *et al.*, 1995, Besançon *et al.*, 1999), indem er die Bindung ribosomaler Proteine während der frühen Assemblierungsphase unterstützt. Beide Aspekte scheinen Teil der durch den Leader vermittelten transienten Hilfsfunktion zu sein.

In dieser Arbeit konnte die „Chaperonfunktion“ des Leaders auf die Bindung der ribosomalen Proteine nachgewiesen werden. Daß der Leader seine Funktion durch eine transiente Wechselwirkung mit der 5'-Region der 16S rRNA vermittelt, konnten die Assemblierungsexperimente mit den Vollängentranskripten zeigen. Wird der Leader nicht rechtzeitig durch die Präsenz des Spacer-Bereichs komplexiert und damit der Einfluß auf die 5'-Region unterbunden, führt dies zu einer starken Beeinträchtigung der Assemblierung.

### **3.5.2 Die „Chaperonfunktion“ verändert den kinetischen Ablauf der Faltung**

Der Einfluß des Leaders auf die Faltung der 16S rRNA in die native Konformation scheint dabei durch kinetische Effekte vermittelt zu werden. Da bei den Proteinbindungsstudien heterogene Populationen ribosomaler Partikel untersucht wurden und diese vermutlich nicht über eine einheitliche Zusammensetzung der ribosomalen Proteine verfügen, spiegeln die Ergebnisse der Assemblierungsstudien nur ein statistisches Mittel wieder. Die dort vermessenen verstärkenden oder inhibitorischen Effekte in Anwesenheit beider Leader könnten auf eine im zeitlichen Mittel früher oder später erfolgende Bindung des entsprechenden Proteins zurückzuführen sein. Kinetische Aussagen sind aufgrund der langen Assemblierungszeiten mit diesem Experiment nicht möglich.

### 3.6 Ausblick

Das Wissen über die „chaperonartige“ Hilfsfunktion der zusätzlich transkribierten Leadersequenzen konnte in dieser Arbeit vertieft und erweitert werden. Weitere Erkenntnisse könnten durch folgende Analysen gewonnen werden:

- Die räumliche Anordnung des Leaders im assemblierten Partikel durch "Cross-link"-Experimente könnte Aufschlüsse über die direkten Orte der Wechselwirkung geben und die mögliche Nähe des Leaders zu ribosomalen Proteinen nachweisen.
- Eine Erweiterung der Assemblierungsstudien mit Transkripten, die den Spacer-Bereich enthalten, könnte den transienten Charakter der leadervermittelten Hilfsfunktion unterstreichen und direkter zeigen.
- Die Strukturanalyse der 3'-Region jenseits des in dieser Arbeit untersuchten Bereiches könnte zu einem besseren Verständnis des destabilisierenden Effektes des Leaders bei Anwesenheit der zentralen und der 3'-Region führen.

## 4 Material

### 4.1 Allgemeines

Alle verwendeten Chemikalien besaßen, soweit nicht anders vermerkt, den Reinheitsgrad 'pro analysis'. Zum Ansetzen der Lösungen wurde hochreines Milli-Q-Wasser (Hausanlage mit nachgeschaltetem „water purification system EPA Est. 41237-MA-1“, Millipore GmbH, Neu Isenburg) verwendet, hier nachfolgend als 'Aqua dest.' bezeichnet, welches in regelmäßigen Abständen bezüglich pH-Wert und Konduktivität überprüft wurde.

### 4.2 Bakterienstämme und Plasmide

#### 4.2.1 *E. coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
HB101	F <sup>-</sup> , <i>proA2</i> , <i>recA13</i> , <i>ara-14</i> , <i>lacY1</i> , <i>galk2</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>rpsL20</i> (Str <sup>r</sup> ), <i>supE44</i> , <i>hsdS20</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), λ <sup>-</sup>	Boyer und Roulland-Dussoix, 1969
GM2199	<i>ara-14</i> , <i>dam-13</i> , ::Tn9, <i>galk2</i> , <i>galT22</i> , <i>hisG4</i> , <i>lacY1</i> , <i>leuB6</i> , <i>mtl-1</i> , <i>rspL136</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>tonA31</i> , <i>tsx-78</i> , <i>xyl-5</i>	Marinus <i>et al.</i> , 1983

#### 4.2.2 Plasmide

- pBP2 pUC19-T7-Derivat mit der vollständigen Sequenz des 16S rRNA-Gens des *rrnB*-Operons von *E. coli* (1,8 kb *DraI* Fragment von pKK3535) in der *StuI* Schnittstelle unter Kontrolle des T7-Promotors.
- pWB pBP2-Derivat mit einkloniertem leader-Bereich (256 bp *NaeI/BclI* Fragment aus p7P2, *Pardon et al.*, 1994) in der *SacI/BclI*-Schnittstelle) vor dem 16S rRNA-Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors.
- pWB11 pBP2-Derivat mit einkloniertem leader-Bereich (227 bp *KpnI/BclI* Fragment aus p7P2-11, *Pardon et al.*, 1994) vor dem 16S rRNA-Gen unter der Kontrolle des T7-Promotors.
- pIK pWB-Derivat, bei dem die downstream des 16S-rRNA-Strukturgens liegende singuläre *XbaI*-Schnittstelle bis auf 5 Nukleotide hinter das 16S rRNA-Gen verschoben wurde.
- pIK11 pWB11-Derivat, bei dem die downstream des 16S-rRNA-Strukturgens liegende singuläre *XbaI*-Schnittstelle bis auf 5 Nukleotide hinter das 16S rRNA-Gen verschoben wurde.
- pIK16S pBP2-Derivat, bei dem die downstream des 16S-rRNA-Strukturgens liegende singuläre *XbaI*-Schnittstelle bis auf 5 Nukleotide hinter das 16S rRNA-Gen verschoben wurde.

### 4.3 Nukleinsäuren und Nukleotide

#### Nukleinsäuren:

kb-Leiter Gibco BRL, Eggenstein

#### Nukleotide:

Adenosin-5'-triphosphat	Boehringer, Mannheim
Cytidin-5'-triphosphat	Sigma, St. Lewis, USA
Guanosin-5'-triphosphat	Sigma, St. Lewis, USA
Uridin-5'-triphosphat	Sigma, St. Lewis, USA
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat	Sigma, St. Lewis, USA
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat	Sigma, St. Lewis, USA
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat	Sigma, St. Lewis, USA
2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat	Sigma, St. Lewis, USA
2',3'-Dideoxyadenosin-5'-triphosphat	Sigma, St. Lewis, USA
2',3'-Dideoxycytidin-5'-triphosphat	Sigma, St. Lewis, USA
2',3'-Dideoxyguanosin-5'-triphosphat	Sigma, St. Lewis, USA
2',3'-Dideoxythymidin-5'-triphosphat	Sigma, St. Lewis, USA

#### Radionukleotide:

Adenosin-5'-[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig
Adenosin-5'-[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig

#### DNA-Oligonukleotide:

zur Primer-Extension:

Oligo	Sequenz (5'→3')	komplementäre Position 16S RNA
#3,	CTT CTG CGG GTA ACG TC	481-497
#3a,	CAA ACC GCC TGC GTG CGC	575-592
#14,	CTT CTT CCT GTT ACC GT	66-82
#16,	TTC TTC GCG TTG CAT CG	962-978
#1540,	CAG CGT TCA ATC TGA GCC	21-39

zur Klonierung:

Oligo                      Sequenz (5'→3')

---

#UST7Xba,    GGT CTA GAT AAG GTA AGG AGG TGA TCC A

#DST7,        TCA CAC CAT GGG AGT GGG TTG CA

#### 4.4 Enzyme

Restriktionsendonukleasen:

<i>Xba</i> I	New England Biolabs, USA
<i>Nco</i> I	New England Biolabs, USA

Sonstige Enzyme:

AMV-reverse Transkriptase	Promega, USA
Pyrophosphatase, anorganische	Promega, USA
Proteinase K	Merk, Darmstadt
Lysozym	Sigma, St. Lewis, USA
Ribonuklease A	Sigma, St. Lewis, USA
Ribonuklease T1	Boehringer, Mannheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
RNase-Inhibitor RNasin, rekombinant	Promega, USA
T4 RNA-Ligase	New England Biolabs, USA
T4 Polynukleotidkinase	Promega, USA
T7 RNA-Polymerase	nach Hecker, 1989, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von B. Esters

#### 4.5 Puffer und Medien

1x TABE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat, pH 7.5 20 mM Natriumborat 2 mM EDTA
1x TAE-Puffer:	40 mM Tris-Acetat, pH 7.5 1 mM EDTA
1x TBE-Puffer:	89 mM Tris-Borat, pH 8.3 2.5 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8.0

	1 mM EDTA
YT-Medium:	8 g/L Trypton 5 g/L NaCl 5 g/L Hefeextrakt
	in Aqua dest. auf pH 7.4 mit NaOH
YT-Agar:	YT-Medium mit 15 g/L Agar

#### 4.6 Feinchemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agar	Sigma, St. Louis, USA
Agarose	Biozym, Hameln
Agarose (ultrapure)	Seakem, Hamburg
Aluminiumoxid (Alcoa)	Serva, Heidelberg
Amberlite MB-1	Biomedicals, Ohio, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, St. Louis, USA
Brij 35	Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Jansen, Beerse, Belgien
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Harnstoff	Sigma, St. Louis, USA
Hefeextrakt	Gibco BRL, Eggenstein
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
Polyethylenglykol (PEG6000)	Sigma, St. Louis, USA
Saccharose, p. A.	Merck, Darmstadt
Saccharose (zur Dichtegradientenzentrifugation)	Merck, Darmstadt
Spermidin	Sigma, St. Lewis, USA
Toluidine blue	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Trypton	Difco, Detroit, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

## 4.7 Verschiedenes

Sterilfilter FB030/3 (0.2 µm)	Schleicher und Schüll, Dassel
VS Filtermembranen (Porengröße 0,025 µm, ( 2,5 cm)	Millipore GmbH, Neu Isenburg
DE 81-Papier	Whatman, England
Röntgenfilm RX	Fuji, Japan
Röntgenfilm X-OMAT, Bio Max	Kodak, USA
Verstärkerfolie DuPont Cronex Lightning Plus Screen	DuPont, Bad Homburg

## 5 Methoden

### 5.1 Allgemeine mikrobiologische Methoden

Beim Umgang mit den verschiedenen Bakterienstämmen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Der mikrobiologische Abfall wurde vor der Entsorgung rückautoklaviert. Der Umgang mit rekombinanter DNA erfolgte unter Berücksichtigung der gesetzlichen Vorschriften zum Umgang mit rekombinanter DNA in Organismen (GVO).

#### 5.1.1 Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten

Alle verwendeten temperaturstabilen Lösungen, Puffer und Medien wurden durch Dampfdrucksterilisation (20 min, 120°C, 2-3 bar) autoklaviert. Die temperaturinstabilen Lösungen wurden mit Hilfe einer 0.2 µm Membran (FB030/3, Schleicher und Schuell) sterilfiltriert. Glasgeräte wurden für 4 h bei 210°C hitzesterilisiert.

### 5.1.2 Haltung und Sicherung von Zellstämmen

Alle benutzten Bakterienstämme wurden vor Benutzung aus tiefgefrorenen Stocks auf YT-Platten (4.5), die gegebenenfalls mit einem entsprechend selektiven Antibiotikum supplementiert waren (Amp mit 100 µg/ml), mit einer sterilen Impföse ausgestrichen und bei 37°C bis zum Wachstum von Einzelkolonien inkubiert. Die kurzfristige Sicherung neuer Stämme erfolgte durch Haltung auf YT-Platten (2.5, versehen mit dem entsprechenden Antibiotikum) bei 4°C. Zur langfristigen Sicherung wurde 1 ml einer üN-Kultur (5.1.3) in einem sterilen Stockgläschen mit 200 µl autoklaviertem 87 % (v/v) Glycerin versetzt, 30 Min. bei RT inkubiert und anschließend bei -70°C als Stock gelagert.

### 5.1.3 Anzucht von üN-Kulturen

Zur Anzucht von üN-Bakterienkulturen wurden Einzelkolonien von einer YT-Platte (4.5) in 25 ml YT-Medium (4.5), dem 50 µg/ml Ampicillin zugesetzt wurde, überimpft und auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C üT inkubiert. 800 ml Kulturen, die mit 50 µg/ml Amp versetzt worden waren, wurden dann aus den üT-Kulturen 1/100 angeimpft und üN auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C inkubiert.

### 5.1.4 Herstellung von kompetenten Zellen

Kompetente Zellen des Stammes HB101 wurden nach der von Dagert und Ehrlich, 1979 entwickelten Methode für Transformationsexperimente hergestellt. Die Überprüfung der Transformationsraten ergaben im Mittel eine Effizienz von ca.  $10^6$  Transformanden / µg eingesetzter pUC18-Plasmid-DNA. Eine 100 ml YT-Wachstumskultur wurde mit 1 ml einer üN-Kultur angeimpft und auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C inkubiert. Das Aufwachsen wurde bei einer  $OD_{560}$  von 0.6 gestoppt und

die Zellen wurden für 20 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen in vorgekühlten Zentrifugenbechern in einer Beckman J2-21 Zentrifuge (JA-14-Rotor) bei 4000 rpm und 4°C für 10 Minuten pelletiert. Die weitere Behandlung erfolgte im Kühlraum bei 4°C mit ebenfalls vorgekühlten Geräten und Lösungen. Nachdem das Zellpellet in 50 ml 0.1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert wurde, erfolgte eine einstündige Inkubation auf Eis. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 Minuten bei 4000 rpm und 4°C, wurde das Pellet in 4 ml eisgekühlter 85 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 15% (v/v) Glycerin aufgenommen und in Volumen à 200 µl aliquotiert.

Die Zellen erhielten durch eine Lagerung von 1-24 Stunden bei 4°C ihre höchste Kompetenz. Durch rasches Abkühlen in flüssigem Stickstoff und anschließender Lagerung bei -70°C können die Zellen mehrere Wochen verwendet werden.

#### **5.1.5 Transformation von Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*-Zellen**

Für ein Transformationsexperiment wurden 200 µl kompetente Zellen (5.1.4) auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 2-20 ng Plasmid-DNA gemischt. Nach einer Inkubation von 45-60 Minuten auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 3 Minuten bei 42°C. Anschließend wurden 800 µl auf 37°C vortemperiertes YT-Medium (4.5) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf einer YT-Festmediumplatte (100 µg Ampicilin/ml) ausgestrichen und bei 37°C inkubiert, bis Einzelkolonien sichtbar wurden.

## 5.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 UV/VIS-Spektroskopie

#### 5.2.1.1 Spektralphotometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung reiner Nukleinsäurelösungen wurde in einem Beckman Spektralphotometer (Modell DU 64) mit Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. Die zu messenden Lösungen wurden so verdünnt, daß die Absorptionswerte im linearen Bereich zwischen 0,1 und 1 OD lagen. Die Kalibrierung erfolgte jeweils gegen das entsprechende Lösungsmittel (TE-Puffer oder *A. dest.*). Zur Berechnung der Konzentration wurden, nach Verrechnung des Verdünnungsfaktors, vereinfacht folgende Beziehungen verwendet:

$$1.0 A_{260} \approx 37 \mu\text{g ssNS/ml}$$

$$1.0 A_{260} \approx 50 \mu\text{g dsNS/ml}$$

Zur Überprüfung der Reinheit von Nukleinsäurelösungen wurden Absorptionsspektren in einem Wellenlängenbereich von 220 nm bis 320 nm aufgenommen. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) gibt Anhaltspunkte über mögliche Verunreinigungen der gemessenen Probe. Bei einer reinen Präparation sollte der  $A_{260}/A_{280}$ -Wert zwischen 1.8 und 2.0 liegen. Kontaminationen durch Proteine oder Phenol führen zu deutlich geringeren Quotienten, was eine genaue Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration erschwert.

Bei Nukleinsäure-Lösungen, deren Konzentrationen für eine spektralphotometrische Bestimmung zu gering waren (<250 ng/ml), konnte die Menge unter Verwendung des Interkalationsfarbstoffes Ethidiumbromid und dessen UV-induzierter Fluoreszenz abgeschätzt werden: Da die Fluoreszenzintensität dieser Komplexe proportional zur absoluten

Nukleinsäure-Konzentration ist, kann die Menge in der zu untersuchenden Probe leicht über einen Vergleich mit Standardreihen bekannter DNA-Konzentrationen ermittelt werden. Mit Hilfe dieser Methode sind noch bis zu 20 ng DNA nachweisbar.

#### 5.2.1.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung von Gesamt-Proteinkonzentrationen in heterogenen Gemischen wurde ein Bradford-Assay (Bio-Rad) durchgeführt. Hierzu wurden in einem Microassay 800 µl Proteinlösung mit 200 µl Dye-Reagenz vermischt, 30 Min. bei RT inkubiert und anschließend bei 590 nm in einem Beckman Spektralphotometer (Modell DU 64) vermessen. Gleichzeitig wurde mit Hilfe eines Protein-Standards (Bio-Rad) eine Eichgerade erstellt, anhand deren Geradengleichung die unbekannte Proteinkonzentration errechnet werden konnte.

Für die Konzentration bei gegebener Extinktion gilt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz:

$$c = E \cdot \varepsilon^{-1} \cdot d^{-1}$$

- mit: c = molare Konzentration der absorbierenden Lösung  
 $\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient (des Proteins)  
bei der Wellenlänge (  $M^{-1}cm^{-1}$  )  
d = Länge des Lichtweges durch die absorbierende Lösung (hier 1 cm)  
E = gemessene Extinktion

#### 5.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion

Um wäßrige Nukleinsäurelösungen von Proteinen zu befreien, wurden Phenol/Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Dazu wurde die zu reinigende Lösung mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1, Phenol der Fa. Roth,

Karlsruhe) versetzt und mindestens 1 Minute sorgfältig auf dem Vortex geschüttelt. Die Probe wurde dann zur schnellen Phasentrennung 5 Min. bei 13000 rpm zentrifugiert (Hettich Tischzentrifuge), der wässrige Überstand ohne Interphase abgenommen und solange erneut extrahiert, bis keine Interphase mehr sichtbar war.

Anschließend wurde die Lösung einmal mit Chloroform extrahiert, um eventuelle Phenolreste und andere organische Rückstände zu entfernen. Dazu wurde 1 Volumen Chloroform zugegeben, gut gemischt und wiederum 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert (Hettich Tischzentrifuge). Die wässrige Phase wurde zur weiteren Bearbeitung in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

### **5.2.3 Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren**

Die zu fällenden Lösungen wurden, sofern es die Salzkonzentrationen erforderten, mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5.5 versetzt und dann mit 2-3 Volumen eiskaltem, absolutem Ethanol vermischt und 30 Min. bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die gefällten Nukleinsäuren 30 Min. bei 13000 rpm (Hettich Tischzentrifuge) abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (Hettich Tischzentrifuge, 10 min, 13000 rpm) wurde das Pellet lyophilisiert (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) und dann in entsprechender Lösung (Puffer oder *Aqua dest.*) aufgenommen.

### **5.2.4 Ethanolpräzipitation ribosomaler Untereinheiten und rekonstituierter Partikel**

Rekonstituierte Partikel und ribosomale Untereinheiten wurden mit 1 Volumen eiskaltem Ethanol gefällt. Auf die Zugabe von Fällungssalzen wurde aufgrund der im Saccharosegradienten herrschenden Salzkonzentrationen verzichtet. Nach Zugabe des Ethanols wurde 30 Min. auf Eis gefällt und anschließend



## 5.2.6 Isolation von DNA

### 5.2.6.1 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Die präparative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der von Hillen et al., 1981 beschriebenen Methode. Hierzu wurden 500 ml YT-Medium (4.5), mit einem entsprechendem Antibiotikum und 1/100 Volumen einer üN-Kultur angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory). Die so gewonnenen Zellen wurden dann durch Zentrifugation (10 Min. 8000 rpm, 4°C, Beckman Zentrifuge J2-21, Rotor JA-10) sedimentiert, das Zellpellet in 8 ml Saccharose-Lösung sorgfältig resuspendiert und in Ti55.2-Polycarbonatröhrchen (Beckman) überführt. Nach Zugabe von 3 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) und 3 ml Lysozym-Lösung wurde die Suspension 15 Min. auf Eis inkubiert, anschließend 2 ml Brij-Doc-Lösung hinzugegeben und für weitere 10 Min. auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde dann 30 Min. bei 44000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2), der klare Überstand wurde in einen Meßzylinder dekantiert und 30 Min. bei 37°C mit 50 µg RNase A /ml Überstand inkubiert. Nach Zugabe von 50 µg Proteinase K /ml Überstand wurde für weitere 15 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0.5 Volumen PEG-Lösung 30 Min. auf Eis gefällt und für 30 Min. bei 10000 rpm und 4°C pelletiert (Beckman Zentrifuge J2-21, Rotor JA-17). Das erhaltene DNA-Pellet wurde in 10 ml TE-Puffer (4.5) aufgenommen und in Greiner-Reaktionsgefäße á 5 ml aliquotiert. Jede Fraktion wurde einmal mit 1 Volumen TE-gesättigtem Phenol, einmal mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) und zweimal mit 1 Volumen Chloroform extrahiert. Die DNA-Lösung wurde durch eine Ethanol-Fällung (5.2.3) aufkonzentriert. Nach anschließendem Waschen mit 80% Ethanol und Lyophilisation (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) wurde das DNA-Pellet schließlich in 200 µl TE-Puffer resuspendiert. Dabei wurden jeweils 4 Fraktionen gepoolt und anschließend die entsprechenden Greiner-Reaktionsgefäße mit weiteren 200 µl TE-Puffer nachgewaschen.

Saccharose-Lösung:	25% (w/v) Saccharose 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Lysozym-Lösung:	20 mg/ml Lysozymchlorid 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Brij-Doc-Lösung:	2 Volumenteile 10% (w/v) Brij 35 1 Volumenteil 10% (w/v) Na-Deoxycholat in <i>Aqua dest.</i>
RNase A:	200 µg/ml RNase A in 100 mM NaOAc, pH 5.0 (die RNase wurde vor der Benutzung nach Maniatis <i>et al.</i> (1982) von DNase-Aktivität befreit)
Proteinase K:	20 mg/ml in <i>Aqua dest.</i>
PEG-Lösung:	30% (w/v) PEG <sub>6000</sub> in 1.5 M NaCl

#### 5.2.6.2 Isolierung analytischer Mengen von Plasmid-DNA

Zur schnellen Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab wurde die Methode von Ish-Horowitz und Burk (1981) verwendet. Hierbei wurden 3 ml einer üN-Kultur für 5 Minuten bei 12000 rpm (Heraeus Christ Biofuge A) pelletiert, in 200 µl Lyse-Lösung I resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lyse-Lösung II erfolgt eine weitere Inkubation für 5 Minuten auf Eis. Chromosomale DNA und Zelltrümmer wurden durch Zugabe von 150 µl 3 M KOAc, pH 4.8 und Inkubation für weitere 5 Minuten auf Eis gefällt. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 12000 rpm (Hettich Tischzentrifuge) zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Es folgte eine zweimale Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1), sowie eine einmalige Extraktion mit Chloroform. Die Plasmid-DNA wurde mit 2 Volumen absolutem Ethanol für 15 Minuten auf Eis gefällt und 15 Minuten bei 12000 rpm (Hettich Tischzentrifuge) zentrifugiert. Nach der Lyophyllisation (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) wurde die Plasmid-DNA in 300 µl TE-Puffer (4.5) resuspendiert.



### 5.2.7.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (dPAGE)

Zur analytischen Auftrennung von Primer Extension-Reaktionen oder Plasmidsequenzierungen wurden denaturierende 10% Polyacrylamidgele mit einer Vernetzung von 19:1 verwendet. Die Glasplatten wurden mit *A. dest.*, Ethanol und Aceton gereinigt und anschließend mit Repelcote (0,04% Dichlordimethylsilan in Chloroform) silikonisiert. Die Gellösung wurde mit 7 M Harnstoff versetzt. Als Gel- und Elektrophoresepuffer wurde 1x TBE verwendet. Die Gellösung wurde nach dem Lösen des Harnstoffes entgast und mit 60 µl TEMED und 600 µl 10% (w/v) APS versetzt. Anschließend wurde die Lösung zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Die Gele hatten die Dimensionen 400 x 300 x 0.4 mm. Die Nukleinsäureproben wurden in TBE/Harnstoff-Probenpuffer aufgenommen, für 3 Minuten bei 96°C denaturiert und auf vorgeheizten Gelen bei 75W aufgetrennt. Um die Kontamination des Anodenpuffers möglichst gering zu halten wurde das untere Gelende mit DE-81 Papier umwickelt, welches als Ionentauscher das radioaktive Phosphat zu binden vermag.

TBE/Harnstoff-Probenpuffer: 0.025 % Bromphenolblau  
0.025 % Xylencyanol  
7 M Harnstoff  
in 1 x TBE-Puffer (4.5)

### 5.2.7.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidgelsystem nach Laemmli, 1970 benutzt. Hierbei wird als denaturierendes Agens Natriumdodecylsulfat (SDS) eingesetzt, welches als amphiphiles Detergens die native Proteinstruktur auflöst. Die zu analysierenden Proteine werden aufgrund der denaturierenden Bedingungen (Aufkochen in SDS-Puffer, 0.1% SDS im Trenngel) ausschließlich in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Die Geldimension betrug 180 x 165 x 1 mm. Die Proteine wurden zunächst in

einem Sammelgel (ca. 40 x 165 mm) fokussiert und dann in einem Trenngel (ca. 140 x 165 mm) aufgetrennt.

Die Proteinproben (10-40  $\mu$ l) wurden entweder nach der Lyophilisation direkt in SDS-Probenpuffer resuspendiert oder auf ein Volumen von 10-40  $\mu$ l mit SDS-Probenpuffer aufgefüllt. Danach mit 2-8  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol vermischt, 10 Min. aufgekocht und anschließend 10 Min. auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA, bis der Bromphenolblau-Marker das untere Ende des Trenngels erreicht hatte. Die Elektrophoresedauer betrug in der Regel 2-2,5 h.

Lösung A (30 % Acrylamidlösung):	300 g/l Acrylamid 8 g/l Bisacrylamid mit Amberlite entionisieren und filtrieren
Lösung B:	1.5 M Tris-HCl, pH 8.8
Lösung C:	10% (w/v) SDS
Lösung D:	500 mM Tris-HCl, pH 6.8
Elektrophoresepuffer:	28.8 g/l Glycin 6 g/l Tris 1 g/l SDS mit HCl auf pH 8.8 einstellen

Für ein 15% SDS-Gel wurden folgende Lösungen in folgenden Anteilen gemischt:

15% Trenngellösung:	5 ml Lösung A 2,5 ml Lösung B 0,1 ml Lösung C ad 10 ml <i>Aqua dest.</i> 10 µl TEMED 100 µl 10% APS
6% Sammelgellösung:	2 ml Lösung A 0.1 ml Lösung C 2.5 ml Lösung D 5.4 ml <i>Aqua dest.</i>  5 µl TEMED 50 µl 10% APS
Probenpuffer:	2.5 ml Lösung D 2 ml Lösung C 2 ml Glycerin 0.1 ml 0.1% (w/v) Bromphenolblau 3.4 ml <i>Aqua dest.</i>

Die Detektion der Banden erfolgte durch Coomassie-Färbung (5.2.8.1), oder bei geringen Proteinkonzentrationen nach erfolgter Coomassie-Färbung zusätzlich durch die empfindlichere Silberfärbung (5.2.8.3).

#### 5.2.7.4 Kombinierte Agarose-Polyacrylamidgelelektrophorese (Mischgele)

Zur Analyse von rekonstituierten Partikeln und freien RNA-Transkripten wurden 1% Agarose / 3% Polyacrylamidgele (200:1) in vertikaler Ausrichtung verwendet. Dieses Verfahren wurde von Dahlberg *et al.*, 1969 entwickelt. Das Gelsystem wurde durch ein ca. 2 cm hohes Sockelgel stabilisiert, welches

zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen wurde. Die vorbereiteten Glasplatten wurden mit Sockelgel für ca. 30 Min. in einem Wärmeschrank (37°C) vorgewärmt um die vorzeitige Polymerisation des Agaroseanteils zu verhindern. Lösung 1 wurde durch mehrmaliges kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und in einem Wasserbad bis zur Verwendung bei 70°C vortemperiert. Lösung 2 wurde kurz entgast und anschließend ebenfalls im Wasserbad vortemperiert (70°C). Lösung 2 wurde dem Wasserbad entnommen und mit 100 µl TEMED versetzt und schnell mit Lösung 1 gemischt. Durch Zugabe von 600 µl 10% APS wurde die Polymerisation gestartet und die Gellösung zügig zwischen die vortemperierten Glasplatten gegossen. Die Polymerisationszeit betrug 1,5-2 h.

Die RNA- und Partikelproben wurden mit 1xTABE-Probenpuffer versehen und bis zur Auftrennung auf Eis gehalten. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke bei 6-10 mA üN bei einer Temperatur von 4°C. Die Gele wurden anschließend durch Toloidinblau (5.2.8.2) gefärbt. Zur Dokumentation wurden die Gele auf einem Geltrockner (Biorad Dual Temperature Slab Gel Dryer, Model 1125B) für 1,5 Stunden bei 60°C getrocknet und somit dauerhaft konserviert.

Sockelgel:	2 ml 30% Acrylamidstammlösung (200:1) 0,6 ml 10x TABE (5) 3,4 ml <i>Aqua dest.</i> 5 µl TEMED 30 µl 10% APS
Lösung 1:	1 g Agarose 50 ml <i>Aqua dest.</i>
Lösung 2:	10 ml 30% Acrylamidstammlösung (200:1) 10 ml 10x TABE 30 ml <i>Aqua dest.</i>
TABE-Probenpuffer:	0,025% Bromphenolblau (w/v) 0,025% Xylencyanol (w/v) 25% Glycerin in 1x TABE (5)

#### 5.2.7.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese von assemblierten Partikeln

Zur hochauflösenden Auftrennung der ribosomalen Proteine assemblierter Partikel wurde die von Geyl et al., 1981 entwickelte Methode verwendet. Zu je 10 ml eiskalter „Gellösung 1. Dimension“ wurden 35 µl TEMED und 100 µl 7% (w/v) APS gegeben. In ein unten mit doppeltem Parafilm abgedichtetes Glasröhrchen wurden jeweils 2 ml der Lösung gegossen. Der Meniskus wurde mit 4 M Harnstoff überschichtet, um die Oberfläche für das Auftragen zu glätten. Nach der Polymerisation von ca. 1,5 h wurden die Röhrchen in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. Anschließend wurden der obere und der untere Laufpuffer in die entsprechenden Pufferkammern gefüllt. Die assemblierten Partikel wurden während der Polymerisation der 1. Dimension mit je 5 µl RNase T1 versetzt und 1,5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Partikellösung mit 100 µl 2D-Probenpuffer versetzt und in einem Gesamtvolumen von ca. 200 µl aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C für 30 Min. bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA pro Röhrchengel. Anschließend wurde die Stromstärke auf 4 mA pro Gel erhöht, bis der Farbmaler das untere Ende der Gele erreicht hatte. Die Gesamtdauer betrug in der Regel zwischen 4,5 – 5 Stunden.

Während des Laufes der 1. Dimension wurde die Kammer für die 2. Dimension zusammengebaut und in den flachen Kunststoffuntersatz gebracht. 130 ml „Gellösung 2. Dimension“ wurden mit 260 µl TEMED und 2,6 ml 10% (w/v) APS versetzt und als Sockelgel in den Kunststoffuntersatz gegossen. Die Polymerisationszeit beträgt ebenfalls ca. 1,5 Stunden.

Nach dem Lauf der 1. Dimension wurden die Röhrchengele unter Verwendung einer HPLC-Spritze mit Wasser vorsichtig aus den Glasröhrchen herausgespült und in die vorgesehenen Kerben der Kammer für die 2. Dimension transferiert. 200 ml „Gellösung 2. Dimension“ wurden mit 400 µl TEMED und 4 ml 10% (w/v) APS versehen und zum Gießen der Trenngele verwendet. Hierbei war darauf zu achten, daß die Röhrchengele mit einpolymerisiert wurden. Die Polymerisationszeit beträgt ca. 1,5 Stunden.

Die Elektrophorese erfolgte ebenfalls bei 4°C unter Verwendung des unten angegebenen Laufpuffers. Ihre Dauer betrug über Nacht ca. 16-19 Stunden



## 5.2.8 Nachweis von Nukleinsäuren und Proteinen in Polyacrylamidgelen

### 5.2.8.1 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE (5.2.7.3) erfolgte über den Farbstoff 'Coomassie Brilliant Blue R250'. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese in einer Coomassie-Färbelösung 1 h unter leichtem Schütteln auf einem Horizontalschüttler gefärbt. Dann wurde das Gel in einer Entfärbelösung für mindestens 3 h (alternativ üN) wieder entfärbt. Bei diesem Entfärbeporgang konnten die Proteine dann als dunkelblau gefärbte Banden vor dem hellblauen Hintergrund detektiert werden. Mit Hilfe dieser Methode können bis zu 100 ng Protein/Bande nachgewiesen werden.

Coomassie-Färbelösung:                    50% (v/v) Methanol  
    10% (v/v) Essigsäure  
    0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250

Entfärbelösung:                         10% (v/v) Methanol  
    10% (v/v) Essigsäure

### 5.2.8.2 Toluidinblaufärbung von Mischgelen

Mischgele wurden nach der Elektrophorese für 2 Stunden in 0,1% (w/v) Toluidinblau in 7,5% (v/v) Essigsäure gefärbt. Bei diesem Verfahren werden selektiv Nukleinsäuren angefärbt. Die Entfärbung erfolgte über Nacht in 0,1% (v/v) Essigsäure. Die Empfindlichkeit liegt bei 100-500 ng/Bande.

### 5.2.8.3 Silberfärbung von Proteinen

Der Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen durch Silberfärbung nach der von Blum *et al.* 1987 beschriebenen Methode ermöglichte eine empfindlichere Detektion von Proteinbanden als die oben beschriebene

Coomassie-Färbung. Hierzu wurde das Gel nach abgeschlossener Elektrophorese für 2 h in Fixierlösung I unter leichtem Schütteln fixiert. Danach wurde das Gel zweimal für 10 Min. in 50% Methanol und einmal für 10 Min. in 30% Ethanol gewaschen. Anschließend folgte eine Verstärkung für 1 Minute in einer Natriumthiosulfatlösung (0.2 g/l). Nach dreimaligem Wässern für jeweils 20 s in *Aqua dest.* erfolgte die Färbung in einer Färbelösung für 30 min. Die Entwicklung wurde in einer Entwicklerlösung bis zur gewünschten Intensität (mindestens 10 min) durchgeführt. Zum Stoppen des Entwicklungsvorganges wurde das Gel ca. 10 Min. in Fixierlösung II geschwenkt. Die Empfindlichkeit dieser Methode liegt bei bis zu 2-5 ng Protein.

Die so gefärbten Gele wurden dann zur vorübergehenden Lagerung in Folie eingeschweißt oder auf einem Geltrockner (Biorad Dual Temperature Slab Gel Dryer, Model 1125B) für ca. 1,5 h bei 60°C getrocknet und somit dauerhaft konserviert.

Fixierlösung I:	50% (v/v) Methanol 12% (v/v) Essigsäure 0.0185% (v/v) Formaldehyd (37 %)
Färbelösung:	2 g/l Silbernitrat 0.028% (v/v) Formaldehyd (37 %)
Entwicklerlösung:	60 g/l Natriumcarbonat 0.04 g/l Natriumthiosulfat 0.0185 % (v/v) Formaldehyd (37 %) (immer frisch angesetzt)
Fixierlösung II:	25% (v/v) Methanol 12% (v/v) Essigsäure

## 5.3 Spezielle Methoden

### 5.3.1 Präparation von Template-DNA

Aus der nach 5.2.6.1 präparierten Plasmid-DNA (pIK, pIK11 und pIK16S) wurden durch Restriktionshydrolysen mit *Sma*I die benötigten Template-Fragmente für die Herstellung der verkürzten Transkripte (T614Lwt, T614Lmu und T614) präpariert. Die Herstellung der Template-DNA für die Transkription der Volllänge erfolgte durch Restriktion mit *Xba*I. In 400 µl Ansätzen wurden je 400 µg Plasmid-DNA mit den entsprechenden Pufferbedingungen sowie 100 Units des jeweiligen Restriktionsenzym versetzt und über Nacht bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Nach der Restriktion wurden die Ansätze auf einem 0,8 %igen Agarosegel durch Vergleich mit einer kb-Leiter auf die Vollständigkeit der Hydrolyse und auf ihre korrekte Länge hin überprüft. War die Restriktion erfolgreich wurden das Volumen der Ansätze auf das Doppelte mit *A. dest* angehoben. Die Aufarbeitung erfolgte durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (5.2.2) mit anschließender Ethanol-Präzipitation (5.2.3). Nach der Resuspension in 200 µl TE-Puffer wurde die Qualität der Template-DNAs erneut auf 0,8% Agarosegelen überprüft und die abgeschätzte Konzentration mit der einer im Spektralphotometer vermessenen Probe verglichen. (5.2.1.1)

Enzyme & Pufferbedingungen:

*Sma*I: NEB 4

*Xba*I: NEB 2

100 µg / ml BSA

### 5.3.2 Phosphorylierung von DNA-Oligonukleotiden

DNA-Oligonukleotide wurden durch eine Kinasierung mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP am 5'-Ende radioaktiv markiert. Diese Reaktion wird durch die T4-Polynukleotidkinase katalysiert. In einem Reaktionsvolumen von 20 µl werden 10 pmol des entsprechenden Oligonukleotids mit 5 µl  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (ca. 50 µCi)

und einer Unit T4-Polynukleotidkinase in 1x Kinasepuffer für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch die Inkubation von 10 Minuten bei 68°C gestoppt. Nach Zugabe von 1 µl 20 µg /ml Glycogen, 2 µl 7.5 M Ammoniumacetat und 100 µl absolutem Ethanol erfolgt die Fällung in flüssigem Stickstoff, sowie eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 12000 rpm und 4°C. Nach dem Waschen mit 80% Ethanol und dem Trocknen für 20 Minuten wird das Pellet in 20 µl TE-Puffer unter Verwendung eines Eppendorf-Schüttlers für 2-3 Stunden resuspendiert. Anschließend wurde die Aktivität durch Messung der Cerenkov-Strahlung (Beckman LS 5000 TD Szintillationszähler) eines 1 µl-Aliquots bestimmt.

1 x Kinasepuffer:        50 mM Tris-HCl, pH 7.6  
                              5 mM DTT  
                              10 mM MgCl<sub>2</sub>  
                              0.1 mM EDTA, pH 8.0

### 5.3.3 *In vitro* Transkription mit T7-RNA-Polymerase

Die in den Rekonstitutionsexperimenten verwendeten Transkripte wurden in präparativen Ansätzen durch *in vitro* Transkription mit DNA-abhängiger T7-RNA-Polymerase (Präparation, B. Esters) unter Verwendung des RiboMAX-Protokolls der Firma Promega hergestellt. Dabei wurde gemäß Herstellerangaben verfahren. In einem 960 µl Ansatz wurden 32 pmol der jeweiligen Template-DNA mit 5x RiboMAX-Puffer, 500 Units RNasin-Inhibitor, sowie 4,8 Units anorganischer Pyrophosphatase versetzt. Die Nukleotide wurde bei diesem großen Ansatzvolumen in einem Premix direkt aus den Stocklösungen eingesetzt. Der Premix wurde so angesetzt, daß alle NTPs im Ansatz in einer Endkonzentration von 3 mM vorliegen. Nach der Zugabe von ca. 10000 Units T7-Polymerase wurde der Ansatz 2h bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 10000 Units T7-Polymerase erfolgte eine zweite Inkubation für 2h bei 37°C. Durch Zugabe von 11 µl RNase-freier DNase I (40 u/µl) und einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Template-DNA hydrolysiert. Die Reaktion wurde durch eine kurze Inkubation auf Eis gestoppt. Anschließend wurde das Reaktionsvolumen zur Extraktion auf 2 ml

angehoben. Die Transkripte wurden zweimal durch Zugabe von 1 Volumen Phenol/Chloroform extrahiert und aus dem wäßrigen Überstand durch eine Ethanolfällung (5.2.3) präzipitiert. Nach dem Waschen mit 80% Ethanol und 20-minütigem Trocknen auf Eis wurde die RNA in 200 µl TE-Puffer resuspendiert. Auf einem 2% Agarosegel wurde die Qualität der Transkripte analysiert, sowie die Konzentration durch Vergleich mit einem RNA-Marker mit definierter Auftragsmenge bestimmt. Der RNA-Marker wurde in einem kleineren Transkriptionsansatz hergestellt. Im Gegensatz zu den präparativen Ansätzen wurde der RNA-Marker nach der Aufarbeitung durch Verwendung von G50-Quickspin Columns der Firma Boehringer, Mannheim von noch vorhandenen Nukleotiden befreit. Dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die Konzentration der Marker-RNA wurde im Spektralphotometer bestimmt. Durch Vergleich mit einer Messung vor der Nukleotidaufreinigung konnte der Anteil der Nukleotide an der RNA-Menge auf ca. 50% bestimmt werden.

RiboMAX-Puffer:	80 mM HEPES-KOH, pH 7.5
	12 mM MgCl <sub>2</sub>
	2 mM Spermidin
	40 mM DTT
NTP-Stocks:	120 mM rATP
	108 mM rCTP
	121 mM rUTP
	137 mM rGTP

#### **5.3.4 *In vitro* Rekonstitution ribosomaler Partikel**

Die Rekonstitutionsexperimente wurden in abgewandelter Form nach Held und Nomura, 1973 durchgeführt. Ribosomale RNA wurde in einer Endkonzentration von 200 nM in 1x Rekonstitutionspuffer mit dem 5fach molaren Überschuß an TP70 versetzt, kurz gemischt und bei der jeweiligen Temperatur für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 10 Min. auf Eis abgekühlt und dann entweder für die 2D-Analysen auf linearen

Saccharosegradienten vom überschüssigen TP70 getrennt oder für die Partikelmodifikationen direkt weiterverwendet.

1x Rekonstitutionspuffer:                    30 mM Tris-HCl, pH 7.4  
    330 mM KCl  
    20 mM MgCl<sub>2</sub>  
    6 mM β-Mercaptoethanol

### 5.3.5 Präparation von Gesamtribosomen

Aus gefrorenen MRE600 Zellen wurden Gesamtribosomen nach folgendem Verfahren präpariert. Ca. 50 g Zellen wurden in einem Mörser nach und nach mit der gleichen Menge Alcoa versehen und 10 Min. kräftig aufgerieben, bis eine cremartige Konsistenz vorliegt. Das Gemisch wurde mit 45 Units DNase I /g Zellen versetzt, gemischt und 20 Min. auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 10-20 ml Storage-Puffer wurde die Zellmasse aufgeschwemmt und anschließend in Corex-Röhrchen aliquotiert. Es folgte eine Zentrifugation für 30 Min. bei 5000 rpm und 4°C (Heraeus Megafuge 1.0R). Der honig-gelbe Überstand wurde in JA-17 Zentrifugenbecher überführt und auf Eis zwischengelagert. Die Pellets wurden jeweils mit 10-20 ml frischem Storage-Puffer aufgeschwemmt. Anschließend wurden die Pellets erneut bei 5000 rpm und 4°C für weitere 15 Min. zentrifugiert (Heraeus Megafuge 1.0 R). Die Überstände wurden vereinigt und zu gleichen Teilen auf vorbereitete 15 ml Zuckerkissen verteilt. Anschließend wurde üN für 20 h bei 40000 rpm und 4°C (Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor Ti55.2) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die pelletierten Ribosomen auf einem Horizontal-Schüttler auf Eis in mehreren Gaben à 500 µl Storage-Puffer vorsichtig resuspendiert. Dabei wurde darauf geachtet, die Ribosomen möglichst konzentriert zu halten. Nach Bestimmung der OD Ribosomen /ml durch eine Messung bei 260 nm wurden die Ribosomen in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

Storage-Puffer:	50 mM Na-Cacodylat, pH 7.2 10 mM MgCl <sub>2</sub> 150 mM KCl 1,5 mM DTT
Zuckerkissen:	20 mM Tris-HCl, pH 7.5 500 mM NH <sub>4</sub> Cl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 1,1 M Saccharose zur Dichtegradientenzentrifugation 10 mM β-Mercaptoethanol

### 5.3.6 Präparation ribosomaler Untereinheiten

Ribosomale Untereinheiten (50S und 30S) wurden aus Gesamtribosomen (5.3.5) durch Trennung auf linearen Saccharosegradienten (10%-30%) präpariert. Diese wurden auf eine Magnesiumkonzentration von 1 mM eingestellt, was zu einer Trennung der ribosomalen Untereinheiten führt.

Es wurden jeweils 60-80 OD pro Gradient aufgetragen und anschließend  $\text{üN}$  für 13 h bei 21000 rpm und 4°C (Beckman L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor SW28) zentrifugiert. Die Gradienten wurden dann unter Verwendung einer Peristaltikpumpe (LKB Bromma 12000 Varioperpex Peristaltic Pump) durch ein Durchfluß-Spektralphotometer (LKB Bromma 2138 UVicord S) bei 280 nm geleitet. Auf einem an das Spektralphotometer angeschlossenen Schreiber (LKB Bromma 2210 2-Channel Recorder) wurde die Absorption bei 280 nm verfolgt und die auftretenden Banden in Greiner-Reaktionsgefäßen fraktioniert. Die Fraktionen wurden mit 1 Volumen eiskaltem Ethanol präzipitiert. Anschließend wurden die Konzentrationen der fraktionierten Untereinheiten im Spektralphotometer bestimmt. Jeweils 1  $\mu\text{l}$  einer Fraktion wurde in einem Gesamtvolumen von 1 ml sterilem *Aqua dest.* in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen. Dabei entspricht  $1\text{OD}_{260}$  in etwa 36 pmol 50S und 72 pmol 30S Untereinheiten.



### 5.3.8 Saccharosegradienten zur Analyse ribosomaler Untereinheiten und rekonstituierter Partikel

Lineare Saccharosegradienten von 10%-30% Saccharose wurden zur Trennung der Gesamtribosomen in ribosomale Untereinheiten verwendet. Die Gradienten, mit einem Gesamtvolumen von 36 ml, wurden aus den entsprechenden Saccharose-Lösungen unter Verwendung eines Gradientenmischers hergestellt und direkt in vorbehandelte Polyallomerröhrchen für den SW28-Rotor gegossen. Die Polyallomerröhrchen wurden mit 0,1% SDS vorbehandelt und gründlich mit *Aqua dest.* gespült. Anschließend wurden sie in einem Wärmeschrank bis zum Gebrauch getrocknet. Zur Analyse rekonstituierter Partikel wurden lineare Gradienten von 5%-20% Saccharose mit einem Gesamtvolumen von 16 ml verwendet. Diese wurden aus den jeweiligen Saccharose-Lösungen nach der gleichen Vorgehensweise wie die Gradienten zur Untereinheitentrennung hergestellt. Als Gradientenpuffer wurde jedoch Rekonstitutionspuffer statt Storage-Puffer verwendet. Alle Gradienten wurden bis zur Beladung bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Gradienten wurden dann wie unter (5.3.6) beschrieben fraktioniert und die Partikelfractionen gesammelt. Die Partikel wurden mit 1 Volumen eiskalten, absolutem Ethanol gefällt. Nach dem Waschen mit 1 ml 80 % Ethanol und einer 20-minütigen Trocknungsphase auf Eis wurden die Partikel in 100 µl 1x Rekonstitutionspuffer resuspendiert.

Gradientenlösungen zur Untereinheiten-Trennung:

10% Saccharose-Lösung:

10% Saccharose (w/v)  
zur Dichtegradienten-  
zentrifugation  
50 mM Tris-HCl, pH 7.6  
50 mM NH<sub>4</sub>Cl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
6 mM β-Mercaptoethanol

30% Saccharose-Lösung:

30% Saccharose (w/v)  
zur Dichtegradienten-  
zentrifugation  
50 mM Tris-HCl, pH 7.6  
50 mM NH<sub>4</sub>Cl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
6 mM β-Mercaptoethanol

Gradientenlösungen zur Partikelanalyse:

5% Saccharose-Lösung:

5% Saccharose (w/v)  
(zur Dichtegradienten-  
zentrifugation)  
30 mM Tris-HCl, pH 7.4  
330 mM KCl  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
6 mM β-Mercaptoethanol

20% Saccharose-Lösung:

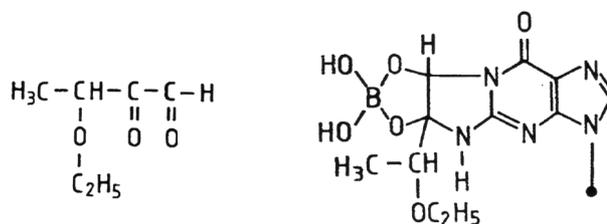
20% Saccharose (w/v)  
(zur Dichtegradienten-  
zentrifugation)  
30 mM Tris-HCl, pH 7.4  
330 mM KCl  
20 mM MgCl<sub>2</sub>  
6 mM β-Mercaptoethanol

### 5.3.9 Partikelmapping mit Kethoxal

Die Partikel für die Strukturuntersuchungen wurden wie unter (5.3.4) beschrieben assembliert. Da im Vergleich zu den Proteinanalysen nur eine geringere Menge an Partikeln erforderlich war, wurden das Reaktionsvolumen verkleinert. In Reaktionsvolumina von 50 µl wurden die zu untersuchenden RNAs (Endkonzentration: 200 nM) in 1x Rekonstitutionspuffer mit einem 5fach molaren Überschuß an TP70 versetzt und 1 Stunde bei der jeweiligen Assemblierungstemperatur (12°C, 30°C oder 40°C) inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Jeder Ansatz wurde halbiert. Die zu modifizierende Hälfte jedes Ansatzes wurden mit 1,3 µl Kethoxallösung P versetzt. Die andere Hälfte wurde als unmodifizierte

Kontrolle mitgeführt und das Kethoxal-Volumen durch 1x Rekonstitutionspuffer ersetzt. Alle Ansätze wurden bei 10°C für 30 Minuten inkubiert. Die Temperatur wurde so gewählt, daß die Modifikationstemperatur unterhalb der niedrigsten Assemblierungstemperatur liegt, um weitere Strukturveränderungen während des Modifikationszeitraums zu unterbinden.

Kethoxal modifiziert ausschließlich einzelsträngige Guanosine am N1 und N2 durch Bildung eines basenlabilen Fünfringes zwischen den beiden Carbonylgruppen des Kethoxals und den genannten Positionen des Guanosins. Dieser labile Fünfring kann durch die Anwesenheit von Borat stabilisiert werden. Die Strukturformel von Kethoxal und das durch Modifikation entstehende Addukt sind in nachfolgender Abbildung dargestellt.



Die Strukturformel von Kethoxal (links) und das durch die Modifikation resultierende Addukt am Guanotin

Nach Zugabe von 7,9 µl 1 M NaOAc, pH 6.4, 1,3 µl 0,5 M Na-Borat und 79 µl absolutem Ethanol wurden die Partikel für 30 Minuten auf Eis gefällt. Nach dem Waschen mit 200 µl 80% Ethanol und dem 10-minütigen Trocknen der Pellets auf Eis erfolgte die Resuspension in 200 µl *A. dest* mit 10 mM Na-Borat. Die Partikel wurden anschließend in Primer-Extension Analysen (5.3.12) untersucht. Die Nukleotidpositionen wurden durch eine parallel durchgeführte Primer-Extension-Sequenzierung (5.3.13) bestimmt.

Kethoxallösung P  
(zur Partikelmodifikation)

50 µl Kethoxal-Stocklösung  
ad 1 ml 10% Ethanol

### 5.3.10 kinetische Strukturanalysen mit Kethoxal

Zur Untersuchung zeitaufgelöster Faltungsvorgänge wurde eine von Banerjee *et al.*, 1995 entwickelte Methode abgewandelt. Die Strukturbildung denaturierter Transkripte wurde bei einer konstanten Temperatur von 30°C in Anwesenheit von Kethoxal verfolgt. Die eingesetzte RNA-Menge wurde so gewählt, daß pro Meßzeitpunkt für die spätere Primer-Extension-Analyse ca 1,7 µg RNA vorlagen. Zu der Anzahl der für die Zeitpunkte zu entnehmenden Proben wurden noch eine Probe für die unmodifizierte Kontrolle, sowie eine Probe als Reserve hinzuaddiert. Im Denaturierungsansatz wurde die RNA in einer Konzentration von 690 nM im Falle der leaderhaltigen Transkripte und 780 nM im Falle der leaderfreien Transkripte in Gegenwart von 1x Modifikationspuffer eingesetzt. Die Ansätze wurde für 3 Minuten bei 96°C denaturiert. Der Reaktionsansatz wurde so vorbereitet, daß die Endkonzentration der RNA 43 nM betrug. Der Reaktionsansatz enthielt 231 µl Kethoxallösung K. Das Volumen von Reaktionspuffer und *A. dest.* wurden so gewählt, daß nach Zugabe der RNA in den Reaktionsansatz diese in 1x Modifikationspuffer vorlag. Vom Denaturierungsansatz wurde ein Aliquot als unmodifizierte Kontrolle entnommen. Die übrige RNA wurde in den Reaktionsansatz überführt und dadurch das Experiment gestartet. Die erste Probe wurde nach 5 Sekunden entnommen und als Zeitwert Null definiert. Die weiteren Proben wurden zu definierten Zeiten entnommen und durch Überführung in vorbereitete Fällungsansätze unmittelbar gefällt, wodurch die Modifikationsreaktion durch Ausdünnung des Kethoxals gestoppt wird. Nach der Fällung des letzten Meßwertes wurde die während des ganzen Experimentes mitgeführte unmodifizierte Kontrolle ebenfalls gefällt. Nach der Fällung des Aliquots für den letzten Zeitwert werden alle Proben weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert, um für jede entnommene Probe eine minimale Fällungsdauer von 30 Minuten zu gewährleisten. Anschließend wurden alle Proben 30 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach dem Waschen mit je 400 µl 80 % Ethanol erfolgte ein Trocknen für ca. 20 Minuten auf Eis. Die Pellets wurden in 40 µl TE-Puffer resuspendiert und in Primer-Extension-Analysen (5.3.12) auf strukturelle Unterschiede untersucht. Die

Nukleotidpositionen wurden durch eine parallel durchgeführte Primer-Extension-Sequenzierung (5.3.13) bestimmt.

Kethoxallösung K (zur kinetischen Modifikation)	0,5 µl Kethoxal-Stocklösung ad 1 ml 10% Ethanol
1x Modifikationspuffer:	50 mM Hepes-NaOH, pH 7.5 20 mM Na-Borat 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM EDTA 70 mM NaCl

### 5.3.11 Plasmid-Sequenzierung

Plasmide wurde unter Verwendung des Sequenase 2.0-Kits der Firma USB sequenziert. Dabei wurde das durch PCR amplifizierte und einklonierte Fragment durch Sequenzierung unter Verwendung der beiden Oligos UST7Xba und DST7 bis über beide Insertionsschnittstellen hinaus überprüft.

5 µg DNA des entsprechenden Plasmids in 10 µl werden mit 40 µl einer 0,25 M NaOH/0,25 mM EDTA-Lösung versetzt und 40 Min. bei 37°C denaturiert. Nach Zugabe von 5 µl 3M NaOAc, pH 5.2 und 165 µl absoluten Ethanol erfolgt die Fällung in flüssigem Stickstoff. Anschließend wird für 30 Min. bei 12000 rpm zentrifugiert. Nach dem Waschen und Lyophilisieren erfolgt die Resuspension erst unmittelbar vor dem Ansetzen der Hybridisierung, um eine vorzeitige Renaturierung der DNA zu verhindern. Durch Zugabe von 7 µl A. dest., 2 µl Sequenase-Reaktionspuffer und 1 µl Oligo (entspricht 0,1-0,2 pmol) wird der Hybridisierungsansatz vorbereitet. Der Ansatz wird für 2 Min. bei 65°C denaturiert und die Hybridisierung erfolgt beim anschließenden langsamen Abkühlen auf Raumtemperatur.

Der Markierungsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

1 µl 0,1 M DTT
2 µl dG Labeling Mix (1:5 verdünnt in A. dest.)
0,5 µl α-[ <sup>32</sup> P]-dATP
2 µl Sequenase (1:8 verdünnt in Dilutionbuffer)
10 µl Hybridisierungsansatz

Der Markierungsansatz wird für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2 Minuten werden schon vorbereitete Aliquots à 2,5 µl der NTP-Lösungen für 1 Minute bei 37°C vorinkubiert. Anschließend werden vom Markierungsansatz 3,5 µl zu jeder NTP-Lösung dazugegeben und weitere 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von je 4µl Stopp-Lösung und Inkubation für 2 Minuten bei 96°C gestoppt. Nach dem raschen Abkühlen erfolgt die elektrophoretische Auftrennung auf einem Sequenziergel (5.2.7.2).

### 5.3.12 Primer-Extension-Reaktion

Die Primer-Extension-Analyse erfolgte nach einem abgewandelten Protokoll von Stern *et al.*, 1988. In einem Reaktionsansatz von 4,5 µl wird 1 µl der zu analysierenden RNA mit  $5 \times 10^5$  cpm bis  $1 \times 10^6$  cpm eines 5'-[ $\gamma^{32}\text{P}$ ]-markierten Oligonukleotids in 1x Hybridisierungspuffer für 1 Minute bei 60°C inkubiert und durch langsames Abkühlen auf Raumtemperatur hybridisiert.

Bei der Vorbereitung der RNA ist darauf zu achten, daß alle RNAs im gleichen Maßstab aufgearbeitet werden, um vergleichbare Mengen in gleichen Volumina zu erhalten. Die eingesetzte Aktivität des Oligonukleotids richtete sich nach der Effizienz der Markierungsreaktion.

In dem Reaktionsansatzvolumen von 6 µl wurden 2 µl des Hybridisierungsgemisches mit 2 µl dNTP-Lösung und einer Unit AMV reverser Transkriptase in 1 x Verlängerungspuffer für 30 Minuten bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6 µl TBE/Harnstoff-Probenpuffer gestoppt und die Reaktionsprodukte für 3 Minuten bei 96°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte auf denaturierenden 10% Polyacrylamidgelen mit einem Vernetzungsgrad von 19:1(5.2.7.2).

### 5.3.13 Primer-Extension-Sequenzierung

Für die RNA-Sequenzierung wurden 2 µl RNA in einem Gesamtvolumen von 8,5 µl mit  $1 \times 10^6$  cpm des markierten Oligonukleotids in 1 x Hybridisierungspuffer für 1 Minute bei 60°C inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die Sequenzierungsreaktion wurden 4 Reaktionsgefäße mit 2 µl der entsprechenden ddNTP-Lösung, sowie einer Unit AMV reverse Transkriptase in 1x Verlängerungspuffer vorbereitet. Je 2 µl des Hybridisierungsansatzes wurden zu den 4 Reaktionsansätzen hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Verlängerungsreaktion für 30 Minuten bei 42°C. Durch Zugabe von 6 µl TBE/Harnstoff-Probenpuffer wurden die Reaktionen gestoppt und für 3 Minuten bei 96°C denaturiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung auf denaturierenden 10% Polyacrylamidgelen der Vernetzung 19:1 (5.2.7.2).

5x Hybridisierungspuffer:	250 mM K-HEPES, pH 7.0 500 mM KCl
5x Verlängerungspuffer:	125 mM Tris-HCl, pH 8.5 125 mM KCl 125 mM DTT 125 mM MgCl <sub>2</sub>
dNTP-Lösung:	je 250 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5
ddNTP-Lösung:	je 250 µM der NTPs, zusätzlich im A-Mix: 50 µM ddTTP im C-Mix: 50 µM ddGTP im G-Mix: 50 µM ddCTP im T-Mix: 50 µM ddATP in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5

### 5.3.14 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine von Mullis und Faloona (1987) entwickelte Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen. Dabei wird die zu amplifizierende Sequenz durch zwei synthetische Oligonukleotidprimer begrenzt, die an den flankierenden Bereichen hybridisieren. Durch wiederholtes Denaturieren, Primerhybridisieren und Verlängern können selbst geringe Mengen eines DNA-Abschnitts spezifisch amplifiziert werden.

In einem Reaktionsvolumen von 50 µl wurden 10 ng der zu amplifizierenden Plasmid-DNA mit 400 µM dNTPs, 500 nM Oligo-Primer bei einer Magnesiumkonzentration von 3 mM mit einer Unit Taq-Polymerase gemischt, mit Paraffin überschichtet und in einem Landgraf Thermocycler nach folgendem Protokoll inkubiert:

Denaturierung:	2 Minuten, 95°C	1. Zyklus
Amplifizierung:	30 Sekunden, 95°C 30 Sekunden, 51°C 40 Sekunden, 72°C	30 Zyklen
Chase:	10 Minuten, 72°C	31. Zyklus

Nach dem Durchlauf aller Zyklen wurden die Produkte auf 0,8% Agarosegelen auf ihre Qualität hin überprüft. Nach dieser Kontrolle wurden sie durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaOAc, pH 5.0 sowie 3 Volumen Ethanol für 30 Minuten auf Eis gefällt. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 12000 rpm (Hettich Biofuge A), Waschen mit 80% Ethanol und Lyophyllisation (Heto VR-1 Speedvac Concentrator) wurde die amplifizierte DNA in sterilem *Aqua dest.* resuspendiert. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer (5.2.1.1).

## 6 Klonierung der Transkriptionsvektoren

Für eine Analyse der Leader-Interaktionen mußten Fusionstranskripte hergestellt werden, die Leader und 16S rRNA enthielten. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß nicht zusätzliche Spacer-Sequenzen am 3'-Ende des 16S rRNA-Strukturgens transkribiert wurden, da diese die Leader-Interaktion erheblich beeinflussen würden. Um dies zu erreichen, wurde eine singuläre *Xba*I-Schnittstelle, die sich ca. 400 bp downstream des 16S rRNA-Gens befindet, unmittelbar hinter das 16S rRNA-Gen kloniert. Unter Verwendung des Plasmids pWB11 wurde der Bereich zwischen den beiden Oligonukleotiden UST7*Xba*I und DST7 über PCR amplifiziert.

Die drei Vektoren pWB (16S rRNA + Wildtyp-Leader), pWB11 (16S rRNA + mutierter Leader) und pBP2 (16S rRNA) wurden mit den Restriktionsenzymen *Xba*I und *Nco*I geöffnet. Das amplifizierte DNA-Fragment wurden in Ligationsansätzen mit einem Vektor : Insert Verhältnis von 1/33 in die drei Zielvektoren einligiert. Nach erfolgter Transformation wurden die Zellen auf Ampicilin-Agarplatten ausgestrichen. Von potentiell positiven Klonen wurden üN-Kulturen aufgezogen und die Plasmid-DNA im analytischen Maßstab präpariert (5.2.6.2). Die Plasmid-DNA wurde durch Restriktion mit *Xba*I und *Nco*I überprüft. Von den per Restriktionskartierung eindeutig positiven Klonen wurde von jedem der drei Konstrukte erneut eine üN-Kultur aufgezogen. Die im analytischen Maßstab präparierte Plasmid-DNA wurde durch Sequenzierung (5.3.11) überprüft und alle drei Konstrukte pIK (16S rRNA + Wildtyp-Leader), pIK11 (16S rRNA + mutierter Leader) und pIK16S (16S rRNA) verfügten somit über eine singuläre *Xba*I-Schnittstelle, 6 Nukleotide hinter dem Ende des 16S rRNA-Strukturgens.

- Aksoy et al. (1984). Evidence for antitermination in *E. coli* rRNA transcription. *J. Bacteriol.* **159**: 260-264.
- Bachellerie, J-P., Michot, B., Nicoloso, M., Balakin, A., Ni, J. und Fournier, M. J. (1995). Antisense snoRNAs: a family of nucleolar RNAs with long complementarities to rRNA. *TIBS* **20**: 261-264.
- Baldwin, T. O. (2000). Protein folding in vivo: the importance of ribosomes. *Nature Cell Biology* **1**: E154-155.
- Balzer, M. und Wagner, R. (1998). Mutations in the Leader Region of Ribosomal RNA Operons Cause Structurally Defective 30S Ribosomes as Revealed by in vivo Structural Probing. *J. Mol. Biol.* **276**: 547-557.
- Banerjee, A. R. und Turner, D. H. (1995). The Time Dependence of Chemical Modification Reveals Slow Steps in the Folding of a Group I Ribozyme. *Biochemistry* **34**: 6504-6512.
- Batey, R. T. und Doudna, J. A. (1998). The parallel universes of RNA folding. *Nature struct. biol.* **5**: 337-340.
- Besançon, W. and Wagner, R. (1999). Characterization of transient RNA-RNA interactions important for the facilitated structure formation of bacterial ribosomal 16S RNA. *Nucleic Acids Res.* **27**: 4353-4362.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels, *Electrophoresis* **8**: 93-99.
- Bovia, F. and Strub, K. (1996). The signal recognition particle and related small cytoplasmic ribonuclein particles. *J. Cell Sci.* **109**: 2601-2608.
- Boyer, H. W. and Roulland-Dussoix, D. A. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459.
- Brink, M. F., Verbeet, M. P. and de Boer, H. A. (1993). Formation of the central pseudoknot in 16S rRNA is essential for initiation of translation. *Embo J.* **12**: 3987-3996.
- Bryngelson J. D. and Wolynes P. G. (1989). Intermediates and barrier crossing in a random energy-model (with applications to protein folding). *J. Phys. Chem.* **93**: 6902-6915.

Bryngelson J. D., Onuchic J. N., Socci N. D. and Wolynes P. G. (1995). Funnels, pathways, and the energy landscape of protein-folding - a synthesis. *Proteins* **21**: 167.

Cate, J. H., Gooding, A. R., Podell, E., Zhou, K., Golden, B. L., Kundrot, C. E., Cech, T. R. and Doudna, J. A. (1996). Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing. *Science* **273**: 1678-1685.

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.

Cech, T. R. (1993). Structure and mechanism of the large catalytic RNAs: group I and group II introns and ribonuclease P. In: *The RNA world* pp. 239-269, Gesteland R. F. and Atkins J. F. (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Cole, P. E., Yang, S. K. and Crothers, D. M. (1972). conformational changes of transfer ribonucleic acid. Equilibrium phase diagrams. *Biochemistry* **11**: 4358-4368.

Cole, P. E. and Crothers, D. M. (1972). Conformational changes of transfer ribonucleic acid: relaxation kinetics of the early melting transition of methionine transfer ribonucleic acid (*Escherichia coli*). *Biochemistry* **11**: 4368-4374.

Coutts, S. M. (1971). Thermodynamics and kinetics of G-C base pairing in the isolated extra arm of serine-specific transfer RNA from yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **232**: 94-106.

Crick, F. H. (1968). The origin of the genetic code. *J. Mol. Biol.* **38**: 367-379.

Culver, G. M., Heilek, G. M. und Noller, H. F. (1999). Probing the rRNA Environment of Ribosomal Protein S5 Across the Subunit Interface and Inside the 30S Subunit using Tethered Fe(II). *J. Mol. Biol.* **286**: 355-364.

Dagert, M. und Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chlorid improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**: 23-26.

Dahlberg, A. E., Dingman, C. W. und Peacock, A. C. (1969). Electrophoretic Characterization of bacterial Polyribosomes in Agarose-Acrylamide Composite Gels. *J. Mol. Biol.* **41**: 139-147.

- Draper, D. E. und Reynaldo, L. P. (1999a). RNA binding strategies of ribosomal proteins. *NAR* **27**: 381-388.
- Draper, D. E. (1999b). Themes in RNA-protein recognition. *J. Mol. Biol.* **293**: 255-270.
- Ellwood, M. und Nomura M. (1982). Chromosomal location of the genes for rRNA in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **149**: 458-468.
- Filipowicz, W., Pelczar, P., Pogacic, V. and Dragon, F. (1999). Structure and biogenesis of small nucleolar RNAs acting as guides for ribosomal RNA modification. *Acta Biochimica polonica* **46**: 377-389.
- Garrett, R. A., Ungewickell, E., Newberry, V., Hunter, J. and Wagner, R. (1977). An RNA core in the 30S ribosomal subunit of *Escherichia coli* and its structural and functional significance. *Cell. Biol. Int. Rep.* **1**: 487-502.
- Gausing, K. (1977). Regulation of ribosome production in *Escherichia coli*: synthesis and stability of ribosomal RNA and of ribosomal protein messenger RNA at different growth rates. *J. Mol. Biol.* **115**: 335-354.
- Gourse, R. L., Gaal, T., Bartlett, M. S., Appleman, J. A. und Ross, W. (1996). rRNA transcription and growth rate-dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 645-677.
- Heilek, G. M. und Noller, H. F. (1996). Site-Directed radical probing of the rRNA neighborhood of ribosomal protein S5. *Science* **272**: 1659-1662.
- Held, W. A., Mizushima, S. und Nomura, M. (1973). Reconstitution of *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits from purified molecular components. *J. Biol. Chem.* **248**: 5720-5730.
- Held, W.A., Ballou, B., Mizushima, S. und Nomura, M. (1974). Assembly mapping of 30S ribosomal proteins from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **249**: 3109-3111.
- Hillen, W., Klein, R.D., und Wells, R.D. (1981). Preparation of milligram amounts of 21 DNA restriction fragments, *Biochem.* **29**: 3748-3756.
- Horwitz, R.J., Li, J. and Greenblatt, J. (1987). An elongation control particle containing the N gene transcriptional antitermination protein of bacteriophage Lambda. *Cell* **62**: 1153-1163.

- Ish-Horowitz, A. and Burk, M. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* **9**: 2989-2998.
- Jinks-Robertson, S. und Nomura, M. (1982). Ribosomal protein S4 acts in *trans* as a translational repressor to regulate expression of the  $\alpha$ -Operon in *Escherichia coli*. *J. Bac.* **151**: 193-202.
- Jinks-Robertson, S. and Nomura, M. (1987). Ribosomes and tRNA. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology, Neidhardt, F. C. (ed.), ASM, Washington DC, 1358-1385.
- Jones, S., Daley, TA, Luscombe, NM, Berman, HM, Thornton, JM (2001). Protein-RNA interactions: a structural analysis, *NAR* **29**: 943-954.
- Kim, S. H., Quigley, G. J., Suddath, F. L., McPherson, A., Sneden, D., Kim, J. J. *et al.* (1973). Three-dimensional structure of yeast phenylalanine transfer RNA: folding of the polynucleotide chain. *Science* **179**: 285-288.
- Kim, S. H. (1978). Three-dimensional structure of transfer RNA and its functional implications. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **46**: 279-315.
- King, T. C. and Schlessinger, D. (1983). S1 nuclease mapping analysis of ribosomal RNA processing in wild type and processing deficient *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **258**: 12034-12042.
- King, T. C., Sirdeskmukh, R. und Schlessinger, D. (1986). Nucleolytic Processing of Ribonucleic Acid Transcripts in Procaryotes. *Microbiol. Rev.* **50**: 428-451.
- Krohn, M., Pardon, B. and Wagner, R. (1992). Effects of the template topology on RNA polymerase pausing during *in vitro* transcription of the *E. coli* *rrnB* leader region. *Mol. Microbiol.* **6**: 581-589.
- Krohn, M. and Wagner, R. (1996). Transcriptional pausing of RNA polymerase in the presence of guanosine tetraphosphate depends on the promoter and gene sequence. *J. Biol. Chem.* **271**: 23884-23894.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**: 680-685.
- Lee, B., Matera, A. G., Ward, D. C. und Craft, J. (1996). Association of RNase mitochondrial RNA processing enzyme with ribonuclease P in higher ordered

structures in the nucleolus: A possible coordinate role in ribosome biogenesis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **93**: 11471-11476.

Laughrea, M., Moore, P.B. (1977). Physical properties of ribosomal protein S1 and its interaction with the 30S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. **112**: 399-421.

Lewicki, B. T. U., Margus, T., Remme, J. und Nierhaus, K. H. (1998). Coupling of rRNA Transcription and Ribosomal Assembly in Vivo. J. Mol. Biol. **231**: 581-593.

Mandiyani, V., Tumminia, S. J., Wall, J. S., Hainfield, J. F. und Boublik, M. (1991). Assembly of the *Escherichia coli* 30S ribosomal subunit reveals protein-dependent folding of the 16S rRNA domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 8174-8178.

Mandiyani, V., Tumminia, S., Wall, J. S., Hainfield, J. F. und Boublik, M. (1989). Protein-induced Conformational Changes in 16S Ribosomal RNA during the Initial Assembly Steps of the *Escherichia coli* 30 S Ribosomal Subunit. J. Mol. Biol. **210**: 323-336.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) in Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor, New York.

Marinus, M. G. (1983). Insertion mutations in the dam gene of *Escherichia coli* K12. Mol. Gen. Genet. **192**: 55-66.

Misra, V. K. and Draper, D. E. (1999). On the role of magnesium ions in RNA stability. Biopolymers **48**: 113-135.

Mogridge, J. und Greenblatt, J. (1998). Specific binding of *Escherichia coli* Ribosomal Protein S1 to boxA Transcriptional Antiterminator RNA. J. Bac. **180**: 2248-2252.

Mullis, K. B. and Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. **155**: 335-350.

Noller, H. F., Green, R., Heilek, G., Hoffarth, V., Hüttenhofer, A., Simpson, J., Lee, I., Lieberman, K., Mankin, A., Merryman, C., Powers, T., Puglisi, E. V., Samaha, R. R. und Weiser, B. (1995). Structure and function of ribosomal RNA. Biochem. Cell Biol. **73**: 997-1009.

- Nomura, M., Gourse, R. und Baughman, G. (1984). Regulation of the Synthesis of Ribosomes and Ribosomal Components. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 75-117.
- Nowotny, V. and Nierhaus, K. H. (1988). Assembly of the 30S Subunit from *Escherichia coli* Ribosomes Occurs via Two Assembly Domains Which Are Initiated by S4 and S7, *Biochemistry* **27**: 7051-7055.
- Orgel, L. E. (1968). Evolution of the genetic apparatus. *J. Mol. Biol.* **38**: 381-93.
- Pan J., Thirumalai, D. and Woodson, S. A. (1997). Folding of RNA involves parallel pathways. *J. Mol. Biol.* **273**: 7-13.
- Pan, J. Thirumalai, D. and Woodson, S. A. (1999). Magnesium-dependent folding of self-splicing RNA: exploring the link between cooperativity, thermodynamics, and kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6149-6154.
- Pardon, B., Wagner, R. (1995). The *Escherichia coli* ribosomal RNA leader nut region interacts specifically with mature 16S RNA. *Nucleic Acids Research* **23**: 932-941.
- Powers, T., Changchien, L. M., Craven, G. R. and Noller, H. F. (1988). Probing the assembly of the 3' major domain of 16 S ribosomal RNA. Quaternary interactions involving ribosomal proteins S7, S9 and S19. *J. Mol. Biol.* **200**: 309-319.
- Powers, T., Daubresse, G. und Noller, H. F. (1993). Dynamics of In Vitro Assembly of 16S rRNA into 30S Ribosomal Subunits. *J. Mol. Biol.* **232**: 362-374.
- Powers, T. und Noller, H. F. (1994). A Temperature-dependent Conformational Rearrangement in the Ribosomal Protein S4•16S rRNA Complex. *J. Biol. Chem.* **270**: 1238-1242.
- Pyle, A. M. (1993). Ribozymes: a distinct class of metalloenzymes. *Science* **261**: 709-714.
- Russel, R. and Herschlag, D. (1999). New pathways in folding of the *Tetrahymena* group I RNA enzyme. *J. Mol. Biol.* **291**: 1155-1167.

Squires, C. L., Greenblatt, J., Li, J., Condon, C. and Squires, C. (1993). Ribosomal RNA antitermination in vitro: Requirements for Nus factors and one or more unidentified cellular components. *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 970-974.

Stern, S., Wilson, R.C. and Noller, H.F.(1986). Localization of the binding site for protein S4 on 16 S ribosomal RNA by chemical and enzymatic probing and primer extension. *J. Mol. Biol.* **192**: 101-110.

Stern, S., Moazed, D. and Noller, H.F. (1988). Structural analysis of RNA using chemical and enzymatic probing monitored by primer extension. *Meth. Enzymol.* **164**: 481-489.

Tam, M. F. and Hill, W. E. (1981). Physical Characteristics of the Reconstitution Intermediates (RI30 and RI30\*) from the 30S Ribosomal Subunit of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **20**: 6480-6484.

Theißen, G., Eberle, J., Zacharias, M., Tobias, L. und Wagner, R. (1990a). The  $t_L$  structure within the leader region of *Escherichia coli* ribosomal RNA operons has post-transcriptional functions. *Nucleic Acid Res.* **18**: 3893-3901.

Theißen, G., Behrens, S. E. and Wagner, R. (1990b). Functional importance of the *Escherichia coli* ribosomal RNA leader boxA sequence for post-transcriptional events. *Mol. Microbiol.* **4**: 1667-1678.

Theißen, G. et al. (1993). Some base substitutions in the Leader of an *Escherichia coli* ribosomal RNA operon affect the structure and function of ribosomes. *J. Mol. Biol.* **233**: 203-218.

Thirumalai D. (1995). From the minimal models to real proteins: time scales for protein folding kinetics. *J. Phys. I France* **5**: 1457-1467.

Vartikar, J. V. and Draper, D. E. (1989). S4-16S Ribosomal RNA complex binding constant measurements and specific recognition of a 460-Nucleotide Region. *J. Mol. Biol.* **209**: 221-234.

Vasiliev, V. D., Selivanova, O. M. und Koteliansky, V. E. (1978). Specific selfpacking of the ribosomal 16S RNA. *FEBS L.* **95**: 273-276.

Wagner, R., Theißen, G. und Zacharias, M. (1993). Regulation of the ribosomal RNA synthesis and control of ribosome formation in *E. coli*, In: *The Translational Apparatus*. Nierhaus et al. (eds.), Plenum Press, New York, 119-130.

- Weitzmann, C. J., Cunningham, P. R., Nurse, K. und Ofengand, J. (1993). Chemical evidence for domain assembly of the *Escherichia coli* 30S ribosome, *FASEB J.* **7**: 177-180.
- Williamson, J. R. (2000). Induced fit in RNA-protein recognition. *Nature struct. biol.* **7**: 834-837.
- Wimberly, B. T., Brodersen, D. E., Clemons Jr, W. M., Morgan-Warren, R. J., Carter, A. P., Vornrhein, C., Hartsch, T. and Ramakrishnan, V. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit. *Nature* **407**: 327-339.
- Woese, C. R., Gutell, R., Gupta, R. und Noller, H. F. (1983). Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-Like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* **47**: 621-669.
- Woodson, S. A. (2000). Recent insights on RNA folding mechanisms from catalytic RNA, *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 796-808.
- Young, R. A. and Steitz, J. A. (1978). Complementary sequences 1700 nucleotides apart from a ribonuclease III cleavage site in *Escherichia coli* ribosomal precursor RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci* **75**: 3593-3597.
- Zhang, B. and Cech, T. R. (1997). Peptide bond formation by *in vitro* selected ribozymes. *Nature* **390**: 96-100.

## Anhang

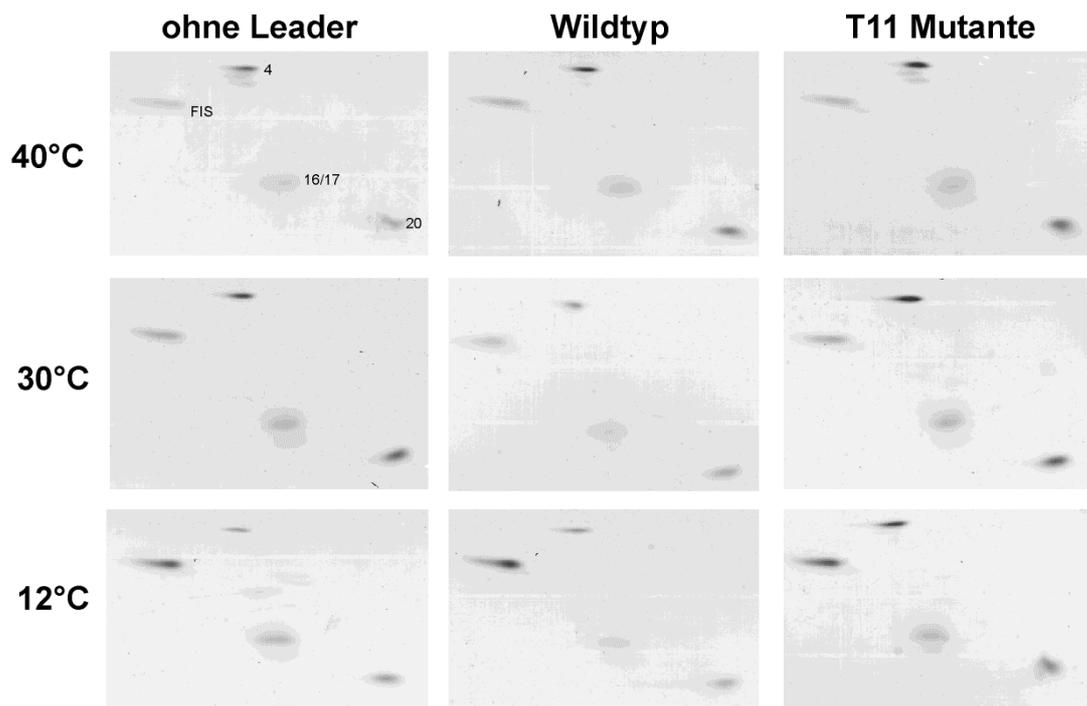
A.1: 2D-Gele der assemblierten 5'-Regionen

A.2: 2D-Gele der assemblierten Vollängen

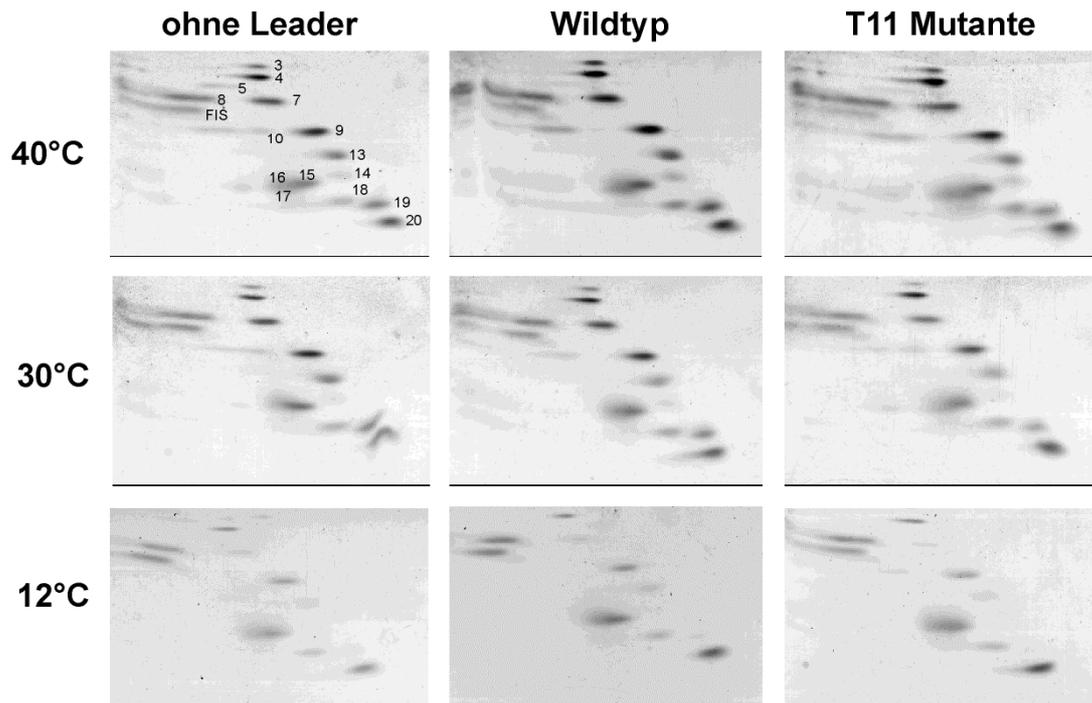
A.3: Positionen der ribosomalen Proteine in der 30S Untereinheit

A.4: Kinetik-Kurven der isolierten 5-Region

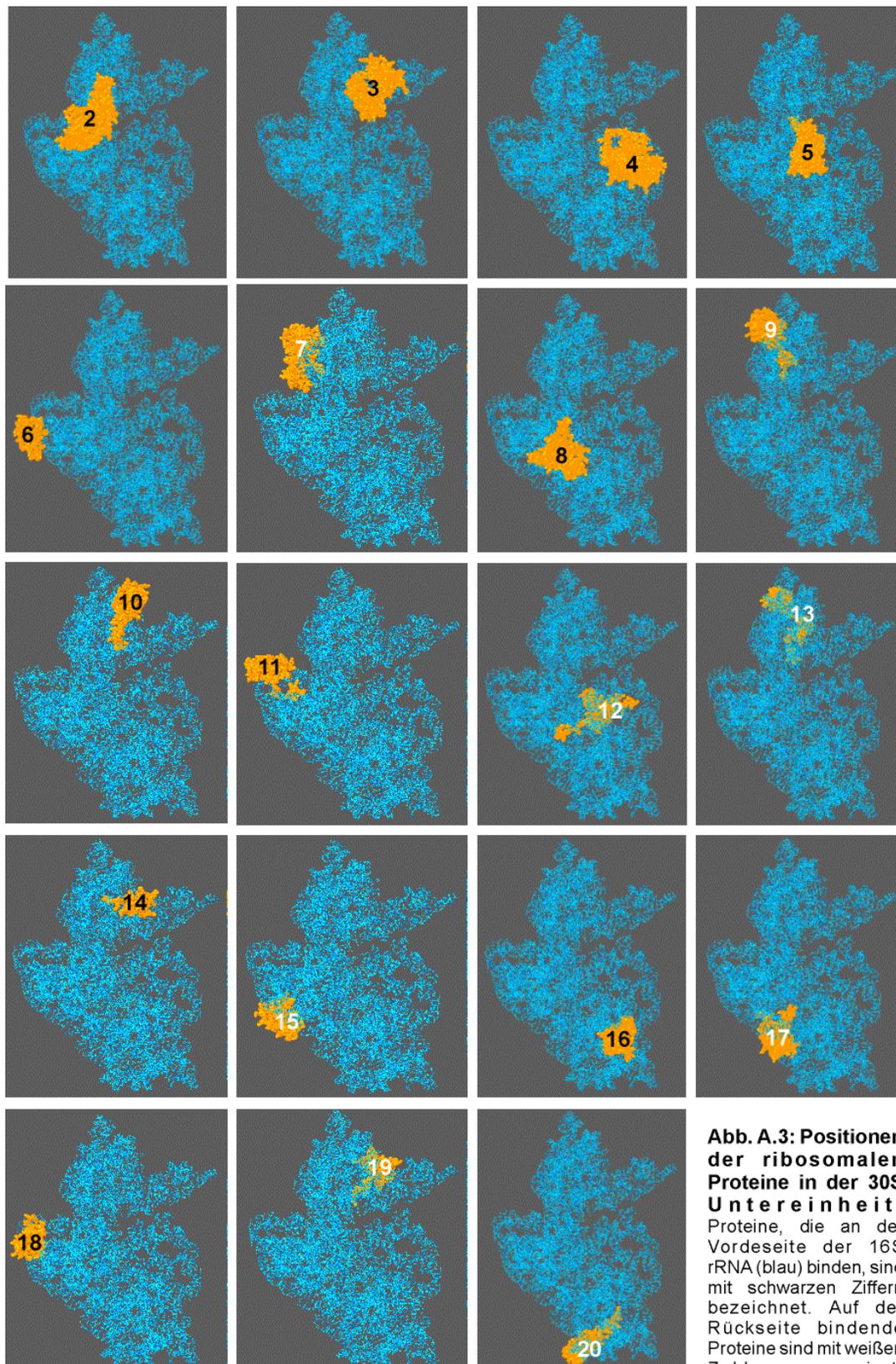
A.5: Kinetik-Kurven der Vollänge



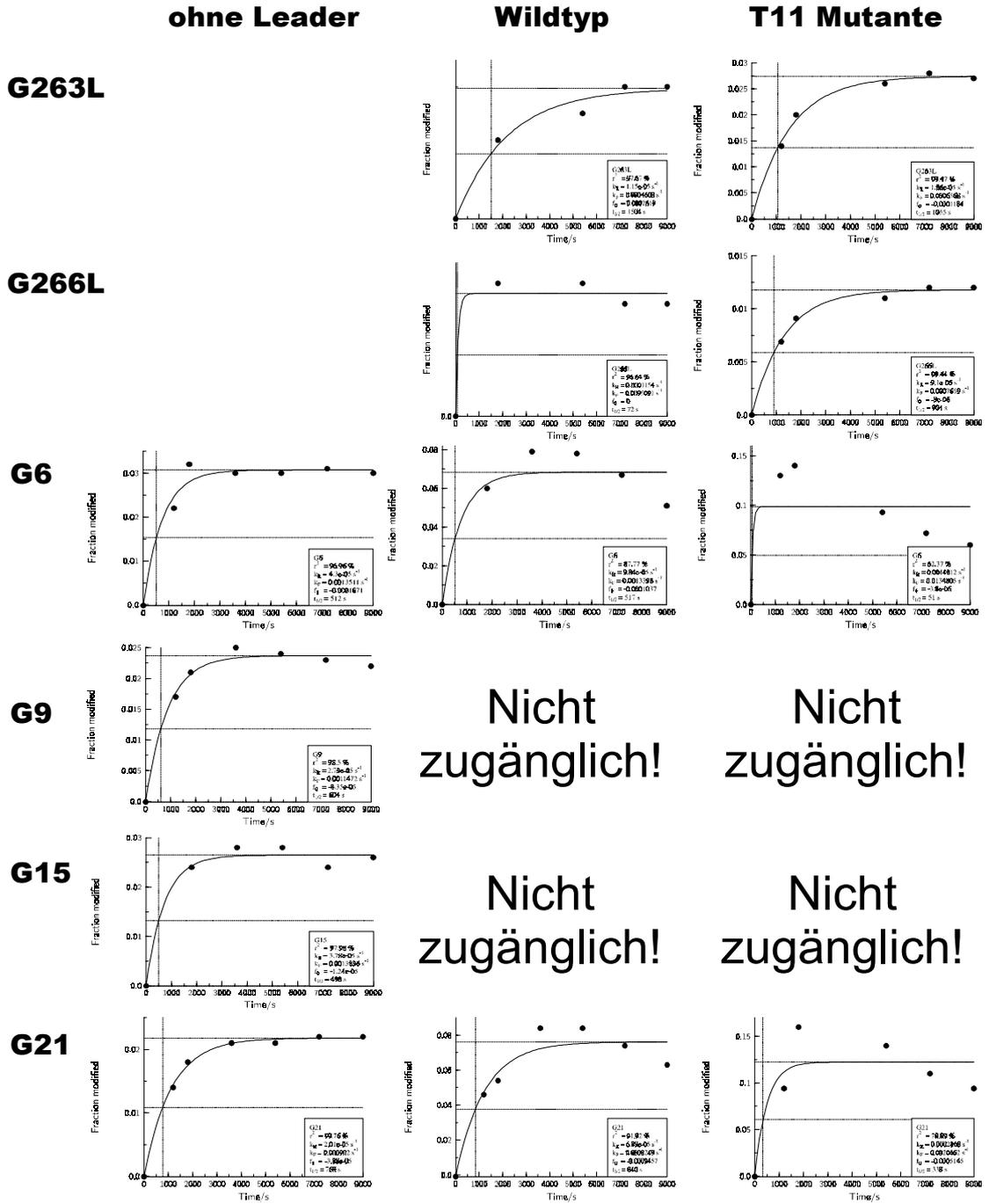
**Abb. A.1: 2D-Gelelektrophorese der assemblierten 5'-Region.** Die Gele in der linken Spalte zeigen die Leader-freien Partikel, die mittlere Spalte zeigt die in Anwesenheit des Wildtyp-Leaders assemblierten Partikel. Die in Anwesenheit des mutierten Leaders assemblierten Partikel sind in der rechten Spalte dargestellt. Die Assemblierungstemperaturen sind links neben den Gelen angegeben. Die ribosomalen Proteine sind in dem 2D-Gel oben links bezeichnet, ebenso die Position des Proteinstandards FIS.



**Abb. A.2: 2D-Gelelektrophorese der assemblierten Vollänge.** Die Gele in der linken Spalte zeigen die Leader-freien Partikel, die mittlere Spalte zeigt die in Anwesenheit des Wildtyp-Leaders assemblierten Partikel. Die in Anwesenheit des mutierten Leaders assemblierten Partikel sind in der rechten Spalte dargestellt. Die Assemblierungstemperaturen sind links neben den Gelen angegeben. Die ribosomalen Proteine sind in dem 2D-Gel oben links bezeichnet, ebenso die Position des Proteinstandards FIS.



A.4: Kinetik-Kurven der isolierten 5'-Regionen



ohne Leader

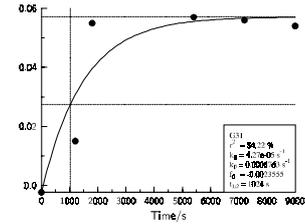
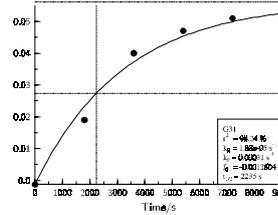
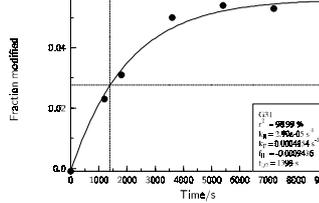
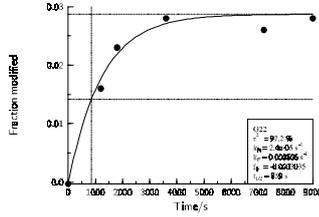
Wildtyp

T11 Mutante

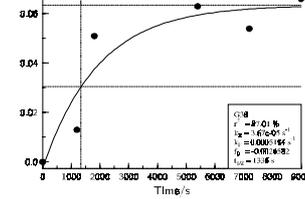
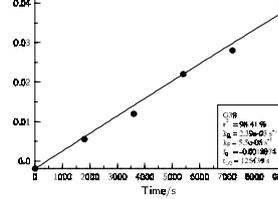
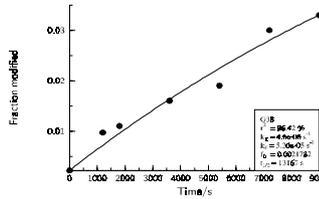
G22

Nicht  
zugänglich!

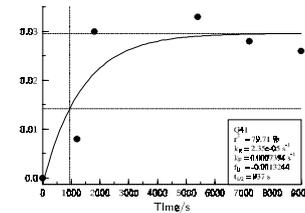
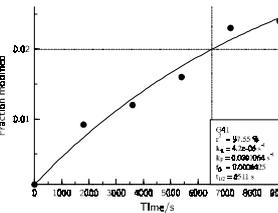
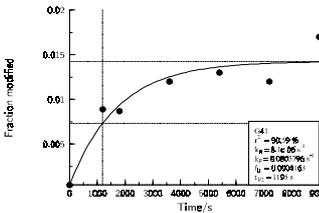
Nicht  
zugänglich!



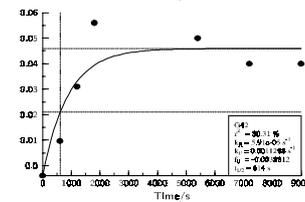
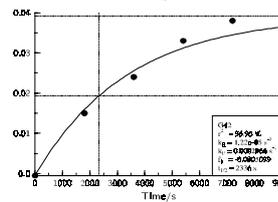
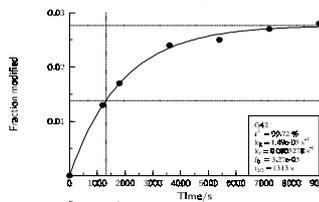
G38



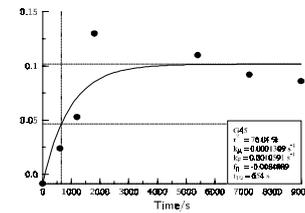
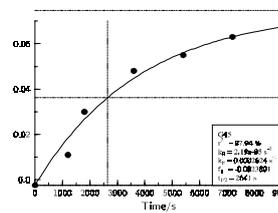
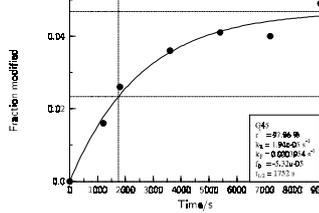
G41



G42



G45

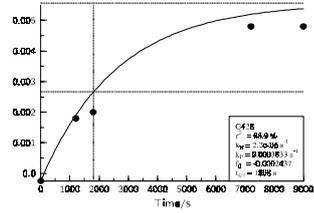
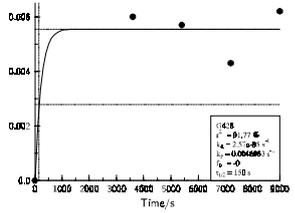
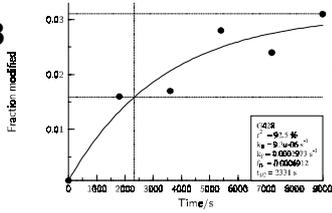


ohne Leader

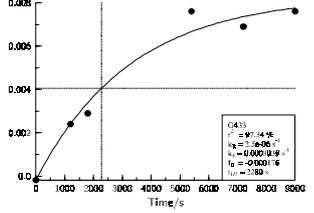
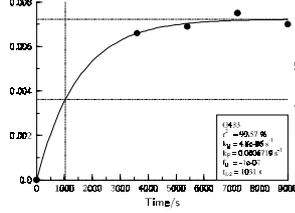
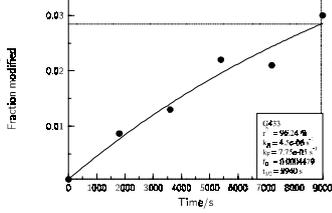
Wildtyp

T11 Mutante

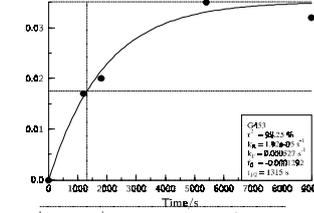
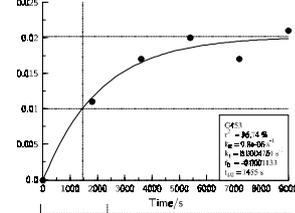
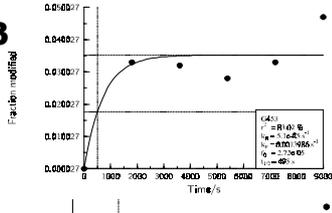
G428



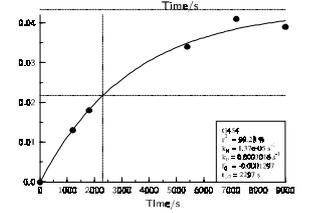
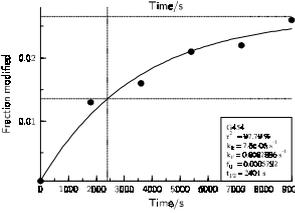
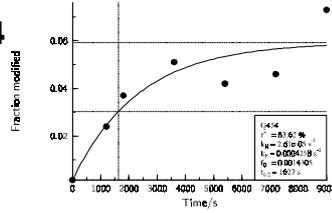
G433



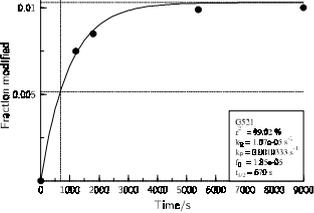
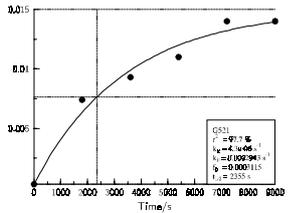
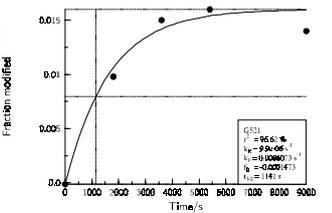
G453



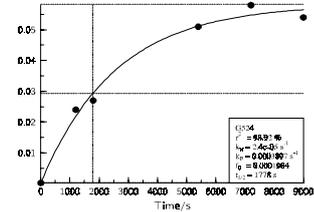
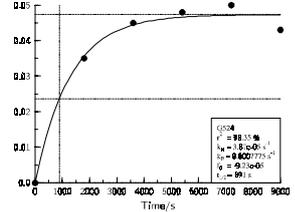
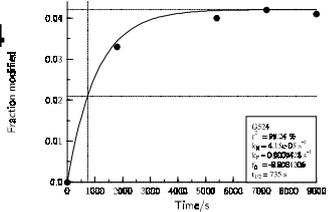
G454

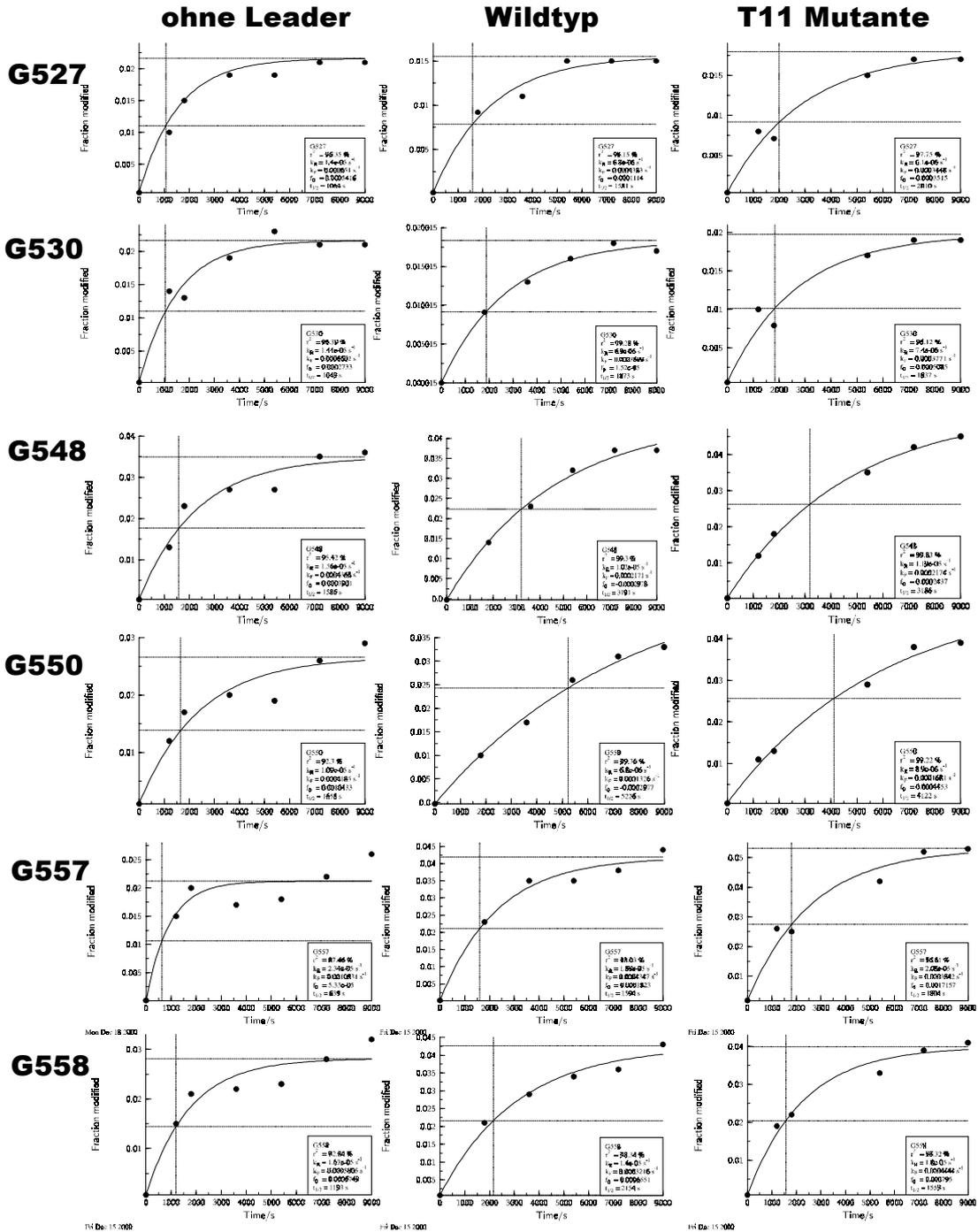


G521

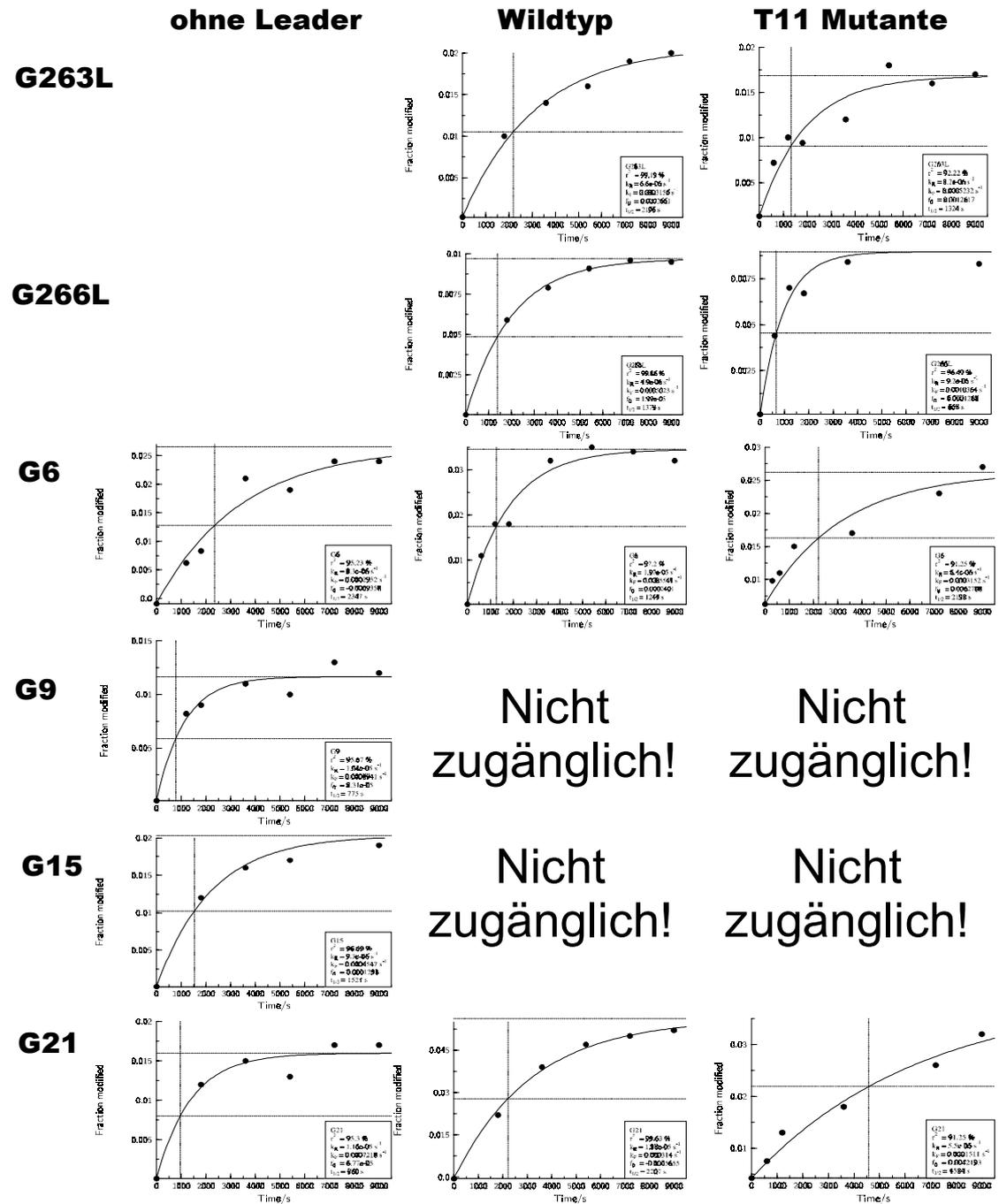


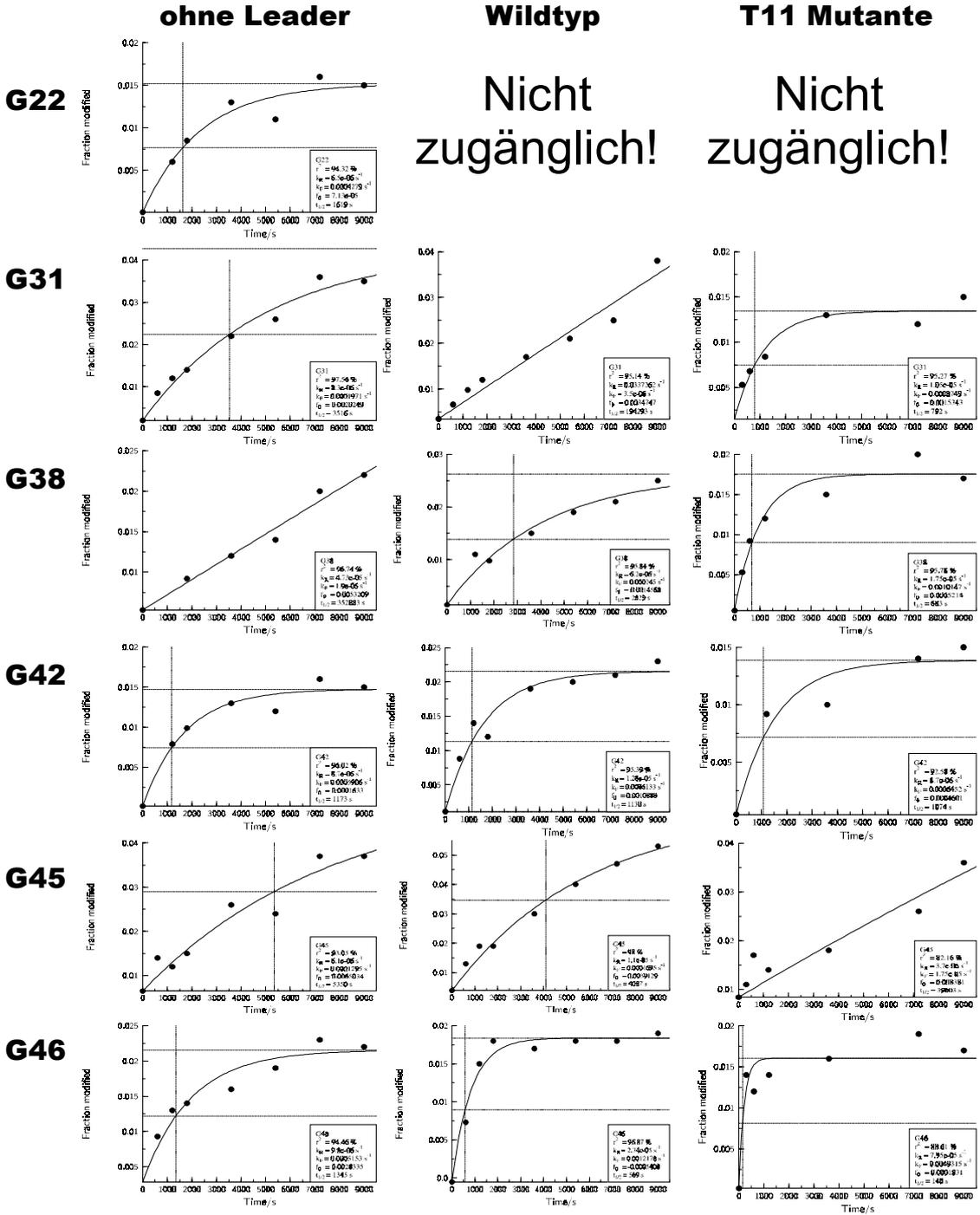
G524

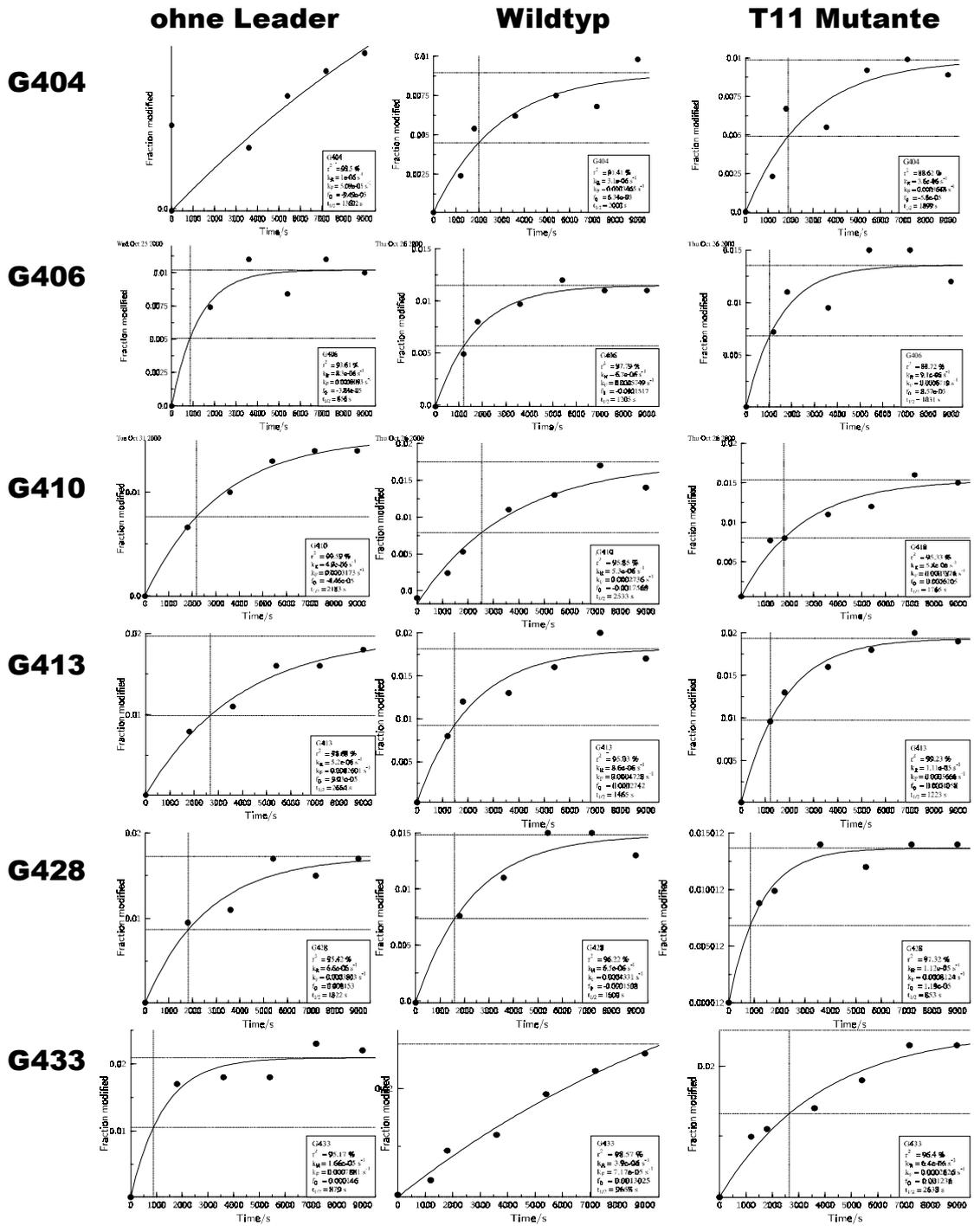




A.5: Kinetik-Kurven der Vollängentranskripte





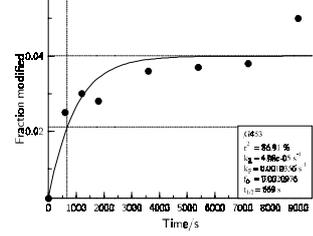
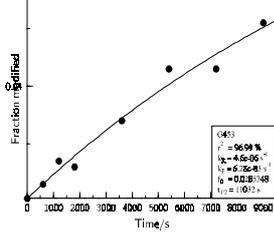
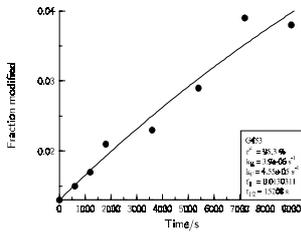


ohne Leader

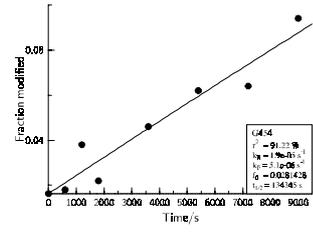
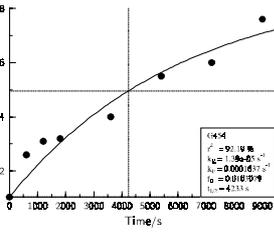
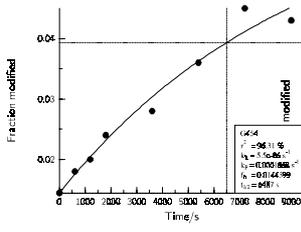
Wildtyp

T11 Mutante

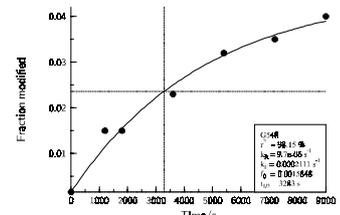
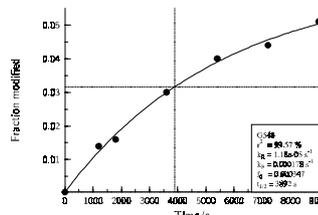
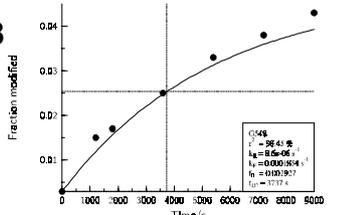
G453



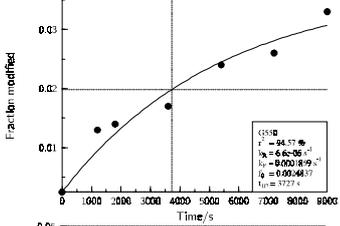
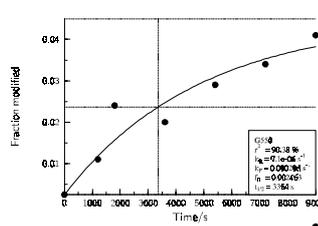
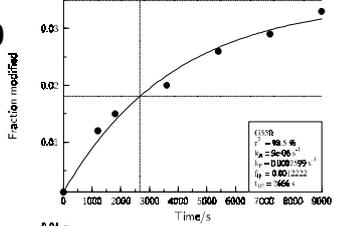
G454



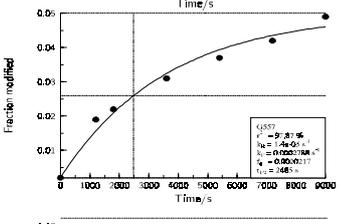
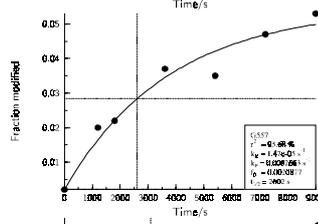
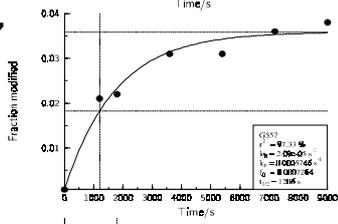
G548



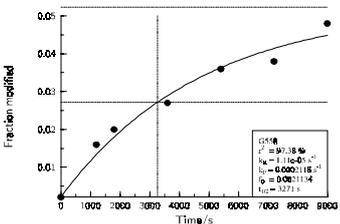
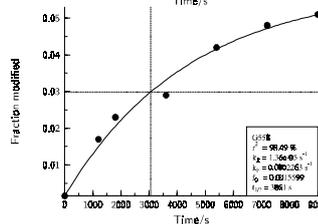
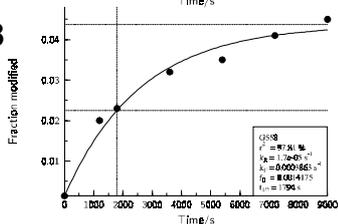
G550

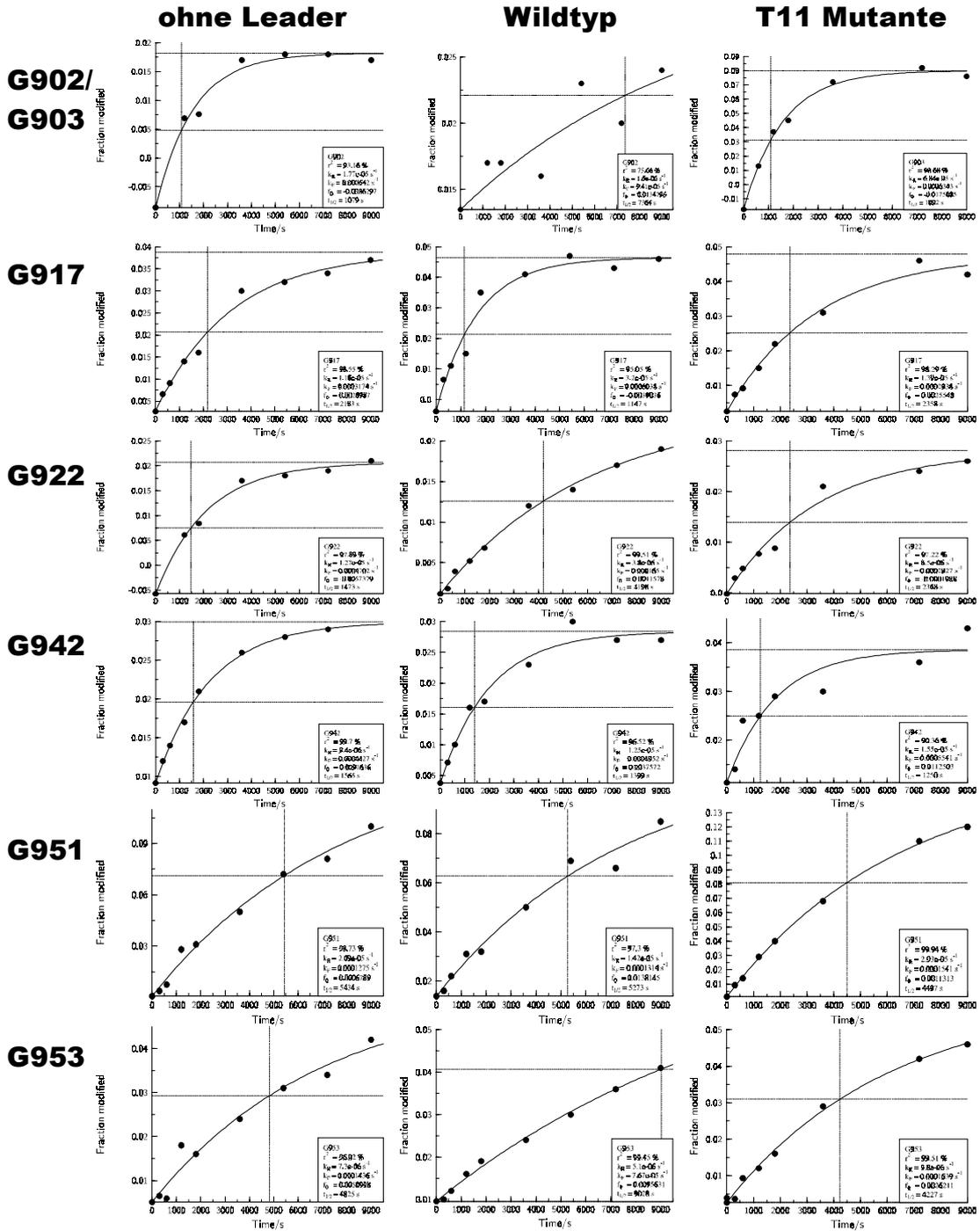


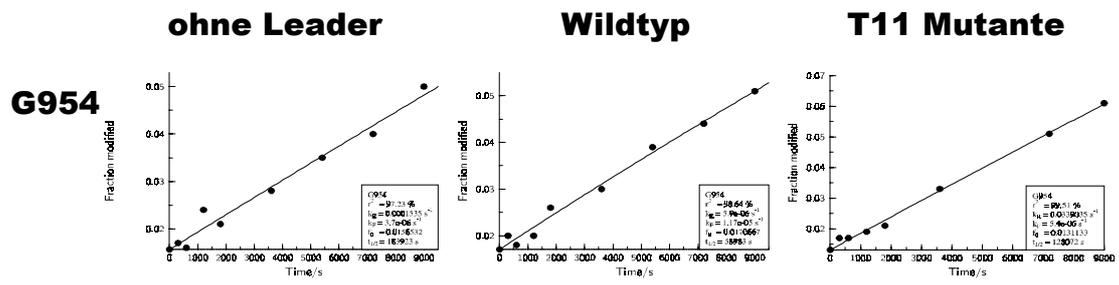
G557



G558







### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich diese Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, den 9. Mai 2001

Oliver Zirwes