

**Max-Planck-Institut für Biochemie**  
**Abteilung Strukturforschung**

**Röntgenstrukturanalyse des Elongationsfaktors NusA  
und des ribosomalen Proteins L4  
aus *Thermotoga maritima***

Michael Worbs

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. Schmidbaur

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h.c. R. Huber  
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher  
3. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 15.1.2001 bei der  
Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie  
am 23.2.2001 angenommen.



für Maureen





## DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 1997 bis Januar 2001 in der Abteilung Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Robert Huber möchte ich für die große Freiheit danken, die er mir bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit gegeben hat. Darüber hinaus hat sein wohlwollendes Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Unterstützung meines Forschungsaufenthaltes in den USA entscheidend zum Erfolg beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Bode bedanke ich mich ebenfalls für die Unterstützung meines Aufenthaltes in Amerika.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Markus C. Wahl. Es war wirklich ein ausgesprochenes Vergnügen mit ihm in unserer zwei Mann „Ribosomenarbeitsgruppe“ zusammenzuarbeiten. Die vielen Diskussionen, sein Humor und die Ratschläge, wenn es einmal nicht so gut lief, waren wirklich wichtig für das Gelingen dieser Arbeit. Ich wünsche ihm auch weiterhin alles Gute bei seiner Habilitation.

In diesem Zusammenhang sei natürlich auch Snezan Marincovic gedankt, der viel bei diversen molekularbiologischen Arbeiten unserer „Ribosomengruppe“ tätig war. Es bleibt nur zu hoffen, daß auf die zahlreichen erfolgreichen Versuche auch bald ein Sechser im Lotto folgt.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Gleb Bourenkov und Herrn Dr. Hans Bartunik, für die Bereitstellung der hervorragend in Schuß gehaltenen *beamline* BW6 am DESY. Ihre großzügige Unterstützung bei der Messung hat einen Großteil der Arbeit erst ermöglicht.

I also would like to thank Dr. Janice Zengel and Dr. Lasse Lindahl for their generous support and the good working atmosphere during my visit to UMBC. They really helped me to learn more about the biochemistry and molecular biology of L4 apart from the crystallographic work. I would like to thank Todd Allen and all the other members of the department for their helpfulness and friendliness.

Besonders bedanke ich mich auch bei allen heutigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Strukturforschung für die ausgezeichnete Hilfe bei vielen Problemen und die ausgezeichnete Arbeitsatmosphäre, insbesondere den Zimmergenossen von K334 mit „Einzugsgebiet“, Dr. Oliver Einsle, Dr. Markus Deibert, Dr. Ulrich Rester, Rupert und Anja Lang, Stefan Gerhardt, Dr. Stefan Steinbacher und Dr. Holger Dobbek. Wir hatten wirklich eine Menge Spaß während langer Abende am Institut. Jens Kaiser danke ich für die angenehme Atmosphäre im Labor bei der Arbeit an unseren „Thermotoga martina“ Proteinen.

Für die Hilfe bei der Bewältigung diverser technischer und bürokratischer Hindernisse bedanke ich mich bei Frau Renate Rüller, Frau Gina Beckmann, Herrn Werner Dersch und Herrn Ottmar Paul. Ihre unverdrossene Unterstützung beim verzweifelten Versenden diverser Päckchen nach Amerika oder der Reparatur der Röntgenanlagen wird mir unvergessen bleiben.

Meiner Familie, im besonderen meinen Eltern und Großeltern und meiner Frau Maureen möchte ich für die volle Unterstützung und Begeisterung danken, die sie mir während der langen Zeit zukommen haben lassen. Dazu gehört auch die große Geduld, die oft nötig war, wenn ich wieder einmal lange Abende mit dem „Suchen von Kristallen“ verbrachte.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
2.1 ALLGEMEINE ASPEKTE DER TRANSKRIPTION IN EUKARYONTEN UND PROKARYONTEN ....	4
2.2 DNA-BINDENDE PROKARYONTISCHE TRANSKRIPTIONSFAKTOREN.....	6
2.3 PROKARYONTISCHE TERMINATIONS- UND ELONGATIONSFAKTOREN.....	7
2.3.1 NusA und die Familie der Nus-Faktoren .....	11
2.3.2 Ribosomales Protein L4 .....	17
2.2 AUFGABENSTELLUNG .....	22
<b>3. MATERIALIEN UND METHODEN .....</b>	<b>24</b>
3.1 MATERIALIEN .....	24
3.1.1 Bakterien .....	24
3.1.2 Plasmide .....	24
3.1.3 Enzyme und Kits .....	25
3.1.4 Oligonukleotide für die Mutagenese an EcoL4 und TmaL4.....	25
3.1.5 Oligonukleotide für die Polymerase- Kettenreaktion.....	27
3.1.6 Chemikalien, Materialien und Geräte.....	27
3. 2 METHODEN .....	27
3.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	27
3.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien .....	29
3.2.1.3 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> .....	30
3.2.1.4 Radioaktive Markierung von <i>E. coli</i> Zellen und Aktivitätstest für L4 .....	30
3.2.2 DNA-Arbeitsmethoden.....	32
3.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	32
3.2.2.2 DNA-Sequenzierung .....	32
3.2.2.3 Isolierung von Plasmiden aus <i>E. coli</i> Zellen.....	33
3.2.2.4 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen .....	33
3.2.2.6 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR .....	34
3.2.2.7 Spezifische Mutagenese an L4 mit den <i>QuikChange Mutagenese-Kit</i> .....	35
3.2.3 Proteinchemische Methoden .....	35
3.2.3.1 Proteinreinigung.....	35
3.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	37
3.2.4 Kristallographische Methoden .....	39
3.2.4.1 Aufbau von Kristallen .....	39
3.2.4.2 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen .....	39
3.2.4.3 Das Phasenproblem und Berechnung der Elektronendichte .....	42
3.2.4.4 Kristallisation .....	47
3.2.4.5 Kristallmontage, Datensammlung und -prozessierung .....	47
3.2.4.6 Modellbau und -verfeinerung .....	48
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
4.1 N-UTILIZATION SUBSTANCE A (NUSA).....	50
4.1.1 Reinigung von NusA .....	50
4.1.2 Kristallisation.....	50
4.1.3 Datensammlung und Strukturlösung mittels multipler anomaler Dispersion.....	51
4.1.4 Modellbau und Verfeinerung.....	54
4.1.5 Kristallstruktur von NusA.....	56
4.1.5.1 Übersicht über die Struktur und Oberflächentopographie .....	56

4.1.5.2 Stabilisierung der N-terminalen Domäne durch Kristallkontakte.....	61
4.1.5.3 Modelle für die RNA-Bindung durch NusA.....	62
4.1.5.4 Kontaktflächen der Domänen .....	66
4.2 RIBOSOMALES PROTEIN L4.....	70
4.2.1 Reinigung von L4.....	70
4.2.2 Kristallisation.....	71
4.2.3 Datensammlung und Strukturlösung mittels multiplen isomorphen Ersatzes.....	71
4.2.4 Modellbau und Verfeinerung.....	74
4.2.5 Kristallstruktur von L4.....	76
4.2.5.1 Übersicht über die Struktur .....	76
4.2.5.2 Identifizierung der Bereiche mit verschiedenen Funktionen .....	80
4.2.5.3 Strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen.....	82
4.2.6 Die 50S Untereinheit von <i>H. marismortui</i> und Vergleich von TmaL4 mit HmaL4..	84
4.2.6.1 Generelle Aspekte der 50S Struktur.....	84
4.2.6.2 Modell für die RNA-Bindung von TmaL4 .....	87
4.2.7 Mutagenesestudien an EcoL4.....	89
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>93</b>
5.1 NUSA.....	93
5.1.1 Bindung an RNAP und andere Komponenten des Transkriptionsapparates .....	93
5.1.2 Kombination von sequenzspezifischer und –unspezifischer RNA-Bindung .....	94
5.1.3 Stapelung der Domänen .....	97
5.1.4 Modell für den Effekt von NusA auf die Elongation der Transkription .....	98
5.2 RIBOSOMALES PROTEIN L4.....	100
5.2.1 TmaL4 als struktureller Prototyp für EcoL4.....	100
5.2.2 Bindung an ribosomale RNA.....	101
5.2.3 Regulatorische Eigenschaften von L4.....	101
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>104</b>
<b>7. ANHANG .....</b>	<b>124</b>
7.1 ABKÜRZUNGEN.....	124
7.2 ABKÜRZUNGEN FÜR AMINOSÄUREN .....	125

## 1. Zusammenfassung

Ribosomen, große Ribonukleoproteinkomplexe, fungieren als universelle Maschinerien zur Synthese von Proteinen in Zellen aller Abstammungslinien. In der Regel wird in Bakterien die Expression der Proteine eines ribosomalen Protein Operons von einem regulatorischen ribosomalen Protein autogen reguliert, das an die Boten-RNA des Operons bindet und so die Translation der Gene reprimiert. Das ribosomale Protein L4 ist das einzige bekannte regulatorische Protein, das zusätzlich zur Translation auch die Transkription seines eigenen S10 Operons durch einen vorzeitigen Abbruch der Synthese der Boten-RNA kontrollieren kann. Dabei kommt es zu der Bildung eines Terminationskomplexes, der neben einer pausierten RNA-Polymerase aus zwei regulatorischen Haarnadelschleifen der S10 *leader*-RNA, L4 und dem Elongationsfaktor *N-utilization substance A* (NusA) besteht. Während der Effekt von L4 für das S10 Operon spezifisch ist, stellt NusA einen generellen Transkriptionsfaktor dar, der bei vielen Genen die Transkriptionsrate der RNA-Polymerase verlangsamt, wobei es durch weitere Modifizierung des Elongationskomplexes entweder zu einer Pausierung, zu einem vorzeitigen Abbruch (Attenuation, Termination) oder sogar zu einem Überlesen von Terminatorsignalen (Antitermination) der Transkription kommen kann. L4 fungiert noch als Komponente der großen 50S Untereinheit des Ribosoms und unterstützt in dieser Eigenschaft die Faltung der 23S ribosomalen RNA durch spezifische Bindung. Da die RNA-bindenden Regionen von L4 nicht charakterisiert sind und die Frage, ob NusA überhaupt RNA kontaktiert, noch nicht umfassend geklärt wurde, sollte eine strukturelle Charakterisierung beider Proteine vorgenommen werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die dreidimensionalen Strukturen von NusA und L4 aus dem thermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Dazu wurden die entsprechenden Gene kloniert, in *E. coli* überexprimiert und für jedes Protein dreistufige Reinigungsprotokolle entwickelt, die reproduzierbare Kristallisation erlaubten. Kristalle von NusA streuten Synchrotronstrahlung bis zu einer Auflösung von 2,1 Å. Die Struktur wurde durch multiple anomale Dispersion (MAD) mit Hilfe eines Selenomethionin-Derivates gelöst und bis zu einem kristallographischen R-Faktor von 24,4% verfeinert. Die Struktur von L4 wurde mit Hilfe des multiplen isomorphen Ersatzes (MIR) gelöst und bei einer Auflösung von 1,7 Å bis zu einem kristallographischen R-Faktor von 20,8% verfeinert.

NusA ist ein annähernd lineares Molekül, das aus vier Domänen besteht. Die N-terminale Domäne, die eine  $\alpha/\beta$ -Faltung zeigt, ist sehr flexibel und wichtig für die Interaktion von NusA mit der RNA-Polymerase. Deshalb erscheint eine Konformationsänderung dieser Region bei Bindung an RNA-Polymerase wahrscheinlich. Der Rest des Proteins ist aus drei RNA bindenden Motiven aufgebaut, einem fünfsträngigen  $\beta$ -barrel (S1 Domäne) und zwei nachfolgenden K-Homologie (KH) Domänen. Diese bestehen aus einem dreisträngigen  $\beta$ -Faltblatt, das auf einer Seite von drei oder vier  $\alpha$ -Helices flankiert wird. Zum ersten Mal ist die Anordnung von mehreren KH Motiven in einem Protein zu sehen, die ein Modell für den modularen Aufbau einer Vielzahl von RNA- und DNA-assoziierten Multi-KH Proteinen darstellt. Modelle legen die Vermutung nahe, daß die Kontaktfläche eine kooperative Bindung beider KH Module an RNA erlaubt. Die Interaktionen zwischen der S1 Domäne und dem ersten KH Motiv ähneln der Kontaktfläche zwischen den beiden KH Domänen, wobei ein Stapel aus alternierenden  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices erzeugt wird. Eine Region stark positiven Oberflächenpotentials, die fast eine gesamte Flanke des Moleküls umfaßt, vermittelt wahrscheinlich unspezifische Wechselwirkung mit RNA, während die spezifische Erkennung von Sequenzen der Boten-RNA von den einzelnen RNA-bindenden Motiven übernommen wird. Die Struktur legt die Vermutung nahe, daß NusA durch multiple Kontakte mit der transkribierenden RNA-Polymerase verbunden ist, die Boten-RNA kontinuierlich nach regulatorischen Signalen abtastet und bei deren Erkennung eine Modifikation des Elongationskomplexes herbeiführt. In diesem Zusammenhang erscheint es wahrscheinlich, daß NusA eine regulatorische Haarnadelschleife der S10 *leader*-RNA direkt kontaktiert und es daraufhin zu einer Pausierung der Transkription kommt.

Die Struktur von L4 besteht aus einem zentralen sechssträngigen  $\beta$ -Faltblatt, um das herum sieben  $\alpha$ -Helices gruppiert sind. Das Protein weist strukturelle Homologie zu einer Reihe von Mononukleotid bindenden Motiven auf. Eine zentrale, 55 Aminosäuren lange Region, die von zwei Helices flankiert wird, ist ungeordnet und nicht im Modell enthalten. Biochemische Experimente und kristallographische Untersuchungen einer anderen Gruppe an der 50S ribosomalen Untereinheit zeigen, daß dieser Teil in erster Linie für den Einbau des Proteins in das Ribosom verantwortlich ist und bei Bindung an ribosomale RNA eine ausgestreckte Konformation annimmt. Zwei fast senkrecht zueinander verlaufende  $\alpha$ -Helices im globulären Rumpf von L4 wurden als mögliche Bindungspartner für die Boten-RNA des S10 Operons identifiziert. Durch Mutagenesestudien, die im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes in den USA durchgeführt wurden, wurde die regulatorische Region von L4 auf einen weiteren  $\alpha$ -

helikalen Bereich am C-Terminus ausgedehnt. Unterschiede in der regulatorischen Aktivität zwischen *Thermotoga maritima* L4 und seinem *Escherichia coli* Homologen sind wahrscheinlich auf Sequenzunterschiede in dieser Helix zurückzuführen. Da L4 nur minimale Kontakte mit anderen Proteinen innerhalb der großen ribosomalen Untereinheit eingeht, aber über eine ausgedehnte, RNA-bindende regulatorische Region verfügt, erscheint es wahrscheinlich, daß das Protein hauptsächlich über Kontakte zur RNA im Terminationskomplex des S10 Operons verankert wird. Dabei ist es möglich, daß NusA bei Bindung an die S10 *leader*-Region eine Konformationsänderung in der RNA induziert, die eine Bindungsstelle für L4 schafft.

Veröffentlichungen, die Teile dieser Arbeit beinhalten oder beinhalten werden:

Worbs, M.; Huber, R. und Wahl, M. C. (2000). Crystal structure of ribosomal protein L4 shows RNA-binding sites for ribosome incorporation and feedback control of the S10 operon. *EMBO J.*, **19**, 807-818.

Worbs, M. und Wahl, M.C. (2000). Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of bacterial and archaeal L4 ribosomal proteins. *Acta Crystallog. D*, **56**, 645-647.

Worbs, M.; Bourenkov, G.P.; Bartunik, H.D.; Huber, R. und Wahl, M.C. An extended RNA binding surface through arrayed S1 and KH Domains in transcription factor NusA. *Manuskript in Vorbereitung*.

## 2. Einleitung

### 2.1 Allgemeine Aspekte der Transkription in Eukaryonten und Prokaryonten

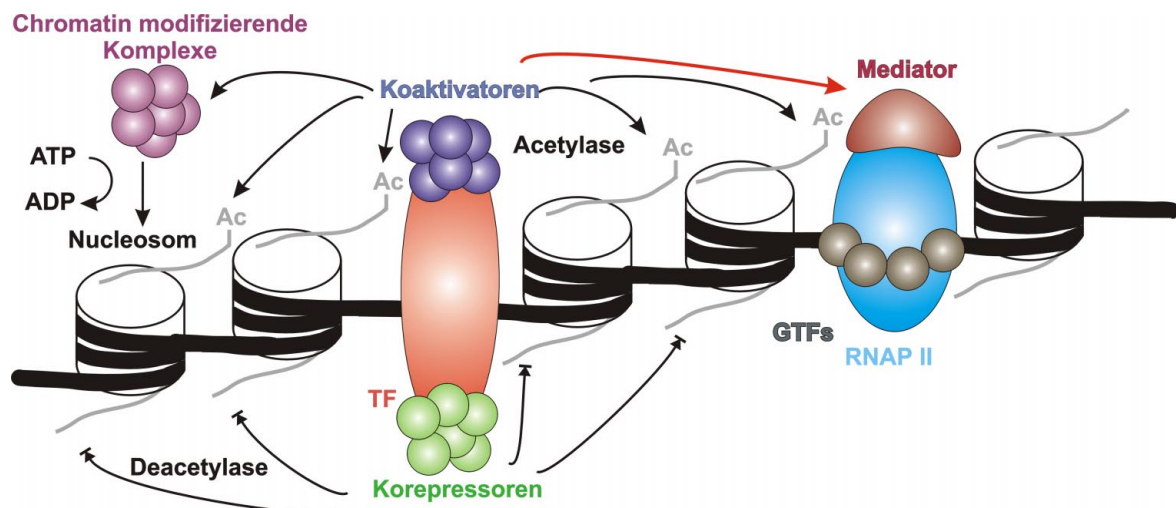
Transkription, die DNA-abhängige Synthese von Boten-RNA (engl. messenger-RNA, *mRNA*), ist ein zentraler Prozeß bei der Expression von genetischer Information und deshalb auch ein kritischer Kontrollpunkt, der einer Vielzahl von regulatorischen Mechanismen unterliegt. Obwohl sich die grundlegenden Mechanismen der prokaryontischen Transkription und ihrer Regulation auch bei Eukaryonten erhalten haben, ist das System in den höheren Organismen weitaus komplexer.

Ein grundlegender Unterschied ist die räumliche und zeitliche Trennung von Transkription und Translation in Eukaryonten, die auf die Unterteilung der Zelle in Kompartimente zurückzuführen ist: Die *mRNA*-Vorläufer werden im Zellkern synthetisiert und prozessiert bevor sie ins Cytosol transportiert werden, wo die Translation stattfindet. Die umfangreiche Prozessierung beinhaltet unter anderem das Anfügen einer 5'-Kappe und eines Poly(A)-Schwanzes am 3'-Ende der Transkripte. Introns, die nicht codierende Regionen innerhalb von Genen enthalten, müssen vor der Translation durch Spleißen herausgeschnitten werden. Im Gegensatz dazu dient in Prokaryonten das neu synthetisierte *mRNA*-Transkript, das keine Introns enthält, sofort als Matrize für die Translation, so daß es zu einer Kopplung beider Prozesse kommt. In Bakterien gibt es koordinierte Einheiten der Transkription, die Operons, die die gleichzeitige Kontrolle und Expression mehrerer Gene erlauben. Eukaryontische Boten-RNAs kodieren nur für ein Gen.

Der bei weitem größte Teil der prokaryontischen RNA wird von einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase (RNAP) synthetisiert. Das *Core*-Enzym mit einem Molekulargewicht von ungefähr 400 kDa ist aus vier Untereinheiten,  $\alpha_2\beta\beta'$ , zusammengesetzt. In Eukaryonten wird die Transkription von drei RNAPs übernommen, die sich unter anderem in ihrer Matrizespezifität und Lokalisation unterscheiden. Dabei ist RNAP II im Nucleoplasma für die Expression von mRNA und heterogener Kern-RNA zuständig. RNAP I und III, die sich in den Nucleoli beziehungsweise Nucleoplasma befinden, synthetisieren ribosomale RNA (rRNA) und transfer-RNA (tRNA). Die am besten charakterisierte Form einer eukaryontischen RNAP II besteht aus 12 Polypeptiden (Cramer *et al.*, 2000) mit einem Molekulargewicht von 500 kDa.



Da die eukaryontische Transkription vielschichtiger ist, gibt es eine ganze Reihe zusätzlicher Regulationsmechanismen, die in Prokaryonten nicht vorhanden sind. Es sei nur erwähnt, daß die Packung von DNA im Chromatin als ein entscheidender Faktor für die Repression von Genen angesehen wird, die vor der Transkription erst von positiv regulierenden Aktivatoren aufgehoben werden muß (Übersichtsartikel (Kornberg, 1999)). Bei der Aktivierung von Genen und ihrer nachfolgenden Transkription sind viele Proteine beteiligt, wie Koaktivatoren oder -Repressoren, die in Zusammenarbeit mit spezialisierten Transkriptionsfaktoren, die Aktivierung oder Deaktivierung von ganzen Bereichen der DNA bewirken, indem sie Chromatin modifizierende Komplexe rekrutieren. RNAPs werden dann während der Transkription von Mediatoren und generellen Transkriptionsfaktoren kontrolliert, die die Erkennung von Promotoren erlauben oder die Entwindung der DNA bewirken (siehe Abb. 2-1)



**Abb. 2-1:** Ausgewählte Beispiele der transkriptionellen Regulation in Eukaryonten (geändert nach (Kornberg, 1999)). Ein Transkriptionsfaktor (TF) der an ein regulatorisches Element bindet kann entweder als Aktivator oder Repressor wirken. Aktivatoren können Chromatin modifizierende Komplexe rekrutieren, die unter ATP-Verbrauch Nucleosomen umbauen und für weitere Faktoren zugänglich machen. Koaktivatoren verfügen über Acetyltransferaseaktivität, die die Histontermini modifiziert und damit die übergeordnete Struktur von Chromatin verändert. Die Acetylierung führt zu einer Verringerung der genischen Repression durch Chromatin, während die Deacetylierung durch Korepressoren diese wieder etabliert. Als zweiter Schritt übertragen die Aktivatoren regulatorische Signale zur RNAP II über einen Multiproteinkomplex, den Mediator. Die RNAP benötigt generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs), die beispielsweise die Promotorerkennung erlauben, die TATA-Box binden oder als ATP-abhängige Helikasen die Promotor-DNA entwinden.

Da im Rahmen dieser Arbeit die Strukturen von zwei Proteinen aus dem Bakterium *Thermotoga maritima* gelöst wurden, die im Falle von NusA eine generelle Auswirkung und bei L4 einen Operon-spezifischen Effekt auf die Kettenverlängerung von mRNA während der

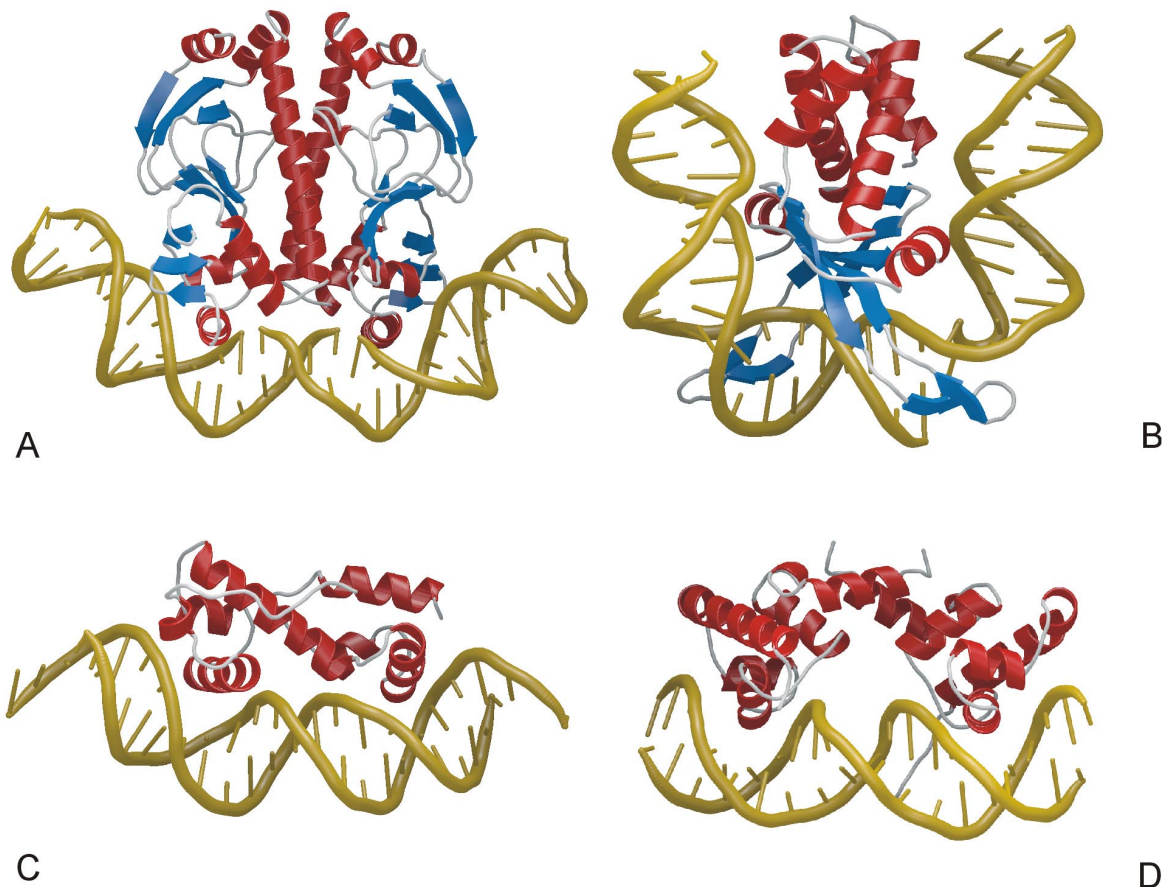
Transkription haben, wird sich diese Einleitung auf prokaryontische Transkriptionsfaktoren beschränken. Beide Proteine üben ihren Einfluß wahrscheinlich zum Teil durch spezifische Bindung an die Boten-RNA aus, weshalb der Schwerpunkt bei RNA-bindenden Elongationsfaktoren liegen wird und nur kurz auf die große Vielfalt der mit DNA interagierenden Transkriptionsfaktoren eingegangen wird.

## 2.2 DNA-bindende prokaryontische Transkriptionsfaktoren

Vor allem die RNAP, dient als Angriffspunkt für eine Reihe von regulatorischen Signalen während der drei Phasen der Transkription: Initiation, Elongation und Termination. Frühe Studien beschäftigten sich hauptsächlich mit der Kontrolle der Initiation. Dabei wurden  $\sigma$ -Faktoren identifiziert, die als „fünfte“ Untereinheit während des Initiationszyklus der bakteriellen RNA-Polymerase die Erkennung bestimmter Promotorstellen erlauben (Burgess *et al.*, 1969) und dabei wahrscheinlich durch spezifische Bindung an die DNA auch an dem Aufschmelzen der DNA-Matrize und der Bildung der Transkriptionsblase beteiligt sind (Helmann und Chamberlin, 1988; Hinkle und Chamberlin, 1972).

Daneben wurden eine Reihe von anderen DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren entdeckt, darunter der lac-Repressor, der an eine promotornahe Region im Lactoseoperon bindet und damit die Transkription der Strukturgene des Operons verhindert (Dickson *et al.*, 1975; McKay *et al.*, 1982). Der  $\lambda$ -Repressor verhindert durch Bindung an seine Operator-Region die Bindung der RNAP an den Promotor und hemmt die Synthese weiterer Phagenproteine so daß der lysogene Zyklus aufrechterhalten wird (Johnson *et al.*, 1981; Reichardt und Kaiser, 1971). Die Strukturen einer Vielzahl von Komplexen zwischen Transkriptionsfaktoren und ihren DNA-Erkennungssequenzen ergaben ein detailliertes Bild von den Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der DNA. Ein häufig vorkommendes DNA-bindendes Modul bei prokaryontischen Transkriptionsfaktoren ist das Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH-Motiv) (Übersichtsartikel von (Brennan, 1992; Pabo und Sauer, 1992)). Die sogenannte Erkennungshelix kann mit Basenpaaren in der großen Furche der DNA in Wechselwirkung treten, wobei die zweite Helix durch hydrophobe Kontakte dieses Motiv stabilisiert. Die Art der Wechselwirkung dieses Moduls mit DNA konnte unter anderem in Kristallstrukturen des  $\lambda$ -Repressors mit seinem Operator (Clarke *et al.*, 1991), des Katabolitgen Aktivatorproteins CAP (Schultz *et al.*, 1991) und einigen Mitgliedern der ArasC Familie von Transkriptionsfaktoren, die verschiedenste Resistenzgene regulieren (Kwon *et al.*, 2000; Rhee *et*

*al.*, 1998) genau untersucht werden (siehe auch Abb. 2-2). Der *integration host factor* IHF der bei der Bindung eine starke Krümmung der DNA induziert und damit möglicherweise einen Teil der Promotorsequenz für Interaktionen mit RNAP zugänglich macht, ist ein Beispiel für die wachsende Zahl von DNA-bindenden Transkriptionsfaktoren, die an die kleine Furche der DNA binden (Rice *et al.*, 1996) (siehe Abb. 2-2).



**Abb. 2-2:** Ausgewählte Beispiele für die Vielfalt der DNA-Protein-Komplexe von Transkriptionsfaktoren. (A) Kataboliten Aktivatorprotein CAP (Schultz *et al.*, 1991), (B) *Integration host factor* IHF (Rice *et al.*, 1996), (C) MarA-DNA Komplex aus der Familie der ArasC Transkriptionsfaktoren (Rhee *et al.*, 1998), (D) DNA-bindende Domäne des  $\lambda$ -Repressors in Komplex mit seinem Operator (Clarke *et al.*, 1991).

### 2.3 prokaryontische Terminations- und Elongationsfaktoren

Früheste Hinweise, daß neben DNA- auch RNA-bindende Proteine die Transkription regulieren können, stammen von Studien über die genetische Polarität in *Escherichia coli* (Das, 1993). Diese bezeichnet das Phänomen, daß Nonsense-Mutationen in polycistronischen Boten-RNAs, die ein Stopp-Codon in promotornahen Genen einführen, manchmal die

Expression von anderen 3'-liegenden Genen verringern. Als verantwortlicher Faktor wurde das Protein Rho isoliert (Adhya und Gottesman, 1978; Roberts, 1969). Es wurde postuliert, daß dieses Protein an bestimmte Regionen der Boten-RNA, sogenannte Rho-abhängige Terminatoren, als Hexamer bindet und der RNA-Polymerase auf der RNA folgt. Das Protein kann dann die RNA-DNA Hybridhelix an der Transkriptionsblase unter ATP-Hydrolyse entwinden (Geiselman *et al.*, 1993) und somit die Transkription beenden. Da in Prokaryonten die Transkription eng mit der Translation gekoppelt ist, werden diese Terminatorsequenzen normalerweise durch translatierende Ribosomen maskiert (Richardson *et al.*, 1975). Die Nonsense-Mutationen vermindern die Translation und ermöglichen Rho dadurch, an den normalerweise maskierten Terminatoren innerhalb von Genen aktiv zu werden. Rho bindet bevorzugt an C-reiche Regionen der mRNA (Morgan *et al.*, 1985), wobei die N-terminale OB-Domäne des Proteins durch Wasserstoffbrückenbindungen zum Cytosin die Basis für eine spezifische Erkennung dieses Nukleotids aufbaut (Bogden *et al.*, 1999) (siehe Abb. 2-3).

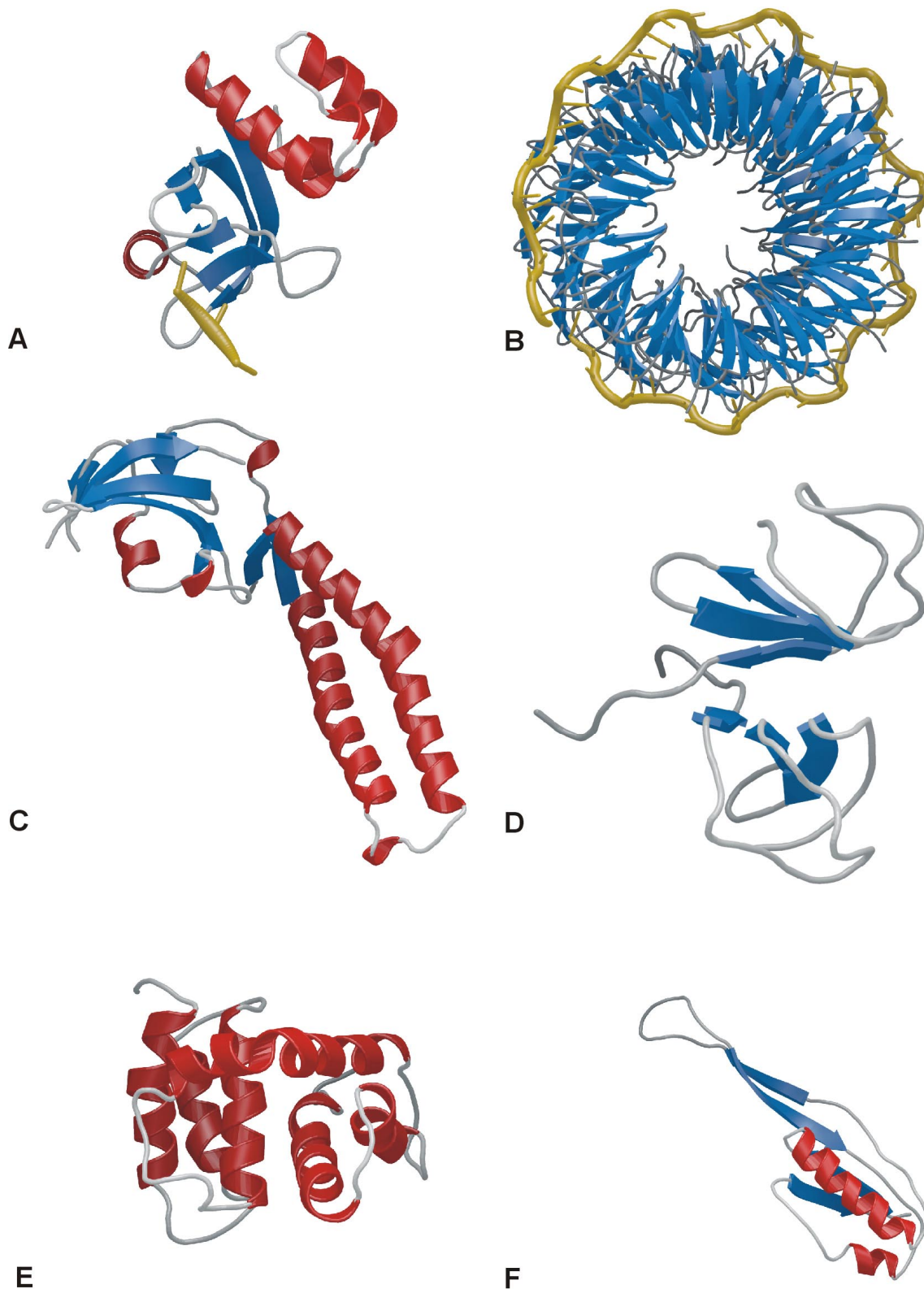
Neben den Rho-abhängigen Terminatoren wurden sogenannte intrinsische Terminatoren entdeckt, die durch G/C-reiche Haarnadelschleifen und nachfolgende A/T-reiche Regionen charakterisiert sind und ohne zusätzliche Proteinfaktoren zu einer Termination führen können (Brendel *et al.*, 1986; Rosenberg und Court, 1979). Der genaue Mechanismus der faktorunabhängigen Termination ist nicht bekannt, aber die Haarnadelschleife scheint die Wechselwirkungen zwischen der neu synthetisierten RNA und RNAP zu stören, wobei die A/T reiche Region zusätzlich eine wenig stabile DNA-RNA Hybridhelix ausbildet und somit der gesamte Elongationskomplex destabilisiert wird (Gusarov und Nudler, 1999; Richardson, 1996).

In den Leitsequenzen der Operons für die Biosynthese von Tryptophan und Histidin in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* wurden Regionen gefunden, die durch alternative Basenpaarung entweder kontrollierte Terminatoren (Attenuatoren) oder Antiterminatoren bilden können (Übersichtsartikel (Landick und Yanowsky, 1987)). Bei der Transkription hält die RNAP an einer sogenannten Attenuator-Region inne (Winkler und Yanofsky, 1981) und ermöglicht die Synthese des Leitpeptids durch das Ribosom (Miozzari und Yanofsky, 1978). Dieses Peptid enthält viele Codons der jeweiligen Aminosäure, was dazu führt, daß in Abhängigkeit der Konzentration der Aminosäure die Translation entweder stoppt oder fortgesetzt wird. Ein gestopptes Ribosom (geringe Konzentration der Aminosäure) interagiert mit einem Teil der

Sequenz des Attenuators und begünstigt die alternative Ausbildung einer Antiterminator-Haarnadelschleife, die es der RNAP ermöglicht, über die Attenuatorstelle hinaus die mRNA zu synthetisieren.

Die Ausbildung entweder einer Antiterminationsstruktur oder einer konkurrierenden Attenuator-Haarnadelschleife wird in einigen Systemen auch durch die Bindung eines regulatorischen Proteins an die mRNA beeinflusst (Übersichtsartikel (Henkin, 1996; Henkin, 2000)). Positiv regulierende Proteine wie bglG im *bgl* Operon von *E.coli* (Verwertung von Zuckern) oder die strukturell homologen SacY und SacT im *sac* Operon von *Bacillus subtilis* erlauben bei Bindung an die mRNA ein Auslesen der Gene über die Terminatoren hinaus. Die aktive Form dieser Proteine ist ein Dimer, das durch Phosphorylierung aus dem inaktiven Monomer gebildet wird (Amster-Choder und Wright, 1992; Arnaud *et al.*, 1992). Die Kristall- und NMR Strukturen der RNA-bindenden Domäne von SacY zeigen, daß durch die Dimerisierung ein RNA-bindendes  $\beta$ -Faltblatt *Sandwich* gebildet wird, das keine strukturelle Homologie zu anderen RNA-bindenden Modulen aufweist (Manival *et al.*, 1997; van Tilbeurgh *et al.*, 1997) (siehe Abb. 2-3).

Negative Regulatoren, die bei Interaktion mit der mRNA Termination der Elongation bewirken, wurden bislang nur in *Bacilli* gefunden (Shimotsu *et al.*, 1986). Im *trp* Operon bindet das TRAP-Attenuator-Protein, nachdem es durch Tryptophan aktiviert wurde, als 11-gliedriger Ring an eine Region in der *leader*-Sequenz, die elf GAG oder UAG Triplets enthält (Babitzke *et al.*, 1994; Babitzke *et al.*, 1996). Dadurch wird die Bildung einer alternativen Terminator-Haarnadelschleife begünstigt, die zum Abbruch der Transkription führt. Die RNA wickelt sich in einer ausgedehnten Konformation um den TRAP-Ring, wobei jedes Monomer mit einem Basentriplet wechselwirkt, so daß ein hochsymmetrischer Komplex entsteht (Antson *et al.*, 1999) (siehe Abb.2-3).



**Abb. 2-3:** Ausgewählte Beispiele für RNA-bindende Transkriptionsfaktoren. **(A)** RNA-bindende OB-Domäne des Terminationsfaktors Rho mit poly(C) RNA (Bogden *et al.*, 1999); **(B)** Komplex des Attenuations-Faktors TRAP mit mRNA (Antson *et al.*, 1999); **(C)** Transkriptsplattungsfaktor GreA (Stebbins *et al.*, 1995); **(D)** Dimeres RNA-bindendes Motiv des Elongationsfaktors SacY (Manival *et al.*, 1997; van Tilbeurgh *et al.*, 1997); **(E)** Antiterminationsfaktor NusB (Altieri *et al.*, 2000); **(F)** ribosomales Protein S10 (Elongationsfaktor NusE) (Schluenzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000).

Eine weitere Klasse von regulatorischen Signalen auf der Boten-RNA, blockiert die katalytische Aktivität der RNAP, was zu sogenannten stabilen *dead end* Komplexen führt, die das RNA-Transkript weder freisetzen noch ohne äußere Einflüsse in der Lage sind, die Transkription wieder aufzunehmen (Arndt und Chamberlin, 1990). In einem solchen Fall scheinen Transkriptspaltungsfaktoren wie die *E. coli* Proteine GreA und GreB bei Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  die Abspaltung des 3'-Endes der mRNA zu induzieren, was zu einer Wiederaufnahme der Kettenverlängerung vom neugebildeten Ende aus führt (Surratt *et al.*, 1991). Da RNAP aus *E. coli* GreA/GreB Mutanten in der Lage ist, die mRNA in Abwesenheit beider Faktoren bei leicht alkalischem pH zu spalten und GreA keine strukturelle Ähnlichkeit mit Restriktionsenzymen aufweist, kann davon ausgegangen werden, daß diese Proteine funktionelle Gruppen innerhalb der RNAP aktivieren, die für die Hydrolyse der mRNA verantwortlich sind (Orlova *et al.*, 1995). Der N-Terminus von GreA (siehe Abb. 2-3) besteht aus einem verdrillten 2-Helix-Bündel, das offenbar die neusynthetisierte RNA im katalytischen Zentrum der RNAP kontaktiert (Stebbins *et al.*, 1995).

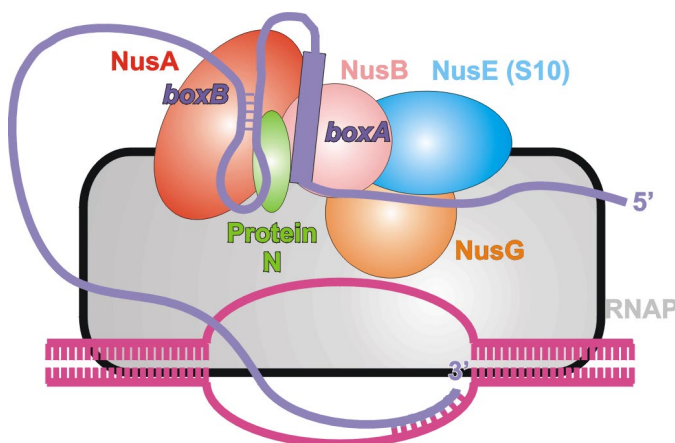
### 2.3.1 NusA und die Familie der Nus-Faktoren

Beim Übergang vom lysogenen zum lytischen Zyklus während der Entwicklung des Bakteriophagen  $\lambda$  müssen die Phagen-Gene des verzögert frühen Stadiums angeschaltet werden. Dazu müssen eine Reihe von intrinsischen und Rho-abhängigen Terminatorsequenzen von der RNAP überlesen werden, was eine Modifikation des Elongationskomplexes erfordert, der durch das  $\lambda$ -spezifische Protein N vermittelt wird (Übersichtsartikel von (Richardson, 1996)). Bei der Untersuchung von Mutationen, die die N-Antitermination verhindern, wurden drei *E. coli* Wirtsproteine entdeckt: NusA, NusB und NusE (Friedman und Baron, 1974; Friedman *et al.*, 1981; Friedmann *et al.*, 1976; Keppel *et al.*, 1974), die entsprechend benannt wurden (Nus-Faktoren, *N-utilization substance*). Versuche, die N-vermittelte Antitermination *in vitro* zu rekonstituieren führten zur Entdeckung eines vierten Faktors, NusG, der die in Anwesenheit der drei anderen Faktoren schwache Stimulation der Transkription verstärkt (Li *et al.*, 1992).

Eine Vielzahl von Experimenten erlaubten es folgendes Modell der N-vermittelten Antitermination aufzustellen (Greenblatt und Li, 1981b; Li *et al.*, 1992; Mason und Greenblatt, 1991; Mason *et al.*, 1992a): Protein N wechselwirkt mit einer regulatorischen



Sequenz, der *nut-site* auf der mRNA, die zwischen dem Promotor und dem ersten Terminator in den beiden frühen Phagenoperons lokalisiert ist (de Crombrughe *et al.*, 1979; Olson *et al.*, 1982; Salstrom und Szybalski, 1978). Die *nut-site* besteht aus zwei getrennten Elementen *boxA* und *boxB*. Die N-terminalen 22 Aminosäuren von Protein N, das komplett ungefaltet ist (Mogridge *et al.*, 1998) weisen ein Arginin reiches Motiv (ARM) auf und binden an die *boxB* Haarnadelschleife, wobei sie eine  $\alpha$ -helikale Konformation annehmen. Die NMR-Struktur dieses Komplexes zeigte, daß die  $\alpha$ -Helix in erster Linie die Gesamtstruktur der Haarnadelschleife durch Interaktion von positiv geladenen Seitenketten mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat erkennt und darüberhinaus hydrophobe Kontakte zu RNA-Basen ausbildet (Legault *et al.*, 1998). Der ungepaarte Loop der RNA faltet analog zu einem sogenannten GAAA Tetra-Loop, der eine hervorstehende Base aufweist, die wahrscheinlich mit NusA wechselwirkt. Der N-*nut-site*-Komplex ist in der Lage, mit NusA zu interagieren, wobei der Komplex sowohl durch Protein-Protein- als auch Protein-RNA Wechselwirkungen stabilisiert wird. NusA scheint dabei an beide regulatorischen Elemente der *nut-site* zu binden (Mogridge *et al.*, 1995). Da NusA wahrscheinlich ein permanenter Bestandteil der RNAP während des Elongationszyklus ist (Greenblatt und Li, 1981a), assembliert sich der gesamte Komplex auf der Oberfläche des Enzyms. Der RNAP-NusA-N-*nut-site* Komplex dient anschließend als zentraler Bestandteil für eine Kaskade weiterer Wechselwirkungen, die zu einem Einbau von NusB, NusE und NusG führen (siehe Abb.2-4).



**Abb.2-4:** Modell des  $\lambda$ -N vermittelten Antiterminationskomplexes, der es der RNAP ermöglicht über Terminatoren hinaus  $\lambda$ -spezifische Gene zu transkribieren (nach (Richardson, 1996)).

Da RNAP eine terminationsresistente Form auch jenseits der *nut-site* beibehalten muß, wurde ein sogenanntes RNA-Looping vorgeschlagen, bei dem sich die wachsende mRNA Kette schlau-fenförmig ausweitet und der Polymerase damit erlaubt im ständigen Kontakt mit den Nus-Faktoren und der *nut-site* zu stehen (Richardson, 1996) (Abb.2-4). *In*

*vitro* Experimente zeigten, daß ein Core-Elongationskomplex, der abgesehen von der *nut-site* nur noch N und NusA enthält, in der Lage ist, Antitermination über kürzere Distanzen zu vermitteln (Mason *et al.*, 1992b; Whalen *et al.*, 1988). Da die  $\lambda$ -Antitermination *in vivo* aber



in Regionen aktiv ist, die bis zu 10 kb von der *nut-site* entfernt sind, werden die anderen Nus-Proteine offenbar als stabilisierende Elemente benötigt (Richardson, 1996).

Das kooperative Zusammenspiel vieler Einzelkomponenten beim Aufbau dieses Ribonukleoprotein-Komplexes legt die Vermutung nahe, daß Bakteriophage  $\lambda$  einen bereits bestehenden regulatorischen Prozeß für die Transkription seiner Gene einsetzt. In der Tat wurden *boxA*-homologe Sequenzen in den *leader*-Regionen der sieben rRNA (*rrn*) Operons von *E. coli* gefunden, deren Mutation nachhaltig die Produktion der rRNA beeinträchtigt (Berg *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1984). *In vitro* konnte Antitermination im *rrn* System mit *E. coli* Rohzellextrakt nachgewiesen werden, wobei gezeigt wurde, daß alle vier Nus-Faktoren notwendig sind (Squires *et al.*, 1993; Vogel und Jensen, 1997). Eine besondere Bedeutung scheint dabei NusB zuzukommen, da kälteempfindliche, langsam wachsende *E. coli* NusB Mutanten isoliert wurden, die Defekte in der Assemblierung von Ribosomen aufwiesen (Georgopoulos *et al.*, 1980) (Taura *et al.*, 1992). NusB und NusE bilden ein Heterodimer, das in der Lage ist, spezifisch an das *rrn boxA* Element zu binden (Mason *et al.*, 1992a; Nodwell und Greenblatt, 1993). Da *rrn* Antitermination *in vitro* nicht durch die Zugabe aller Nus-Proteine, sondern nur durch Rohzellextrakt rekonstituiert werden konnte, wird wenigstens ein zusätzlicher bisher nicht identifizierter Faktor benötigt (Squires *et al.*, 1993).

Die Entdeckung, daß *E. coli*, die mit dem Phagen HK022 infiziert sind, das Wachstum des  $\lambda$ -Phagen nicht mehr unterstützen, führte zur Isolierung des HK022 Proteins Nun (Baron und Weisberg, 1992; Robert *et al.*, 1987). In Analogie zu N besitzt Nun am N-Terminus ein ARM-Motiv, das mit der  $\lambda$ -*boxB* Haarnadelschleife wechselwirkt, in Kooperation mit allen vier Nus-Faktoren allerdings zu einer Termination der Transkription an der  $\lambda$ -*nut-site* führt (Chattopadhyay *et al.*, 1995; Henthorn und Friedman, 1996; Robledo *et al.*, 1991; Watnick und Gottesman, 1999). Der genaue Mechanismus dieser Termination ist nicht bekannt, aber das Protein Nun scheint durch gleichzeitige Interaktion mit der mRNA und Interkalation von C-terminalen Aminosäuren in die doppelsträngige DNA-Matrize eine Blockierung der Transkription zu bewirken (Watnick und Gottesman, 1999; Watnick *et al.*, 2000). Nun konkurriert dabei wahrscheinlich mit N um die gleiche Bindungsstelle an *boxB* (Hung und Gottesman, 1995). Deshalb scheinen die Nus-Faktoren durch Zusammenarbeit in der Lage zu sein, die Aktivität der RNAP zu modulieren, wobei je nach beteiligtem Phagen-Protein unterschiedliche Auswirkungen auf die Elongation zu beobachten sind (Friedman, 1992).

Für NusB wurden in *E. coli* für die Transkription keine weiteren Funktionen abgesehen von der Antitermination nachgewiesen. Es wurden auch Effekte auf die Translation nachgewiesen (siehe unten). Die Struktur des Proteins zeigt eine neuartige vollständig  $\alpha$ -helikale Faltung, wobei die meisten konservierten Aminosäuren offenbar im Kern des Proteins lokalisiert sind und die Konformation stabilisieren (Altieri *et al.*, 2000; Gopal *et al.*, 2000; Huenges *et al.*, 1998) (siehe Abb.2-3). Während NusB von *E. coli* als Monomer in Lösung vorliegt, wurde gezeigt, daß das homologe Protein aus *Mycobacterium tuberculosis* ein Dimer bildet (Gopal *et al.*, 2000).

Auch NusE scheint bei der Transkriptionskontrolle nur Antitermination zu vermitteln. Da es als ribosomales Protein S10 gleichzeitig Bestandteil der kleinen 30S Untereinheit ist (Friedman *et al.*, 1981), hat dieses Protein möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Kopplung der Transkription mit der Translation. Ob es als freies Protein oder als Komponente des Ribosoms bei der Antitermination fungiert ist nicht bekannt. Da dessen Bindungspartner, NusB, aber die Translationsrate und die damit gekoppelte Sekretion von Proteinen beeinflusst scheint das letztgenannte wahrscheinlicher zu sein (Richardson, 1996). Die Struktur von S10 innerhalb der 30 S Untereinheit (Schluenzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000) zeigt ein Protein mit gemischter  $\alpha/\beta$ -Faltung, dessen ausgedehnter  $\beta$ -Hairpin in die rRNA hineinragt, während der globuläre Kern an der Oberfläche lokalisiert ist (siehe Abb.2-3). Die NusE71 Mutation, die die N-vermittelte Antitermination verhindert (Court *et al.*, 1995; Friedman *et al.*, 1981), befindet sich in einem  $\alpha$ -helikalen Segment, das keine Kontakte zu rRNA oder anderen Proteinen macht und deshalb auch im 30S-komplexierten Protein für Interaktion zu anderen Nus-Faktoren oder der *nut-site* zur Verfügung stünde.

NusG ist strukturell noch nicht charakterisiert worden, aber das NusG-Homologe aus *Thermotoga maritima* bindet sequenzunspezifisch und kooperativ an DNA und RNA, wobei elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, daß der Protein-DNA-Komplex eine den Histonen ähnliche Kondensation der DNA aufweist (Liao *et al.*, 1996). Das *Thermotoga maritima* Protein ist nicht in der Lage, die Funktionen seines Homologen in *E. coli* zu übernehmen. NusG dient in *E. coli* neben der Antitermination als wichtiger Kofaktor für die Rho-abhängige Termination. Es konnte gezeigt werden, daß manche Rho-abhängigen Terminatoren nur in Anwesenheit von NusG funktionieren (Sullivan und Gottesmann, 1992) und das Protein offenbar als Bindungspartner für Rho dient und so eine Assoziation des Terminationsfaktors mit dem Transkriptionskomplex vermittelt (Richardson, 1996).

NusA ist der größte ( $M_r \sim 55$  kDa in *E. coli*) der Nus-Faktoren und als einziger absolut essentiell für *E. coli* (Nakamura *et al.*, 1986; Nakamura, 1983; Schauer *et al.*, 1987). Seine Bedeutung wird weiterhin dadurch unterstrichen, daß er im *Mycoplasma genitalium* Genom präsent ist, das wahrscheinlich die kleinste Ausstattung an Genen enthält die von Bakterien benötigt werden (Fraser *et al.*, 1995). Im Gegensatz zu den restlichen Nus-Faktoren ist NusA auch in der Lage allein regulierend auf die RNAP einzuwirken. Das Protein bindet kompetitiv mit den  $\sigma$ -Faktoren wahrscheinlich an die gleichen Regionen der RNAP (Gill *et al.*, 1991b) und ist permanenter Bestandteil des RNAP-Core-Enzyms während der Elongationsphase der Transkription. Es wurden deshalb zwei verschiedene faktorabhängige Zyklen für die RNAP während der Transkription vorgeschlagen: der  $\sigma$ -Zyklus (Initiation) und der NusA-abhängige *Loop* (Elongation, Termination) (Greenblatt und Li, 1981a). NusA beeinflusst die Elongation auf zweierlei Weise: Es erhöht den  $K_s$  für die Nucleosidtriphosphate (NTP) Substrate der RNAP und beeinflusst die Verweildauer des Enzyms an bestimmten regulatorischen Signalen auf der mRNA, was zu einer Unterbrechung oder Termination der Transkription führen kann (Schmidt und Chamberlin, 1984). Der erstgenannte Effekt führt zu einer Verlangsamung der Elongation bei niedriger Konzentration an NTPs und ist möglicherweise auf eine NusA-induzierte Konformationsänderung der NTP Bindungsstelle der RNAP zurückzuführen (Schmidt und Chamberlin, 1984). Der zweite Effekt tritt an Haarnadelschleifen ein, die sich in der neusynthetisierten mRNA gebildet haben, wobei die Stärke des regulatorischen Signals nicht an allen Haarnadelschleifen gleich ausfällt. Es wurde diskutiert, daß diese Variabilität auf Unterschiede in der Bindung dieser Sekundärstrukturelemente mit NusA zurückzuführen ist. NusA stabilisiert diese Bereiche möglicherweise, da es Terminationssignale gibt, die in Abwesenheit des Proteins nicht aktiv sind (Theissen *et al.*, 1990; Uptain *et al.*, 1997). Alternative Modelle gehen davon aus, daß NusA die Bindung dieser Terminationssignale an die RNAP verstärkt, ohne dabei selbst die mRNA kontaktieren zu müssen (Richardson, 1996).

Experimente mit dem Ziel, RNA-Bindung durch NusA nachzuweisen, lieferten lange Zeit widersprüchliche Ergebnisse. Sequenzvergleiche zeigten, daß NusA aus mehreren Domänen aufgebaut ist, die homolog zum S1-Modul und der KH-Domäne sind (Bycroft *et al.*, 1997; Gibson *et al.*, 1993). Varianten dieser Motive wurden in einer Vielzahl von Proteinen entdeckt, die mit RNA oder DNA assoziiert sind: Das ribosomale Protein S1, das der erstgenannten Domäne ihren Namen gab, ist aus sechs Kopien dieses Motivs aufgebaut

(Subramanian, 1983). Das Protein bindet spezifisch sowohl  $\lambda$ -*boxA* als auch die *boxA* Variante der rRNA Operons in *E. coli* (Mogridge und Greenblatt, 1998). Die KH-Domäne wurde zum ersten Mal im humanen heterogenen ribonuklearen Protein K (hnRNP K) identifiziert (Siomi *et al.*, 1993), das bei der Prozessierung von prä-mRNA im Zellkern beteiligt ist. NusA konnte in *E. coli* nur in Transkriptionskomplexen mit einzelsträngiger neusynthetisierter mRNA vernetzt werden, wobei keine Präferenz für eine bestimmte Sequenz erkennbar war (Liu und Hanna, 1995). *In vitro* konnte RNA-Bindung an das isolierte Protein nicht reproduzierbar nachgewiesen werden, obwohl es Hinweise gibt, daß NusA spezifisch die  $\lambda$ -*nut-site* in Antiterminationskomplexen kontaktiert (Das und Wolska, 1984; Horwitz *et al.*, 1987). Von NusA gesteuerte regulatorische Signale auf der mRNA befinden sich oft zwischen den Startpunkten der Translation und innerhalb der Gene gelegenen Rho-abhängigen Terminatoren (Richardson, 1996). Die NusA vermittelte Verlangsamung der Transkription an diesen Punkten kann es dem Ribosom ermöglichen, mit der RNAP aufzuschließen und die Terminatoren zu maskieren, die normalerweise zu einem vorzeitigen Abbruch der Transkription führen (Ruteshouser und Richardson, 1989). NusA koppelt deshalb die Transkription mit der Translation und ermöglicht eine Synchronisierung der beiden Vorgänge. Das Zusammenspiel zwischen NusA und Rho wird dadurch unterstrichen, daß eine normalerweise lethale NusA Mutante lebensfähig wird, wenn gleichzeitig die Rho-abhängige Termination verringert wird (Zheng und Friedman, 1994).

Im einzelnen konnte gezeigt werden, daß NusA das Pausieren der RNAP in den *trp*- und *his*-Operons kontrolliert (Chan und Landick, 1989; Farnham *et al.*, 1982; Landick und Yanofsky, 1984). Es erhöht außerdem die Wahrscheinlichkeit, daß ein Attenuatorsignal vor den Genen *rpoB* und *rpoC* für die beiden Untereinheiten  $\beta$  und  $\beta'$  der RNAP überlesen wird (Linn und Greenblatt, 1992). NusA scheint in *E. coli* Antitermination durch das  $\lambda$ -Protein Q zu erhöhen (Grayhack *et al.*, 1985), obwohl *in vitro* Experimente zeigten, daß Q alleine in der Lage ist, RNAP zu instruieren, sowohl intrinsische wie auch Rho-abhängige Terminatoren zu überlesen (Yang *et al.*, 1989). Q ist für die Transkription der späten Gene des  $\lambda$ -Phagen zuständig. Der genaue Mechanismus der Q vermittelten Antitermination ist nicht bekannt, unterscheidet sich aber dadurch grundlegend von N, daß Q ein spezifisch DNA bindendes Protein ist (Yarnell und Roberts, 1992).

### 2.3.2 Ribosomales Protein L4

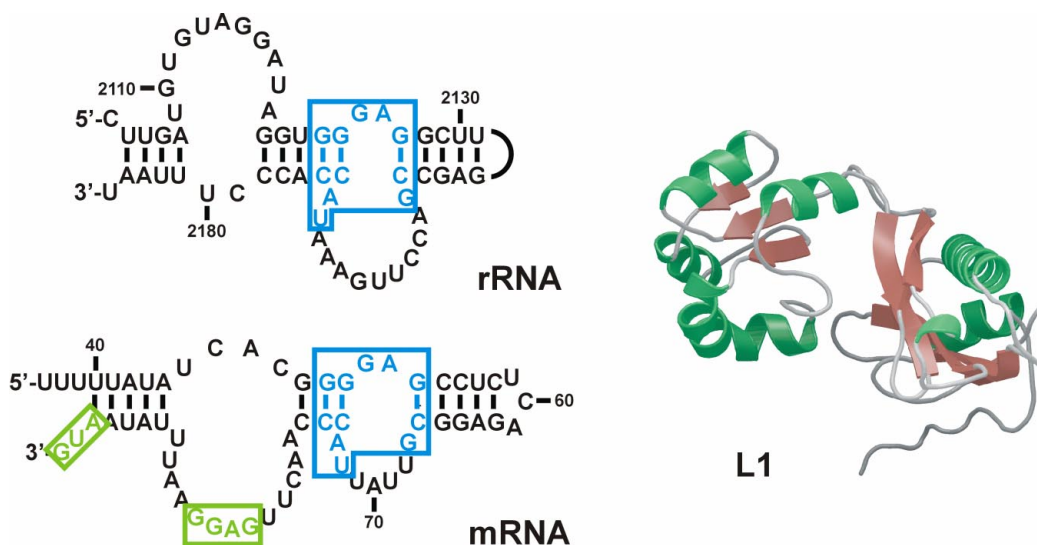
In schnell wachsenden Bakterienzellen besteht bis zu 50% des Trockengewichts aus Ribosomen. Da ein großer Teil der Energieressourcen der Zelle zur Synthese dieser Ribonukleoprotein Partikel verwendet wird, ist eine genaue Regulierung des Expressionsniveaus sowohl der ribosomalen Proteine als auch der rRNA nötig, auch um möglichst stöchiometrische Mengen der vielen Komponenten zu erhalten. Diese Kontrolle soll auch bei langsamerem Wachstum der Zellen, wenn maximale Proteinsynthese nicht benötigt wird, Energieverschwendung vermeiden. Es sind vier Arten der Transkriptionkontrolle von rRNA in *E. coli* gefunden worden (Übersichtsartikel (Condon *et al.*, 1995)). Die bereits erwähnte Antitermination (siehe 2.1.2.2), die stringente Kontrolle, die wachstumsabhängige Regulation, und die Aktivierung durch stromaufwärtsgelegene Regionen.

Bei akutem Mangel an Aminosäuren werden sogenannte *magic spot* Nukleotide (Guanosintetraphosphat ppGpp und Guanosin-pentaphosphat pppGpp) in der Zelle angereichert, die die Initiation der Transkription der rRNA Operons hemmen. Der genaue Mechanismus dieser stringenten Kontrolle ist nicht bekannt, aber es werden eine ppGpp induzierte Konformationsänderung der RNAP diskutiert (Travers, 1980b). Es wurden auch bestimmte DNA Sequenzen in der Nähe von *rrn* Promotoren gefunden, die stringente Kontrolle vermitteln (Travers, 1980a; Travers, 1984).

Die wachstumsabhängige Regulation der Synthese von rRNA wurde das erste Mal von Schaechter und Kollegen beobachtet, die fanden, daß die Menge an rRNA in Zellen proportional zur Wachstumsrate ist (Schaechter *et al.*, 1958). Dieser Effekt ist möglicherweise auf geringe Konzentrationen von ppGpp zurückzuführen, die direkt mit dem Wachstum der Bakterien korrelieren. Demzufolge wäre die stringente Kontrolle nur ein Extrembeispiel der wachstumsabhängigen Regulation (Baracchini und Bremer, 1988; Baracchini und Bremer, 1991). Ein anderes Modell geht davon aus, daß die Expression von den *rrn* Operons direkt von der Menge an rRNA aufgrund eines Rückkopplungsmechanismus reguliert wird. Eine Reihe von Mutageneseexperimenten unterstützen diese These, wobei unter anderem gezeigt wurde, daß verringerte Expression von einem der sieben *rrn* Operons zu einer erhöhten Synthese von rRNA der anderen Operons führt (Condon *et al.*, 1993).

Die Transkription von rRNA wird durch cis-agierende Sequenzen verstärkt, die sich stromaufwärts von den P1 Promotoren der *rrn* Operons befinden und als *upstream activation region* (UAR) bezeichnet werden. Diese Sequenz enthält Bindungsstellen für das Protein Fis und die  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP. Bei Bindung an DNA erzeugt Fis einen Knick in der DNA und wechselwirkt wahrscheinlich direkt mit RNAP (Finkel und Johnson, 1992; Gosink *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 1990). Mutationen in der UAR führten zum Teil zu einer 100-fachen Verringerung der Promotoraktivität (Gaal *et al.*, 1989), während keine Varianten isoliert wurden, die eine Verstärkung der Transkription bewirkten. Dies läßt darauf schließen, daß sich die UAR auf maximale Aktivität hin entwickelt hat.

Im Gegensatz zu der Vielfalt von regulatorischen Mechanismen bei *rrn* Operons steht die Expression von r-Proteinen nur unter autogener Kontrolle. Das bedeutet, daß ein r-Protein dieses Operons sowohl als Komponente des Ribosoms dient, als auch seine eigene Expression und die der anderen Proteine des Operons kontrolliert (Draper, 1989; Nomura *et al.*, 1980; Zengel und Lindahl, 1994). Die Doppelfunktion der regulatorischen r-Proteine legt nahe, daß die Expression der Proteine mit dem Assemblierungsprozess der Ribosomen und damit mit der Menge an rRNA gekoppelt ist: Ist ausreichend neusynthetisierte rRNA vorhanden, so bindet das regulatorische Protein an diese und wird in ribosomale Partikel eingebaut. Liegt ein Überschuß des regulatorischen Proteins vor, so reprimiert es die weitere Synthese aller Proteine seines eigenen Operons, um wieder eine Balance zwischen der Menge an rRNA und r-Proteinen in der Zelle herzustellen. Die meisten regulatorischen Proteine sind primäre r-Proteine und binden somit direkt und spezifisch an rRNA ohne Assistenz weiterer Faktoren.

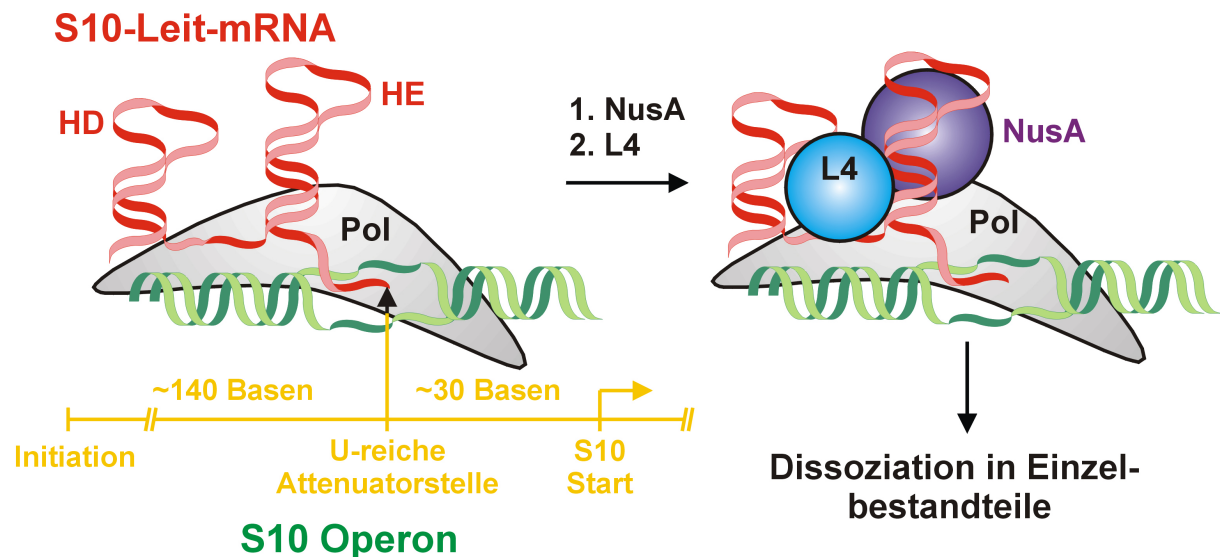


**Abb. 2-5:** Ähnlichkeit der Bindungsstellen für das ribosomale Protein L1 auf der mRNA und der rRNA (blau). Das Startcodon AUG und die Shine-Dalgarno Sequenz in der Leitregion der mRNA sind grün markiert. Die RNA bindende Region von L1 ist zwischen den beiden Domänen des Proteins lokalisiert und hoch konserviert (Nikonov *et al.*, 1996).

Es konnte gezeigt werden, daß viele dieser Proteine an die polycistronische Boten-RNA binden, wobei kritische Sequenzen, wie die Shine-Dalgarno-Region verdeckt werden können, und die Translation hemmen. Die spezifischen Bindungstellen auf der mRNA zeigen oft Struktur- und Sequenzhomologie zu den entsprechenden Assoziationsstellen der regulatorischen r-Proteine auf der rRNA, was für L1 (Draper, 1989), den (L12)<sub>4</sub>-L10 Komplex (Johnsen *et al.*, 1982) und S8 (Cerreti *et al.*, 1988) gezeigt wurde, die das L11, L10 und *spc* Operon regulieren (siehe Abb. 2-5).

L4 in *E. coli* ist bisher das einzige bekannte regulatorische r-Protein, das neben der Translation auch die Transkription seines eigenen S10 Operons unterdrückt (Yates und Nomura, 1980; Zengel *et al.*, 1980). Das S10-Operon enthält 11 r-Proteine, darunter all die Proteine, die am engsten mit dem Peptidyltransferase-Zentrum des Ribosoms assoziiert sind (Nierhaus, 1991; Schulze und Nierhaus, 1982). In der Leit-Boten-RNA des Operons befinden sich etwa 140 Nukleotide entfernt vom Transkriptionsstartpunkt zwei Haarnadelschleifen HD und HE (Shen *et al.*, 1988). Beide Sekundärstrukturen werden für die L4 vermittelte Transkriptionskontrolle benötigt (Freedman *et al.*, 1987). Bei HE handelt es sich um einen intrinsischen Attenuator, der an seinem 3'-Ende eine U/A reiche Region aufweist. Er kann bei der Transkription eine vorübergehende Pausierung der RNAP hervorrufen, die durch NusA stabilisiert werden kann. L4 ist anschließend in der Lage diesen Präterminationskomplex weiter zu festigen, was dazu führt, daß die RNAP die Transkription nicht mehr fortsetzen kann. Der Terminationskomplex dissoziiert und setzt mRNA frei, die keine translatierbaren Gene enthält (vorzeitiger Abbruch der Boten-RNA Synthese). (siehe Abb. 2-6). L4 ist bei dieser Transkriptionskontrolle auf NusA angewiesen. Details über Protein-RNA und Protein-Protein Wechselwirkungen innerhalb des Komplexes sind nicht bekannt, aber L4 scheint separate Module für die Bindung an rRNA und mRNA aufzuweisen (Li *et al.*, 1996): Mutationen in den N-terminalen Bereich des Moleküls führten dazu, daß das Protein nicht mehr in das Ribosom eingebaut wurde, aber nach wie vor regulatorisch aktiv war. Umgekehrt deaktivieren Punktmutationen am C-terminalen Ende die regulatorischen Fähigkeiten, ohne die Inkorporation in das Ribosom zu beeinträchtigen. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wechselwirkt L4 mit Segmenten der rRNA, die keine offensichtliche Ähnlichkeit in Sequenz und Struktur mit der Leitregion der mRNA aufweisen (Gulle *et al.*, 1988; Maly *et al.*, 1980; Zengel und Lindahl, 1996). So wurde L4 in intakten ribosomalen Partikeln mit UV-Strahlung mit einer 110 Nukleotide großen Region in Domäne I der 23S rRNA vernetzt, die sich in einen Pseudoknoten faltet. Darüberhinaus wurde eine kleine Haarnadelschleife in

Domäne II als Interaktionspartner identifiziert (siehe Abb. 2-7). L4 fixiert wahrscheinlich die Tertiärstruktur eines Teils der 23S rRNA, indem es die oben erwähnten Teile der rRNA miteinander in Kontakt bringt, die in der Primärsequenz weit auseinander liegen (Gulle *et al.*, 1988; Maly *et al.*, 1980). Eine entsprechend wichtige Rolle spielt das Protein deshalb auch bei der Assemblierung der 23S rRNA, wo es für die Bildung eines Faltungsintermediates entscheidend ist (Nierhaus, 1991).



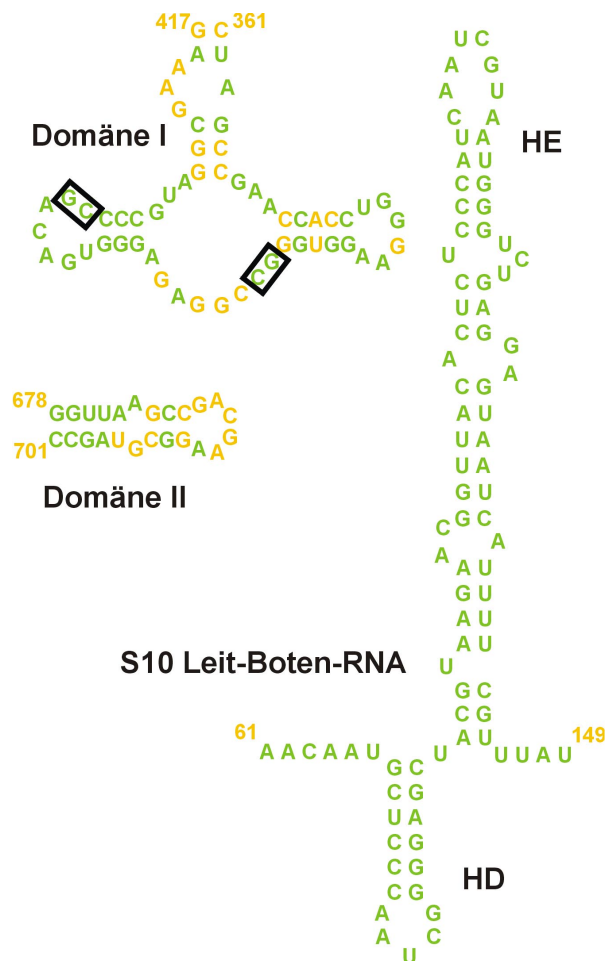
**Abb. 2-6:** Vorzeitiger Abbruch der mRNA-Synthese im S10 ribosomalen Protein Operon (nach (Zengel und Lindahl, 1994)). RNAP pausiert vorübergehend an der Attenuator Haarnadelschleife HE in der Leitregion der Boten-RNA des S10 Operons. NusA ist in der Lage diesen Zustand zu stabilisieren und zusammen mit der RNAP einen sogenannten Prä-Terminationskomplex zu bilden. Dieser kann durch Einbau von L4 soweit gefestigt werden, daß es zum Abbruch der Transkription kommt.

Obwohl inzwischen allgemein anerkannt ist, daß der 23S rRNA eine Schlüsselrolle bei der Peptidyltransferaseaktivität des Ribosoms zukommt, dessen Struktur wahrscheinlich durch die r-Proteine stabilisiert wird (Dahlberg, 1989), wird eine kleine Gruppe von r-Proteinen, immer noch mit dem aktiven Zentrum in Verbindung gebracht (Hampl *et al.*, 1981; Schulze und Nierhaus, 1982). L4 gehörte lange Zeit neben L2 und L3 zu dieser Gruppe, aber Rekonstitutionsexperimente mit 23S rRNA und r-Proteinen in Kombination mit Untersuchungen der Aktivität von 50S Untereinheiten, die intensiven Proteinverdau unterzogen worden waren, begrenzten diese auf L2 und L3 (Green und Noller, 1997; Khaitovich *et al.*, 1999).

Die Hemmung der Translation der S10-mRNA durch L4 ist ein von der Transkriptionsregulation unabhängiger Mechanismus, bei dem weder NusA noch die



Haarnadelschleife HD eine Rolle spielen (Freedman *et al.*, 1987). Obwohl dieser Teil der L4 vermittelten Regulation nicht so gut erforscht ist, wie die Transkriptionskontrolle, wurde ein vorläufiges Modell aufgestellt (Shen *et al.*, 1988): Untersuchungen der Sekundärstruktur der Leitregion der mRNA ergaben, daß diese in zwei verschiedenen Konformationen vorliegt, die sich in der Zugänglichkeit der Ribosomenbindungsstelle unterscheiden. Diese befindet sich stromabwärts vom unteren Teil der Haarnadelschleife HE. Bei Bindung an die mRNA induziert L4 eine Konformationsänderung, die zu der Bildung einer zusätzlichen Haarnadelschleife in dieser Region führt und so die Ribosomenbindungsstelle blockiert (Zengel und Lindahl, 1994).



**Abb. 2-7:** Sekundärstrukturen der rRNA und mRNA Bindungsstellen von L4. Gezeigt sind die Sekundärstruktur der beiden Haarnadelschleifen HD und HE in der *E. coli* S10 mRNA, wobei sich die Shine-Dalgarno Sequenz für die Bindung des Ribosoms stromabwärts von HE befindet. Die Sekundärstrukturen der bisher identifizierten Bindungsstellen von L4 in der 23S rRNA sind hochkonserviert in allen Bakterien. Es handelt sich dabei um eine kleine Haarnadelschleife in Domäne II und einen etwa 110 Nukleotide langen Bereich in Domäne I, der sich durch Wechselwirkungen zwischen den durch schwarze Boxen markierten Nukleotiden, in einen Pseudoknoten faltet. Dargestellt ist die Primärsequenz aus *Thermotoga maritima*, wobei gelb gezeichnete Nukleotide identisch zu *E. coli* sind.

Analysen der Sequenzen und Sekundärstrukturen von verschiedenen Leitregionen des S10 Operons in Bakterien zeigte, daß die L4-vermittelte Regulation sich offenbar auf bestimmte Vertreter des  $\gamma$ -Zweiges der Proteobakterien beschränkt (Allen *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1997). Die für die L4 Regulation benötigten Haarnadelschleifen HD und HE fanden sich nur in einer Untergruppe dieses Zweiges, die zum Beispiel neben *E. coli* auch *Salmonella typhimurium*,

*Yersinia pseudotuberculosis* und *Citrobacter freundii* umfaßt. *Pseudomonas aeruginosa*, ebenfalls ein Vertreter der  $\gamma$ -Proteobakterien, weist eine stark verkürzte Leitregion im S10 Operon auf, die weder in Sequenz noch Sekundärstruktur Ähnlichkeiten mit der *E. coli* mRNA zeigt. Da gezeigt wurde, daß diese Leitregion auch nicht von dem homologen *P. aeruginosa* L4 Protein reguliert wird, muß dieses Bakterium über einen anderen Mechanismus zur Kontrolle des S10 Operons verfügen. Bemerkenswerterweise ist in *E. coli* überexprimiertes *P. aeruginosa* L4 in der Lage dort das S10 Operon zu kontrollieren (T. Allen; L. Lindahl; J. M. Zengel, unveröffentlichte Ergebnisse). Ebenso ist das L4 Protein des sogar weitläufig verwandten *Bacillus stearothermophilus* in *E. coli* regulatorisch aktiv (Zengel *et al.*, 1995), obwohl das thermophile Bakterium wahrscheinlich nicht eine *E. coli* ähnliche Kontrolle aufweist. Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß die Proteinkomponente der *E. coli* Autoregulation aufgrund eines Evolutionsdrucks, der nichts mit diesem Mechanismus zu tun hat, gut konserviert ist, während die entsprechende mRNA Komponente nachträglich in bestimmten Bakterien entstand.

## 2.2 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Strukturen des Elongationsfaktors NusA und des ribosomalen Proteins L4 von *Thermotoga maritima* aufzuklären. Obwohl in beiden Fällen die jeweiligen *E. coli* Homologen am besten untersucht sind, sind die mesophilen ribosomalen Proteine ebenso schwer kristallisierbar wie bislang *E. coli* NusA (*ecoNusA*) und entziehen sich deshalb einer strukturellen Charakterisierung.

Im Falle von NusA erhoffte man sich neue Hinweise auf die bislang umstrittenen RNA-bindenden Eigenschaften des Proteins. Insbesondere sollte geklärt werden, inwieweit die mutmaßlichen RNA kontaktierenden S1 und KH-Domänen innerhalb des Proteins angeordnet sind und ob sich daraus auch Rückschlüsse auf die Art der RNA-Bindung und Organisation einer Vielzahl von modular aufgebauten Multi-KH-Proteinen ergeben. In diesem Zusammenhang sollte nach Hinweisen gesucht werden, ob die Bindung an die mRNA spezifisch oder unspezifisch erfolgt. Entsprechend sollten Protein-bindende Module oder Regionen innerhalb von NusA gesucht und charakterisiert werden. Im besonderen sollte die Art der Wechselwirkung mit RNA-Polymerase ermittelt und nach Hinweisen gesucht werden, die eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen NusA und L4 im Terminationskomplex des S10 Operons möglich erscheinen lassen. Da NusA seine Funktion wahrscheinlich sowohl über Interaktion mit mRNA als auch Bindung an andere Proteine

ausübt, hoffte man, mittels der Struktur ein detaillierteres Modell für den Effekt von NusA auf die Elongationsphase der mRNA-Synthese aufstellen zu können.

Die Struktur von L4 sollte in erster Linie Aufschluß über die Art der Wechselwirkung des Proteins mit RNA und anderen Komponenten des Translationsapparates geben. Im einzelnen sollte untersucht werden, ob ein separates regulatorisches Modul für die Erkennung von mRNA vorhanden ist, das sich strukturell und räumlich vom rRNA-bindenden Teil des Moleküls abhebt. Außerdem sollte nach Hinweisen in der Struktur von L4 gesucht werden, daß dieses Protein mit NusA interagiert. Durch Kombination der beiden Strukturen von NusA und L4 sollte auch ein besseres Verständnis über den Aufbau des Terminationskomplexes im S10 Operon erhalten werden.

## 3. Materialien und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Bakterien

Folgende Bakterien wurden zur Propagierung von Plasmiden und der Überexpression von rekombinanten Proteinen eingesetzt:

##### *E. coli* DH 5 $\alpha$

(ITC Biotechnologie GmbH, Heidelberg) (Hanahan, 1983)

Genotyp: *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17* ( $r_k^- m_k^-$ ), *recA1*, *supE44*, *thi-1*,  $\Delta(\text{lacZYA-argF})$ ,  $\phi 80\text{lacZ}\Delta M15F^- \lambda^-$

##### *E. coli* B121(DE3)pLysS

(Novagen Inc., Madison, Wisconsin, USA) (Studier, 1991; Studier und Moffatt, 1986; Studier *et al.*, 1990)

Genotyp: F, *ompT*, *hsdS<sub>b</sub>*, ( $r_b^- m_b^-$ ), *gal*, *dcm*, (DE3), pLysS ( $\text{Cm}^R$ )

##### *E. coli* B834(DE3)pLysS

(Wood, 1966) (Studier und Moffatt, 1986)

Genotyp: F, *ompT*, *hsdS<sub>b</sub>*, ( $r_b^- m_b^-$ ), *gal*, *dcm*, (DE3), *metB*, pLysS ( $\text{Cm}^R$ )

#### 3.1.2 Plasmide

##### pET22b(+)

(Stratagene, La Jolla, CA, USA) (Studier, 1991; Studier *et al.*, 1990). Dieses Plasmid wurde zur Überexpression aller rekombinanten Proteine mit dem Ziel der Proteinreinigung eingesetzt.

##### pBAD18

(erhalten von J. Zengel und L. Lindahl, University of Maryland, Baltimore County) (Guzman *et al.*, 1995). Dieses Plasmid wurde für die Überexpression aller L4 Mutanten in der radioaktiven Zellmarkierung eingesetzt (siehe Abschnitt 3.2.1.4).

### 3.1.3 Enzyme und Kits

*Pfu* DNA Polymerase

Stratagene GmbH, Heidelberg

PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kits

Perkin Elmer, Überlingen

T4 DNA-Ligase

New England Biolabs, Schwalbach

Qiagen Plasmid Kits

Qiagen, Hilden

Restriktionsenzyme

New England Biolabs, Schwalbach

QuickChange Mutagenese Kit

Stratagene, Heidelberg

### 3.1.4 Oligonukleotide für die Mutagenese an EcoL4 und TmaL4

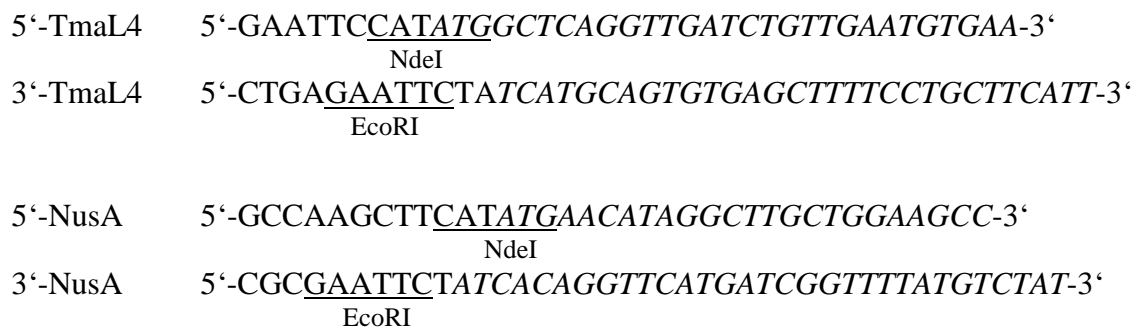
Die folgenden Oligonukleotide wurden für die Mutagenese an EcoL4 und TmaL4 mit dem QuickChange Mutagenese Kit (Stratagene, Heidelberg) verwendet. Die mutierten Nukleotide sind jeweils unterstrichen.

5'-EcoL4-P129A	5'-CTCTGTAGAAGCG <u>G</u> CGAAA <u>A</u> CTAAGCTGC-3'
3'-EcoL4-P129A	5'-GCAGCTTAGTTTTCG <u>C</u> CGCTTCTACAGAG-3'
5'-EcoL4-T131A	5'-GTAGAAGCGCCGAA <u>A</u> GCTAAGCTGCTGGC-3'
3'-EcoL4-T131A	5'-GCCAGCAGCTTAG <u>C</u> TTTTCGGCGCTTCTAC-3'
5'-EcoL4-K132A	5'-GCGCCGAAA <u>A</u> CTG <u>C</u> TCTGCTGGCACAG-3'
3'-EcoL4-K132A	5'-CTGTGCCAGCAG <u>A</u> GCAGTTTTTCGGCGC-3'

5'-EcoL4-T150A	5'-GTGCTGATCATCGCTGGTGAGCTGGAC-3'
3'-EcoL4-T150A	5'-GTCCAGCTCACCAGCGATGATCAGCAC-3'
5'-EcoL4-L153F	5'-CATCACCGGTGAGTTCGACGAAAACCTG-3'
3'-EcoL4-L153F	5'-CAGGTTTTTCGT <u>CGAACT</u> CACCGGTGATG-3'
5'-EcoL4-E155A	5'-CATCACCGGTGAGCTGGACGCAAACCTGTTCCCTGG-3'
3'-EcoL4-E155A	5'-CCAGGAACAGGTTT <u>GCGTCC</u> AGCTCACCGGTGATG-3'
5'-EcoL4-F158A	5'-GCTGGACGAAAACCTGGCCCTGGCTGCGCGCAACC-3'
3'-EcoL4-F158A	5'-GGTTGCGCGCAGCCAGGCGCAGGTTTTTCGTCCAGC-3'
5'-EcoL4-L159F	5'-CGAAAACCTGTTCTTCGCTGCGCGCAACCTGC-3'
3'-EcoL4-L159F	5'-GCAGGTTGCGCGCAGCGAAGAACAGGTTTTTCG-3'
5'-EcoL4-A160F	5'-CGAAAACCTGTTCCCTGTTTCGCGCGCAACCTGCAC-3'
3'-EcoL4-A160F	5'-GTGCAGGTTGCGCGCGAAGCAGGAACAGGTTTTTCG-3'
5'-EcoL4-R162A	5'-CCTGTTCCCTGGCTGCGGCTAACCTGCACAAGGTTG-3'
3'-EcoL4-R162A	5'-CAACCTTGTGCAGGTTAGCCGCAGCCAGGAACAGG-3'
5'-EcoL4- $\alpha$ 4	5'-GTTCTCTGTAGAAGCGGCGGCAGCTGCGCTGCTGGC- ACAGAAAC-3'
3'-EcoL4- $\alpha$ 4	5'-GTTTCTGTGCCAGCAGCGCAGCTGCCGCCGCTTCTAC- AGAGAAC-3'
5'-EcoL4- $\alpha$ 5	5'-GGTGAGCTGGACGAAGCCCTGTTCCCTGGGCTGGTGCCGCC- CTGCACAAGGTTGAC-3'
3'-EcoL4- $\alpha$ 5	5'-GTCAACCTTGTGCAGGGCGGCACCAGCCAGGAACAGGGC- TTCGTCCAGCTCACC-3'
5'-EcoL4- $\alpha$ 6	5'-GCAACTGGTATCGACCCCTTTGACCTGGCCTTCGCCGACA- AAGTCGTAATGACTGCT-3'
3'-EcoL4- $\alpha$ 6	5'-GCAGTCATTACGACTTTGTCGGCGAAGGCCAGGTCAAAC- GGGTCGATAACCAGTTGC-3'
5'-TmaL4- $\alpha$ 4/ $\alpha$ 5	5'-CAAAGTCTCTGGCGCAAATTCTCAAGAACCTTGCGCTT- GAAGACACACTGATGGTCCTTGGTGAGCTGGAGGAAGGATA TATG-3'
3'-TmaL4- $\alpha$ 4/ $\alpha$ 5	5'-CATATATCCTTCCCTCCAGCTCACCAAGGACCATCAGTGTG- TCTTCAAGCGCAAGGTTCTTGAGAATTTGCGCCAGAGACTTT G-3'

### 3.1.5 Oligonukleotide für die Polymerase- Kettenreaktion

Die folgenden Oligonukleotide wurden in der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt um die Gene für TmaL4 und NusA aus gesamtgenomischer DNA von *Thermotoga maritima* zu amplifizieren und in den Expressionsvektor pET22b(+) einzufügen. Die Restriktionschnittstellen sind unterstrichen. Regionen, die komplementär zu den jeweiligen Genen sind, sind kursiv gehalten.



### 3.1.6 Chemikalien, Materialien und Geräte

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma (Deisenhofen) in p.A. Qualität bezogen.

## 3. 2 Methoden

### 3.2.1 Mikrobiologische Methoden

Bei allen mikrobiologischen Methoden wurde sorgfältig auf die Sterilität der verwendeten Arbeitsgeräte, Medien und Lösungen geachtet. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden steril filtriert. Standardarbeiten in der Mikrobiologie wurden nach (Sambrook, 1989) durchgeführt.

### 3.2.1.1 Anzucht von Bakterien

#### a) *E. coli* Plattenkulturen

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium) wurde mit 15 g/l Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 40°C wurde Ampicillin zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben und in sterile Petrischalen gegossen. Die Petrischalen wurden über Nacht in der Sterilbank gelagert, anschließend steril verpackt und bei 4°C aufbewahrt. In der Regel wurden 200 µl Bakterienkultur mit einem sterilen Drygalski-Spatel ausgestrichen und 12 Std. bei 37°C inkubiert. Die Kulturen konnten bis zu 6 Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

LB-Medium: NaCl 10g  
Bacto Trypone 10g  
Hefeextrakt 5g  
pH 7,4 mit NaOH einstellen  
ddH<sub>2</sub>O ad 1l

#### b) Flüssigkulturen

Flüssigkulturen zur Gewinnung von Plasmiden oder als Startkulturen für Proteinexpressionen wurden in Abhängigkeit vom Maßstab der Präparation mit 5 ml oder 50 ml LB-Kulturen durchgeführt und bei 37°C geschüttelt. Je nach Bakterienstamm wurden folgende Antibiotika hinzugegeben :

Ampicillin	100µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml

#### c) Überexpression von rekombinanten Protein in *E. coli* BL21(DE3)pLysS oder *E. coli* B834(DE3)pLysS

Mit frisch transformierten Kulturen (siehe Abschnitt 3.2.1.3) wurden zunächst 50 ml Vorkulturen in LB gezogen, die mit Ampicillin und Chloramphenicol in den oben angegebenen Konzentrationen versetzt waren. Nach Inkubation von 12 Std. bei 37°C wurden die Zellen abzentrifugiert und anschließend in dem entsprechenden Medium aufgenommen, das zur weiteren Fermentation der Zellen verwendet wurde. Natives Protein wurde in BL21(DE3)pLysS überexprimiert. Zum Ersatz von Methionin durch sein Analogon Selenomethionin (Budisa *et al.*, 1995) wurde der Methionin auxotrophe Stamm



B834(DE3)pLysS in *New Minimal Medium* (NMM) fermentiert. Im allgemeinen wurden 12 l Kulturen in 12 2l-Erlenmeyer-Kolben mit eingeschmolzenen Schikanen mit jeweils 5 ml Vorkultur angeimpft und bei 150 Upm entweder bei 37°C (NusA) oder Raumtemperatur (TmaL4) geschüttelt. Nach 2-6 Std. hatten die Zellen eine OD<sub>600</sub> von 0,8 erreicht und wurden durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Proteinexpression wurde für 6 Std. durchgeführt und die Zellen abzentrifugiert (4000×g, 25 min, 4°C). Sie wurden in den entsprechenden Aufschlußpuffer (20 mM HEPES pH 7,0; 50 mM LiCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub> für TmaL4 oder 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 3 mM EDTA für NusA) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

NMM: (aus 1M autoklavierten oder sterilfiltrierten Stammlösungen soweit nicht anders angezeigt)

Ammoniumsulfat	7,5 mM
NaCl	8,5 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	55 mM
Kaliumhydrogenphosphat	100 mM
Magnesiumsulfat	1 mM
Glucose	20 mM
Calciumchlorid/Eisen(III)sulfat	1mg/ml
Kupfer-, Mangan-, Zinkchlorid und Ammoniummolybdat	1µg/ml
Biotin und Thiamin; Stammlösung (10 g/l)	10 mg/ml
Aminosäuremischung außer Methionin (Stammlösung: je 0,5g/ml in NaCl/P <sub>i</sub> )	50 mg/ml
NaCl/P <sub>i</sub>	137 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM Natriumhydrogenphosphat, 1,76 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,0
Ac-D,L-Selenomethionin (Stammlösung: 50g/l)	0.335 M

### 3.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Es wurden 50 ml LB-Medium mit 2 ml einer Vorkultur angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurden die Zellen für 10 min. auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (4000×g, 5 min, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde in 20 ml eiskaltem TFB-I Puffer (Transforming Buffer) aufgenommen und nach 5 min. auf Eis erneut abzentrifugiert. Das

Pellet wurde in 2 ml eiskaltem TFB-II aufgenommen und in Eppendorf-Gefäße aliquotiert und nach dem Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

TFB-I:	Kaliumacetat	30 mM
	Rubidiumchlorid	100 mM
	Calciumchlorid	10 mM
	Manganchlorid	50 mM
	Glycerin (v/v)	15%

Die Lösung wurde mit Essigsäure auf pH 5,5 eingestellt, sterilfiltriert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

TFB-II:	PIPES	10 mM
	Rubidiumchlorid	10 mM
	Calciumchlorid	75 mM
	Glycerin (v/v)	15%

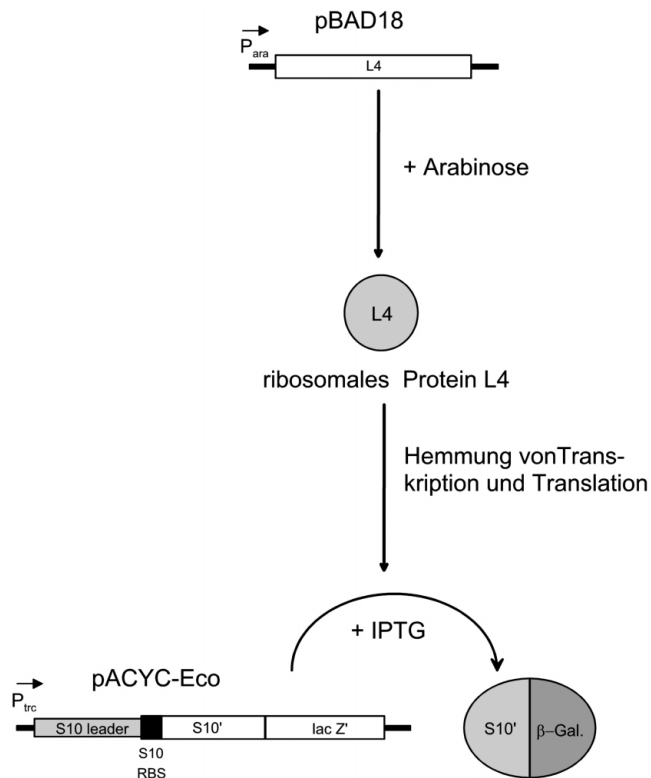
Der Puffer wurde mit 1M KOH auf pH 6,5 eingestellt und nach dem Sterilfiltrieren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.2.1.3 Transformation kompetenter *E. coli*

100  $\mu\text{l}$  transformationskompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 10  $\mu\text{l}$  Ligationsansatz oder 1-2 $\mu\text{g}$  Plasmid versetzt und 1Std. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 2 min. auf  $42^{\circ}\text{C}$  gebracht und anschließend für 15 min. auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurde der Ansatz für 1 Std. bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt und dann entweder 200  $\mu\text{l}$  auf LB-Platten ausplattiert oder komplett zum Animpfen von Flüssigkulturen (siehe 3.2.2) verwendet.

### 3.2.1.4 Radioaktive Markierung von *E. coli* Zellen und Aktivitätstest für L4

Mit Hilfe der radioaktiven Markierung von Zellen wurde analysiert, ob bestimmte L4-Mutanten noch in der Lage sind, translatorisch und transkriptionell regulierend auf ein Reportergen zu wirken.



**Abb. 3-1:** Prinzip des L4-Aktivitätstests (S10 RBS: S10 Ribosomenbindungsstelle)

5 ml *E. coli* Zellen wurden bei 37°C in AB- Minimal-Medium fermentiert, das mit 0,5% Glycerin und 1µg/ml Thiamin supplementiert wurde. Die Zellen enthielten sowohl ein pBAD18-Plasmid mit einer Arabinose-induzierbaren L4-Mutante, die mit dem *QuikChange Mutagenese*-Kit erzeugt worden waren, als auch ein S10'/lacZ' Fusionsreporter-Protein (siehe Abb. 3-1), das mit IPTG induziert werden konnte (pACYC-Eco (Li *et al.*, 1997)). Zusätzlich wies das S10'/lacZ' Plasmid eine S10 Leitsequenz auf, die die beiden Haarnadelschleifen HD und HE enthält (siehe Abb.2-7) (Zengel

und Lindahl, 1993; Zengel *et al.*, 1995). Somit standen Transkription und Translation dieses Reportergens unter der Kontrolle der L4-Mutante. Bei einer OD<sub>450</sub> von 0,5-0,8 wurde die Synthese des Reporterproteins mit 2mM IPTG induziert und nach 9 min. 100µl Zellen für 2 min. mit 5 µCi <sup>35</sup>S-Methionin markiert. Anschließend wurde die Überexpression der L4-Mutante mit 0,25% Arabinose induziert und nach 15 min. 100 µl Zellen wie oben beschrieben radioaktiv markiert. Nach der Lyse der markierten Zellen in SDS-Auftragspuffer wurden die Proben auf 7,5% und 12% SDS-PAGE-Gelen getrennt (siehe Abschnitt 3.2.3.2), getrocknet und für 2 Tage auf einem Phosphor Speicher Schirm exponiert. Die Gele wurden mit dem *STORM PhosphorImager*-System ausgelesen und mit der Software *ImageQuant* ausgewertet (alle Produkte: Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA). Der Vergleich der Intensität der Banden für das S10'/lacZ' Reporterprotein vor und nach Induktion von L4 erlaubte Rückschlüsse auf die Aktivität der verschiedenen L4-Mutanten.

**AB-Minimal-Medium:** 2g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3,0g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 3g NaCl; 0,011g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in 200 ml H<sub>2</sub>O zusammenmischen mit 0,2g MgCl<sub>2</sub>; 0,010g CaCl<sub>2</sub> und 0,0005g FeCl<sub>3</sub>•7H<sub>2</sub>O in 800 ml H<sub>2</sub>O.

### 3.2.2 DNA-Arbeitsmethoden

#### 3.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von komplexen Gemischen aus DNA in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe.

Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose (0,7-2% (w/v) je nach Länge der zu trennenden DNA) in Laufpuffer TBE aufgekocht und nach dem Abkühlen eine Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml in Wasser) zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzugegeben. Die Lösung wurde in eine horizontale Gel-Apparatur gegossen und nach dem Erstarren mit Laufpuffer überschichtet. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (je nach Größe des Gels mit 50-120V) durchgeführt. Mit Hilfe von UV-Licht ( $\lambda=254$  nm) konnte die Position der DNA-Banden bestimmt werden.

1×TBE (Tris Borat EDTA): 90 mM Tris-HCl; 90 mM Borsäure; 2mM EDTA pH 8,0

6×Probenpuffer: 30%(v/v) Glycerin; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol

#### 3.2.2.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA beruht auf einer modifizierten Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988; Saiki *et al.*, 1985) nach der Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Es wurden fluoreszenzmarkierte 2'-3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphate als Kettenabbruchreagenzien eingesetzt. Ihr statistischer Einbau führt zum Kettenabbruch der wachsenden DNA-Stränge. Das Gemisch unterschiedlich langer DNA-Fragmente wird dann elektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen Stränge anhand der Fluoreszenz des Abbruchnukleotids identifiziert. Die typische Zusammensetzung eines Sequenzieransatzes sah folgendermaßen aus:

Terminator Reaktions-Mix	8 µl
Plasmid-DNA	2 µg
Sequenzier-Primer	4 pmol
ddH <sub>2</sub> O ad 20 µl	

Die Ansätze wurden in einem 200 µl Reaktionsgefäß mit 30 µl Mineralöl überschichtet und für 25 Zyklen folgendes PCR-Programm durchgeführt: 30 sec. 96°C; 30 sec. 50°C; 4 min. 60°C. Reinigung, Präzipitation und Elektrophorese der PCR-Produkte wurden ebenso wie die Detektion und Auswertung der Fluoreszenzsignale von Marius Boicu am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried mit einem DNA-Sequenator (Modell 373, Applied Biosystems, Foster City, USA) durchgeführt.

### 3.2.2.3 Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* Zellen

Die Isolierung und Reinigung von Plasmiden aus *E.coli* DH5α-Zellen wurde je nach Volumen der Zellkultur mit dem *QIAGEN Plasmid Mini, Midi* oder *Maxi Kit* durchgeführt. Die Bakterien werden dabei durch alkalische Lyse mit NaOH/SDS aufgeschlossen und genomische DNA durch Kaliumacetat schnell gefällt. Die weitere Reinigung der Plasmide wurde durch Ionenaustauschchromatographie durchgeführt.

### 3.2.2.4 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Im Verlauf der Klonierung der Gene von TmaL4 und NusA wurden Restriktionsverdaue sowohl des erhaltenen PCR-Produkts, als auch des Vektors durchgeführt um die Expressionsvektoren zu konstruieren. Ein Ansatz hatte in der Regel folgende Zusammensetzung:

PCR-Produkt oder Vektor	4-5µg
Restriktionsenzyme	20 U
10×Puffer	5 µl
ddH <sub>2</sub> O ad 50 µl	
Inkubation bei 37°C für 2-4 Std.	

Das geschnittene PCR-Produkt und der Vektor wurden über *Qiaquick Spin* Säulen (Qiagen, Hilden) gereinigt. Dabei werden die DNA-Fragmente unter Hochsalz an eine Silica-Gel-Säule adsorbiert und nach dem Waschen mit Wasser eluiert.

### 3.2.2.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung der Expressionsvektoren für TmaL4 und NusA, wurden das verdaute PCR-Produkt und der geschnittene Vektor pET22b(+) mit Hilfe der Ligase aus dem Bakteriophagen T4 kovalent unter ATP-Verbrauch verknüpft. Das molare Verhältnis des Inserts zum Vektor wurde variiert und betrug in der Regel zwischen 3:1 und 5:1.

Linearisierter Vektor	100 ng
Insert-DNA	× ng (molares Verhältnis Insert/Vektor zwischen 3:1 und 5:1)
10×Ligationspuffer	2 µl (enthält ATP)
T4-Ligase	400 U
ddH <sub>2</sub> O ad 20 µl	

Der Ansatz wurde für 3 Std. bei 4°C inkubiert und dann für 12 Std. auf 14-16°C gehalten. Die Ligase wurde anschließend durch 10-minütiges Erhitzen auf 65°C inaktiviert und der Ligationsansatz zur Transformation von kompetenten *E. coli* Bakterien eingesetzt (siehe 3.2.1.3).

### 3.2.2.6 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR

Zur selektiven Amplifizierung der Gene von NusA und TmaL4 aus *Thermotoga maritima* wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion in folgender Zusammensetzung eingesetzt:

5'-Primer	100 pmol
3'-Primer	100 pmol
genomische DNA	245 ng
dNTP	je 10 mM
DMSO	2,5 µl
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	20 U
ddH <sub>2</sub> O ad 25 µl	

Der Ansatz wurde in jeweils 200 µl Reaktionsgefäßen folgendem PCR-Programm für 25 Zyklen unterzogen: 1 min. 95°C; 1 min. Gradient zwischen 44°C und 64°C mit 4°C Schritten; 3 min. 72°C. Der Gradient bei der Hybridisierung zwischen den PCR-Primern und den 5'-

und 3'-Enden der jeweiligen Gene hatte in der Regel einen großen Einfluß auf die Effizienz der PCR. Die erhaltene Produkte wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft und über *Qiaquick Spin* Säulen (Qiagen, Hilden) gereinigt.

### 3.2.2.7 Spezifische Mutagenese an L4 mit den *QuikChange Mutagenese*-Kit

Mit Hilfe des *QuikChange Mutagenese*-Kit können multiple Mutationen oder Deletionen in Gene eingeführt werden. Dazu verwendet man zwei gegenläufige Primer, die jeweils komplementär zu der Region sind, in der die Mutation eingeführt werden soll und dabei selbst die gewünschte Änderung aufweisen. Mittels PCR werden Tochterplasmide mit dieser Mutation erzeugt und anschließend die methylierten wildtyp Ausgangsplasmide mit Dpn I verdaut. Dieser Ansatz kann direkt zur Transformation von kompetenten Zellen eingesetzt werden. Die Zusammensetzung eines typischen *QuikChange*- Ansatzes sieht folgendermaßen aus:

10×Reaktionspuffer	2,5 µl
5'-Primer	62,5 ng
3'-Primer	62,5 ng
Ausgangs-Plasmid	25 ng
dNTP's (jeweils 20 mM)	0,25 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase	20 U
ddH <sub>2</sub> O ad 25 µl	

Zu Beginn der PCR-Reaktion wurde für 1 min. auf 95°C aufgeheizt und dann für 20 Zyklen jeweils 30 sec bei 95°C denaturiert, dann für 1min. bei 55°C die Primer mit der genomischen DNA hybridisiert und für 12 min. bei 65°C die DNA-Synthese durch Verlängerung der Primer durchgeführt. Der Ansatz wurde dann für 1-2 Std. mit 1 µl Dpn I verdaut und anschließend zur Transformation von DH5α Zellen eingesetzt (siehe 3.2.1.3).

## 3.2.3 Proteinchemische Methoden

### 3.2.3.1 Proteinreinigung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei RNA assoziierte Proteine aus dem thermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* in *E. coli* überexprimiert und gereinigt: Das ribosomale Protein L4 (TmaL4) und der Transkriptionsfaktor NusA. Bei der Reinigung wurde in beiden Fällen Gebrauch von der Hitzestabilität der Proteine gemacht und der Überstand der Zell-Lyse erhitzt, um *E. coli* Proteine zu fällen. Dem schloß sich Anionenaustausch-Chromatographie und zuletzt je nach Protein Hydroxylapatit oder hydrophobe Interaktions-Chromatographie an. Alle chromatographischen Schritte wurden mit selbst gepackten Säulen bei 4 °C durchgeführt. Es wurden peristaltische Pumpen benutzt, an die mit Rührfischen betriebene Gradientenmischer angeschlossen waren. Der Verlauf der Reinigung wurde mit Hilfe von SDS-PAGE Gelen verfolgt (siehe 3.2.3.2).

a) Präparation von TmaL4:

Das Präparationsprotokoll ist eine Modifikation der nicht denaturierenden LiCl-Extraktions-Prozedur für ribosomale Proteine aus großen 50S Untereinheiten von *E. coli* (Dijk und Littlechild, 1979).

Gefrorene Zellen (siehe 3.2.1.1 c) wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und nach Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zweimal für 5 min. unter Kühlung sonifiziert (50% Intervalle, 100% Output) (Branson Macrotip Sonifier, Danbury, CT, USA). Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation für 3 Std. bei 50 000 Upm (55.2 Ti Rotor, Beckmann Instruments, Palo Alto, CA, USA) abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine Konzentration von 3M LiCl mit einer auf pH 7,0 gepufferten 8M Stocklösung gebracht und für eine Std. auf Eis gekühlt. Neu gebildetes Präzipitat wurde durch Zentrifugation abgetrennt und die Lösung für 20 min. auf 70 °C erhitzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand für 12 Std. gegen Puffer A dialysiert ( 10 mM HEPES pH 7,0; 50 mM LiCl; 3 mM EDTA) und auf eine 300 ml DEAE-Sepharose FF Säule (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) geladen. Adsorbierte Proteine wurden mit einem linearen 2l Gradienten von Puffer A nach A mit 0,9M LiCl eluiert. Die vereinigten Fraktionen wurden dann auf eine 150 ml Hydroxylapatitsäule (Biorad, Hercules, CA, USA) geladen, die mit Puffer B (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 2m KCl) equilibriert war. TmaL4 wurde in einer einzigen Bande mittels eines 1l Gradienten nach Puffer B mit zusätzlich 250 mM Kaliumphosphat eluiert. Alle TmaL4-Fraktionen wurden vereinigt und mit Centriprep-3 Konzentratoren (Amicon, Beverley, MA, USA) eingengt. Mit Hilfe von NAP-25-Säulen



(Pharmacia Biotech) wurde der Puffer auf 10 mM HEPES pH 7,0 gewechselt und aliquotierte Mengen bei einer Konzentration von 10 mg/ml in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### b) Präparation von NusA

Die Lyse der Zellen erfolgte analog zur TmaL4-Reinigung. Der Überstand des Zellaufschlusses wurde für 20 min. auf  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt und gebildetes Präzipitat abzentrifugiert (25 000 Upm, 30 min.; JA-25.50, Beckmann Instruments). Die Lösung wurde auf eine 200 ml DEAE-Sepharose FF-Säule aufgetragen, die mit 50 mM Tris-HCl pH 7,6 und 3 mM EDTA (Puffer C) equilibriert war. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen 1,8l Gradienten von Puffer C nach C mit 700 mM NaCl eluiert. Relevante Fraktionen wurden vereinigt und mit festem Ammoniumsulfat unter Rühren versetzt, bis eine finale Konzentration von 1M erreicht war. Die Lösung wurde auf eine 75 ml Phenyl-Sepharose-Säule (Pharmacia Biotech) geladen, die mit Puffer C plus 1 M Ammoniumsulfat equilibriert war. Ein linearer 750 ml Gradient nach Puffer C wurde angelegt und NusA enthaltende Fraktionen vereinigt und zu einer Konzentration von 40 mg/ml mit Amicon-Ultrafiltrationszellen (10 kDa MW cutoff) eingengt. NusA wurde mit NAP-25-Säulen auf 10 mM HEPES pH 7,0 umgepuffert und die Konzentration auf 9mg/ml eingestellt. Die Präparation wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

#### 3.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Verlauf der Reinigungen wurde mittels diskontinuierlicher SDS-Gelelektrophorese überwacht (Laemmli, 1970). Während der Reinigungen von NusA und TmaL4 wurden Gele mit 6% Sammel- und 12% Trennbereichen eingesetzt. Sie hatten eine Größe von  $8,5\times 8\text{ cm}^2$  bei einer Dicke von 1 mm und wurden zu je neun Stück in einer Gießkammer gegossen (Eigenbau, MPI Biochemie, Martinsried).

Sammelgel (6%) für 9 Gele: 20 ml ddH<sub>2</sub>O

3,75 ml Tris-HCl pH 6,8

300µl 10% SDS-Lösung (w/v)

6 ml Acrylamid 30% (w/v); Bisacrylamid 0,8% (w/v)

150 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (w/v)

	50 µl TEMED
Trenngel (12%) für 9 Gele:	36 ml ddH <sub>2</sub> O
	17 ml Tris-HCl pH 8,8
	900 µl 10% SDS-Lösung (w/v)
	36 ml Acrylamid 30% (w/v); Bisacrylamid 0,8% (w/v)
	600 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (w/v)
	44 µl TEMED
SDS-Auftragspuffer (2%):	125 mM Tris-HCl pH 8,9
	0,04% Bromphenolblau
	10% (w/v) SDS
	20% (w/v) Glycerin
	20% (v/v) β-Mercaptoethanol

Die Proben wurden vor den Aufträgen mit einem Volumen 2× Auftragspuffer gemischt und für 30 sec. bei 95 °C inkubiert. Die Gele wurden bei konstanter Spannung von 120 V betrieben.

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele mit Coomassie Blau gefärbt. Dazu wurden die Gele in die Färbelösung transferiert und für 30 sec. in der Mikrowelle erhitzt und anschließend 30 min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Zum Entfärben wurden die Gele für 12 Std. bei Raumtemperatur in Entfärbelösung geschüttelt und anschließend fotografiert.

Färbelösung:	2,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva) in
	30% (v/v) Ethanol
	10% (v/v) Essigsäure
	60% (v/v) Wasser
Entfärbelösung:	30% (v/v) Ethanol
	10% (v/v) Essigsäure
	60% (v/v) Wasser

Für die Gelelektrophorese von radioaktiv markiertem Zell-Lysat im Rahmen des L4-Aktivitätstests wurden größere Gele eingesetzt um eine effektive Auftrennung aller Proteine zu gewährleisten. Zusätzlich wurde eine niedrigere Konzentration an Bisacrylamid eingesetzt

(0,2%), um die Gele trocknen zu können. Es wurden jeweils zwei 1,5 mm dicke Gele mit einer Ausdehnung von  $12 \times 14 \text{ cm}^2$  gegossen und mit der gleichen Spannung wie obige Gele betrieben.

### 3.2.4 Kristallographische Methoden

#### 3.2.4.1 Aufbau von Kristallen

Die kleinste sich wiederholende Baugruppe in Kristallen ist die asymmetrische Einheit. Aus ihr läßt sich durch Anwendung der kristallographischen Punktsymmetrie die Elementarzelle erzeugen. Die kristallographische Translationssymmetrie baut in alle drei Raumrichtungen daraus den Kristall auf. Obwohl es 230 Raumgruppen gibt, sind nur 65 enantiomorph und daher für die Beschreibung von Kristallen chiraler Biomoleküle geeignet. Der ideale, periodische Aufbau von Kristallen ist in der Realität häufig durch Gitterfehler gestört. Deshalb gibt es Blöcke innerhalb des Kristalls, die mosaikartig gegeneinander verschoben sind. Proteinkristalle weisen in Gegensatz zu Kleinmolekül-Kristallen einen sehr lockeren Aufbau auf, der nur durch wenige Kontakte zwischen den einzelnen Proteinen vermittelt wird. Proteinkristalle haben häufig einen sehr hohen Lösungsmittelgehalt und müssen ständig in Kontakt mit ihrer Mutterlauge stehen, um die Integrität ihres Kristallgitters zu gewährleisten.

#### 3.2.4.2 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

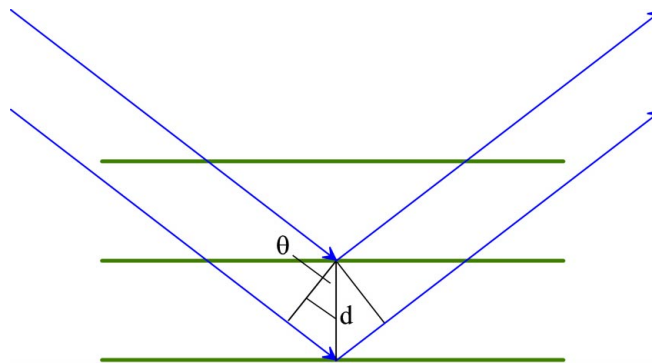
Zur Untersuchung von Proteinstrukturen benötigt man elektromagnetische Strahlung, deren Wellenlänge im Bereich atomarer Bindungen liegt ( $1,54 \text{ \AA}$  für C-C Bindung). Röntgenstrahlung ( $\text{Cu } K_{\alpha} = 1,54 \text{ \AA}$ ) erfüllt dieses Kriterium. Aber aufgrund fehlender Röntgenlinsen ist es nicht möglich, ein direktes Abbild des Proteins zu erhalten. Vielmehr muß über Beugungsexperimente an Kristallen indirekte Information über die Struktur gewonnen werden. Die große Anzahl von geordneten Molekülen in einen Kristall bewirkt dabei eine systematische Verstärkung und Auslöschung des gebeugten Strahls.

Röntgenstrahlung wird von der Elektronenhülle gebeugt, die Proteine umgibt. Dabei induzieren die Röntgenstrahlen Schwingungen gleicher Frequenz in den Elektronen. Diese emittieren daraufhin Sekundärstrahlung gleicher Frequenz, die um  $180^\circ$  phasenverschoben ist. Die Amplituden dieser kohärenten Streuung summieren sich aufgrund der

Phasenverschiebung der Einzelwellen zu Null (destruktive Interferenz), sofern der Gangunterschied nicht ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist (konstruktive Interferenz). Diese Bedingung wird, korrekte Orientierung des Kristalls vorausgesetzt, für eine ganze Reihe von Positionen innerhalb der einzelnen Elementarzellen erfüllt. Dabei bauen diese Punkte ein *reziprokes Gitter* auf, dessen geometrische Eigenschaften invers zum realen Kristallgitter sind. Die Länge der reziproken Gittervektoren entspricht dabei den reziproken Abständen der Ebenen einer Netzebenenschar. Die Netzebenenscharen werden durch ihre Schnittpunkte mit den Achsen der Elementarzelle charakterisiert (Miller'sche Indizes: hkl). Konstruktive Streuung der Röntgenstrahlen tritt dabei an diesen Netzebenen unter einem Winkel  $\theta$  zwischen einfallendem Strahl und der Netzebenenschar auf, sofern der Gangunterschied, der an den verschiedenen Netzebenen gebeugten Strahlen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist (siehe Abb. 3-2):

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta_{hkl} \quad (\text{Braggsche Gleichung})$$

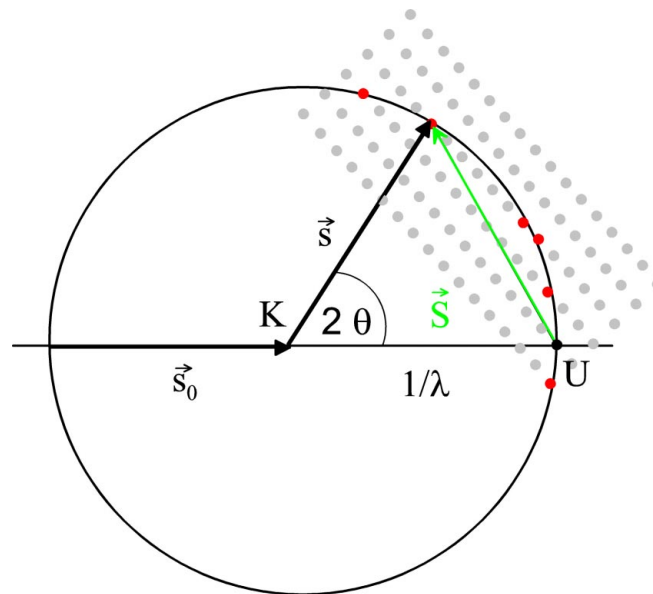
n: ganze Zahl;  $\lambda$ : Wellenlänge; d: Netzebenenabstand



**Abb. 3-2:** Der Gangunterschied zwischen zwei Strahlen, die von benachbarten Netzebenen reflektiert werden, muß  $2d \sin \theta$  betragen, um konstruktive Interferenz aufzuweisen.

Die Ewald-Konstruktion (Abb. 3-3) ermöglicht es, unter Verwendung des reziproken Gitters das Bragg'sche Gesetz als Vektordiagramm darzustellen. Dabei befindet sich der Kristall im Zentrum einer Kugel mit dem Radius  $1/\lambda$ . Die Punkte, an denen der ankommende Strahl  $\vec{p}_0$  die Sphäre schneidet und der Ursprung U des reziproken Gitters liegen sich diametral gegenüber. Das Bragg'sche Gesetz ist für jeden reziproken Gitterpunkt auf der Oberfläche der Kugel erfüllt. Eine Rotation des Kristalls bedingt eine analoge Rotation des reziproken Gitters, so daß weitere Gitterpunkte auf der Oberfläche die Ewald-Sphäre schneiden und

damit in Einklang mit dem Bragg'schen Gesetz gebracht werden. Diese Reflexe können in einem Röntgenbeugungsexperiment beobachtet werden.



**Abb. 3-3:** Ewald-Konstruktion: Man konstruiert eine Kugel mit dem Radius  $1/\lambda$  um den Kristall K, so daß der Ursprung des reziproken Gitters sich in U befindet. Der Wellenvektor des einfallenden Strahls ist mit  $\vec{s}_0$  gekennzeichnet und wird um  $2\theta$  gebeugt, so daß der Wellenvektor  $\vec{s}$  entsteht. Die grauen Punkte kennzeichnen das reziproke Gitter von denen die roten Punkte die Bragg'sche Gleichung erfüllen. Ein reziproker Gittervektor ist durch  $\vec{S}$  repräsentiert.

Jeder beobachtete Reflex entspricht einem Gitterpunkt (hkl). Somit lassen sich aus den Positionen der Reflexe Rückschlüsse auf die Geometrie und damit in den meisten Fällen auch auf die Raumgruppe des Kristalls ziehen. Während die Position der Reflexe durch die Raumgruppe vorgegeben wird, bestimmt die Zusammensetzung der asymmetrischen Einheit die Intensität der einzelnen Reflexe. Ein Kristall kann als Konvolution des Inhalts der Elementarzelle mit dem Kristallgitter angesehen werden. Das Diffraktionsmuster ist daher das Produkt aus der molekularen Transformation und des reziproken Gitters. Da dieses Produkt die Intensität an reziproken Gitterpunkten bestimmt, ist diese hoch wenn die Transformation eine hohe Intensität aufweist und umgekehrt.

Die Intensität der Reflexe nimmt mit steigender Auflösung ab, was sich auf die endliche Ausdehnung der Elektronenhüllen zurückführen läßt. Bei steigenden Streuwinkeln  $\theta$  nimmt die Phasendifferenz, der gebeugten Wellen ebenfalls zu, was dazu führt, daß weniger

Streuwellen zu konstruktiver Interferenz gebracht werden können. Die Gesamtintensität einer an einer Einheitszelle mit  $n$  Atomen gestreuten Welle ergibt sich folgendermaßen:

$$(1) F(S) = \sum_{j=1}^n f_j \exp[2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{S}]$$

Darin ist  $F(S)$  der Strukturfaktor für den reziproken Gittervektor  $S$ , der gerade die Reflexionsbedingung erfüllt. Der Vektor  $r_j$  gibt die Position des Atoms  $j$  in fraktionellen Koordinaten an und  $f_j$  ist der Atomformfaktor, der berücksichtigt, daß ein Atom nur eine endliche Ausdehnung hat. In der Praxis führt die thermische Bewegung der Atome vor allem bei großen Streuwinkeln zu einer zusätzlichen Abnahme der Intensität. Weiterhin tragen Fehler in der periodischen Anordnung der Elementarzellen (Mosaizität), sowie Skalierungsfehler und Absorption zu einer Abnahme der Intensität bei. Um dies zu berücksichtigen wird der Temperaturfaktor  $B$  als zusätzlicher Term für die exponentielle Abnahme der Intensität eingeführt:

$$(2) T_{(iso)} = \exp\left(-B \frac{\sin^2 \theta}{\lambda^2}\right)$$

Der Temperaturfaktor ist folgendermaßen gegeben, wobei  $\bar{u}^2$  die mittlere quadratische Auslenkung ist:

$$(3) B = 8\pi^2 \cdot \bar{u}^2$$

Für jeden Reflex ergibt sich der Strukturfaktor  $F$  als Summation aller atomaren Formfaktoren  $f$  in der asymmetrischen Einheit für jeden einzelnen Reflex unter Multiplikation mit ihrem jeweiligen Phasenwinkel:

$$(4) \vec{F}(\vec{S}) = \sum_{j=1}^n f_j \exp(2\pi i \vec{r}_j \cdot \vec{S})$$

### 3.2.4.3 Das Phasenproblem und Berechnung der Elektronendichte

Da die Strukturfaktoren die Fourier Transformation der Elektronendichte sind, läßt sich durch inverse Fouriertransformation aus den Strukturfaktoren die Elektronendichte  $\rho(x,y,z)$

berechnen. Jeder Strukturfaktor kann dabei als Wellenfunktion beschrieben werden, die sowohl über eine Amplitude als auch über einen Phasenwinkel verfügt:

$$(5) \quad \rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} F(h, k, l) \exp(-2\pi i(hx + ky + lz))$$

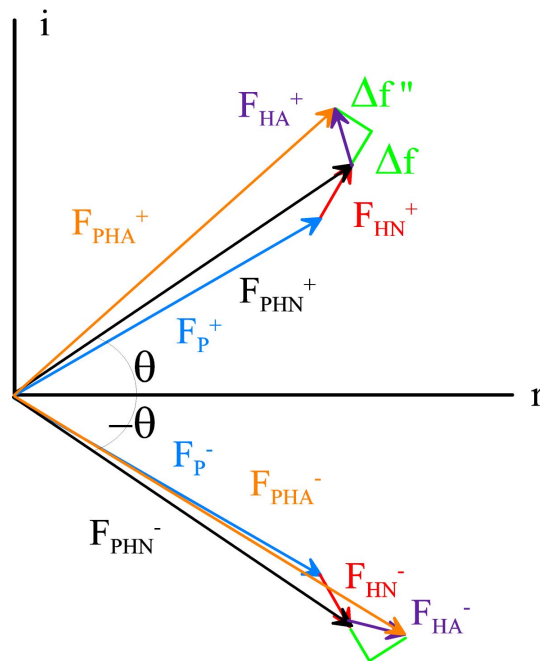
wobei  $F(h, k, l) = |F(h, k, l)| \exp i\alpha(h, k, l)$

Von einem Röntgenbeugungsexperiment erhält man allerdings nur Aufschluß über die Intensität jedes Reflexes  $I(h,k,l)$ , wobei  $I(h, k, l) \approx |F(h, k, l)|^2$  ist. Information über die Phasenwinkel wird nicht erhalten, so daß eine Berechnung der Elektronendichte nicht möglich ist. In der Proteinkristallographie werden drei Methoden zur Lösung des Phasenproblems eingesetzt: der molekulare Ersatz (molecular replacement), der multiple isomorphe Ersatz (multiple isomorphous replacement) (siehe 3.2.4.3.2), die multiple anomale Dispersion MAD (multiple anomalous dispersion) (siehe 3.2.4.3.1) und in wenigen Fällen auch direkte Methoden (Karle, 1989; Uson und Sheldrick, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur MAD- und MIR-Methoden zur Strukturlösung eingesetzt.

#### 3.2.4.3.1 Multiple anomale Dispersion (MAD)

Die MAD-Methode benötigt Röntgenstrahlung mit variabel verstellbarer Wellenlänge, da Datensätze bei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden. Dazu verwendet man Synchrotronstrahlung, die von Elektronen in Speicherringen erzeugt wird. Die Datensätze, die die Strukturlösung von NusA ermöglichten wurden an der Beamline BW6 des Deutschen Elektronen Synchrotrons (DESY) in Hamburg aufgenommen. Die zweite Voraussetzung für MAD ist das Vorhandensein von Schweratomen im Protein, die geeignete Absorptionskanten für MAD-Experimente aufweisen. In der Regel werden Schweratom-Derivate von Kristallen dadurch erzeugt, daß die Kristalle in schweratomhaltige Mutterlauge eingelegt werden und die Atome dann mit funktionellen Gruppen der Aminosäuren reagieren. Diese Methode hat den Nachteil, das dadurch häufig die Morphologie der Kristalle gestört wird und damit die Identifizierung von Derivaten erschwert wird. Eine andere Möglichkeit ergibt sich durch den Ersatz von Methionin durch Selenomethionin, indem rekombinantes Protein in Methionin auxotrophen Bakterienstämmen unter Vorhandensein von Selenomethionin im Medium exprimiert wird (Budisa *et al.*, 1995). Diese Methode wurde im Falle von NusA angewandt (siehe Abschnitt 3.2.1.1).

Bei der Messung an einer Absorptionskante findet keine elastische Streuung der Elektronen am betroffenen Atom mehr statt. Es kommt zu einer Ionisation durch Herausschlagen eines Elektrons, im Falle von Se aus der K-Schale. Die restliche Röntgenstrahlung wechselwirkt mit dem Kern und erfährt dadurch eine Änderung in Amplitude und Phase, die sich von der bei elastischer Streuung beobachteten Verschiebung von  $180^\circ$  unterscheidet und *anomale Streuung oder Dispersion* genannt wird. Diese addiert immer einen kleinen Phasenwinkel zur elastischen Streuung mit der Folge, daß die Strukturfaktoren von Friedel-Paaren (Reflexe mit identischen Strukturfaktoramplituden und Phasenwinkeln mit umgekehrten Vorzeichen) nicht mehr equivalent sind (siehe Abb. 3-4). Die resultierenden Intensitätsunterschiede zwischen Friedelpaaren werden *Bijvoet-Differenzen* genannt.



**Abb. 3-4:** Der Einfluß der anomalen Dispersion auf Strukturfaktoren mit entgegengesetzten Vorzeichen für den Phasenwinkel (Drenth, 1994). Ohne anomale Streuung gilt  $F_{PHN}^+ = F_{PHN}^-$ . Diese Strukturfaktoren setzen sich aus einem Beitrag des Proteins  $F_P$  und einem „normalen“ Beitrag  $F_{HN}$  des Schweratoms zusammen. Im Falle anomaler Streuung addiert sich eine reale Komponente  $\Delta f$  in Verlängerung zu  $F_{HN}$  und senkrecht dazu eine imaginäre Komponente  $\Delta f''$ , die stets einen kleinen Phasenwinkel dazu addiert. Als Folge davon weisen die kombinierten Strukturfaktoren aus „normalen“ und „anormalen“ Beiträgen  $F_{PHA}^+$  und  $F_{PHA}^-$  sowohl unterschiedliche Amplituden als auch Phasenwinkel auf.

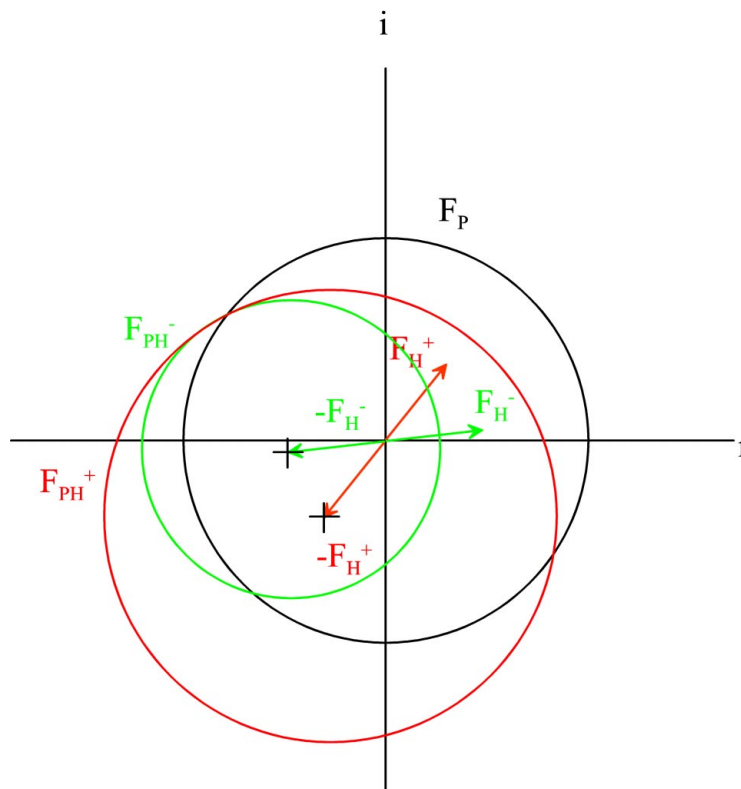
Die anomale Streuung kann dazu genutzt werden, die Positionen der anomalen streuenden Atome zu bestimmen. Dazu berechnet man eine Patterson-Funktion, die eine Fourier-



Summation mit den experimentell zugänglichen Intensitäten der Reflexe als Koeffizienten darstellt (Patterson, 1934).

$$(6) P(uvw) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)|^2 \cos[2\pi(hu + kv + lw)]$$

Diese Funktion zeigt Maxima an den Endpunkten von interatomaren Abstandsvektoren zwischen den anomal streuenden Atomen, wenn als Koeffizienten die anomalen Differenzen  $(\Delta|F|_{ano})^2$  verwendet werden. Sobald die Positionen der Schweratome bekannt sind, lassen sich daraus graphisch mit Hilfe der Harkerkonstruktion (siehe Abb. 3-5) die Phasenwinkel für jeden Reflex berechnen (Harker, 1956). Dabei gilt:  $F_{PH} = F_P + F_H$ .

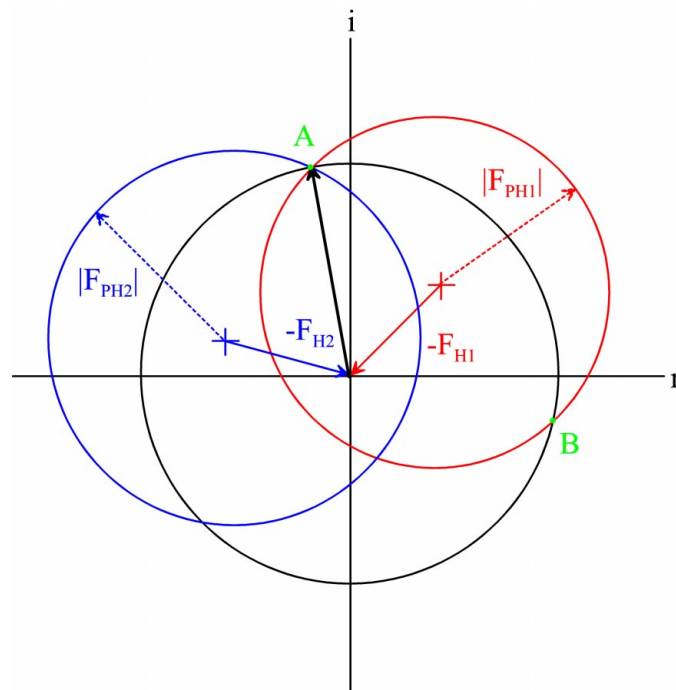


**Abb. 3-5:** vereinfachte Harkerkonstruktion, die die Ableitung eines eindeutigen Phasenwinkels mit Hilfe der anomalen Streuung erlaubt. Der Vektor für die „normalen“ Strukturfaktor-Amplituden ist mit  $F_P$  gegeben. Die beiden Bijvoet-Paare sind mit  $F_H^+$  und  $F_H^-$  gekennzeichnet, aber  $F_H^-$  vereinfacht mit einem Phasenwinkel mit entgegengesetzten Vorzeichen gezeichnet, damit sich die drei Kreise in einem Punkt schneiden. Im MAD Experiment wird  $F_P$  durch Messung eines remote Datensatzes bestimmt, dessen Wellenlänge weit von der Absorptionskante entfernt ist.

Anomale Differenzen betragen nur einen kleinen Teil der isomorphen Differenzen, die in MIR-Experimenten bestimmt werden. Da ein kompletter MAD-Datensatz aber von einem gefrorenen Kristall aufgenommen werden kann, treten keine Fehler wegen Nichtisomorphie verschiedener Kristalle auf. Die erste Proteinstruktur, die mit Hilfe von MAD gelöst wurde, war die des basischen blauen Kupferproteins aus der Gurke (Guss *et al.*, 1988; Hendrickson *et al.*, 1988; Murthy *et al.*, 1988).

### 3.2.4.3.2 Multipler isomorpher Ersatz (MIR)

Im Gegensatz zu MAD benötigt man bei MIR mehrere Datensätze von verschiedenen Schweratom-Derivaten eines Kristalls, die möglichst unter Beibehaltung der dreidimensionalen Struktur der Kristalle erhalten werden (Isomorphie). Die Positionen der Schweratome können über eine sogenannte *Differenz-Patterson-Funktion* aus nativem Kristall und Schweratomderivat errechnet werden. Bei nur einem Derivat ergeben sich zwei Lösungen für die Phasenwinkel. Im Prinzip wird ein weiteres Derivat benötigt, um die Phasenwinkel eindeutig zu berechnen (siehe Abb. 3-6). Schlechte Datenqualität und schwache Isomorphie führen häufig dazu, daß sogar dies nicht ausreicht. Im Falle von TmaL4 wurden drei Derivate



**Abb. 3-6:** Harkerkonstruktion im Fall der MIR-Methode. Der schwarze Kreis mit Radius  $FP$  schneidet im Falle eines Derivates ( $F_{PH1}$ ) dessen Kreis an zwei Punkten A und B, so daß der Phasenwinkel nicht eindeutig bestimmt werden kann. Erst unter Zuhilfenahme eines zweiten Derivats ( $F_{PH2}$ ) ergibt sich ein Schnittpunkt (A) für alle drei Kreise, der einen eindeutigen Phasenwinkel markiert.

zur Strukturlösung eingesetzt.

#### 3.2.4.4 Kristallisation

Alle Kristallisationsexperimente wurden nach der Dampfdiffusionsmethode durchgeführt (McPherson, 1990). Dabei kommt es in einem abgeschlossenen Raum zur Gleichgewichtseinstellung zwischen einem Proteintropfen und einem Reservoir, das die Kristallisationslösung enthält. Die damit verbundene Änderung der Konzentrationen des Proteins und des Präzipitanz führt zu einer übersättigten Proteinlösung. Bei günstigen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinmolekülen können sich Kristallkeime bilden, die durch definierte Anlagerung weiterer Moleküle zu Kristallen führen. Da die Kristallisation von vielen verschiedenen Parametern wie zum Beispiel Temperatur, Art des Präzipitanz und dessen Konzentration, pH-Wert und Beschaffenheit des Puffers und eventuell von Additiven abhängt, versucht man initiale Kristallisationsbedingungen durch einen sogenannten *sparse matrix screen* (Carter Jr., 1990; Carter Jr. und Carter, 1979; Jancarik und Sung-Hou, 1991) zu finden, der verschiedenste Kombinationen der populärsten Puffer und Präzipitanzen enthält. Diese können dann mit Hilfe einer Feinabstimmung bei der man in der Regel pH-Wert und Präzipitanzkonzentration einer einzigen Bedingung variiert, verbessert werden.

Zur Kristallisation nach der *sitting drop* Methode wurden jeweils 3 µl Proteinlösung mit 1,5 µl des Reservoirs vermischt, in die Vertiefung von CrysChem-Platten pipettiert und nach Zugabe von 0,5 ml Reservoir mit CrystalClear Band (Manco Inc; Avon, OH, USA) verschlossen. Die Ansätze wurden jeweils bei 25 °C und bei 4 °C durchgeführt.

#### 3.2.4.5 Kristallmontage, Datensammlung und -prozessierung

Die Kristalle wurden aus der Mutterlauge mit einer silikonisierten Spezialglaskapillare (Mark-Röhrchen, W. Müller, Berlin) geerntet und mit Filterpapierstreifen weitgehend von der Kristallisationslösung befreit. Die Kapillare wurde an beiden Enden mit Dentalwachs (Glaswachs, Richter und Hoffman, Harvard-Dental GmbH, Berlin) verschlossen. Um ein Austrocknen des Kristalls zu verhindern wurde etwas Reservoir-Lösung in der Glaskapillare belassen. Die Kapillare wurde mit Wachs auf einem Goniometerkopf befestigt.

Zur Aufnahme von Cryo-Datensätzen wurden die NusA-Kristalle in einer Cryo-Schleife geerntet, in Perfluoropolyether PFO-X125/03 (Lancaster, England) als Cryoprotektans überführt und im Stickstoffstrom gefroren. TmaL4 –Kristalle konnten direkt aus ihrer Mutterlauge in der Cryo-Schleife eingefroren werden.

Die Datensätze wurden auf einer *Image Plate* (MAR Research, Hamburg) aufgenommen. Das Funktionsprinzip beruht darauf, daß eine polykristalline Schicht aus BaFBr:Eu<sup>2+</sup> durch Röntgenquanten zu Eu<sup>3+</sup> oxidiert werden kann. Die dabei freigesetzten Elektronen können in metastabilen Zuständen gefangen werden, den sogenannten Farbzentren, die eine lange Lebensdauer aufweisen. Nach Belichten kann das gespeicherte Bild mit einem He-Ne-Laser ausgelesen werden, der die latent gefangenen Elektronen photostimuliert, die unter Emission von blauen Licht wieder in den Grundzustand übergehen. Die Lumineszenz wird von einem Photomultiplier detektiert und in ein digitales Signal überführt. Die Röntgenstrahlung Cu-K $\alpha$ -Strahlung bei  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$  wurde mit einem Rigaku (Tokyo, Japan) Drehanoden Generator bei 50 kV und 100 mA erzeugt.

Die Datensätze wurden mit dem HKL-Programm (Otwinowski und Minor, 1997) ausgewertet. Identifizierung und Verfeinerung der Schweratompositionen von anomalen Patterson-Fouriersynthesen (NusA) oder Differenzpatterson-Funktionen (TmaL4) wurde mit den Programmen RSPS and MLPHARE (Collaborative Computational Project, 1994) vorgenommen. Die experimentellen Elektronendichten wurden entweder mit MLPHARE oder mit dem Programm SHARP (de la Fortelle und Bricogne, 1997) berechnet.

#### 3.2.4.6 Modellbau und –verfeinerung

Die Aminosäurekette wurde bei beiden Proteinen mit dem Programm MAIN (Turk, 1996) manuell in die Elektronendichte eingepaßt. Die Verfeinerung der Strukturen wurde mit dem Programm CNS (Brünger, 1998) durchgeführt. Dabei wird versucht, die Differenz zwischen den aus dem gebauten Modell berechneten Strukturfaktoren und den experimentell bestimmten Strukturfaktoren unter Berücksichtigung von vernünftigen Werten für Bindungslängen und –winkel (Engh und Huber, 1991) zu minimieren. Das verfeinerte Modell dient dann zur Berechnung neuer, verbesserter Phasen und Elektronendichten. Ein Kriterium für die Qualität der Struktur ist der R-Faktor:

$$(7) R = \frac{\sum_{hkl} \left| |F_{obs}| - k |F_{calc}| \right|}{\sum_{hkl} |F_{obs}|} \times 100\%$$

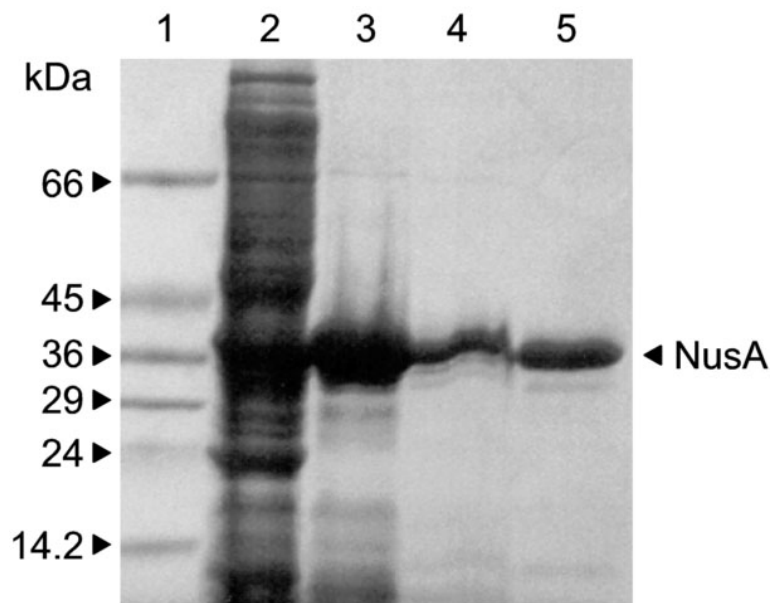
wobei  $k$  ein Skalierungsfaktor ist, der beobachtete und berechnete Strukturformfaktoren auf eine einheitliche Skala bringt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 N-utilization substance A (NusA)

#### 4.1.1 Reinigung von NusA

NusA aus *Thermotoga maritima* wurde nach einem dreistufigen Protokoll gereinigt (siehe Abb. 4-1). Nach erfolgter Zellyse wurde der lösliche Überstand (Spur 2) für 30 min. auf 95°C erhitzt, wobei das thermostabile NusA fast quantitativ im Überstand verblieb (Spur 3), während ein Großteil der *E. coli* Proteine hitzedenaturiert wurde und präzipitierte. Die Präparation wurde anschließend über eine DEAE-Säule (Spur 4) und eine Phenyl-Sepharose-Säule (Spur 5) gereinigt und das Protein nach Umpuffern auf 10 mM HEPES, pH 7,0, sauber erhalten.

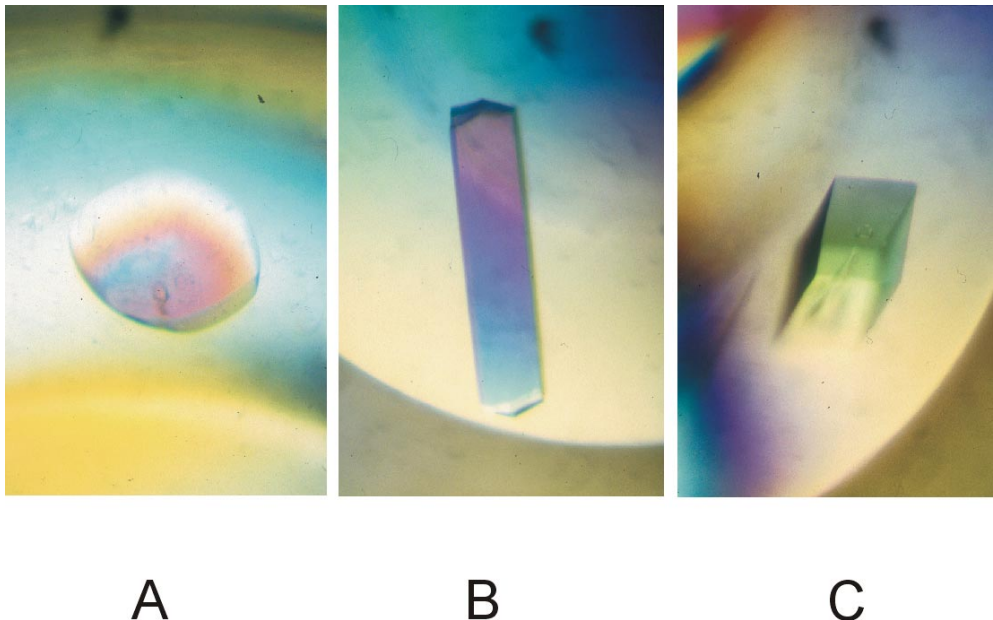


**Abb. 4-1: Reinigungsschritte der NusA Präparation:** 12% SDS-Gel mit Coomassie gefärbt: 1) Marker, 2) Zellysate, 3) Überstand der 95°C Denaturierung, 4) vereinigte Fraktionen nach DEAE-Säule, 5) vereinigte Fraktionen nach Phenyl-Sepharose.

#### 4.1.2 Kristallisation

Die Verwendung der 96 Hausfactorials führte bei einer Vielzahl von Bedingungen, die Ammoniumsulfat als Präzipitant und Tris als Puffersubstanz beinhalteten zu stäbchen-

förmigen oder stark abgerundeten Kristallen (siehe Abb. 4-2). Diese Kristalle gehörten zu Raumgruppe P2 und streuten bis maximal 3,8 Å. Kristalle, die mit dem Detergens N,N-bis(3-D-gluconamidopropyl)-deoxycholamin (Deoxy Big Chap) unter ansonsten gleichen Bedingungen erhalten wurden, ergaben kein interpretierbares Diffraktionsbild. Erst die Verwendung von 2-6% (v/v) PEG 400 als Additiv und HEPES als Puffersubstanz führte zu reproduzierbaren Kristallen der Raumgruppe P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2 mit ungefähren Dimensionen von 0,7 × 0,7 × 0,4 mm<sup>3</sup>, die Synchrotronstrahlung bis 2,1 Å streuten. Die finalen Kristallisationsbedingungen waren 1,8 – 2 M Ammoniumsulfat, 100 mM HEPES pH 6,8-7,6; 2-6% PEG 400, wobei 3 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 9 mg/ml mit 1,5 µl Reservoir gemischt wurden.

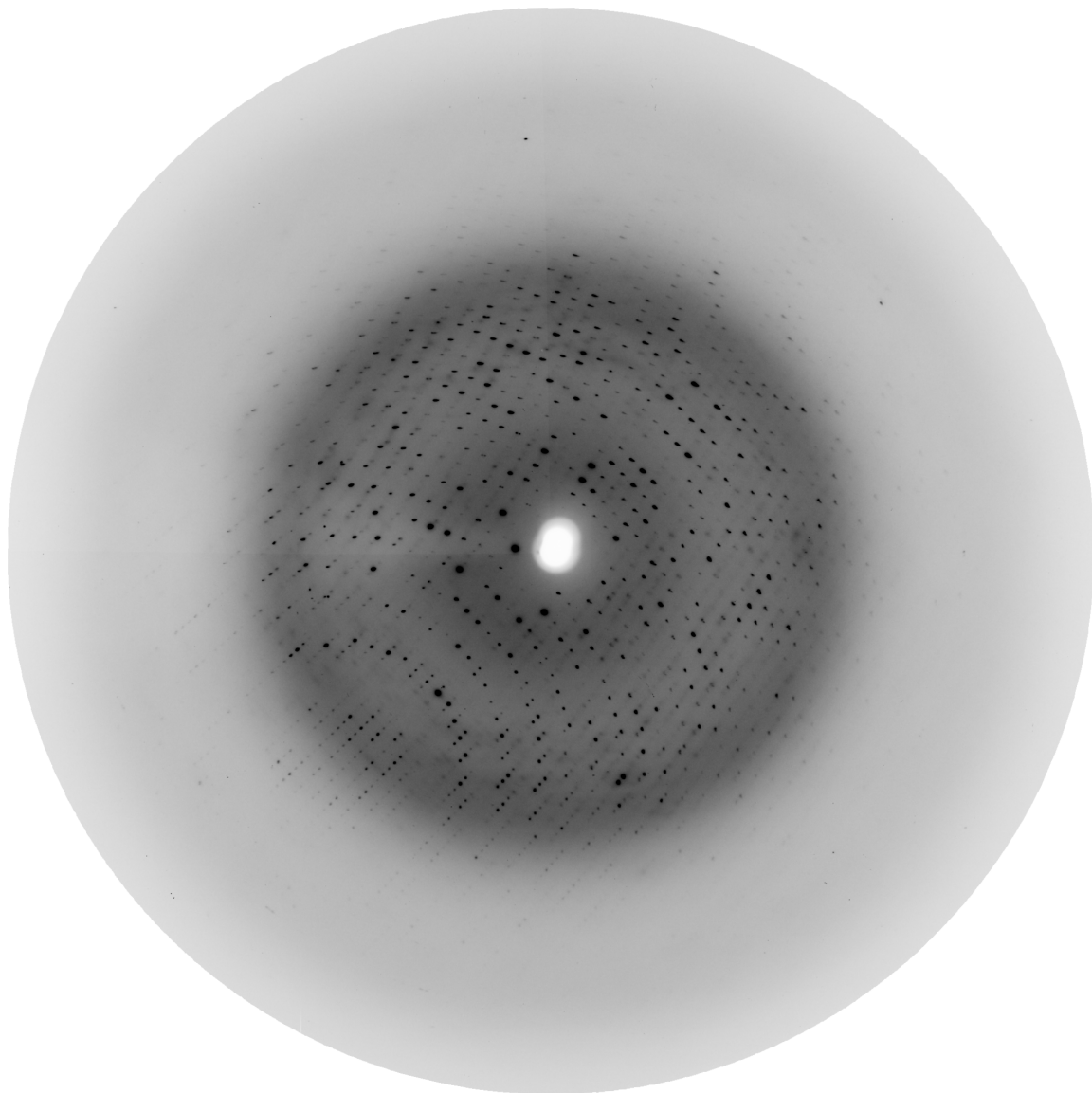


**Abb. 4-2:** Verschiedene Kristallformen von NusA bei unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen: (A) Kristall der Raumgruppe P2 bei 1,8 M Ammoniumsulfat, 100 mM Tris pH 8,0; 2 mM Zinkacetat. (B) Fehlgeordneter Kristall bei 1,8 M Ammoniumsulfat, 100 mM Tris pH 8,0; 0,14 mM Deoxy Big Chap (C) Kristall der Raumgruppe P4<sub>3</sub>2<sub>1</sub>2 bei 1,8 M Ammoniumsulfat, 100 mM HEPES pH 7,4; 6% PEG 400

#### 4.1.3 Datensammlung und Strukturlösung mittels multipler anomaler Dispersion

Ein erster nativer Datensatz mit einer Auflösung von 2,8 Å wurde am Max-Planck-Institut mit einem Drehanoden-Generator auf einer *Imageplate* aufgenommen. Um Derivate von NusA zu erhalten wurden zwei Strategien verfolgt. Die erste beruhte auf einer konventionellen Inkubation der Kristalle in Schweratomlösungen und anschließender Berechnung der

Differenzpattersonfunktion zwischen nativem Kristall und den entsprechend eingelegten Kristallen um eventuelle Schweratompositionen zu identifizieren. Diese Methode führte zu einem  $\text{HgCl}_2$ -Derivat. Da gleichzeitig auch durch die zweite Strategie, Anzucht von methioninauxotrophen *E. coli* in Minimalmedium (siehe Abschnitt 3.2.1) ein Selenomethionin-Derivat erhalten werden konnte, wurden MAD-Daten beider Derivate und ein nativer Datensatz am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg aufgenommen (siehe Tab. 4-1 und Abb. 4-3 A und B).



**Abb. 4-3:** Diffraktionsbild eines nativen NusA Kristalls aufgenommen am DESY in Hamburg: maximale Auflösung : 2,1 Å, Rotation: 0,5°, Wellenlänge  $\lambda = 0,95$  Å.



**Tabelle 4-1: Datensammlungs- und Phasierungsstatistik**

	SeMet			HgCl <sub>2</sub>			Nativ
	Peak	Edge	Remote	Peak	Edge	Remote	
<b>Raumgruppe</b>	P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2			P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2			P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2
<b>Zellkonstanten</b>							
a = b (Å)	115.0			114.9			115.5
c (Å)	61.6			63.5			63.8
<b>Wellenlänge</b> (Å)	0.9788	0.9793	0.9500	1.0000	1.0085	0.9500	0.9500
<b>Auflösung</b> (Å)	15.0-2.7	15.0-2.7	15.0-2.7	15.0-2.7	15.0-2.7	15.0-2.7	20-2.1
<b>Unabhängige</b> <b>Reflexe</b>	12248	12248	12278	12210	12181	12246	25817
<b>Redundanz</b>	10.8	10.8	10.7	10.8	10.9	10.9	7.8
<b>Vollständigkeit</b> (%)	99.7 (98.9)	99.7 (100)	99.6 (100)	99.6 (99.9)	99.2 (97.7)	99.4 (99.9)	99.8 (99.8)
<b>I/σ(I)</b>	39.6 (9.7)	39.6 (9.6)	39.6 (10.1)	36.4 (5.2)	36.4 (5.0)	37.4 (5.9)	40.6 (3.5)
<b>R<sub>merge</sub><sup>a</sup> (%)</b>	3.3 (14.7)	3.7 (15.2)	3.2 (13.7)	3.4 (22.9)	3.5 (28.1)	3.5 (19.7)	7.3 (40.2)
<b>Phasierung</b>							
<b>Auflösung (Å)</b>	15.0-2.8	15.0-2.8	15.0-2.8	15.0-2.8	15.0-2.8	15.0-2.8	
<b>Schweratom-</b> <b>positionen</b>	4			1			
<b>FOM<sup>b</sup></b> Vor DM				0.55			0.27
Nach DM (15.0-2.1Å)				0.83			0.80

<sup>a</sup>  $R_{\text{merge}} = (\sum_h \sum_i [|I(h, i) - \langle I(h) \rangle|] / \sum_h \sum_i I)$ , wobei  $I(h, i)$  die Intensität der  $i$ -ten Messung von  $h$  und  $\langle I(h) \rangle$  ist der entsprechende Wert von  $h$  für alle  $i$  Messungen, also die Summation über alle Messungen.

<sup>b</sup> FOM = Figure of merit

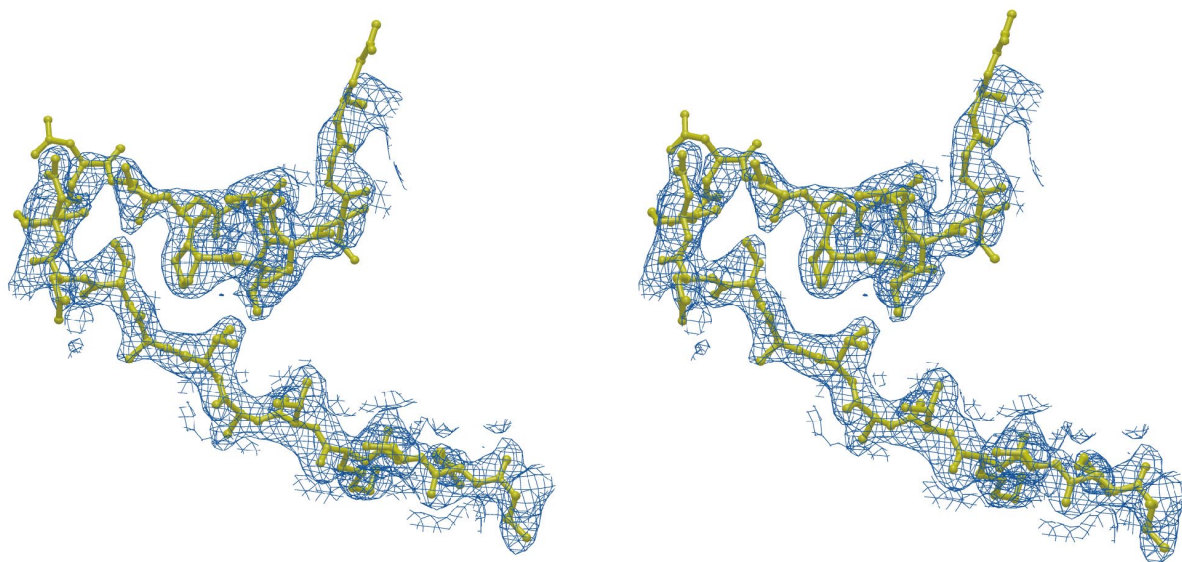
Daten in Klammern gelten für die letzte Auflösungsschale von 0.1Å.

Die Daten wurden mit dem HKL-Programmpaket ausgewertet (Otwinowski und Minor, 1997), die Intensitäten in Strukturfaktoramplituden überführt und für die weitere Prozessierung mit dem CCP4-Programm S2MTZ (Collaborative Computational Project, 1994) in das mtz-Format umgeschrieben. Nach Berechnung der Phasen mit MLPHARE und

deren Modifizierung mit dem Programm DM wurde eine Elektronendichtekarte bei einer Auflösung von 2,1 Å berechnet. Elektronendichtekarten, die unabhängig voneinander mit den vier Selen-Positionen oder der einen Hg-Position berechnet wurden, zeigten keine signifikanten Unterschiede zueinander und zu einer Elektronendichte mit kombinierten Phasen von beiden Derivaten.

#### 4.1.4 Modellbau und Verfeinerung

In der experimentellen Elektronendichte konnten die meisten Sekundärstrukturelemente der Domänen klar identifiziert werden. Besonders Teile der N-terminalen Domäne und einige Loop-Regionen zeigten keinen durchgehenden Verlauf. Sie waren nur in einer niedrigkonturierten experimentellen Elektronendichtekarte zu sehen. Ein Polyalanin-Modell, das bereits das gesamte Molekül umfaßte, wurde in die Elektronendichte eingebaut und mit dem Programm CNS (Brünger, 1998) verfeinert. Nach jeder Verfeinerung wurde das Modell manuell gegen eine  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  Elektronendichtekarte und die experimentellen Dichten abgeglichen und schrittweise Seitenketten in das Modell integriert. Obwohl der generelle Verlauf des Proteinrückgrats in der langen Helix  $\alpha 3$  klar zu erkennen war, war auch in späteren Stadien der Verfeinerung keine gut definierte Elektronendichte für die Seitenketten zu sehen. Da die flankierenden Loop-Regionen ebenfalls schlecht definiert waren, konnte die Primärsequenz nicht eindeutig zugeordnet werden und kann deshalb in dieser Region um eine Aminosäure verschoben sein. Die meisten schlecht definierten Regionen des Moleküls befinden sich in der N-terminalen Domäne (Rest 1-122), während der Rest der Struktur eine exzellente Elektronendichte aufweist (siehe Abb. 4-4). Nach Fertigstellung des Proteinmodells, wurden in stereochemisch sinnvollen Positionen Wassermoleküle in positive Differenzdichte eingebaut und isotrope Temperaturfaktoren verfeinert. Der freie R-Faktor konvergierte bei 31%, was wahrscheinlich auf den flexiblen N-Terminus des Moleküls zurückzuführen ist (siehe Tabelle 4-2). Seitenketten mit verbotenen  $\phi/\psi$  dihedralen Hauptkettenwinkeln (4%) fanden sich entweder in flexiblen Loop-Bereichen oder waren in der Elektronendichte sehr gut definiert. 5% der Reste befinden sich in großzügig erlaubten Bereichen und 91% in den erlaubten oder bevorzugten Regionen im Ramachandran Diagramm (Ramachandran, 1968).



**Abb. 4-4:** Stereodarstellung eines Teils der experimentellen Elektronendichte bei 2,1 Å nach Dichtemodifizierung mit DM. Gezeigt ist die Region zwischen den Aminosäuren 321 und 253 in der ersten KH-Domäne von NusA.

**Tabelle 4-2:**

Verfeinerungsstatistiken von NusA

**Nativer Datensatz**

<b>Auflösung (Å)</b>	20,0-2,1
<b>Anzahl der Reflexe</b>	25817 (99,8%)
<b>Anzahl der Proteinatome</b>	2667
<b>Anzahl der Wassermoleküle</b>	375
<b><math>R_{\text{krist}}^c</math></b>	24,4
<b><math>R_{\text{frei}}^c</math></b>	31,9
<b>R.m.s. Abweichungen Bindungslängen (Å)</b>	0,011
<b>R.m.s. Abweichungen Bindungswinkel (°)</b>	1,66

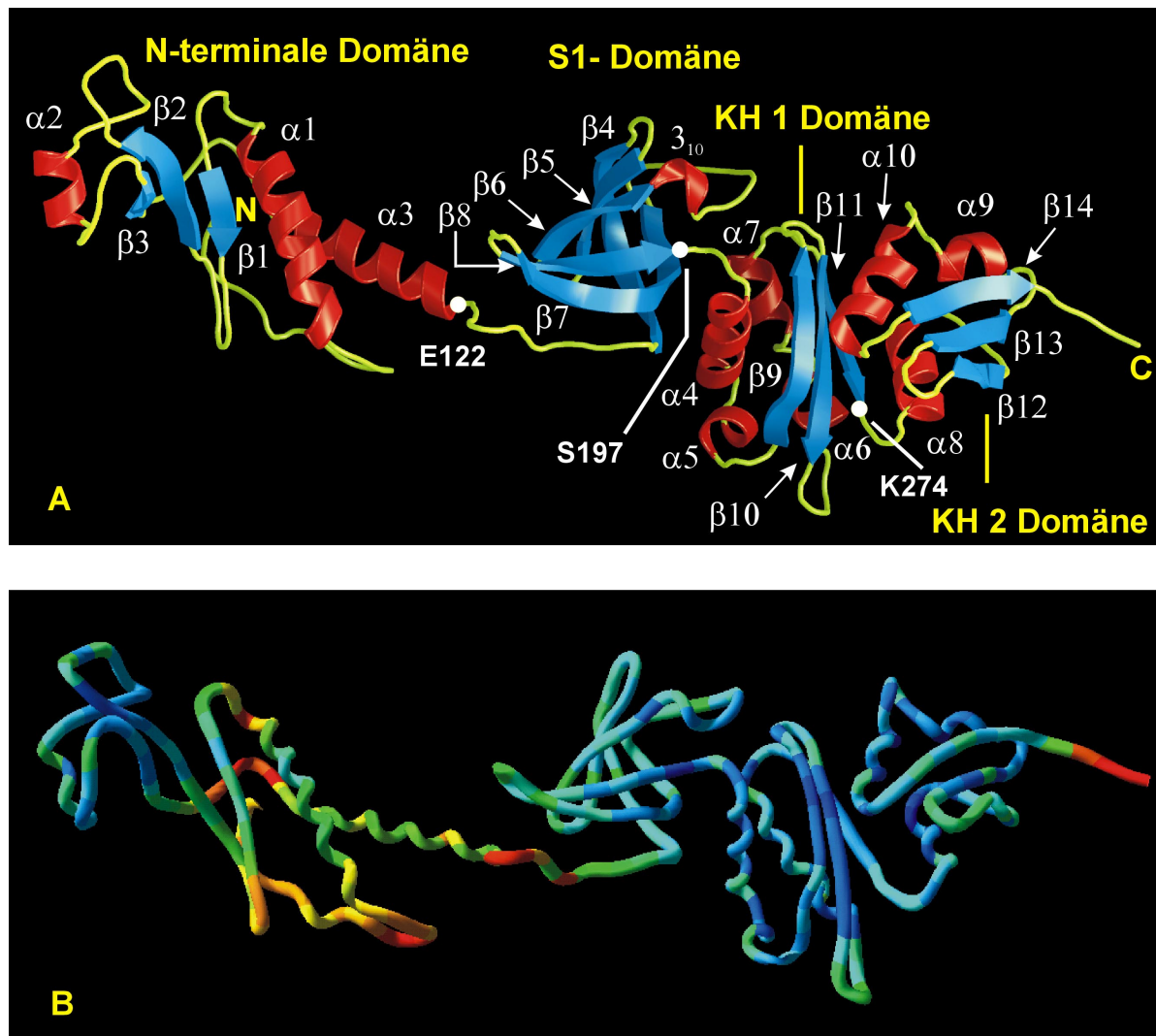
<sup>c</sup>  $R_{\text{krist}} = \sum |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}| / \sum |F_{\text{obs}}|$ , wobei  $F_{\text{obs}}$  und  $F_{\text{calc}}$  die beobachteten beziehungsweise berechneten Strukturfaktoramplituden sind;  $R_{\text{frei}}$  wurde mit zufällig ausgewählten 5% der Daten berechnet, die von allen Verfeinerungszyklen ausgeschlossen wurden.

## 4.1.5 Kristallstruktur von NusA

### 4.1.5.1 Übersicht über die Struktur und Oberflächentopographie

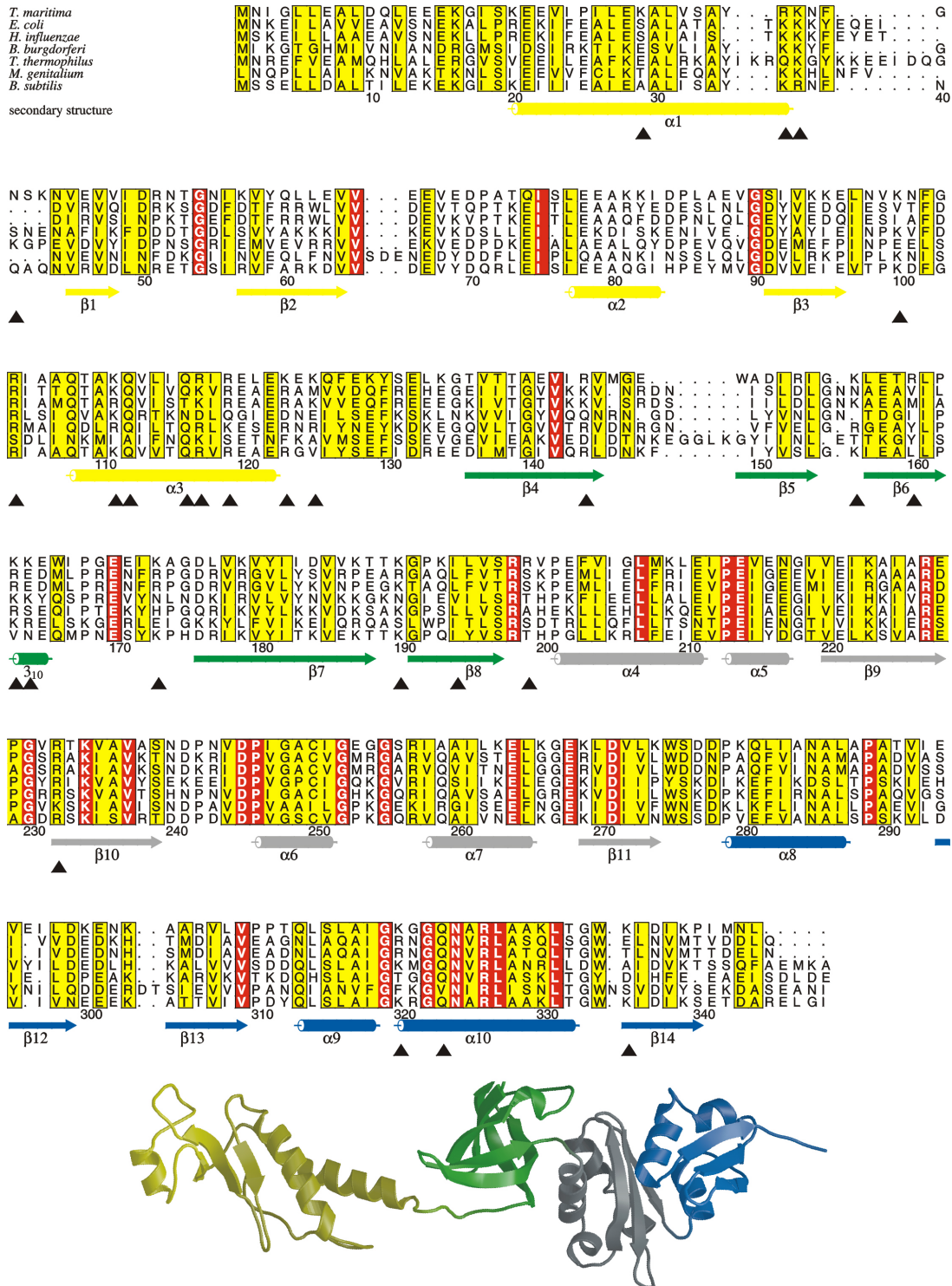
NusA von *Thermotoga maritima* ist ein langgestrecktes Molekül mit Abmessungen von  $115 \text{ \AA} \times 28 \text{ \AA} \times 25 \text{ \AA}$ , das aus vier Domänen besteht (siehe Abb. 4-5). Die N-terminale Domäne (NTD) (Aminosäuren 1-122) zeigt ein dreisträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, das auf beiden Seiten von je einer  $\alpha$ -Helix flankiert wird. Die einzelnen Sekundärstrukturelemente sind durch ausgedehnte Loop-Regionen miteinander verbunden, die hohe Temperaturfaktoren aufweisen. Dieses Modul ist durch eine lange Helix,  $\alpha_3$ , und eine nachfolgende Region (Rest 122-135), die eine vollkommen gestreckte Konformation einnimmt, mit dem S1-Homologiemotiv verbunden. Diese Domäne, zum ersten Mal im ribosomalen Protein S1 identifiziert, das aus 6 S1-Kopien aufgebaut ist (Gribskov, 1992; Subramanian, 1983), besteht aus einem fünfsträngigen antiparallelem  $\beta$ -barrel und weist eine typische *Greek key* Topologie mit einer kleinen  $3_{10}$  Helix nach dem dritten  $\beta$ -Strang,  $\beta_6$ , auf. C-terminal zur S1-Domäne befinden sich zwei K-Homologie (KH) Motive (Aminosäuren 200-276 und 277-344). Diese Faltungsmotive wurden im prä-mRNA bindenden Protein K entdeckt (Siomi *et al.*, 1993). Sie bestehen aus einem dreisträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt, das sich auf einer Seite gegen  $\alpha$ -helikale Segmente packt. Während KH2 die minimale Anzahl von drei  $\beta$ -Faltblättern und drei  $\alpha$ -Helices enthält, hat KH1 eine zusätzliche kleine  $\alpha$ -Helix zwischen  $\alpha_4$  und dem ersten  $\beta$ -Strang,  $\beta_9$ .

Das sehr gut charakterisierte *E. coli* NusA (*ecoNusA*) enthält eine weitere C-terminale Domäne, die für die Funktion des Protein nicht essentiell ist (Tsugawa *et al.*, 1988). Es wurde gezeigt, daß dieses Modul mit der  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP und mit  $\lambda$ -Protein N wechselwirkt (Mah *et al.*, 1999; Mah *et al.*, 2000). Da die Sequenzhomologie zum Rest von *ecoNusA* 52% beträgt, kann das *T. maritima* Protein als Modell für das minimale aktive Fragment von *ecoNusA* dienen.



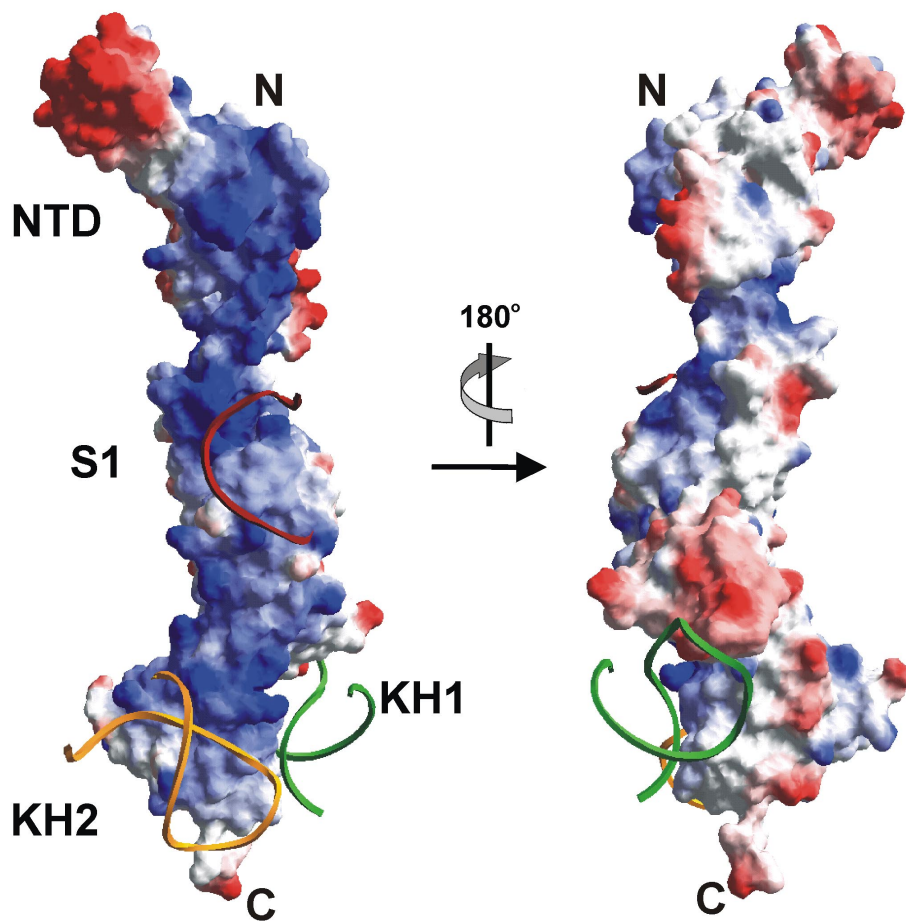
**Abb. 4-5:** (A) Darstellung von *tmaNusA* mit den einzelnen Sekundärstrukturelementen in den vier Domänen. Aminosäuren, die den C-Terminus einer Domäne markieren, sind durch weiße Punkte gekennzeichnet. (B) Temperaturfaktorplot des Proteins, wobei die niedrigsten B-Faktoren dunkelblau und die höchsten rot eingefärbt sind. Deutlich sind die hohen Temperaturfaktoren vor allem der N-terminalen Domäne und der verbrückenden Helix  $\alpha_3$  zu erkennen. Die obere Abbildung wurde mit Bobscrip angefertigt und der Temperaturfaktorplot mit dem Swiss-Pdb-Viewer erstellt und mit OpenGL gerendert (Guex und Peitsch, 1997).

Das Oberflächenpotential von NusA zeigt eine auffallende Asymmetrie (siehe Ab. 4-7). Ein stark positives Oberflächenpotential an dem etwa 30 Aminosäuren beteiligt sind, überspannt fast eine gesamte Seite des Moleküls. Die Aminosäuren befinden sich vor allem in den zwei  $\alpha$ -Helices der N-terminalen Domäne, in den verbindenden Loops zwischen den  $\beta$ -Faltblättern und der  $3_{10}$ -Helix der S1-Domäne, und in  $\beta_{10}$ ,  $\beta_{11}$  und  $\alpha_{10}$  der beiden KH-Domänen. Ein Sequenzvergleich (siehe Abb. 4-6) zeigt, daß die Art der meisten Seitenketten auch bei anderen NusA-Proteinen konserviert ist. Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß diese positiv



**Abb. 4-6:** Sequenzvergleich zwischen NusA Sequenzen von verschiedenen Bakterien (*Thermotoga maritima*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Borrelia burgdorferi*, *Thermus thermophilus*, *Mycoplasma genitalium*, *Bacillus subtilis*), die aus der SWISSPROT Datenbank (Bairoch und Apweiler, 2000) erhalten wurden. Die Nummerierung bezieht sich auf *tmaNusA*. Aminosäuren, die Bestandteil der positiv geladenen Flanke des Moleküls sind, sind mit schwarzen Dreiecken gekennzeichnet. Aminosäuren die in 6 von 7 Spezies streng konserviert sind, sind durch roten Hintergrund gekennzeichnet, diejenigen mit 5 strikt konservierten Sequenzen sind mit gelben Hintergrund markiert. Die Sekundärstrukturen wurden mit dem Programm STRIDE (Frishman und Argos, 1995) ermittelt und sind analog zu den Domänen der obigen Abbildung eingefärbt.

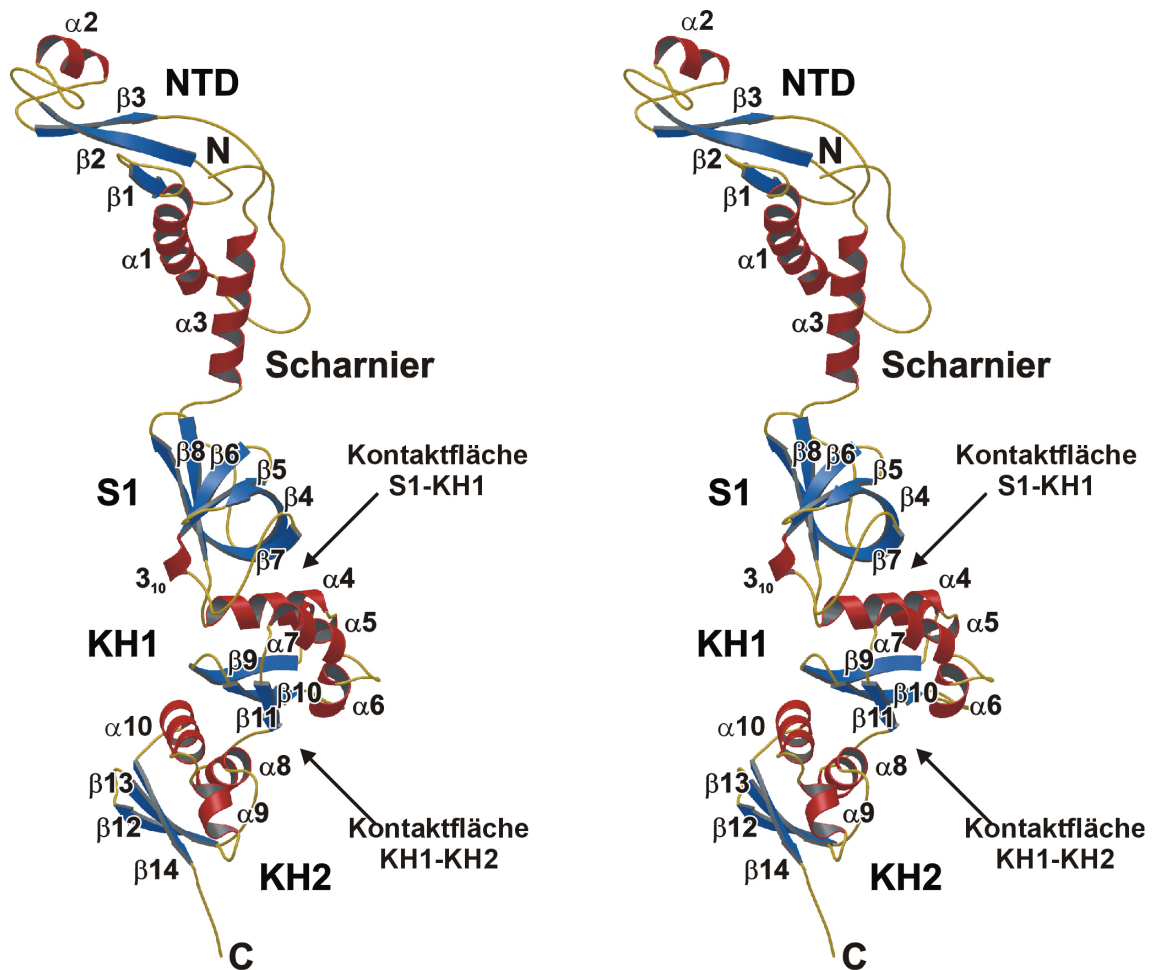




**Abb. 4-7:** Darstellung des Oberflächenpotentials von NusA, erstellt mit dem Swiss-Pdb-Viewer.: **Links:** mutmaßliche RNA bindende Oberfläche. *Ribbon*-Darstellungen des Zucker-Phosphat-Rückgrats von RNA-Liganden für das S1-Motiv (rot) und die beiden KH-Domänen (grün und gelb) sind schematisch dargestellt. Die Positionen der RNA-Moleküle wurden durch Überlagerung von NusA mit RNA-Protein-Komplexen homologer Polypeptide erhalten, wie im Text dargestellt (siehe Abschnitt 4.1.5.3). **Rechts:** Oberflächenpotential der Flanke, die dem positiven Potential gegenüberliegt.

geladene Flanke auch bei anderen NusA-Homologen anzutreffen ist. In nukleinsäurebindenden Proteinen sind positive geladene Oberflächenbereiche in der Regel an der Erkennung des Zucker-Phosphat-Rückgrats beteiligt. Im Falle von NusA könnte dieser ausgedehnte Teil für die Interaktion mit Boten-RNA eine wichtige Rolle spielen. Auf der gegenüberliegenden Seite der mutmaßlichen RNA-bindenden Oberfläche zeigt NusA eine Flanke mit gemischtem Potential. Es treten, hydrophobe, saure und auch basische Reste auf, wobei hauptsächlich die Helix  $\alpha_3$  mit der nachfolgenden Loop-Region (Phe127 bis Thr138), das erste  $\alpha$ -helikale Segment von KH1 (Leu210, Glu214, Glu216) und einige Reste in der Kontaktfläche zwischen beiden KH-Domänen (Asp277, Asp278) beteiligt sind. Dieser Teil

des Moleküls könnte für sequenzspezifische Wechselwirkung mit RNA (siehe Abschnitt 4.1.5.3), oder auch für Bindung zu anderen Proteinkomponenten der Transkriptionsmaschinerie eingesetzt werden.

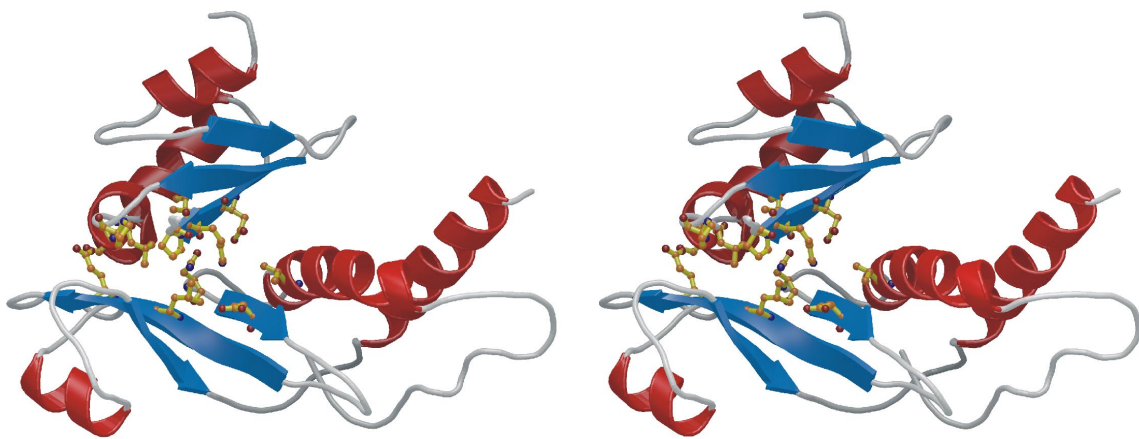


**Abb. 4-8:** Stereodarstellung von *tmaNusA*.  $\alpha$ -Helices sind in rot gezeichnet,  $\beta$ -Faltblätter in blau und Loop-Regionen in gelb. Mit Scharnier ist die flexible, die NTD mit dem Rest des Moleküls verbrückende Helix  $\alpha 3$  gekennzeichnet.



#### 4.1.5.2 Stabilisierung der N-terminalen Domäne durch Kristallkontakte

Deletionsexperimente zeigten, daß eine trunkierte *ecoNusA* Variante, die nur die N-terminalen 136 Reste enthält, die entscheidenden Faktoren für die Interaktion mit RNAP beibehält, aber keine Antiterminationsaktivität mehr zeigt (Mah *et al.*, 1999). Die flächenartige Anordnung der Sekundärstrukturelemente steht im Gegensatz zur kompakten globulären Faltung, die normalerweise für Domänen zu beobachten ist und führt zu einer lockeren Packung. Im Einklang damit weist ein Großteil des N-Terminus hohe Temperaturfaktoren auf, wobei vor allem die N-terminalen 20 Reste und Helix  $\alpha_3$  mit ihren flankierenden Loop-Regionen hervorstechen (siehe Abb. 4-5B). Die Konformation dieses Teiles von NusA wird möglicherweise stark durch Kristallkontakte beeinflusst. Obwohl einige hydrophobe Reste der amphipathischen Helix  $\alpha_1$ , wie zum Beispiel Val23, Leu27 und Leu31, mit Val113 und Leu114 von Helix  $\alpha_3$  und Leu6 am N-Terminus wechselwirken, wird die Bildung eines regulären hydrophoben Kerns durch einige hydrophile Reste gestört (Glu7, Gln11), die sich zwischen die hydrophoben Aminosäuren einlagern.



**Abb. 4-9:** Stereoabbildung der wichtigsten Kristallkontakte der NTD (unten) zu der zweiten KH-Domäne eines symmetrieäquivalenten Moleküls (oben). Die Kontakte kommen vor allem über die  $\beta$ -Faltblätter zustande und bedingen wahrscheinlich ein Aufklappen der NTD in diesem Bereich. Die Seitenketten, die an den Kontakten beteiligt sind, sind in *ball and stick* Darstellung gezeichnet.

Abgesehen von schwächeren Wechselwirkungen über Loop-Regionen, wird die N-terminale Domäne vor allem durch Kristallkontakte mit der zweiten KH-Domäne eines symmetrieäquivalenten Moleküls stabilisiert (siehe Abb. 4-9). Das KH-Motiv wechselwirkt

mit dem dreisträngigen  $\beta$ -Faltblatt der NTD über van der Waals Kontakte von hydrophoben Resten und über wenige Wasserstoffbrückenbindungen. Dabei wird die NTD möglicherweise aufgeweitet, indem die beiden Helices  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$  zur Seite gedrängt werden. Es liegt die Vermutung nahe, daß dieser Bereich eine zentrale Rolle bei der Bindung an RNAP spielt und auch in diesem Fall eine Konformationsänderung erfährt. Die Verbindung zu den nachfolgenden RNA-bindenden Domänen über Helix  $\alpha 3$  ist ziemlich lose, so daß die NTD von dem Rest des Moleküls abgekoppelt ist. Eine Datenbanksuche mit dem DALI-Programm (Holm und Sander, 1993), ergab keine relevanten Homologien zu bereits bekannten Faltungstypen.

Auf einer Seite zeigt das N-terminale Modul ein zweigeteiltes Oberflächenpotential, wobei Helix  $\alpha 2$  und einige Bereiche der  $\beta$ -Stränge  $\beta 2$  und  $\beta 3$  eine Subdomäne mit stark negativen Oberflächenpotential bilden. Große Teile von Helix  $\alpha 1$  und  $\alpha 3$  zeigen positive Oberflächenladung, die Bestandteil des langen kontinuierlichen Bandes basischer Aminosäuren ist, das sich am Molekül entlangzieht (siehe Abb. 4-7).

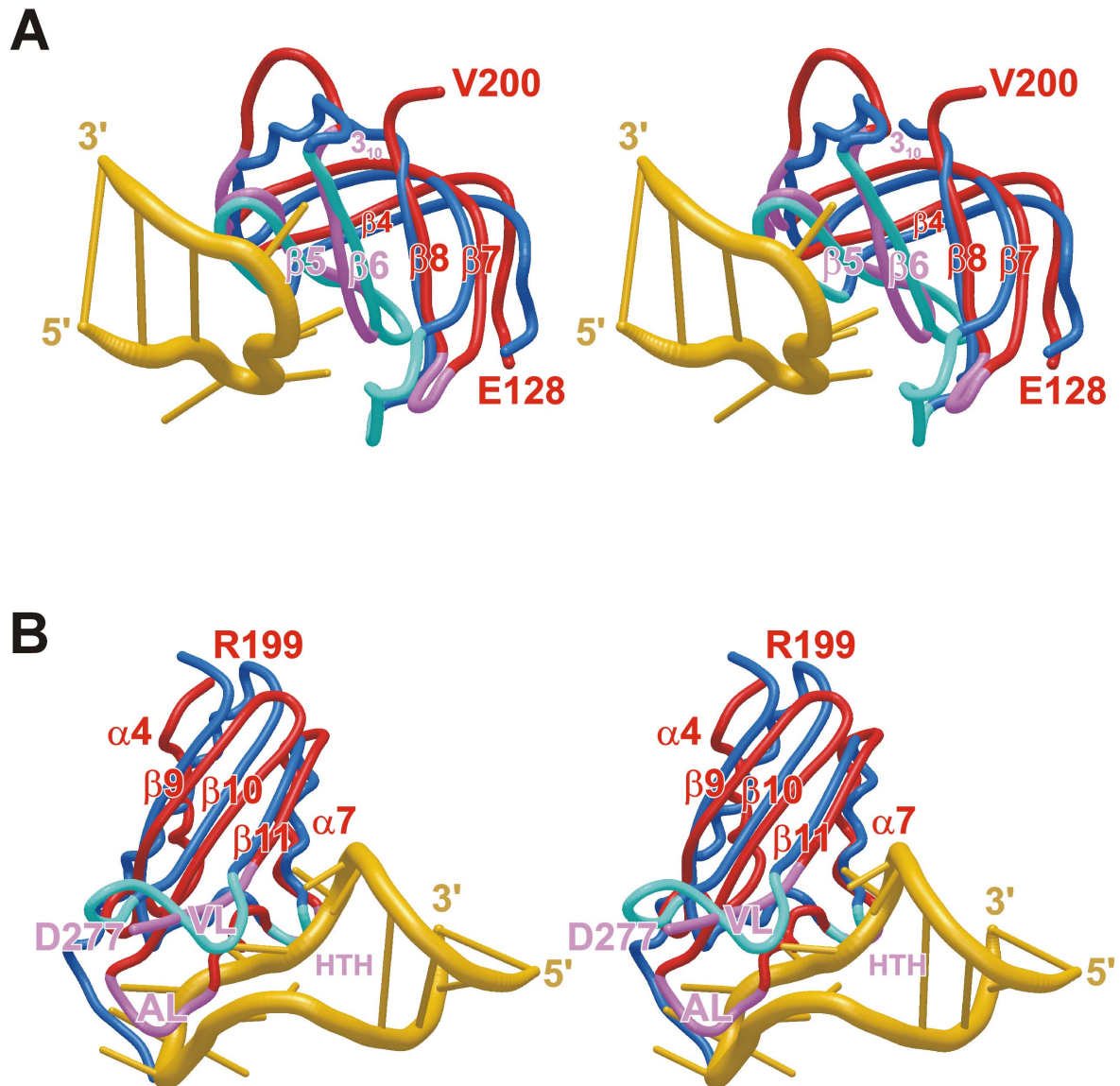
#### 4.1.5.3 Modelle für die RNA-Bindung durch NusA

Für beide nachfolgenden Domänen, dem S1-Motiv und dem KH-Modul wurden zum Teil mehrere RNA-Protein Strukturen gelöst, die für die Aufstellung eines Modells der Wechselwirkung von NusA mit Boten-RNA von Bedeutung sind und hier detaillierter besprochen werden sollen. S1 Domänen sind Vertreter der Superfamilie der OB-Proteine (Oligonukleotid-Oligosaccharid bindender Faltungstyp). S1 Motive besitzen eine zusätzliche  $3_{10}$  Helix nach dem dritten  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta 6$  in NusA), die in OB-Proteinen nicht vorhanden ist. Es wurden eine Reihe von Strukturen von S1 Domänen gelöst. Erwähnt seien hier die *E. coli* Polynukleotidphosphorylase (PNPase) (Bycroft *et al.*, 1997) und das *Bacillus subtilis* Kälteschock-Protein CspB (Schindelin *et al.*, 1993). Alle S1 Strukturen wurden ohne RNA-Liganden gelöst, aber ein in erster Linie positiv geladener Bereich auf einer Seite des  $\beta$ -barrels wurde als mutmaßliche Bindungsstelle für RNA identifiziert.

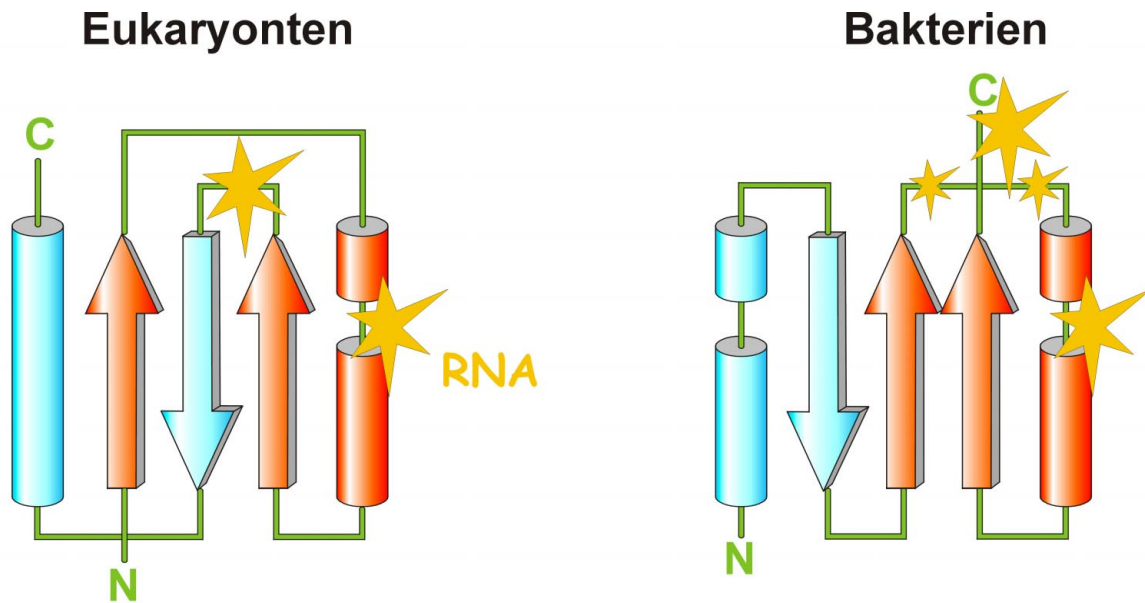
Einige RNA-Protein Strukturen wurden für Polypeptide mit OB-Faltung gelöst, wie zum Beispiel der Komplex aus der RNA-bindenden Domäne des Terminationsfaktor Rho mit einem 9-mer poly(C) (Bogden *et al.*, 1999), das ribosomale Protein S17 komplexiert an rRNA

(Schluenzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000) und die OB-Motive von Typ II tRNA-Synthetasen in Kontakt mit dem Anticodon-Loop des tRNA-Moleküls (Cavarelli *et al.*, 1993; Eiler *et al.*, 1999). Es ist sehr wahrscheinlich, daß diese Faltungsmotive aufgrund ihrer hohen strukturellen Homologie zu S1-Domänen auf eine ähnliche Weise mit RNA wechselwirken. Eine Überlagerung zwischen dem OB-Anticodon-Loop Komplex der Aspartyl tRNA Synthetase (Eiler *et al.*, 1999) und der S1-Domäne von NusA erlaubt deshalb die Identifizierung von Seitenketten, die wahrscheinlich an der Bindung zu RNA beteiligt sind (siehe Abb. 4-10). Beide Proteine überlagern mit einer *r.m.s.*-Abweichung von 2,1 Å für 45 C $\alpha$ -Atome. Im modellierten Komplex ist die RNA auf einer Plattform positioniert, die aus den  $\beta$ -Strängen  $\beta$ 4 bis  $\beta$ 6 besteht. Komplettiert wird diese Plattform durch die  $3_{10}$ -Helix und zusätzliche Kontakte zur RNA macht der Loop zwischen  $\beta$ 7 und  $\beta$ 8. Die mutmaßliche RNA bindende Region ist topologisch äquivalent zu den vorgeschlagenen Bindungsstellen für RNA in den S1-Domänen (Bycroft *et al.*, 1997; Schindelin *et al.*, 1993). Die wahrscheinliche Interaktionsregion mit RNA in der S1-Domäne von NusA zeigt positives Oberflächenpotential und ist Bestandteil der ausgedehnten Region mit basischen Seitenketten auf der Oberfläche (siehe Abb. 4-7).

Im Falle des KH-Motivs wurden eine Reihe von NMR- und Kristallstrukturen von isolierten Domänen des humanen RNA-assoziierten Proteins Vigilin (Musco *et al.*, 1997), von FMR I (Musco *et al.*, 1996), dem humanen Protein NOVA (Lewis *et al.*, 1999) und von hnRNP-K (Baber *et al.*, 1999) gelöst. KH-Domänen in bakteriellen Proteinen wurden in den Strukturen des *E. coli* Zellzyklusregulators ERA (Chen *et al.*, 1999) und im ribosomalen Protein S3 aus *Thermus thermophilus* (Schluenzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000) gefunden. Überlagerungen der oben erwähnten Strukturen mit den entsprechenden Domänen aus NusA zeigten, daß die bakteriellen und eukaryontischen Motive unterschiedliche Topologien aufweisen (siehe Abb. 4-11). Die Abfolge von Sekundärstrukturelementen in Bakterien lautet  $\alpha(\alpha)\beta\mathbf{\beta\alpha\alpha\beta}$ , während Eukaryonten eine  $\mathbf{\beta\alpha\alpha\beta\alpha}$  Anordnung zeigen. Die fett gedruckte  $\mathbf{\beta\alpha\alpha\beta}$  Substruktur entspricht dem ursprünglich vorgeschlagenen minimalen KH Kernmotiv (Castiglione Morelli *et al.*, 1995; Gibson *et al.*, 1993), dem unterschiedliche Erweiterungen je nach Art der Zellen angefügt wurden. Das Kernmotiv enthält in allen Fällen ein konserviertes (GXXG)-Motiv zwischen den beiden  $\alpha$ -helikalen Segmenten und einen C-terminalen variablen Loop, die zusammen die RNA-bindende Region aufbauen (siehe unten im Text). Es muß abgewartet werden, welche KH-Topologie Archaen aufweisen.



**Abb. 4-10:** (A) Stereoabbildung einer Überlagerung der S1-Domäne von NusA (rot) mit dem N-terminalen OB-Faltungsmotiv der Aspartyl-tRNA Synthetase (blau) in Komplex mit dem Anticodon Loop der tRNA (gold) (Eiler *et al.*, 1999). (B) Stereoabbildung der Überlagerung der ersten KH-Domäne von NusA (rot) mit dem NOVA KH2 Motiv (blau) in Komplex mit einer Haarnadelschleife (gold). In beiden Abbildungen sind bekannte und mutmaßliche RNA kontaktierende Bereiche der NusA-Domänen cyan oder im Falle der homologen Motive magenta markiert. HTH Helix-Turn-Helix-Motiv; VL variabler Loop; AL zusätzlicher Loop.



**Abb. 4-11:** Topologiediagramme der eukaryontischen und bakteriellen KH-Domänen. Rot eingefärbt ist das gemeinsame Kernmotiv  $\beta\alpha\beta$ , während die terminalen Erweiterungen in blau gehalten sind. Mit gelben Sternen sind die Regionen markiert, die an der Bindung zur RNA beteiligt sind.

Proteine, die KH-Domänen aufweisen binden eine Vielzahl von Nukleinsäuren, darunter mRNA im Fall des ribosomalen Proteins S3 (Urlaub *et al.*, 1995) und Heterochromatin-DNA im Falle von DDP1 (Cortes und Azorin, 2000). Kürzlich wurde die Kristallstruktur der dritten KH-Domäne des humanen Proteins NOVA in Komplex mit einer *in vitro* selektierten Haarnadelschleife gelöst (Lewis *et al.*, 2000). Sie zeigt, daß eine aliphatische  $\alpha/\beta$  Plattform die Basis für die Erkennung von einzelsträngigen Nukleinsäuren darstellt. Die RNA findet Halt zwischen dem (GXXG)-Motiv und dem sogenannten variablen Loop. Die Überlagerung des NOVA-RNA Komplexes mit der ersten KH-Domäne von NusA zeigt, daß aufgrund der unterschiedlichen Topologie das KH-Motiv von NusA auf eine leicht modifizierte Art mit RNA wechselwirkt (siehe Abb. 4-10B). Beide Strukturen haben eine *r.m.s.*-Abweichung von 2,2 Å über 34  $C_{\alpha}$ -Atome. Während die HTH-Motive beider Proteine sehr gut übereinandergelegt werden können, entspricht der variable Loop von NOVA KH3 dem C-Terminus der KH-Domäne von NusA (siehe Abb. 4-10B und 4-11). In Übereinstimmung damit zeigen auch die C-Termini der beiden KH-Domänen von NusA Sequenzvariabilität (KH1: Trp275-Asp278; KH2: Ile341-Leu 344), ähnlich wie der variable Loop in NOVA. Der RNA-Ligand von NOVA kollidiert mit einer zusätzlichen Loop-Region von KH1, die  $\beta 10$  und  $\alpha 6$  verbindet (siehe Abb. 4-10B). Dieser Bereich in NusA erscheint flexibel und könnte deshalb bei Bindung an RNA eine Konformationsänderung erfahren, wobei neben dem HTH-Motiv und dem C-Terminus eine zusätzliche Bindungsstelle für die RNA entstehen könnte.

Die zweite KH-Domäne zeigt im wesentlichen die gleichen Eigenschaften wie das KH1 Motiv, wobei der zusätzliche Loop (Reste 310-312) allerdings wesentlich kleiner ist.

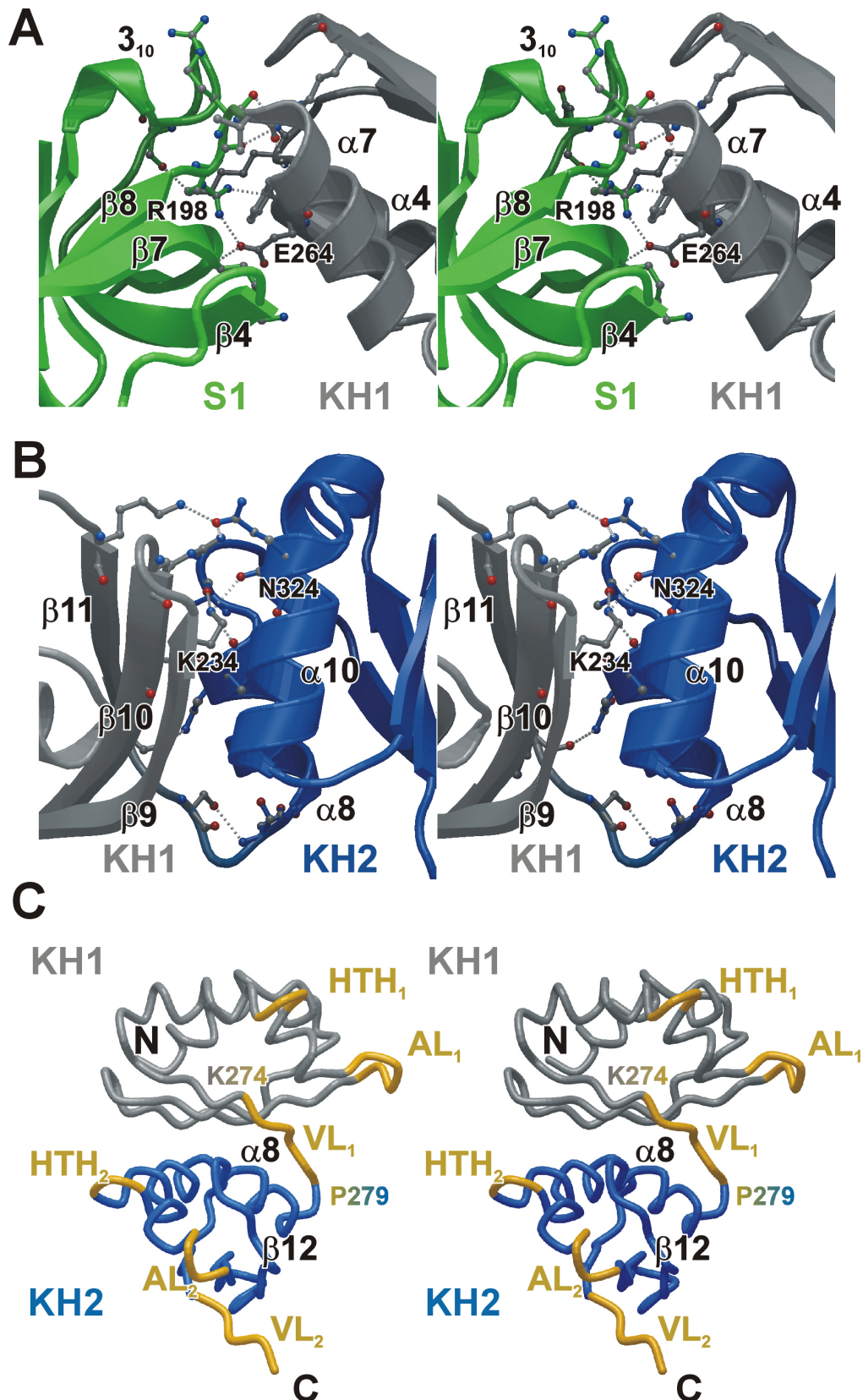
Die RNA-bindende Oberfläche der ersten KH-Domäne ist nicht Bestandteil der Flanke mit positivem Oberflächenpotential. Statt dessen stellen zwei Reste dieses Motivs (Arg199 und Arg232) den kontinuierlichen Verlauf des elektropositiven Bandes auf der Oberfläche sicher, während die mutmaßliche Kontaktstelle für die RNA sich auf die gegenüberliegende Seite des Moleküls in eine Region mit gemischten elektrostatischen Potential erstreckt (siehe Abb. 4-7). Aus diesem Grund scheint KH1 besonders für eine sequenzspezifische Erkennung von RNA geeignet zu sein. Im Gegensatz dazu ist der RNA-kontaktierende Bereich von KH2 in der Region mit positiven Potential eingeschlossen.

#### 4.1.5.4 Kontaktflächen der Domänen

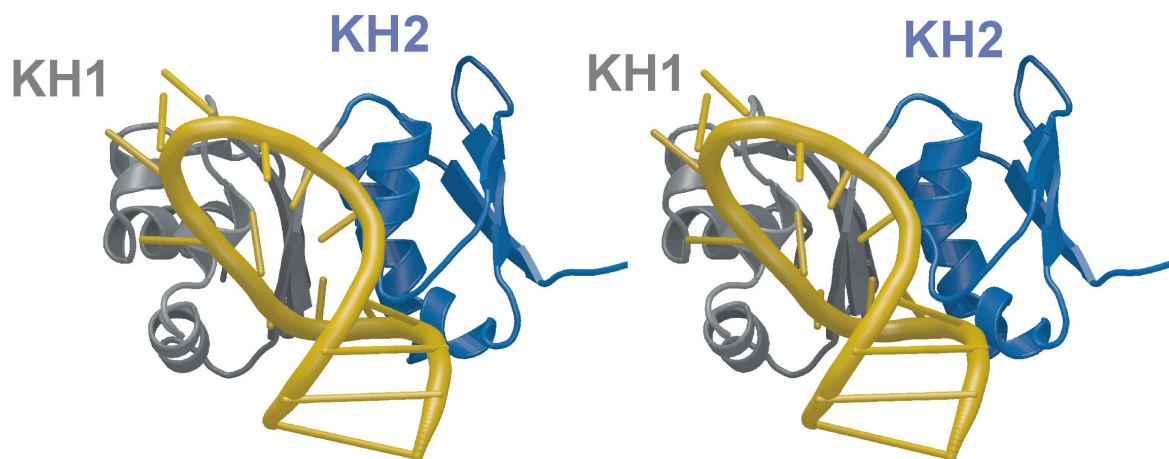
Während die NTD vom Rest des Moleküls durch die flexible Helix  $\alpha 3$  abgekoppelt ist, bilden die drei C-terminalen Faltungsmotive eine starre, dicht gestapelte Region von NusA (siehe Abb. 4-9). Die enge Assoziierung zwischen der S1-Domäne und KH1 wird durch eine Plattform ermöglicht, die durch die wechselwirkenden N-terminalen Hälften der  $\beta$ -Faltblätter  $\beta 4$  und  $\beta 7$  gebildet wird (Val137, Asp176, Tyr181) und Helix  $\alpha 4$  (Phe203, Leu210) und den C-terminalen Teil von  $\alpha 7$  (Lys266) in KH1 kontaktiert (siehe Abb. 4-12A). An dieser Interaktion sind sowohl hydrophobe Kontakte als auch Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt. Die Kontaktfläche zwischen beiden Domänen bedeckt  $1165 \text{ \AA}^2$  Oberfläche, was ein ziemlich komplementäres Stapeln beider Motive vermuten läßt.

Die Architektur der Kontaktfläche zwischen den beiden KH-Motiven ähnelt der S1-KH1-Wechselwirkung: Zwei  $\alpha$ -Helices des C-terminalen KH-Motivs ( $\alpha 8$  und  $\alpha 10$ ) packen gegen die  $\beta$ -Faltblätter des vorhergehenden Motivs ( $\beta 9$ ,  $\beta 10$  und  $\beta 11$ ), wobei ein dicht gepackter  $\alpha/\beta$  Stapel entsteht (siehe Abb. 4-12B). Während im Fall der S1-KH1 Interaktion die Achsen der  $\beta$ -Faltblätter und  $\alpha$ -Helices senkrecht zueinander stehen, sind alle Sekundärstrukturelemente im Falle der KH1-KH2 Wechselwirkung parallel zueinander angeordnet. Das zweite KH-Motiv ist  $100^\circ$  relativ zur ersten KH-Domäne rotiert, was die direkte kovalente Verknüpfung beider Module durch eine kurze Loop-Region erlaubt. Die Kontaktfläche zwischen beiden KH-Motiven bedeckt  $1270 \text{ \AA}^2$  Oberfläche.





**Abb. 4-12:** Stapelung der RNA-bindenden Domänen: (A) Detaillierte Darstellung der Wechselwirkung zwischen der S1- und der ersten KH-Domäne (B) Details der Kontaktfläche zwischen den beiden KH-Modulen. Konservierte Reste, die an der Domänenstapelung beteiligt sind, sind in *ball and stick* Darstellung gezeichnet. (C) Die beiden aufeinanderfolgenden KH-Motive mit in Gold gehaltenen mutmaßlichen RNA-bindenden Regionen. Abkürzungen wie in Abb. 4-10.



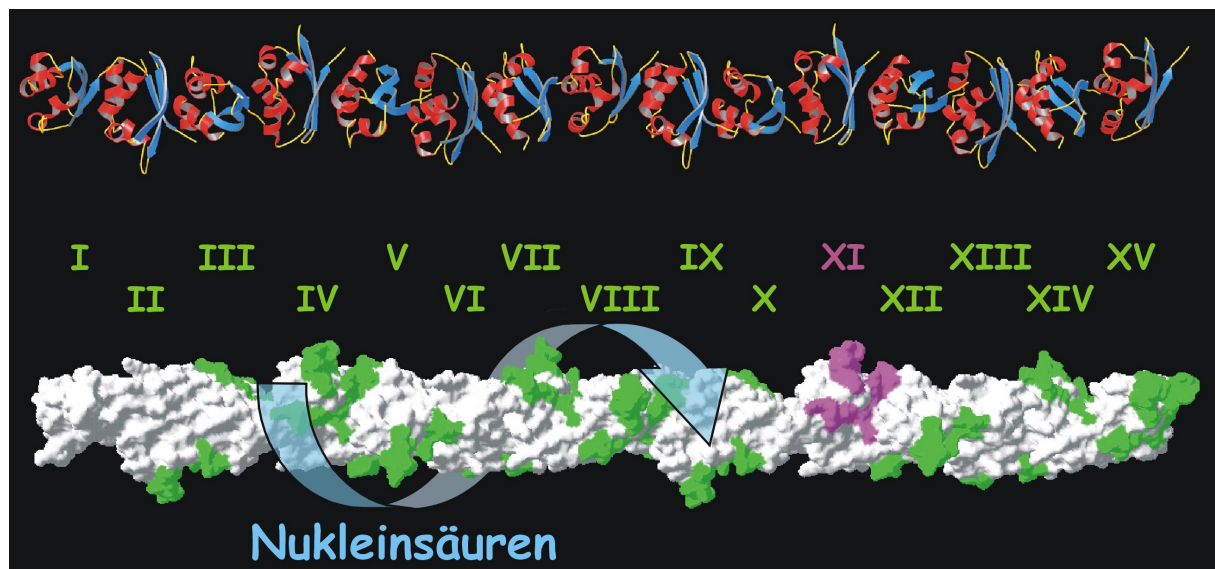
**Abb. 4-13:** Die Stapelung der ersten KH-Domäne (grau) auf das zweite KH-Motiv (blau) ermöglicht kooperative Bindung beider Module an einen RNA-Liganden. Dabei unterstützt KH2 mit seinen Helices  $\alpha 8$  und  $\alpha 9$  KH1 in seiner Bindung zur RNA.

Bei näherer Betrachtung ergibt sich die Möglichkeit, daß eine zusätzliche RNA-bindende Region zwischen beiden KH-Modulen durch das Stapeln entsteht. Das HTH-Motif von KH2 ( $\alpha 9$  und  $\alpha 10$ ) könnte mit  $\beta 9$  und dem C-Terminus von KH1 zusammen eine neue KH-ähnliche  $\alpha/\beta$  Plattform aufbauen, wobei möglicherweise auch die Loop-Region zwischen Helix  $\alpha 8$  und  $\beta 12$  involviert sein könnte (siehe Abb. 4-12C). Diese zusätzliche Bindungsstelle würde die Oberfläche der Proteine, die für die Interaktion mit Nukleinsäuren zur Verfügung steht, sehr stark vergrößern und sich gleichzeitig positiv auf ihre Vielseitigkeit auswirken. In der Tat wurden Hinweise gefunden, daß durch die Assoziation von 15 KH-Domänen im *Drosophila melanogaster* Protein DDP1, einem Vigilin Homologen, zwei unabhängige RNA-bindende Regionen entstehen (Cortes und Azorin, 2000). Darüber hinaus unterstützt KH2 durch Seitenketten in den Helices  $\alpha 8$  und  $\alpha 9$ , die sowohl einzel- als auch doppelsträngige Regionen der KH1 gebundenen RNA kontaktieren, KH1 in seiner Bindung zum Liganden (siehe Abb. 4-13). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß aufeinanderfolgende KH-Module ihre Bindungspartner kooperativ kontaktieren.

Eine Vielzahl von mit Nukleinsäuren assoziierten Proteinen enthalten multiple KH-Motive. Vigilin und seine Homologen bestehen aus 15 Kopien dieses Moduls, getrennt durch wahrscheinlich  $\alpha$ -helikale, verbrückende Regionen mit einer Länge von ungefähr 18 Resten, und binden verschiedenste Arten von zellulären RNA- und DNA-Molekülen (Kanamori *et al.*, 1998; Kruse *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 1997). Als wir die globale Struktur dieses Proteins



gemäß der in NusA beobachteten Stapel modellierten, erhielten wir elongierte Moleküle (siehe Abb. 4-14). Eine Vielzahl von biochemischen Experimenten zeigte, daß das ribosomale Protein S1, aufgebaut aus sechs S1-Motiven, in Lösung eine langgestreckte Struktur aufweist (Labischinski und Subramanian, 1979; Yokota *et al.*, 1979; Yokota *et al.*, 1977). Mit Hilfe von hydrodynamischen Studien wurde auch eine elongierte Form für NusA in Lösung nachgewiesen (Gill *et al.*, 1991b). Deshalb erscheint eine ähnliche Situation bei Aneinanderreihung von 15 KH-Motiven möglich. Die Verteilung der mutmaßlichen RNA/DNA bindenden Regionen läßt vermuten, daß sich die Nukleinsäuren mehrmals um das Protein wickeln.

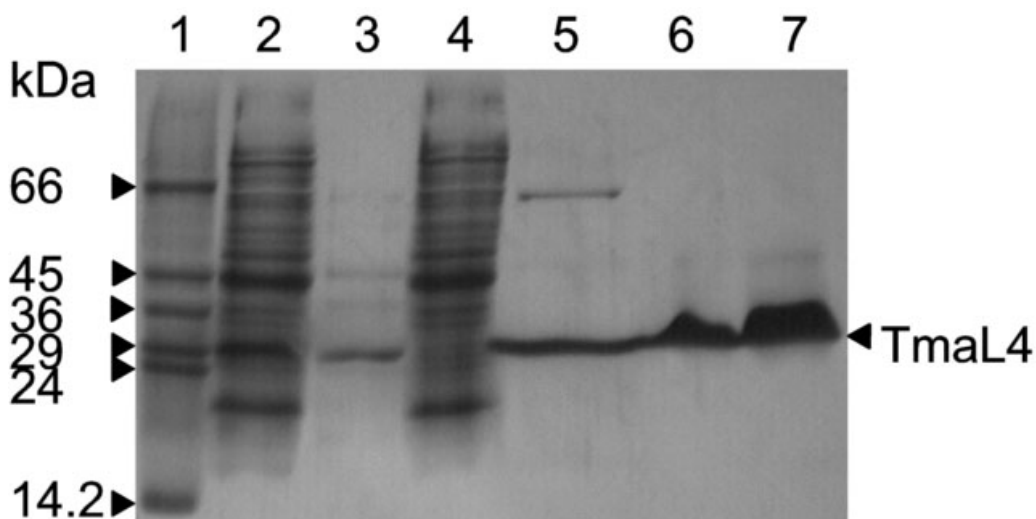


**Abb. 4-14:** Modell für die Assoziation von 15 KH-Modulen im Protein Vigilin. Die Module sind jeweils um etwa 100° gegeneinander rotiert, so daß das achte Motiv etwa die gleiche Orientierung wie das erste Modul aufweist. Dies läßt vermuten, daß sich die Nukleinsäuren um das Protein wickeln. Mit römischen Ziffern sind die Positionen der einzelnen KH-Module in Vigilin gekennzeichnet. Die mutmaßlichen RNA-bindenden Regionen sind grün markiert, wobei der RNA-bindende Bereich des elften Moduls magenta hervorgehoben ist.

## 4.2 Ribosomales Protein L4

### 4.2.1 Reinigung von L4

Die Reinigung von rekombinant exprimiertem TmaL4 erfolgte mittels eines dreistufigen Protokolls (siehe Abb. 4-15). Nach Aufschluß der *E. coli* Zellen wurde der lösliche Überstand (Spur 2) auf 3 M LiCl pH 7,0 gebracht und für 20 min. auf 70°C erhitzt. Diese Prozedur führte zu einer selektiven Hitzedenaturierung und Präzipitierung vieler *E. coli* Proteine (Spur 4), während das thermophile TmaL4 im löslichen Überstand verblieb (Spur 3) und gegen 10 mM HEPES pH 7,0; 50 mM LiCl und 3 mM EDTA dialysiert wurde. Verbleibende Verunreinigungen von Proteinen und Nukleinsäuren wurden anschließend durch Chromatographie an einer DEAE-Säule (Spur 5) und einer Hydroxylapatitsäule (Spur 6 und 7) entfernt. Nach Austausch des Puffers auf 10 mM HEPES pH 7,0 konnte das Protein für Kristallisationsexperimente eingesetzt werden.



**Abb. 4-15:** 12 %iges Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Reinigungsschritte für TmaL4: 1) Marker, 2) Überstand der Lyse, 3) Überstand der Hitzedenaturierung, 4) Präzipitat der Hitzedenaturierung, 5) Vereinigte Fraktionen nach DEAE-Säule, 6) Vereinigte Fraktionen der Hydroxylapatitsäule 1µl, 7) Vereinigte Fraktionen der Hydroxylapatitsäule 2 µl

#### 4.2.2 Kristallisation

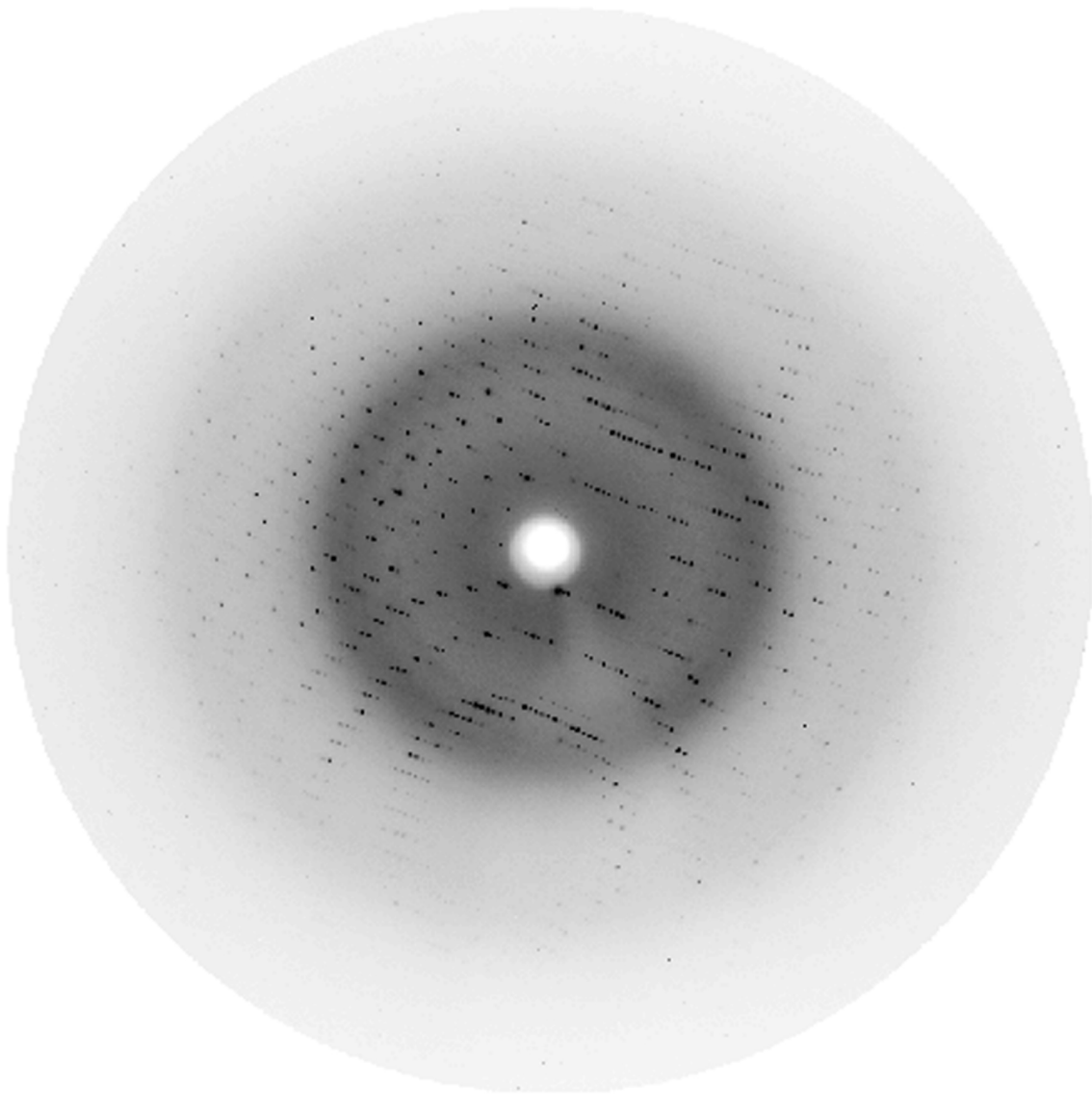
Für Röntgenbeugungsexperimente taugliche Kristalle wurden nach etwa 3 Wochen in sitzenden Tropfen aus dem *Hausfactorial-Screen* erhalten. Eine Verfeinerung des pH-Wertes und der Präzipitanzkonzentration führte dazu, daß größere Kristalle mit maximalen Dimensionen von etwa  $400 \times 200 \times 200 \mu\text{m}$  innerhalb von 3 bis vier Tagen wuchsen. Man mischte  $3 \mu\text{l}$  einer  $10 \text{ mg/ml}$  Proteinlösung in  $10 \text{ mM}$  HEPES pH 7,0 mit  $1,5 \mu\text{l}$  Reservoir, das 35-38 % (v/v) Polyethylenglycol PEG 400,  $0,2 \text{ M}$  Ammoniumacetat und  $0,1 \text{ M}$  Citrat pH 3,8-4,5 enthielt. Je nach Präparation kam es zu einer mehr oder minder großen Ausfällung von Protein, die sich nach einem Tag wieder auflöste.



**Abb. 4-16:** Aufnahme eines TmaL4-Kristalls mit einem Polarisationsfilter.

#### 4.2.3 Datensammlung und Strukturlösung mittels multiplen isomorphen Ersatzes

Ein nativer Datensatz bis  $2,5 \text{ \AA}$  Auflösung wurde auf einer *Imageplate* am Max-Planck-Institut aufgenommen. Am DESY in Hamburg wurde mit einem direkt aus dem Kristallisationstropfen gefrorenen Kristall eine Auflösung von  $1,7 \text{ \AA}$  erzielt (siehe Abb. 4-17) und ein kompletter Datensatz gesammelt. Da aufgrund stark reduzierter Expression von TmaL4 in NMM-Minimalmedium kein Selenomethionin-Derivat erhalten werden konnte,



**Abb. 4-17:** Rotationsaufnahme von  $1^\circ$ , aufgenommen am DESY in Hamburg mit einem nativen, gefrorenen Kristall auf einem CCD-Detektor. Die Auflösung am Detektorrand beträgt  $1,7 \text{ \AA}$  und die Wellenlänge  $\lambda=1,09 \text{ \AA}$ .

wurde eine konventionelle Suche nach Schweratomderivaten durchgeführt. Dabei konnte mit drei Schweratomlösungen eine Derivatisierung der Kristalle erreicht werden: Uranylacetat ( $\text{UO}_2\text{OAc}_2$ ), Pentafluorouranylat ( $\text{K}_3\text{UO}_2\text{F}_5$ ) und Hexachloroiridat(III) ( $\text{K}_3\text{IrCl}_6$ ). Das Iridiumderivat konnte erst erhalten werden, als die Kristallisationslösung gegen eine Stabilisierungslösung ausgetauscht wurde, die statt Citrat HEPES als Puffer enthielt. Citrat ist als Puffer für Derivatisierungen von Kristallen problematisch, da es als potentieller Ligand für viele Schweratomverbindungen dienen kann. Während die in die Uranylverbindungen eingelegten Kristalle Risse bekamen und neben erhöhter Mosaizität ihre Steukraft auf  $2,5 \text{ \AA}$

**Tabelle 4-3 A:** Datensammlungsstatistik

Datensatz	Auflösung (Å)	Vollständigkeit (%) <sup>b</sup>	R <sub>merge</sub> (%) <sup>a</sup>	I/σI	Konz. Metall (mM)	Dauer	Anzahl d. Positionen	Puffer
Nativ (RT)	2.50	92.8 (93.8)	6.0 (21.7)	15.5 (3.5)	-	-	-	-
Nativ (cryo)	1.70	92.8 (88.0)	5.4 (34.4)	25.9 (3.9)	-	-	-	-
UO <sub>2</sub> OAc <sub>2</sub> (RT)	3.33	85.6 (88.8)	9.8 (24.2)	9.1 (3.8)	14	33h	2	Citrat
UO <sub>2</sub> OAc <sub>2</sub> (cryo)	2.50	75.9 (75.0)	6.5 (35.3)	12.8 (3.1)	14	13d	2	Citrat
K <sub>3</sub> UO <sub>2</sub> F <sub>5</sub> (RT)	3.90	76.0 (75.3)	14.0 (39.8)	6.8 (2.7)	12	13d	1	Citrat
K <sub>3</sub> IrCl <sub>6</sub> (RT)	3.05	98.9 (92.2)	15.0 (49.1)	6.9 (2.9)	8	36h	2	HEPES
K <sub>3</sub> IrCl <sub>6</sub> (cryo)	1.70	97.8 (74.2)	5.6 (32.6)	23.8 (2.8)	8	36h	1	HEPES

**Tabelle 4-3 B:** Phasierungsstatistik

Datensatz	Phasing power <sup>c</sup>		R <sub>Cullis</sub> <sup>d</sup>	
	iso. <sup>e</sup>	ano. <sup>e</sup>	iso.	ano.
UO <sub>2</sub> OAc <sub>2</sub> (RT)	1.7	0.9	0.78	0.90
UO <sub>2</sub> OAc <sub>2</sub> (cryo)	1.2	1.1	0.82	0.86
K <sub>3</sub> UO <sub>2</sub> F <sub>5</sub> (RT)	1.2	0.9	0.90	0.89
K <sub>3</sub> IrCl <sub>6</sub> (RT)	1.5	0.8	0.74	0.84
K <sub>3</sub> IrCl <sub>6</sub> (cryo)	0.7	1.2	0.86	0.79

<sup>a</sup>  $R_{\text{merge}} = \sum |I_i - \langle I \rangle| / \sum I_i$ , wobei  $I_i$  eine individuelle Messung der Intensität ist und  $\langle I \rangle$  die gemittelte Intensität für diesen Reflex ist.

<sup>b</sup> Werte in Klammern bezeichnen die Statistiken für die höchste Auflösungsschale (0,3 Å)

<sup>c</sup>  $\text{Phasing power} = [\sum |F_H|^2 / \sum |E|^2]^{1/2}$  wobei E der *lack of closure* mit  $\sum |E|^2 = \sum \{ |F_{PH}|(\text{obs}) - |F_{PH}|(\text{calc}) \}^2$

<sup>d</sup>  $R_{\text{Cullis}} = \sum \left| \frac{(F_{PH} \pm F_P) - F_H(\text{calc})}{S |F_{PH} \pm F_P|} \right|$

$F_P$ ,  $F_{PH}$ , and  $F_H$  sind die Strukturfaktoren für das native Protein, das Derivat und für das Schweratom.

<sup>e</sup> iso. bezeichnet isomorph und ano. anomal.

RT heißt Raumtemperatur.

mit Synchrotronstrahlung verringert wurde, zeigten die mit der Iridiumverbindung derivatisierten Kristalle keinerlei Schaden, so daß am DESY ein Datensatz bis 1,7 Å Auflösung aufgenommen werden konnte.

Die Daten wurden analog zu NusA prozessiert (siehe Abschnitt 4.1.3). Für die MIRAS-Phasierung mit SHARP (de la Fortelle und Bricogne, 1997) wurden sowohl Cryo-Datensätze als auch bei Raumtemperatur am Max-Planck-Institut aufgenommene Datensätze für das Uranylacetat und Hexachloroiridat verwendet (siehe Tabelle 4-3 A und B). Von dem Pentafluorouranylat-Derivat konnte nur ein Datensatz bei Raumtemperatur aufgenommen werden.

#### 4.2.4 Modellbau und Verfeinerung

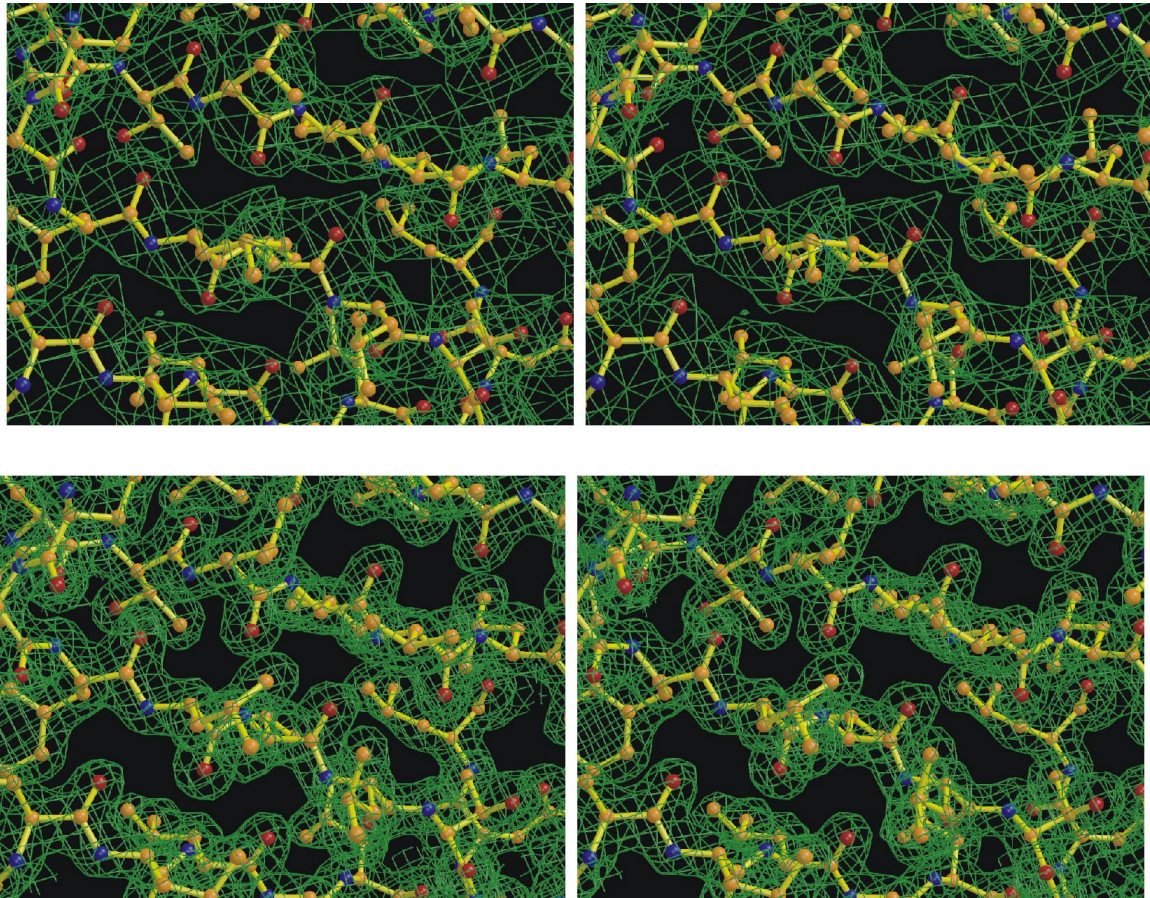
Die experimentelle Elektronendichte bei 2,5 Å erlaubte den Einbau eines anfänglichen Modells mit über 90% der Seitenketten (siehe Abb. 4-18). Während aller Stadien der Verfeinerung war für die interne Region zwischen den Aminosäuren Ser41 und Asp96 keine Elektronendichte sichtbar, so daß dieser Teil des Moleküls nicht im finalen Modell beinhaltet war. Eine flexible Loop-Region zwischen den Resten Asn186 und Gly191 zeigte auch für Hauptkettenatome schlecht definierte Elektronendichte. Teile dieses Bereich wurden während der Verfeinerung auf eine Besetzungszahl von 0 gesetzt. Es zeigte sich, daß die Konformation eines Teils dieses Loops durch ein Citratmolekül stabilisiert wird. Nachdem ein Modell für die sichtbaren Teile des Proteins eingebaut und die Auflösung auf 1,7 Å erhöht worden war, wurden Wasser an stereochemisch sinnvollen Positionen in positiven Differenzdichten eingebaut. Der freie R-Faktor konvergierte nach Verfeinerung von isotropen Temperaturfaktoren bei 23,7% (siehe Tabelle 4-4). Das finale Modell enthielt 172 Aminosäuren, 73% des gesamten Proteins, wobei sich 92,7% aller Aminosäuren in den am meist bevorzugten Regionen des Ramachandran-Plots befanden (Ramachandran, 1968) und der durchschnittliche Fehler in den Positionen der Atome 0,23 Å betrug (Luzzati, 1952).

**Tabelle 4-4:** Statistiken für das finale Modell

Auflösungsbereich (Å)	8.0-1.7
Sigma cutoff	2.0
Anzahl der Reflexe bei der Verfeinerung	22 806
Prozentsatz an Reflexen für die Berechnung des $R_{\text{frei}}$	5.0
Vollständigkeit der Daten im Auflösungsbereich	92.9
Anzahl der Proteinatome	1398
Anzahl der Wassermoleküle	213
Anzahl der Citratmoleküle	1
R-Faktor (%) <sup>a</sup>	20.8
Freier R-Faktor (%) <sup>b</sup>	23.7
r.m.s Abweichungen von idealen Werten	
Bindungslängen (Å)	0.009
Bindungswinkel (°)	1.51
dihedrale Winkel (°)	22.7
impropers Winkel (°)	0.98
durchschnittlicher B-Faktor der Hauptkette (Å <sup>2</sup> )	23.6
r.m.s Abweichung der Hauptkettenatome (Å <sup>2</sup> )	1.5
durchschnittlicher B-Faktor für Seitenketten (Å <sup>2</sup> )	28.6
r.m.s Abweichungen für B-Faktoren der Seitenketten (Å <sup>2</sup> )	2.8
Ramachandran plot:	
Reste in meist bevorzugten Regionen (%)	92.7
Reste in großzügig erlaubten Regionen (%)	7.3

<sup>a</sup> R-Faktor =  $\{\sum | |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| | \} / \sum |F_{\text{obs}}|$ ; <sup>b</sup> freier R-Faktor =  $\{\sum_T | |F_{\text{obs}}| - k |F_{\text{calc}}| | \} / \sum_T |F_{\text{obs}}|$   
wobei T das Testset ist.





**Abb. 4-18:** Stereoabbildung eines Teils des viersträngigen  $\beta$ -Faltblatts am C-Terminus des Proteins. Der obere Teil zeigt die experimentelle Elektronendichte bei 2,5 Å Auflösung und konturiert bei  $0,8\sigma$ . Der untere Teil zeigt die finale  $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$  Elektronendichte bei 1,7 Å und konturiert bei  $1,4\sigma$ .

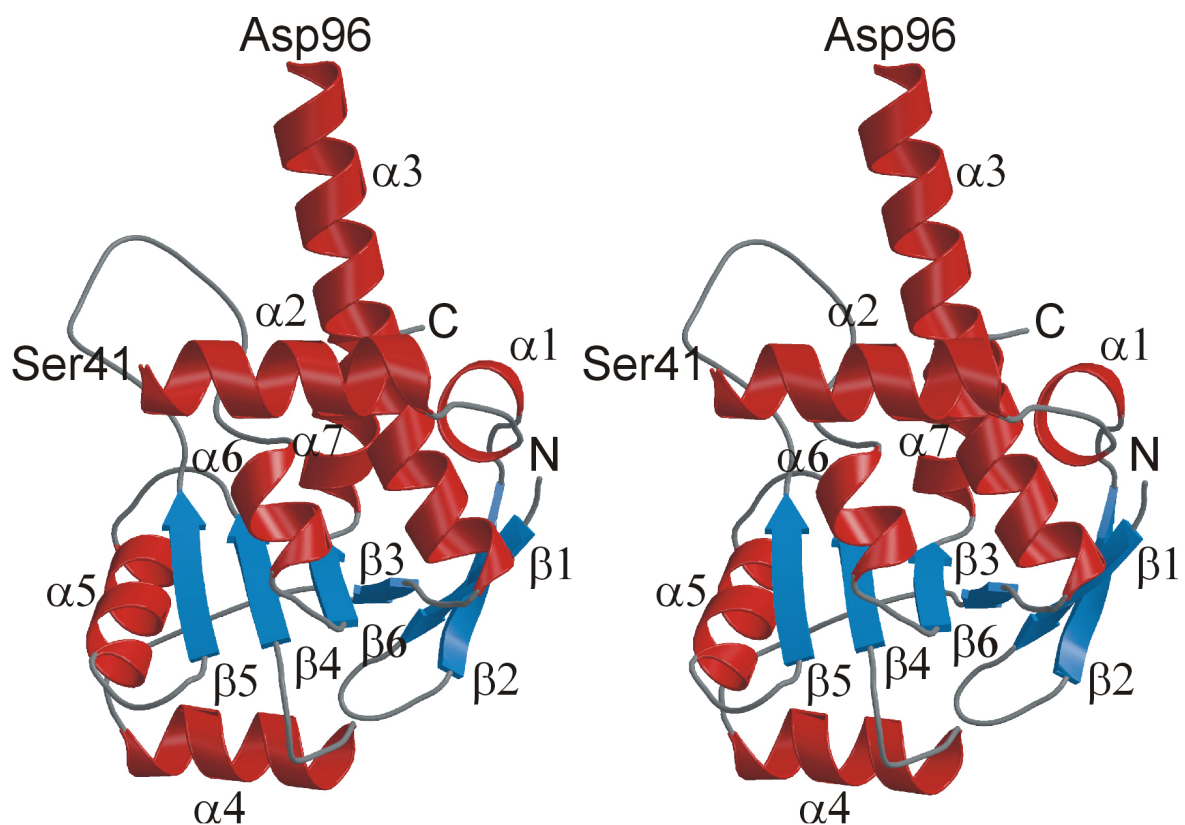
## 4.2.5 Kristallstruktur von L4

### 4.2.5.1 Übersicht über die Struktur

Mit einem Molekulargewicht von 26 630 Da gehört TmaL4 zu den größten ribosomalen Proteinen. Der Teil des Proteins, der durch die Elektronendichte definiert ist, hat ungefähre Ausmaße von  $50 \times 33 \times 30$  Å und zeigt eine  $\alpha/\beta$ -Faltung mit einem offenen  $\beta$ -Faltblatt (siehe Abb. 4-19). Trotz seiner verschiedenen Funktionen, die unterschiedlichen Bereichen des Moleküls zugeordnet werden konnten (Li *et al.*, 1996), besteht TmaL4 nur aus einer Domäne. Dies steht im Widerspruch zu der oft beobachteten Organisation größerer ribosomaler Proteine in mehrere Domänen. Abb. 4-20 zeigt die Abfolge der Sekundärstrukturelemente. Sieben  $\alpha$ -Helices sind um ein hauptsächlich paralleles  $\beta$ -Faltblatt gruppiert. Alle Helices sind



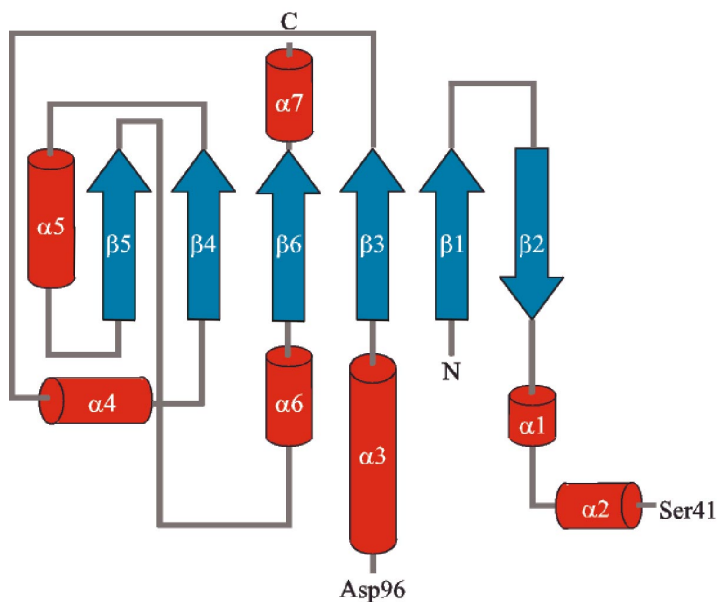
teilweise solvensexponiert und deshalb bipatisch, wobei alle hydrophoben Seitenketten in das Innere des Proteins zeigen. TmaL4 weist deshalb einen gut konservierten hydrophoben Kern auf, der die Faltung des Proteins stabilisiert. Das Zentrum des hydrophoben Kerns ist aus einem viersträngigen parallelen  $\beta$ -Faltblatt,  $\beta 3$  bis  $\beta 6$  aufgebaut. Die ersten beiden  $\beta$ -Stränge,  $\beta 1$  und  $\beta 2$ , befinden sich an der Peripherie des Proteins und bilden einen  $\beta$ -Hairpin, der nur durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rest des  $\beta$ -Faltblatts verbunden ist und fast senkrecht zu diesem steht.



**Abb. 4-19:** Stereoabbildung von TmaL4, die einen Überblick über die Faltung des Proteins gibt.  $\alpha$ -Helices sind rot,  $\beta$ -Faltblätter blau und Loop-Regionen grau eingefärbt. Zwischen Ser41 und Asp96 war keine Elektronendichte sichtbar.

Eine Besonderheit der Struktur ist ein 55 Aminosäuren umfassender Bereich (Ser41-Asp96) zwischen Helix  $\alpha 2$  und der langen gebogenen Helix  $\alpha 3$ , der keinerlei Elektronendichte aufweist (siehe Abb 4-19). Interessanterweise sagt das Sekundärstrukturvorhersageprogramm PHDsec (Rost und Sander, 1993) in erster Linie ungeordnete Loop-Bereiche für diese Region voraus. Der Rest der Struktur von TmaL4 wird korrekt von diesem Programm vorhergesagt (siehe Abb. 4-21). Kristalle von TmaL4 enthalten Protein mit voller Länge wie durch SDS-

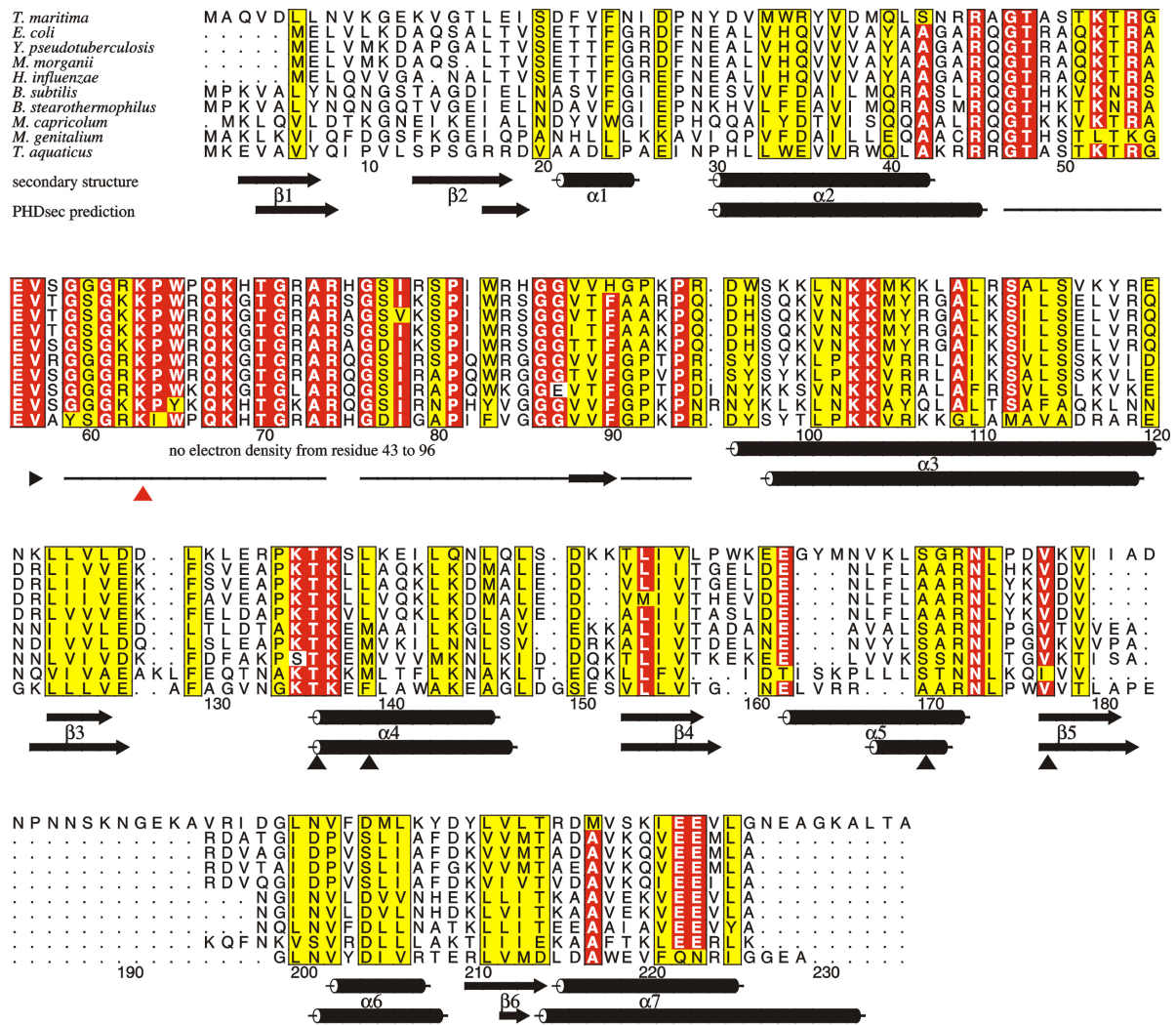
PAGE von aufgelösten Kristallen gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Auswertung von Circular dichroismus-Spektren nach der *self-consistent*-Methode (Sreerama und Woody, 1993) ergab, daß TmaL4 in Lösung 36 %  $\alpha$ -helikale, 13 %  $\beta$ -Faltblatt- und 13,6% *Turn*-Anteile aufweist. Dies stimmt gut mit den Prozentsätzen der einzelnen Sekundärstrukturelemente überein, die aus der Kristallstruktur berechnet wurden, wenn man davon ausgeht, daß die Region zwischen Ser41 und Asp96 ungeordnet ist (34,5%  $\alpha$ -Helices, 12,8%  $\beta$ -Faltblätter und 25% *turns*). In der Kristallpackung wurden große Lücken gefunden, die wahrscheinlich den ungeordneten Teil von TmaL4 fassen. All diese Beobachtungen lassen vermuten, daß ein großer interner Teil des Moleküls ungeordnet ist und nicht in einer gefalteten Konformation durch flexible Scharniere mit dem Rest des Proteins verbunden ist.



**Abb. 4-20:** Topologiediagramm von TmaL4. Die Farbkodierung der Sekundärstrukturelemente ist die gleiche wie in Abb. 4-19:

Die C-terminalen zwei Drittel des geordneten Teils von TmaL4, der der ungeordneten Region nachfolgt, bestehen aus einem viersträngigen parallelen  $\beta$ -Faltblatt, das von fünf Helices umgeben ist. Die Helices  $\alpha 6$  und  $\alpha 7$  stehen fast senkrecht zu der Achse von  $\alpha 5$  und zu der Ebene, die durch das viersträngige Faltblatt aufgespannt wird, wobei  $\alpha 7$  teilweise gegen die Helix  $\alpha 3$  packt. Zwischen dem  $\beta$ -Strang  $\beta 5$  und der Helix  $\alpha 6$  befindet sich eine zusätzliche ausgedehnte Loop-Region aus 20 hauptsächlich basischen Aminosäuren, die in anderen bakteriellen L4-Proteinen nicht vorhanden ist.

Die C-terminalen zwei Drittel des geordneten Teils von TmaL4, der der ungeordneten Region nachfolgt, bestehen aus einem viersträngigen parallelen  $\beta$ -Faltblatt, das von fünf Helices umgeben ist. Die Helices  $\alpha 6$  und  $\alpha 7$  stehen fast senkrecht zu der Achse von  $\alpha 5$  und zu der Ebene, die durch das viersträngige Faltblatt aufgespannt wird, wobei  $\alpha 7$  teilweise gegen die Helix  $\alpha 3$

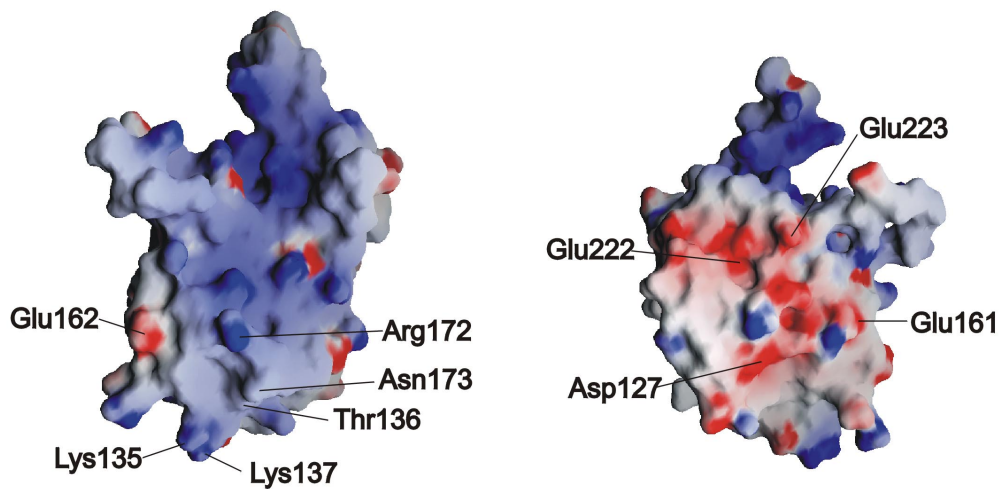


**Abb. 4-21:** Sequenzvergleich zwischen TmaL4 und repräsentativen Sequenzen von anderen Bakterien. Die Spezies sind: *Thermotoga maritima* (Nelson *et al.*, 1999), *Escherichia coli* (Zurawski und Zurawski, 1985), *Yersinia pseudotuberculosis* (Gross *et al.*, 1989), *Morganella morganii* (Zengel *et al.*, 1995), *Haemophilus influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995), *Bacillus subtilis* (Yasumoto *et al.*, 1996), *Bacillus stearothermophilus* (Herwig *et al.*, 1992), *Mycoplasma capricolum* (Ohkubo *et al.*, 1987), *Mycoplasma genitalium* (Fraser *et al.*, 1995) und *Thermus aquaticus* (Pfeiffer *et al.*, 1995). Der Sequenzvergleich wurde mit dem Programmen PILEUP und ALSRIPT (Barton, 1993) erstellt. Die Nummerierung bezieht sich auf TmaL4. Der Hintergrund von Resten, die in wenigstens 9 von 10 Spezies streng konserviert sind, sind rot eingefärbt. Aminosäuren mit Konservierungswerten > 5 (Livingstone und Barton, 1993) sind mit gelben Hintergründen gezeichnet. Die von dem Programm PHDsec (Rost und Sander, 1993) vorhergesagten Sekundärstrukturen sind ebenso gegeben wie die aus der Struktur mit dem Programm STRIDE (Frishman und Argos, 1995) berechneten Sekundärstrukturen. Vorhergesagte Loop-Regionen sind nur für den Ser41/Asp96-Bereich als horizontale Linien eingezeichnet. Reste, die wichtig für die regulatorische Funktion von L4 sind (Li *et al.*, 1996), sind durch schwarze Dreiecke markiert und die Aminosäure, die im Falle einer Mutation Resistenz gegen Erythromycin verleiht (Chittum und Champney, 1994), ist durch ein rotes Dreieck markiert.

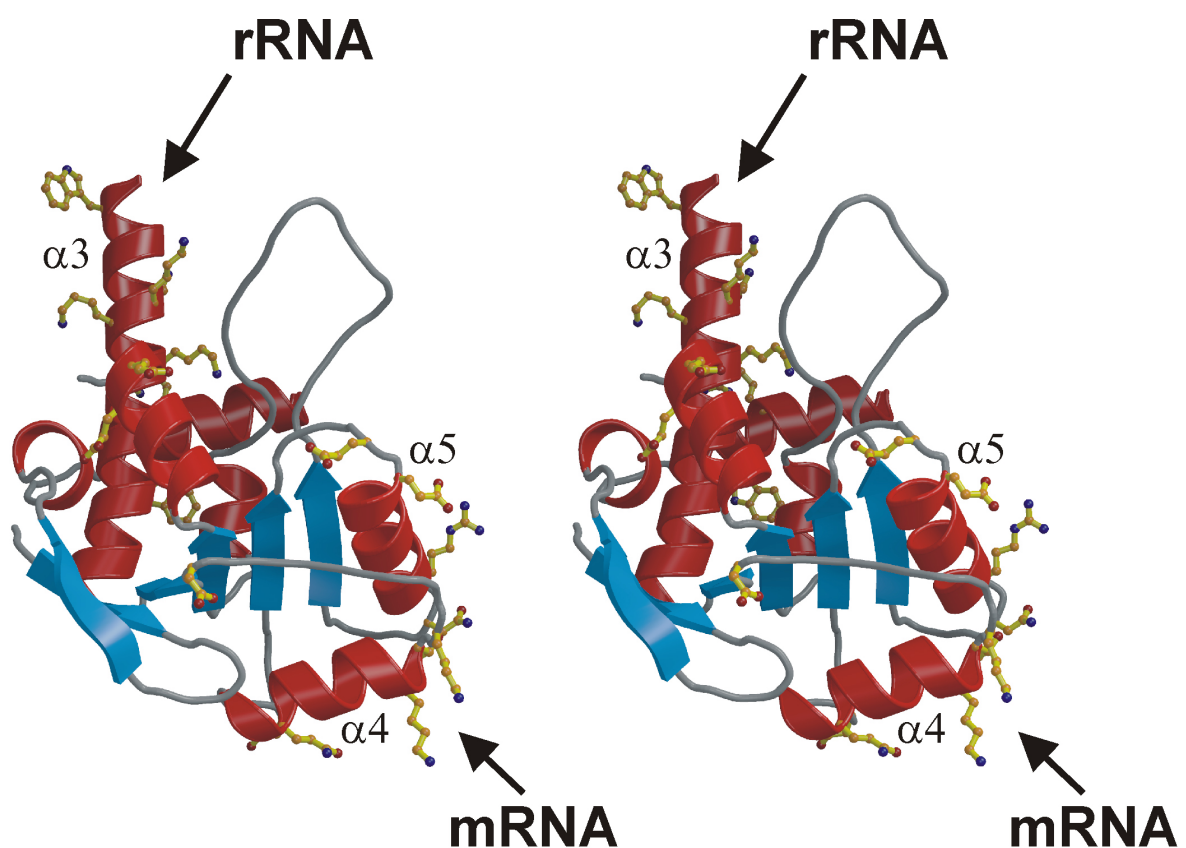
#### 4.2.5.2 Identifizierung der Bereiche mit verschiedenen Funktionen

Strukturelle Daten in Kombination mit einer Vielzahl von Primärsequenzen von r-Proteinen erlauben es, die Konservierungsschemata auf die Oberflächen der Proteine zu legen und auf diese Weise funktionell wichtige Bereiche, wie zum Beispiel rRNA-bindende Regionen, zu identifizieren (Davies *et al.*, 1998). Strukturen von r-Proteinen und r-Protein-RNA-Komplexen zeigen, daß Interaktion mit RNA durch basische Aminosäuren vermittelt wird, die das Zucker-Phosphat-Rückgrat der RNA kontaktieren oder durch aromatische Aminosäuren, die auf die RNA-Basen stapeln (Draper und Reynaldo, 1999; Liljas und Al-Karadaghi, 1997; Oubridge *et al.*, 1994; Ramakrishnan und White, 1998).

Bei Betrachtung des Oberflächenpotentials von TmaL4 fällt dessen Asymmetrie auf (siehe Abb. 4-22): Eine Seite ist stark positiv geladen und scheint für die Bindung mit rRNA vorbestimmt zu sein. Sie besteht aus Teilen der Helix  $\alpha 3$  (Lys99, Lys103, Lys104, Lys106 und Lys107), dem N-Terminus von  $\alpha 4$  (Lys135, Lys137 und Thr136), den solvensexponierten Bereichen von  $\alpha 5$  (Lys160, Lys168, Leu169, Arg172 und Asn173) und einigen Resten von  $\alpha 6$  (Lys207 und Phe203) und  $\beta 5$  (Lys178). Ein Sequenzvergleich zwischen verschiedenen L4-Homologen (siehe Abb. 4-21) zeigt, daß Lys178 und die Seitenketten von  $\alpha 6$  sehr variabel sind, während die meisten der anderen Aminosäuren konserviert sind. Ausgehend von diesen konservierten Aminosäuren läßt sich die mutmaßliche Kontaktfläche mit RNA in zwei räumlich getrennte Regionen einteilen (siehe Abb. 4-23). Der erste Bereich besteht aus dem N-Terminus von  $\alpha 3$ . Dem geht die ungeordnete 55 Reste lange Region voraus, die den am stärksten konservierten Teil aller bakteriellen L4 Proteine umfaßt und viele basische Seitenketten enthält (siehe Abb. 4-21). Deshalb liegt die Vermutung nahe, daß diese Loop-Region das zentrale Element der mit RNA interagierenden Oberfläche ist. Die zweite mutmaßliche RNA-bindende Region befindet sich um die beiden Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$ , die beinahe senkrecht zueinander orientiert sind (siehe Abb. 4-23). Interessanterweise entspricht der räumlichen Trennung dieser beiden RNA-bindenden Module eine Analyse des Proteins durch Mutagenese, die diesen beiden Regionen im *E. coli* L4 unterschiedliche Funktionen zuschreibt (Li *et al.*, 1996). Während die erste Region (Helices  $\alpha 2$  und  $\alpha 3$  und der dazwischen befindliche ungeordnete 43-96 Loop) anscheinend mit rRNA interagiert, wird der zweite Bereich um die Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  mit der Bindung an Boten-RNA in Verbindung gebracht.



**Abb. 4-22:** Elektrostatistisches Oberflächenpotential von TmaL4. Links ist die mutmaßliche RNA-bindende Oberfläche dargestellt. Rechts ist die stark negativ geladene, gegenüberliegende Seite des Moleküls dargestellt. Die Potentiale wurden mit dem Programm GRASP berechnet (Nicholls *et al.*, 1991).



**Abb. 4-23:** Stereoabbildung von TmaL4. Konservierte Seitenketten sind in *ball and stick* Darstellung gezeigt. Deutlich zu sehen ist die räumliche Trennung der beiden funktionellen Module des Proteins (Li *et al.*, 1996): Die lange Helix  $\alpha 3$  und Helix  $\alpha 2$  im Hintergrund bauen zusammen mit der nicht sichtbaren 55 Reste großen Loop-Region die Bindungsstelle für rRNA auf. Am C-Terminus befinden sich die beiden Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$ , die mit der Bindung zur mRNA in Verbindung gebracht werden.

Der mutmaßlichen RNA-bindenden Oberfläche gegenüber befindet sich eine hauptsächlich negative geladene Flanke (siehe Abb. 4-22). Sie besteht aus vielen konservierten Resten (Asp127, Glu161, Glu162, Glu222 und Glu223) und einigen nicht konservierten Seitenketten (Asp128 und Asp216). Die Seitenkette von Glu222 wechselwirkt mit der Amidbindung von Ser20 (Abstand 2,74 Å), aber die restlichen Aminosäuren sind nicht in Interaktionen mit anderen Resten involviert. Es ist aufgrund der Ladung sehr unwahrscheinlich, daß diese Seite von TmaL4 mit RNA wechselwirkt. Die Funktion der konservierten Reste war zum Zeitpunkt der Beendigung des Projekts nicht bekannt, aber es wurde vermutet, daß sie mit Proteinkomponenten des Transkriptions- oder Translationsapparates wechselwirken.

#### 4.2.5.3 Strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen

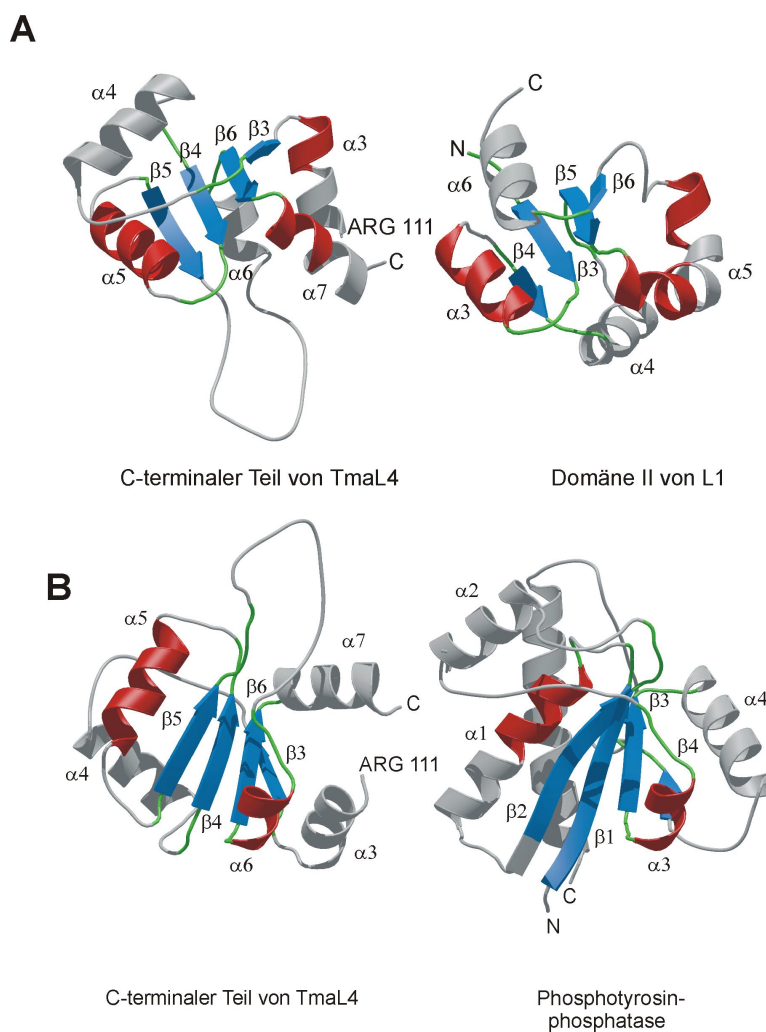
Ribosomen sind wahrscheinlich sehr alten Ursprungs (Draper und Reynaldo, 1999), so daß r-Proteine strukturelle Prototypen für nukleinsäurebindende Polypeptide darstellen könnten. In der Tat wurden Homologien zwischen r-Proteinen und bekannten DNA- und RNA-bindenden Motiven gefunden. Beispielsweise überlagern drei konservierte  $\alpha$ -Helices in L11 sehr gut mit den entsprechenden Bereichen von Homeodomänen DNA-bindenden Polypeptiden (Draper und Reynaldo, 1999; Xing *et al.*, 1997) und die beiden Domänen des r-Proteins L2 zeigen Homologie zu SH3-barrel und OB-Modulen (Nakagawa *et al.*, 1999).

Im Falle von TmaL4 wurde mit dem DALI-Programm (Holm und Sander, 1993) und der SCOP-Datenbank (Murzin *et al.*, 1995) nach strukturell homologen Proteinen gesucht. Es wurden viele Treffer, vor allem Proteine mit Mononukleotid-bindenden Motiven, gefunden. Da alle Proteine aber wesentlich größer waren als TmaL4 und die Ähnlichkeiten sich auf kleine Bereiche beschränkten, war es schwierig die Relevanz dieser Vergleiche zu beurteilen. Deshalb wurde eine manuelle Suche durchgeführt, die zeigte, daß Domäne II des r-Proteins L1 (Nikonov *et al.*, 1996) und eine kleine Phosphotyrosin-Protein-Phosphatase (PTPase) (Su *et al.*, 1994) homolog zum C-Terminus von TmaL4 sind. Wie auch bei den größeren Proteinen wurde die beste Übereinstimmung für das viersträngige parallele  $\beta$ -Faltblatt und für die Helices  $\alpha 5$  und  $\alpha 6$  von TmaL4 gefunden (siehe Abb. 4-24). Die *r.m.s.*-Abweichungen der C $\alpha$ -Atome der überlagerten Sekundärstrukturelemente beträgt 2,3 Å für Domäne II von L1 (47 überlagerte Reste) und 2,0 Å für die PTPase (56 überlagerte Reste). Die Bereiche des



Moleküls, die eine andere Orientierung aufwiesen, zeigten immer noch topologische Konservierung, zum Beispiel ist Helix  $\alpha_4$  in TmaL4 äquivalent zu Helix  $\alpha_6$  in L1 und zur längeren Helix  $\alpha_5$  in der PTPase.

Beide homologen Proteine zeigen allerdings von TmaL4 völlig verschiedene RNA-beziehungswise Phosphat-bindende Bereiche. L1 bindet wahrscheinlich rRNA zwischen der Kontaktfläche beider Domänen (Nikonov *et al.*, 1996), wobei das C-terminale Ende der Helix  $\alpha_{5L1}$  die konservierten Seitenketten für die Bindung zur RNA aufweist. Diese Reste entsprechen dem C-Terminus von Helix  $\alpha_3$  in TmaL4. Viele Seitenketten in diesem Bereich



**Abb. 4-24:** (A) Struktureller Vergleich zwischen dem C-Terminus von TmaL4 und der Domäne II von L1. Sich entsprechende Bereiche der Moleküle sind in gleicher Farbe gezeichnet. (B) Vergleich zwischen dem C-Terminus von TmaL4 und der Phosphotyrosin-Phosphatase. Die Farbkodierung ist die gleiche wie in (A).

sind in Interaktionen, hauptsächlich mit dem N-Terminus von TmaL4 involviert und stehen deshalb nicht für Bindung zur rRNA zur Verfügung. Die PTPase weist ein Phosphat-bindenden Loop-Motiv zwischen  $\beta_1$  und  $\alpha_1$  auf (siehe Abb. 4-24). Diese Region entspricht dem Loop zwischen  $\beta_4$  und  $\alpha_5$  in TmaL4, der keinerlei konservierte Primärsequenz innerhalb der Bakterien zeigt. Darüberhinaus ist die konservierte Aminosäure Glu161 Bestandteil der negativ geladenen Oberfläche, die nicht in RNA-Bindung involviert ist. Deshalb scheidet eine Beteiligung dieser Region an Interaktionen mit rRNA aus.

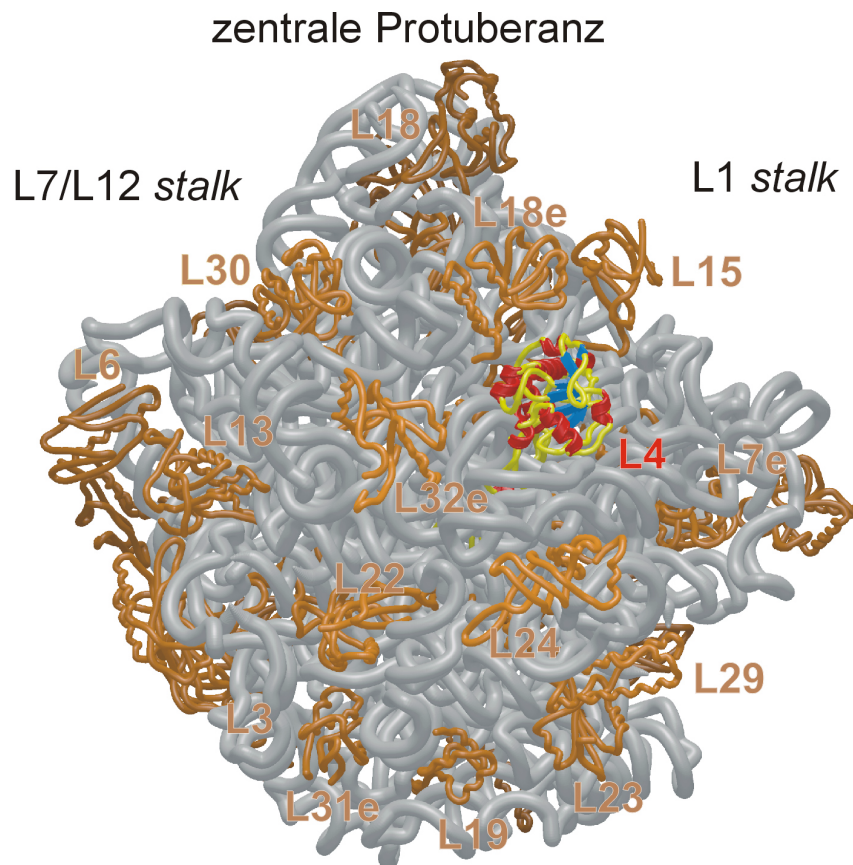
#### 4.2.6 Die 50S Untereinheit von *H. marismortui* und Vergleich von TmaL4 mit HmaL4

##### 4.2.6.1 Generelle Aspekte der 50S Struktur

Etwa ein halbes Jahr nachdem unsere Struktur von *Thermotoga maritima* L4 publiziert worden war, veröffentlichten Steitz und Mitarbeiter die Kristallstruktur der großen 50S Untereinheit des halophilen Archaeons *Haloarcula marismortui* bei 2,4 Å Auflösung (Ban *et al.*, 2000). Damit war die Grundlage geschaffen, lange diskutierte Probleme der Forschung am Ribosom, wie zum Beispiel die Frage, ob die Peptidyltransferaseaktivität vollkommen auf RNA-vermittelter Katalyse beruht oder einige r-Proteine doch daran beteiligt sind, und nicht zuletzt den katalytischen Mechanismus der Knüpfung der Peptidbindung, unter dem Licht einer detaillierten Struktur zu betrachten. Da kurz darauf auch zwei unabhängige Kristallstrukturen der kleinen 30S Untereinheit von *Thermus thermophilus* mit Auflösungen um 3 Å veröffentlicht wurden (Schluenzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000), bieten sich jetzt genaue Einblicke in das Ribosom in seiner Gesamtheit, die auch den Prozess der Dekodierung einschließt. Im folgenden sollen einige allgemeine Aspekte und die Konsequenzen, die sich aus der 50S Struktur für TmaL4 ergeben kurz diskutiert werden.

Die große 50S Untereinheit besteht zu zwei Dritteln aus rRNA, die sich in 23S und 5S rRNA unterteilt, und zu einem Drittel aus r-Proteinen. Sie katalysiert die Bildung der Peptidbindung und enthält das GTPase Zentrum des Ribosoms, das die Bindungsstelle für eine Reihe von GTP-bindenden Proteinen enthält, die während der Initiation, Elongation und Termination der Translation assistieren. Der Ribonukleoproteinkomplex bildet eine kompakte und monolithische Einheit mit Ausmaßen von etwa 250 Å in jede Raumrichtung, wobei etwa die Hälfte der sichtbaren 27 r-Proteine globuläre Rümpfe auf der Oberfläche aufweisen, aus denen Erweiterungen herausragen, die sich tief in die rRNA hineinschlängeln (siehe Abb. 4-25). Die Proteine befinden sich meist in Einbuchtungen der rRNA und verbrücken verschiedene RNA-Segmente und –Domänen miteinander, so daß, wie bereits vermutet wurde, die Faltung der rRNA stabilisiert wird.

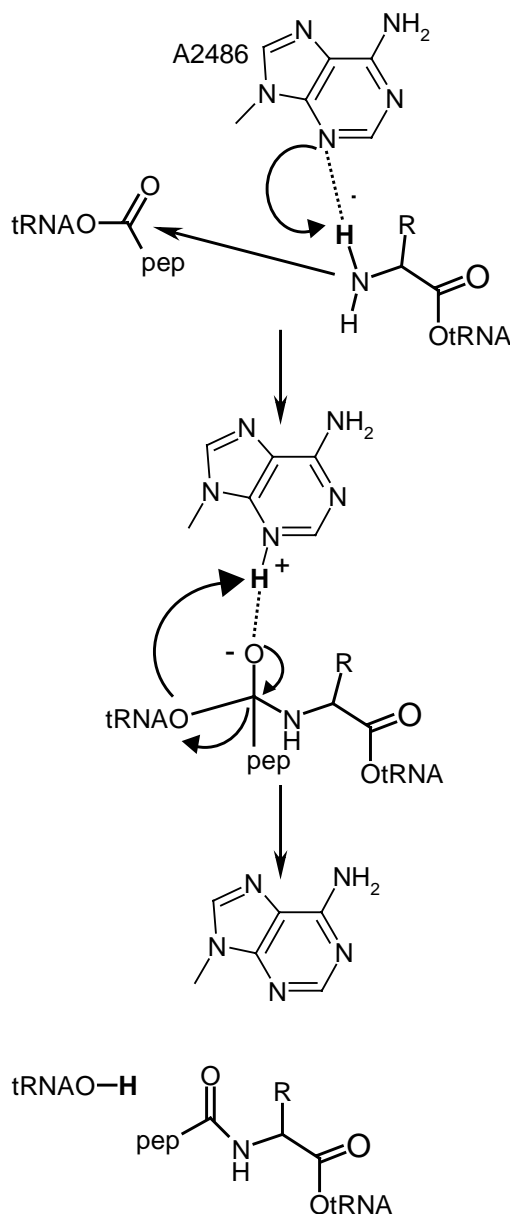




**Abb. 4-25:** Ansicht der Rückseite der 50S Untereinheit von *Haloarcula marismortui*. Die rRNAs sind als graue und die r-Proteine sind als braune Bänder dargestellt. L4 befindet sich zwischen der zentralen Protuberanz und dem L1 stalk, der in der Struktur nicht sichtbar ist, im hinteren Teil der 50S Untereinheit. Ebenso waren große Teile des sogenannten L7/L12 stalks, der das GTPase Zentrum enthält, in der Elektronendichte nicht zu sehen. Zum Teil sind die nichtglobulären Erweiterungen einiger r-Proteine zu erkennen, die in den kompakten Rumpf der rRNA hineinragen. Die Erweiterung e bei den Bezeichnungen einiger r-Proteine, bedeutet, daß es für diese Polypeptide nur Homologe bei Eukaryonten gibt.

Komplexe des 50S Partikels mit zwei Substratanalogen identifizierten das Peptidyltransferasezentrum (Nissen *et al.*, 2000). Es befindet sich im zentralen Loop der Domäne V der 23S rRNA in einem kompakt gefalteten Bereich, wobei in einem Umkreis von wenigstens 18 Å keine Proteine anzutreffen sind. Deshalb ist die Knüpfung der Peptidbindung eine gänzlich RNA-katalysierte Reaktion, das Ribosom ist also ein Ribozym. Im Umkreis von 3 Å um den Phosphoramididsauerstoff des Yarus-Inhibitors, der ein Analogon des Übergangszustandes der Peptidyltransferasereaktion ist, befindet sich nur das N3-Atom von Adenin 2486 (A2451 in *E. coli*). Dieses Nukleotid ist absolut konserviert in allen drei Organismenreichen und weist einen ungewöhnlich hohen pK<sub>a</sub>-Wert auf (Muth *et al.*, 2000). Dieser wird wahrscheinlich durch eine Ladungsübertragung, ähnlich wie bei den

Serinproteasen verursacht. Nissen *et al.* postulieren, daß die Knüpfung der Peptidbindung im Ribosom die Umkehrreaktion zum Acylierungsschritt ist, der bei der Hydrolyse von Peptidbindungen durch Serinproteasen auftritt (Nissen *et al.*, 2000). Dabei scheint A2486 als generelle Base zu wirken, deren N3 ein Proton von der  $\alpha$ -Aminogruppe der in der A-Stelle gebundenen Aminoacyl-tRNA abstrahiert und damit einen nukleophilen Angriff dieser Aminogruppe auf den Carbonylkohlenstoff der Peptidyl-tRNA ermöglicht. Das protonierte N3 stabilisiert dann den tetraedrischen Übergangszustand am Kohlenstoff. Durch Transfer des Protons auf die 3'-OH-Gruppe der Peptidyl-tRNA wird das neu synthetisierte Peptid deacyliert (siehe Abb. 4-26).

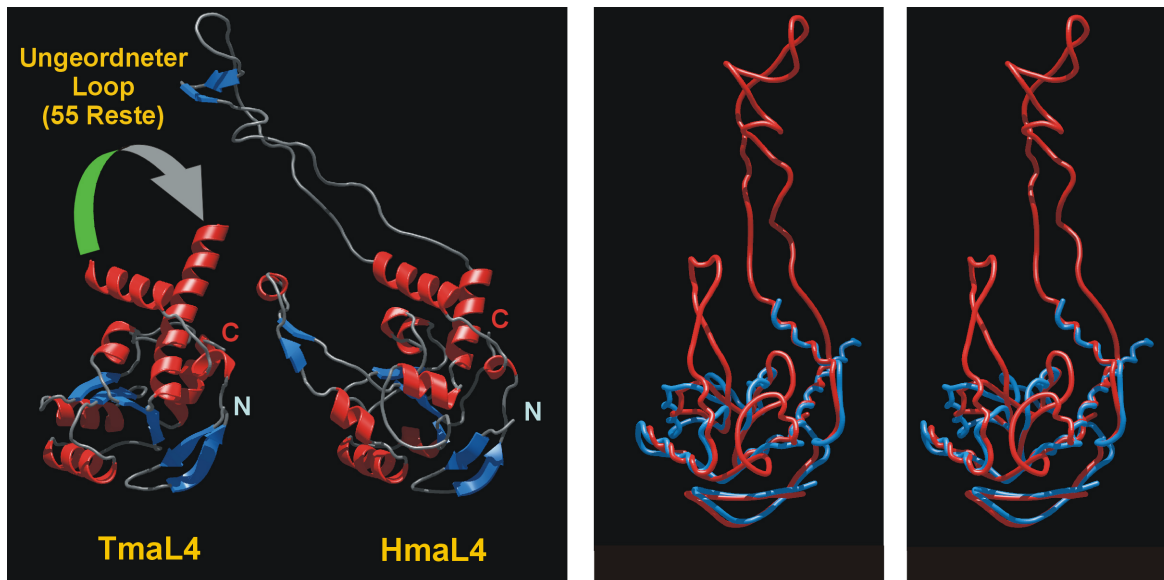


**Abb. 4-26:** Von Nissen *et al.* vorgeschlagener Mechanismus der Peptidyltransferasereaktion (Nissen *et al.*, 2000), bei dem ein Adenin als generelle Base wirkt. Adenin 2486 ist als Standardtautomer gezeichnet, könnte aber auch als Iminotautomer vorliegen, wobei die tatsächliche Ladungsverteilung wahrscheinlich dazwischen liegt. Zu Beginn abstrahiert das N3 von A2486 ein Proton von der  $\alpha$ -Aminogruppe der in der A-Stelle gebundenen Aminoacyl-tRNA. Das protonierte N3 stabilisiert den tetraedrischen Übergangszustand des Kohlenstoffs durch Wasserstoffbrückenbindung zum Oxyanion. Im letzten Schritt wird das Proton vom N3 abstrahiert und zum 3'-Ende der tRNA in der P-Stelle transferiert. Dadurch kann das neu gebildete Peptid deacyliert werden, was zu einer unbeladenen tRNA in der P-Stelle und einer Peptidyl-tRNA in der A-Stelle führt.

#### 4.2.6.2 Modell für die RNA-Bindung von TmaL4

Sowohl EcoL4 als auch TmaL4 zeigen nur schwache Sequenzhomologien zu ihren archaealen Homologen (24% beziehungsweise 28% zu *Haloarcula marismortui* L4). Da mit der 50S Struktur auch ein Modell für das *Haloarcula marismortui* L4 (HmaL4) zur Verfügung steht, wurde eine Überlagerung von TmaL4 mit diesem Protein durchgeführt. Sie ergab, daß trotz der geringen Sequenzhomologie eine große strukturelle Ähnlichkeit zwischen beiden Proteinen vorliegt, so daß 121 C $\alpha$ -Atome mit einer *r.m.s.*-Abweichung von 1,5 Å überlagern (siehe Abb. 4-27). Bei erster Betrachtung von HmaL4 fällt auf, daß es einen langen nichtglobulären „Finger“ aufweist der fast 60 Å in die rRNA hineinragt. Dieser Teil entspricht der 55 Reste langen Region in TmaL4 für die keine Elektronendichte erhalten werden konnte. Damit ist klar, daß dieser Bereich in der Tat sich bei Bindung an die rRNA ordnet und eine unübliche Konformation annimmt. Darüberhinaus enthält HmaL4 eine weitere Insertion von 25 Aminosäuren zwischen  $\alpha$ 4 und  $\beta$ 4, die nicht in TmaL4 vorhanden ist. Der zusätzliche Loop in TmaL4 zwischen  $\beta$ 5 und  $\alpha$ 6 findet keine Entsprechung in HmaL4. Da dieser Bereich auch in anderen bakteriellen L4-Proteinen nicht vorhanden ist, ist er somit spezifisch für das *Thermotoga maritima* Protein.

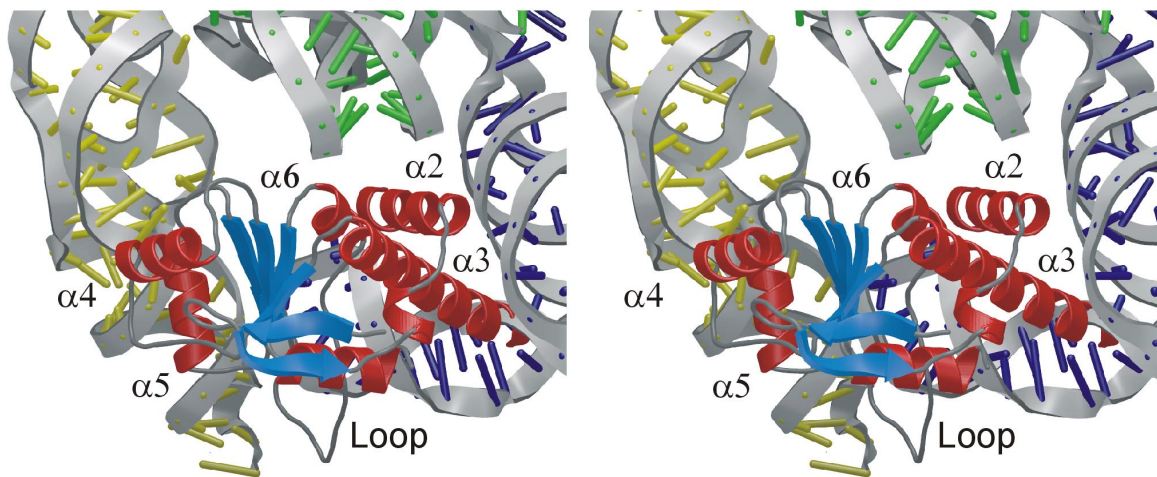
HmaL4 befindet sich im hinteren Teil der 50S Untereinheit, unterhalb der zentralen Protuberanz. Es wechselwirkt schwach mit den r-Proteinen L24, L18e und L37e, wobei die beiden letztgenannten Proteine keine Homologen in Bakterien aufweisen. Teile der Loop Region von L4 kleiden einen Tunnel aus, der sich über 100 Å durch die große Untereinheit zieht und wahrscheinlich die neu synthetisierte Polypeptidkette beherbergt. Mit seinem ausgedehnten „Finger“ nähert sich das Protein auch dem Peptidyltransferasezentrum bis auf etwa 22 Å und gehört damit neben L2, L3 und L10e zu einer Untergruppe von r-Proteinen, die dem aktiven RNA-Katalysezentrum bis auf maximal 18 Å nahekommen.



**Abb. 4-27:** Vergleich zwischen TmaL4 und HmaL4. Auf der linken Seite sind *ribbon* Darstellungen beider Proteine zu sehen. Rechts ist eine Stereoabbildung der Hauptketten beider Proteine zu sehen (TmaL4 blau; HmaL4 rot).

In Analogie zur Struktur von L4 sind auch dessen Interaktionspartner auf der rRNA gut konserviert. Die Regionen der rRNA in Domäne I und II, die mittels UV-Strahlung mit *E. coli* L4 vernetzt wurden, wechselwirken auch mit HmaL4. Allerdings unterschätzten diese Experimente das Ausmaß der Kontaktfläche zwischen L4 und rRNA. Vor allem der ausgedehnte „Finger“ machte unzählige Kontakte mit rRNA vor allem in Domäne I und II aber im untergeordneten Maße auch mit Domäne V. Passt man gemäß der Überlagerung TmaL4 in die Einbuchtung zwischen den rRNA-Segmenten von *Haloarcula marismortui* ein, so sieht man, daß der globuläre Rumpf des Proteins um die beiden Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  herum in der Tat den bereits erwähnten (siehe Abschnitt 2.3.2) Pseudoknoten in Domäne I kontaktiert (Nukleotide 326 bis 330) und der N-Terminus von Helix  $\alpha 2$ , um die in *E. coli* vernetzte Aminosäure herum (Tyr35) Domäne II (Nukleotide 674 bis 676 und 447 bis 449) kontaktiert (siehe Abb. 4-28). Die stabilisierende Funktion von L4 für die Faltung der rRNA wird auch dadurch deutlich, daß auf engstem Raum viele Kontakte gemacht werden. So bindet die kurze Helix  $\alpha 2$  auch rRNA Segmente in Domäne II, die über 600 Nukleotide von der anderen Bindungsstelle entfernt sind (Nukleotid 1348). Auch die Helix  $\alpha 6$  ist an Kontakten zu der gleichen Region in Domäne II beteiligt (Nukleotide 1307 bis 1309). Die lange gebogene Helix  $\alpha 3$  geht viele Kontakte zwischen den Positionen 664 bis 774 in Domäne II ein, wobei die Helix in TmaL4 länger ist als in HmaL4 und deshalb mit der rRNA kollidiert. In diesem Bereich scheint es daher leichte Unterschiede zwischen beiden L4-Proteinen und ihren RNA-

Liganden zu geben. Der nur in TmaL4 vorhandene Loop kontaktiert Domäne II (Nukleotide 669 bis 671). Deutlich ist zu erkennen (siehe Abb. 4-28), daß TmaL4 in erster Linie Interaktionen mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der rRNA macht und nur wenige Wasserstoffbrückenbindungen zu Basen ausbildet. HmaL4 passt aber genauso wie TmaL4 genau in die Lücken zwischen den einzelnen helikalen Bereichen der rRNA, so daß die zur RNA komplementäre Gestalt des Proteins bei der Erkennung seiner spezifischen Bindungsstellen sicherlich eine große Rolle spielt.



**Abb. 4-28:** Die Bindungsstellen von TmaL4 auf der rRNA von *Haloarcula marismortui*. Die Position von TmaL4 wurde durch Überlagerung mit HmaL4 erhalten. Deutlich ist zu sehen, daß das Protein bis auf die längere Helix  $\alpha 3$  sehr gut in die durch die verschiedenen rRNA Segmente geschaffenen Zwischenräume passt. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat der rRNA ist als graues Band gezeichnet, während die Basen als gelbe (Domäne I), blaue (Domäne II Nukleotide 648 bis 758) oder grüne Stäbe (Domäne II Nukleotide 1303 bis 1310 und 1345 bis 1351) dargestellt sind. Loop bezeichnet die TmaL4 spezifische Erweiterung, die Domäne II kontaktiert.

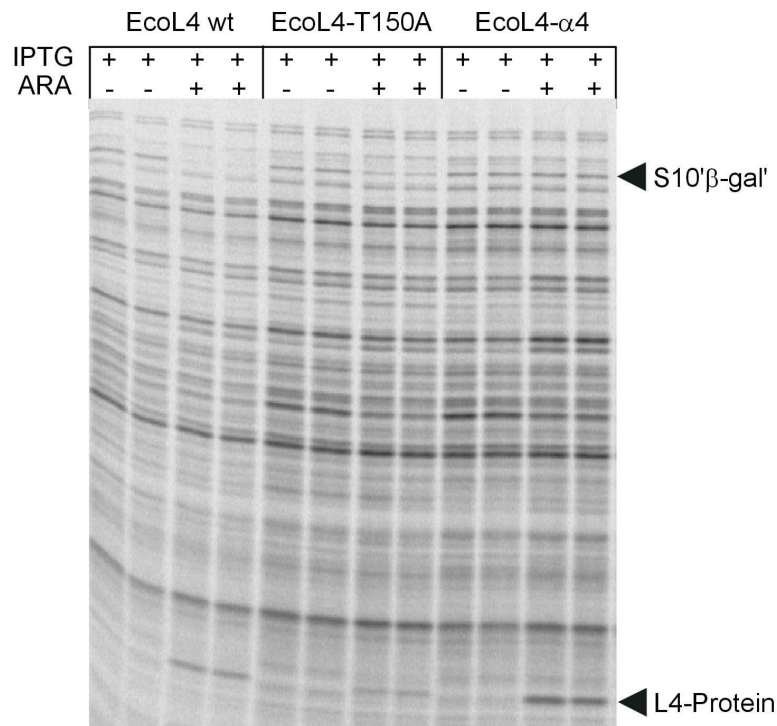
#### 4.2.7 Mutagenesestudien an EcoL4

Im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes an der University of Maryland, Baltimore County (UMBC) wurden anhand der von uns gelösten Kristallstruktur des ribosomalen Proteins L4 von *Thermotoga maritima* spezifische Mutationen in das homologe L4 aus *Escherichia coli* eingeführt und deren Effekt auf die regulatorische Aktivität des Proteins mit Hilfe des bereits beschriebenen Aktivitätstests (siehe Abschnitt 3.2.1.4) untersucht. Dadurch sollte Aufschluß über die räumliche Ausdehnung des regulatorischen Teils des Proteins gewonnen werden. Zu Beginn der Mutagenesestudie wurden Punktmutationen in den mutmaßlichen regulatorischen Bereich des Proteins um die Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  eingeführt. Da sich gleichzeitig herausstellte, daß TmaL4 nur etwa 15 % der regulatorischen Aktivität des EcoL4 Proteins aufweist, wurde

versucht, durch gezielte Mutationen in TmaL4 dessen regulatorische Aktivität zu steigern. Es wurden also zwei gegensätzliche Ansatzpunkte für die Untersuchung der Eigenschaften von EcoL4 gewählt:

1. Isolierung und Charakterisierung von spezifischen Mutationen in EcoL4, die dessen transkriptionale und/oder translationale Aktivität verringern oder sogar aufheben.
2. Einführung von Mutationen in TmaL4 mit dem Ziel, dessen regulatorische Aktivität zu erhöhen und der von EcoL4 anzugleichen.

Es wurden 15 Mutanten in EcoL4 und eine Mutante in TmaL4 erzeugt. Tabelle 4-5 zeigt eine Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse. Daraus wird ersichtlich, daß einzelne Punktmutationen in EcoL4 in der Regel nur minimale Auswirkungen auf das regulatorische Verhalten von EcoL4 hatten, das heißt, daß in den meisten Fällen die Punktmutanten vergleichbare Aktivität wie Wildtyp EcoL4 zeigten. Nur bei der A160F Mutante (in  $\alpha 5$ ) und T150A (in  $\beta 5$ ) wurden nach Induktion der jeweiligen L4 Variante fast die 10-fache bzw. 6-fache Menge an Reporterprotein exprimiert im Vergleich zum Wildtyp EcoL4. Darüberhinaus führten nur multiple Mutationen in den Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  zu einem Totalverlust der L4-Regulation (EcoL4- $\alpha 4$  und EcoL4- $\alpha 5$ ). Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der beiden nicht konsekutiven Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  für die Bindung zur Boten-RNA. Da die 50S Struktur von *Haloarcula marismortui* zeigt, daß im globulären Rumpf von L4 neben  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  auch noch  $\alpha 6$  am C-Terminus die rRNA kontaktiert (siehe oben), wurden auch in dieser Region multiple Mutationen eingeführt (EcoL4- $\alpha 6$ ), die zu einem Totalverlust von L4-vermittelter Regulation führten. Während des Forschungsaufenthalts wurde eine Deletionsmutante von *Bacillus stearothermophilus* L4 bekannt, die Erythromycin-Resistenz vermittelt (Wittmann-Liebold *et al.* unveröffentlichte Ergebnisse). Dabei wurde ein großer Teil der nichtglobulären Extension des Proteins, die aus dem globulären gut definierten Kern des Moleküls herausragt, deletiert (Aminosäuren 57 bis 82). Die entsprechende EcoL4 Mutante (EcoL4- $\Delta$ erythro) wurde erzeugt und es konnte gezeigt werden, daß diese Mutation die regulatorischen Eigenschaften des Moleküls nicht beeinflusst.



**Abb. 4-29:** Autoradiogramm eines 12% SDS-Gels. Gezeigt werden Zellextrakte nach Induktion des Reportergens S10'/β-gal' mit IPTG und nach Induktion der jeweiligen L4-Varianten mit Arabinose. Die Positionen des Reporterproteins und der L4-Proteine sind durch Dreiecke gekennzeichnet. Bei Induktion des wt-EcoL4 beispielsweise ist deutlich die Reprimierung des S10'/β'-gal-Reporterproteins zu erkennen, während bei der inaktiven Mutante EcoL4- $\alpha$ 4 praktisch keine Auswirkungen zu beobachten sind

Protein	Mutation(en)	S10'/ $\beta$ -gal' Synthese +L4/-L4	Lokalisierung der Mutation(en)
EcoL4-wt	wildtyp (wt)	0,10	-
EcoL4-P129A	P129A	0,17	N-Terminus von $\alpha$ 4
EcoL4-K130A	K130A	vergleichbar mit wt (Wert nicht bestimmt)	in $\alpha$ 4
EcoL4-T131A	T131A	0,13	in $\alpha$ 4
EcoL4-K132A	K132A	0,10	in $\alpha$ 4
EcoL4-T150A	T150A	0,38	in $\beta$ 5
EcoL4-L153F	L153F	0,08	nahe $\alpha$ 5
EcoL4-E155A	E155A	0,22	in $\alpha$ 5
EcoL4-F158A	F158A	0,12	in $\alpha$ 5
EcoL4-L159F	L159F	0,22	in $\alpha$ 5
EcoL4-A160F	A160F	0,78	in $\alpha$ 5
EcoL4-R162A	R162A	0,11	in $\alpha$ 5
EcoL4- $\alpha$ 4	P129A, K130A, T131A, K132A	1,08	in $\alpha$ 4
EcoL4- $\alpha$ 5	N159A, A164G, R165A, N166A	0,70	in $\alpha$ 5
EcoL4- $\alpha$ 6	V178F, S179D, I181A, A182F, F183A	0,93	in $\alpha$ 6
EcoL4- $\Delta$ erythro	K57 bis G82 deletiert	vergleichbar mit wt (Wert nicht bestimmt)	zentraler Bereich des ungeordneten Loops zwischen $\alpha$ 2 und $\alpha$ 3
TmaL4-wt	wildtyp	0,61	-
TmaL4- $\alpha$ 4/ $\alpha$ 5	K140A, E141Q, Q144K, Q147A, S149E, P158G, W159E, K160L, K151 und K152 deletiert	0,57	in $\alpha$ 4, $\alpha$ 5, $\beta$ 5

**Tabelle 4-5:** Regulatorische Eigenschaften verschiedener EcoL4 und TmaL4 Mutanten. Synthese des S10'/ $\beta$ -gal' Reporterproteins wurde vor und nach Induktion der verschiedenen L4 Mutanten durch Autoradiographie der Protein-Banden nach SDS-Gelelektrophorese ermittelt.



## 5. Diskussion

### 5.1 NusA

#### 5.1.1 Bindung an RNAP und andere Komponenten des Transkriptionsapparates

Die Fähigkeit von NusA, eine Pausierung, Termination oder Antitermination des Elongationskomplexes zu induzieren hängt von der Bindung des Proteins an RNAP ab. Eine Mutante, der die N-terminale Domäne fehlt, ist nicht in der Lage regulativ zu wirken (Mah *et al.*, 1999). NusA interagiert in Antiterminationskomplexen auch mit Protein N und NusB (Greenblatt und Li, 1981b). Protein *footprinting* (Traviglia *et al.*, 1999) und Bindungsstudien mit immobilisiertem NusA (Liu *et al.*, 1996) zeigten, daß das Protein die  $\beta$  und  $\beta'$  Untereinheiten der RNAP in Regionen kontaktiert, die mit der Bindungsstelle für  $\sigma^{70}$  überlappen. Wechselwirkungen mit den  $\alpha$ -Untereinheiten (Liu *et al.*, 1996) sind offensichtlich auf die C-terminale regulatorische Domäne von *ecoNusA* beschränkt (Mah *et al.*, 2000), die im *T. maritima* Homologen nicht vorhanden ist. Während alle Reste, die in der  $\beta'$ -Untereinheit von NusA kontaktiert werden, sich im N-terminalen Bereich des Polypeptids befinden, der in der *Thermus aquaticus* RNAP Struktur (Zhang *et al.*, 1999), wahrscheinlich aufgrund von Unordnung, nicht zu sehen ist, verteilen sich die kontaktierten Aminosäuren in der  $\beta$ -Untereinheit (Traviglia *et al.*, 1999) über einen Bereich von fast 90 Å. Um diese Distanz zu überbrücken, müßte NusA die stark elongierte Form annehmen, die in der Kristallstruktur zu sehen ist. In der Tat zeigten auch hydrodynamische Studien, daß NusA in Lösung wahrscheinlich eine langgestreckte Form aufweist (Gill *et al.*, 1991b). Als Konsequenz würden wahrscheinlich auch die RNA-bindenden S1- und KH-Motive in Kontakt mit RNAP kommen. Die kürzlich veröffentlichten Strukturen der kleinen 30S Untereinheiten des Ribosomes, zeigten, daß ribosomale Proteine über diese Module auch andere Proteine im Komplex kontaktieren (Schluenzen *et al.*, 2000; Wimberly *et al.*, 2000): Die N-terminale Helix des KH-Motivs in S3 wechselwirkt mit den r-Proteinen S14 und S10 (NusE) und die OB-Domäne von S17 weist einen erweiterten  $\beta$ -turn auf, der mit S12 wechselwirkt. Vor allem die Interaktion zwischen einem r-Protein mit einem KH-Modul und NusE ist interessant, wenn man in Betracht zieht, daß NusA und NusE beide Bestandteile der N-vermittelten und *rrn* Antiterminationskomplexe sind, obwohl eine direkte Wechselwirkung zwischen beiden Polypeptiden noch nicht nachgewiesen wurde.

Die auffällige Asymmetrie des elektrostatischen Oberflächenpotentials von NusA steht im Einklang mit einer gleichzeitigen Bindung an mRNA auf der einen Seite und RNAP und anderen Transkriptionsfaktoren auf der anderen Seite. Wechselwirkungen zu anderen Proteinen könnten über die Flanke mit gemischtem Potential vermittelt werden, die sich gegenüber der mutmaßlichen RNA-bindenden Region des Proteins befindet. Aufgrund der ausgedehnten Kontakte benötigt NusA möglicherweise keinen ausgeprägt positiv geladenen Bereich, um an die stark saure RNAP zu binden, wie es für den Transkriptionspaltungsfaktor GreA vorgeschlagen wurde (Stebbins *et al.*, 1995).

NusA induziert bei Bindung Konformationsänderungen in der RNAP (Zhang und Hanna, 1994). In Analogie dazu zeigt die Kristallstruktur eine hohe Flexibilität der N-terminalen Domäne, was eine gegenseitige Konformationsänderung beider Proteine bei Interaktion wahrscheinlich erscheinen läßt. Die hohe Beweglichkeit von wichtigen Regionen, die mit RNAP wechselwirken, stellt NusA in eine Linie mit anderen Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel  $\sigma^{70}$ , dem ebenfalls große Flexibilität nachgewiesen wurde (Malhotra *et al.*, 1996; Severinova *et al.*, 1996). Obwohl die Bindungsstellen von NusA und  $\sigma^{70}$  wahrscheinlich überlappen, gibt es keine offensichtliche strukturelle Ähnlichkeit zwischen der N-terminalen Domäne von NusA und den bisher bekannten RNAP-bindenden Regionen von  $\sigma^{70}$  (Malhotra *et al.*, 1996). Da bekannt ist, daß RNAP beim Eintritt in den Elongationszyklus große strukturelle Änderungen durchmacht und nach Freisetzung der  $\sigma$ -Faktoren NusA bindet, erscheint es möglich, daß vor allem der  $\sigma$ /NusA kontaktierende Bereich bei diesem Übergang seine Struktur verändert (Gill *et al.*, 1991a).

### 5.1.2 Kombination von sequenzspezifischer und –unspezifischer RNA-Bindung

Obwohl es vernünftig erscheint, daß NusA durch Bindung mit der Boten-RNA seine Funktionen ausübt, gibt es widersprüchliche Ergebnisse, was die RNA-Bindung des Proteins betrifft. Sequenzvergleiche zeigten, daß NusA Faltungsmotive enthält, die zu S1 und KH-Domänen homolog sind, Modulen, die in anderen Proteinen an der spezifischen wie auch unspezifischen Bindung an Nukleinsäuren beteiligt sind (Bycroft *et al.*, 1997; Dodson und Shapiro, 1997; Gibson *et al.*, 1993). Varianten beider Motive binden *boxA* der  $\lambda$ -*nut-site* oder kleine Haarnadelschleifen definierter Sequenz (Lewis *et al.*, 2000; Mogridge und Greenblatt, 1998). NusA konnte zwar in Transkriptionskomplexen an neu synthetisierte mRNA ohne Präferenz für bestimmte Sequenzen vernetzt werden (Liu und Hanna, 1995), aber Versuche,

*in vitro* RNA-Bindung von isoliertem NusA zu beweisen, lieferten nicht reproduzierbare Ergebnisse. So konnten Tsugawa und Kollegen bei Filterbindungsexperimenten zeigen, daß NusA Sequenzen kontaktiert, die stromaufwärts der *boxA*-Stelle liegen (Tsugawa *et al.*, 1985), andere Gruppen waren jedoch nicht in der Lage bei einer Vielzahl von biochemischen Experimenten wie zum Beispiel Gel-Shifts, dieses Ergebnis für das isolierte Polypeptid nachzuvollziehen (Mah *et al.*, 1999; Mogridge *et al.*, 1995). Nichtsdestotrotz ergaben sich Hinweise auf spezifische Bindung von RNA durch NusA in Antiterminationskomplexen (Das und Wolska, 1984; Horwitz *et al.*, 1987). Eine regulatorische Sequenz, die der  $\lambda$ -*boxA*-Stelle ähnelt, ist an der Antitermination in *rrn* Operons beteiligt (Aksoy *et al.*, 1984; Berg *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1984), bindet aber wahrscheinlich eher an ein Heterodimer aus NusB und NusE als an NusA (Nodwell und Greenblatt, 1993). Die meisten NusA kontrollierten regulatorischen Signale auf der mRNA, die zu einer verstärkten Termination der Transkription führen, bestehen aus G/C-reichen Haarnadelschleifen (Farnham *et al.*, 1982; Greenblatt und Li, 1981b). Es wurde gezeigt, daß KH-Domänen 4 bis 5 Nukleotide in einzelsträngigen Bereichen von Haarnadelschleifen erkennen können (Lewis *et al.*, 2000), so daß eine Interaktion zwischen den KH-Motiven von NusA und den oben genannten Sekundärstrukturen möglich erscheint. Obwohl es Hinweise gibt, daß NusA diese Strukturen stabilisiert (Artsimovitch und Landick, 1998), konnte keine direkte Bindung nachgewiesen werden.

Eine kürzlich erschienene Arbeit von Greenblatt und Mitarbeitern sorgte für eine teilweise Klärung dieser widersprüchlichen Ergebnisse (Mah *et al.*, 2000). Sie konnten zeigen, daß die C-terminale Domäne von *ecoNusA* autoinhibitorische Aktivität zeigt. Sie faltet sich offenbar zurück und bedeckt zumindest einen Teil der RNA-bindenden Motive des Proteins. Nach Deletion eines Teils dieses regulatorischen Bereichs konnte *in vitro* Bindung an die *nut-site* RNA nachgewiesen werden, wobei Mutationen in der *boxA* oder *boxB* Sequenz die Interaktion verhinderten (Mah *et al.*, 2000; Mogridge *et al.*, 1995), was für eine spezifische Erkennung der RNA spricht. Die  $\alpha$ -Untereinheit der RNAP und Protein N legen bei Bindung an die C-terminale Domäne von *ecoNusA* offenbar dessen RNA-bindende Regionen frei, so daß eine Interaktion mit der Boten-RNA erfolgen kann.

Die Kristallstruktur von *tmaNusA* sorgt für eine weitere Klärung bezüglich der RNA-bindenden Eigenschaften des Elongationsfaktors: Die Modelle für die RNA-Bindung von NusA, die anhand von bekannten Komplexstrukturen von isolierten homologen Motiven

erstellt wurden, sind besonders überzeugend, da die nukleinsäurebindenden Bereiche auch zugänglich sind, wenn die einzelnen Domänen in NusA eingebunden werden und nicht in Interdomänenkontakten involviert sind. Diese Strukturen legen nahe, daß NusA in der Lage ist sowohl spezifisch als auch unspezifisch RNA zu binden. Das ausgedehnte Band positiven Oberflächenpotentials erinnert an eine unspezifisch RNA-bindende Region, die eine Annäherung des Proteins an das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat erlaubt. Folgerichtig scheint die Ladungsverteilung dieser Region in allen NusA Homologen konserviert zu sein, obwohl die Sequenz variiert. Vermutlich markiert sie den Verlauf der Boten-RNA entlang des Moleküls und ermöglicht NusA, sie kontinuierlich nach regulatorischen Sequenzen abzutasten. Die Bewegung der mRNA entlang NusA wird dabei möglicherweise durch die fortschreitende Kettenverlängerung im aktiven Zentrum der RNAP während der Elongation ausgelöst. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß eine Deletion der N-terminalen Domäne ebenfalls die *in vitro* RNA-Bindung durch NusA verhindert (Mah *et al.*, 2000). Deshalb sind die positiv geladenen Regionen der Helices  $\alpha 1$  und  $\alpha 3$  wahrscheinlich ebenfalls an unspezifischer Interaktion mit der RNA beteiligt. Darüberhinaus wurde gezeigt, daß die Autoinhibierung von *eco*NusA durch eine negativ geladene Region am C-Terminus vermittelt wird (Mah *et al.*, 2000; Mogridge *et al.*, 1995), die sehr einfach die positiv geladene Flanke blockieren könnte.

Sequenzspezifische Wechselwirkung zur RNA wird in den S1- und KH-Modulen von NusA offenbar. Die RNA-bindende Region des ersten KH-Moduls befindet sich abseits von dem positiven Oberflächenpotential, was vermuten läßt, daß dieses Motiv nicht über das Zucker-Phosphat-Rückgrat unspezifisch mit der Boten-RNA interagiert. Der zusätzliche Loop könnte weitergehende sequenzspezifische Kontakte, abgesehen von der KH-typischen Fixierung der RNA zwischen dem HTH-Motif und dem variablen Loop (C-Terminus), ermöglichen. Die Affinität für die RNA-Liganden würde durch das zweite KH-Motiv weiter erhöht werden, das kooperativ die Bindung unterstützt. Deshalb scheint die erste KH-Domäne der beste Kandidat für spezifische Wechselwirkung mit RNA zu sein. Im Gegensatz dazu ist die zweite KH-Domäne in das positive Oberflächenpotential eingebettet und hat keinen zusätzlichen ausgedehnten Loop wie KH1. Es erscheint wahrscheinlich, daß das zweite KH-Motiv unspezifische Wechselwirkung mit RNA vermittelt, da sein gesamtes Aussehen dem der KH-Domäne des ribosomalen Proteins S3 ähnelt, das für unspezifische Interaktion mit mRNA verantwortlich ist (Schluenzen *et al.*, 2000; Urlaub *et al.*, 1995; Wimberly *et al.*, 2000).

Mutationen in der S1-Domäne lassen eine Beteiligung dieser Region an Antitermination vermuten. Eine Leu183Arg-Mutation im *E. coli* Protein führt dazu, daß das Protein nicht mehr die  $\lambda$ -*nut-site* binden kann (Friedman und Baron, 1974; Mah *et al.*, 2000). Zumindest die hydrophobe Eigenschaft dieser Aminosäure ist konserviert (Ile182 in *tmaNusA*) wobei sie Bestandteil des hydrophoben Kerns der S1-Domäne ist. Deshalb erscheint der Ersatz durch eine hydrophile Aminosäure die strukturelle Integrität der ganzen S1-Domäne zu stören. Eine zweite Mutation in *ecoNusA*, Arg199Ala, hebt ebenfalls die NusA vermittelte Antitermination auf (Mah *et al.*, 2000). Diese streng konservierte Aminosäure (Arg198 in *tmaNusA*) befindet sich an der Peripherie der S1-Domäne an der Kontaktfläche zwischen dem S1- und KH1-Motiv (siehe Abb. 4-12A) und ist an einer Reihe von wichtigen Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken zu anderen strikt konservierten Seitenketten, Asp170, Arg277 und Asp264 beteiligt. Bei Entfernung von Arg198 wird eindeutig die relative Orientierung beider RNA-bindenden Domänen zueinander destabilisiert und wahrscheinlich der kontinuierliche Verlauf der Region mit positiven Oberflächenpotential gestört. In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß die Kontaktfläche zwischen den beiden KH-Modulen ebenfalls durch viele streng konservierte Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten von Lys234 und Asn324 und Hauptkettenatomen von Ala288 und Ala286 stabilisiert wird (siehe Abb.4-12B). Es dürfte aufschlußreich sein, den Effekt von Mutationen in diesem Bereich auf die Aktivität von NusA zu untersuchen.

### 5.1.3 Stapelung der Domänen

Obwohl schon die Strukturen einer Reihe von isolierten S1- und KH-Domänen von Prokaryonten und Eukaryonten bestimmt wurden, ist in NusA zum ersten Mal die Anordnung von mehreren solcher Module zu sehen, was repräsentativ für eine Vielzahl von nukleinsäurebindenden Proteinen ist. Detailliertes Wissen über die Anordnung der Domänen ist eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Funktion dieser Polypeptide.

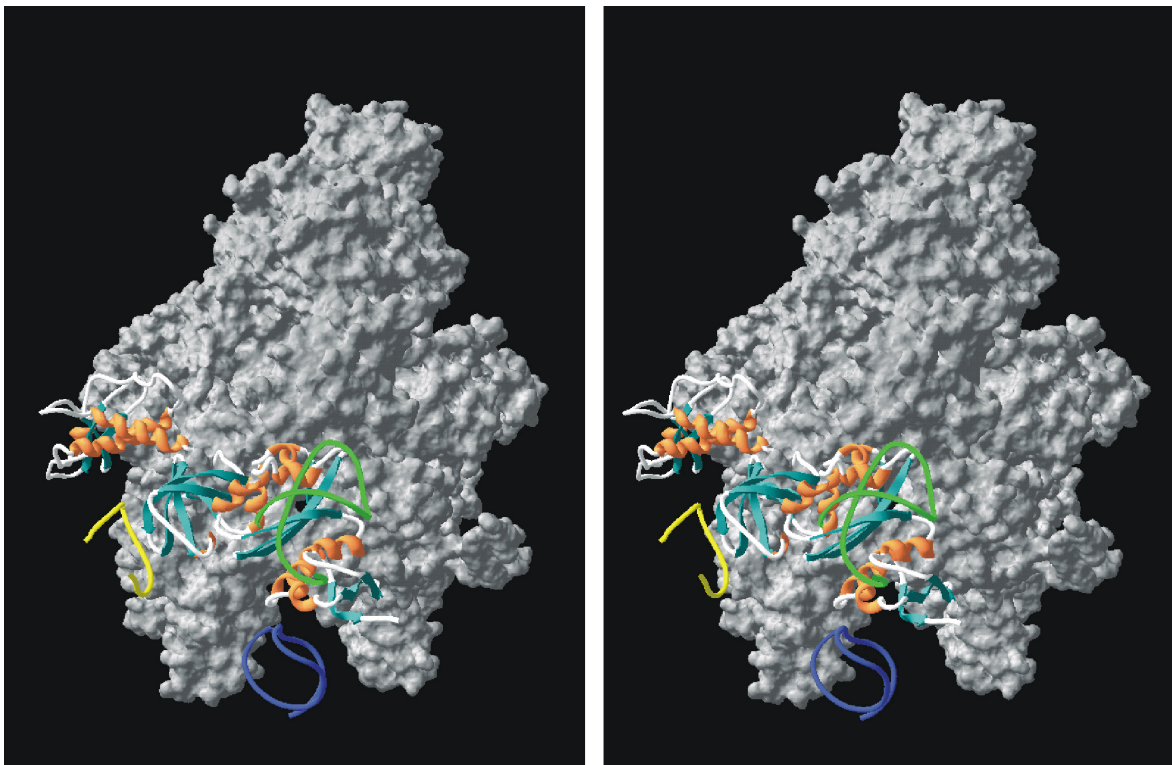
In den Kristallstrukturen von isolierten und RNA gebundenen NOVA KH-Monomeren (Lewis *et al.*, 1999; Lewis *et al.*, 2000) wechselwirken zwei Protomere in der asymmetrischen Einheit über ihre  $\alpha$ -helikalen Oberflächen, was einer KH1-KH2 Stapelung über die Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 8$  entsprechen würde. Diese Interaktion wurde auch als Modell für die Anordnung von KH-Domänen in Proteinen verstanden. Diese Orientierung bringt die N-Termini beider Motive nah zueinander, so daß die oft gefundenen kurzen verbrückenden Loop-Regionen

durch längere Bereiche ersetzt werden müßten. Trotz ihrer anderen Topologie können auch die NOVA-Monomere analog zu der in NusA beobachteten  $\alpha/\beta$  Stapelung orientiert werden, so daß eine direkte Verbindung zwischen den C- und N-Termini geschaffen wird. Darüberhinaus birgt die  $\alpha/\beta$ -Stapelung von NusA weitere Vorteile gegenüber der Anordnung der beiden NOVA-Monomere im Kristall: Die KH1-KH2 Kontaktfläche in NusA verdeckt  $1269 \text{ \AA}^2$ , während die NOVA-Kristallkontakte nur  $888 \text{ \AA}^2$  ausmachen. Zum anderen unterstützt die zweite KH-Domäne die erste bei der Bindung zur RNA, wie bereits besprochen. Eine solche Kooperativität ist bei dem nichtkristallographischen NOVA-Dimer nicht möglich, da die RNA-Liganden an den entgegengesetzten Enden des Komplexes binden. Abgesehen davon scheint die  $\alpha/\beta$ -Stapelung ein generelles Prinzip bei der Organisation mehrerer Module in Proteinen zu sein, da auch die S1-KH1-Wechselwirkung ein solches Schema aufweist. Daher könnte NusA auch als Modell für andere Proteine dienen, die aus S1- und KH- Modulen aufgebaut sind, wie zum Beispiel PNPase (Bycroft *et al.*, 1997).

#### 5.1.4 Modell für den Effekt von NusA auf die Elongation der Transkription

Die Kristallstruktur in Kombination mit biochemischen Daten legt die Vermutung nahe, daß NusA in permanentem Kontakt mit der RNAP während der Elongationsphase steht und ständig die mRNA nach regulatorischen Sequenzen abtastet (siehe Abb. 5-1). In der Tat überlappen einige durch *protein footprinting* identifizierte Regionen der RNAP, die NusA kontaktieren, auch mit Bereichen, die bei Abwesenheit des Elongationsfaktors mit mRNA vernetzt werden können (Mooney *et al.*, 1998; Traviglia *et al.*, 1999). Interessanterweise befindet sich die vernetzte Region der mRNA nur ungefähr 14 Nukleotide stromaufwärts von den neu synthetisierten Bereichen der Nukleinsäure, so daß vermutet werden kann, daß NusA nach dem Austritt der mRNA aus der RNAP in Aktion tritt. Der lange und kontinuierliche Bereich positiven Oberflächenpotentials erlaubt die Annäherung und Wechselwirkung mit mRNA beliebiger Sequenz über das Zucker-Phosphat-Rückgrat. Spezifische Erkennung von regulatorischen Haarnadelschleifen auf der Boten-RNA erfolgt vor allem über das erste KH-Modul, dessen einzigartige Mischung von Seitenketten direkte Interaktion mit den Basen der Nukleotide ermöglicht. In diesem Zusammenhang scheint es möglich, daß dieser Bereich von NusA auch die regulatorische Haarnadelschleife HE in der *leader*-Region des S10 Operons direkt kontaktiert, die essentiell für eine NusA-vermittelte Pausierung der RNAP ist (Zengel und Lindahl, 1994). Das zweite KH-Motiv unterstützt vielleicht nur die Ausrichtung der mRNA auf dem Protein. Das S1-Motiv könnte die mRNA nach regulatorischen Elementen

abtasten, die keine offensichtliche Sekundärstruktur aufweisen, wie zum Beispiel *boxA*. Kooperative Bindung der linear angeordneten RNA-bindenden Faltungsmotive an RNA könnte es NusA möglich machen, eine Vielzahl verschiedener regulatorischer Signale zu erkennen, die unter Umständen aus mehreren getrennten Bereichen bestehen könnten, wie die *boxA* und *boxB* Sequenzen der  $\lambda$ -*nut-site*. Es ist auch denkbar, daß NusA über seine zusätzlichen Protein-bindenden Eigenschaften die Assemblierung verschiedenster Transkriptionsfaktoren um Terminations/Antiterminations-Sequenzen herum steuert. Aufgrund seiner vielfältigen Aufgaben, die ein Zusammenspiel mit verschiedenen Komponenten zur Folge haben, sind wahrscheinlich Strukturen von physiologischen Transkriptionskomplexen nötig, um unzweideutig alle funktionellen Bereiche von NusA zu identifizieren.



**Abb. 5-1:** Stereodarstellung einer möglichen Orientierung von NusA auf der RNAP (Zhang *et al.*, 1999). RNAP ist als graue Oberfläche dargestellt. Die ungefähre mutmaßliche Position des Elongationsfaktors wurde aus den durch *protein footprinting* identifizierten Bereichen der RNAP  $\beta$ -Untereinheit, die mit NusA wechselwirken, abgeleitet (Traviglia *et al.*, 1999). Das Protein wurde so auf der Oberfläche positioniert, daß alle RNA-bindenden Bereiche weiterhin zugänglich sind und die N-terminale Domäne den größten, durch *footprinting* markierten Bereich, kontaktiert. Die RNA-Liganden der S1-Domäne sind als gelbes, die der KH1 als grünes und der KH2 Domäne als blaues Band dargestellt.

## 5.2 Ribosomales Protein L4

### 5.2.1 TmaL4 als struktureller Prototyp für EcoL4

Während eine Fülle von biochemischen und molekularbiologischen Daten für das *E. coli* Ribosom und seine einzelnen Komponenten vorhanden ist, sind die mesophilen *E. coli* Proteine und rRNA nur schwer zu kristallisieren. Detaillierte strukturelle Daten über das Ribosom wurden in erster Linie von extremophilen Organismen wie *Thermus thermophilus* oder *Haloarcula marismortui* erhalten. Es ist allgemein anerkannt, daß die ribosomalen Komponenten so hoch konserviert sind, daß das generelle Aussehen des Ribosoms sich in allen Organismenreichen sehr ähnelt. Eine Überlagerung der 23S rRNA von *Haloarcula marismortui* auf die 7,5 Å Cryo-Elektronenmikroskopie-Dichte der *E. coli* 50S Untereinheit (Matadeen *et al.*, 1999) zeigt, daß in erster Annäherung beide Strukturen sehr homolog sind (Brimacombe, 2000). Bei genauerer Betrachtung fällt allerdings auf, daß im Detail beide Strukturen in manchen Regionen voneinander abweichen, was auf eine Reihe von Insertionen und Deletionen in der rRNA zurückzuführen ist.

Das gleiche gilt auch für die r-Proteine. Von den 27 Proteinen, die in der *H. marismortui* 50S Untereinheit zu sehen sind, existieren für 12 Polypeptide keine bakteriellen sondern nur eukaryontische Homologe (Ban *et al.*, 2000). HmaL4 zeigt zwar klare strukturelle Ähnlichkeit zu TmaL4, aber abgesehen von der geringen Sequenzhomologie und den jeweils spezifischen Insertionen sind auch eine Reihe von Unterschieden in der Sekundärstruktur zu sehen. So ist beispielsweise der helikale Bereich  $\alpha 5$  von TmaL4 in HmaL4 nicht vorhanden, sondern durch eine Loop-Region (Aminosäuren 200 bis 207), die rRNA kontaktiert, ersetzt. Ebenso ist die Helix  $\alpha 6$  durch eine kürzere  $3_{10}$ -Helix (Reste 221-223) ausgetauscht. Beide Elemente von TmaL4 sind aber sehr wahrscheinlich im *E. coli* Protein vorhanden, wie die hohe Sequenzidentität zwischen EcoL4 und TmaL4 (42%) und das Sekundärstrukturvorhersageprogramm PHDsec (Daten nicht gezeigt) vermuten lassen. Zusätzlich war es möglich, TmaL4 in *E. coli* Ribosomen einzubauen (T. Allen, L.Lindahl und J. Zengel, unveröffentlichte Ergebnisse), was für eine hohe strukturelle Übereinstimmung zwischen beiden Proteinen spricht. Deshalb scheint TmaL4 ein besseres Modell für EcoL4 zu sein als HmaL4.



### 5.2.2 Bindung an ribosomale RNA

Sowohl die Kristallstruktur der 50S Untereinheit, als auch eine Reihe von biochemischen Experimenten haben die wichtigsten RNA-bindenden Regionen von L4 identifiziert. Das Protein scheint ähnlich wie zum Beispiel L14 (Davies *et al.*, 1996) eine hierarchische Ordnung von RNA-bindenden Modulen zu besitzen mit einer ausgedehnten primären Bindungsstelle und einem ziemlich kompakten sekundären Modul. Mutageneseexperimente (Li *et al.*, 1996) zeigten, daß Deletionen in Helix  $\alpha 3$  den Einbau des Proteins ins Ribosom verhindern. In Analogie dazu zeigt die 50S Struktur (Ban *et al.*, 2000), daß dieser helikale Bereich zusammen mit der langen ausgedehnten nichtglobulären Erweiterung und der vorangehenden Helix  $\alpha 2$  eine Vielzahl von Kontakten mit der rRNA macht. Aus diesen Gründen scheint diese Region die primäre rRNA-Bindungsstelle darzustellen. Auf der anderen Seite kontaktieren die helikalen Segmente  $\alpha 4$  bis  $\alpha 6$  im globulären c-terminalen Teil des Polypeptids ebenfalls rRNA. Li *et al.* konnten zeigen, daß Mutationen im Bereich der beiden nicht konsekutiven Helices  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  nicht die Assemblierung von L4 in ribosomale Partikel stören (Li *et al.*, 1996). Es erscheint daher wahrscheinlich, daß diese Bereiche die sekundäre Bindungsstelle von L4 repräsentieren, die im Vergleich zur primären nur untergeordnete Bedeutung für die Interaktion mit rRNA besitzt.

### 5.2.3 Regulatorische Eigenschaften von L4

Interessanterweise führen die letztgenannten Mutationen im C-Terminus zu EcoL4-Varianten, die nicht mehr in der Lage sind, sowohl Transkription als auch Translation des S10-Operons zu regulieren (Li *et al.*, 1996). Diese Entdeckung führte zur Identifizierung eines regulatorischen Moduls im C-terminalen Bereich von EcoL4, das wahrscheinlich innerhalb des pausierten Transkriptionskomplexes die Haarnadelschleifen HD und HE in der *leader*-Sequenz des S10-Operons kontaktiert (siehe Einleitung Abschnitt 2.3.2). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, daß EcoL4, gebunden an den Pseuknoten in Domäne I der 23S rRNA, der  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  kontaktiert, regulatorisch inaktiv ist (Zengel und Lindahl, 1993). Es scheint also eine Art konkurrierende Bindung zwischen der *leader*-mRNA Sequenz und der rRNA vorzuliegen. Der gleichzeitige Einsatz des regulatorischen Moduls als sekundäre Bindungsstelle für rRNA könnte erklären, warum die L4-Proteinkomponente des regulatorischen Apparates so gut konserviert ist und auch in L4-Homologen wie zum Beispiel *Pseudomonas aeruginosa* vorhanden ist, die in ihren jeweiligen Organismen nicht regulativ

tätig sind, während die RNA-Komponente der regulatorischen Sekundärstrukturen in der mRNA nur in einer kleinen Untergruppe der Proteobakterien vorhanden ist. Da die oben erwähnte Deletion in der Helix  $\alpha 3$ , die den Einbau von L4 ins Ribosom störte, dessen regulatorische Aktivität nicht beeinträchtigte, scheint das primäre rRNA-Bindungsmotiv nicht an der Wechselwirkung mit der mRNA beteiligt zu sein.

Zur weiteren Untersuchung des regulatorischen Bereichs von EcoL4 wurden Punktmutationen in  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$  und auch  $\alpha 6$ , das gemäß der 50S Struktur von *H. marismortui* (Ban *et al.*, 2000) ebenfalls rRNA bindet, eingeführt. Es zeigte sich, daß nur die gleichzeitige Veränderung von mehreren Aminosäuren zu einem Verlust der Kontrolle des S10-Operons führt. Da L4, multiple Kontakte mit rRNA macht, erscheint es wahrscheinlich, daß entsprechend ausgedehnte Kontakte zur mRNA ausgebildet werden, die nicht durch Veränderung einer einzigen Aminosäure aufgehoben werden können. Interessanterweise stellte sich heraus, daß TmaL4 das erste bakterielle L4-Protein ist, das eine stark veringerte regulatorische Aktivität im Vergleich zu EcoL4 aufweist. Da offenbar auch die Helix  $\alpha 6$  an der Reprimierung der Transkription und Translation des S10-Operons entscheidend beteiligt ist und dieser Bereich relativ große Sequenzvariabilität zeigt, läßt sich vermuten, daß dies der Grund für die veringerte Aktivität von TmaL4 ist. Ein weiterer Hinweis dafür ergibt sich aus der TmaL4 Mutante, bei der Aminosäuren in  $\alpha 4$  und  $\alpha 5$  zu der entsprechenden EcoL4 Sequenz mutiert wurden (TmaL4- $\alpha 4/\alpha 5$ ). Diese Mutante zeigt nur geringfügig bessere Regulation als wildtyp TmaL4, was darauf hindeutet, daß noch weitere Bereiche wichtig sind, möglicherweise eben  $\alpha$ -Helix  $\alpha 6$ . Weitere Mutagenese-Experimente sind geplant, um diese Hypothese zu überprüfen.

Die Beteiligung von  $\alpha 6$  an der Regulation wirft die wichtige Frage nach der dreidimensionalen Struktur der L4-Bindungspartner auf der mRNA auf. Die beiden aufeinanderfolgenden Haarnadelschleifen HD und HE müssen sich in eine Struktur falten, die effektiv mit dem Arrangement des Pseudoknotens in Domäne I und der  $\alpha 6$ -kontaktierten RNA-Helix in Domäne II der 23S rRNA um Bindung an L4 konkurriert. Dennoch ist keine offensichtliche Homologie zwischen der Faltung der rRNA und der Struktur der beiden Haarnadelschleifen HD und HE zu erkennen. Da aber wie oben besprochen die Komplementarität zwischen L4 und den Zwischenräumen, die durch die rRNA gebildet werden, wichtig zu sein scheint für die Bindung, müssen Ähnlichkeiten zwischen der mRNA und der rRNA vorhanden sein, die aus der Sekundärstruktur der beiden Haarnadelschleifen

nicht evident sind. Möglicherweise sind andere Proteinkomponenten des pausierten Transkriptionskomplexes wie beispielsweise NusA nötig, um die Faltung der beiden Haarnadelschleifen in eine komplexere Struktur zu stabilisieren. Es scheint beispielsweise möglich, daß NusA als permanenter Bestandteil der RNAP während des Elongationszyklus direkt mit der regulatorischen Haarnadelschleife HE wechselwirkt und so eine Konformationsänderung in der RNA induziert, die es L4 erlaubt die zweite Haarnadelschleife HD zu kontaktieren, die essentiell für die L4-vermittelte Kontrolle ist (Zengel und Lindahl, 1994). Da HmaL4 in der großen Untereinheit nur am Rande andere Proteine kontaktiert, ist es darüberhinaus wahrscheinlich, daß NusA oder die RNAP nicht mit L4 wechselwirken, sondern daß L4 mittels seiner ausgedehnten RNA-bindenden Oberflächen im pausierten Transkriptionskomplex gehalten wird. Dabei scheint die große und flexible Loop-Region im N-Terminus von L4, die der wichtigste Faktor für den Einbau in das Ribosom ist, keine Rolle zu spielen. Gerade dieses Paradoxon macht es nötig, weiter mit der strukturellen Untersuchung des S10-Operon-Transkriptionskomplexes und seiner Bestandteile fortzufahren.

## 6. Literaturverzeichnis

- Adhya, S. und Gottesman, M. (1978). Control of transcription termination; *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 967-96.
- Aksoy, S., Squires, C.L. und Squires, C. (1984). Evidence for antitermination in *Escherichia coli* rRNA transcription; *J. Bacteriol.*, **159**, 260-4.
- Allen, T., Shen, P., Samsel, L., Liu, R., Lindahl, L. und Zengel, J.M. (1999). Phylogenetic analysis of L4-mediated autogenous control of the S10 ribosomal protein operon; *J. Bacteriol.*, **181**, 6124-6132.
- Altieri, A.S., Mazzulla, M.J., Horita, D.A., Heath Coats, R., Wingfield, P.T., Das, A., Court, D.L. und Andrew Byrd, R. (2000). The structure of the transcriptional antiterminator NusB from *Escherichia coli*; *Nature Struct. Biol.*, **7**, 470-4.
- Amster-Choder, O. und Wright, A. (1992). Modulation of the dimerization of a transcriptional antiterminator protein by phosphorylation; *Science*, **257**, 1395-8.
- Antson, A.A., Dodson, E.J., Dodson, G., Greaves, R.B., Chen, X. und Gollnick, P. (1999). Structure of the *trp* RNA-binding attenuation protein, TRAP, bound to RNA; *Nature*, **401**, 235-42.
- Arnaud, M., Vary, P., Zagorec, M., Klier, A., Debarbouille, M., Postma, P. und Rapoport, G. (1992). Regulation of the *sacPA* operon of *Bacillus subtilis*: identification of phosphotransferase system components involved in SacT activity; *J. Bacteriol.*, **174**, 3161-70.
- Arndt, K.M. und Chamberlin, M.J. (1990). RNA chain elongation by *Escherichia coli* RNA polymerase. Factors affecting the stability of elongating ternary complexes; *J. Mol. Biol.*, **213**, 79-108.
- Artsimovitch, I. und Landick, R. (1998). Interaction of a nascent RNA structure with RNA polymerase is required for hairpin-dependent transcriptional pausing but not for transcript release; *Genes Dev.*, **12**, 3110-22.
- Baber, J.L., Libutti, D., Levens, D. und Tjandra, N. (1999). High precision solution structure of the C-terminal KH domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, a c-myc transcription factor; *J. Mol. Biol.*, **289**, 949-62.
- Babitzke, P., Stults, J.T., Shire, S.J. und Yanofsky, C. (1994). TRAP, the *trp* RNA-binding attenuation protein of *Bacillus subtilis*, is a multisubunit complex that appears to recognize G/UAG repeats in the *trpEDCFBA* and *trpG* transcripts; *J. Biol. Chem.*, **269**, 16597-604.

- Babitzke, P., Yealy, J. und Campanelli, D. (1996). Interaction of the trp RNA-Binding attenuation protein (TRAP) of *Bacillus subtilis* with RNA: effects of the number of GAG repeats, the nucleotides separating adjacent repeats, and RNA secondary structure; *J. Bacteriol.*, **178**, 5159-63.
- Bairoch, A. und Apweiler, R. (2000). The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000; *Nucleic Acids Res.*, **28**, 45-48.
- Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P.B. und Steitz, T.A. (2000). The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution; *Science*, **289**, 905-20.
- Baracchini, E. und Bremer, H. (1988). Stringent and growth control of rRNA synthesis in *Escherichia coli* are both mediated by ppGpp; *J. Biol. Chem.*, **263**, 2597-602.
- Baracchini, E. und Bremer, H. (1991). Control of rRNA synthesis in *Escherichia coli* at increased *rrn* gene dosage. Role of guanosine tetraphosphate and ribosome feedback; *J. Biol. Chem.*, **266**, 11753-60.
- Baron, J. und Weisberg, R.A. (1992). Mutations of the phage lambda nutL region that prevent the action of Nun, a site-specific transcription termination factor; *J. Bacteriol.*, **174**, 1983-9.
- Barton, G.J. (1993). ALSCRIPT a tool to format multiple sequences alignments; *Protein Eng.*, **6**, 37-40.
- Berg, K.L., Squires, C. und Squires, C.L. (1989). Ribosomal RNA operon anti-termination. Function of leader and spacer region box B-box A sequences and their conservation in diverse micro-organisms; *J. Mol. Biol.*, **209**, 345-58.
- Bogden, C.E., Fass, D., Bergman, N., Nichols, M.D. und Berger, J.M. (1999). The structural basis for terminator recognition by the Rho transcription termination factor; *Mol. Cell*, **3**, 487-93.
- Brendel, V., Hamm, G.H. und Trifonov, E.N. (1986). Terminators of transcription with RNA polymerase from *Escherichia coli*: what they look like and how to find them; *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **3**, 705-23.
- Brennan, R.G. (1992). DNA recognition by the helix-turn-helix motif; *Curr. Op. Struct. Biol.*, **2**, 100-108.
- Brimacombe, R. (2000). The bacterial ribosome at atomic resolution; *Structure*, **8**, R195-R200.
- Brünger, A.T.e.a. (1998). Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination; *Acta Crystallogr.*, **D 54**, 905-921.

- Budisa, N., Steipe, B., Demange, P., Eckerskorn, C., Kellermann, J. und Huber, R. (1995). High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogs 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in *Escherichia coli*; *Eur. J. Biochem.*, **230**, 788-96.
- Burgess, R.R., Travers, A.A., Dunn, J.J. und Bautz, E.K. (1969). Factor stimulating transcription by RNA polymerase; *Nature*, **221**, 43-6.
- Bycroft, M., Hubbard, T.J., Proctor, M., Freund, S.M. und Murzin, A.G. (1997). The solution structure of the S1 RNA binding domain: a member of an ancient nucleic acid-binding fold; *Cell*, **88**, 235-42.
- Carter Jr., C.W. (1990). Efficient factorial designs and the analysis of macromolecular crystal growth conditions; *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, **1**, 12-24.
- Carter Jr., C.W. und Carter, C.W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments; *J. Biol. Chem.*, **254**, 12219-12223.
- Castiglione Morelli, M.A., Stier, G., Gibson, T., Joseph, C., Musco, G., Pastore, A. und Trave, G. (1995). The KH module has an alpha beta fold; *FEBS Letters*, **358**, 193-8.
- Cavarelli, J., Rees, B., Ruff, M., Thierry, J.C. und Moras, D. (1993). Yeast tRNA(Asp) recognition by its cognate class II aminoacyl-tRNA synthetase; *Nature*, **362**, 181-4.
- Cerreti, D.P., Mattheakis, L.C., Kearny, K.R., Vu, K.R. und Nomura, M. (1988). Translational regulation of the *spc* operon in *Escherichia coli*. identification and structural analysis of the target site for S8 repressor protein; *J. Mol. Biol.*, **204**, 309-329.
- Chan, C.L. und Landick, R. (1989). The *Salmonella typhimurium his* operon leader region contains an RNA hairpin-dependent transcription pause site. Mechanistic implications of the effect on pausing of altered RNA hairpins; *J. Biol. Chem.*, **264**, 20796-804.
- Chattopadhyay, S., Hung, S.C., Stuart, A.C., Palmer, A.G., 3rd, Garcia-Mena, J., Das, A. und Gottesman, M.E. (1995). Interaction between the phage HK022 Nun protein and the nut RNA of phage lambda; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 12131-5.
- Chen, X., Court, D.L. und Ji, X. (1999). Crystal structure of ERA: a GTPase-dependent cell cycle regulator containing an RNA binding motif; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 8396-401.
- Chittum, H.S. und Champney, W.S. (1994). Ribosomal protein gene sequence changes in Erythromycin resistant mutants of *Escherichia coli*; *J. Bacteriol.*, **176**, 6192-6198.

- Clarke, N.D., Beamer, L.J., Goldberg, H.R., Berkower, C. und Pabo, C.O. (1991). The DNA binding arm of lambda repressor: critical contacts from a flexible region; *Science*, **254**, 267-70.
- Collaborative Computational Project, N. (1994). The CCP4 Suite: Programs for protein crystallography; *Acta Crystallogr.*, **D 50**, 760-763.
- Condon, C., French, S., Squires, C. und Squires, C.L. (1993). Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies; *EMBO J.*, **12**, 4305-15.
- Condon, C., Squires, C. und Squires, C.L. (1995). Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*; *Microbiol. Rev.*, **59**, 623-45.
- Cortes, A. und Azorin, F. (2000). DDP1, a heterochromatin-associated multi-KH-domain protein of *Drosophila melanogaster*, interacts specifically with centromeric satellite DNA sequences; *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 3860-9.
- Court, D.L., Patterson, T.A., Baker, T., Costantino, N., Mao, X. und Friedman, D.I. (1995). Structural and functional analyses of the transcription-translation proteins NusB and NusE; *J. Bacteriol.*, **177**, 2589-91.
- Cramer, P., Bushnell, D.A., Fu, J., Gnat, A.L., Maier-Davis, B., Thompson, N.E., Burgess, R.R., Edwards, A.M., David, P.R. und Kornberg, R.D. (2000). Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism; *Science*, **288**, 640-9.
- Dahlberg, A.E. (1989). The functional role of ribosomal RNA in protein synthesis; *Cell*, **57**, 525-529.
- Das, A. (1993). Control of transcription termination by RNA-binding proteins; *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 893-930.
- Das, A. und Wolska, K. (1984). Transcription antitermination *in vitro* by lambda N gene product: requirement for a phage nut site and the products of host nusA, nusB, and nusE genes; *Cell*, **38**, 165-73.
- Davies, C., Gerstner, R.B., Draper, D.E., Ramakrishnan, V. und White, S.W. (1998). The crystal structure of ribosomal protein S4 reveals a two-domain molecule with an extensive RNA-binding surface: one domain shows structural homology to the ETS DNA-binding motif; *EMBO J.*, **17**, 4545-58.
- Davies, C., White, S.W. und Ramakrishnan, V. (1996). The crystal structure of ribosomal protein L14 reveals an important organizational component of the translational apparatus; *Structure*, **4**, 55-66.

- de Crombrugge, B., Mudryj, M., DiLauro, R. und Gottesman, M. (1979). Specificity of the bacteriophage lambda N gene product (pN): nut sequences are necessary and sufficient for antitermination by pN; *Cell*, **18**, 1145-51.
- de la Fortelle, E. und Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement in the MIR and MAD methods; *Methods Enzymol.*, **276**, 472-494.
- Dickson, R.C., Abelson, J., Barnes, W.M. und Reznikoff, W.S. (1975). Genetic regulation: the Lac control region; *Science*, **187**, 27-35.
- Dijk, J. und Littlechild, J. (1979). Purification of ribosomal proteins from *Escherichia coli* under nondenaturing conditions; *Methods Enzymol.*, **59**, 481-502.
- Dodson, R.E. und Shapiro, D.J. (1997). Vigilin, a ubiquitous protein with 14 K homology domains, is the estrogen-inducible vitellogenin mRNA 3'-untranslated region-binding protein; *J. Biol. Chem.*, **272**, 12249-52.
- Draper, D.E. (1989). How do proteins recognize specific RNA sites? New clues from autogenously regulated ribosomal proteins; *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 335-338.
- Draper, D.E. und Reynaldo, L.P. (1999). RNA binding strategies of ribosomal proteins; *Nucleic Acids Res.*, **27**, 381-388.
- Drenth, J. (1994) Principles of Protein X-ray Crystallography. Springer Verlag, Heidelberg.
- Eiler, S., Dock-Bregeon, A., Moulinier, L., Thierry, J.C. und Moras, D. (1999). Synthesis of aspartyl-tRNA(Asp) in *Escherichia coli* --a snapshot of the second step; *EMBO J.*, **18**, 6532-41.
- Engh, R.A. und Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein-structure refinement; *Acta Crystallogr.*, **D 254**, 760-763.
- Farnham, P.J., Greenblatt, J. und Platt, T. (1982). Effects of NusA protein on transcription termination in the tryptophan operon of *Escherichia coli*; *Cell*, **29**, 945-51.
- Finkel, S.E. und Johnson, R.C. (1992). The Fis protein: it's not just for DNA inversion anymore; *Mol. Microbiol.*, **6**, 3257-65.
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M. und et al. (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd; *Science*, **269**, 496-512.
- Fraser, C.M., Gocayne, J.D., White, O., Adams, M.D., Clayton, R.A., Fleischmann, R.D., Bult, C.J., Kerlavage, A.R., Sutton, G., Kelley, J.M. und et al. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*; *Science*, **270**, 397-403.



- Freedman, L.P., Zengel, J.M., Archer, R.H. und Lindahl, L. (1987). Autogenous control of the S10 ribosomal protein operon of *Escherichia coli*: genetic dissection of transcriptional and posttranscriptional regulation; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6516-20.
- Friedman, D.I. (1992). Interaction between bacteriophage  $\lambda$  and its *Escherichia coli* host; *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **2**, 727-738.
- Friedman, D.I. und Baron, L.S. (1974). Genetic characterization of a bacterial locus involved in the activity of the N function of phage lambda; *Virology*, **58**, 141-8.
- Friedman, D.I., Sauer, A.T., Baumann, M.R., Baron, L.S. und Adhya, S.L. (1981). Evidence, that ribosomal protein S10 participates in the control of transcription termination; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1115-1118.
- Friedmann, D.I., Baumann, M. und Baron, L.S. (1976). Cooperative effects of bacterial mutations affecting lambda N gene expression; *Virology*, **73**, 119-127.
- Frishman, D. und Argos, P. (1995). Knowledge-based protein secondary structure assignment; *Proteins*, **23**, 566-79.
- Gaal, T., Barkei, J., Dickson, R.R., deBoer, H.A., deHaseth, P.L., Alavi, H. und Gourse, R.L. (1989). Saturation mutagenesis of an *Escherichia coli* rRNA promoter and initial characterization of promoter variants; *J. Bacteriol.*, **171**, 4852-61.
- Geiselman, J., Wang, Y., Seifried, S.E. und von Hippel, P.H. (1993). A physical model for the translocation and helicase activities of *Escherichia coli* transcription termination protein Rho; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7754-8.
- Georgopoulos, C.P., Swindle, J., Keppel, F., Ballivet, M., Bisig, R. und Eisen, H. (1980). Studies on the *E. coli* groNB (nusB) gene which affects bacteriophage lambda N gene function; *Mol. Gen. Genet.*, **179**, 55-61.
- Gibson, T.J., Thompson, J.D. und Heringa, J. (1993). The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid; *FEBS Letters*, **324**, 361-6.
- Gill, S.C., Weitzel, S.E. und von Hippel, P.H. (1991a). *Escherichia coli* sigma 70 and NusA proteins. I. Binding interactions with core RNA polymerase in solution and within the transcription complex; *J. Mol. Biol.*, **220**, 307-24.
- Gill, S.C., Yager, T.D. und von Hippel, P.H. (1991b). *Escherichia coli* sigma 70 and NusA proteins. II. Physical properties and self-association states; *J. Mol. Biol.*, **220**, 325-33.
- Gopal, B., Haire, L.F., Cox, R.A., Jo Colston, M., Major, S., Brannigan, J.A., Smerdon, S.J. und Dodson, G. (2000). The crystal structure of NusB from *Mycobacterium tuberculosis*; *Nature Struct. Biol.*, **7**, 475-8.

- Gosink, K.K., Ross, W., Leirmo, S., Osuna, R., Finkel, S.E., Johnson, R.C. und Gourse, R.L. (1993). DNA binding and bending are necessary but not sufficient for Fis-dependent activation of *rrnB* P1; *J. Bacteriol.*, **175**, 1580-9.
- Grayhack, E.J., Yang, X.J., Lau, L.F. und Roberts, J.W. (1985). Phage lambda gene Q antiterminator recognizes RNA polymerase near the promoter and accelerates it through a pause site; *Cell*, **42**, 259-69.
- Green, R. und Noller, H.F. (1997). Ribosomes and translation; *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 679-716.
- Greenblatt, J. und Li, J. (1981a). Interaction of the sigma factor and the nusA gene protein of *E. coli* with RNA polymerase in the initiation-termination cycle of transcription; *Cell*, **24**, 421-8.
- Greenblatt, J. und Li, J. (1981b). The nusA gene protein of *Escherichia coli*. Its identification and a demonstration that it interacts with the gene N transcription anti-termination protein of bacteriophage lambda; *J. Mol. Biol.*, **147**, 11-23.
- Gribskov, M. (1992). Translational initiation factors IF-1 and eIF-2 alpha share an RNA-binding motif with prokaryotic ribosomal protein S1 and polynucleotide phosphorylase; *Gene*, **119**, 107-11.
- Gross, U., Chen, J.H., Kono, D.H., Lobo, J.G. und Yu, D.T. (1989). High degree of conservation between ribosomal proteins of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*; *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3601-2.
- Guex, N. und Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling; *Electrophoresis*, **18**, 2714-23.
- Gulle, H., Hoppe, E., Osswald, M., Greuer, B., Brimacombe, R. und Stöffler, G. (1988). RNA-protein cross-linking in *Escherichia coli* 50 S ribosomal subunits, determination of sites on 23 S RNA that are cross-linked to proteins L2, L4, L24, and L27 by treatment with 2-iminothiolane; *Nucleic Acids Res.*, **16**, 815-832.
- Gusarov, I. und Nudler, E. (1999). The mechanism of intrinsic transcription termination; *Mol. Cell*, **3**, 495-504.
- Guss, J.M., Merritt, E.A., Phizackerley, R.P., Hedman, B., Murata, M., Hodgson, K.O. und Freeman, H.C. (1988). Phase determination by multiple-wavelength x-ray diffraction: crystal structure of a basic "blue" copper protein from cucumbers; *Science*, **241**, 806-11.

- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. und Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter; *J. Bacteriol.*, **177**, 4121-30.
- Hampl, H., Schulze, H. und Nierhaus, K.H. (1981). Ribosomal components from *Escherichia coli* 50 S subunits involved in the reconstitution of peptidyltransferase activity; *J. Biol. Chem.*, **256**, 2284-2288.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids; *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-80.
- Harker, D. (1956). The determination of the phases of the structure factors on non-centrosymmetric crystals by the method of the double isomorphous replacement; *Acta Crystallogr.*, **9**, 1-9.
- Helmann, J.D. und Chamberlin, M.J. (1988). Structure and function of bacterial sigma factors; *Annu. Rev. Biochem.*, **57**, 839-72.
- Hendrickson, W.A., Smith, J.L., Phizackerley, R.P. und Merrit, E.A. (1988). Crystallographic structure analysis of lampreyhemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation; *Proteins*, **4**, 77-88.
- Henkin, T.M. (1996). Control of transcription termination in prokaryotes; *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 35-57.
- Henkin, T.M. (2000). Transcription termination control in bacteria; *Curr. Op. Microbiol.*, **3**, 149-53.
- Henthorn, K.S. und Friedman, D.I. (1996). Identification of functional regions of the Nun transcription termination protein of phage HK022 and the N antitermination protein of phage gamma using hybrid nun-N genes; *J. Mol. Biol.*, **257**, 9-20.
- Herwig, S., Kruff, V. und Wittmann-Liebold, B. (1992). Primary structures of ribosomal proteins L3 and L4 from *Bacillus stearothermophilus*; *Eur. J. Biochem.*, **207**, 877-85.
- Hinkle, D.C. und Chamberlin, M.J. (1972). Studies of the binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to DNA. I. The role of sigma subunit in site selection; *J. Mol. Biol.*, **70**, 157-85.
- Holm, L. und Sander, C. (1993). Protein structure comparison by alignment of distance matrices; *J. Mol. Biol.*, **233**, 123-138.
- Horwitz, R.J., Li, J. und Greenblatt, J. (1987). An elongation control particle containing the N gene transcriptional antitermination protein of bacteriophage lambda; *Cell*, **51**, 631-41.
- Huenges, M., Rolz, C., Gschwind, R., Peteranderl, R., Berglechner, F., Richter, G., Bacher, A., Kessler, H. und Gemmecker, G. (1998). Solution structure of the antitermination

- protein NusB of *Escherichia coli*: a novel all-helical fold for an RNA-binding protein; *EMBO J.*, **17**, 4092-100.
- Hung, S.C. und Gottesman, M.E. (1995). Phage HK022 Nun protein arrests transcription on phage lambda DNA *in vitro* and competes with the phage lambda N antitermination protein; *J. Mol. Biol.*, **247**, 428-42.
- Jancarik, J. und Sung-Hou, K. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins; *J. Appl. Crystallogr.*, **24**, 409-11.
- Johnsen, M., Christensen, T., Dennis, P.P. und Fiil, N.P. (1982). Autogenous control: ribosomal protein L10-L12 complex binds to the leader sequence of its mRNA; *EMBO J.*, **1**, 999-1004.
- Johnson, A.D., Poteete, A.R., Lauer, G., Sauer, R.T., Ackers, G.K. und Ptashne, M. (1981). lambda Repressor and cro-components of an efficient molecular switch; *Nature*, **294**, 217-23.
- Kanamori, H., Dodson, R.E. und Shapiro, D.J. (1998). In vitro genetic analysis of the RNA binding site of vigilin, a multi-KH-domain protein; *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3991-4003.
- Karle, J. (1989). Direct methods in protein crystallography; *Acta Crystallogr.*, **A 45**, 765-781.
- Keppel, F., Georgopoulos, C. und Eisen, H. (1974). Host interference with expression of the lambda N gene product; *Biochimie*, **56**, 1503-1509.
- Khaitovich, P., Mankin, A.S., Green, R., Lancaster, L. und Noller, H.F. (1999). characterisation of functionally active subribosomal particles from *Thermus thermophilus*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 85-90.
- Kornberg, R.D. (1999). Eukaryotic transcriptional control; *Trends Cell Biol.*, **9**, M46-9.
- Kruse, C., Grunweller, A., Willkomm, D.K., Pfeiffer, T., Hartmann, R.K. und Muller, P.K. (1998). tRNA is entrapped in similar, but distinct, nuclear and cytoplasmic ribonucleoprotein complexes, both of which contain vigilin and elongation factor 1 alpha; *Biochem J.*, **329**, 615-21.
- Kwon, H.J., Bennik, M.H., Demple, B. und Ellenberger, T. (2000). Crystal structure of the *Escherichia coli* Rob transcription factor in complex with DNA; *Nature Struct. Biol.*, **7**, 424-30.
- Labischinski, H. und Subramanian, A.R. (1979). Protein S1 from *Escherichia coli* ribosomes: an improved isolation procedure and shape determination by small-angle X-ray scattering; *Eur. J. Biochem.*, **95**, 359-66.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature*, **227**, 680-685.

- Landick, R. und Yanofsky, C. (1984). Stability of an RNA secondary structure affects in vitro transcription pausing in the *trp* operon leader region; *J. Biol. Chem.*, **259**, 11550-5.
- Landick, R. und Yanowsky, C. (1987) Transcription attenuation. In Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, H.E. (eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. American Society of Microbiology, Washington, DC, pp. 1276-1301.
- Legault, P., Li, J., Mogridge, J., Kay, L.E. und Greenblatt, J. (1998). NMR structure of the bacteriophage lambda N peptide/boxB RNA complex: recognition of a GNRA fold by an arginine-rich motif; *Cell*, **93**, 289-99.
- Lewis, H.A., Chen, H., Edo, C., Buckanovich, R.J., Yang, Y.Y., Musunuru, K., Zhong, R., Darnell, R.B. und Burley, S.K. (1999). Crystal structures of Nova-1 and Nova-2 K-homology RNA-binding domains; *Structure Fold. Des.*, **7**, 191-203.
- Lewis, H.A., Musunuru, K., Jensen, K.B., Edo, C., Chen, H., Darnell, R.B. und Burley, S.K. (2000). Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome; *Cell*, **100**, 323-32.
- Li, J., Horwitz, R., McCracken, S. und Greenblatt, J. (1992). NusG, a new *Escherichia coli* elongation factor involved in transcriptional antitermination by the N protein of phage lambda; *J. Biol. Chem.*, **267**, 6012-9.
- Li, S.C., Squires, C.L. und Squires, C. (1984). Antitermination of *E. coli* rRNA transcription is caused by a control region segment containing lambda nut-like sequences; *Cell*, **38**, 851-60.
- Li, X., Lindahl, L., Sha, Y. und Zengel, J.M. (1997). Analysis of the *Bacillus subtilis* S10 ribosomal protein gene cluster identifies two promoters that may be responsible for transcription of the entire 15-kilobase S10-*spc-alpha* cluster; *J. Bacteriol.*, **179**, 7046-54.
- Li, X., Lindahl, L. und Zengel, J.M. (1996). Ribosomal protein L4 from *Escherichia coli* utilizes nonidentical determinants for its structural and regulatory functions; *RNA*, **2**, 24-37.
- Liao, D., Lurz, R., Dobrinski, B. und Dennis, P.P. (1996). A NusG-like protein from *Thermotoga maritima* binds to DNA and RNA; *J. Bacteriol.*, **178**, 4089-98.
- Liljas, A. und Al-Karadaghi, S. (1997). Structural aspects of protein synthesis; *Nature Struct. Biol.*, **4**, 767-771.

- Linn, T. und Greenblatt, J. (1992). The NusA and NusG proteins of *Escherichia coli* increase the *in vitro* readthrough frequency of a transcriptional attenuator preceding the gene for the beta subunit of RNA polymerase; *J. Biol. Chem.*, **267**, 1449-54.
- Liu, K. und Hanna, M.M. (1995). NusA contacts nascent RNA in *Escherichia coli* transcription complexes; *J. Mol. Biol.*, **247**, 547-58.
- Liu, K., Zhang, Y., Severinov, K., Das, A. und Hanna, M.M. (1996). Role of *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit in modulation of pausing, termination and anti-termination by the transcription elongation factor NusA; *EMBO J.*, **15**, 150-61.
- Livingstone, C.D. und Barton, G.J. (1993). Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation; *Comp. Applic. Biosci.*, **9**, 745-56.
- Luzzati, P. (1952). Traitement statistique des erreurs dans la détermination des structures cristallines; *Acta Crystallogr.*, **5**, 802-810.
- Mah, T.F., Li, J., Davidson, A.R. und Greenblatt, J. (1999). Functional importance of regions in *Escherichia coli* elongation factor NusA that interact with RNA polymerase, the bacteriophage lambda N protein and RNA; *Mol. Microbiol.*, **34**, 523-37.
- Mah, T.-F., Kuznedelov, K., Mushegian, A., Severinov, K. und Greenblatt, J. (2000). The alpha subunit of *E.coli* RNA polymerase activates RNA binding by NusA; *Genes Dev.*, **14**, 2664-2675.
- Malhotra, A., Severinova, E. und Darst, S.A. (1996). Crystal structure of a sigma 70 subunit fragment from *E. coli* RNA polymerase; *Cell*, **87**, 127-36.
- Maly, P., Rinke, J., Ulmer, E., Zwieb, C. und Brimacombe, R. (1980). Precise localization of the site of cross-linking between protein L4 and 23S ribonucleic acid induced by mild ultraviolet irradiation of *Escherichia coli* 50S ribosomal subunits; *Biochemistry*, **19**, 4179-88.
- Manival, X., Yang, Y., Strub, M.P., Kochoyan, M., Steinmetz, M. und Aymerich, S. (1997). From genetic to structural characterization of a new class of RNA-binding domain within the SacY/BglG family of antiterminator proteins; *EMBO J.*, **16**, 5019-29.
- Mason, S.W. und Greenblatt, J. (1991). Assembly of transcription elongation complexes containing the N protein of phage lambda and the *Escherichia coli* elongation factors NusA, NusB, NusG, and S10; *Genes Dev.*, **5**, 1504-12.
- Mason, S.W., Li, J. und Greenblatt, J. (1992a). Direct interaction between two *Escherichia coli* transcription antitermination factors, NusB and ribosomal protein S10; *J. Mol. Biol.*, **223**, 55-66.

- Mason, S.W., Li, J. und Greenblatt, J. (1992b). Host factor requirements for processive antitermination of transcription and suppression of pausing by the N protein of bacteriophage lambda; *J. Biol. Chem.*, **267**, 19418-26.
- Matadeen, R., Patwardhan, A., Gowen, B., Orlova, E.V., Pape, T., Cuff, M., Mueller, F., Brimacombe, R. und van Heel, M. (1999). The *Escherichia coli* large ribosomal subunit at 7.5 Å resolution; *Structure Fold. Des.*, **7**, 1575-83.
- McKay, D.B., Pickover, C.A. und Steitz, T.A. (1982). *Escherichia coli* lac repressor is elongated with its operator DNA binding domains located at both ends; *J. Mol. Biol.*, **156**, 175-83.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization; *Eur. J. Biochem.*, **189**, 1-23.
- Miozzari, G.F. und Yanofsky, C. (1978). Translation of the leader region of the *Escherichia coli* tryptophan operon; *J. Bacteriol.*, **133**, 1457-66.
- Mogridge, J. und Greenblatt, J. (1998). Specific binding of *Escherichia coli* ribosomal protein S1 to *boxA* transcriptional antiterminator RNA; *J. Bacteriol.*, **180**, 2248-52.
- Mogridge, J., Legault, P., Li, J., Van Oene, M.D., Kay, L.E. und Greenblatt, J. (1998). Independent ligand-induced folding of the RNA-binding domain and two functionally distinct antitermination regions in the phage lambda N protein; *Mol. Cell*, **1**, 265-75.
- Mogridge, J., Mah, T.F. und Greenblatt, J. (1995). A protein-RNA interaction network facilitates the template-independent cooperative assembly on RNA polymerase of a stable antitermination complex containing the lambda N protein; *Genes Dev.*, **9**, 2831-45.
- Mooney, R.A., Artsimovitch, I. und Landick, R. (1998). Information processing by RNA polymerase: recognition of regulatory signals during RNA chain elongation; *J. Bacteriol.*, **180**, 3265-75.
- Morgan, W.D., Bear, D.G., Litchman, B.L. und von Hippel, P.H. (1985). RNA sequence and secondary structure requirements for rho-dependent transcription termination; *Nucleic Acids Res.*, **13**, 3739-54.
- Murthy, H.M., Hendrickson, W.A., Orme-Johnson, W.H., Merritt, E.A. und Phizackerley, R.P. (1988). Crystal structure of *Clostridium acidi-urici* ferredoxin at 5-Å resolution based on measurements of anomalous X-ray scattering at multiple wavelengths; *J. Biol. Chem.*, **263**, 18430-6.

- Murzin, A.G., Brenner, S.F., Hubbard, T. und Chothia, C. (1995). Scop:a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures; *J. Mol. Biol.*, **247**, 536-540.
- Musco, G., Kharrat, A., Stier, G., Fraternali, F., Gibson, T.J., Nilges, M. und Pastore, A. (1997). The solution structure of the first KH domain of FMR1, the protein responsible for the fragile X syndrome; *Nature Struct. Biol.*, **4**, 712-6.
- Musco, G., Stier, G., Joseph, C., Castiglione Morelli, M.A., Nilges, M., Gibson, T.J. und Pastore, A. (1996). Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome; *Cell*, **85**, 237-45.
- Muth, G.W., Ortoleva-Donnelly, L. und Strobel, S.A. (2000). A single adenosine with a neutral pKa in the ribosomal peptidyl transferase center; *Science*, **289**, 947-50.
- Nakagawa, A., nakashima, T., Taniguchi, M., Hosaka, H., Kimura, M. und Tanaka, I. (1999). The three-dimensional structure of the RNA-binding domain of ribosomal protein L2; a protein at the peptidyl transferase center of the ribosome; *EMBO J.*, **18**, 1459-1467.
- Nakamura, Y., Mizusawa, S., Court, D.L. und Tsugawa, A. (1986). Regulatory defects of a conditionally lethal nusA mutant of *Escherichia coli*. Positive and negative modulator roles of NusA protein *in vivo*; *J. Mol. Biol.*, **189**, 103-11.
- Nakamura, Y.U., H. (1983). Isolation of Conditionally Lethal Amber Mutations Affecting Synthesis of The NusA Protein of *Escherichia coli*; *Mol. Gen. Genet.*, **190**, 196-203.
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J.A., Linher, K.D., Garrett, M.M., Stewart, A.M., Cotton, M.D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Eisen, J.A., Fraser, C.M. und et al. (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*; *Nature*, **399**, 323-9.
- Nicholls, A., Sharp, K.A. und Honig, B. (1991). Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons; *Proteins*, **11**, 281-96.
- Nierhaus, K.H. (1991). The assembly of prokaryotic ribosomes; *Biochimie*, **73**, 739-55.
- Nikonov, S., Nevskaya, N., Eliseikina, I., Fomenkova, N., Nikulin, A., Ossina, N., Garber, M., Jonsson, B.H., Briand, C., Al-Karadaghi, S., Svensson, A., Aevansson, A. und Liljas, A. (1996). Crystal structure of the RNA binding ribosomal protein L1 from *Thermus thermophilus*; *EMBO J.*, **15**, 1350-9.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. und Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis; *Science*, **289**, 920-30.



- Nodwell, J.R. und Greenblatt, J. (1993). Recognition of boxA antiterminator RNA by the *E. coli* antitermination factors NusB and ribosomal protein S10; *Cell*, **72**, 261-8.
- Nomura, M., Yates, J.L., Dean, D. und Post, L.E. (1980). Feedback regulation of ribosomal protein gene expression in *Escherichia coli*: Structural homology between ribosomal RNA and ribosomal protein mRNA; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7084-7088.
- Ohkubo, S., Muto, A., Kawauchi, Y., Yamao, F. und Osawa, S. (1987). The ribosomal protein gene cluster of *Mycoplasma capricolum*; *Mol. Gen. Genet*, **210**, 314-22.
- Olson, E.R., Flamm, E.L. und Friedman, D.I. (1982). Analysis of *nutR*: a region of phage lambda required for antitermination of transcription; *Cell*, **31**, 61-70.
- Orlova, M., Newlands, J., Das, A., Goldfarb, A. und Borukhov, S. (1995). Intrinsic transcript cleavage activity of RNA polymerase; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4596-600.
- Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillations mode; *Methods Enzymol.*, **276**, 307-326.
- Oubridge, C., Ito, N., Evans, P.R., Teo, C.H. und Nagai, K. (1994). Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin; *Nature*, **372**, 432-8.
- Pabo, C.O. und Sauer, R.T. (1992). Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition; *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 1053-95.
- Patterson, A.L. (1934). A Fourier series method for the determination of the components of interatomic distances in crystals; *Phys. Rev.*, **46**, 372-376.
- Pfeiffer, T., Jorcke, D., Feltens, R. und Hartmann, R.K. (1995). Direct linkage of str-, S10- and spc-related gene clusters in *Thermus thermophilus* HB8, and sequences of ribosomal proteins L4 and S10; *Gene*, **167**, 141-5.
- Ramachandran, G.N.S., V. (1968). Conformation of polypeptides and proteins.; *Advan. Protein Chem.*, **23**, 283-437.
- Ramakrishnan, V. und White, S.W. (1998). Ribosomal protein structures: insights into the architecture, machinery and evolution of the ribosome; *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 208-212.
- Reichardt, L. und Kaiser, A.D. (1971). Control of lambda repressor synthesis; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **68**, 2185-9.
- Rhee, S., Martin, R.G., Rosner, J.L. und Davies, D.R. (1998). A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10413-8.

- Rice, P.A., Yang, S., Mizuuchi, K. und Nash, H.A. (1996). Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn; *Cell*, **87**, 1295-306.
- Richardson, J.P., Grimley, C. und Lowery, C. (1975). Transcription termination factor rho activity is altered in *Escherichia coli* with suA gene mutations; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 1725-1728.
- Richardson, J.P.G., J. (1996) Control of RNA chain elongation and termination. In Neidhardt, F.C. (ed.) *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, pp. 386-406.
- Robert, J., Sloan, S.B., Weisberg, R.A., Gottesman, M.E., Robledo, R. und Harbrecht, D. (1987). The remarkable specificity of a new transcription termination factor suggests that the mechanisms of termination and antitermination are similar; *Cell*, **51**, 483-92.
- Roberts, J.W. (1969). Termination factor for RNA synthesis; *Nature*, **224**, 1168-74.
- Robledo, R., Atkinson, B.L. und Gottesman, M.E. (1991). *Escherichia coli* mutations that block transcription termination by phage HK022 Nun protein; *J. Mol. Biol*, **220**, 613-9.
- Rosenberg, M. und Court, D. (1979). Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription; *Annu. Rev. Genet.*, **13**, 319-53.
- Ross, W., Thompson, J.F., Newlands, J.T. und Gourse, R.L. (1990). *E.coli* Fis protein activates ribosomal RNA transcription *in vitro* and *in vivo*; *EMBO J.*, **9**, 3733-42.
- Rost, B. und Sander, C. (1993). Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy; *J. Mol. Biol*, **232**, 584-99.
- Ruteshouser, E.C. und Richardson, J.P. (1989). Identification and characterization of transcription termination sites in the *Escherichia coli* lacZ gene; *J. Mol. Biol*, **208**, 23-43.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. und Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase; *Science*, **239**, 487-91.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia; *Science*, **230**, 1350-4.
- Salstrom, J.S. und Szybalski, W. (1978). Coliphage lambda nutL-: a unique class of mutants defective in the site of gene N product utilization for antitermination of leftward transcription; *J. Mol. Biol*, **124**, 195-221.

- Sambrook, J.F., E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-7.
- Schaechter, M., Maaloe, O. und Kjelgaard, N.O. (1958). Dependence on medium and temperature of cell size and chemical composition during balanced growth of *Salmonella typhimurium*; *J. Gen. Microbiol.*, **19**, 592-606.
- Schauer, A.T., Carver, D.L., Bigelow, B., Baron, L.S. und Friedman, D.I. (1987). lambda N antitermination system: functional analysis of phage interactions with the host NusA protein; *J. Mol. Biol.*, **194**, 679-90.
- Schindelin, H., Marahiel, M.A. und Heinemann, U. (1993). Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein; *Nature*, **364**, 164-8.
- Schlutzen, F., Tocilj, A., Zarivach, R., Harms, J., Gluehmann, M., Janell, D., Bashan, A., Bartels, H., Agmon, I., Franceschi, F. und Yonath, A. (2000). Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 Å resolution; *Cell*, **102**, 615-623.
- Schmidt, M.C. und Chamberlin, M.J. (1984). Amplification and isolation of *Escherichia coli* nusA protein and studies of its effects on *in vitro* RNA chain elongation; *Biochemistry*, **23**, 197-203.
- Schultz, S.C., Shields, G.C. und Steitz, T.A. (1991). Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees; *Science*, **253**, 1001-7.
- Schulze, H. und Nierhaus, K.H. (1982). Minimal set of ribosomal components for reconstitution of the peptidyltransferase activity; *EMBO J.*, **1**, 609-613.
- Severinova, E., Severinov, K., Fenyó, D., Marr, M., Brody, E.N., Roberts, J.W., Chait, B.T. und Darst, S.A. (1996). Domain organization of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma 70 subunit; *J. Mol. Biol.*, **263**, 637-47.
- Shen, P., Zengel, J.M. und Lindahl, L. (1988). Secondary structure of the leader transcript from the *Escherichia coli* S10 ribosomal protein operon; *Nucleic Acids Res.*, **16**, 8905-24.
- Shimotsu, H., Kuroda, M.I., Yanofsky, C. und Henner, D.J. (1986). Novel form of transcription attenuation regulates expression the *Bacillus subtilis* tryptophan operon; *J. Bacteriol.*, **166**, 461-71.

- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M. und Dreyfuss, G. (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif; *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1193-8.
- Squires, C.L., Greenblatt, J., Li, J. und Condon, C. (1993). Ribosomal RNA antitermination *in vitro*: requirement for Nus factors and one or more unidentified cellular components; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 970-4.
- Sreerama, N. und Woody, R.W. (1993). A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism; *Anal. Biochem.*, **209**, 32-44.
- Stebbins, C.E., Borukhov, S., Orlova, M., Polyakov, A., Goldfarb, A. und Darst, S.A. (1995). Crystal structure of the GreA transcript cleavage factor from *Escherichia coli*; *Nature*, **373**, 636-40.
- Studier, F.W. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system; *J. Mol. Biol.*, **219**, 37-44.
- Studier, F.W. und Moffatt, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes; *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-30.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W. (1990). Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes; *Methods Enzymol.*, **185**, 60-89.
- Su, X.D., Taddei, N., Stefani, M., Ramponi, G. und Nordlund, P. (1994). The crystal structure of a low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase; *Nature*, **370**, 575-8.
- Subramanian, A.R. (1983). Structure and functions of ribosomal protein S1; *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **28**, 101-42.
- Sullivan, S.L. und Gottesmann, M.E. (1992). Requirement for *E.coli* NusG protein in factor-dependent transcription termination; *Cell*, **68**, 989-994.
- Surratt, C.K., Milan, S.C. und Chamberlin, M.J. (1991). Spontaneous cleavage of RNA in ternary complexes of *Escherichia coli* RNA polymerase and its significance for the mechanism of transcription; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7983-7.
- Taura, T., Ueguchi, C., Shiba, K. und Ito, K. (1992). Insertional disruption of the nusB (ssyB) gene leads to cold-sensitive growth of *Escherichia coli* and suppression of the secY24 mutation; *Mol. Gen. Genet.*, **234**, 429-32.
- Theissen, G., Pardon, B. und Wagner, R. (1990). A quantitative assessment for transcriptional pausing of DNA-dependent RNA polymerases *in vitro*; *Anal. Biochem.*, **189**, 254-61.
- Travers, A. (1980a). Promoter sequence for stringent control of bacterial ribonucleic acid synthesis; *J. Bacteriol.*, **141**, 973-976.

- Travers, A. (1980b). A tRNA promoter with an altered response to to ppGpp; *J. Mol. Biol.*, **141**, 91-97.
- Travers, A. (1984). Conserved features of coordinately regulated *E. coli* promoters; *Nucleic Acids Res.*, **12**, 2605-2618.
- Travaglia, S.L., Datwyler, S.A., Yan, D., Ishihama, A. und Meares, C.F. (1999). Targeted protein footprinting: where different transcription factors bind to RNA polymerase; *Biochemistry*, **38**, 15774-8.
- Tsugawa, A., Kurihara, T., Zuber, M., Court, D.L. und Nakamura, Y. (1985). *E. coli* NusA protein binds *in vitro* to an RNA sequence immediately upstream of the *boxA* signal of bacteriophage lambda; *EMBO J.*, **4**, 2337-42.
- Tsugawa, A., Saito, M., Court, D.L. und Nakamura, Y. (1988). nusA amber mutation that causes temperature-sensitive growth of *Escherichia coli*; *J. Bacteriol.*, **170**, 908-15.
- Turk, D. (1996) An interactive software for density modifications, model building, structure refinement and analysis. In Bourne, P.E. and Watenpaugh, K. (eds.), Proceedings from the 1996 meeting of the International Union of Crystallography Macromolecular Computing School.
- Uptain, S.M., Kane, C.M. und Chamberlin, M.J. (1997). Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation; *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 117-72.
- Urlaub, H., Kruft, V., Bischof, O., Müller, E.-V. und Wittmann-Liebold, B. (1995). Protein-rRNA binding features and their structural and functional implications in ribosomes as determined by cross-linking studies; *EMBO J.*, **14**, 4578-4588.
- Uson, I. und Sheldrick, G.M. (1999). Advances in direct methods for protein crystallography; *Curr. Op. Struct. Biol.*, **9**, 643-8.
- van Tilbeurgh, H., Manival, X., Aymerich, S., Lhoste, J.M., Dumas, C. und Kochoyan, M. (1997). Crystal structure of a new RNA-binding domain from the antiterminator protein SacY of *Bacillus subtilis*; *EMBO J.*, **16**, 5030-6.
- Vogel, U. und Jensen, K.F. (1997). NusA is required for ribosomal antitermination and for modulation of the transcription elongation rate of both antiterminated RNA and mRNA; *J. Biol. Chem.*, **272**, 12265-71.
- Watnick, R.S. und Gottesman, M.E. (1999). Binding of transcription termination protein nun to nascent RNA and template DNA; *Science*, **286**, 2337-9.
- Watnick, R.S., Herring, S.C., Palmer, A.G., 3rd und Gottesman, M.E. (2000). The carboxyl terminus of phage HK022 Nun includes a novel zinc-binding motif and a tryptophan required for transcription termination; *Genes Dev.*, **14**, 731-9.

- Weber, V., Wernitznig, A., Hager, G., Harata, M., Frank, P. und Wintersberger, U. (1997). Purification and nucleic-acid-binding properties of a *Saccharomyces cerevisiae* protein involved in the control of ploidy; *Eur. J. Biochem.*, **249**, 309-17.
- Whalen, W., Ghosh, B. und Das, A. (1988). NusA protein is necessary and sufficient *in vitro* for phage lambda N gene product to suppress a rho-independent terminator placed downstream of *nutL*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2494-8.
- Wimberly, B., Brodersen, D., Clemons Jr, W., Morgen-Warren, R. und Carter, A. (2000). Structure of the 30S ribosomal subunit; *Nature*, **407**, 327-329.
- Winkler, M.E. und Yanofsky, C. (1981). Pausing of RNA polymerase during *in vitro* transcription of the tryptophan operon leader region; *Biochemistry*, **20**, 3738-44.
- Wood, W.B. (1966). Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA; *J. Mol. Biol*, **16**, 118-33.
- Xing, Y., Guha Thakurta, D. und Draper, D.E. (1997). The RNA binding domain of ribosomal protein L11 is structurally similar to homeodomains; *Nature Struct. Biol.*, **4**, 24-7.
- Yang, X.J., Goliger, J.A. und Roberts, J.W. (1989). Specificity and mechanism of antitermination by Q proteins of bacteriophages lambda and 82; *J. Mol. Biol*, **210**, 453-60.
- Yarnell, W.S. und Roberts, J.W. (1992). The phage lambda gene Q transcription antiterminator binds DNA in the late gene promoter as it modifies RNA polymerase; *Cell*, **69**, 1181-9.
- Yasumoto, K., Liu, H., Jeong, S.M., Ohashi, Y., Kakinuma, S., Tanaka, K., Kawamura, F., Yoshikawa, H. und Takahashi, H. (1996). Sequence analysis of a 50 kb region between *spo0H* and *rrnH* on the *Bacillus subtilis* chromosome; *Microbiology*, **142**, 3039-46.
- Yates, J.L. und Nomura, M. (1980). *E.coli* ribosomal protein L4 is a feedback regulatory protein; *Cell*, **21**, 517-522.
- Yokota, T., Arai, K. und Kaziro, Y. (1979). Studies on 30S ribosomal protein S1 from *E. coli*. I. Purification and physicochemical properties; *J. Biochem.*, **86**, 1725-37.
- Yokota, T., Arai, K.I. und Kaziro, Y. (1977). Involvement of 30S ribosomal protein S1 in poly(U)-directed polyphenylalanine synthesis; *J. Biochem.*, **82**, 1485-9.
- Zengel, J.M. und Lindahl, L. (1993). Domain I of 23S rRNA competes with a paused transcription complex for ribosomal protein L4 of *Escherichia coli*; *Nucleic Acids Res.*, **21**, 2429-35.

- Zengel, J.M. und Lindahl, L. (1994). Diverse mechanisms for regulating ribosomal protein synthesis in *Escherichia coli*; *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **47**, 331-370.
- Zengel, J.M. und Lindahl, L. (1996). A hairpin structure upstream of the terminator hairpin required for ribosomal protein L4-mediated attenuation control of the S10 operon of *Escherichia coli*; *J. Bacteriol.*, **178**, 2383-7.
- Zengel, J.M., Mueckl, D. und Lindahl, L. (1980). Protein L4 of the *E.coli* ribosome regulates an eleven gene r protein operon; *Cell*, **21**, 523-535.
- Zengel, J.M., Vorozheikina, D., Li, X. und Lindahl, L. (1995). Regulation of the *Escherichia coli* S10 ribosomal protein operon by heterologous L4 ribosomal proteins; *Biochem. Cell Biol.*, **73**, 1105-12.
- Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K. und Darst, S.A. (1999). Crystal structure of *Thermus aquaticus* core RNA polymerase at 3.3 Å resolution; *Cell*, **98**, 811-24.
- Zhang, Y. und Hanna, M.M. (1994). NusA changes the conformation of *Escherichia coli* RNA polymerase at the binding site for the 3' end of the nascent RNA; *J. Bacteriol.*, **176**, 1787-9.
- Zheng, C. und Friedman, D.I. (1994). Reduced Rho-dependent transcription termination permits NusA-independent growth of *Escherichia coli*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 7543-7.
- Zurawski, G. und Zurawski, S.M. (1985). Structure of the *Escherichia coli* S10 ribosomal protein operon; *Nucleic Acids Res.*, **13**, 4521-6.

## 7. Anhang

### 7.1 Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
Abb.	Abbildung
Å	Ångström ; $1\text{Å} = 10^{-10}\text{ m}$
ARM	Arginin reiches Motiv
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
DEAE	Diethyl-aminoethyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EcoL4	ribosomales Protein L4 von <i>Escherichia coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ecoNusA</i>	<i>Escherichia coli</i> NusA
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
HEPES	Hydroxyethyl-piperanzin-ethansulfonsäure
HTH-Motiv	Helix-Turn-Helix-Motiv
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA ( <i>engl. messenger RNA</i> )
NTP	Nucleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
<i>r.m.s.</i>	<i>root mean square</i>
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>engl. ribonucleic acid</i> )
RNAP	RNA-Polymerase
r-Protein(e)	ribosomale Protein(e)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure



S	Svedberg ( $10^{-13}$ s)
TmaL4	ribosomales Protein L4 von <i>Thermotoga maritima</i>
tmaNusA	<i>Thermotoga maritima</i> NusA
tRNA	transfer-RNA
Tris	$\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
Upm	Umdrehungen in der Minute

## 7.2 Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparaginsäure	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
L	Leu	Leucin			