

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Armine Hayrapetyan

aus Jerewan/Armenien

Tag der mündlichen Prüfung:

**Zusammenspiel von posttranskriptionellen
Modifikationen und Strukturen von humanen
mitochondrialen tRNAs**

Diese Arbeit wurde angeleitet von: Dr. Mark Helm

Gutachter: Prof. Dr. Andres Jäschke
Prof. Dr. Stefan Wöfl

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andres Jäschke in der Zeit von August 2003 bis März 2007 am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie der Fakultät für Biowissenschaften der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg angefertigt.

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe, sowie wörtliche oder inhaltliche Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Armine Hayrapetyan

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Andres Jäschke, dem Leiter der Abteilung Chemie vom IPMB der Fakultät für Biowissenschaften der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg bedanke ich mich für die Möglichkeit, meine Promotion in seinem Institut anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Stefan Wölfl danke ich für die Bereitschaft die Arbeit zu begutachten.

Bei Mark bedanke ich mich besonders herzlich für die wissenschaftliche Betreuung und seine Unterstützung zur jeder Zeit und in allen Bereichen dieser Arbeit.

Für das freundliche Überlassen von Cybrid-Cells 143b und #G7497A, sowie für meinen Aufenthalt in Köln richte ich mein herzliches Dankeschön an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wiesner. Besonders möchte ich Maria für ihre Unterstützung bei der Durchführung von Northern-Blots danken.

Für die Durchführung der Kapillarelektrophorese möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lyko im DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum) herzlich bedanken.

Für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit und für die stets freundliche Hilfe geht ein besonderer Dank an Heike.

Carina möchte ich herzlich für die aufmerksame und geduldige Korrektur der Arbeit danken. Auch Madelein und Florentine danke ich für eure Zeit und Geduld bei den Korrekturen.

Ich danke auch allen meinen Kollegen für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre innerhalb und außerhalb des Instituts.

Der größte Dank aber geht an meine Familie für die liebevolle Unterstützung.

Abkürzungsverzeichnis

aaRS	<i>Aminoacyl-tRNA Synthetase</i>
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammonium Persulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	bacterial alkaline phosphatase
Bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	Bovine serum albumine
°C	Grad Celsius
cpm	<i>counts per minute</i> (radioaktive Zerfälle pro Minute)
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHU	Dihydrouridin
DM	Dodecyl-Maltosid
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ds	<i>double-stranded</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FADH ₂	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
H	Stunde(n)
Hum	<i>Humane</i>
IPTG	Isopropylthiogalactopyranosid
IVT	<i>in vitro</i> Transkript
KSS	<i>Kearns-Sayre Syndrome</i>
LHON	<i>Leber's Hereditary Optic Neuropathy</i>
M	molar [mol/l]
MELAS	<i>Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes</i>
MERRF	<i>Myoclonic Eepilepsy with Ragged-Red Fiber</i>
min	Minute(n)
mM	Millimolar

mRNA	<i>messenger RNA</i>			
mt	mitochondrial			
m/v	Masse pro Volumen			
NADH	Nicotinamid-Adenosin-Dinukleotid			
NaOH	Natronlauge			
Nt	Nukleotid			
NTP	Nukleosidtriphosphat			
nt	Nukleotid(e)			
OD	Optische Dichte			
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese			
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>			
PDB	Proteindatenbank			
PNK	Polynukleotidkinase			
RNA	<i>ribonucleic acid</i>			
Rnase	Ribonuclease			
RRF	<i>ragged red fibers</i>			
rRNA	<i>ribosomal RNA</i>			
RT	Raumtemperatur			
Sec	Sekunde(n)			
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>			
ss	<i>single-stranded</i>			
SSC	<i>sodium chloride – sodium citrate</i>			
TEMED	Tetramethylethyldiamin			
T _M	Schmelzpunkt			
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol			
tRNA	<i>transfer RNA</i>			
TTP	Thymidintriphosphat			
U	Unit(s)			
UTP	Uridintriphosphat			
UV	Ultraviolett			
V	Volt			
v/v	Volumen pro Volumen			
W	Watt			
WT	Wildtyp			
XC	Xylen cyanol	Präfixe vor Einheiten:	p	Pico (10 ⁻¹²)
			n	Nano (10 ⁻⁹)
			μ	Mikro (10 ⁻⁶)
			m	Milli(10 ⁻³)

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	I
INHALTSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
ZUSAMMENFASSUNG	XI
SUMMARY	XIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Mitochondrien	1
1.1.1 Struktur der Mitochondrien	2
1.1.2 Funktion der Mitochondrien	3
1.1.3 Transport der kernkodierten Proteine in das Mitochondrium	5
1.2 Mitochondriale DNA des Menschen	6
1.2.1 Replikation der mitochondrialen DNA	7
1.2.2 Transkription der mitochondrialen DNA	8
1.2.3 Der genetische Code	9
1.3 tRNA	10
1.3.1 Struktur der tRNA	10
1.3.2 Struktur mitochondrialer tRNA	13
1.3.3 Prozessierung der tRNAs	15
1.3.4 Aminoacylierung der tRNA	17
1.3.5 Posttranskriptionelle Modifikation der tRNA	20
1.4 Mitochondriale Erkrankungen (Mitochondriopathien)	24
1.4.1 Häufige mitochondriale Erkrankungen	25
1.4.2 Mitochondriale Erkrankungen bedingt durch nukleäre Mutationen	27
1.4.3 Weitere neurodegenerative Erkrankungen	29
1.4.4 Mitochondrial bedingte Schwerhörigkeiten	29

2	MATERIAL UND METHODEN	31
2.1	Chemikalien und Enzyme	31
2.2	Puffer und Medien	34
2.3	Oligonukleotide	39
2.4	Standards und Kits	41
2.5	Molekularbiologische Methoden	42
2.5.1	Amplifizierung der DNA-Fragmente mit Hilfe der PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	42
2.5.2	<i>in vitro</i> T7-Transkription	42
2.5.2.1	Nicht radioaktive T7-Transkription	44
2.5.2.2	Radioaktive T7-Transkription	44
2.5.3	5'-Phosphorylierung der RNA	46
2.5.4	Dephosphorylierung von DNA/RNA	46
2.5.5	3'-Markierung von RNA	47
2.6	Gelelektrophoretische Methoden	48
2.6.1	Agarosegelelektrophorese	48
2.6.2	Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	49
2.6.3	Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (native PAGE)	50
2.6.4	SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)	50
2.7	Nachweis von Nukleinsäuren	51
2.7.1	Ethidiumbromid Färbung	51
2.7.2	Autoradiographie	51
2.7.3	UV-Shadowing	52
2.7.4	Northern-Blotting	52
2.8	Gelelution von Nukleinsäuren	53
2.9	Aufreinigung der RNA mit organischen Lösungsmitteln	53
2.10	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	54
2.10.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung	54
2.10.2	Konzentrationsbestimmung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren	54
2.11	Enzymatische Spaltung von RNA	55
2.11.1	Enzymatische Kartierung	55
	Ribonuclease T1 (RNase T1)	55

Ribonuclease T2 (RNase T2)	55
Ribonuclease V1 (RNase V1)	55
Nuclease S1	55
2.11.2 Vollständige Hydrolyse von RNA	56
Spaltung mit Nuclease P1	56
Spaltung mit Ribonuclease T2 (RNase T2)	57
2.11.2.1 2D-Dünnschichtchromatographie	57
2.11.3 G- und L-Leiter	57
2.11.3.1 Guanosinleiter aus dem Verdau mit Ribonuclease T1 (RNase T1)	57
2.11.3.2 Partielle alkalische Hydrolyse	58
2.12 Chemische Spaltung der RNA	58
2.12.1 Spaltung mit Bleiacetat	58
2.12.2 Spaltung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)	59
2.13 Modifikation der RNA	60
2.14 Temperaturabhängige UV-Spektroskopie (Schmelzkurven)	60
2.15 Mikrobiologische Methoden	61
2.15.1 Kultivierung von <i>E.coli</i>	61
2.15.2 Elution von DNA aus Agarosegelen	61
2.15.3 Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> Zellen	62
2.15.4 Präparation von Plasmid DNA aus <i>E.coli</i>	62
2.16 Aufreinigung der Pus1 und Pus4 rekombinanten Enzyme	62
2.16.1 Induktion der Proteinexpression	62
2.16.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine	63
2.17 Methoden für Zellkultur	63
2.17.1 Zelllinien	63
2.17.2 Die Anzucht der Zellen	63
2.17.3 Aufreinigung der Gesamt-RNA aus Osteosarcoma Zellen	64
2.17.4 Aufreinigung der Gesamt-tRNA aus Gesamt-RNA	64
2.17.5 Aufreinigung der mitochondrialen Zellextrakte	65
2.17.5.1 Herstellung von Saccharosedichtegradienten	65
2.17.5.2 Präparation von Mitochondrien aus HeLa Zellen	65
2.17.5.3 Aufreinigung der mitochondrialen Zellextrakte	66
3 AUFGABENSTELLUNG	67

4	ERGEBNISSE	69
4.1	Posttranskriptionelle Modifikation von tRNA-Transkripten	69
4.2	Chemische und enzymatische Kartierung der tRNAs	76
4.2.1	Strukturanalyse der humanen mitochondrialen tRNA ^{Gln}	77
4.2.2	Strukturanalyse der humanen mitochondrialen tRNA ^{Leu(CUN)}	81
4.2.3	Strukturanalyse der humanen mitochondrialen tRNA ^{Ser(UCN)}	87
4.3	Temperaturabhängige T1-RNase Kartierung von tRNA ^{Ser(UCN)}	92
4.4	Temperaturabhängige DEPC Kartierung von tRNA ^{Ser(UCN)}	96
4.5	Strukturanalyse von tRNA ^{Ser(UCN)} -WT und -G7497A Mutante mittels UV-Schmelzkurven-Messungen	99
4.6	Untersuchung der Struktur von tRNA ^{Ser(UCN)} -Derivaten mittels temperaturabhängiger PAGE unter nicht denaturierenden Bedingungen	105
4.7	Temperaturabhängige Modifikation von tRNA ^{Ser(UCN)} -Transkripten mit mt S-100 Extrakt	107
4.8	Modifikation der tRNA ^{Ser(UCN)} -Transkripte mit rekombinanten Pus4p (YNL292w) und Pus1p (YPL212C) Enzymen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	109
4.9	UV-Schmelzkurven von modifizierten Transkripten	112
4.10	Enzymatische Kartierung der modifizierten Transkripte	119
5	DISKUSSION	121
6	LITERATURVERZEICHNIS	129
7	ANHANG	139
	Anhang 1: Posttranskriptionelle Modifikation der tRNA ^{Gln} .	139
	Anhang 2: Schmelzkurvenanalyse von tRNA ^{Leu(CUN)} -WT, -12320G und - G12315A <i>in vitro</i> Transkripten in Anwesenheit von 0, 0,5, 1 und 2 mM MgCl ₂ .	140
	Anhang 3: RNase T1 Kartierung von tRNA ^{Ser(UCN)} 3'-markierten <i>in vitro</i> Transkripten bei 20 – 45 °C.	141
	Anhang 4: Erste Ableitungen der tRNA ^{Ser(UCN)} -WT <i>in vitro</i> Transkripten in Anwesenheit von 0, 0,5, 1 und 2 mM MgCl ₂ in 50 mM Phosphatpuffer und 100 mM NaCl.	143
	Anhang 5: Publikationen und Poster	144

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopisches Bild eines Mitochondriums	1
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Mitochondriums.	2
Abbildung 1.3: Oxidative Phosphorylierung.	4
Abbildung 1.4: Proteintransport in Mitochondrien [Truscott et al., 2003].	5
Abbildung 1.5: Genkarte der menschlichen mitochondrialen DNA und die Lokalisierung der geläufigsten Krankheitsmutationen.	7
Abbildung 1.6: Transkription der mitochondrialen DNA.	8
Abbildung 1.7: Diagramm der Sekundär- und 3D-Struktur der tRNA am Beispiel der Hefe tRNA ^{Phe} .	12
Abbildung 1.8: Humane mitochondriale tRNA ^{Ser(UCN)} und tRNA ^{Ser(AGY)} .	14
Abbildung 1.9: tRNA-Prozessierung.	15
Abbildung 1.10: Kristallstruktur der Klasse II tRNA-Nukleotidyltransferase aus <i>Bacillus stearothermophilus</i> mit CTP- (A) und ATP- (B).	16
Abbildung 1.11: Kristallstruktur von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen der Klasse I (A) und II (B) am Beispiel von GlnRS für die Klasse I und AspRS für die Klasse II.	18
Abbildung 1.12: Kristallstruktur von mitochondrialen Säuger SerRS mit Seryladenylat.	19
Abbildung 1.13: Isomerisierung von Uridin zu Pseudouridin.	21
Abbildung 1.14: Basen- <i>flipping</i> . H, Histidin.	22
Abbildung 1.15: λ -Form von tRNA [Ishitani et al., 2003].	23
Abbildung 2.1: Organisation der <i>Hammerhead Ribozym</i> -Transkripte an Hand der tRNA ^{Ser(UCN)} .	43
Abbildung 2.2: 3'-Ende „ <i>splintlabeling</i> “ der tRNA ^{Ser(UCN)} . * C = [α - ³² P]-dCTP.	48
Abbildung 2.3: Northern-Blotting.	53
Abbildung 4.1: Chromatographische Auftrennung des mitochondrialen S-100 Extraktes.	69
Abbildung 4.2: <i>In vitro</i> T7 Transkription.	70
Abbildung 4.3: Relative Positionen der Nukleotide auf einer Cellulose Platte bei Trennung (A) mit DC-Laufpuffer A und B und (B) mit A und C [Dirheimer et al., 1995].	71
Abbildung 4.4: <i>In vitro</i> posttranskriptionelle Modifikation mit mitochondrialem S-100 Extrakt von (A) tRNA ^{Phe} , (B) tRNA ^{Lys} , (C) tRNA ^{Gln} , (D) tRNA ^{Leu(CUN)} , (E) tRNA ^{Ser(UCN)} und deren Mutanten.	72
Abbildung 4.5: Die „ <i>next neighbor</i> “ Analyse von tRNA ^{Ser(UCN)} -Transkript.	76
Abbildung 4.6: Struktur von der hum mt tRNA ^{Gln} .	77
Abbildung 4.7: Strukturanalyse von der tRNAGln-WT und -T4336C Mutante durch Nukleaseverdau.	78
Abbildung 4.8: Strukturanalyse der tRNA ^{Gln} -WT und -T4336C Mutante durch Bleispaltung und gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente.	79
Abbildung 4.9: Struktur von der hum mt tRNA ^{Leu(CUN)} .	81
Abbildung 4.10: : Strukturanalyse von tRNA ^{Leu(CUN)} -WT, -A12320G und -G12315A Mutanten durch Nukleaseverdau.	82

Abbildung 4.11: Strukturanalyse von der tRNA ^{Leu(CUN)} -WT, -A12320G und -G12315A Mutanten durch Blei(II)-induzierter Spaltung.	84
Abbildung 4.12: Normalisierte erste Ableitungen der tRNA ^{Leu(CUN)} -WT (blau), und ihrer Mutanten A12320G (rot) und G12315A (grün) in Anwesenheit von 1 mM MgCl ₂ .	85
Abbildung 4.13: Die Kleeblatt Struktur der hum mt tRNA ^{Ser(UCN)} .	87
Abbildung 4.14: Strukturanalyse von tRNA ^{Ser(UCN)} -WT, sowie ihrer G7497A und T7512C Mutanten durch Nukleaseverdau.	89
Abbildung 4.15: Strukturanalyse von tRNA ^{Ser(UCN)} -WT, -G7497A und -T7512C Mutanten durch Blei(II)-induzierte Spaltung.	90
Abbildung 4.16: Strukturanalyse von tRNA ^{Ser(UCN)} -WT, G7497A und T7512C Mutanten durch T1-RNase	91
Abbildung 4.17: RNase T1 Kartierung von tRNA ^{Ser(UCN)} -WT, -G7497A und -T7512C <i>in vitro</i> 5'-markierten (A) Transkripten bei 20 – 45 °C	95
Abbildung 4.18: DEPC Kartierung von tRNA ^{Ser(UCN)} -WT, -G7497A und -T7512C <i>in vitro</i> 5'-markierten Transkripten bei 25 °C (A), 35 °C (B), 45 °C (C) und 60 °C (D)	96
Abbildung 4.19: Native Gelelektrophorese von Transkripten von tRNA ^{Ser(UCN)} -WT und G7497A Mutante.	98
Abbildung 4.20: Normalisierte UV-Schmelzkurven (A) und deren ersten Ableitungen (B) von tRNA ^{Ser(UCN)} -WT und -G7497A Mutante ohne MgCl ₂ und mit 1 mM MgCl ₂	101
Abbildung 4.21: Normalisierte UV-Schmelzkurven (A) und deren erste Ableitungen (B) von tRNA ^{Ser(UCN)} -WT und -G7497A Mutante bei 1 mM MgCl ₂ und 100 mM NaCl.	103
Abbildung 4.22: Normalisierte 1. Ableitung der tRNA ^{Ser(UCN)} -WT und -G7497A Mutante für OD ₂₆₀ = 0,4 (blau bzw. rot) und für OD ₂₆₀ = 1,6 (hell blau bzw. hell rot).	104
Abbildung 4.23: Native Gelelektrophorese von Transkripten von tRNA ^{Ser(UCN)} -WT und Derivaten.	106
Abbildung 4.24: Temperaturabhängige Modifikationskinetiken mit mt S-100 Extrakt. (A) bei 20 °C, (B) bei 37 °C und (C) bei 45 °C.	108
Abbildung 4.25: Aufreinigung rekombinanter Hefe Pus1 (A) und Pus4 (B) Proteine mittels HisTrap HP Säule (oben) und SDS-PAGE (unten).	110
Abbildung 4.26: Modifikation der tRNA ^{Ser(UCN)} -Transkripte mit verschiedenen Konzentrationen von Pus4 (A) und Pus1 (B) Enzymen.	111
Abbildung 4.27: Vergleich der Schmelzkurven (A, C) und deren 1. Ableitung (B, D) von tRNA ^{Ser(UCN)} -WT (A, B) und -G7497A Mutante (C, D) in Abhängigkeit von den Modifikationen.	113
Abbildung 4.28: Vergleich der Schmelzkurven (A, C) und deren 1. Ableitung (B, D) von tRNA ^{Ser(UCN)} -WT (A, B) und -G7497A Mutante (C, D) in Abhängigkeit von den Modifikationen bei der Anwesenheit von 1 mM MgCl ₂ und 100 mM NaCl.	117
Abbildung 4.29: Untersuchung der tRNA ^{Ser(UCN)} -Struktur mittels PAGE unter nativen Bedingungen.	118
Abbildung 4.30: Enzymatische Kartierung der modifizierten Transkripte.	119
Abbildung 5.1: Zwei alternative Strukturen von tRNA ^{Lys} -WT Transkript; (A) Haarnadelstruktur. (B)	123

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht über die Anzahl der kern- bzw. mitochondrial-kodierten Untereinheiten der vier Komplexe der Atmungskette und ATP-Synthase.	6
Tabelle 1.2: Der universelle genetische Code mit 61 Codons für 20 Aminosäuren und drei Stopp-Codons.	9
Tabelle 1.3: Häufige mitochondriale Erkrankungen.	27
Tabelle 1.4: mtDNA Mutationen in proteinkodierten Genen [Rotig and Munnich, 2003]	28
Tabelle 1.5: Mitochondriale Mutationen, die mit syndromaler Schwerhörigkeit assoziieren.	30
Tabelle 2.1: Ein PCR-Standardansatz von 100 µl.	42
Tabelle 2.2: Transkription-Standardansatz von 1 ml.	44
Tabelle 2.3: Transkription-Standardansatz von 40 µl.	45
Tabelle 2.4: 5'-Phosphorylierung-Standardansatz von 20 µl.	46
Tabelle 2.5: 3'-Markierung-Reaktionsansatz 1 (A) und 2 (B).	47
Tabelle 2.6: Trennbereich der Agarosegele.	49
Tabelle 2.7: Komigrationsverhalten einzelsträngiger Nukleinsäurefragmente und der Farbstoffe BPB und XC in denaturierenden Polyacrylamidgelen.	50
Tabelle 2.8: Nuklease Konzentrationen bei temperaturabhängigen RNase T1 Spaltung.	56
Tabelle 2.9: Herstellung der Bleiacetat-Lösung.	59
Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Modifikationen mit mitochondrialem S-100 Extrakt.	75
Tabelle 4.2: Vergleich der Schmelztemperaturen von (A) tRNA^{Leu(CUN)}-WT, (B) tRNA^{Leu(CUN)}-A12320G und (C) tRNA^{Leu(CUN)}-G12315A ermittelt durch UV-Spektroskopie.	86
Tabelle 4.3: Übersicht der Schmelztemperaturen der tRNA^{Ser(UCN)}-WT und G7497A Mutante in Abhängigkeit von Mg²⁺ und Na⁺ Konzentrationen.	102
Tabelle 4.4: Sequenzalignment von tRNA^{Ser(UCN)} von Primaten.	105
Tabelle 4.5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Kapillarelektrophorese.	112
Tabelle 4.6: Übersicht der Schmelztemperaturen der tRNA^{Ser(UCN)}-WT und -G7497A Mutante in Abhängigkeit von Mg²⁺ und Na⁺ Konzentrationen.	112

Zusammenfassung

Mitochondrien sind Organellen eukaryotischer Zellen, die für die Energieproduktion der Zellen verantwortlich sind, sowie über ein eigenes Genom verfügen. Das menschliche mitochondriale Genom kodiert 13 Proteine für die Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe und 22 *transfer* RNAs (tRNAs). Mehr als 80 verschiedene Punktmutationen in den humanen mitochondrialen tRNA Genen werden mit Krankheiten wie Kardiopathie, Enzephalopathie und Myopathien assoziiert.

Die Bildung von alternativen sekundären und tertiären tRNA-Strukturen könnte die Pathogenität dieser Mutationen erklären. Um Informationen über die strukturelle Dynamik der humanen mitochondrialen tRNAs und über pathogene Mutanten (tRNA^{Lys}-WT, -A8344G, tRNA^{Ser(UCN)}-WT, -G7497A, -T7512C, tRNA^{Gln}-WT, -T4336C, tRNA^{Leu(CUN)}-WT, -A12320G, -G12315A) zu bekommen, wurde die Struktur von *in vitro* Transkripten mit folgenden Methoden genauer untersucht: chemische und enzymatische Kartierung, UV-Schmelzkurvenanalyse und elektrophoretische Mobilität auf nativen Gelen, sowie posttranskriptionelle Modifikation mit Enzymen aus humanen mitochondrialen Extrakten und aus *Saccharomyces cerevisiae* (scPus1p und scPus4p).

Folgende Ergebnisse wurden dabei gewonnen: enzymatische und chemische Kartierungsdaten und UV-Schmelzkurvenanalyse zeigen, dass die A12320G und G12315A Mutanten der tRNA^{Leu(CUN)} eine ungewöhnliche Struktur besitzen, die sich vom Wildtyp deutlich unterscheidet. In humaner mitochondrialer tRNA^{Ser(UCN)} führt die G7497A Mutation zu einer stark kompaktierten Struktur, was durch temperaturabhängige Strukturanalyse gezeigt wurde. Das durch diese Mutation eingeführte G•U Wobble-Paar im D-Stem hat einen negativen Einfluss auf die Erkennung sowohl durch humane mitochondriale Enzyme, als auch durch Pus4 und Pus1 aus *S.cerevisiae*. Die strukturelle Dynamik von nicht-modifizierten und teilmodifizierten Transkripten, die mit UV-Schmelzkurven analysiert wurden, zeigt, dass posttranskriptionelle Modifikationen eine wichtige Rolle in der strukturellen und wahrscheinlich auch in der metabolischen Stabilität dieser tRNA spielen. Die Studien der pathogenen G7497A Punktmutation in Osteosarcoma Zellen zeigen, dass untermodifizierte tRNAs instabil sind und in der Zelle schnell abgebaut werden. Es wurde eine Reduktion zur Verfügung stehender funktioneller tRNAs in Mitochondrien auf 10 % gefunden, was zu einer Verminderung der Proteinsynthese um 40 % führt [Mollers et al., 2005].

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die meisten pathogenen Mutationen im Kernbereich der tRNA deren Struktur signifikant beeinflussen. Mit Ausnahme einer Mutation T4336C in tRNA^{Gln}, welche die Aktivität von Pseudouridin-Synthase im Vergleich zu dem Wildtyp erhöhte, zeigten die meisten pathogenen Mutationen eine Verringerung der Aktivität von den Modifikationsenzymen.

Summary

Mitochondria are intracellular organelles responsible for the majority of a cell's energy production. The human mitochondrial genome encodes 13 proteins for subunits of the respiratory chain complexes and 22 transfer RNAs (tRNAs). More than 80 different point mutations in human mitochondrial tRNA genes are correlated with severe disorders, including fatal cardiopathies, encephalopathies, myopathies, and others.

The formation of alternative secondary and tertiary structures of mutant tRNAs could explain their pathogenicity. To obtain information about the structural dynamics of the secondary and tertiary structures of human mitochondrial tRNAs and their mutants (tRNA^{Lys}-WT, -A8344G, tRNA^{Ser(UCN)}-WT, -G7497A, -T7512C, tRNA^{Gln}-WT, -T4336C, tRNA^{Leu(CUN)}-WT, -A12320G, -G12315A), we have analysed the structure of their *in vitro* transcripts using the following biochemical methods: chemical and enzymatic probing of RNA, UV-melting curves, nondenaturing gelelectrophoresis and post-transcriptional modification with mitochondrial extracts, Pus1 and Pus4 from *Saccharomyces cerevisiae*.

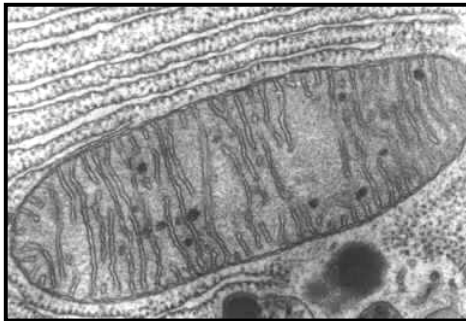
Results of enzymatic and chemical probing and also of UV-melting curve measurements suggest that both mutants of tRNA^{Leu(CUN)}, A12320G and G12315A, possess an unusual structure compared to the wild-type. The mutation G7497A, which leads to a C to U transition, changes a G-C pair in the D-stem of the tRNA^{Ser(UCN)} into a G•U wobble pair. It was shown that this causes a dramatic decrease of the steady-state level of functional tRNA molecules below 10 %, as well as a 40 % lower rate of protein synthesis [Mollers et al., 2005]. The chemical and enzymatic RNA probing at different temperatures suggests that the mutant exhibits an unusual structure, which is also apparent in nondenaturing gel electrophoresis experiments. The structural disturbance introduced by the wobble-pair was also shown to affect recognition by modification enzymes including Pus4 and Pus1 from *S.cerevisiae*. The structural dynamics of partial modified and unmodified *in vitro* transcripts were analysed by UV-melting curves. These experiments suggest an important role of post-transcriptional modifications in structural and, likely, metabolic stability of this tRNA.

In summary, our results showed that most mutations in the core-region of tRNA significantly affect the tRNA structure. Examination of post-transcriptional modification of human mitochondrial tRNAs and their pathogenic mutants with a mitochondrial extract showed a reduction in the modification levels of all mutants, except tRNA^{Gln}-T4336C, that lead to increase of pseudouridine synthase activity.

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind Organellen eukaryotischer Zellen, die einen Durchmesser von 0,2 - 1 μm haben (Abbildung 1.1). Ihre wesentliche Funktion besteht darin, aus der Verbrennung von Kohlenhydraten und Fetten mittels Oxidation einfache Energieträger wie NADH und FADH_2 zu gewinnen, und anschließend durch verschiedene biochemische Reaktionen der Atmungskette ADP mit Hilfe oxidativer Phosphorylierung in energiereiches ATP umzuwandeln. Mitochondrien



werden deshalb oft auch als „Kraftwerke“ der Zelle bezeichnet. Sie kommen in allen Zellen außer in den roten Blutkörperchen (Erythrozyten) vor.

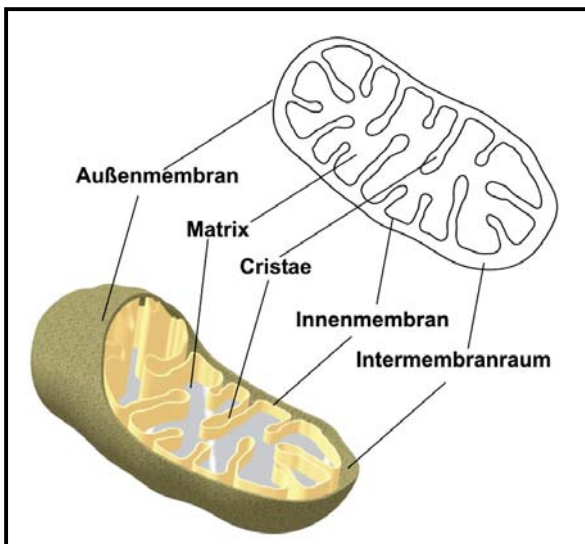
Abbildung 1.1: Elektronenmikroskopisches Bild eines Mitochondriums (fusionanomaly.net/mitochondria.html).

Nach der Endosymbiontentheorie haben sich Mitochondrien aus einem aerob lebenden, Sauerstoff-atmenden Bakterium entwickelt, welches im Laufe der Evolution von einer mitochondrienlosen eukaryotischen Wirtszelle aufgenommen wurde. Das Zusammenspiel der beiden Organismen hat sich dann im Verlauf der Evolution zu einer gegenseitigen Abhängigkeit entwickelt. Wesentliche Schritte beim Verlust der Selbständigkeit waren die Verlagerung vieler ursprünglich prokaryotischer Gene in den Zellkern [Gray, 1989], [Gray et al., 1999].

Je nach Energiebedarf besitzen Zellen einige wenige (z.B. Hautzellen nur ca. ein Dutzend) bis tausende Mitochondrien (z.B. Herz, Leber, Nieren); jede Organelle enthält wiederum zwei bis zehn mtDNA-Kopien [Veltri et al., 1990]. In den 50er Jahren gelang es erstmals mit Hilfe der Elektronenmikroskopie die komplexen intramitochondrialen Strukturen sichtbar zu machen [Palade, 1953].

1.1.1 Struktur der Mitochondrien

Mitochondrien besitzen zwei Membranen (Abbildung 1.2). Die äußere Membran enthält Porine und dient damit als Diffusionsbarriere. In der stark gefalteten inneren Membran sind die wesentlichen Enzyme der Atmungskette eingebettet und diese Membran ist für die meisten



kleinen Moleküle und Ionen undurchlässig. Sie ist zur Vergrößerung der Oberfläche in zahlreiche sogenannte Cristae gefaltet. In diesen Cristae befinden sich die Enzyme der mitochondrialen Atmungskette. Die innere Membran umschließt die mitochondriale Matrix, die die DNA und alle zur Genexpression notwendigen Elemente enthält. Die Ribosomen sind kleiner als die cytoplasmatischen und gehören dem prokaryotischen 70S Typ an.

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Mitochondriums.

Mitochondrien variieren je nach Zelltyp. Je nach den Einstülpungen der Innenmembran unterscheidet man: Crista-Typ und Tubulus-Typ. Außerdem kann die Matrix je nach Proteinreichtum hell und dunkel erscheinen.

Lange Zeit ging man davon aus, dass Mitochondrien in der Regel eine nierenförmige Gestalt aufweisen und in der Zelle frei verteilt vorliegen. Erst die Anwendung von spezifischen Farbstoffen in lebenden Zellen zeigte, dass Mitochondrien ein dynamisches Netzwerk ausbilden [Hermann and Shaw, 1998; Yaffe, 1999]. Sie bewegen sich kontinuierlich an den Bahnen des Zytoskeletts entlang, fusionieren miteinander und teilen sich wieder [Bereiter-Hahn and Voth, 1994]. Die Dynamik der Mitochondrien spielt eine wichtige Rolle für ihre Vererbung bei der Zytokinese und für den Erhalt mitochondrialer Funktionen in der vegetativen Zelle. Der intrazelluläre Transport von Mitochondrien wird (abhängig vom Zelltyp) entweder durch Aktinfilamente oder durch Mikrotubuli vermittelt. Mitochondrien sind oft in intrazellulären Bereichen hohen Energiebedarfs lokalisiert. Nervenzellen stellen dafür ein Beispiel dar. Hier werden die Mitochondrien im Zellkörper sich teilen und anschließend durch das Axon über große Entfernungen zur Synapse transportiert werden, wo sie Energie für neurosekretorische Prozesse

zur Verfügung stellen. Der Transport von Mitochondrien wird durch molekulare Motorproteine vermittelt, die an die Oberfläche der Organellen binden und dann entlang der Bahnen des Cytoskeletts wandern [Hollenbeck, 1996; Langford, 1995; Nangaku et al., 1994].

1.1.2 Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind an vielen Stoffwechselprozessen in der Zelle beteiligt; beispielsweise die Gewinnung von Energie in Form von ATP durch die oxidative Phosphorylierung, Citratzyklus, Fettsäureabbau, Biosynthese der Eisen/Schwefel-Gruppen, Apoptose und der Synthese des Häm-moleküls, der Nukleotide und von Phospholipiden [Kozlov et al., 1999] [Lill and Kispal, 2000].

Die oxidative Phosphorylierung ist die wichtigste Reaktionsfolge zur Energiegewinnung in aeroben Organismen. Die komplexen Metabolite unserer täglichen Nahrung wie Kohlenhydrate, Lipide und Proteine werden zunächst zu ihren monomeren Einheiten, vor allem Glukose, Fettsäuren, Glycerin und Aminosäuren und anschließend zu Acetyl-CoA abgebaut. Im Citronensäure-Zyklus wird Acetyl-CoA durch O_2 zu CO_2 oxidiert, wobei gleichzeitig die Coenzyme NAD^+ und FAD zu deren energiereichen Zwischenprodukten NADH und $FADH_2$ reduziert werden. Im letzten Teil dieses Stoffwechselweges werden Elektronen von NADH oder $FADH_2$ auf den Sauerstoff O_2 übertragen, und zu H_2O reduziert. Die dabei frei werdende Energie treibt die Synthese des energiereichen ATP aus ADP durch Phosphorylierung mit Pyrophosphat an (Abbildung 1.3).

Die Elektronenübertragung von NADH oder $FADH_2$ auf O_2 wird durch eine Reihe hintereinander geschalteter Enzyme in der inneren Mitochondrienmembran vermittelt. Die Elektronen werden von den Komplexen I [Janssen et al., 2006] und II [Sun et al., 2005] durch Coenzym Q an Komplex III [Xia et al., 1997] und weiter durch das Membranprotein Cytochrom C an Komplex IV [Taanman, 1997] transportiert, bis sie schließlich auf molekularen Sauerstoff übertragen werden. Allerdings findet die Übertragung von Elektronen bei zirka ein bis drei Prozent des Sauerstoffs unvollständig statt, wobei anstelle von Wasser das Superoxidation (eine Sauerstoffbindung mit einem ungepaarten Elektron, $O_2^{\cdot-}$) entsteht, die als reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) bezeichnet werden. Diese erzeugen in der Zelle den „oxidativen Stress“, der Schäden in Zellen verursacht, zur Abnahme der Mitochondrien und mtDNA führt [Lee et al., 2000], und damit zum Altern beiträgt.

Das Altern ist mit einer progressiven Abnahme von Muskelmasse und Muskelleistung verbunden [Evans, 1995]. Der Verlust der Masse wurde im Skelettmuskel, Gehirn und anderen Geweben gefunden, die einen hohen Bedarf an oxidativer Phosphorylierung Energie haben. [Fries, 1980; Shigenaga et al., 1994]. Eine steigende Zahl von atmungsdefekten Zellen wurde auch in Herz und Skelettmuskeln nachgewiesen [Muller-Hocker, 1989] [Muller-Hocker, 1992].

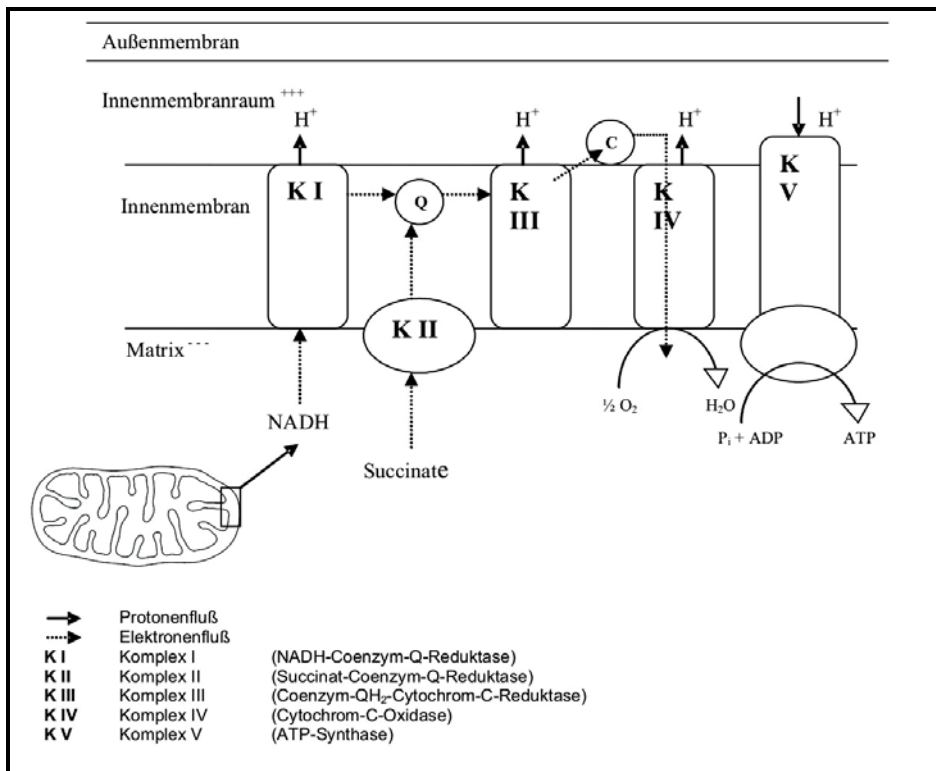


Abbildung 1.3: Oxidative Phosphorylierung.

Mitochondrien sind nicht nur die Energielieferanten unserer Zellen – sie bestimmen auch über Leben und Tod. Aus bisherigen Untersuchungen ist bekannt, dass apoptogene Faktoren wie Cytochrom C und AIF (*apoptosis inducing factor*) in einem frühen Stadium der Apoptose aus den Mitochondrien freigesetzt werden [Green and Reed, 1998].

Bis vor kurzem ging man davon aus, dass Fe-S-Cluster in der Zelle spontan entstehen und in Apoproteine eingebaut werden, 1998 wurde jedoch gezeigt, dass die Fe-S-Cluster durch die ISC (*iron sulfur cluster*)-Maschinerie in den Mitochondrien synthetisiert und in die Apoproteine eingebaut werden [Zheng et al., 1998].

1.1.3 Transport der kernkodierte Proteine in das Mitochondrium

Etwa 85% der mitochondrialen Proteine sind kernkodiert, werden im Cytoplasma translatiert und in die Mitochondrien transportiert. Es sind nicht nur die Untereinheiten der Atmungskettenkomplex-Proteine, sondern auch die DNA- und RNA-Polymerasen, ribosomale Proteine, verschiedene Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren, tRNA Modifikationsenzyme, aaRS-en (*Aminoacyl-tRNA Synthetases*) und viele weitere Enzyme, die für die tRNA-Reifung gebraucht werden. Die Transportmaschinerie selbst ist auch von kernkodierten Proteinen abhängig. Man kennt drei Membrankomplexe, die an dem Transport von Polypeptidketten in die Mitochondrien beteiligt sind: den TOM (*translocase of the outer membrane*)-Komplex in der Außenmembran, sowie die TIM22- und TIM23 (*translocase of the inner membrane*)-Komplexe in der Innenmembran.

Die mitochondrialen Proteine besitzen entweder ein internes Importsignal oder eine N-terminale Präsequenz. Diese Präsequenzen sind 20-60 Aminosäuren lang und bilden eine amphipathische α -Helix aus, die auf einer Seite positive und auf der anderen lipophile Aminosäureseitenketten tragen [von Heijne, 1986]. Nach dem Import werden die Präsequenzen proteolytisch entfernt. Ein zu transportierendes Protein bildet zunächst mit Hitzeschockproteinen einen Komplex, bevor es an das Protein in der Mitochondrienmembran, Tom, andocken kann. Im Intermembranraum werden die Proteine mit einer N-terminalen Präsequenz auf den TIM23-Komplex bzw. Proteine mit einem internen Importsignal auf den TIM22-Komplex übertragen, und von dort in die Matrix inseriert [Truscott et al., 2003] (Abbildung 1.4).

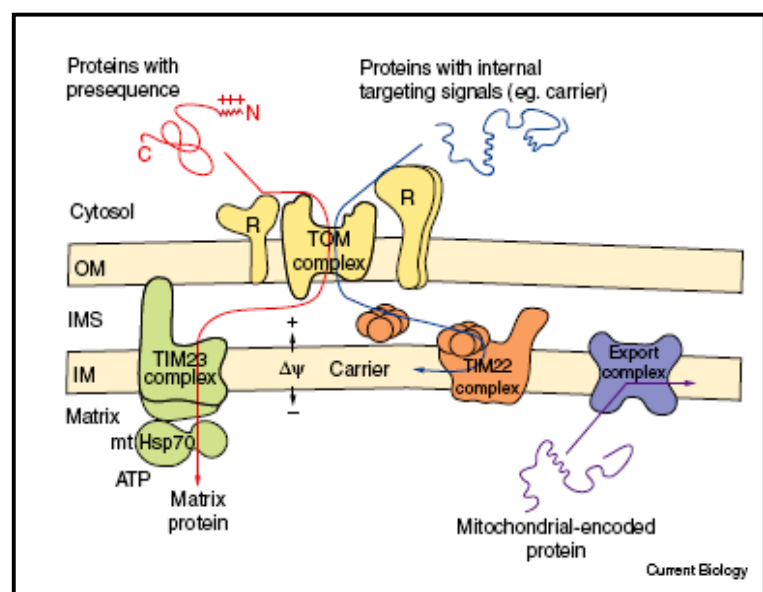


Abbildung 1.4: Proteintransport in Mitochondrien [Truscott et al., 2003]. OM, Außenmembran; IMS, Intermembranraum; IM, Innere Membran; TOM, *translocase of the outer membrane*; TIM, *translocase of the inner membrane*.

1.2 Mitochondriale DNA des Menschen

Das Mitochondrium besitzt ein eigenes Genom. In menschlichen Zellen kommen bis zu hundert Mitochondrien vor und bis zu tausend Kopien der mtDNA pro Zelle [Veltri et al., 1990]. Die mitochondriale DNA ist ein ringförmig geschlossenes, doppelsträngiges, superhelikales DNA-Molekül mit einer Länge von 16569 bp, und kodiert für 13 Proteine von insgesamt 84 Untereinheiten der Atmungskette (ND1-6 und ND4L Untereinheiten für NADH Dehydrogenase (Komplex I); COX1-3 und CYTB für Cytochrom C Oxidase (Komplex IV) ATP6 und ATP8 für ATP-Synthase (Komplex V)), 2 rRNAs (16S und 12S) und 22 tRNAs (Abbildung 1.5) [Brandon et al., 2005]. Die restliche Proteine (~1000) werden im Zellkern kodiert [Anderson et al., 1981] [Attardi and Schatz, 1988]. Tabelle 1.1 gibt eine Übersicht über die einzelnen Untereinheiten der Atmungskette (Komplex V wird auch mit aufgeführt).

Komplex	I	II	III	IV	V
Synonym	NADH-Coenzym Q-Reduktase	Succinat-Coenzym Q-Reduktase	Coenzym-QH2 Cytochrom-C-Reduktase	Cytochrom C-Oxidase	ATP-Synthase
Kern-kodierte Untereinheiten	35	4	10	10	12
Mitochondrial-kodierte Untereinheiten	7	0	1	3	2

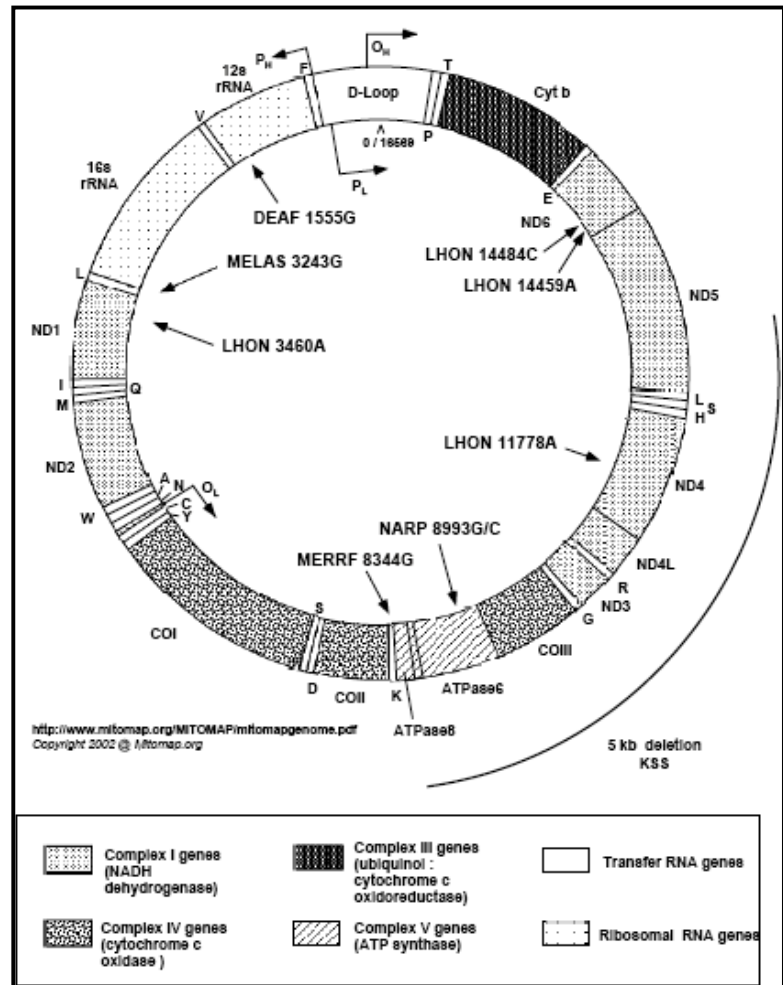
Tabelle 1.1: Übersicht über die Anzahl der kern- bzw. mitochondrial-kodierten Untereinheiten der vier Komplexe der Atmungskette und ATP-Synthase.

Im Gegensatz zum Kerngenom besitzt das mitochondriale Genom eine sehr kompakte Struktur, d. h. ca. 93% der DNA-Sequenzen sind kodierend (Abbildung 1.5). Mitochondriale DNA ist instabil. Der fehlende Histonschutz, ein ineffizienter Fehlererkennungs- und Reparaturmechanismus und der Einfluss von starken Oxidantien machen das mt Genom verletzlich, was sich in einer 10 bis 20fach höheren Mutationsrate als in der chromosomalen DNA (im Zellkern) niederschlägt [Croteau et al., 1999] [Marcelino and Thilly, 1999].

Punktmutationen und Deletionen im mitochondrialen Genom können zu erheblicher Beeinträchtigung der Atmungskette führen. Bei Mutationen der mtDNA ist nur ein Teil der DNA-Moleküle betroffen, so dass in einem Gewebe neben Wildtyp-mtDNA auch mutierte gefunden werden kann (*Heteroplasmie*). Wenn das Verhältnis von mutierter DNA zu Wildtyp einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, kann die verminderte Energieversorgung der Zelle nicht mehr kompensiert werden und die mtDNA-Mutation wird pathogen. Ist die

Energiebereitstellung durch die Mitochondrien gestört, kann es beim Menschen zur Ausbildung schwerer Erkrankungen kommen (1.4). Das mitochondriale Genom wird nahezu ausschließlich maternal vererbt [Giles et al., 1980], obwohl in seltenen Einzelfällen auch paternale mtDNA nachweisbar sein kann [Schwartz and Vissing, 2002].

Abbildung 1.5: Genkarte der menschlichen mitochondrialen DNA und die Lokalisierung der geläufigsten Krankheitsmutationen. Der äußere Strang wird als „Heavy-Strand“ (H-Strang), der innere als „Light-Strand“ (L-Strang), bezeichnet. Auf dem Genom befinden sich neben den 13 Strukturgenen von den Untereinheiten der Atmungskettenenzyme die Gene von 2 rRNAs und 22 tRNAs. ND1 bis ND6 kodieren für die Untereinheiten des Komplexes I der Atmungskette, die Gene CO I (COX I) bis CO III (COX III) kodieren für Komplex IV. Cyt b kodiert für das Cytochrom b des Komplexes III und ATPase 6/8 für Untereinheiten des F₀-Bereiches der ATP-Synthase. O_H und O_L sind die Replikationsursprünge des H- bzw. des L-Stranges. P_H und P_L sind die Promoter für die jeweiligen Stränge [Kogelnik et al., 1996].



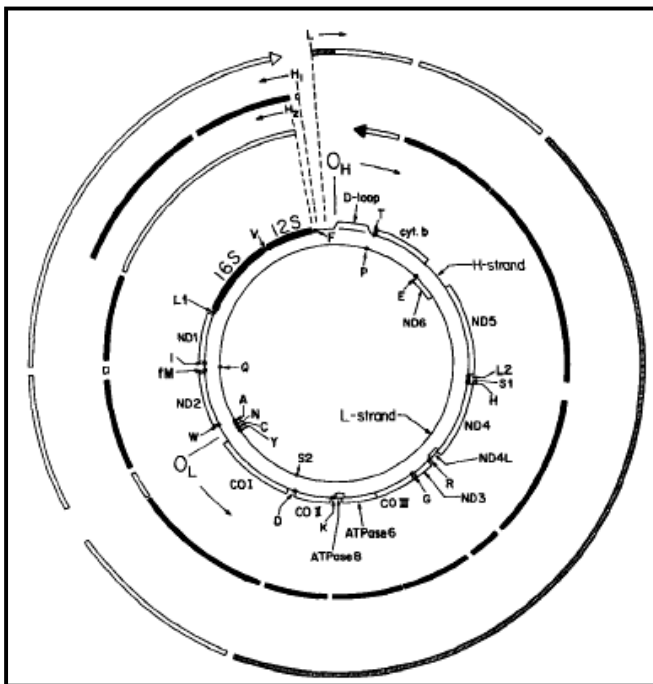
1.2.1 Replikation der mitochondrialen DNA

Mitochondrien besitzen komplette Maschinerien zur Replikation, Transkription und Translation. Die Replikation der mtDNA ist abhängig von kernkodierten Genprodukten (DNA-Polymerase γ , mtTFA, Topoisomerase II). Die mtDNA wird in einen H-Strang (H; *heavy*) und einen L-Strang (L; *light*) unterteilt, was sich von unterschiedlicher Sedimentationsgeschwindigkeit im Caesium-

Chlorid-Gradienten ableitet. Eine kurze dreisträngige Region, D-Loop genannt (*D*; *displacement*) [Kasamatsu et al., 1971] enthält den Replikationsursprung O_H . Bei der Replikation wird zunächst der schwere Strang ausgehend vom Replikationsursprung O_H zu etwa 2/3 repliziert, bis der Replikationsursprung O_L für den leichten Strang erreicht ist. Anschließend erfolgt die Replikation des gesamten L-Stranges gegen den Uhrzeigersinn und gleichzeitig die Fortsetzung der Replikation des H-Stranges in der anderen Richtung [Clayton, 2003]. Bei eukaryotischer Kern-DNA existieren viele Stellen, an denen die Replikation gleichzeitig oder in kurzen Zeitabständen beginnt. Neuste Ergebnisse durch AFM- (*atomic force microscopy*) und 2D-Agarosegel-Analysen deuten auf einen alternativen Replikationsweg mit mehreren O_L für mtDNA hin [Brown and Clayton, 2006].

1.2.2 Transkription der mitochondrialen DNA

Die Transkription der mtDNA erfolgt mittels einer nukleär kodierten RNA-Polymerase. Die zwei Promotoren für die Transkription des schweren (H-) und ein Promotor für die Transkription des leichten (L-) Stranges befinden sich in einer 1121 Basenpaare langen, nicht-kodierenden Region der mtDNA, die als D-Loop (*displacement-loop*) bezeichnet wird. Die Transkription des H-Stranges erfolgt im Uhrzeigersinn und die des L-Stranges entgegen dem Uhrzeigersinn



(Abbildung 1.6). Es entstehen polycistronische Transkripte, aus denen die rRNAs, tRNAs und mRNAs durch RNasen prozessiert und die mRNAs dabei polyadenyliert werden [Attardi and Schatz, 1988; Clayton, 2000].

Abbildung 1.6: Transkription der mitochondrialen DNA. H-Strand, äußerer Strang, L-Strand, innerer Strang. H_1 und H_2 sind die Promotoren für den H-Strang und L , für den L-Strang [Attardi and Schatz, 1988].

1.2.3 Der genetische Code

Die DNA enthält nur 4 unterschiedliche Mononukleotide, daher ist eine Abfolge von mindestens drei Nukleotiden (Triplet) erforderlich, um jeder der 20 Aminosäuren ein definiertes Codon zuzuordnen. Es stehen $4^3 = 64$ Möglichkeiten als Kombination von drei Basen zur Verfügung (Tabelle 1.2). Diese Zuordnung der Aminosäuren hat man bei allen Lebewesen gefunden, deshalb nennt man den genetischen Code „*universell*“. Ausnahmen sind vor allem in Mitochondrien, aber auch bei einigen Bakterien, einzelligen Organismen und Pilzen zu finden. In den Mitochondrien wird das Stop-Codon UGA oft als Trp, das Ile-Codon AUA als Met und das Arg-Codon UAG als Stop-Signal verwendet (Tabelle 1.2 grün). In Ciliaten wird das Stop-Codon UAG häufig als Gln und das Stop-Codon UGA in Mycoplasma als Trp translatiert.

Manche Codons kodieren für dieselbe Aminosäure, obwohl sie sich in der dritten Base unterscheiden. Die tRNAs, die mit unterschiedlichen Anticodons von der gleichen Aminoacyl-tRNA-Synthetase beladen werden, nennt man Isoakzeptoren. Gleichzeitig können auch verschiedene Basentriplets mit der gleichen tRNA interagieren (Wobble-Hypothese), weil die dritte Position des Codons unübliche Basenpaare bildet [Barrell et al., 1980].

erste Base	zweite Base				dritte Base
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop ochre	Stop opal (Trp)	A
	Leu	Ser	Stop amber	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile (Met)	Thr	Lys	Arg (Stop)	A
	Met	Thr	Lys	Arg (Stop)	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Tabelle 1.2: Der universelle genetische Code mit 61 Codons für 20 Aminosäuren und drei Stopp-Codons. Start-Codon ist immer AUG (Methionin). Das Stopp-Codon UAA wird auch als *ochre*, das Stopp-Codon UGA als *opal* und das Stopp-Codon UAG als *amber* bezeichnet, u.a. nach dem Name des Erstentdeckers, der Bernstein hieß; das englische Wort für Bernstein ist AMBER. OCKER und OPAL sind weitere Wortspiele, die von AMBER abgeleitet werden. Unterschiede zwischen dem „universellen“ und dem mitochondrialen genetischen Code sind grün gekennzeichnet.

Die erste genetisch codierte modifizierte Aminosäure war Selenocystein, das in Proteinen von Archea bis zu Säugetieren gefunden wurde [Berry et al., 2001; Rother et al., 2000]. Sie entsteht nicht durch posttranslationale Modifikation, sondern wird durch das UGA (Opal-Stoppocodon) kodiert [Chambers et al., 1986].

Die Arbeitsgruppen von Krzycki und Chan haben 2002 eine andere genetisch codierte, 22-ste Aminosäure (Pyrrolysin) beschrieben [Hao et al., 2002] [Srinivasan et al., 2002].

1.3 tRNA

tRNAs sind „Adapter“ zum Einbau der Aminosäuren bei der Translation der mRNA, dabei gibt es zum Teil mehrere tRNA-Spezies für eine Aminosäure (Isoakzeptoren). Für das Ablesen der mRNA ist es wichtig, dass das Ribosom das richtige Leseraster auf der mRNA erkennt. Die zwei funktionellen tRNA Bindungsstellen (A und P) am Ribosom sind für die Bindung und das Ablesen der mRNA verantwortlich. Die Funktion der dritten (E-Stelle) wurde für die Kontrolle der Einhaltung des Leserasters der mRNA bei der Proteinbiosynthese nachgewiesen [Marquez et al., 2004]. Die Länge aller reifen tRNAs liegt zwischen 73-95 Nukleotiden. (Abbildung 1.7).

Die aktuelle tRNA-Datenbank besteht aus 7600 tRNA Gensequenzen aus 131 Organismen sowohl Archaeobakterien, Eubakterien als auch Eukaryoten, sowie 571 tRNA-Sequenzen auf RNA-Ebene inklusive 79 modifizierten Basen. Davon sind 64 Sequenzen von mitochondrialen Säuger tRNAs [Sprinzl and Vassilenko, 2005].

1.3.1 Struktur der tRNA

Für die Interaktionen zwischen einer tRNA und den entsprechenden Enzymen, wie aaRS, Modifikationsenzymen, Translations- und Elongationsfaktoren sowie für die Erkennung durch Ribosomen, sind konservierte Sequenzen der tRNA-Struktur verantwortlich. Die Struktur der RNA lässt sich in drei grundlegende Organisationsebenen einteilen: Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur. Die sekundäre Struktur der tRNA entsteht durch Haarnadelschleifen-Bildungen der bestimmten Regionen der primären Sequenzen und wird in sechs Bereiche unterteilt. Der Akzeptorarm besitzt einen aus 7 Basenpaaren bestehenden Stamm mit einem 3'-terminalen

Überhang 5'-NCCA-3'. Dessen Adenosin wird mit der entsprechenden Aminosäure verestert. T-Arm und Anticodonarm bestehen jeweils aus einem 5 Basenpaaren langen Stamm (Stem) und einer meist 7 nukleotidlangen Schleife (Loop). Der D-Arm beginnt mit einem 3-4 Basenpaaren langen Stamm, während die Schleife wie auch der variable Arm (auch Connector 2 genannt) in ihrer Größe variieren [Steinberg et al., 1997]. Die D- und T-Regionen haben ihren Namen von den modifizierten Nukleotiden in den Loops, Dihydrouridin (D) bzw. Ribothymidin (T). Die sechste Region wird Connector 1 genannt und ist eine Übergangsregion zwischen Acceptor- und D-Arm.

Die Tertiärstruktur einer tRNA wurde erstmals unabhängig voneinander von Klug und Rich beschrieben [Kim et al., 1974; Robertus et al., 1974]. Kristallstrukturanalysen zeigten, dass die tRNAs in ihrer dreidimensionalen Struktur ein gedrehtes „L“ darstellen. Die beiden Schenkel des L bestehen aus dem auf dem Akzeptor-Arm gestapelten T-Arm, der eine durchgehende 11 Nukleotide lange Doppelhelix bildet und dem Anticodonarm mit D-Arm, der nicht gestapelt aber ähnlich angeordnet ist. Zur Bildung der L-Struktur erfolgt eine Interaktion zwischen T-, D- und variablem Loop, die durch tertiäre Wechselwirkungen entsteht [Steinberg et al., 1997] (Abbildung 1.7). In diesem so genannten Kernbereich der tRNA sind viele Nukleotide wie z.B. m¹G9, m²G10, m²₂G26, T54, Ψ55 und m⁵C48/49 modifiziert [Limbach et al., 1994] (1.3.5). Die drei typischen Wechselwirkungen für die klassischen tRNAs sind G19–C56, G18–Ψ55 und T54–A58. Das G15 – C48 Basenpaar ist ein “reverses Watson-Crick-Paar” und T54–A58 ein “reverses Hoogsteen-Paar”. Die Kristallstrukturanalyse von tRNA zeigte, dass der T-Loop bei der Stapelung des G53–C61 Basenpaars über dem reversen *trans* Hoogsteen T54–A58 Basenpaar stabilisiert wird und dabei eine charakteristische Wölbung der zwei Pyrimidine in Positionen 59 und 60 nach außen entsteht [Westhof et al., 1983] [Romby et al., 1987] [Dirheimer et al., 1995]. Das Basenpaar G18 – Ψ55 ist auch über das T54–A58 Basenpaar gestapelt. Es existieren außerdem eine Reihe von Basentriplets, die aus einem Watson-Crick Paar bestehen, das über eine oder zwei Wasserstoffbrücken mit einer weiteren Base verknüpft ist: U8–A14–A21, 9–23–12, 25–10–45, 13–22–46. In all diesen Triplets sind die Kettenverläufe notwendigerweise einmal parallel und einmal antiparallel.

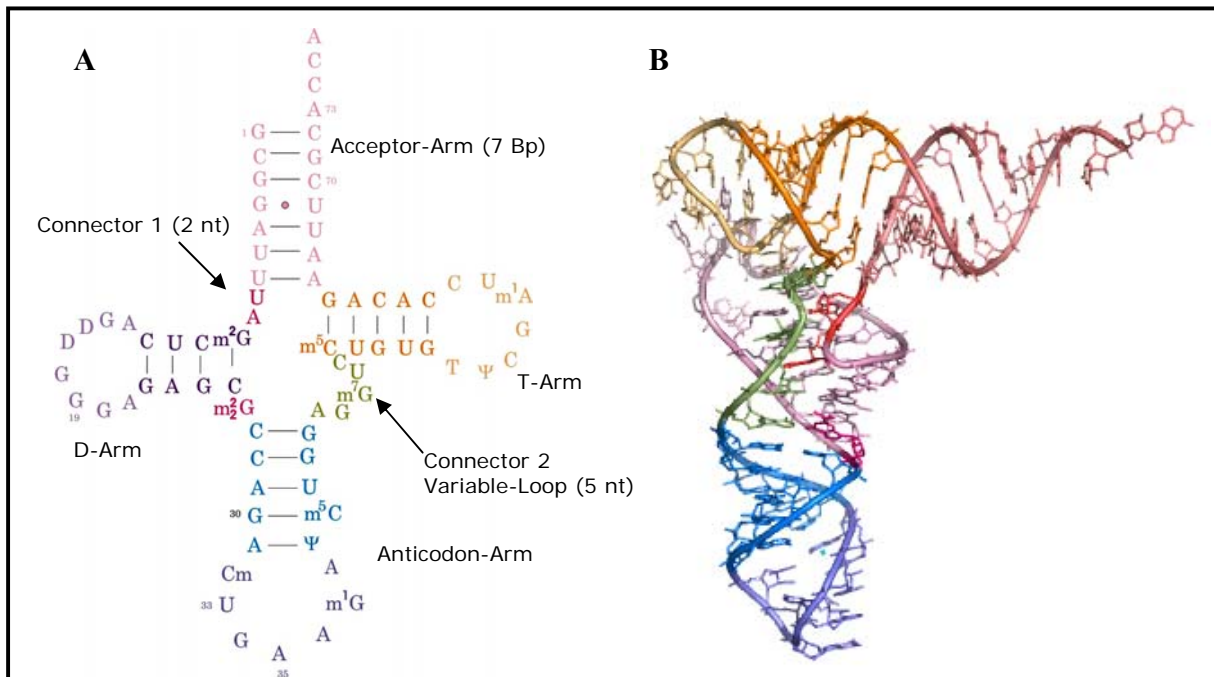


Abbildung 1.7: Diagramm der Sekundär- und 3D-Struktur der tRNA am Beispiel der Hefe tRNA^{Phe}. Die Domänen sind farblich gekennzeichnet. **(A)** Modifikationen sind in der klassischen Kleeblattstruktur der tRNA gezeigt. Watson-Crick-Basenpaare sind durch Linien und G-U-Wobble-Basenpaar durch einen Kreis dargestellt. Ψ, Pseudouridin; D, Didyrouridin; T, Ribothymidin. **(B)** Klassische Darstellung der Tertiärstruktur von cytosolischer tRNA^{Phe} aus Hefe in der aus der Kristallstruktur der tRNA (PDB-Nummer: 1EVV) abgeleiteten L-Form.

RNA Doppelhelices liegen ausschließlich in der A-Form vor. Neben den klassischen Watson-Crick Basenpaarungen [Leontis and Westhof, 2001] [Leontis et al., 2002] kommen aber recht häufig auch nicht-Watson-Crick Basenpaarungen vor, wie z.B. G•U [Helm et al., 2000; Masquida et al., 1999] [Masquida and Westhof, 2000]. Sie passen jedoch relativ gut in die Watson-Crick-Geometrie der RNA-Helix und erzeugen nur eine geringfügige Ausbuchtung des Phosphatrückgrates.

tRNA-Moleküle benötigen divalente Kationen wie Mg²⁺, um sich in die biologisch aktive Form zu falten. Kristallstrukturanalysen deuten z.B. bei tRNA^{Phe} auf vier Magnesiumbindungsstellen hin. Alle vier Stellen befinden sich in den nicht helikalen Regionen der tRNA. Zwei Magnesiumionen binden an die Nukleotide des D-Loops; das erste an die G19 und das zweite an G20, A21. Ein anderes Magnesium wird im variablen Loop an die Phosphatreste der Nukleotide U8 bis U12 durch Wasserstoffbrücken koordiniert. Die vierte Bindungsstelle befindet sich im

Anticodon-Loop. Das Magnesiumion wird durch die Reste 37 bis 39 und 32 gebunden und an der Bildung der Anticodongeometrie stark beteiligt [Holbrook et al., 1977].

1.3.2 Struktur mitochondrialer tRNA

Das mitochondriale Genom kodiert 22 tRNAs und enthält damit alle 20 für die Translation benötigten tRNAs (es gibt jeweils zwei Isoakzeptoren für $tRNA^{Leu}$ und $tRNA^{Ser}$, die strukturell von den klassischen tRNAs abweichen) [Dirheimer et al., 1995]. 20 der 22 menschlichen mitochondrialen tRNAs falten sich in die klassische „Kleeblatt“-Struktur (Abbildung 1.7). Zwei tRNAs, die zu der Ser-Familie gehören, unterscheiden sich allerdings stark von den klassischen tRNAs (Abbildung 1.8). $tRNA^{Ser(AGY)}$ hat einen gekürzten Connector 1, dem der komplette D-Arm fehlt [de Bruijn et al., 1980] [Hayashi et al., 1997] und auch $tRNA^{Ser(UCN)}$ hat einen gekürzten Connector 1, sowie einen verlängerten Anticodon-Arm (6 Basen-Paare statt 5) [Hayashi et al., 1998; Watanabe et al., 1994].

Bei Untersuchung der 679 mitochondrialen tRNA Sequenzen aus Säugern wurden konservierte Regionen in den Längen der gepaarten Regionen (Stem) und ihrer Schleifen (Loop) festgestellt [Helm et al., 2000]. Alle 20 tRNA Familien enthalten einen 7 Basenpaare langen Akzeptorarm und einen 2 Nukleotide langen Connector 1, der den Positionen 8 und 9 in klassischen tRNAs entspricht. Die D- und T-Loop Längen, welche bei klassischen tRNAs konserviert sind (8-10 Nukleotide bzw. 7 Nukleotide), variieren bei den mt tRNAs (2-11 Nukleotide bzw. von 1-10 Nukleotide) sehr stark. Die variable Region (Connector 2), die bei klassischen tRNAs aus zwischen 4 und 21 Nukleotide bestehen kann, ist bei mt tRNAs nur 2 bis 4 Nukleotide lang. Eine „8 – N ,9 – N“ Faustformel für die Connector 1 und Connector 2 (variable Loop) Regionen wurde von Steinberg und Cedergren 1994 vorgeschlagen: eine tRNA mit N Basenpaaren im Anticodon-Stem muss mindestens 8 – N Nukleotide in Connector1 und 9 – N Nukleotide in Connector2 enthalten [Steinberg and Cedergren, 1994].

Obwohl drei der typischen Wechselwirkungen klassischer tRNAs, nämlich G19–C56, G18–Ψ55 und T54–A58 nur bei wenigen mitochondrialen tRNAs vorhanden sind, wie z.B. $tRNA^{Ser(UCN)}$ [Hayashi et al., 1998], $tRNA^{Leu(CUN)}$ und $tRNA^{Gln}$ [Helm et al., 2000], falten sich die mitochondriale tRNAs in die klassische L-Form. Die Triplets 9-(23-12) und (25-10)-45 aber

auch die Interaktion zwischen 26-44 wurde bei allen tRNAs (ausgenommen tRNA^{Ser(AGY)}) gefunden.

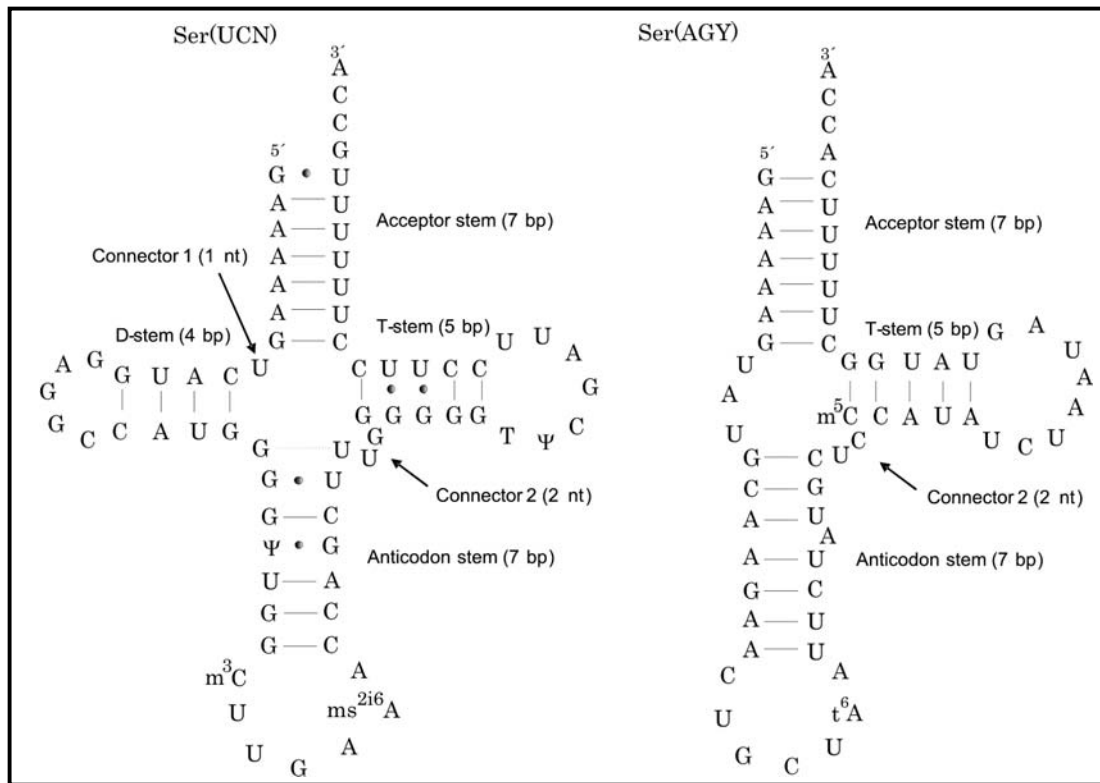


Abbildung 1.8: Humane mitochondriale tRNA^{Ser(UCN)} und tRNA^{Ser(AGY)}.

Bei mitochondrialen tRNAs variiert die Anzahl von Anlagerungsstellen für Magnesiumionen. Das Fehlen von drei Nucleotiden im D-Loop, einem Nucleotid in Connector1 und zwei in dem variablen Loop (insgesamt sechs Nucleotide) bei mt tRNA^{Ser(UCN)} führt zu einer Abnahme der Magnesiumbindungsstellen auf zwei; eine in dem Anticodon-Loop und eine zweite in dem D-Loop.

1.3.3 Prozessierung der tRNAs

Die Biosynthese von tRNAs geschieht durch Transkription von DNA. Die tRNAs werden zunächst als größere Vorläufer-Moleküle mit 5'- und 3'- Extrasequenzen (*leader* bzw. *trailer*) synthetisiert, aus denen die funktionsfähigen tRNAs prozessiert werden [Rossmannith et al., 1995].

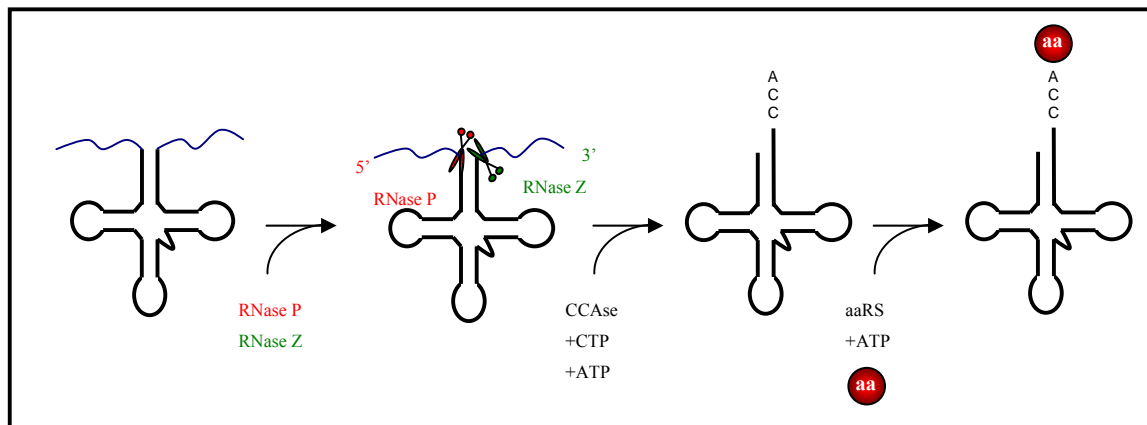


Abbildung 1.9: tRNA-Prozessierung. tRNAs werden als längere Vorläufer-Moleküle synthetisiert, aus welchen die einzelnen tRNAs herausgeschnitten werden. Das Zurechtschneiden am 5'-Ende der tRNA erfolgt durch das Enzym RNase P, das Herausschneiden am 3'-Ende führt die RNase Z durch. Nach der Synthese von CCA Sequenzen an dem 3'-Ende der tRNA wird es durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS) mit einer Aminosäure (aa) verestert.

Abbildung 1.9 präsentiert das Prozessierungsschema von tRNAs. Die Prozessierung beginnt mit der endonukleolytischen Spaltung des 5'-Endes der tRNA. Dafür ist die Endoribonuklease P (**RNase P**) verantwortlich. Die RNase P besteht bei Prokaryoten aus einer kleinen Proteinuntereinheit RnpA (Mr = 15000) und einem RNA-Molekül RnpB (400 Nukleotide). Die RNA-Untereinheit enthält eine tRNA-spezifische Bindedomäne und eine katalytische Domäne [Krasilnikov et al., 2003]. Das RNase P-Enzym der Archea und Eukarya ist komplizierter aufgebaut und benötigt 4-10 Proteinuntereinheiten [Numata et al., 2004]. Die RNase P aus dem Kern enthält 10 Protein-Untereinheiten, Rpp14, Rpp20, Rpp21, Rpp25, Rpp29, Rpp30, Rpp38, Rpp40, hPop5, hPop1 und eine einzige RNA Sequenz, H1-RNA [Jarrous and Altman, 2001]. Die Gruppe von Attardi fand heraus, dass die RNA-Untereinheit von der mitochondrialen RNase P mit der H1-RNA von kernkodiertem RNase P identisch ist [Puranam and Attardi, 2001]. In der Zelle werden die 5'-Enden aller tRNAs von dem selben Enzym prozessiert. Demzufolge wird die Substraterkennung durch die RNase P weniger durch Wechselwirkung mit definierten

Sequenzmotiven, sondern hauptsächlich über die gemeinsamen strukturellen Merkmale der tRNAs vermittelt. Damit ist die L-Form der tRNA das Erkennungselement für die Interaktion mit der RNase P.

Der zweite tRNA-Prozessierungsschritt ist die Spaltung des 3'-Endes der tRNA durch Ribonuklease Z (**RNase Z**) [Schiffer et al., 2003; Vogel et al., 2005]. RNase Z spaltet den *trailer* von der tRNA meistens direkt nach der Diskriminatorbase, und das 3'-Ende der tRNA wird damit für das Addieren der CCA-Sequenzen vorbereitet. Die Reifung von tRNA-Molekülen durch RNase Z passiert nicht nur im Zellkern, sondern auch in den Mitochondrien. Auch hier sind die Kern- und mitochondrialen RNase Z Enzyme identisch [Levinger et al., 2004].

tRNA-Nukleotidyltransferasen (**CCAsen**) sind matrizen-unabhängige Polymerasen, die die Sequenz CCA an den 3'-Enden von tRNAs synthetisieren [Nagaike et al., 2001]. Dieser Schritt ist für die weitere Aminoacylierung der tRNA mit ihrer Aminosäure notwendig. Bei Bakterien kann das CCA-Motiv bei allen tRNA-Genen (wie bei *E.coli*), bei einem Teil der tRNA-Gene (wie bei *Bacillus subtilis*) oder bei keinem der tRNA-Gene kodiert sein. Als Substrat benötigt CCAsen CTP und ATP. Aufgrund einer Sequenzhomologie sind CCAsen in zwei Klassen unterteilt; die Enzyme von Archea bilden die Klasse I während die Enzyme von Eubakterien und Eukaryoten die Klasse II. Obwohl beide Klassen dieselbe Reaktion katalysieren, haben Strukturanalysen gezeigt, dass sich die Strukturen der Enzyme von beiden Klassen grundsätzlich voneinander unterscheiden [Li et al., 2002] [Okabe et al., 2003]. Die Kristallstrukturen der Enzyme mit ATP oder CTP zeigten, dass beide NTP-Substrate mit derselben katalytischen Domäne interagieren (Abbildung 1.10).

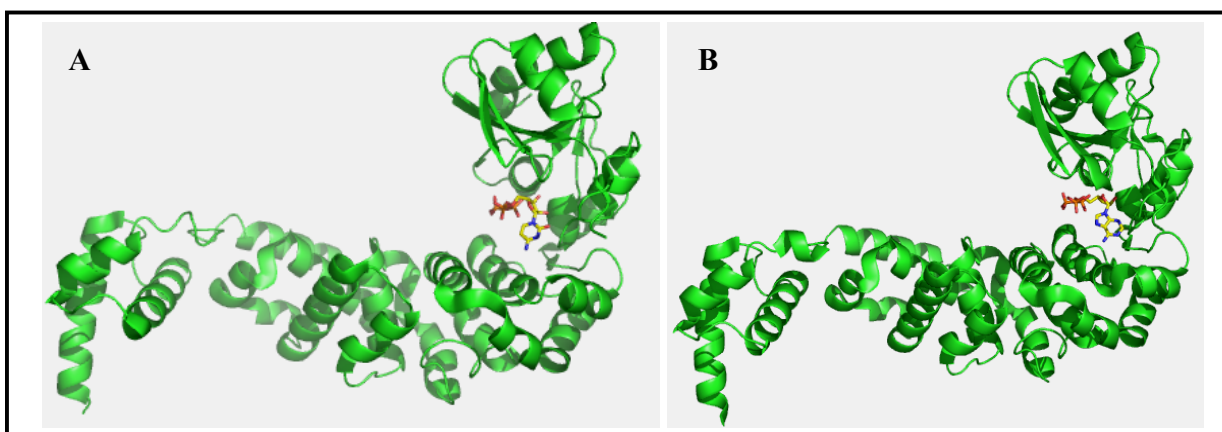


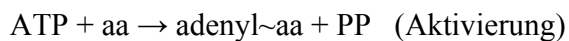
Abbildung 1.10: Kristallstruktur der Klasse II tRNA-Nukleotidyltransferase aus *Bacillus stearothermophilus* mit CTP- (**A**) und ATP- (**B**). In grün ist die tRNA-Nukleotidyltransferase vorgestellt. CTP und ATP Farben entsprechen den Pymol CHNOS Farben. Die Strukturen von 1MIY und 1MIW wurden mit Hilfe der Pymol Software abgeleitet.

1.3.4 Aminoacylierung der tRNA

Die Aminosäuren werden von den Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (**aaRS**) mit den tRNAs verestert. AaRS sind komplexe Enzyme, die ATP als Energiequelle und Mg^{2+} -Ionen als Cofaktoren nutzen. Es gibt je eine aaRS pro Aminosäure [Szymanski et al., 2001]. Eine bestimmte aaRS aminoacyliert gleichzeitig alle Isoakzeptoren für eine spezifische tRNA. Das Enzym erkennt dabei sowohl die Aminosäure als auch die dazugehörige tRNA mit hoher Spezifität.

Es gibt zwei Klassen von aaRS, die verschiedene ATP- und Akzeptor-Stem-Bindungsstellen haben. Die aaRS der Klasse I enthalten als ATP Bindungsstelle ein klassisches Nukleotidbindungsmotiv (Rossmann-Faltung, $\beta\alpha\beta$) und sind meistens Monomere, während Klasse II aaRS Dimere oder Multimere sind und eine 7-strängige antiparallele β -Faltblatt Struktur mit einer flankierenden α -Helix für die ATP-Bindung enthalten. Die Klasse I aaRS bindet den Akzeptor-Stem von der *minor groove*- und die Klasse II von der *major groove*-Seite des Akzeptors (Abbildung 1.11). Bei der katalytischen Reaktion der Klasse I aaRS wird die Aminosäure an das 2'-Ende der tRNA gekoppelt, während bei der Klasse II das 3'-Ende bevorzugt wird. Zu der Klasse I gehören die aaRS für Arginin, Cystein, Glutaminsäure, Glutamin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Tyrosin, Tryptophan und Valin; zu der Klasse II die aaRS für Alanin, Asparaginsäure, Asparagin, Glycin, Histidin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin und Threonin. Beide Klassen sind ihrerseits in die drei Subklassen Ia, Ib, Ic und IIa, IIb, IIc unterteilt [Cusack, 1995].

Der erste Schritt bei der Aminoacylierung ist die Aktivierung der Aminosäure zum Aminoacyladenylat unter Verbrauch von ATP. Anschließend wird diese auf die tRNA übertragen.



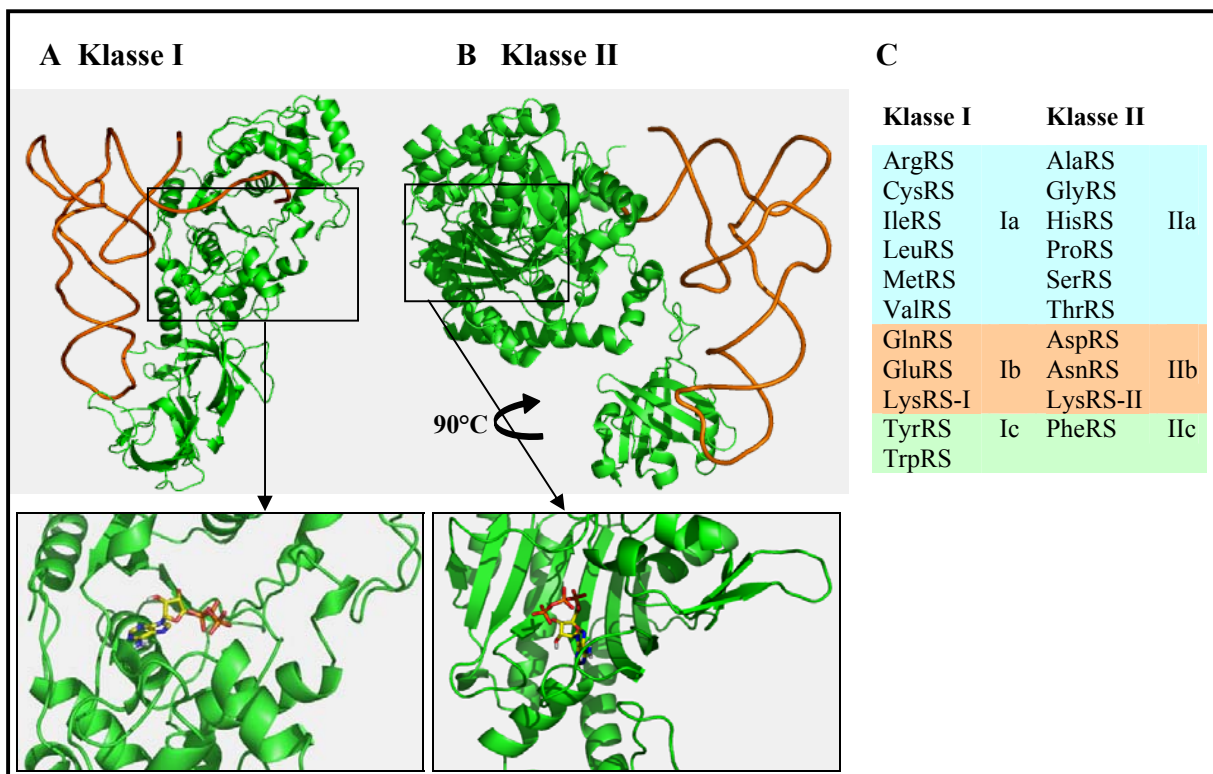


Abbildung 1.11: Kristallstruktur von Aminoacyl-tRNA-Synthetasen der Klasse I (**A**) und II (**B**) am Beispiel von GlnRS für die Klasse I und AspRS für die Klasse II. Oben sind die Kristallstrukturen der tRNA mit entsprechender aaRS und unten die ATP-Bindungsstellen dargestellt. Grün sind die Proteine und orange sind die tRNA. ATP Farben entsprechen den Pymol CHNOS Farben. Die Strukturen von 1QRS und 1IL2 wurden mit Hilfe von Pymol Software abgeleitet. (**C**) Unterteilung der aaRS in zwei Klassen bestehend aus jeweils drei Subklassen.

Dieser Vorgang verlangt die Unterscheidung der tRNA-Moleküle, die in ihrer Tertiärstruktur sehr ähnlich sind. Der Akzeptorstamm und das Anticodon-Triplett sind die wichtigsten Elemente für die Erkennung durch die aaRS [Giege et al., 1998]. Klasse I aaRS erkennen die tRNA an den Basenpaaren des Akzeptor-Stems. Klasse II aaRS erkennen Akzeptor-Stem und Anticodon-Loop. Ein prominentes Beispiel ist die Erkennung der Alanyl-tRNAs. Hier ist die Aminoacylierung durch Alanyl-tRNA-Synthetase von der Anwesenheit des Basenpaars G3-U70 innerhalb des Akzeptorarms der tRNA abhängig [Hou and Schimmel, 1988]. Der Austausch von U70 gegen C hat eine Abschaltung der Aminoacylierung der tRNA zur Folge [Park et al., 1989]. Sehr oft sind Basen innerhalb des Anticodons essentiell für die Erkennung der tRNA durch die entsprechende Synthetase [Rould et al., 1991]. Auch die dem CCA-Ende der tRNA direkt benachbarte Diskriminatorbase N73 ist oft ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal [Hou, 1997]. Der Ersatz

der Diskriminatorbase A73 von menschlicher tRNA^{Leu} durch die für tRNA^{Ser} spezifische Base G erzeugt einen kompletten Identitätswechsel hin zur Aminoacylierung mit Serin. Das umgekehrte Experiment, der Austausch von G73 in humaner tRNA^{Ser} mit dem für tRNA^{Leu} spezifischen A, verursacht den totalen Verlust der Spezifität für Serin, ohne eine Leucinakzeptanz zu schaffen [Breitschopf and Gross, 1994]. Die SerRS ist eine Ausnahme, wobei kein Nukleotid im Anticodon-Loop durch SerRS erkannt wird. Die klassische tRNA^{Ser} enthält einen charakteristischen extralangen variablen Loop (~20 Nukleotide), welcher ein Erkennungselement bei SerRS darstellt. Durch biochemische Studien wurde festgestellt, dass die SerRS von Hefe und Archea denselben Erkennungsmechanismus verwendet, was darauf hinweist, dass diese eigenartige Erkennung des variablen Loops von SerRS in allen drei Reichen hoch konserviert ist, mit einer Ausnahme bei der mitochondrialen tRNA^{Ser} (2 Nukleotide). Während der Evolution wurde dieses Abkürzen des variablen Loops durch Beschaffung von *distal Helix* und *C-Schwanz* von SerRS kompensiert, was die Änderung des Erkennungselementes (T-Loop) zur Folge hatte (Abbildung 1.12).



Abbildung 1.12: Kristallstruktur von mitochondrialen Säuger SerRS mit Seryladenylat. Grün sind die Proteine dargestellt. Seryladenylat Farben entsprechen den Pymol CHNOS Farben. Die Strukturen sind mit Hilfe den Pymol Software von 1WLE abgeleitet.

Die zwanzig mitochondrialen aaRS werden im Cytoplasma synthetisiert und in die Mitochondrien transportiert. Einige menschliche mitochondriale aaRS wurden identifiziert und charakterisiert: LeuRS [Bullard et al., 2000], LysRS [Tolkunova et al., 2000], PheRS [Bullard et al., 1999], TrpRS [Jorgensen et al., 2000; Shen et al., 2006], GlyRS [Mudge et al., 1998; Shiba et al., 1994], HisRS [O'Hanlon and Miller, 2002; O'Hanlon et al., 1995], IleRS [Nichols et al., 1995; Shiba et al., 1994], TyrRS [Bonfond et al., 2005], AspRS [Bonfond et al., 2005] und SerRS [Chimnaronk et al., 2004] [Chimnaronk et al., 2005].

AaRS enthalten eine zusätzliche Korrekturlesefunktion, durch welche falsch angefügte Aminosäuren wieder hydrolytisch abgespalten werden. Auf diese Weise werden auch strukturell sehr ähnliche Aminosäuren mit hoher Selektivität unterschieden. Gut untersucht ist die Diskriminierung zwischen Val und Thr durch die ValRS und zwischen Val und Ile durch die IleRS [Jakubowski, 1996] [Fukai et al., 2000]. Val und Thr sind isosterisch, Val und Ile sind ähnlich hydrophob, allerdings ist Val kleiner als Ile. ValRS aktiviert Val ca. 600 mal rascher zu Val-AMP als Thr zu Thr-AMP und hydrolysiert Thr-tRNA^{Val} bevor es frei gesetzt wird. Das aktive Zentrum für die Hydrolyse bindet Thr (hydrophil) während es Val (hydrophob) ausschließt. IleRS aktiviert sowohl Val als auch Ile zu Val-AMP bzw. Ile-AMP. Eine Bindung von Leu ist durch die Größe ausgeschlossen. Val-AMP wird dann aber rasch hydrolysiert, weil es zu klein für die Bindungsstelle ist. Ile-AMP wird korrekt auf tRNA^{Ile} übertragen.

1.3.5 Posttranskriptionelle Modifikation der tRNA

Ein wichtiger Schritt bei der Reifung von tRNA-Vorläufern ist die Modifikation bestimmter Nukleotide. Mehr als 95 verschiedene posttranskriptionell modifizierte Nukleotide in allen RNA-Typen sind bekannt. Bisher hat man über 80 verschiedene modifizierte Nukleotide in tRNAs gefunden [Limbach et al., 1994; Sprinzl et al., 1998]. Davon sind 36 in Archea, 42 in Bakterien und 47 in Eukaryoten nachgewiesen worden [Auffinger and Westhof, 1998; Rozenski et al., 1999; Sprinzl et al., 1998]. Modifikationen in tRNAs kann man in zwei Gruppen unterteilen. Zur ersten Gruppe gehören die Modifikationen im Kernbereich, die zur Stabilisierung der Tertiärstruktur der tRNA dienen [Helm et al., 1999] [Helm, 2006]. Die häufig vorkommenden Modifikationen im Kernbereich der tRNA sind T54, Ψ 55, m¹A8, m¹G9, m²G10, m¹A58, m²G26, m⁷G46 und m⁵C49 [Ishitani et al., 2003]. Fast alle tRNAs enthalten zwei konservierte modifizierte Nukleotide im T-Loop, nämlich Ribothymidin (T54) bzw. Pseudouridin (Ψ 55) [Grosjean et al., 1996]. Während T54 bei *Mycoplasma* fehlt [Andachi et al., 1989], ist Ψ 55 für die meisten Lebewesen universell.

Pseudouridin-Synthasen sind die meist benutzten Enzyme für posttranskriptionelle Modifikation. Diese Enzyme katalysieren die Isomerisierung von Uridin zu Pseudouridin (Ψ) (Abbildung 1.13) und benötigen für die Katalyse keine Cofaktoren. Alle bekannten Ψ -Synthasen von Archea, Eubakterien und Eukaryoten kann man in fünf Familien unterteilen, die nach *E.coli* Enzymen

benannt werden, RluA, RsuA, TruA, TruB und TruD. Alle Ψ -Synthasen besitzen eine Kernregion mit acht β -Faltblättern sowie verschiedenen Helices und Loops, die die Kernregion flankieren. Ein Aspartatrest in einem Loop ist bei allen Ψ -Synthasen präsent.

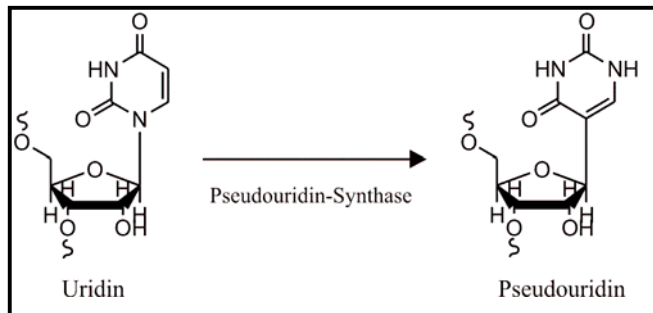


Abbildung 1.13: Isomerisierung von Uridin zu Pseudouridin.

Einige Ψ -Synthasen sind jeweils spezifisch für ein zu modifizierendes Nucleotid an einer bestimmten Position der tRNA. TruB ist ein Enzym, das die Bildung von Ψ 55 im T-Loop katalysiert.

Andere Ψ -Synthasen weisen eine Ortsspezifität in einem bestimmten Organismus auf, wie z.B. RsuA ausschließlich U516 in dem 16S rRNA von *E.coli* isomerisiert. RluA ist ein Beispiel für eine Ψ -Synthase, die bestimmte Positionen von zwei strukturell verschiedenen Typen von RNAs (23S rRNA und bestimmte tRNAs) modifiziert, die in ihren Sequenzen eine Ähnlichkeit zeigen. Die anderen Ψ -Synthasen, wie TruA und RluD sind multifunktionelle Enzyme, die die Bildung von Pseudouridin an verschiedenen Positionen in der selben tRNA katalysieren.

Die hochspezifischen Enzyme erkennen die zu verändernden Nucleotide in der tRNA auf unterschiedliche Weise. Die Arbeitsgruppe von Becker hat gezeigt, dass das hoch konservierte Basenpaar G53-C61 ein Erkennungselement für die Pseudouridine-55 Synthase ist. Nicht nur die Anzahl der Nucleotide in dem Stem (4) und im Loop (8), sondern auch die hoch konservierten Nucleotide in den Positionen 54, 55, 65 und 58 im T-Loop sind wichtig für die Erkennung der tRNA durch Ψ 55 Synthase [Becker et al., 1997]. Bei dem Kontakt mit dem Enzym klappen die drei T-Loop Nucleotide (55, 56 und 57) nach außen, und die Interaktion mit dem D-Loop wird dabei zerstört. Das Histidin 43 ist in der TruB Familie hoch konserviert und dient zur Stabilisierung der tRNA *flipping*-Konformation (Abbildung 1.14 in grün). Basen-*flipping* wurde auch in Kristallstrukturen von DNA-Methyltransferasen dokumentiert [Ahn et al., 2003].

Dieselbe Rolle wie H43 könnte auch die hoch konservierte Aminosäure Arginin in den RluA, RsuA und TruA Familien spielen. Pseudouridine Synthase 1 (Pus1) von *Saccharomyces cerevisiae* ist ein dem TruA ähnliches Enzym. Als Erkennungselement für das Enzym wurden der D-Stem-Loop und das G26-A44 Basenpaar nachgewiesen [Arluison et al., 1998].

Die Pseudouridin Synthase 1 von der Maus (mPus1p) war die erste biochemisch und chemisch charakterisierte Synthase von Wirbeltieren. mPus1p katalysiert die Ψ Bildung in den Positionen 27, 28, 30, 34, 36 von *in vitro* transkribierten tRNAs von Mensch und Hefe. Die Pseudouridin Synthase 1 von *Saccharomyces cerevisiae* (scPus1p) zeigt katalytische Aktivität in sieben Positionen von tRNAs, 26, 27, 28, 34, 36, 65 und 67 und U44 in U2 snRNA [Behm-Ansmant et al., 2006].

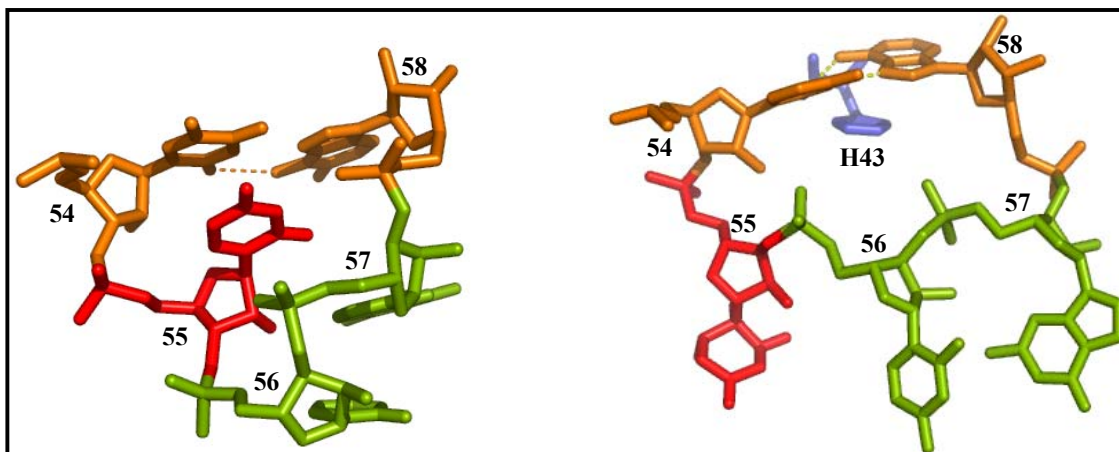


Abbildung 1.14: Basen-*flipping*. H, Histidin. Die Zahlen entsprechen den Nukleotidpositionen im T-Loop der tRNA. Die Strukturen von 1EHZ bzw. 1K8W wurden mit Hilfe der Pymol Software abgeleitet.

Eine C \rightarrow T Transition bei mRNA in der Position 656 in Exon 3 von dem Pus1 Gen von Menschen führt zu einem R116W Aminosäureaustausch, der zu der seltenen autosomal-rezessiven Erbkrankheit MLASA (*Mitochondrial myopathie and sideroblastic anemia*) führt [Patton et al., 2005]. Arginin und Tryptophan unterscheiden sich prinzipiell in ihren physikalischen Eigenschaften. Arginin 116 ist in einer hoch konservierten Domäne RTDKGV lokalisiert und in allen eukaryotischen und prokaryotischen Pus1 Proteinen konserviert. Das

RTDKGV-Sequenzmotiv stellt die katalytische Domäne dar, die in allen Pseudouridin-Synthase Familien (TruA, RluA, RsuA and TruB) vorkommt.

Das zur *E.coli* tRNA, Ψ55 Pseudouridin-Synthase homologe Cbf5p stellt die Pseudouridin-Synthase Aktivität für die snoRNA-gerichtete Pseudouridinylierungsreaktion bereit [Lafontaine et al., 1998]. Archeosin tRNA-Guanin Transglykosylase (ArcTGT) ist das Enzym für die Archeosinbiosynthese. Archeosin (7-formamidino-7-deazaguanosin) ist ein modifiziertes Nukleotid, das in den meisten archeabakteriellen tRNAs in der Position 15 vorkommt. Dieses Nukleotid im D-Loop der tRNA interagiert mit dem Nukleotid 48 im variablen Loop und dem Nukleotid 59 im T-Loop. Es ist damit an der Bildung von D-T-Arm Interaktionen beteiligt. ArcTGTs besitzen eine RNA Bindungsdomäne (PUA), die eine hohe Sequenzhomologie zu der Bindungsdomäne von Cbf5p/Dyskerin besitzt. Auch die Bindungsdomäne von TruB aus *E.coli* ähnelt sehr der PUA Domäne, obwohl es sich um keine homologe Sequenz handelt. Die Kristallstrukturanalyse von ArcTGT-tRNA^{Val} Komplexen hat gezeigt, dass die tRNA in einer λ-Form vorkommt [Ishitani et al., 2003].

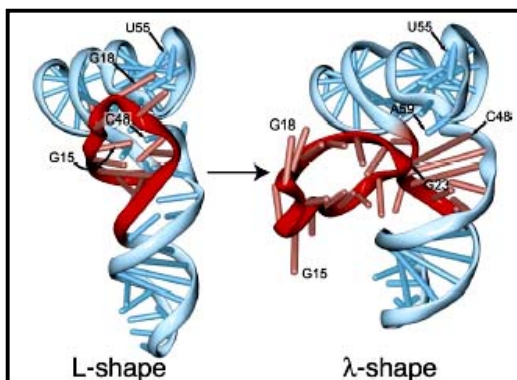


Abbildung 1.15: λ-Form von tRNA [Ishitani et al., 2003].

Modifizierte Nukleotide, die im Anticodon Bereich vorkommen, gehören zu der zweiten Gruppe von Modifikationen. Die Positionen 34 und 37 sind am häufigsten und am vielfältigsten modifiziert. Die Modifikationen in der Position 34 tragen zur höheren Genauigkeit bei der Codon-Erkennung bei [Bjork et al., 2001] [Marck and Grosjean, 2002] [Giege et al., 1998] [Stuart et al., 2000] [Yarian et al., 2002]. Die Modifikationen in der Position 34 ermöglichen oder erschweren die Paarung mit der *Wobble*-Position im Codon. Adenosin 34 und Uridin 34 sind in nahezu allen tRNAs modifiziert, Ausnahmen sind die mitochondrialen tRNAs und die tRNAs von Mycoplasmen. Die Modifikationen des Nukleotides 37 hängen von der Art des Nukleotids

36 ab. Die Adenosinderivate i6A und t6A stabilisieren die schwachen A(36)=U bzw. U(36)=A Basenpaare durch zusätzliche Basenstapelung. Das N^1 -methylierte Guanin (m^1G) ist für die Einhaltung des Leserasters wichtig, wenn die Position 36 ebenfalls G ist. Einige Modifikationen in dieser Position sind Unikate, wie z.B. 1-Methylinosin 37 in der tRNA^{Ala} oder Wye37; Wybutosin ist ein hoch modifiziertes Guanin Analogon, das ausschließlich in der Position 37 von Hefe tRNA^{Phe} vorkommt.

Man kennt noch eine andere Funktion der Modifikationen in der Anticodon-Region: die Unterdrückung der Basenpaar Bildungen im Anticodon-Loop [Cabello-Villegas et al., 2004; Cabello-Villegas et al., 2002; Sundaram et al., 2000]. Es wurde bereits ein Einfluss von Modifikationen auf die Bindung der tRNA an das Ribosom [Yarian et al., 2000] [Ashraf et al., 1999] gezeigt.

1.4 Mitochondriale Erkrankungen (Mitochondriopathien)

Unter dem Begriff Erbkrankheit werden allgemein solche Erkrankungen zusammengefasst, die durch untypisch veränderte Erbanlagen ausgelöst werden. Man unterscheidet:

Autosomal-rezessive Erbkrankheiten: Die Besonderheit tritt nur dann in Erscheinung, wenn sich auf jeweils beiden Chromosomen die Mutation in einem bestimmten Gen findet.

Autosomal-dominante Erbkrankheiten: Hier führt bereits ein verändertes Allel auf einem der beiden homologen Chromosomen zur Merkmalsausprägung.

1962 berichtete Rolf Luft [Luft et al., 1962] über eine Untersuchung der Mitochondrien einer Frau, die unter lang anhaltender Müdigkeit und Muskelschwäche litt. Die aus den Patienten isolierten Mitochondrien unterlagen nicht mehr der normalen Atmungsregulation. Seit diesem ersten Artikel sind zahlreiche weitere Krankheiten bekannt geworden, die auf Abweichungen in der Struktur und Funktion von Mitochondrien zurückzuführen sind. Meistens sind Muskel- und Nervengewebe betroffen, weil diese Gewebe den größten ATP-Bedarf haben.

Mitochondriopathien sind klinisch, biochemisch und genetisch heterogene Erkrankungen, die auf Störungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels beruhen. Die klinischen Symptome sind geistige Behinderung, Minderwuchs, Atemstörungen, Erbrechen, Apathie, Krampfanfälle,

Sehstörungen, Hörstörungen, Herzrhythmusstörungen und Muskelschwäche [Simon and Johns, 1999; Wallace, 1993; Wallace, 1999]. Eine Mitochondrien-Erkrankung kann sowohl im Kindesalter als auch im Erwachsenenalter auftreten.

In Bezug auf das mitochondriale Genom wurden verschiedene Mutationstypen beschrieben: Deletionen/Duplikationen/Insertionen, die zu einer Verlängerung der Genomlänge führen und Punktmutationen. Große Deletionen im mt-Genom sind meistens Neu- bzw. Spontanmutationen, die heteroplasmisch auftreten. Fast alle Punktmutationen der mtDNA werden mütterlich vererbt und können tRNA-, mRNA und rRNA-Gene betreffen. Heute sind mehr als 100 Deletionen/Duplikationen/Insertionen und mehr als 80 verschiedene Punktmutationen im humanen mitochondrialen Genom beschrieben [Kogelnik et al., 1996] [Florentz et al., 2003]. Ein Großteil dieser Mutationen liegt in den Genen, die für tRNA-Moleküle kodieren.

1.4.1 Häufige mitochondriale Erkrankungen

In 90 % aller Fälle von Mutationen in mtDNA für Komplex I Gene kommt es zur LHON (*Leber's Hereditary Optic Neuropathy*) die durch eine Störung der Sehnerven zu hochgradiger Sehminderung führt. Selten finden sich bei LHON-Patienten weitere neurologische Auffälligkeiten, insbesondere Bewegungsstörungen wie Ataxie und Dystonie. Bei 9 % der Fälle treten kardiale Arrhythmien auf [Schmiedel et al., 2003]. Neben Erkrankungsfällen mit maternalem Erbmodus findet sich häufig auch sporadisches Auftreten. Drei mtDNA-Punktmutationen, die alle in Komplex-I-Strukturgenen liegen, verursachen 96 % aller LHON-Erkrankungen, die häufigste befindet sich an Position 11778 (ND4, Komplex I) der mtDNA [Wallace et al., 1988a], seltener sind die Mutationen T14484C und G3460A.

Es sind eine ganze Menge weiterer Punktmutationen (so genannte Sekundärmutationen) in Familien mit Leberscher Optikusatrophie beobachtet worden, die jedoch in einem kleinen Prozentsatz auch in der Normalbevölkerung vorkommen, sodass ihr Auftreten nicht eindeutig mit dieser Erkrankung korreliert. Allerdings kommen diese Sekundärmutationen in Familien mit Leberscher Optikusatrophie deutlich häufiger vor als in der Normalbevölkerung.

Die häufigsten mitochondrialen Myopathien sind das MELAS (*Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes*)-Syndrom [Goto et al., 1990], sowie das MERRF (*Myoclonic Eepilepsy with Ragged-Red Fiber*)-Syndrom.

Das MELAS-Syndrom ist eine mitochondrial vererbte Erkrankung mit einem breitem klinischen Spektrum, von Migräne-ähnlichen Kopfschmerzanfällen, über schwere Myopathien bis hin zum mütterlich vererbten insulinabhängigen und nichtinsulinabhängigen Diabetes mellitus. Bei etwa 80 % der MELAS-Patienten wird die Krankheit durch eine Punktmutation an Position 3243 im tRNA^{Leu(UUR)}-Gen des mitochondrialen Genoms verursacht [Goto et al., 1990]. Im tRNA^{Leu(UUR)}-Gen liegen weitere seltene MELAS-Mutationen, insbesondere die Mutation T3271C, die sich bei 7–15% der MELAS-Fälle fand [Tarnopolsky et al., 1998]. Darüber hinaus sind aber auch seltene Mutationen in anderen tRNA-Genen und Strukturgenen beschrieben, wie z. B. Punktmutation G12315A in tRNA^{Leu(CUN)} [Fu et al., 1996].

Der charakteristische Befund bei MERRF ist eine Myoklonusepilepsie, überwiegend mit Nachweis von RRF (*ragged-red fibres*) in der Muskelbiopsie. Als RRF werden die mit Gomori-Trichrom-Färbung im Lichtmikroskop erkennbaren verdickten unscharfen Ränder der Muskelfasern bezeichnet. Weitere typische Befunde sind zerebelläre Ataxie, sensorineurale Schwerhörigkeit, Polyneuropathie, Kleinwuchs, Optikusatrophie und Demenzentwicklung. Bei ca. 80 % der Patienten liegt eine heteroplasmische A8344G tRNA^{Lys}-Punktmutation der mtDNA vor [Wallace et al., 1988b]. Neben weiteren MERRF-assoziierten Punktmutationen im tRNA^{Lys}-Gen (T8356C, G8363A, G8361A) wurden selten Punktmutationen im tRNA^{Ser(UCN)}-Gen beschrieben, die zu einem MERRF/MELAS-Overlap-Syndrom führen können, dem aber auch die Punktmutation A3243G zugrunde liegen kann.

Beim KSS (*Kearns-Sayre Syndrome*) handelt es sich um eine mitochondriale Myopathie der äußeren Augenmuskulatur. Durch gestörten Stoffwechsel in Mitochondrien kommt es zu einem Energiemangel in der betroffenen Muskulatur. Im Gegensatz zu anderen Myopathien sind beim KSS auch oft andere Gewebe mit betroffen, z. B. Herz, Leber oder ZNS. Typische Begleitsymptome sind sensorineurale Schwerhörigkeit, Kleinwuchs, neuropsychologische Auffälligkeiten bis zur dementiellen Entwicklung, endokrinologische Störungen (Diabetes mellitus, verzögerte Pubertät). Das KSS tritt fast ausschließlich sporadisch auf und ist genetisch in ca. 80 % der Fälle auf singuläre mtDNA-Deletionen, relativ häufig auf eine 4977 bp große Deletion und seltener auf Duplikationen zurückzuführen [Holt et al., 1988].

Die Tabelle 1.3 stellt eine Zusammenfassung der häufigsten mitochondrialen Erkrankungen dar.

Krankheit	Mutation	Gen
CPEO	A3243G T4274C	tRNA ^{Leu(UUR)} tRNA ^{Ile}
MELAS	A3243G T3271C	tRNA ^{Leu(UUR)} [Goto et al., 1990]
MERRF	A8344G T8356C A8296G	tRNA ^{Lys} [Shoffner et al., 1990] [Zeviani et al., 1993]
LHON	G11778A T14484C und G3460A	KomplexI, ND4 [Wallace et al., 1988a]
KSS	4977 bp Deletion	[Holt et al., 1988]
Myopathy	A12320G T14709C	tRNA ^{Leu(CUN)} tRNA ^{Glu}

Tabelle 1.3: Häufige mitochondriale Erkrankungen. LHON, *Leber's Hereditary Optic Neuropathy*; KSS, *Kearns-Sayre Syndrome*; MERRF, *Myoclonic epilepsy and ragged red fibers*; MELAS, *Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*; CPEO, *Chronisch-progressive externe Ophthalmoplegie*; MLASA, *Mitochondrial myopathie and sideroblastic anemia*; Pus1, Pseudouridin-Synthase 1 .

1.4.2 Mitochondriale Erkrankungen bedingt durch nukleäre Mutationen

Die zahlreiche Struktur-Proteine und Funktionsregulatoren der Atmungskette, mitochondriale Transkription, Replikation und Translation notwendige Faktoren sind nukleär kodiert und werden aus dem Zytoplasma in die Mitochondrien importiert. Die Anzahl der bekannten, für mitochondriale Erkrankungen verantwortlichen nukleären Mutationen sind in der Tabelle 1.4 aufgelistet.

MLASA (*Mitochondrial myopathie and sideroblastic anemia*) ist eine seltene autosomal-rezessive Erbkrankheit [Fernandez-Vizarra et al., 2006]. Eine C→T Transition bei mRNA in der Position 656 in Exon 3 von dem Pus1 Gen führt zu einem R116W Aminosäureaustausch [Patton et al., 2005]. Typische Befunde sind Müdigkeit und Übelkeit mit Erbrechen.

Häufige mitochondriale Erkrankungen sind in der Tabelle 1.3 aufgelistet.

Gen	Mutation	Krankheit
Komplex I		
<i>ND1</i>	G3460A	LHON [Brandon et al., 2005]
<i>ND1</i>	3902 zu 3908 Inversion	Exercise intolerance [Brandon et al., 2005]
<i>ND2</i>	G5244A	LHON [Brandon et al., 2005]
<i>ND4</i>	G11,778A	LHON [Brandon et al., 2005]
<i>ND4</i>	G11,832A	Isolated myopathy [Brandon et al., 2005]
<i>ND5</i>	G13,513A	MELAS MELAS/LHON [Brandon et al., 2005]
<i>ND5</i>	G13,730A	LHON [Brandon et al., 2005]
<i>ND5</i>	A13,514G	MELAS [Brandon et al., 2005]
<i>ND6</i>	G14,459A	LHON/dystonia [Brandon et al., 2005]
<i>ND6</i>	T14,484C	LHON [Brandon et al., 2005]
Komplex III		
<i>Cyt b</i>	4 bp Deletion (14,784 + 4)	MELAS + Parkinson [Brandon et al., 2005]
<i>Cyt b</i>	G14,846A	Exercise intolerance [Andreu et al., 1999]
<i>Cyt b</i>	G15,084A	Exercise intolerance [Andreu et al., 1999]
<i>Cyt b</i>	G15,168A	Exercise intolerance [Andreu et al., 1999]
<i>Cyt b</i>	G15,242A	Encephalomyopathy [Brandon et al., 2005]
<i>Cyt b</i>	G15,243A	Cardiomyopathy [Valnot et al., 1999]
<i>Cyt b</i>	G15,059A	Myoglobinuria, Myopathy [Brandon et al., 2005]
<i>Cyt b</i>	G15,498A	Hystocytoid; Cardiomyopathy, hepatic; Steatosis, tubular; Necrosis [Brandon et al., 2005]
<i>Cyt b</i>	24 bp Deletion (15,498 + 24)	Exercise intolerance [Andreu et al., 1999]
<i>Cyt b</i>	G15,615A	Exercise intolerance [Brandon et al., 2005]
<i>Cyt b</i>	G15,723A	Exercise intolerance [Andreu et al., 1999]
<i>Cyt b</i>	G15,762A	[Brandon et al., 2005]
Komplex IV		
<i>COXI</i>	5 bp Deletion	Motor neuron-like [Comi et al., 1998]degeneration
<i>COXI</i>	G5920A	Myoglobinuria [Brandon et al., 2005]
<i>COXI</i>	T6721C	Sideroblastic anemia [Gattermann et al., 1997]
<i>COXI</i>	T6742C	Sideroblastic anemia [Gattermann et al., 1997]
<i>COXI</i>	G6930A	Multisystem disorder [Brandon et al., 2005]
<i>COXII</i>	T7587C	Encephalomyopathy [Brandon et al., 2005]
<i>COXII</i>	T7671A	Myopathy [Brandon et al., 2005]
<i>COXIII</i>	T9557C	MELAS [Brandon et al., 2005]
<i>COXIII</i>	15 bp Deletion (9514 + 15)	Myoglobinuria [Keightley et al., 1996]
<i>COXIII</i>	9537C ins	Leigh-like [Brandon et al., 2005]
<i>COXIII</i>	G9952A	Encephalopathy, myopathy [Brandon et al., 2005]
Komplex V		
<i>ATP6</i>	T8993G	NARP/Leigh syndrom [Holt et al., 1990]
<i>ATP6</i>	T9176C	NARP/Leigh syndrom [Brandon et al., 2005]

Tabelle 1.4: mtDNA Mutationen in proteinkodierten Genen [Rotig and Munnich, 2003]

1.4.3 Weitere neurodegenerative Erkrankungen

Mutationen der mitochondrialen oder der nukleären DNA und auch Kombinationen beider wurden als Ursache vieler chronischer Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer erkannt [Schapira, 1999]. Auch die mitochondriale tRNA^{Gln} T4336C Mutation assoziiert mit Alzheimers und Parkinsons Erkrankung [Edland et al., 2002]. Bei der Alzheimer-Krankheit kommt es zu einer Schädigung von Nervenzellen im Gehirn, gefolgt von deren Absterben. Die Ursachen der Schädigung sind außerordentlich vielfältig und auch noch nicht vollständig aufgeklärt. Vermehrt gebildete Sauerstoffradikale, die Anhäufung von Amyloid-beta (A β , Hauptbestandteil der in Alzheimer-Gehirnen gefundenen Ablagerungen), Induktion vom programmiertem Zelltod (Apoptose) und ein gestörter Energiehaushalt können Ursachen des Untergangs von Nervenzellen sein.

Auch bei einigen Formen der familiären Migräne, speziellen Kardiomyopathie-Formen sowie besonderen Formen des Typ I-Diabetes mellitus wird eine Beteiligung der Mitochondrien vermutet. Seit 1992 weiß man, dass Mutationen im mitochondrialen Genom Ursache für Diabetes sein können. Man kennt inzwischen rund 40 verschiedene, diabetogene Mutationen des mitochondrialen Genoms. Am häufigsten (3 %) ist die Punktmutation A3243G in der tRNA^{Leu(UUR)}.

1.4.4 Mitochondrial bedingte Schwerhörigkeiten

Schwerhörigkeit ist die häufigste sensorische Erkrankung des Menschen mit Inzidenz 1:1000 Geburten. Die hereditären Vererbungsformen werden in autosomal-dominant (DFNA), autosomal-rezessiv (DFNB), X-chromosomal (DFN) und mitochondrial unterteilt [Morton, 2002]. Die Häufigkeit von mitochondrialen Schwerhörigkeiten wird derzeit auf ca. 33% von allen Hördefekten geschätzt. Mutationen in zwei mitochondrialen Genen 12S rRNA und tRNA^{Ser(UCN)} wurden als häufigste Ursache für mitochondrial bedingte Schwerhörigkeit gefunden [Li et al., 2004].

Genetisch bedingte Schwerhörigkeit wird als syndromal bezeichnet, wenn außer dem Hörverlust noch Fehlbildungen anderer Organsysteme zu finden sind. Den größeren Anteil der genetisch

bedingten Schwerhörigkeit (ca. 70%) nehmen die nicht-syndromalen Formen ein, die, bei denen keine weiteren Symptome oder Anomalien außer Hörstörung vorliegen.

Die häufig vorkommenden mitochondrialen Mutationen, die mit syndromaler Schwerhörigkeit assoziieren, sind in der Tabelle 1.5 aufgelistet.

Gen	Mutation	Phenotyp
tRNA ^{Leu(UUR)}	A3243G	MELAS [Goto et al., 1990] und MIDD [van den Ouweland et al., 1992]
tRNA ^{Lys}	A8344G T8356C A8296G	MERRF [Shoffner et al., 1990] MERRF [Zeviani et al., 1993] MIDD [Kameoka et al., 1998]
tRNA ^{Ser(UCN)}	T7512C G7497A	Progressive Myoklonus-epilepsie, ataxia und Gehörlosigkeit [Jaksch et al., 1998] [Jacobs et al., 2005]
tRNA ^{Glu}	T14709C	MIDD [Hao et al., 1995]

Tabelle 1.5: Mitochondriale Mutationen, die mit syndromaler Schwerhörigkeit assoziieren. KSS, *Kearns-Sayre Syndrome*; MERRF, *Myoclonic epilepsy and ragged red fibers*; MELAS, *Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*; MIDD, *Maternally inherited diabetes and deafness*.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid/ Bis-Lösung, 29:1	Serva, Heidelberg
Ammoniak (NH ₃), 25 %	Riedel-deHaën, Seelze
Ammoniumacetate (NH ₄ OAc)	AppliChem, Darmstadt
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Anilin, reinst	Fluka, Buchs
Ammonium Persulfat (APS)	Fluka, Buchs
BAP (bacterial alkaline phosphatase)	Fermentas, St. Leon-Rot
Bleiacetat Pb(OAc) ₂	Sigma, München
Bromphenolblau (BPB)	Merck, Darmstadt
BstN I	BioLabs, New England
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merk, Darmstadt
Chloroform, reinst	Merk, Darmstadt
Dextransulfat	Serva, Heidelberg
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, München
Digitonin	Sigma, München
Dinatriumhydrogenphosphat	AppliChem, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, München
Dodecylsulfat Na-Salz	Serva, Heidelberg
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Detriot
Ethanol absolut (EtOH)	Merck, Darmstadt
Ethanolamine 98 %	Sigma, München
Ethidiumbromid	Fluka, Buchs
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, München
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe
Formamid	AppliChem, Darmstadt

Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Across, Kassel
HeLa Cell extract S100	Stock Biologicals, Belgium
Imidazol	Fluka, Buchs
Isobuttersäure	Fluka, Buchs
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, Darmstadt
LB-Agar	Sigma, München
LB-Broth	Sigma, München
Litiumperchlorid (LiClO ₄)	Sigma, München
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merk, Darmstadt
β-Mercaptoethanol 98 %	Sigma, München
MOPS	Roth, Karlsruhe
MOPS-Natriumsalz	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Grüssing, Filsum
Natriumcacodylat	Fluka, Buchs
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Fluka, Buchs
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Fluka, Buchs
N-Dodecyl-β-D-Maltoside (DM)	Sigma, München
NTPs	Sigma, München
Nuclease S1	Roche, Basel
Nuclease P1	Roche, Basel
Phenol, reinst	Fluka, Buchs
1-Propanol	AppliChem, Darmstadt
n-Propanol	AppliChem, Darmstadt
[γ- ³² P]-ATP	GE Healthcare, München
[α- ³² P]-dCTP	GE Healthcare, München
[α- ³² P]-NTPs	GE Healthcare, München
Pyruvat	Gibco, Detroit

Ribonuklease T1 (RNase T1)	Gibco, Detroit
Ribonuklease T2 (RNase T2)	Invitrogen, Karlsruhe
Ribonuklease V1 (RNase V1)	Pierce PerBio,
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Sigma, München
Salzsäure (HCl)	Fluka, Buchs
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, München
Sequenase Version 2.0 DNA Polymerase	USB, Cleveland
Spermidin	Fluka, Buchs
Sodium chloride-Sodium citrate (SSC)	Promega, Mannheim
Taq-Polymerase	Rapidozym, Berlin
T7 RNA Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	Fermentas, St. Leon-Rot
N,N,N,N- tetramethylethylenediamin (TEMED)	Fluka, Buchs
totale <i>E.coli</i> tRNA	Roche, Basel
Tris	Sigma Aldrich, München
Triton X-100	Sigma, München
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Xylen cyanol (XC)	Sigma, München

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Fermentas (St. Leon-Rot), Gibco (Detroit, USA), Merck (Darmstadt), Pierce (Rockford, USA), Roche (Basel), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), und Sigma (München) und alle Waschlösungsmittel vom Zentralbereich Neuenheimer Feld Zentrallager (Heidelberg) bezogen.

2.2 Puffer und Medien

Alle Puffer wurden mit Millipore-Wasser angesetzt, pH-Wert mit dem pH-Meter eingestellt, steril filtriert und bei 4 °C bzw. -20 °C gelagert.

A (3' splint labeling) Puffer:	12,5 mM Tris-HCL pH 7,9 25 mM NaCl 0,25 mM EDTA
B (3' splint labeling) Puffer:	25 mM Tris-HCl pH7,9 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 5 % Glycerol
B&W Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 7,5 1 mM EDTA 2 M NaCl
DC-Laufpuffer A:	330 ml Isobuttersäure 5 ml Ammoniak 25 % ad 500 ml H ₂ O
DC-Laufpuffer B:	1000 ml Phosphat-Puffer pH 6,8 (0,1 M) 600 g Ammoniumsulfat Vor dem Gebrauch wurde 1,5 ml 1-Propanol pro 100 ml Puffer zugefügt.
DC-Laufpuffer C:	75 ml HCl konzentriert 350 ml Isopropanol ad 500 ml H ₂ O
DEN Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 8,0 0,2 % SDS 2 % Formamide
DEPC-Stop:	0,6 M NaOAc pH 5,5 1 mM EDTA 0,05 µg/µl carrier (<i>E.coli</i> tRNA)
E1 Puffer:	40 mM Tris-HCL pH 7,5 40 mM NaCl 10 mM MgCl ₂

G-Leiter:	12,5 mM Natriumcitrat pH 4,5 0,5 mM EDTA 3,5 M Harnstoff
Hybridisierungspuffer:	10 % Dextransulfat 1 M NaCl 1 % SDS
KL-Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 7,4 10 mM MgCl ₂
L-Leiter:	50 mM NaHCO ₃ pH 9,0
Ladepuffer denaturiert:	90 % Formamid 9,8 % 10xTBE 0,1 % Xylencyanol 0,1 % Bromphenolblau
Ladepuffer native:	90 % TBE 9,8 % Glycerin (v/v) 0,1 % Xylencyanol 0,1 % Bromphenolblau
LB-Medium:	20 g LB-Broth: Hefeextrakt 5 g NaCl 5 g Trypton 10 g ad 1 l Wasser; autoklavieren Für LB ^{Amp} wurden nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.
LB-Platten:	17,5 g LB-Agar: Hefeextrakt 2,5 g NaCl 2,5 g Trypton 5 g Agar 7,5 g ad 500 ml Wasser, autoklavieren Für LB ^{Amp} -Platten wurde nach dem Autoklavieren 100 µg/ml Ampicillin zugegeben.
M8 Puffer:	50 mM Ethanolamin pH 8,0 4 mM DTT 0,1 mM EDTA 2 mM Spermidin

MLB Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM MgCl ₂ 4 M Guanidinium Thiocyanat 2 % Triton X-100 21 mM β-Mercaptoethanol
N1 Puffer:	50 mM Natriumcacodylat pH 7,5 10 mM MgCl ₂ 40 mM NaCl
PufferA nativ:	100 mM NaOH 50 mM NaCl
PufferB nativ:	100 mM NaCl
NKB Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 7,4 7,5 mM MgCl ₂ 130 mM NaCl 5 mM KCl
Northern Waschpuffer "low":	2 x SSC pH 7,0 0,1 % SDS
Northern Waschpuffer "high":	0,1 % SSC pH 7,0 0,1 % SDS
Pb-Stop:	1 x TBE 8 M Harnstoff 10 mM EDTA 0,1 % Xylencyanol 0,1 % Bromphenolblau
Pus HisTag Puffer A:	200 mM NaCl 1 mM DTT 0,5 mg/ml DM 46,6 mM K ₂ HPO ₄ 3,4 mM KH ₂ PO ₄

Pus HisTag Puffer B:	200 mM NaCl 1 mM DTT 0,5 mg/ml DM 46,6 mM K ₂ HPO ₄ 3,4 mM KH ₂ PO ₄ 300 mM Imidazole
Pus MOD Puffer:	100 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM MgCl ₂ 0,1 mM EDTA 100 mM NH ₄ OAc 0,5 mM DTT
Pus-Dialysepuffer:	20 mM Tris-HCl pH 8,5 1 mM DTT 1 mM MgCl ₂ 20 % Glycerol
QEB Puffer:	50 mM MOPS pH 7,5 15 % EtOH 300 mM NaCl 0,1 % Triton X-100
QEL Puffer:	50 mM MOPS pH 7,5 15 % EtOH 750 mM NaCl
QLW Puffer:	50 mM MOPS pH 7,5 15 % EtOH 300 mM NaCl
RNase-Stop:	0,6 M NaOAc pH 5,5 0,1 M EDTA 0,1 µg/µl carrier (<i>E.coli</i> tRNA)
RSB Puffer:	10 mM Tris-HCl pH 6,7 0,15 mM MgCl ₂ 10 mM KCl
S1 Puffer:	50 mM Na•Cacodylate pH 7,5 1 mM EDTA

Saccharose-O:	1 M Saccharose 10 mM Tris-HCl pH 7,5 5 mM EDTA
Saccharose-U:	1,5 M Saccharose 10 mM Tris-HCl pH 7,5 5 mM EDTA
Saccharose-TE:	20 % Saccharose 50 mM Tris-HCl pH 7,5 10 mM EDTA
SDS Trenngel 10 %:	1,7 ml Acrylamid (30 %, 29:1) 1,3 ml Tris-HCl (1,5 M) pH8,8 0,05 ml 10 % SDS (w/v) 0,07 ml APS (10 %) 0,002 ml TEMED 1,9 ml H ₂ O
SDS Sammelgel 5 %:	0,33 ml Acrylamid (30 %, 29:1) 0,25 ml 10 % SDS (w/v) 0,01 ml APS (10 %) 0,002 ml TEMED 1,4 ml H ₂ O
SDS Laufpuffer:	25 mM Tris 250 mM Glycine 0,1 % SDS
SDS Ladepuffer:	0,63 ml Tris-HCl (1M) pH 6,8 2,5 ml Glycerol 2 ml SDS (10 %) 0,2 ml Bromphenolblau 4,17 ml H ₂ O 5 % β -Mercaptoethanol wurde vor dem Gebrauch hinzugefügt.
« Strasbourg » Puffer:	40 mM Tris-HCl pH 8,1 1 mM Spermidin 5 mM DTT 0,01 % Triton X-100

2.3 Oligonukleotide

Alle Sequenzen sind in der Richtung 5' → 3' angegeben und wurden bei IBA (Göttingen) und Thermo (Ulm) in einer Konzentration von 100 pmol/μl käuflich erworben.

Hum mt tRNA^{Ser(UCN)}-Wildtyp (MH111, 82768N):

TGGCAAAAAAGGAAGGAATCGAACCCCCCAAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATAGCCTCCATGA
CTTTTTTCGACGGTACCGGTACCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGGAAAAAGTCTCTCCCTAT
AGTGAGTCGTATT

Hum mt tRNA^{Ser(UCN)}-G7497A (MH112, 83128N):

TGGCAAAAAAGGAAGGAATCGAACCCCCCAAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATAGCCTCCATGA
CTTTTTTCGACGGTACCGGTACCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGGAAAAAGTCTCTCCCTAT
AGTGAGTCGTATT

Hum mt tRNA^{Ser(UCN)}-T7512C (MH113, 83129N):

TGGCAAAAAAGGAAGGAATCGAACCCCCCAAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATAGCCTCCATGA
CTTTTTTCGACGGTACCGGTACCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGGAAAAAGTCTCTCCCTAT
AGTGAGTCGTATT

Hum mttRNA^{Ser(UCN)}-G7497A/C7471T (MH144, OR220116-1):

TGGCAAAAAAGGAAGGAATCGAACCCCCCTAAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATAGCCTCCATGA
CTTTTTTCGACGGTACCGGTACCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGGAAAAAGTCTCTCCCTAT
AGTGAGTCGTATT

Hum mttRNA^{Ser(UCN)}-G7497A/T7502C/G7498A (MH145, OR220116-2):

TGGCAAAAAAGGAAGGAATCGAACCCCCCAAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATAGCCTCCATGA
CTTTTTTCGACGGTACCGGTACCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGGAAAAAGTCTCTCCCTAT
AGTGAGTCGTATT

Bornean Orang Utan tRNA^{Ser(UCN)}-WT (MH146, OR220116-3):

TGGCAAAAAAGGAAGGAATCGAACCTCCTAAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATAGCCTCCATGA
CTTTTTTCGACGGTACCGGTACCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGGAAAAAGTCTCTCCCTAT
AGTGAGTCGTATT

Hum mt tRNA^{Leu(CUN)}-Wildtyp (MH59, 90903N):

TGGTACTTTTATTTGGAGTTGCACCAAATTTTGGGGCCTAAGACCAATGGATAGCTGTTATCC
TTTAAAAGTGACGGTACCGGTACCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGACTTTCTCCCTATAGT
GAGTCGTATT

Hum mt tRNA^{Leu(CUN)}- T12320C (MH101, 74361N):

TGGTACTTTTATTTGGAGTCGCACCAAAATTTTTGGGGCCTAAGACCAATGGATAGCTGTTATCC
TTTAAAAGTGACGGTACCGGTACCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGACTTTCTCCCTATAGT
GAGTCGTATT

Hum mt tRNA^{Leu(CUN)}- C12315T (MH102, 74182N):

TGGTACTTTTATTTGGAGTTGCACTAAAATTTTTGGGGCCTAAGACCAATGGATAGCTGTTATCC
TTTAAAAGTGACGGTACCGGTACCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGACTTTCTCCCTATAGT
GAGTCGTATT

Hefe cyt tRNA^{Phe}:

Linearisiertes pTFMA Plasmid

Hum mt tRNA^{Lys}-Wildtyp:

Linearisiertes pTFMA Plasmid

Hum mt tRNA^{Lys}-T5344C (MH55):

TGGTCACTGTAAAGAGGTGTTGGCTCTCTTAATCTTTAACTTAAAAGGTTAATGCTAAGTTAGCT
TTACAGTGGACGGTACCGGTACCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGCACTTCTCCCTATAGTG
AGTCGTATT

Hum mt tRNA^{Gln}-Wildtyp (MH61):

TGGCTAGGACTATGAGAATCGAACCCATCCCTGAGAATCCAAAATTCTCCGTGCCACCTATCACA
CCCCATCCTAGACGGTACCGGTACCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGTAGGTCTCCCTATAG
TGAGTCGTATT

Hum mt tRNA^{Gln}-T4336C (MH104, 75599N):

TGGCTAGGACCATGAGAATCGAACCCATCCCTGAGAATCCAAAATTCTCCGTGCCACCTATCACA
CCCCATCCTAGACGGTACCGGTACCGTTTCGTCTCACGGACTCATCAGTAGGTCTCCCTATAG
TGAGTCGTATT

Rückwärtsprimer Hum mt tRNA^{Ser(UCN)} (MH41, OR218192-1):

TGGCAAAAAGGAAGG

Rückwärtsprimer Hum mt tRNA^{Leu(CUN)} (MH60, 86712N):

TGGTACTTTTATTTGGAGTT

Rückwärtsprimer Hum mt tRNA^{Leu(CUN)}- T12320C (MH103, 74181N):

TGGTACTTTTATTTGGAGTC

Rückwärtsprimer Hum mt tRNA^{Lys} (MH57):

TGGTCACTGTAAAGAGGTGT

Rückwärtsprimer Hum mt tRNA^{Gln} (MH62):

TGGCTAGGACTATGAGAATC

Rückwärtsprimer Hum mt tRNA^{Gln}-T4336C (MH105, 75600N):

TGGCTAGGACCATGAGAATC

Vorwärtsprimer (T7 Universal) (MH53, 83734N):

CGCGCGAAGCTTAATACGACTCACTATA

3'-Ende "splint labelling" (MH106, 77801N):

GGTGGCAAAAAAGGAAGG

2.4 Standards und Kits

100 bp-Leiter	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteine-Leiter	Pierce, Bonn
BSA-Größen-Leiter	Bio-Rad, München
DyeEx 2.0 Spin Kit 250	Qiagen, Hilden
JETsorb Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
Rosetta 2DE3 pLys Singles	Novagen, Darmstadt
Plasmid Maxi Kit 25	Qiagen, Hilden
Mini-Prep Kit 250	Qiagen, Hilden

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Amplifizierung der DNA-Fragmente mit Hilfe der PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Die PCR ist eine *in vitro*-Methode zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen.

Die Reaktionsmischung wurde auf 94 °C erhitzt, um die DNA-Stränge zu denaturieren. Durch Abkühlen bis auf 57 °C wurden die Primer an die einzelnen DNA-Stränge hybridisiert. Die Temperatur wurde auf 72 °C erhöht, was eine ideale Arbeitstemperatur für das Enzym Taq Polymerase ist, um die komplementären Stränge zu synthetisieren. Diese drei Schritte wurden fünfundzwanzigmal wiederholt [Saiki et al., 1985].

Die Amplifikate (Tabelle 2.1) wurden in einem 2 %igen Agarosegel aufgetrennt (2.6.2), mit Ethidiumbromid gefärbt (2.7.1) und anschließend unter UV-Licht (2.7.2) sichtbar gemacht. Die Größe der Amplifikate wurde mit Hilfe eines 100 Basenpaare DNA-Längenstandards abgeschätzt.

	Volumen	Endkonzentration
10 x PCR-Puffer	10 µl	67 mM Tris pH 8,8 16 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,01 % Tween 20
MgCl ₂ (50 mM)	6 µl	3 mM
dNTPs (je 10 mM)	40 µl (je 10 µl)	je 1 mM
Vorwärtsprimer (100pmol/µl)	1 µl	1 µM
Rückwärtsprimer (100pmol/µl)	1 µl	1 µM
DNA-template (100 pmol/µl)	3-4 µl	3-4 µM
Taq-Polymerase (5 U/µl)	2 µl	0,1 U/µl
H ₂ O	ad 100 µl	

Tabelle 2.1: Ein PCR-Standardansatz von 100 µl.

2.5.2 *in vitro* T7-Transkription

Mittels einer T7-Transkription kann von einer ds DNA-Sequenz die komplementäre RNA-Sequenz erzeugt werden.

Als Enzym wurde die aus dem Bakteriophagen T7 isolierte DNA-abhängige RNA-Polymerase (T7 RNA Polymerase) verwendet [Milligan et al., 1987]. Als Templat für die Polymerase dienten ein linearisiertes Plasmid oder ein PCR-Produkt.

Hammerhead-Ribozyme sind in der Lage, an eine Substrat-RNA zu hybridisieren und diese am 5'-Ende zu spalten. Sind Substrat- und Ribozym-RNA Bestandteil des selben RNA-Moleküls, handelt es sich um eine Spaltung *in cis*. Im Gegensatz dazu bezeichnet man die ribozymatische Spaltung von Substrat-RNA, die ein vom Ribozym unabhängiges Molekül darstellt, als Spaltung *in trans*.

Um die Ziel-RNA abzuspalten ist eine Sequenz von 7-9 Nukleotiden (blau) am 3'-Ende des Ribozyms (Abbildung 2.1) erforderlich, die mittels komplementärer Basenpaarungen mit dem 5'-Ende der Ziel-RNA bindet. Das 5'-Ende des Ribozyms faltet sich in die typische „Hammerhead“-Struktur (grün), so dass die autokatalytische Spaltung am 5'-Ende der tRNA stattfindet. Die Reaktion erfordert kein ATP. 30 mM MgCl₂ ist die optimale Konzentration für die Spaltungsreaktion. Es entstehen tRNAs mit 5'-OH Enden statt 5'-Phosphat wie in nativen tRNA-Molekülen [Fechter et al., 1998].

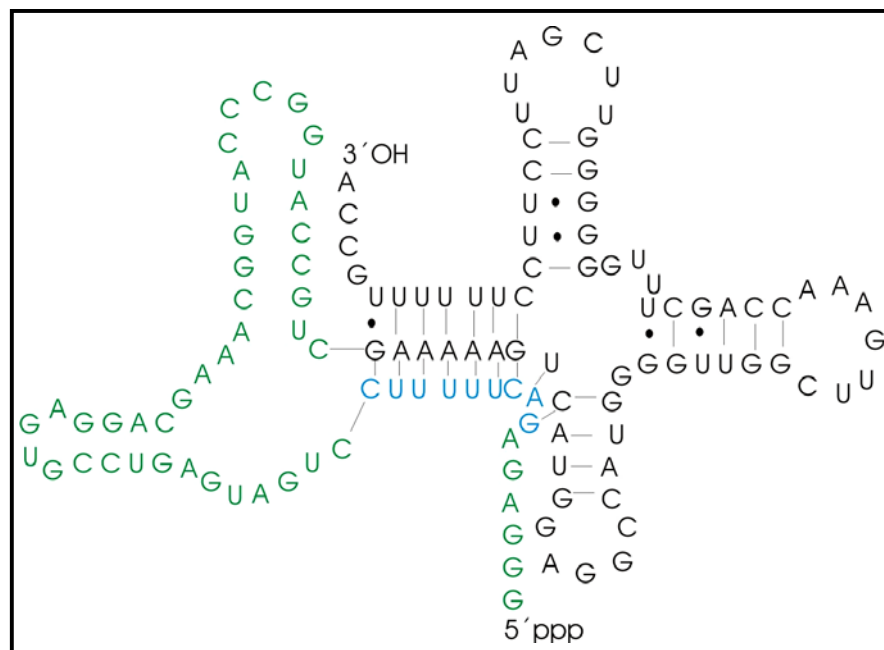


Abbildung 2.1: Organisation der *Hammerhead* Ribozym-Transkripte an Hand der tRNA^{Ser(UCN)} (grün, Ribozym; blau, komplementäre Sequenz; schwarz, tRNA^{Ser(UCN)}).

2.5.2.1 Nicht radioaktive T7-Transkription

Präparative T7-Transkriptionen wurden im 1 ml-Maßstab durchgeführt und anschließend auf einem 10 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel (2.6.2) gereinigt. Die Transkriptions-Ansätze (Tabelle 2.2) wurden für 4 h bei 37 °C inkubiert. Die gewünschte Bande wurde mittels UV-Shadowing (2.7.3) identifiziert, ausgeschnitten und bei 20°C über Nacht aus dem Gel eluiert (2.8). Nach einer weiteren Ethanol-fällung wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (2.10.1).

	Volumen	Endkonzentration
DNA (PCR, 2.5.1)	150 µl	
MgCl ₂ (300 mM)	100 µl	30 mM
NTPs (je 25 mM)	160 µl (je 40 µl)	je 4 mM
5 x « Strasbourg »-Puffer	200 µl	1 x « Strasbourg »-Puffer (2.2)
BSA (1 mg/ml)	2 µl	2 x 10 ⁻³ µg/µl
T7 RNA-Polymerase (200 U/µl)	20 µl	4 U/µl
H ₂ O	ad 1000 µl	

Tabelle 2.2: Transkription-Standardansatz von 1 ml.

2.5.2.2 Radioaktive T7-Transkription

Der Transkriptionsansatz (Tabelle 2.3) wurde bei 37 °C für 3-4 h inkubiert. Ein Aliquot von 1 µl wurde zur radioaktiven Bestimmung der Menge an RNA am Szintillationszähler vermessen. Nach der Transkription wurde der gesamte Reaktionsansatz in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.6.2). Die gewünschte Bande wurde mittels Autoradiographie (2.7.2) sichtbar gemacht, aus dem Gel ausgeschnitten und in 400 µl 0,5 M Ammoniumacetat-Lösung eluiert (2.8). Nach der Ethanol Fällung wurde das radioaktive Signal der gereinigten RNA in einem Cerenkov- Zähler (LS 6500, Beckman Coulter, Krefeld) gemessen und aus den Messwerten die Ausbeute an gereinigter RNA pro Transkriptionsansatz errechnet (2.10.2).

A	Volumen	Endkonzentration
DNA (PCR, 2.5.1)	4 µl	
MgCl ₂ (300 mM)	4 µl	30 mM
NTPs (je 10 mM)	4 µl (je 1 µl)	je 1 mM
[α- ³² P]-NTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	je 2,5 µl	je 1,9 µM
5 x « Strasbourg »-Puffer	8 µl	1 x (2.2)
BSA (0,04 mg/ml)	4 µl	4 µg/ml
T7 RNA-Polymerase (200 U/µl)	2 µl	10 U/µl
H ₂ O	ad 40 µl	

B	Volumen	Endkonzentration
DNA (PCR, 2.5.1)	4 µl	
MgCl ₂ (300 mM)	4 µl	30 mM
ATP (20 mM)	8 µl	4 mM
GTP (20 mM)		4 mM
CTP (5 mM)		1 mM
UTP (20 mM)		4 mM
[α- ³² P]-CTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	3 µl	2,25 µM
5 x « Strasbourg »-Puffer	8 µl	1 x (2.2)
BSA (0,04 mg/ml)	4 µl	4 µg/ml
T7 RNA-Polymerase (200 U/µl)	2 µl	10 U/µl
H ₂ O	ad 40 µl	

C	Volumen	Endkonzentration
DNA (PCR, 2.5.1)	4 µl	
MgCl ₂ (300 mM)	4 µl	30 mM
ATP (20 mM)	8 µl	4 mM
GTP (20 mM)		4 mM
CTP (20 mM)		4 mM
UTP (5 mM)		1 mM
[α- ³² P]-UTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	3 µl	2,25 µM
5 x « Strasbourg »-Puffer	8 µl	1 x (2.2)
BSA (0,04 mg/ml)	4 µl	4 µg/ml
T7 RNA-Polymerase (200 U/µl)	2 µl	10 U/µl
H ₂ O	ad 40 µl	

Tabelle 2.3: Transkription-Standardansatz von 40 µl. (A) Transkriptionsansatz mit [α-³²P]-NTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml); (B) mit [α-³²P]-CTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml); (C) mit [α-³²P]-UTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml).

2.5.3 5'-Phosphorylierung der RNA

Die Polynukleotidkinase des *E.coli* Phagen T4 katalysiert den Transfer des γ -Phosphats eines ATP-Moleküls auf ein freies 5'-Ende der RNA. Pro Ansatz (Tabelle 2.4) wurden etwa 10 pmol RNA eingesetzt und die Reaktion 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der 5'-Phosphorylierung wurden die Ansätze über ein denaturierendes Polyacrylamidgel gereinigt (2.6.2). Die gewünschte Bande wurde mittels Autoradiographie detektiert (2.7.2), ausgeschnitten, eluiert (2.8) und durch Ethanolfällung konzentriert. Anschließend wurde die Radioaktivitätsmenge am Cerenkov-Zähler (LS 6500, Beckman Coulter, Krefeld) vermessen.

	Volumen	Endkonzentration
RNA	14 μ l	10-50 pmol
Kinase-Puffer A	2 μ l	500mM Tris-HCl pH 7,6 100mM MgCl ₂ 50mM DTT 1mM Spermidin 1mM EDTA
[γ - ³² P]-NTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	2 μ l	60 pmol
T4 Polynukleotidkinase (10 U/ μ l)	2 μ l	1 U/ μ l
	20 μ l	

Tabelle 2.4: 5'-Phosphorylierung-Standardansatz von 20 μ l.

2.5.4 Dephosphorylierung von DNA/RNA

Um eine unerwünschte Selbstligation von DNA-Fragmenten zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung von Plasmiden durchgeführt.

Damit die nativ aus den Zellen erworbene tRNAs an ihrem 5'-Ende durch den Transfer einer radioaktiv markierten Phosphatgruppe markiert werden konnten (2.5.3), musste ebenfalls zunächst die 5'- Phosphatgruppe mit Hilfe der alkalische Phosphatase (*bacterial alkaline phosphatase*; BAP) entfernt werden.

Für die Reaktion wurde die DNA/RNA mit DEN Puffer (2.2) im Verhältnis 1:4 auf 80 °C für 5 min erhitzt, etwa 75 U des Enzyms zugefügt und folgendes Programm im Thermocycler (PTC-200, MJResearch, Miami) durchgeführt: 15 min bei 37 °C; 15 min 50 °C; 15 min 65 °C.

Die auf diese Weise behandelte DNA/RNA wurde einer zweimaligen Phenol-Extraktion, einer zweimaligen Diethylether Extraktion (2.9) und anschließender Ethanolpräzipitation unterzogen. Die DNA/RNA wurde nach der Fällung in H₂O bidest. aufgenommen.

2.5.5 3'-Markierung von RNA

Die radioaktive 3'-Markierung erfolgt nach Huang und Szostak 1996 (Abbildung 2.2) [Huang and Szostak, 1996]. Mit dieser Methode kann man die Ziel-RNA in einem RNA-Mix am 3'-Ende markieren, die RNA dient dabei als Primer in einer DNA Polymerisierungsreaktion.

Die tRNA^{Ser(UCN)}-Transkripte wurden an ihr 3'-Ende mit einem 18 nt langen Desoxynukleotid mit 2 überhängenden Gs hybridisiert. Dafür wurde der Reaktionsansatz 1 (Tabelle 2.5 A) für 2 min bei 90 °C inkubiert und auf Eis gekühlt. Um die zwei [α -³²P]-dCTPs an 3'-Ende der tRNA einzubauen, wurde Reaktionsansatz 2 (Tabelle 2.5 B) zugegeben und 30 min bei 37 °C weiter inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz über ein 10 %iges denaturierendes Polyacrylamidgel aufgereinigt, eluiert und mit Ethanol gefällt.

A

	Volumen	Endkonzentration
RNA	2 μ l	10-50 pmol
Oligonukleotid (100 pmol/ μ l)	2 μ l	200 pmol
Puffer A (2.2)	1 μ l	
	5 μ l	

B

	Volumen	Endkonzentration
[α - ³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	3 μ l	90 pmol
Puffer B (2.2)	1 μ l	
Sequenase (13 U/ μ l)	0,5 μ l	6,5 U
H ₂ O	ad. 5 μ l	

Tabelle 2.5: 3'-Markierung-Reaktionsansatz 1 (A) und 2 (B).

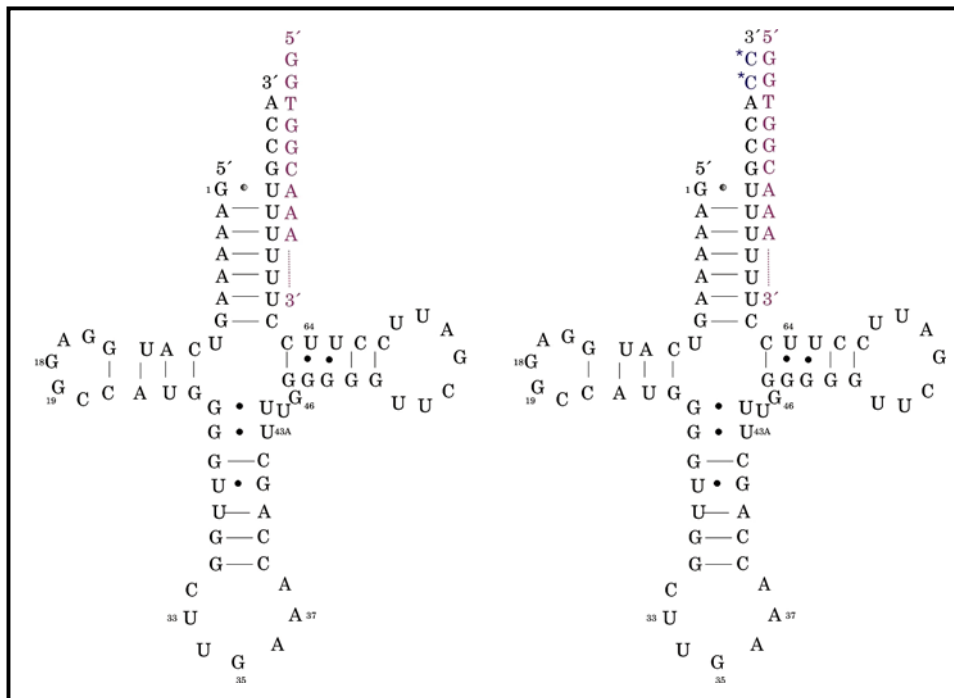


Abbildung 2.2: 3'-Ende „splintlabeling“ der tRNA^{Ser(UCN)}. *C = [α -³²P]-dCTP.

2.6 Gelelektrophoretische Methoden

Die Trennung von Nukleinsäuren durch Gelelektrophorese beruht auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von Molekülen verschiedener Ladung und Masse im elektrischen Feld. Dabei hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der angelegten elektrischen Feldstärke und dem Vernetzungsgrad der Gelmatrix ab. Die Durchführung erfolgt auf Agarose- und Polyacrylamidgelen.

2.6.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Standardmethode zur Auftrennung, Identifizierung und Isolierung von DNA-Molekülen. DNA-Moleküle wurden in horizontalen 2 %igen Gelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 0,5 x TBE Puffer. Die Elektrophorese erfolgte 30 min bei

einer konstanten Spannung von 120 V. Die Dokumentation der Gele nach der Färbung mit Ethidiumbromid (2.7.1) erfolgte mit AlphaImager (Alpha Innotech Corporation, San Leandro) und entsprechender Software.

% Agarose [w/v]	Trennbereich [bp]
0,7	800 – 10000
0,8	500 – 7000
1,2	400 – 6000
1,5	200 – 4000
2	100 – 3000
3	< 100

Tabelle 2.6: Trennbereich der Agarosegele.

2.6.2 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Diese Methode wurde zur Qualitätskontrolle und präparativen Reinigung von Nukleinsäuren benutzt. Unter denaturierenden Bedingungen werden Sekundär- und Tertiärstrukturen von Nukleinsäuren aufgelöst, damit diese die Auftrennung so wenig wie möglich beeinflussen und die Nukleinsäuren somit aufgrund ihrer Kettenlänge getrennt werden können.

RNA-Fragmente wurden mit Hilfe von 10-15 %igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Zur Herstellung der Polyacrylamidlösung wurden Sequenziergel Konzentrat, Sequenziergel Verdünner und Sequenziergel Puffer-Konzentrat (ROTH, Karlsruhe) im gewünschten Verhältnis miteinander vermischt und kurz vor dem Gießen TEMED (0,1 % (v/v)) und APS (1 % (w/v)) zugegeben. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA in TBE Puffer durchgeführt. Das Laufverhalten der Nukleinsäure wurde anhand der zwei Farbstoffe BPB und XC verfolgt (Tabelle 2.7). Visualisierung der Gele erfolgte durch Verwendung von Phosphoimager „*Imaging Screens*“ (GE Healthcare, München), AlphaImager (Alpha Innotech Corporation, San Leandro) (2.7.2) oder UV-Shadowing (2.7.3).

% Acrylamid	BPB/(nt)	XC/ (nt)
20	~ 19	~ 4-5
19	~ 20	~ 6-7
18	~ 25	~ 7-8
15	~ 30	~ 9-10
12	~ 40	~ 14-16
10	~ 50	~ 18-19
8	~ 60	~ 22-23
6	~ 80	~ 25-26

Tabelle 2.7: Komigrationsverhalten einzelsträngiger Nukleinsäurefragmente und der Farbstoffe BPB und XC in denaturierenden Polyacrylamidgelen.

2.6.3 Native Polyacrylamid Gelelektrophorese (native PAGE)

Unter nicht-denaturierenden Bedingungen beeinflussen die tertiären Strukturen die Wanderungsgeschwindigkeit von Nukleinsäuren, somit können Polynukleotide mit verschiedenen Konformationen voneinander getrennt werden. Die nicht-denaturierende Gelelektrophorese wird in Abwesenheit von Harnstoff und unter gekühlten Bedingungen durchgeführt, um eine Denaturierung während der Elektrophorese zu verhindern.

Die Proben wurden mit „Ladepuffer native“ (2.2) versetzt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für 5 min bei 60 °C denaturiert und für 20 min bei Raumtemperatur renaturiert. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA in TBE Puffer durchgeführt. Visualisierung der Gele erfolgte durch Verwendung der Phosphoimager „*Imaging Screens*“ (GE Healthcare, München) oder Northern-Blotting und nachfolgender Hybridisierung mit entsprechender Sonde (2.7.4).

2.6.4 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli durchgeführt. Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Ein SDS-Polyacrylamidgel setzt sich aus einer Sammelgelschicht und einer Trenngelschicht zusammen (2.2). Die SDS-PAGE wurde in einer Elektrophoresekammer (Mini-

Protean 3, Bio-Rad, München) 15 min bei 75 V und 40 min bei 150 V durchgeführt. Vor dem Laden wurden die Proben mit Ladepuffer (2.2) versetzt und 4 min bei 95 °C denaturiert.

Die Gele wurden sofort nach dem Ende der Elektrophorese in Plastikschaalen mit Coomassie Brilliant Blue (Bio-Rad, München) gefärbt und zwischen zwei Folien in Trockenschrank (GelAirDryer, Bio-Rad, München) getrocknet.

2.7 Nachweis von Nukleinsäuren

Zur Auswertung der Gele nach der Elektrophorese wurden die RNA-Moleküle entweder vor der Elektrophorese radioaktiv markiert und anschließend in einer Autoradiographie nachgewiesen oder nach der Elektrophorese mit verschiedenen Farbstoffen gefärbt und unter UV-Licht betrachtet oder es erfolgte eine Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden.

2.7.1 Ethidiumbromid Färbung

Mit Hilfe der Ethidiumbromidfärbung kann die Position der DNA-Fragmente im Agarosegel unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Mittels Ethidiumbromidfärbung wurden die Nukleinsäurebanden sowohl in Agarosegelen als auch in Polyacrylamidgelen angefärbt. Ethidiumbromid ist ein rotbrauner Farbstoff, der zwischen den Basenpaaren interkaliert und bei Anregung mit UV-Licht stark fluoresziert. Agarosegelen wurde 5 µl Ethidiumbromidlösung direkt zugesetzt, Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese 30 min in Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ ml in 1 x TBE) geschwenkt.

2.7.2 Autoradiographie

Die Position und Intensität radioaktiv markierter Substanzen kann nach Auftrennung in einem Elektrophoresegel durch Auflegen eines Röntgenfilms (Medical X-ray Film RXOG (Safety), Fuji) auf das Gel ermittelt werden; der Röntgenfilm wurde in lichtdichten Filmkassetten exponiert und in der AGFA Curix 60 entwickelt.

Alternativ wurden Spezialplatten („*Imaging Screens*“, GE Healthcare, München) anstelle von Röntgenfilmen exponiert. Ein Auslesen der Platten erfolgte in einem Gerät der Firma Amersham, Typhoon 9400. Mit Hilfe einer entsprechenden Software („*ImageQuant*“, Version 5.2) wurden die Daten quantifiziert.

2.7.3 UV-Shadowing

Durch UV-Shadowing können Nukleinsäuren ohne Färbung detektiert werden. Dazu wurde das Gel auf eine feste Folie und anschließend auf eine fluoreszierende Dünnschichtchromatographie-Platte gelegt. Aufgestrahltes UV-Licht (254 nm) wird von den Nukleinsäuren absorbiert, so dass an dieser Position ein dunkler Schatten entsteht. Um UV-induzierte Schäden an den Nukleinsäuren zu vermeiden, wurde die Exposition möglichst kurz gehalten.

2.7.4 Northern-Blotting

Northern-Blotting wird dazu verwendet, um in einem Gemisch von RNA- Fragmenten eine bestimmte Sequenz nachzuweisen. Zuerst wurde die Gesamt-RNA (2.17.3) oder Gesamt-tRNA (2.17.4) aus den Zellen isoliert und parallel zu den nichtradioaktiven Transkripten (2.5.2.1) elektrophoretisch aufgetrennt (2.6.2 bzw. 2.6.3). Anschließend wurde die RNA aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nylonmembran (Hyperbond-N, Amersham Life Science) transferiert. Der Blotaufbau (Abbildung 2.3) bestand dabei aus drei Lagen Whatman-Papier, Polyacrylamidgel, Nylonmembran und drei weiteren Lagen Whatman-Papier. Membran und Whatman-Papier wurden zunächst in 0,25 x SSC-Puffer getränkt, um einen luftblasenfreien Transfer zu gewährleisten. Der RNA-Transfer erfolgte für 15 min bei 150 V, 30 min bei 500 V. Anschließend wurde die RNA 1 min bei 150 J/cm² auf der Membran in einem CL 1000 UV Crosslinker (UVP) fixiert. Die Membran wurde dann direkt zur Prähybridisierung mit 7 ml Hybridisierungs-Puffer über Nacht bei 55 °C in einen Hybridisierungsofen mit Rotationsfunktion (Thermo, Karlsruhe) gegeben. Am nächsten Tag erfolgte die Hybridisierung mit 5'-markierter Sonde (2.3) (unter den gleichen Bedingungen) für 3-4 h.

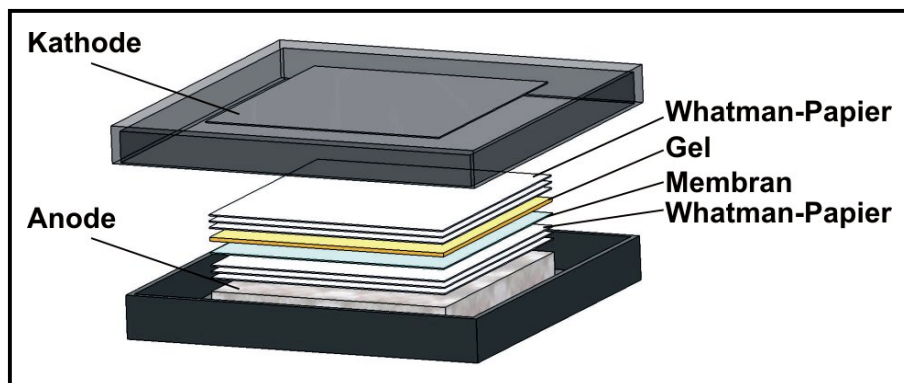


Abbildung 2.3: Northern-Blotting.

2.8 Gelelution von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden durch Diffusion aus den Gelen eluiert. Bei radioaktiv markierten Nukleinsäuren wurde zunächst mit einem 1:1 Ausdruck des Autoradiographie-Bildes als Schablone die gewünschte Bande aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Bei nicht radioaktiv markierten Nukleinsäuren wurde die Lage der Bande durch UV-Shadowing (2.7.3) bestimmt. Die Gelstücke wurden mit 400 μ l Elutionspuffer (0,5 M Ammoniumacetat) überschichtet und über Nacht bei 20 °C geschüttelt. Die Nukleinsäuren wurden per Zentrifugation durch eine Membran (NANOSEP MF 0.45 μ m; PALL, Darmstadt) gefiltert und durch Ethanol-fällung konzentriert.

2.9 Aufreinigung der RNA mit organischen Lösungsmitteln

Durch die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln werden die Proteine aus der Nukleinsäurelösung entfernt. Dabei hat Phenol eine denaturierende Funktion und Chloroform dient neben der Denaturierung zur besseren Trennung der Phasen.

Die wässrige Nukleinsäurelösung wird mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform (Roth, Karlsruhe) versetzt. Danach wurden die Phasen durch Zentrifugation bei 1000 g für 3 min bei Raumtemperatur getrennt (MIKRO 120, Hettich, Bäch). Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Der wässrige Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Gefäß überführt und zur Entfernung der Phenolreste zweimal mit Wasser gesättigtem Diethylether extrahiert (1000 g / 3

min / RT). Die Etherreste wurden durch Evaporation unter dem Abzug entfernt. Die Isolierung der Nukleinsäure erfolgte durch Fällung mit Ethanol.

2.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

2.10.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von doppelsträngiger (ds) DNA oder einzelsträngiger (ss) RNA wurde anhand der OD bei einer Wellenlänge von 260 nm berechnet. Dabei gilt, dass die OD_{260} bei einer Konzentration an dsDNA von 50 µg/ml bzw. ssRNA von 40 µg/ml (1980-Davis) gleich 1 ist. Die OD-Werte wurden an Ultrospec 2100 *pro* (GE Healthcare, München) oder ND-1000 (PeqLab, Erlangen) UV/Vis Spectrophotometer gemessen.

Um Verunreinigungen in den Nukleinsäurelösungen zu beurteilen, wurde das Verhältnis der OD-Werte bei 260 nm (Absorptionsmaximum Nukleinsäuren) zu 280 nm (Absorptionsmaximum der Proteine), die bei einer reinen DNA-Lösung 1,8 und bei einer reinen RNA-Lösung 2 beträgt, verfolgt. Bei Verunreinigungen mit Protein oder Phenol ist dieser Wert signifikant kleiner.

2.10.2 Konzentrationsbestimmung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren

Die RNAs wurden mit [α - 32 P]-NTPs transkribiert (2.5.2.2) und durch denaturierende PAGE gereinigt. Ein Aliquot (1 µl) von den gesamten Transkriptionsansatz und die erhaltene RNA wurden am Cerenkov-Zähler (LS 6500, Beckman Coulter, Krefeld) vermessen und mit folgenden Formeln die Menge bestimmt.

$$\text{Einbaureate des } [\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP} = \frac{\text{Radioaktivität der RNA [cpm]} * 100 \%}{\text{Eingesetzte Gesamtradioaktivität [cpm]}}$$

$$\text{RNA-Stoffmenge} = \frac{\text{Einbaureate} * \text{Konzentration NTP} * \text{Ansatzvolumen}}{\text{Anzahl der im Transkript vorkommenden Nukleotide}}$$

2.11 Enzymatische Spaltung von RNA

2.11.1 Enzymatische Kartierung

Spezifische Spaltungen durch Ribonukleasen liefern Informationen über zugängliche Bereiche bzw. Sekundärstrukturen in Ribonukleinsäuren.

Dafür wurde die 5'- bzw. 3'-radioaktiv markierte RNA (50.000 cpm/Ansatz) durch Erwärmen auf 65°C für 3 min und Abkühlen auf Raumtemperatur während 20 min renaturiert. Die enzymatischen Hydrolysen mit den Nukleasen T1, T2, S1 und V1 wurden in 20 µl 1 x E1 Puffer (2.2) durchgeführt.

Ribonuclease T1 (RNase T1)

Die RNase T1 (MW 11000 Da) aus *Aspergillus oryzae* ist eine Endoribonuklease, die spezifisch Phosphodiesterbindungen benachbart zum 3'-Phosphat von Guanosin Nukleotiden einer RNA spaltet (5'-Gp▼NpNpNp-3'). Es entstehen Produkte mit terminalen Guanosin-3'-Phosphaten.

Ribonuclease T2 (RNase T2)

RNase T2 (MW 36000 Da) aus *Aspergillus oryzae* ist eine einzelstrang-spezifische Endonuclease. Wie bei RNase T1 entstehen Fragmente mit einem 3'-Phosphat-Ende.

Ribonuclease V1 (RNase V1)

RNase V1 (MW 15900 Da) ist eine Endonuclease aus dem Gift der Kobra *Naja naja oxiana* und spaltet bevorzugt doppelsträngige oder strukturierte Regionen in der RNA ohne Basenspezifität. Dabei entstehen Fragmente mit einer 5'-Phosphatgruppe (5'-NpN▼pNpNp-3'). RNase V1 spaltet auch einzelsträngige Regionen, die in einer gestapelten Konformation vorliegen.

Nuclease S1

Nuclease S1 (MW 32000 Da) aus *Aspergillus oryzae* ist eine einzelstrang-spezifische Endonuclease, die die Anwesenheit von Zn^{2+} erfordert [Berk and Sharp, 1977]. Sie spaltet sowohl RNA als auch DNA und dabei entstehen Fragmente mit einem 5'-Phosphat-Ende. Nuclease S1 wird zur Erkennung ungepaarter RNA-Regionen genutzt.

Dem Reaktionsansatz wurde Carrier-RNA (totale *E.coli* tRNA) zugegeben, um Probleme bei der Reproduzierbarkeit bei den geringen Mengen eingesetzte markierte RNA-Konzentrationsschwankungen zu vermeiden.

Die Reaktionsansätze wurden für 15 min bei 37 °C (bei temperaturabhängiger Hydrolyse bei 20, 25, 30, 35, 40 oder 45 °C) mit 6 U RNase T1, 0,25 U RNase T2, 0,2 U RNase V1 und 0,1 U Nuklease S1 oder bei temperaturabhängiger enzymatischer Spaltung mit 10 µl der entsprechenden Konzentration an RNase T1 (Tabelle 2.8) inkubiert. Die Enzymkonzentration und die Inkubationsdauer müssen dabei so gewählt werden, dass kein vollständiger Verdau der RNA auftritt. Etwa 90 % der eingesetzten RNA sollte unverdaut bleiben. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 20 µl RNase-Stop Lösung (2.2) und anschließender Extraktion mit 40 µl Roti-Phenol gestoppt. Die RNA wurde mit dem zehnfachen Volumen (400 µl) 2% LiClO₄ in Aceton präzipitiert und das Pellet getrocknet. Die Proben wurden dann mit der Pb-Stop Lösung (2.2) versetzt und auf einheitliche Konzentrationen an cpm/µl gebracht. Gleich große Probenvolumina wurden dann auf einem 10 bis 15 %igen denaturierenden Polyacrylamidgel bei 1500 Volt für 3-4 h aufgetrennt und mittels Phosphorimager analysiert.

Temperatur (°C)	Nuklease Konzentration (U/µl)			
20	0,15	0,12	0,06	0,02
25	0,12	0,06	0,02	0,01
30	0,06	0,02	0,01	0,006
35	0,02	0,01	0,006	0,002
40	0,01	0,006	0,002	0,0015
45	0,006	0,003	0,0015	0,0012

Tabelle 2.8: Nuklease Konzentrationen bei temperaturabhängigen RNase T1 Spaltung.

2.11.2 Vollständige Hydrolyse von RNA

Spaltung mit Nuclease P1

Nuclease P1 (MW 24000 Da) aus *Penicillium citrinum* spaltet die Bindung zwischen der 3'-Hydroxy- und der 5'-Phosphatgruppe. Bevorzugt werden dabei Phosphodiesterbindungen in einzelsträngiger DNA und RNA hydrolysiert. Die Nuclease P1 ist auch eine Phosphomonoesterase, die die 3'-terminale Phosphatgruppe eines Nukleotids abspaltet, so dass als endgültige Hydrolyseprodukte 5'-Mononukleotide entstehen.

Für die vollständige Hydrolyse wurde die RNA (50000 cpm) mit 50 mM NH₄OAc, pH 5,3 versetzt und nach der Zugabe von 0,3 U RNase P1 über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Spaltung mit Ribonuclease T2 (RNase T2)

RNase T2 (MW 36000 Da) aus *Aspergillus oryzae* ist eine einzelstrang-spezifische Endonuclease. Wie bei RNase T1 entstehen Fragmente mit einem 3'-Phosphat-Ende.

Für die vollständige Hydrolyse („*next neighbor*“ Analyse) wurde die RNA (50000 cpm) mit 50 mM NH₄OAc, pH 4,6 versetzt und nach der Zugabe von 0,2 U RNase T2 über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

2.11.2.1 2D-Dünnschichtchromatographie

Die Analyse einzelner Mononukleotide nach einem Nukleaseverdau wurde durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie ermöglicht [Rogg et al., 1976]. Die Auftrennung der mit RNase T2 bzw. Nuklease P1 in einzelne Nukleotide verdauten, [α -³²P]-markierten tRNA-Transkripte erfolgte auf einer mit Cellulose beschichteten DC-Platte. Dazu wurde 1 μ l (3000 - 5000 cpm) einer RNA-Lösung mit einer Pipettenspitze vorsichtig aufgetragen und getrocknet. Anschließend wurde die Platte in den DC-Laufpuffer A gestellt. Nach ca. 4 Stunden erreichte der Puffer den oberen Rand der Platte. Bevor die Auftrennung in die 2. Dimension im DC-Laufpuffer B bzw. DC-Laufpuffer C (2.2) erfolgte, wurde die Platte luftgetrocknet. Nach dem zweiten Lauf wurden die DC-Platten getrocknet und mittels Autoradiographie (2.7.2) analysiert.

2.11.3 G- und L-Leiter

2.11.3.1 Guanosinleiter aus dem Verdau mit Ribonuclease T1 (RNase T1)

Die RNase T1 (MW 11000 Da) aus *Aspergillus oryzae* ist eine Endoribonuklease, die spezifisch Phosphodiesterbindungen benachbart zum 3'-Phosphat von Guanosin Nukleotiden einer RNA spaltet (5'-Gp \blacktriangledown NpNpNp-3'). Es entstehen Produkte mit terminalen Guanosin-3'-Phosphaten, die im denaturierenden Polyacrylamidgel eine Guanosin-spezifische Leiter ergeben. RNase T1

spaltet unter denaturierenden Bedingungen (3,5 M Harnstoff) und ermöglicht zusammen mit der partiellen alkalischen Hydrolyse (2.11.3.2) die Zuordnung von Banden aus enzymatischen (2.11.1) und chemischen Spaltungen (2.12). Die denaturierende Spaltung erfolgte 10 min bei 55 °C .

2.11.3.2 Partielle alkalische Hydrolyse

Durch alkalische Hydrolyse kann RNA nach jedem Nukleotid gespalten werden, die im denaturierenden Polyacrylamidgel eine Leiter entsteht. Zusammen mit der T1-Leiter als Größenstandard ermöglicht dies eine Zuordnung von Banden aus enzymatischen und chemischen Spaltungen. Zu diesem Zweck wurde die 5'-markierte RNA mit 50 mM NaHCO₃, pH 9,0 versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Pb-Stop Lösung (2.2) und durch sofortiges Einfrieren beendet.

2.12 Chemische Spaltung der RNA

Chemische Spaltung der RNA wurde nach [Peattie and Gilbert, 1980] durchgeführt.

2.12.1 Spaltung mit Bleiacetat

Bei niedrigen Bleiionenkonzentrationen beobachtet man hochspezifische Spaltungen an bestimmten Positionen der RNA [R. Giege, 2001]. Spezifität und Intensität der bleiinduzierten Hydrolyse sind stark abhängig vom pH-Wert, der Mg²⁺-Konzentration, der Temperatur und der Konformation der RNA.

Der Reaktionsansatz mit 5'-[γ -³²P]-markierter RNA (200.000 cpm/Ansatz) und 0,6 µg/µl Carrier-RNA (total *E.coli* tRNA) in 25 µl Endvolumen wurde durch Erwärmen auf 60 °C für 3 min und Abkühlen auf Raumtemperatur während 20 min renaturiert, damit die RNA in einer möglichst nativen Konformation vorlag. Nach Zugabe von 0,6 bzw 1,2 mM Bleiacetat (Tabelle 2.9) und 1 x E1 Puffer wurde für 15, 30, 60, 90 und 120 min bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe eines Volumens von Pb-Stop Puffer (2.2) und sofortigem Einfrieren gestoppt.

			Endkonzentration
Lösung I	113,8 mg Pb(OAc) ₂ 1 ml H ₂ O		0,3 M Pb(OAc)₂
Lösung II	8 µl 0,3 M Pb(OAc)₂ 992 ml H ₂ O	100 µl 2,4 mM Pb(OAc)₂ + 100 µl 2 x E1 Puffer (2.2)	1,2 mM Pb(OAc)₂
Lösung III	4 µl 0,3 M Pb(OAc)₂ 996 ml H ₂ O	100 µl 1,2 mM Pb(OAc)₂ + 100 µl 2 x E1 Puffer (2.2)	0,6 mM Pb(OAc)₂

Tabelle 2.9: Herstellung der Bleiacetat-Lösung. Alle Lösungen wurden frisch vor dem Gebrauch vorbereitet. Bleiacetat wurde im Wasser gelöst und durch Zugabe von einem Volumen E1 Puffer die gewünschte Konzentration der Bleiacetat-Lösung erhalten.

2.12.2 Spaltung mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)

Der Reaktionsansatz mit 5'-[α-³²P]-markierter RNA (250.000 cpm/Ansatz) und 0,4 µg/µl Carrier-RNA/Ansatz (total *E.coli* tRNA) in 50 µl Endvolumen wurde durch Erwärmen auf 60 °C für 3 min und Abkühlen auf Raumtemperatur während 20 min renaturiert. Nach Zugabe von N1 Puffer für native und S1 für semi-denaturierende und denaturierende Bedingungen wurden (außer bei der Kontrolle) 20 µl reines DEPC zugegeben und bei 20, 25, 30, 35, 40 und 45 °C für 50, 150 und 180 min unter nativen und semi-denaturierenden Bedingungen sowie bei 60 °C für 10, 20 und 25 min unter denaturierende Bedingungen inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 50 µl DEPC-Stop Lösung (2.2) und durch 2faches Füllen mit Ethanol gestoppt. Das Pellet wurde in 15 µl Anilin-Acetat Puffer (100 µl Anilin + 60 µl HOAc; 2 min vortexen und nach der Zugabe von 930 µl H₂O bei -20 °C einfrieren) gelöst und im Dunklen 10 min bei 60 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 180 µl DEPC-Stop Lösung (2.2) und 600 µl EtOH gefällt und das Pellet in Pb-Stop Puffer (2.2) aufgenommen.

Anschließend wurden die Proben auf einheitliche cpm/µl Zahl eingestellt und auf einem 12 %igen denaturierenden Gel aufgetrennt.

2.13 Modifikation der RNA

Die mit [α - ^{32}P]-NTP transkribierten tRNAs wurden mit mitochondrialen Extrakten, Pus1p und Pus4p rekombinanten Enzymen modifiziert. Dafür wurden die tRNAs (200000 cpm) mit M8- bzw. Pus MOD-Puffer (2.2) versetzt und für 3 min bei 60 °C denaturiert und dann für 20 min bei Raumtemperatur renaturiert, damit sie sich in ihrer natürlichen Konformation falten konnten. Danach wurde ein Premix mit M8-Puffer und mitochondrialen Extrakten bzw. mit Pus MOD-Puffer und Pus1p oder Pus4p Enzymen dazugegeben und für 0 bis zu 3h bei 20, 30, 37 bzw. 45 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 Volumina Ladepuffer (2.2) gestoppt und die tRNAs über ein 10 %iges Gel aufgereinigt.

2.14 Temperaturabhängige UV-Spektroskopie (Schmelzkurven)

Die Messung von Schmelzkurven ist eine einfache Methode, die die Untersuchung der Konformationsänderungen von Nukleinsäuren während des Übergangs von einem nativen zu einem denaturierten Zustand ermöglicht. Die Methode beruht auf der Messung der UV-Absorption in Abhängigkeit von der Temperatur. Durch das Auflösen der Basenpaarungen innerhalb eines RNA-Moleküls kommt es bei der Entfaltung zu einer Zunahme der Absorption (Hyperchromizität). Die Faltung von RNA-Molekülen ist ein sehr komplizierter Prozess, in dem die Abstoßungskraft der negativen Ladungen des Polyphosphat-Rückgrates durch die Bindung von mono- und/oder divalenten Metallionen kompensiert wird. Die Metallionen stabilisieren dabei die native tertiäre Struktur.

Die Schmelzkurven wurden bei 260 nm an einem Cary 100 Bio-UV/Vis Spectrophotometer (Varian, Darmstadt) aufgenommen. Die Messküvette (Cary UV MICRO CELL 0,9 ml, Varian, Darmstadt) hatte eine Schichtdicke von 10 mm. Die UV-Absorption wurde als Funktion der Temperatur im Intervall 20-90° aufgezeichnet (Heizrate: 0.5 °C/min). Als Puffer diente ein 50 mM Phosphatpuffer mit 150 mM Natriumchlorid und einem pH-Wert von 7. Von jeder tRNA wurden ca. 8 μg (OD_{260} 0,4 bis 0,8) in 600 μl Puffer (mit/ohne NaCl) gelöst und bei der Anwesenheit von 1 bis 10 mM MgCl_2 gemessen. Die Lösungen wurden vor der Messung 10 min im Ultraschallbad entgast, in die Küvetten überführt und mit einer 2-3 mm dicken Schicht an Silikonöl überschichtet. Da die thermische Denaturierung bei der tRNA reversibel ist, wurden die Proben nach einem Denaturierungsschritt (20-90 °C) renaturiert (90-20 °C). Dieser Vorgang

wurde dreimal wiederholt. Die erhaltenen Kurven wurden mit dem Programm MS Excel ausgewertet: (i) die Absorptionendwerte wurden auf 1 normiert; (ii) die erste Ableitung der normierten Absorptionswerte wurde berechnet; (iii) durch Berechnen des gleitenden Durchschnitts über jeweils zwanzig Absorptionswerte wurde die Kurve geglättet. Die Übergangstemperatur T_m wurde als Maximum der ersten Ableitung der Absorptionskurve ($dAbs/dT$) abgelesen.

2.15 Mikrobiologische Methoden

Alle für die Kultivierung von *E.coli* verwendeter Geräte und Medien wurden bei 121 °C autoklaviert.

2.15.1 Kultivierung von *E.coli*

Bakterielle Vorkulturen wurden in 3 mL LB-Medium in 15 ml Falcon Gefäßen von einer Einzelkolonie oder einer Glycerinkultur angesetzt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Für Plasmidpräparationen wurden die Vorkulturen in 500 mL LB-Medium im Erlenmeyerkolben bei 37 °C für 24 h herangezogen. Zur Selektion plasmidhaltiger Stämme wurde dem Medium 100 µg/ml Ampicillin hinzugefügt. Der Wachstumsgrad wurde durch Messungen der OD bei 600 nm verfolgt. Für Dauerkulturen wurden 500 µl Bakterienkultur mit 500 µl Glycerin vermischt und bei -80 °C aufbewahrt. Um einzelne Kolonie zu erhalten, wurden LB-Agarplatten mit dem 3-Ösen-Ausstrich angelegt und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.15.2 Elution von DNA aus Agarosegelen

DNA Fragmente wurden aus Agarosegelstücken mit dem JETsorb Gel Extraktion Kit (2.4) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert.

2.15.3 Transformation von kompetenten *E.coli* Zellen

Es wurden 50 μ l kompetente Zellen (Rosetta DE3 pLysS, Novagen) auf Eis aufgetaut, mit 2 μ l (10 ng/ μ l) Plasmid gemischt und 5 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen 30 s bei 42 °C inkubiert, 2 min auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 250 μ l SOC-Medium 1 h bei 37 °C und 250 rpm im Eppendorf-Thermoshaker geschüttelt. Die Zellen wurden auf einer LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.15.4 Präparation von Plasmid DNA aus *E.coli*

Die Präparation von DNA wurde im analytischen (3 ml Plasmid-Minipräparation) oder präparativen (500 – 1000 ml Plasmid-Maxipräparation) Maßstab durchgeführt. Die Plasmidpräparation wurde im Wesentlichen nach dem Protokoll des Herstellers (Qiagen) durchgeführt.

2.16 Aufreinigung der Pus1 und Pus4 rekombinanten Enzyme

2.16.1 Induktion der Proteinexpression

Die 10 ml Übernachtskulturen wurden in 300 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,7 erreicht wurde. Nach Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG wurden die Bakterien 3-5 h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 4°C und 4500 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -80°C (über Nacht) gelagert. Um den Erfolg der Proteininduktion zu überprüfen, wurde jeweils vor und nach der Induktion 1 ml Bakteriensuspension als Probe genommen, 1 min bei 20000 g und RT abzentrifugiert und das Sediment in 100 μ l SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden dann mit SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Aufreinigung der Pus1 und Pus4 rekombinanten Proteine mit HisTag erfolgte mit HisTrap HP (GE Healthcare, München) Säulen nach [Arluison et al., 1998]. Der HisTag ist eine Reihe von sechs aufeinander folgenden Histidinen [Porath et al., 1975], die an das zu reinigende Protein angekoppelt sind. Die Säule wurde zuerst mit Pus HisTag Puffer A 97 % und HisTag Puffer B 3

% (2.2) äquiliibriert. Nach Auftragen des Zellextraktes (1 ml) wurde die Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min weitere 20 min gewaschen. Die geringe Konzentration von Imidazol erhöht die Reinheit der Proteinisolierung. Anschließend wurde das gebundene Pus1-Protein 15 min und Pus4 20 min mit einem linearen Gradient von Imidazol eluiert; Imidazol konkurriert mit dem HisTag des Proteins um Koordinationsstellen der Ni²⁺ Ionen. Das Pus1 Enzym eluierte bei einer Imidazolkonzentration von ca. 50 mM in einem Volumen von 8 ml und Pus4 von 60 mM und einem Volumen von 14 ml. Die Imidazolreste wurden durch Dialyse in 1 L Pus-Dialysepuffer (2.2) entfernt.

Sämtliche Schritte wurden bei 4°C (Kühlraum) mit eisgekühlten Lösungen durchgeführt.

2.16.2 Konzentrationsbestimmung der Proteine

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der von Bradford [Bradford, 1976] beschriebenen Methode. Die Proben wurden 1:5 (v/v) mit der Reagenzlösung (Quick Start Bradford, Bio-Rad, München) verdünnt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Für eine Eichgerade wurden aufsteigende BSA-Konzentrationen von 0,5 µg/ml bis 5 µg/ml (Bio-Rad, München) gemessen.

2.17 Methoden für Zellkultur

2.17.1 Zelllinien

#7497 Osteosarcoma Zellen (Prof. Rudolf Wiesner, Köln)

143 B Osteosarcoma Zellen (Prof. Rudolf Wiesner, Köln) [Mollers et al., 2005]

S3 HeLa Zellen (Prof. Utz Fischer, Würzburg)

2.17.2 Die Anzucht der Zellen

Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank Biowizard Kojair (Axon) durchgeführt. Die Aufzucht der Osteosarcoma Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (Nunc) in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* DMEM unter Zusatz von 5 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 %

Penicillin/Streptomycin, 1 % Pyruvat und 0,5 % Uridin und S3 HeLa Zellen in Zellkultursuspension Flaschen Celstir (Wheaton, Millville) in DMEM unter Zusatz von 5 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt im Brutschrank HERA Cell 150 (Kendro). Die Osteosarcoma Zellen wurden alle 2-3 Tage unter sterilen Bedingungen passagiert. Dazu wurde das Zell-Nährmedium abgesaugt. Die Zellen wurden durch Trypsinierung (50 µl/cm²) vom Boden gelöst und mit 6 ml Nährmedium in ein steriles 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nun wurden die Zellen durch 5-minütige Zentrifugation bei 1040 x g pelletiert. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, erfolgte die Suspension des Zellpellets in 5 ml Nährmedium. Zum Passagieren der Zellen wurde 1/3 (v/v) der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit 2/3 (v/v) Medium aufgefüllt.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen von der Flaschenboden abgelöst und in ein 15 ml Falcon überführt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 1040 x g wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in Nährmedium resuspendiert. 20 µl Zellsuspension wurde in eine Neubauer-Kammer überführt. Unter dem Mikroskop wurden beide Kammern ausgezählt und hiervon der Mittelwert gebildet.

2.17.3 Aufreinigung der Gesamt-RNA aus Osteosarcoma Zellen

10⁶ Zellen wurden in 4 ml MLB Lösung gemischt, 1-2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 0,125 M Natriumacetat, 3,75 ml Phenol (1 kg Phenol in 200 ml 100 mM NaOAc, pH 4,5 equilibrieren) und 0,75 ml Chlorophorm vorsichtig vermischt und 20 min bei 4 °C und 18000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße abpipettiert und ethanolpräzipitiert. Die aufgereinigte RNA wurde in 20 µl H₂O aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

2.17.4 Aufreinigung der Gesamt-tRNA aus Gesamt-RNA

Die tRNAs wurden aus der Gesamt-RNA (2.17.3) mit der Säule vom Plasmid MiniKit 25 (Qiagen) gewonnen. Die Säule wurde mit 3 ml QEB (2.2) equilibriert und mit in QLW

aufgenommener Gesamt-RNA beladen. Zunächst erfolgten 2 Waschschrirte mit je 3 ml QLW. Danach wurde die gesamt tRNA mit 3 ml QEL eluiert. Die Nukleinsäuren wurden durch Ethanol-fällung konzentriert. Konzentrationsbestimmung der tRNA erfolgte photometrisch (2.7.2) bei 260 nm.

2.17.5 Aufreinigung der mitochondrialen Zellextrakte

2.17.5.1 Herstellung von Saccharosedichtegradienten

Zur Herstellung von Saccharosedichtegradienten wurden zunächst zwei Lösungen mit der niedrigsten und der höchsten Saccharosekonzentration (2.2; Saccharose-O und Saccharose-U) des Gradienten angesetzt und kühl gelagert. Dann wurden 6 ml der höher konzentrierten Saccharoselösung in ein 14 ml-Cellulose-Nitrat-Gefäß (Beckmann) gegeben und vorsichtig unter Vermeidung der Vermischung beider Phasen mit 6 ml der niedriger konzentrierten Saccharoselösung überschichtet.

2.17.5.2 Präparation von Mitochondrien aus HeLa Zellen

5 g Zellpellet wurde mit 30 ml NKB-Puffer (2.2) versetzt und in 3 15 ml Falcon Gefäße verteilt. Alle 3 Teile wurden danach gleich behandelt. Die Zelllösungen wurden bei 1060 x g für 5 min bei -4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml RSB-Puffer resuspendiert. Nach 2minütiger Inkubation auf Eis wurden mit Homogenisator PotterS (Sartorius, Göttingen) die Zellen aufgebrochen (20mal bei 600 Drehungen/min). Das Verhältnis der aufgebrochenen und ganzen Zellen wurde unter dem Mikroskop beobachtet. Wenn es niedriger als 80 % war, wurde der Vorgang wiederholt. Zu der Zellsuspension wurden 1,6 ml 2M Saccharose Lösung zugegeben. Alle 3 Pellets wurden in ein 50 ml Falcon-Tube zusammen geführt und bei 1200 x g für 3 min zentrifugiert. Das Präzipitat bestehend aus Zellkernen und anderen Zelltrümmern wurde verworfen. Der Überstand wurde zur Reinigung von groben Bestandteilen erneut 3 min bei 1200 x g zentrifugiert. Die nach der Differentialzentrifugation erhaltene Mitochondrienfraktion ist noch verunreinigt. Um sie zu reinigen, wurde den Mitochondrienfraktion 2 mg/ml Digitonin zugegeben und je 7 ml vorsichtig auf den

Saccharosegradienten gegeben. Der Gradient wurde 20 min bei 22000 x g bei 4 °C in der Ultrazentrifuge (SW 27/28 – Beckman-Rotor) zentrifugiert. Dabei bildet sich zwischen der 1 M- und 1,5 M-Schicht ein Ring. Diese Bande enthält die Mitochondrien und wurde mit einer Pipette abgenommen und bei 10000 x g für 30 min bei -4 °C pelletiert.

2.17.5.3 Aufreinigung der mitochondrialen Zellextrakte

Das Pellet wurde dann in 6 ml M8-Puffer (2.2) mit „*Complete mini protease inhibitor*“ (Roche, Basel) resuspendiert und in 3ml Ultrazentrifugen-Gefäße transferiert. Nach dem Homogenisieren mit einem Sonifikator (MS 72 Spitze) bei 20 % Amplitude, 10 x 10 Sekunden mit einminütigem Kühlen wurden die Lösungen 60 min bei 39000 rpm (Beckman TLA 100.3) bei 4 °C ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde mit *Amicon Ultra Centrifugal Filters* (10 kDa Porengröße; Millipore) bis auf 1 ml konzentriert. Die Extrakte wurden danach entweder mit 20 % Glycerol versetzt und bei – 20 °C aufbewahrt, oder mittels Größenausschluss-Chromatographie über eine HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 Säule fraktioniert (Fluß-Rate: 1 ml/min; Puffer: M8 + 300 mM NaCl).

3 Aufgabenstellung

Seit Anfang der 80er-Jahre des 20. Jahrhunderts konnten verschiedene Erkrankungen auf der mitochondrialen Ebene beschrieben werden. Schweregrad und klinische Symptomatik werden einerseits durch die Art einer Mutation und andererseits durch das Verhältnis mutierter gegenüber gesunder mtDNA (Heteroplasmie) bestimmt. Symptome werden in Organen beobachtet, in welchen der Anteil mutierter mtDNA einen spezifischen Schwellenwert überschreitet. Am häufigsten sind ZNS, Muskel und Herz betroffen. Es werden immer weitere Mutationen in tRNA-Genen beschrieben, welche mit einem Syndrom assoziiert sind, sie sind die "hotspots" für die mitochondrialen Myopathien. Diese Mutationen reduzieren die Menge zur Verfügung stehender funktioneller tRNAs, was eine signifikante Verminderung der mitochondrialen Proteinsynthese zur Folge hat. Bisher ist ungeklärt, welche molekularen Aspekte der mutierten tRNAs die Auslösung des Krankheitsbildes bewirken.

Trotz vieler Kenntnisse über die tRNA-Struktur sind die Wechselwirkungen zwischen den tRNA Strukturelementen noch nicht vollständig aufgeklärt, und der Einfluß von modifizierten Nukleotiden ist in mitochondrialen tRNAs im Wesentlichen unerforscht. Das Ziel der Arbeit war es, aufgrund der Mutationen in den T- und D-Arm Regionen von vier verschiedenen mitochondrialen tRNAs ($tRNA^{Lys}$, $tRNA^{Leu(CUN)}$, $tRNA^{Gln}$ und $tRNA^{Ser(UCN)}$) aufzuklären, ob tertiäre Wechselwirkungen in den tRNAs an der pathogenen Wirkungen beteiligt sind. Dafür sollten die Strukturen der genannten tRNAs als Wildtyp und deren Mutanten mit einer Reihe biochemischer Techniken untersucht werden, zu denen unter anderem chemische und enzymatische Kartierung, UV-Spektroskopie und native Gelelektrophorese gehörten.

Die Modifikation einzelner Nukleotide in tRNAs stellt einen wichtigen Vorgang während der tRNA-Reifung *in vivo* dar. Die posttranskriptionellen Modifikationen dienen zur RNA-Stabilisierung, zur Regulation der Translationseffizienz und zur RNA-Prozessierung. Das Fehlen von Modifikationen in tRNAs wirkt sich je nach tRNA-Spezies unterschiedlich aus. Zum einen kann die Faltung und Struktur von tRNAs durch Modifikationen beeinflusst werden. Einige tRNAs bilden hierbei in der unmodifizierten Form Sekundärstrukturen aus, die stark von der klassischen Kleeblattstruktur abweichen und zu biologisch inaktiven tRNA-Molekülen führen [Helm et al., 1999]. Durch den Einsatz von Enzymen für die Pseudouridinylierung aus verschiedenen Organismen (Hefe, Humane HeLa Zellen) sollte die Auswirkung der strukturellen Änderungen auf posttranskriptionelle Modifikation von tRNAs erforscht werden.

4 Ergebnisse

4.1 Posttranskriptionelle Modifikation von tRNA-Transkripten

Für die posttranskriptionelle Modifikation der tRNAs wurde mitochondrialer S-100 Extrakt aus HeLa Zellen gewonnen und chromatographisch aufgereinigt (2.16). Für die Trennung der Proteine wurde eine Größenausschlusschromatographie über eine HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 Säule durchgeführt (Abbildung 4.1). Fraktionen 2 und 3 enthalten m^1A -, m^1G -, m^2G -Methyltransferasen (TRM10 ~ 35 kDa, TRM1 ~ 42 kDa), und Pseudouridin-Synthase (Pus1 ~ 63 kDa; Pus4 ~ 45 kDa) Aktivitäten [Helm and Attardi, 2004]. Nach diesem Reinigungsschritt wurden beide Fraktionen in Amicon Ultra Centrifugal Filters (10 kDa Porengröße; Millipore) vereinigt, aufkonzentriert und einem Pufferaustausch gegen M8-Puffer unterzogen. Die Konzentration des finalen S-100 Extraktes betrug 4,3 mg/ml.

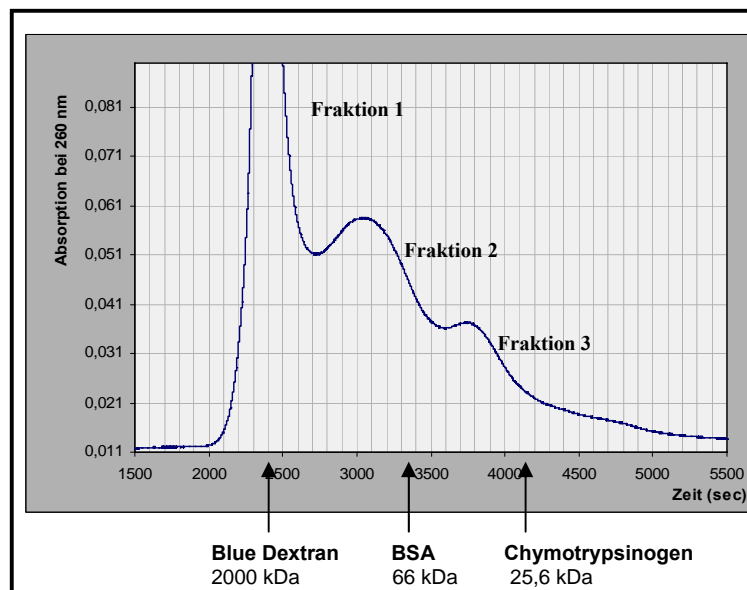


Abbildung 4.1: Chromatographische Auftrennung des mitochondrialen S-100 Extraktes. Die drei Pfeile unten zeigen die Positionen von Standardgrößen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Transkripte von verschiedenen humanen mitochondrialen tRNAs und ihnen abgeleiteten pathogenen Mutanten ($tRNA^{Lys}$ -WT, -A8344G, $tRNA^{Ser(UCN)}$ -WT, -G7497A, -T7512C, $tRNA^{Gln}$ -WT, -T4336C, $tRNA^{Leu(CUN)}$ -WT, -A12320G, -G12315A) sowie cytosolische $tRNA^{Phe}$ aus Hefe bezüglich posttranskriptioneller Modifikationen untersucht. Dafür

wurden die mit radioaktiven Nukleotiden transkribierten tRNAs (2.5.2.2) (Abbildung 4.2) mit mitochondrialem S-100 Extrakt aus HeLa Zellen modifiziert (2.13), reisoliert (2.6.2) und zu Mononukleotiden mit Hilfe von Nukleasen gespalten (2.11.2). Die Auftrennung der einzelnen Nukleotide erfolgte auf einer mit Cellulose beschichteten DC-Platte in zwei Dimensionen (2.11.2.1) (Abbildung 4.4). Identifikation der Positionen erfolgte nach Keith (Abbildung 4.3) [Keith, 1995].

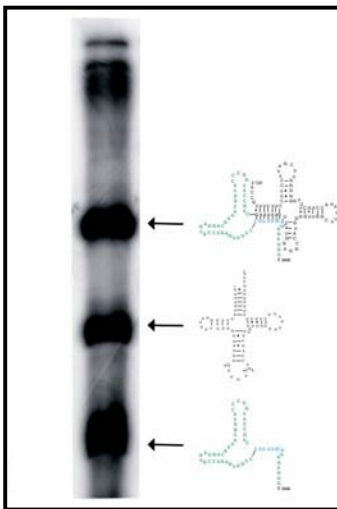


Abbildung 4.2: *In vitro* T7 Transkription. Die untere Bande repräsentiert das Ribozym, die mittlere Bande die tRNA und die obere Bande den tRNA-Hammerhead Ribozym Komplex. Organisation der Transkripte mit tRNA-Hammerhead Ribozym Komplex (2.5.2).

Die cytosolische **tRNA^{Phe}** aus Hefe in ihrer nativen Form enthält 20 % modifizierte Nukleotide und ihr Transkript diente im weiteren als optimale Referenz für Modifikationstests. Wie die Abbildung 4.4 A zeigt, sind mehrere Enzymaktivitäten (m^1A , m^2G , m^1G , Ψ) in dem HeLa S-100 Extrakt vorhanden.

Ebenso wurden humane mitochondriale **tRNA^{Lys}-WT** sowie ihre pathogene Mutante **A8344G**, die das MERRF-Syndrom verursacht, auf Modifikationseffizienz mit S-100 mitochondrialem Extrakt untersucht. Native tRNA^{Lys} ist in den Positionen 9, 10, 27/28 als m^1A , m^2G bzw. Ψ modifiziert und enthält zusätzlich modifizierte Nukleotide im Anticodon-Loop: t^6A37 und hypermodifizierte mcm^5s^2U34 . Die Methylierung des Adeninrestes in der Position 9 ist nur bei mitochondrialen tRNAs vorhanden, hingegen kommen die m^2G10 und $\Psi27/28$ Modifikationen in vielen klassischen tRNAs vor. Nach der Inkubation von tRNA^{Lys}-WT mit mitochondrialem Proteinextrakt wurden m^1A , m^2G und Ψ detektiert. Bei tRNA^{Lys}-A8344G konnte zwar Ψ nachgewiesen werden, jedoch im Vergleich zum WT zu einem deutlich geringeren Prozentsatz.

mitochondrialem Proteinextrakt wurden in der tRNA^{Leu(CUN)} sowohl beim WT als auch bei den Mutanten zu Ψ modifizierte Us in den Positionen 27/28 detektiert, allerdings in unterschiedlichen Verhältnis, was auf eine unterschiedliche Modifikationseffizienz schließen lässt (WT – 0,5 mol/mol tRNA, A12320G – 0,2 mol/mol tRNA und G12315A – 0,1 mol/mol tRNA) (Abbildung 4.4 D). Unterschiedlich waren auch die Modifikationseffizienzen an der m¹A Position (WT – 0,1 mol/mol tRNA, A12320G – 0,01 mol/mol tRNA und G12315A – keine).

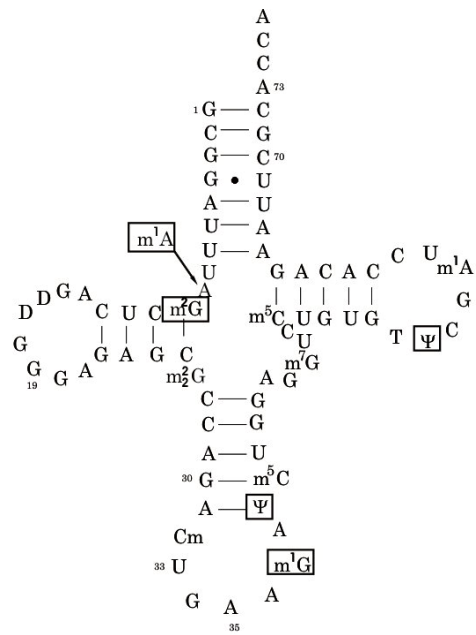
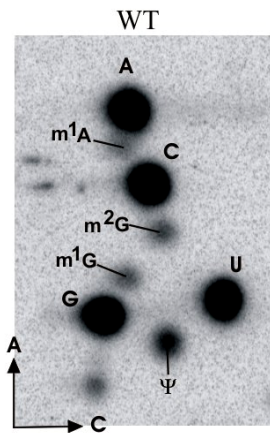
Eine schwere mitochondriale Myopathien wurden bei Patienten mit einer G7497A Mutation in der tRNA^{Ser(UCN)} beobachtet. Weitere Symptome sind Progressive Myoklonus-Epilepsie, Ataxia und Gehörlosigkeit [Jaksch et al., 1998]. Die Mutation T7512C ist mit nicht-syndromaler Schwerhörigkeit assoziiert [Hutchin et al., 2000]. Bei der nativen tRNA^{Ser(UCN)} sind 5 modifizierte Nukleotide bekannt, wovon drei in klassischen tRNAs vorkommen: Ψ55, T54 und m³C32. Die anderen zwei modifizierten Nukleotide befinden sich im Anticodon-Arm: Ψ28 und ms²i⁶A37. In der Abbildung 4.4 E ist die Modifikationsanalyse von tRNA^{Ser(UCN)}-WT und zwei Mutanten dargestellt. Es lassen sich deutliche Unterschiede des Modifikationsniveaus detektieren. Die beiden Mutanten der tRNA^{Ser(UCN)} wurden im Vergleich zum WT schlechter modifiziert, WT – 0,9 (±0,04) mol/mol tRNA, G7497A – 0,7 (±0,04) mol/mol tRNA und T7512C – 0,7 (±0,05) mol/mol tRNA. Mit Hilfe der „next-neighbor“ Analyse wurde die Position von modifiziertem Ψ bestimmt (Abbildung 4.5); es wurde als Ψ55 nachgewiesen.

=====

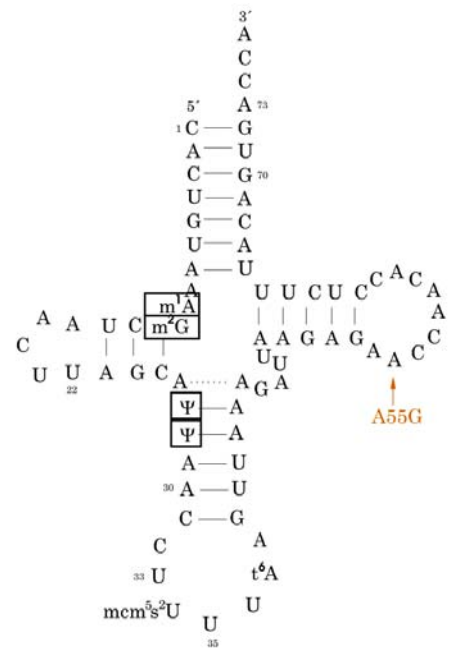
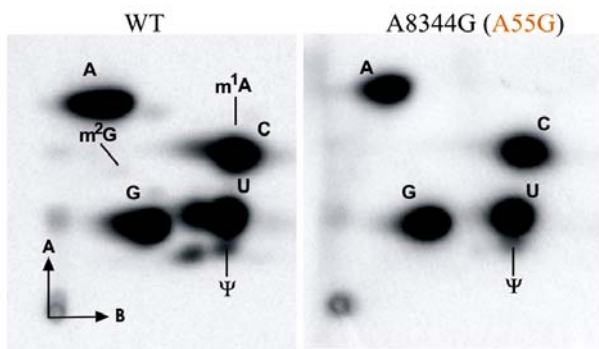
Abbildung 4.4: *In vitro* posttranskriptionelle Modifikation mit mitochondrialem S-100 Extrakt von (A) tRNA^{Phe}, (B) tRNA^{Lys}, (C) tRNA^{Gln}, (D) tRNA^{Leu(CUN)}, (E) tRNA^{Ser(UCN)} und deren Mutanten. (links) 2D-Dünnschichtchromatographie. A, Adenosinmonophosphat; C, Cytidinmonophosphat; U, Uridinmonophosphat; G, Guanodinmonophosphat; m¹A, 1-Methyladenosinmonophosphat; m¹G, 1-Methylguanodinmonophosphat; m²G, N²-Methylguanodinmonophosphat; Ψ, Pseudouridinmonophosphat; m¹Ψ, 1-methylpseudouridinphosphat. DC-Laufpuffer: A, Isobuttersäure / Ammoniak / H₂O (66/1/33; v/v/v); B, Phosphat-Puffer pH 6,8 (0,1 M) / Ammoniumsulfat / 1-Propanol (100/60/1,5; v/w/v); C, HCl reinst / Isopropanol / H₂O (15/70/15; v/v/v). (rechts) Schematische Darstellung der entsprechenden Transkripte mit Modifikationen. Die Mutationen sind orange angegeben. Die mit HeLa S-100 Extrakt modifizierten Nukleotide sind umrahmt.

=====

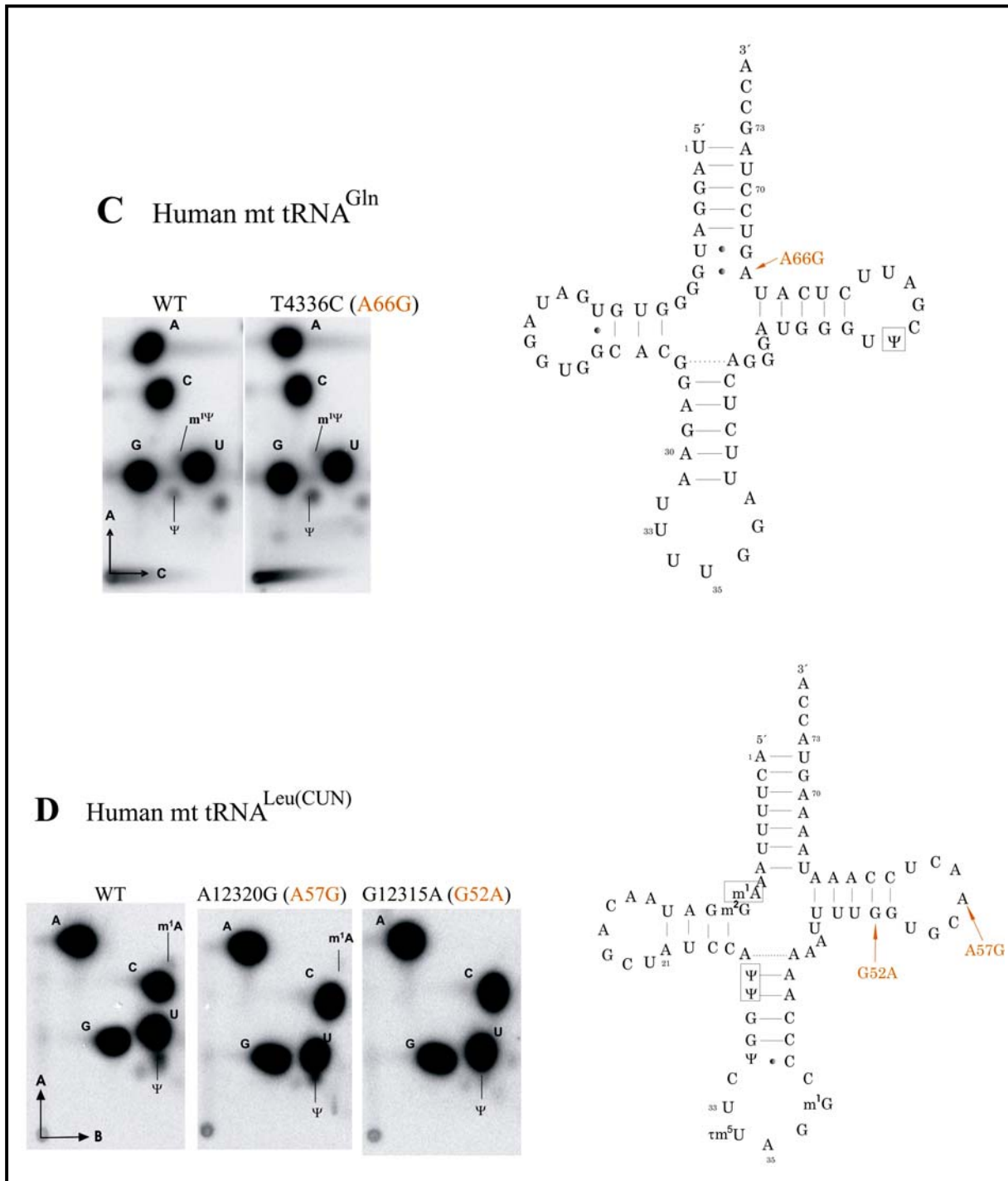
A Hefe cyt tRNA^{Phe}



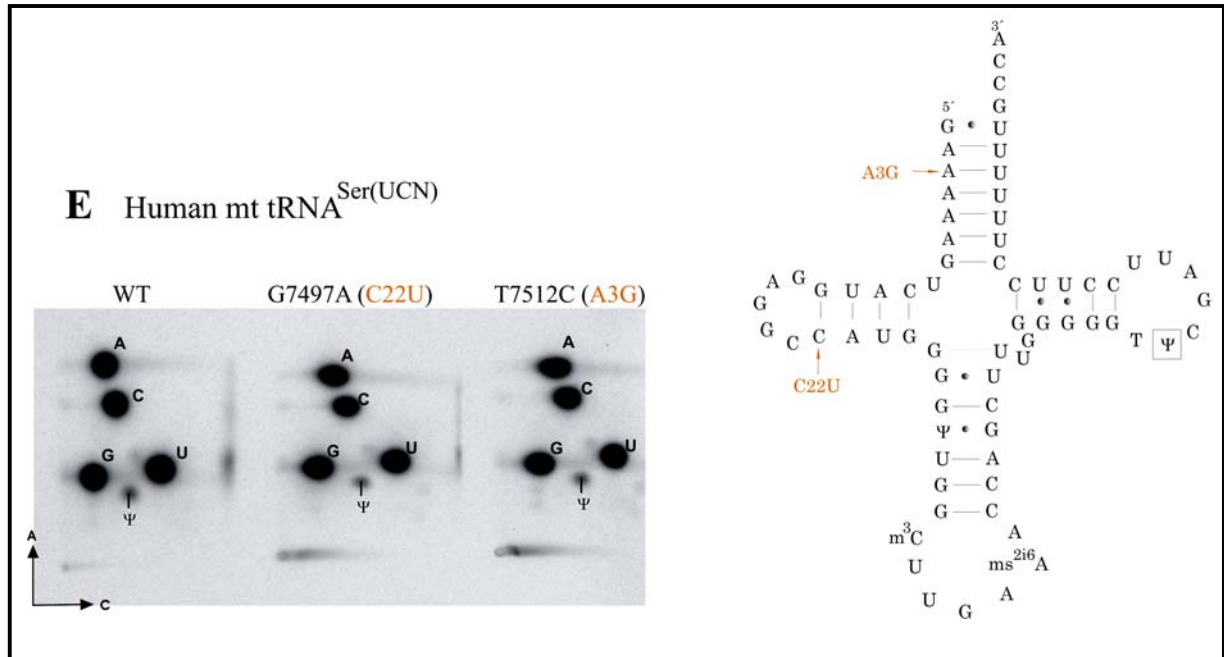
B Human mt tRNA^{Lys}



(Abbildung 4.4 fortgesetzt)



(Abbildung 4.4 fortgesetzt)



Modifikation	mol/mol tRNA			
	m ¹ A	m ² G	m ¹ G	Ψ
A. Hefe cyt tRNA ^{Phe}	0,8	0,8	0,8	1,9
B. Hum mt tRNA ^{Lys} -WT	+	+		+
Hum mt tRNA ^{Lys} - T8344C	-	-		+
	nicht quantifizierbar			
C. Hum mt tRNA ^{Gln} -WT				0,5(±0,05)
Hum mt tRNA ^{Gln} - T4336C				0,7(±0,08)
D. Hum mt tRNA ^{Leu(CUN)} -WT	0,1	-	-	0,5
Hum mt tRNA ^{Leu(CUN)} -A12320G	0,01	-	-	0,2
Hum mt tRNA ^{Leu(CUN)} -GC12315A	-	-	-	0,1
E. Hum mt tRNA ^{Ser(UCN)} -WT				0,9(±0,04)
Hum mt tRNA ^{Ser(UCN)} -G7497A				0,7(±0,04)
Hum mt tRNA ^{Ser(UCN)} -T7512C				0,7(±0,05)

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der Modifikationen mit mitochondrialem S-100 Extrakt. +, modifiziert; -, nicht modifiziert. Die Größe der „+“ Zeichen entspricht den Modifikationseffizienzen.

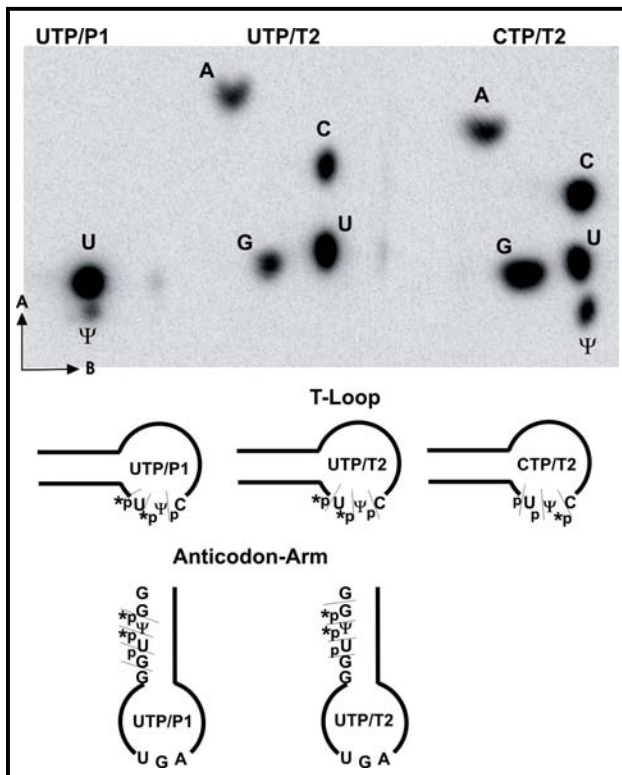


Abbildung 4.5: Die „next neighbor“ Analyse von tRNA^{Ser(UCN)}-Transkript. **Oben**, die 2D-Dünnschichtchromatographie von modifiziertem Transkript. A, Adenosinmonophosphat; C, Cytidinmonophosphat; U, Uridinmonophosphat; G, Guanysinmonophosphat; Ψ, Pseudouridinmonophosphat; DC-Laufpuffer: A, Isobuttersäure / Ammoniak / H₂O (66/1/33; v/v/v); B, Phosphat-Puffer pH 6,8 (0,1 M) / Ammoniumsulfat / 1-Propanol (100/60/1,5; v/w/v); **Unten**, die Spaltungsstellen der Nucleasen. UTP und CTP entsprechen den mit [α-³²P]-UTP bzw. [α-³²P]-CTP transkribierten tRNA. P1, Nuclease P1. Nach der Spaltung entstehen 5'-Phosphat-Nucleoside. T2, RNase T2. Nach der Spaltung entstehen 3'-Phosphat-Nucleoside. Die radioaktiven Phosphate sind mit Stern (*) gekennzeichnet.

Wie die Ergebnisse der posttranskriptionellen Modifikation zeigen, können die Mutationen im Kernbereich der tRNA die Aktivität der Modifikationsenzyme entscheidend verringern. Für eine optimale Funktion der Enzyme sind bestimmte Strukturen in der tRNA notwendig. Die Mutationen können zu unerwünschten Veränderungen der Struktureigenschaften führen, die ihrerseits die Modifikationseffizienz beeinflussen. Um genaue strukturelle Abweichungen feststellen zu können, wurden die Strukturen der tRNAs mit Hilfe der enzymatischen und chemischen Kartierung untersucht.

4.2 Chemische und enzymatische Kartierung der tRNAs

Die dreidimensionalen Strukturen des tRNA-Moleküls werden von verschiedenen biologischen Eigenschaften bestimmt, was man sich für Strukturuntersuchungen zu Nutze machen kann. Bei der Strukturanalyse von tRNA-Transkripten ermöglichen sowohl nukleotidspezifisch schneidende Nucleasen, als auch spezifisch modifizierende Chemikalien die einzelsträngigen bzw. doppelsträngigen RNA-Bereiche zu identifizieren.

Für die *in vitro* Strukturanalysen wurden 5'- (2.5.3) und 3'- (2.5.5) markierten T7-Transkripte eingesetzt, die zuvor über ein denaturierendes Polyacrylamidgel (2.6.2) aufgereinigt wurden. Diese Experimente wurden bei physiologischen 37 °C durchgeführt.

Die Struktur des humanen mt tRNA^{Lys}-WT und der -A8344G Mutante wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass unmodifizierte *in vitro*-Transkripte keine Kleeblattstruktur, sondern eine haarnadelähnliche Struktur aufweisen [Helm et al., 1998]. Demzufolge wurden keine weitere Strukturanalysen durchgeführt.

4.2.1 Strukturanalyse der humanen mitochondrialen tRNA^{Gln}

Die Strukturanalysen der humanen mt tRNA^{Gln} wurden sowohl mit dem WT als auch einer Mutante mit der pathogenen Punktmutation T4336C durchgeführt (Abbildung 4.6).

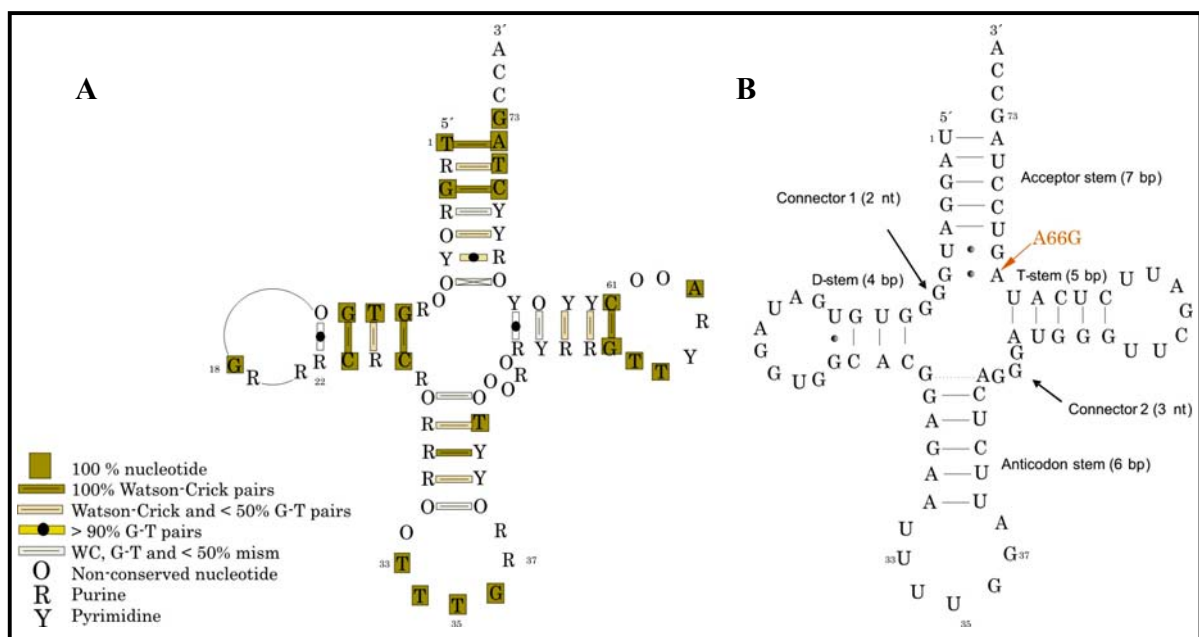


Abbildung 4.6: Struktur von der hum mt tRNA^{Gln}. (A) Konsensus Sequenz nach [Helm et al., 2000]. (B) Sekundärstruktur von hum mt tRNA^{Gln}. Die Mutation ist in orange angegeben (die Modifikationen sind nicht publiziert).

In Abbildung 4.7 ist das Ergebnis der gelelektrophoretischen Trennung der Spaltungsfragmente für tRNA^{Gln}-WT und -T4336C Mutanten zu sehen. Die Guanosinleiter der tRNA aus einem

Verdau mit RNase T1 bzw. eine durch alkalische Hydrolyse gewonnene Nukleotidleiter wurden in den Spuren G und L aufgetragen. Anhand der beiden Leitern können die RNase-Spaltungsprodukte den entsprechenden Positionen in der Sekundärstruktur der tRNA zugeordnet werden. Die Positionen G14, G18 und G19 in dem D-Loop und G36 und G37 in dem Anticodon-Loop sind sowohl beim WT als auch bei der Mutante zugänglich für RNase T1, was auf ungepaarte Regionen hindeutet. In dem Bereich des variablen Loops sind in der Mutante die Zugänglichkeiten für RNase T1 erhöht.

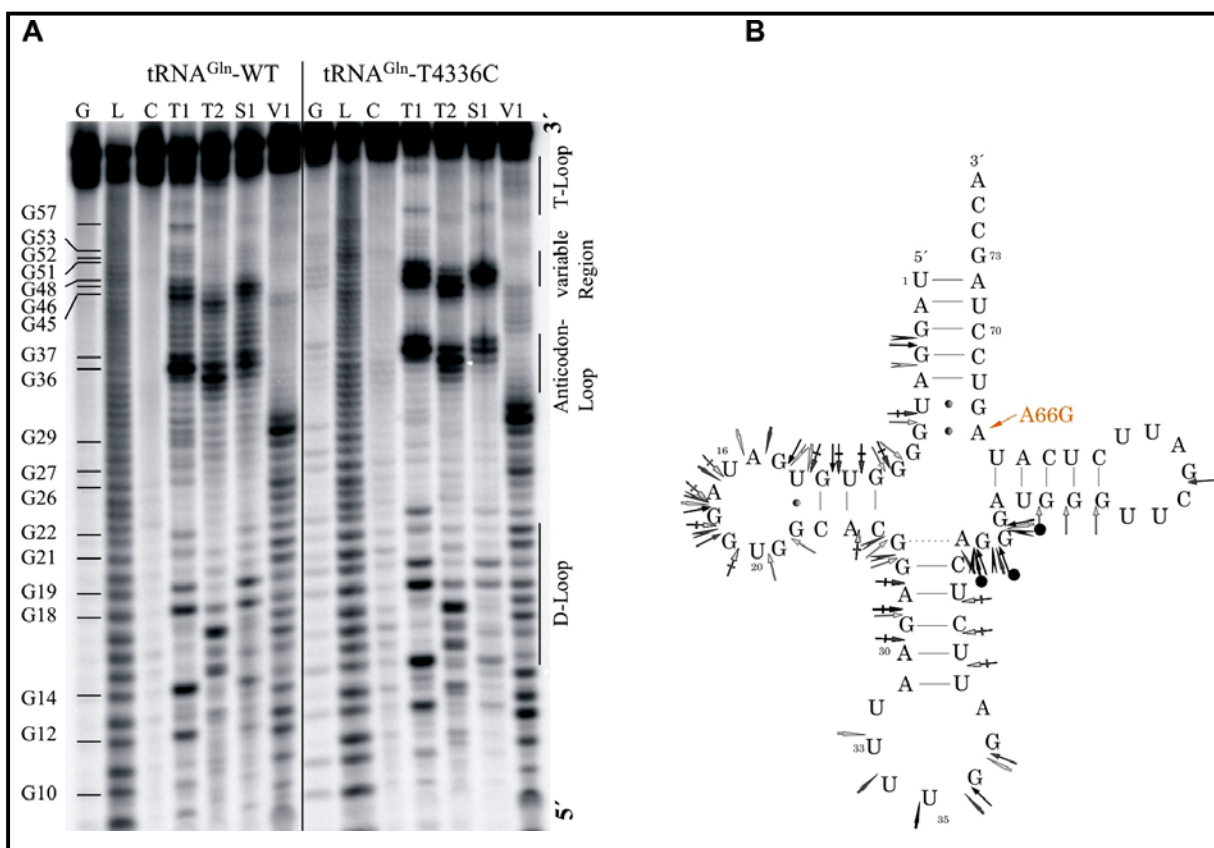


Abbildung 4.7: Strukturanalyse von der tRNA^{Gln}-WT und -T4336C Mutante durch Nukleaseverdau. **(A)** Gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente. Die tRNAs wurden mit ³²P an dem 5'-Ende radioaktiv markiert. G, Spaltung mit RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen; L, alkalische Hydrolyseleiter; C, Kontrolle (Inkubation ohne Nukleasen); T1, RNase T1-Verdau in Anwesenheit von 0,3 U/μl; T2, RNase T2-Verdau in Anwesenheit von 0,0125 U/μl; S1, Nuklease S1-Verdau in Anwesenheit von 4 U/μl; V1, RNase V1-Verdau in Anwesenheit von 9 U/ml. **(B)** Schematische Darstellung der RNase Kartierung. Die Farbintensität der Pfeile entspricht Spaltungsintensitäten. Die Kreise kennzeichnen die Positionen der unterschiedlichen Spaltungsmuster.

Ein weiterer Unterschied in dem variablen Loop Bereich ist auch bei T2 und S1 Nukleaseverdau zu sehen. Hier sind die Positionen A44, G45 bis G48 im WT weniger zugänglich als in der Mutante. Bei dem doppelstrangspezifischen Nuklease V1 Verdau wurden keine Unterschiede in der Signalstärke der Banden detektiert.

Weitere Analysen wurden mit Hilfe von chemischen Modifikationen durchgeführt. Viele zweiwertige Metallionen, darunter auch Bleiionen, sind in der Lage die RNA zu hydrolysieren. [Giege et al. 1999]. Bleiionen hydrolysieren RNAs in einzelsträngigen und flexiblen Bereichen, während helikale Regionen nicht gespalten werden. Das entsprechende Bleispaltungsmuster ist in den Spuren 1 bis 9 in Abbildung 4.8 dargestellt.

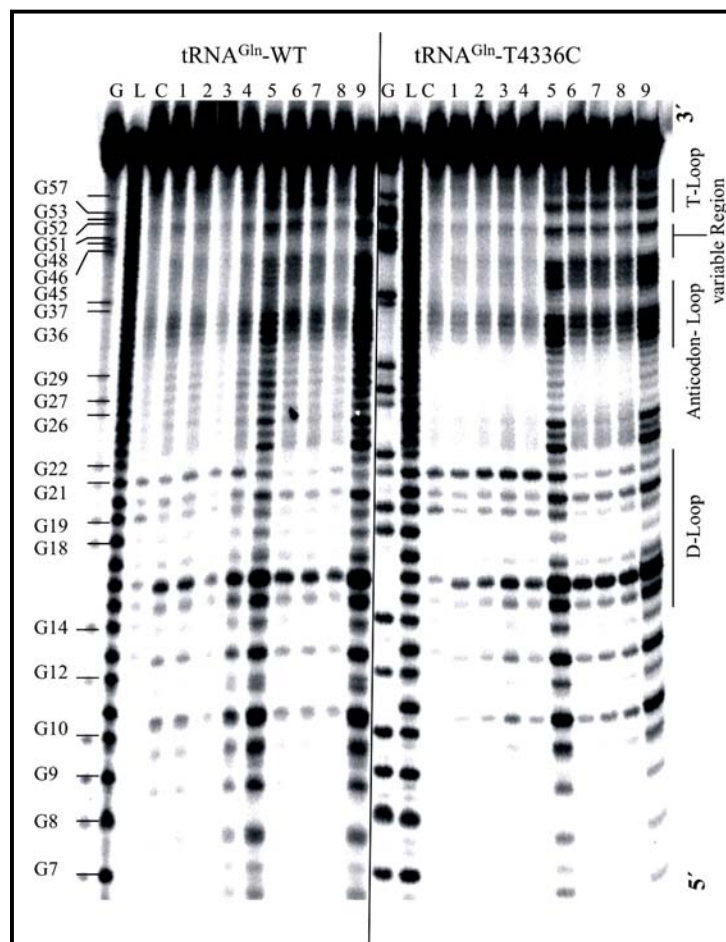


Abbildung 4.8: Strukturanalyse der tRNA^{Gln}-WT und -T4336C Mutante durch Bleispaltung und gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente. Die tRNAs wurden mit ³²P radioaktiv markiert. G: Spaltung mit RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen; L: alkalische Hydrolyseleiter; C: Kontrolle (Inkubation ohne Pb(OAc)₂). Spuren 1 bis 5: Blei-Spaltung während 2, 3, 3.5, 4, 4.5 h in Anwesenheit von 1,2 mM Pb(OAc)₂ Lösung und 6 bis 9: Blei-Spaltung während 0.4, 0.2, 1, 2 h in Anwesenheit von 2,4 mM Pb(OAc)₂.

Die Experimente wurden unter nativen Bedingungen in Gegenwart von 10 mM MgCl₂ und zwei verschiedenen Konzentrationen von Bleiionen (0,6 und 1,2 mM Pb(OAc)₂) durchgeführt. Bei niedrigen Konzentrationen von Bleiionen wurden die Spaltstellen erst nach 4,5 h sichtbar. Bei höherer Konzentration schneidet Blei schon nach 15 Minuten. Die X-ray kristallographischen Analysen der tRNA^{Phe} aus Hefe zeigten, dass die Bleiionen-Spaltungstellen häufig mit Magnesiumionen-Bindungsstellen übereinstimmen [Brown et al., 1985]. Für tRNA^{Phe} wurden 4 Bindungsstellen für Magnesiumionen gefunden; die erste befindet sich zwischen den Nukleotiden 20 und 21, die zweite zwischen D-Loop (Positionen 19/20) und T-Loop (Positionen 59/60), die dritte im variablen Loop und die vierte im Anticodon-Loop. Abbildung 4.8 zeigt sowohl Spaltungen im Connector 1 und in den D- und T-Loops, als auch eine besonders starke Spaltung in der Anticodon-Region, was mit der Koordination von Magnesiumionen übereinstimmt. Überraschenderweise treten auch Spaltungen in den Positionen 40 bis 45 auf. Bemerkenswert ist, dass die Spaltung in diesen Positionen bedeutend stärker ausfällt, als auf der gegenüberliegenden Seite des Stems. Die drei Nukleotide in dem variablen Loop sind vor der Spaltung mit Bleiionen voll geschützt sowohl beim WT als auch bei der Mutante.

Die vorgestellten Kartierungsdaten dokumentieren, dass sich die Transkripte von tRNA^{Gln}-WT und -T4336C Mutante in der Struktur nur mäßig unterscheiden und in einer klassischen L-Struktur gefaltet sind.

Spaltungsfragmente von Position A18 für die Nuklease S1 sind bei der Mutante A12320G und WT stärker ausgeprägt als bei der G12315A Mutante (Abbildung 4.10 A). Das V1 Verdaumuster zeigt keinen eindeutigen Unterschied zwischen allen Transkripten (Abbildung 4.10 A, Spuren 4-6).

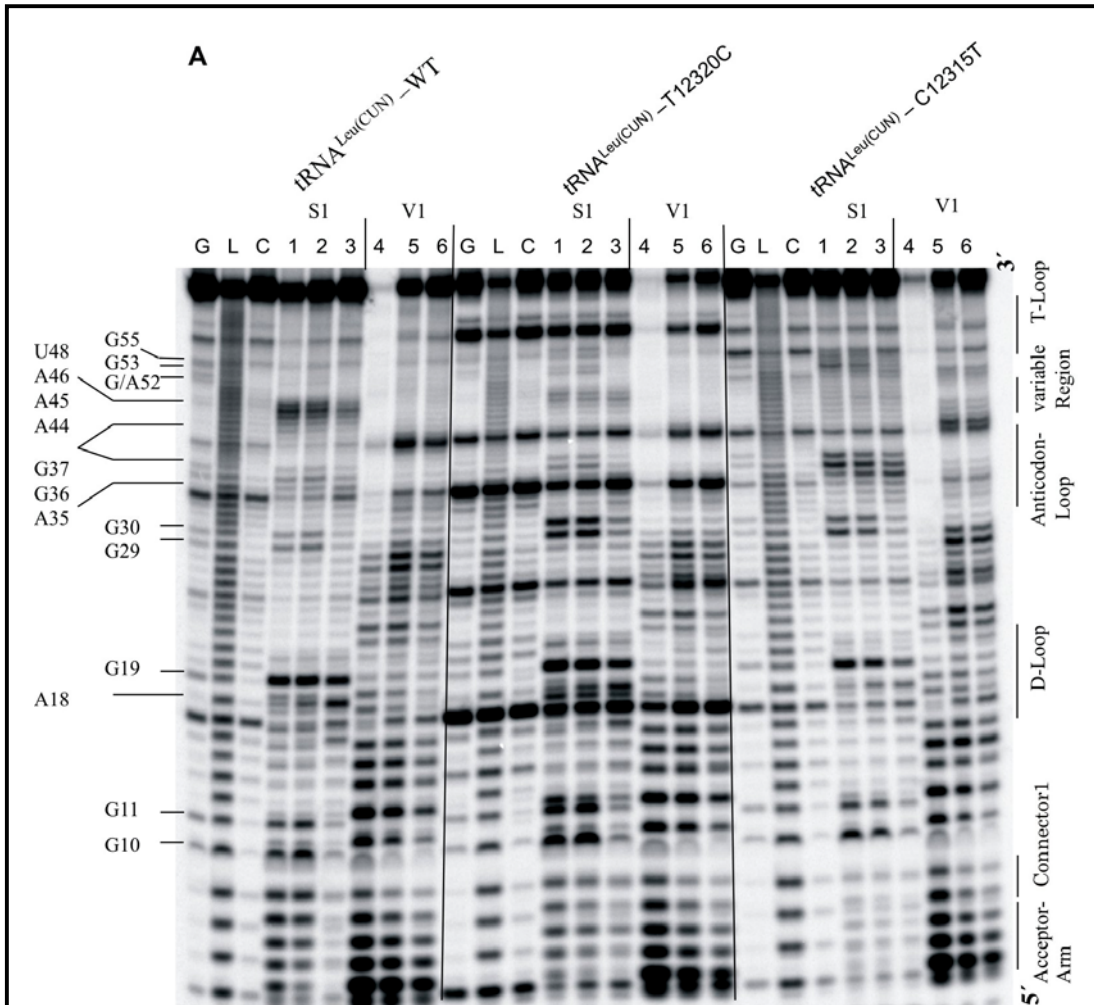
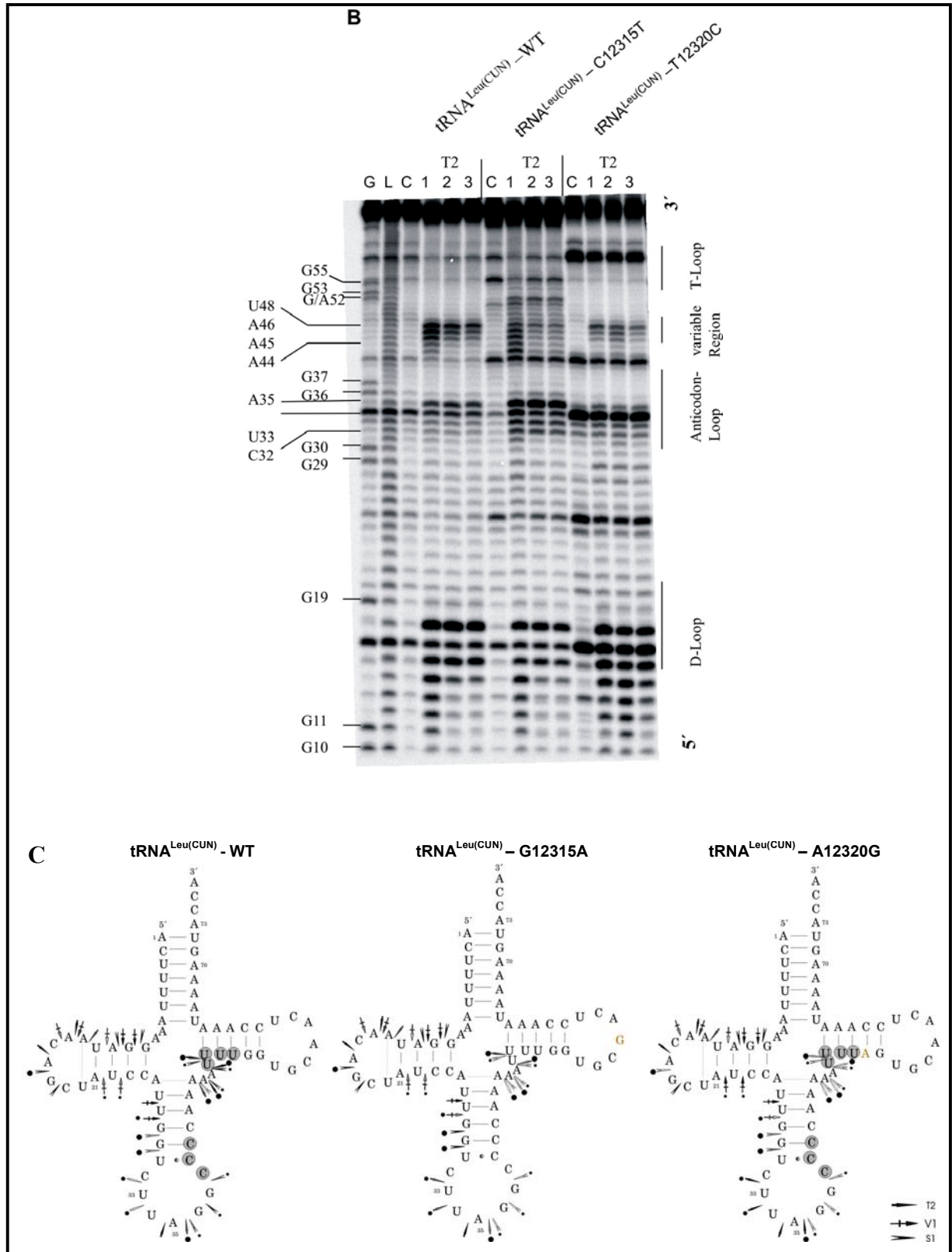


Abbildung 4.10: : Strukturanalyse von tRNA^{Leu(CUN)}-WT, -A12320G und -G12315A Mutanten durch Nukleaseverdau. **(A)** Gelelektrophoretische Auftrennung der mit RNase V1 und Nuklease S1 gespaltenen Fragmente. S1, Nuklease S1-Verdau in Anwesenheit von Spur 1: 10×10^{-3} U/ μl ; Spur 2: 7×10^{-3} U/ μl ; Spur 3: 5×10^{-3} U/ μl . V1, RNase V1-Verdau in Anwesenheit von Spur 4: $2,5 \times 10^{-3}$ U/ μl ; Spur 5: $1,25 \times 10^{-3}$ U/ μl ; Spur 6: $6,25 \times 10^{-4}$ U/ μl . **(B)** Gelelektrophoretische Auftrennung der mit RNase T2 gespaltenen Fragmente. Die tRNAs wurden mit ^{32}P an dem 5'-Ende radioaktiv markiert. G, Spaltung mit RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen; L, alkalische Hydrolyseleiter; C, Kontrolle (Inkubation ohne Nukleasen); T2, RNase T2-Verdau in Anwesenheit von Spur 1: 0,01 U/ μl ; Spur 2: 0,007 U/ μl ; Spur 3: 0,005 U/ μl . **(C)** Schematische Darstellung der RNase Kartierung. Die Farbintensität der Pfeile entspricht den Spaltungsintensitäten. Die schwarzen Punkte zeigen die Unterschiede zwischen Nuklease-Spaltungsfragmenten und die Größe der Kreise entspricht Unterschiedsintensitäten. Die Kreise kennzeichnen die Bleispaltungsstellen.

(Abbildung 4.10 fortgesetzt)



Zusätzlich wurden Bleispaltungsexperimente durchgeführt (Abbildung 4.11). Das Ergebnis zeigt, dass drei Nukleotide im T-Stem, drei im Anticodon-Arm und U48 im variablen Loop bei dem WT und bei der G12315A Mutante durch Bleiionen erkannt und geschnitten werden. Die drei Reste im T-Stem und zwei Reste im Anticodon-Stem liegen in der Kleeblatt-Struktur gepaart vor und hätten theoretisch nicht durch die Blei-Ionen modifiziert werden dürfen. An diesen Positionen wurde jedoch keine Spaltung bei der A12320G Mutante detektiert.

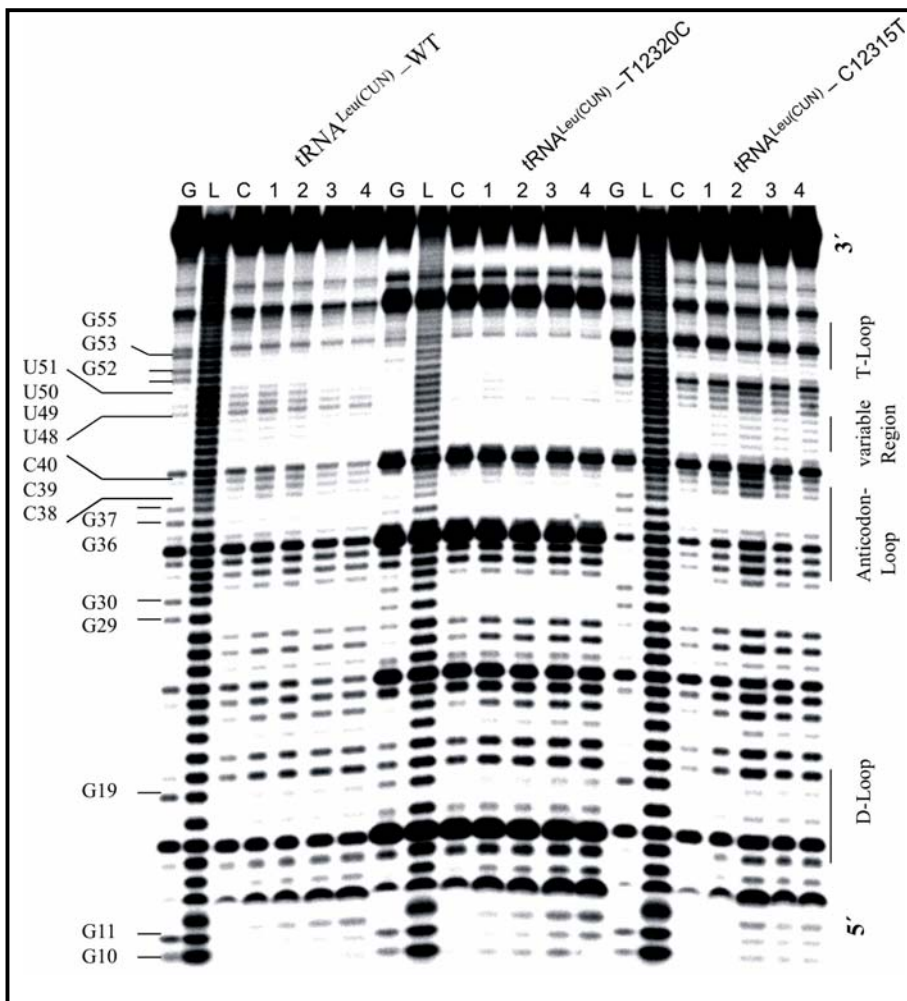


Abbildung 4.11: Strukturanalyse von der tRNA^{Leu(CUN)}-WT, -A12320G und -G12315A Mutanten durch Blei(II)-induzierter Spaltung. **(A)** Gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente. Die tRNAs wurden mit ³²P radioaktiv markiert. G: Spaltung mit RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen; L: alkalische Hydrolyseleiter; C: Kontrolle (Inkubation ohne Pb(OAc)₂). Spuren 1 bis 4: Blei-Spaltung während 15, 30, 60 und 90 Minuten in Anwesenheit von 1,2 mM Pb(OAc)₂ Lösung. **(B)** Schematische Darstellung der Pb(II)-induzierten Spaltstellen. Die Farbintensität der Pfeile entspricht den verschiedenen Spaltungsintensitäten.

Mit Hilfe der chemischen und enzymatischen Kartierung konnte gezeigt werden, dass durch beide Mutationen eine Strukturänderung bewirkt wird. Durch die G52A Transition im T-Stem wird die Tertiärstruktur instabiler, wo hingegen die Transition A57G die tertiäre Interaktionen zwischen T- und D-Loop stabilisiert. Diese Aussage wurde durch Untersuchung des Schmelzverhaltens der tRNA-Transkripte unterstützt.

Das Schmelzverhalten der drei tRNAs wurde mittels UV-Spektroskopie (2.14) untersucht. Bei den UV-spektroskopischen Untersuchungen macht man es sich zunutze, dass die Absorption beim Übergang von gefalteter zur ungefalteter Struktur bei Nukleinsäuren zunimmt. Abbildung 4.12 und Anhang 2 zeigen die erste Ableitung der Schmelzkurven von unmodifizierten tRNA-Transkripten. Die Schmelzkurven von allen drei tRNA-Transkripten wurden in einem 50 mM Phosphatpuffer bei pH 7,0 in Anwesenheit von 0,5, 1, 2 mM $MgCl_2$ und ohne $MgCl_2$ vermessen. Die Schmelzpunkte, welche durch das Ablesen des Maximums der 1. Ableitung erhalten wurden, sind in der Tabelle 4.2 zusammengefasst.

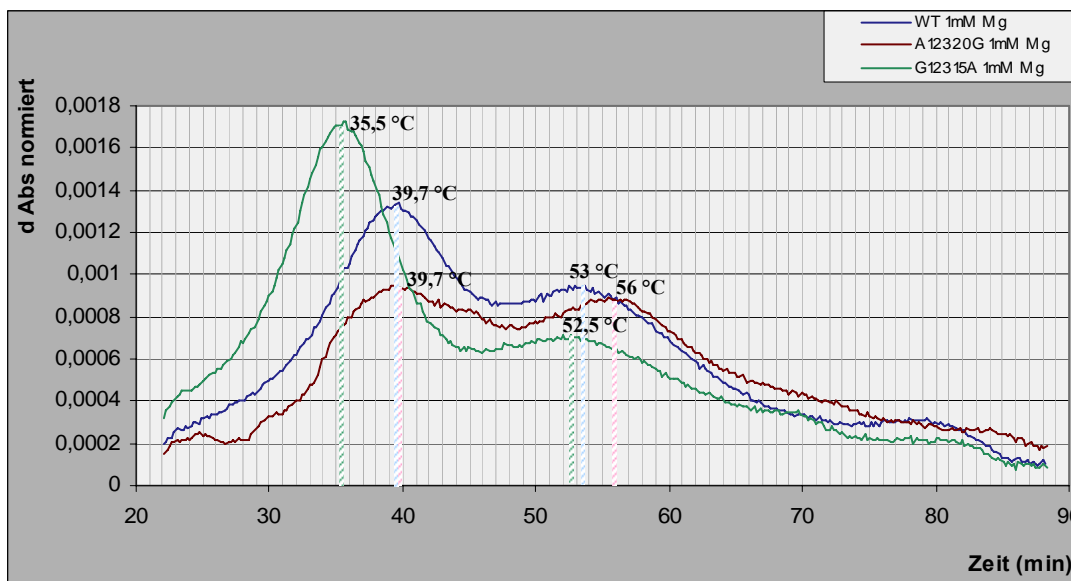


Abbildung 4.12: Normalisierte erste Ableitungen der tRNA^{Leu(CUN)}-WT (blau), und ihrer Mutanten A12320G (rot) und G12315A (grün) in Anwesenheit von 1 mM $MgCl_2$. Die Zahlen entsprechen den Schmelzpunkten.

Der Vergleich der Kurven zeigt einen deutlichen Unterschied in der tRNA-Struktur zwischen dem WT und den beiden Mutanten. Sowohl der erste als auch der zweite Übergang liegen bei der G12315A Mutante bei niedrigeren Temperaturen ($T_m = 35,5 \pm 0,5$ °C, $52,5 \pm 0,5$ °C) als bei dem WT ($T_m = 39,7 \pm 0,5$ °C, $53,0 \pm 0,5$ °C) bzw. der A12320G Mutante ($T_m = 39,7 \pm 0,5$ °C, $56 \pm$

0,5 °C). Der zweite Übergang in der Schmelzkurve der A12320G Mutante fällt wesentlich steiler aus als bei dem WT und der G12315A Mutante, wo hingegen der erste Übergang wesentlich flacher ist als bei dem WT und der G12315A Mutante.

Die Schmelzpunktniedrigung der G12315A Mutante und auch der steile Anstieg des ersten Überganges sind mit schwach ausgebildeten sekundären bzw. tertiären Strukturen, verursacht durch die G52A Transition, zu begründen. Bei der A12320G Mutante entfalten sich die tertiären Bindungen langsamer und dadurch verschiebt sich der T_m -Wert des zweiten Übergangs, an dem die Sekundärstrukturen schmelzen, um 3 °C. Dieser Befund lässt vermuten, dass die tRNA-Struktur von der A12320G Mutante durch die A57G Transition kompakter wird als bei dem WT und die tRNA-Struktur von der G12315A Mutante durch die G52A Transition instabiler als bei dem WT wird. Die Schmelzkurven-Daten stimmen mit den Kartierungsergebnissen überein, die bereits auf eine veränderte tRNA-Struktur hinwiesen.

Die Auswirkung von Magnesiumionen auf das Schmelzverhalten wurde überprüft. Wie im Anhang 2 und in der Tabelle 4.2 zu erkennen ist, liegen die Schmelzpunkte der Transkripte in 0,5 mM $MgCl_2$ (grüne Kurve) und in 1mM $MgCl_2$ (hellblaue Kurve) dicht zusammen und wurden um ~ 2 °C (gegenüber der Schmelzpunkte ohne $MgCl_2$) erhöht. Eine weitere Erhöhung der Mg^{2+} Ionen-Konzentration ergab eine Verschiebung um weitere 5 °C, was auf die Stabilisierung der tRNA-Struktur durch Mg^{2+} Ionen zurückzuführen ist.

A tRNA^{Leu(CUN)}-WT

MgCl ₂ (mM)	0	0,5	1	2
T_m ($\pm 0,5$ °C)	37	39,3	39,7	44,3
	52,5	54,4	53	58,3

B tRNA^{Leu(CUN)}-A12320G

MgCl ₂ (mM)	0	0,5	1	2
T_m ($\pm 0,5$ °C)	37	39,3	39,7	44,4
	52	55,8	56	58,5

C tRNA^{Leu(CUN)}-G12315A

MgCl ₂ (mM)	0	0,5	1	2
T_m ($\pm 0,5$ °C)	34,2	35	35,5	40,4
	52,8	53	52,5	56

Tabelle 4.2: Vergleich der Schmelztemperaturen von (A) tRNA^{Leu(CUN)}-WT, (B) tRNA^{Leu(CUN)}-A12320G und (C) tRNA^{Leu(CUN)}-G12315A ermittelt durch UV-Spektroskopie.

4.2.3 Strukturanalyse der humanen mitochondrialen tRNA^{Ser(UCN)}

Die Strukturanalyse der humanen mt tRNA^{Ser(UCN)} wurde mit drei unterschiedlichen Transkripten durchgeführt, dem WT und zwei Mutanten mit den pathogenen Punktmutationen G7497A bzw. T7512C. Humane mt tRNA^{Ser(UCN)} ist ein Beispiel für eine tRNA mit nicht klassischer Kleeblatt-Struktur (Abbildung 4.13), die nur 1 Nukleotid in Connector 1 enthält und einen verlängerten Anticodon-Stem besitzt.

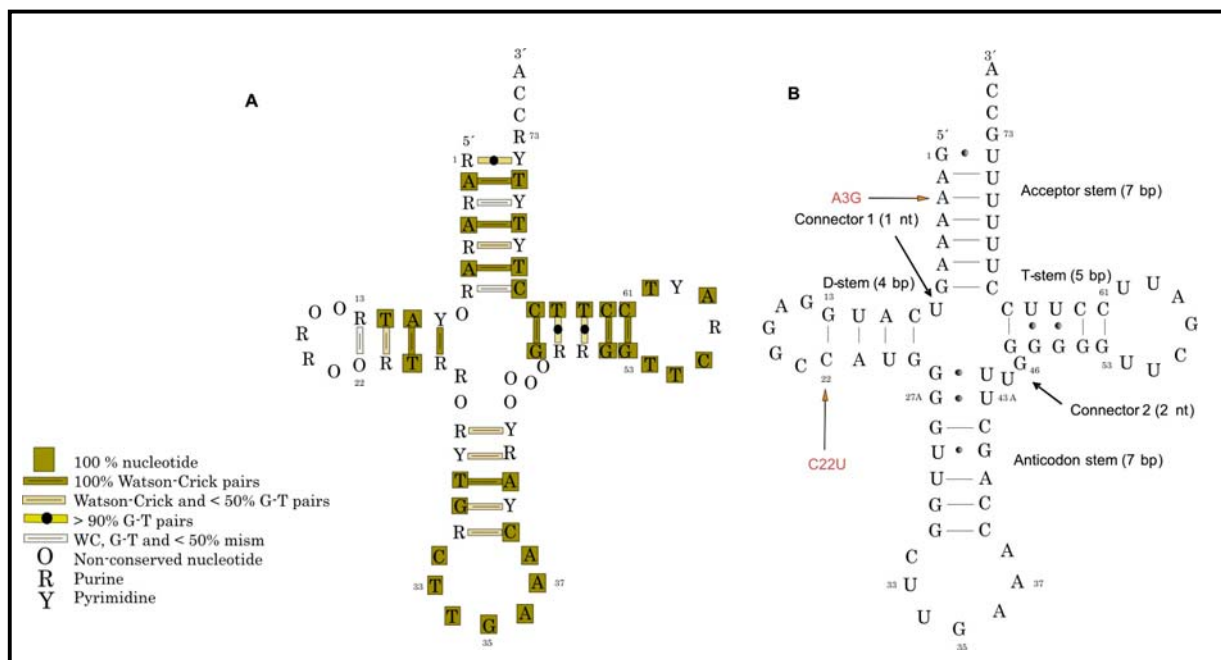


Abbildung 4.13: Die Kleeblatt Struktur der hum mt tRNA^{Ser(UCN)}. (A) Konsensus Sequenz nach [Helm et al., 2000]. (B) Sekundärstruktur von tRNA^{Ser(UCN)}-WT Transkript [Watanabe et al., 1994]. Die Mutationen sind orange angezeigt.

Die Strukturanalyse erfolgte mit 5'-markierten (2.5.3) tRNAs. Die Spaltungsmuster von allen drei tRNAs nach T2-, S1- und V1-Kartierung zeigten keine eindeutigen Unterschiede, im Gegensatz zu dem T1-Verdau (Abbildung 4.14 A). Die Auswertung der Zugänglichkeit für die Nukleasen erfolgte über Intensitätsvergleich der Abbruchbanden und ist in der Abbildung 4.14 B zusammengefasst.

=====

Abbildung 4.14: Strukturanalyse von tRNA^{Ser(UCN)}-WT, sowie ihrer G7497A und T7512C Mutanten durch Nukleaseverdau. **(A)** Gelelektrophoretische Auftrennung der mit Nukleasen gespaltenen Fragmente. Die tRNAs wurden mit ³²P an dem 5'-Ende radioaktiv markiert. G, Spaltung mit RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen; L, alkalische Hydrolyseleiter; C, Kontrolle (Inkubation ohne Nukleasen); Spur T1, RNase T1-Verdau in Anwesenheit von 1 U/μl; Spur T2, RNase T2-Verdau in Anwesenheit von 0,025 U/μl; Spur V1, RNase V1-Verdau in Anwesenheit von 18 U/μl; Spur S1, Nuklease S1-Verdau in Anwesenheit von 80 U/μl. **(B)** Schematische Darstellung der RNase Kartierung. Die Farbintensität der Pfeile entspricht den Spaltungsintensitäten. Die schwarzen Kreise zeigen die Unterschiede zwischen Nuklease-Spaltungsfragmenten; die Größe der Kreise entspricht Intensitätsunterschieden.

=====

Um zusätzlich experimentelle Daten bezüglich der tRNA-Struktur zu erhalten, wurde eine Blei(II)-induzierte Spaltung von *in vitro* Transkripten durchgeführt. Das Verdauemuster ist in Abbildung 4.15 angezeigt. Flexible Einzelstrang-RNA-Bereiche sind anfällig für eine Blei(II)-induzierte Spaltung. Außerdem haben die Bleiionen eine hohe Affinität für die spezifischen Magnesium-Bindungsstellen. Die Signale im WT und in den Mutanten sind zum größten Teil der identisch.

Die drei Fragmente, die die Spaltung zwischen C32, U33 und U34 Nukleotide im Anticodon-Loop beinhalten, zeigen unterschiedliche Auftrennungsmuster bei der G7497 Mutante und dem WT bzw. bei der T7512C Mutante. Sie werden bei der G7497A Mutante in ihrer gelelektrophoretischen Mobilität verlangsamt. Ebenfalls findet man für D- und T-Loop und die variable Region Bereiche, die durch Bleiionen erkannt und spezifisch gespalten werden. Die Auswertung der Zugänglichkeit für die Bleiionen erfolgte über Intensitätsvergleich der Abbruchbanden und ist in der Abbildung 4.15 B zusammengefasst.

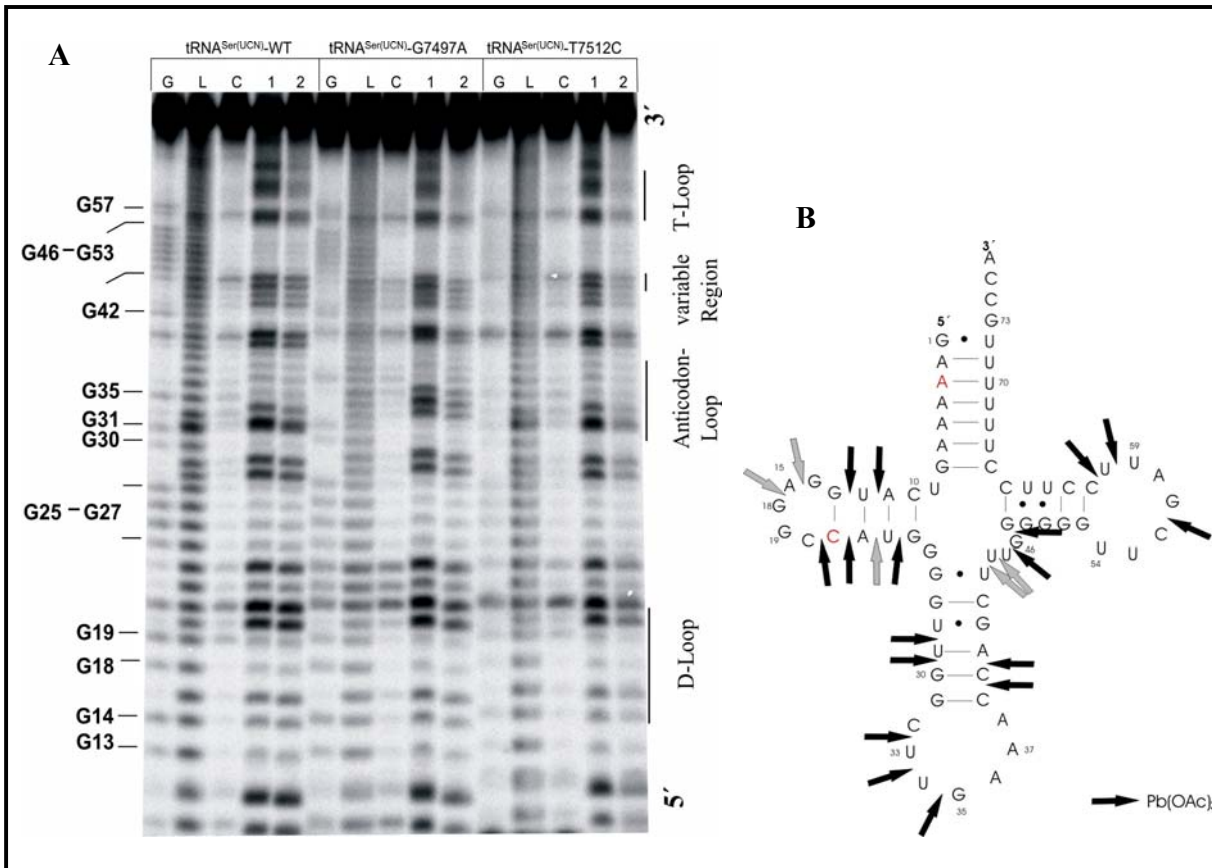


Abbildung 4.15: Strukturanalyse von tRNA^{Ser(UCN)}-WT, -G7497A und -T7512C Mutanten durch Blei(II)-induzierte Spaltung. (A) Gelelektrophoretische Auftrennung der Fragmente. Die tRNAs wurden mit ³²P radioaktiv markiert. G: Spaltung mit RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen; L: alkalische Hydrolyseleiter; C: Kontrolle (Inkubation ohne Pb(OAc)₂). Spuren 1, 2: Blei-Spaltung während 30 bzw. 120 Minuten in Anwesenheit von 0,6 mM Pb(OAc)₂ Lösung. (B) Schematische Darstellung der Pb(II)-induzierten Spaltstellen. Die Pfeile zeigen die Spaltstellen und die Farbintensität der Pfeile entspricht verschiedenen Spaltungsintensitäten. Die Positionen der Mutationen sind rot angezeigt.

Die genauere Analyse der T1-Kartierung erfolgte mit 5'- (2.5.3) und 3'- markierten (2.5.5) tRNAs. Bei dem RNase T1 Verdau (Abbildung 4.16) lassen sich innerhalb des T-Stems sowohl in den beiden Mutanten als auch bei dem WT keine Zugänglichkeiten für T1 an den Positionen G50 bis G53 und G30/G31 detektieren. Gleich stark zugänglich sind die Positionen G57, G35 und G18. Man findet für die Mutante G7497A wenige Zugänglichkeiten an G19, G25 bis G27 im Gegensatz zu dem WT und der T7512C Mutante, die ziemlich ähnliche Zugänglichkeiten zeigen. Position G35 im Anticodon-Loop ist für alle tRNA-Varianten gleich gut zugänglich.

Ein weiterer Unterschied zwischen den Zugänglichkeiten in der Mutante G7497A und dem WT ist sowohl in der variablen Region als auch an dem D-Loop zu sehen. Hier sind die Positionen G7, G13/G14 und G46/G48 in der G7497A Mutante für T1 besser zugänglich als im WT und in der T7512C Mutante. Diese Bereiche sind im Sekundärstrukturmodell der tRNA^{Ser(UCN)} ungepaart, wobei eine tertiäre Strukturausbildung zwischen T- und D-Loops bzw. zwischen variabler Region bzw. D-Loop möglich ist.

4.3 Temperaturabhängige T1-RNase Kartierung von tRNA^{Ser(UCN)}

Um sekundäre Spaltungen ausschließen zu können, erfolgte die Strukturanalyse mit 5'- und 3'-markierten tRNA-Transkripten. Die T1 RNase Kartierung wurde bei sechs verschiedenen Temperaturen (20, 25, 30, 35, 40 und 45 °C) durchgeführt.

Betrachtet man die Strukturanalysen der temperaturabhängigen T1 Kartierung, so findet man zwei Signale (G35 und G57), die bei allen tRNA-Transkripten gleich gut unter allen Konditionen zugänglich sind. G35 befindet sich im Anticodon-Loop, G57 im T-Loop und sind damit für die RNase T1 gut zugänglich. Aufgrund dessen wurden alle Daten in Abbildung 4.17 B auf den G35 Höchstwert normalisiert.

Wie Abbildung 4.17 zeigt, waren keine wesentlichen Unterschiede bei G30, G31, G35 und G49 bis G53 beobachtet. In allen anderen Positionen unterscheiden sich die Zugänglichkeiten zwischen WT und G7497A Mutante sehr stark und zwischen WT und T7512C Mutante nur mäßig. Schon bei 20 °C Kartierung sind in der G7497A Mutante starke Signale für die Positionen G7, G13 und G14 zu erkennen, was auf erhöhte Zugänglichkeiten hinweist. Dabei ist festzustellen, dass die Signale mit steigender Temperatur sogar noch intensiver werden. Hingegen wurde in der Mutante T7512C und WT eine schwache Zugänglichkeit detektiert, die bei 30 °C Kartierung steigt und bis zu 45 °C Kartierung unverändert bleibt. Ein weiterer Unterschied zwischen den Zugänglichkeiten in den Mutanten und dem WT ist in dem D-Loop – Anticodon-Loop Übergangsbereich (G25 bis G27) zu sehen, der mit steigender Temperatur bei dem WT und der T7512C Mutante noch mehr verstärkt wird, und bei der G7497A Mutante unverändert bleibt. Die Positionen G18 und G19 im D-Loop zeigen für alle drei Transkripte bei 20 °C eine schwache Zugänglichkeit, die bei der G7497A Mutante bis auf 45 °C unzugänglich bleibt, während bei dem WT und bei der T7512C Mutante die Zugänglichkeit bei 30 °C steigt und dann weiter bis auf 45

°C unverändert bleibt. Diese beiden Gs sind an den klassischen D-/T-Loop Interaktionen beteiligt. Die Kartierung-Daten für diese Positionen stimmen mit den Ergebnissen von UV-Schmelzkurven-Messungen überein. Beim WT und der T7512C Mutante schmelzen diese Interaktionen bei 37 °C, dagegen bleiben sie bei der G7497A Mutante bis 45 °C erhalten.

Die Spaltfragmente im Anticodon-Loop der 5'-markierten G7497A Mutante unterscheiden sich vom WT und dem T7512C Mutante, was an verschiedenen Laufeigenschaften der zwei Fragmente lag, die in ihrer gelelektrophoretischen Mobilität verlangsamt waren. Es konnte allerdings keine Veränderung des Bandenmusters bei 3'-markierten tRNA-Transkripten gefunden werden.

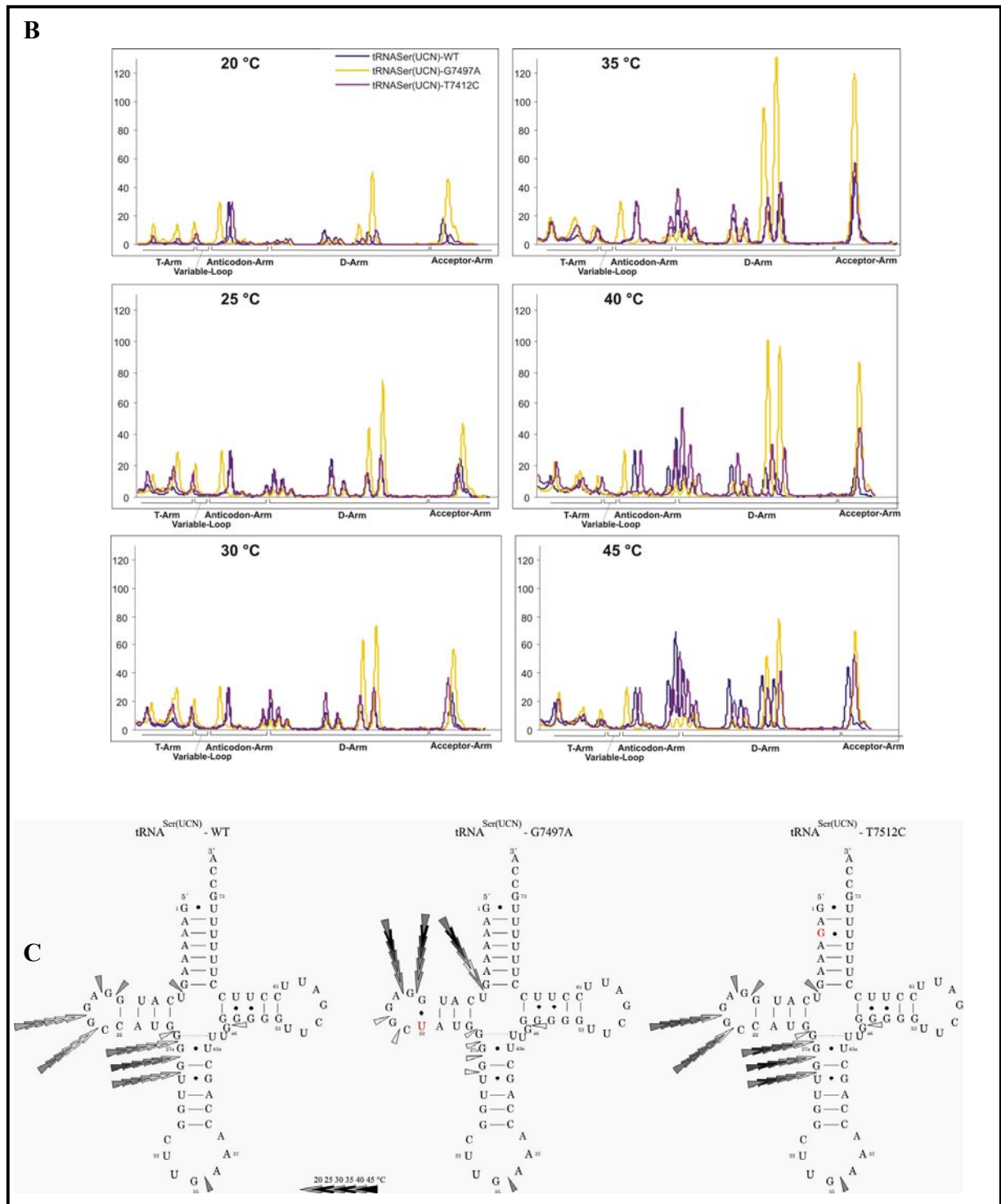


Abbildung 4.17: RNase T1 Kartierung von tRNA^{Ser(UCN)}-WT, -G7497A und -T7512C *in vitro* 5'-markierten (A) Transkripten bei 20 – 45 °C (G, Spaltung mit RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen; L, alkalische Hydrolyseleiter; C, Kontrolle (Inkubation ohne Nukleasen); Spuren 1-4, RNase T1-Verdau. (B) Chromatographische Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung der 5'-markierten Transkripte. (C) Schematische Darstellung der RNase T1 Kartierung von 5'-markierten Transkripten. Die Farbintensität der Dreiecke entspricht verschiedenen Spaltungsintensitäten.

4.4 Temperaturabhängige DEPC Kartierung von tRNA^{Ser(UCN)}

Um die Beteiligung von Adeninbasen an tertiären Wechselwirkungen zu untersuchen, wurden DEPC Modifizierungsexperimente unter denaturierenden (1 mM EDTA, 60 °C), semidenaturierenden (1 mM EDTA, 20, 25, 30, 35, 40, 45 °C) und nativen Bedingungen (10 mM MgCl₂, 20, 25, 30, 35, 40, 45 °C) durchgeführt. Unter nativen Bedingungen kann aufgrund der Anwesenheit von Magnesiumionen, im Gegensatz zu semidenaturierenden Bedingungen, die RNA ihre vollständig gefaltete Tertiärstruktur einnehmen und einzelne Positionen sind dann für den Angriff des DEPC nicht mehr zugänglich. Abbildung 4.18 zeigt die durch Diethylpyrocarbonat hervorgerufenen Modifizierungsmuster der tRNA^{Ser}-WT und den beiden Mutanten bei drei verschiedenen Temperaturen (25, 35 und 45 °C).

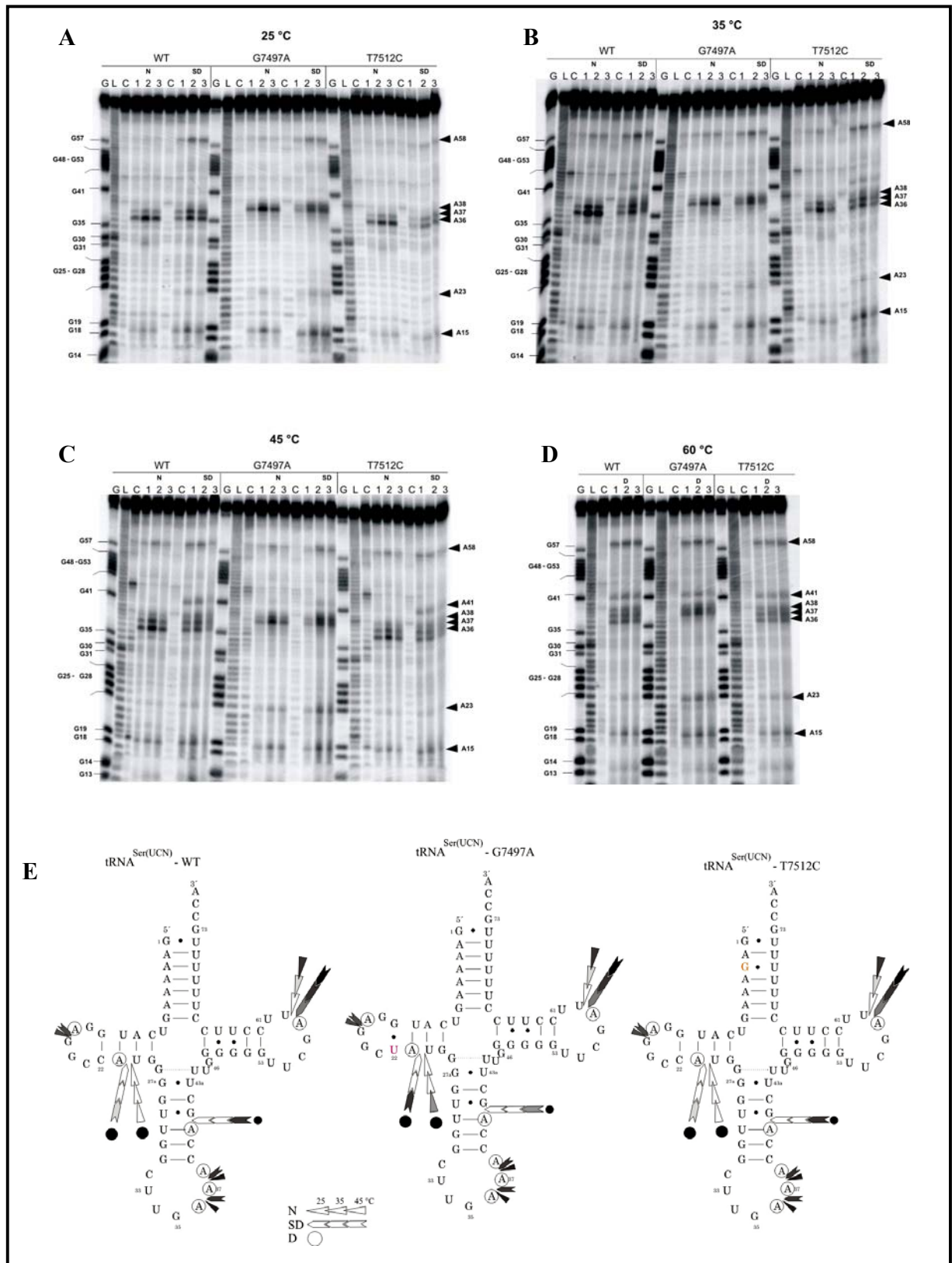
Wie die Abbildung 4.18 D zeigt, werden alle Adeninreste unter denaturierenden Bedingungen durch DEPC modifiziert und durch Anilin an diesen Stellen gespalten, was darauf hindeutet, dass bei 60 °C die tRNA-Moleküle in denaturierter Form vorliegen.

Bei Anwesenheit (native) oder Abwesenheit (semi-denaturierend) von Mg²⁺-Ionen werden die Adeninreste im Anticodon-Loop von DEPC erkannt und modifiziert. Unter nativen Bedingungen ist die Reaktivität von A58 innerhalb des T-Loop gegenüber DEPC unter 40 °C Kartierung verringert. Da unter diesen Bedingungen auch die tertiären Strukturen der tRNAs ausgebildet werden, kann die reduzierte Reaktivität mit der Stapelung von A58 mit U54 auf das G53-C61 Basenpaar des T-Stems erklärt werden.

=====

Abbildung 4.18: DEPC Kartierung von tRNA^{Ser(UCN)}-WT, -G7497A und -T7512C *in vitro* 5'-markierten Transkripten bei 25 °C (A), 35 °C (B), 45 °C (C) und 60 °C (D) (G, Spaltung mit RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen; L, alkalische Hydrolyseleiter; C, Kontrolle (Inkubation ohne Nukleasen); N, native; SD, semidenaturierende; D, denaturierende Bedingungen; Spuren 1-3, DEPC-Markierung für 50, 150 und 180 min. für (A) und 10, 20 und 25 min. für (B). Die Guanosinreste sind an der linken und Adenosinreste an der rechten Seite des Gels angegeben. (E) Schematische Darstellung der DEPC Kartierung von 5'-markierten Transkripten. Die Farbintensität der Pfeile entspricht verschiedenen Spaltungsintensitäten.

=====



Ein starker Einfluss von pathogenen Mutationen ist an der Position A23 zu erkennen, an der eine hohe Zugänglichkeit bei der G7497A Mutante bei 45 °C gezeigt werden konnte, aber keine Reaktivität bei dem WT und der T7512C Mutante. Dies deutet darauf hin, dass der D-Stem bei der G7497A Mutante unter den Reaktionsbedingungen bei 45 °C schon denaturiert vorliegt. Der Adeninrest in Position 41 ist bei allen drei Transkripten erst bei 45 °C und nur unter semidenaturierenden Bedingungen reaktiv, was auf einen wenig strukturierten Zustand des Anticodon-Stems hinweist. Alle anderen Adeninreste werden durch Basenstapelung geschützt. Obwohl die Position N7 von Adenosin nicht an der Ausbildung konventioneller Watson-Crick-Basenpaare beteiligt ist, ist ihre Reaktivität gegenüber DEPC bei der Basenstapelung empfindlich.

Weitere Hinweise für eine kompaktere Struktur der G7497A Mutante wurden durch native Gelelektrophorese (2.6.3) erhalten. Ein Gel-Shift der Mutante bestätigt die Vermutung, dass die C→U Transition zu einer Strukturänderung bei der G7497A Mutante führt, wohingegen die Transition A→G bei der T7512C Mutante keinen solchen Einfluss zu haben scheint (Abbildung 4.19). Die *in vitro* Transkripte der G7497A Mutante legen eine längere Strecke zurück, als die des WTs und der T7512C Mutante. *In vitro* Transkripte, die mit Hilfe eines Ribozymes erzeugt werden, unterscheiden sich von den nativen tRNAs an dem 5'-Ende durch das Fehlen einer Phosphatgruppe. Um den Einfluss der Phosphatgruppen am 5'-Ende der Transkripte bei dem Gel-Shift auszuschließen, wurden die Transkripte an dem 5'-Ende phosphoryliert und mit nicht phosphorylierten Transkripten auf Mobilität in einem nativen Gel überprüft. Die negativen Gruppen des Phosphats zeigen eine Auswirkung auf die Mobilität, aber keinen Einfluss auf den Gel-Shift der G7497A Mutante. Ähnliche Ergebnisse wurden bei nativen tRNAs aus gesunden Patienten und mehreren Cybrid-Klonen von beiden Mutanten beobachtet [Mollers et al., 2005].

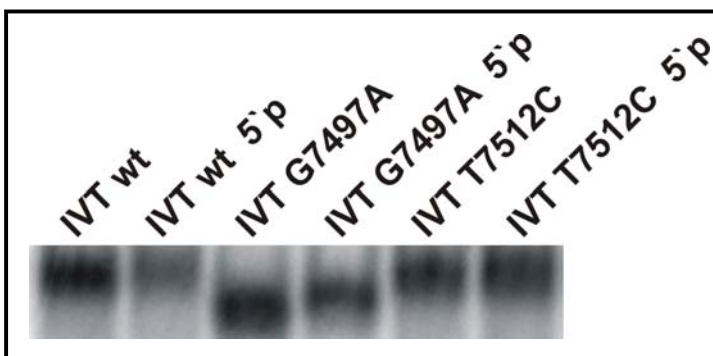


Abbildung 4.19: Native Gelelektrophorese von Transkripten von tRNA^{Ser(UCN)}-WT und –G7497A Mutante. IVT, *in vitro* Transkript. 5'p, am 5'-Ende phosphoryliert.

Da die Kartierungsdaten von WT und T7512C Mutante nur wenig differieren, kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Transkripte unter nativen Bedingungen ähnliche Strukturen bilden. Auf Grund dessen wurden die weiteren Experimente nur mit WT und G7497A Transkripten durchgeführt.

4.5 Strukturanalyse von tRNA^{Ser(UCN)}-WT und -G7497A Mutante mittels UV-Schmelzkurven-Messungen

Aufgrund der bereits gezeigten Strukturunterschiede bei tRNA^{Ser(UCN)}-WT und der -G7497A Mutante sollte geklärt werden, ob mittels UV-Schmelzkurvenanalyse auch auf dieser Ebene Unterschiede zu erkennen sind. Die Messung von Schmelzkurven ist eine einfache Methode, die die Untersuchung der thermodynamischen Stabilität und der Konformationsänderungen von Nukleinsäuren während des Übergangs von einem nativen zu einem denaturierten Zustand ermöglicht. Durch das Auflösen der tertiären Wechselwirkungen zwischen tRNA Strukturteilen und Basenstapelungen innerhalb des tRNA-Moleküls kommt es bei der Entfaltung zu einer Zunahme der Absorption, der so genannten Hyperchromizität.

Das Schmelzverhalten der beiden tRNAs wurde mittels UV-Spektroskopie (2.14) untersucht. Die Abbildung 4.20 zeigt Schmelzkurven der unmodifizierten tRNA Transkripte und deren erste Ableitung. Alle tRNAs wurden in einem 50 mM Phosphatpuffer bei pH 7,0 in Ab- und Anwesenheit von 1 mM MgCl₂ vermessen. Die Schmelzkurven wurden in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 90 °C mit einer Heizrate 0,5 °C/min aufgenommen. Zu erkennen ist der typische sigmoidale Verlauf der Schmelzkurve. Beim WT sind zwei ineinander übergehende sigmoidale Kurven zu sehen, die jeweils für einen Schmelzpunkt stehen (biphasische Schmelzkurve). Bei der Mutante ist nur eine sigmoidale Kurve zu erkennen (monophasische Schmelzkurve). Anhand der sekundären und tertiären Strukturen kann nachvollzogen werden, wie das Aufschmelzen der Transkripte abläuft. Die Denaturierung des WT Transkripts beginnt mit dem Auflösen der tertiären Wechselwirkungen zwischen D- und T-Loop, wodurch der erste Übergang zustande kommt. Ausgehend von der Sekundärstruktur beginnt die Denaturierung des D-Stems gefolgt von den Sekundärstrukturelementen im T-Stem. Das Auflösen sämtlicher Basenpaarungen in den Anticodon- und Akzeptor-Stämmen bewirkt dann den zweiten Übergang. Bei der Mutante ist nur ein Übergang zu beobachten, was bedeutet,

dass die Tertiär- und die Sekundärstruktur gleichzeitig zerstört werden. Die Schmelzpunkte für das Schmelzen der Transkripte, welche durch Ablesen des Maximums der ersten Ableitung erhalten wurden, betragen $T_{m1} = 33,2 \text{ °C} (\pm 0,2 \text{ °C})$, $T_{m2} = 59,3 \text{ °C} (\pm 0,2 \text{ °C})$ für den WT und $T_m = 51,6 \text{ °C} (\pm 0,2 \text{ °C})$ für die G7497A Mutante ohne MgCl_2 und $T_{m1} = 36,0 \text{ °C} (\pm 0,2 \text{ °C})$, $T_{m2} = 62,8 \text{ °C} (\pm 0,2 \text{ °C})$ für dem WT und $T_m = 56,5 \text{ °C} (\pm 0,2 \text{ °C})$ für die G7497A Mutante. Dabei steht T_{m1} für die Denaturierungstemperatur am ersten und T_{m2} am zweiten Übergang. Der Vergleich der Kurven zeigt einen deutlichen Unterschied in der tRNA Struktur. Offenbar ist ein gewisser Strukturanteil der tRNA^{Ser(UCN)}-G7497A noch stärker gefaltet, so dass die Struktur dadurch noch stärker stabilisiert ist.

Divalente Kationen können die Stabilität der nativen RNA-Struktur erhöhen. Mg^{2+} oder Ca^{2+} stabilisieren die Doppelhelixkonformation durch unspezifische Wechselwirkungen mit den Phosphorsäurediesterbindungen. Wie die Kurven mit 1 mM Mg^{2+} Ionen (1b und 2b) erkennen lassen, beeinflussen die Mg^{2+} Ionen das Schmelzverhalten der tRNAs. Die Schmelzpunkte der tRNAs wurden durch Zugabe der 1 mM MgCl_2 um 3 °C bei WT und um 5 °C bei der Mutante erhöht. Das ist ein deutlicher Effekt der Stabilisierung der tRNA-Struktur durch Mg^{2+} Ionen. Mit zunehmender Magnesiumkonzentration kam es zu keiner weiteren Verschiebung des T_m -Wertes in Richtung höherer Temperaturen.

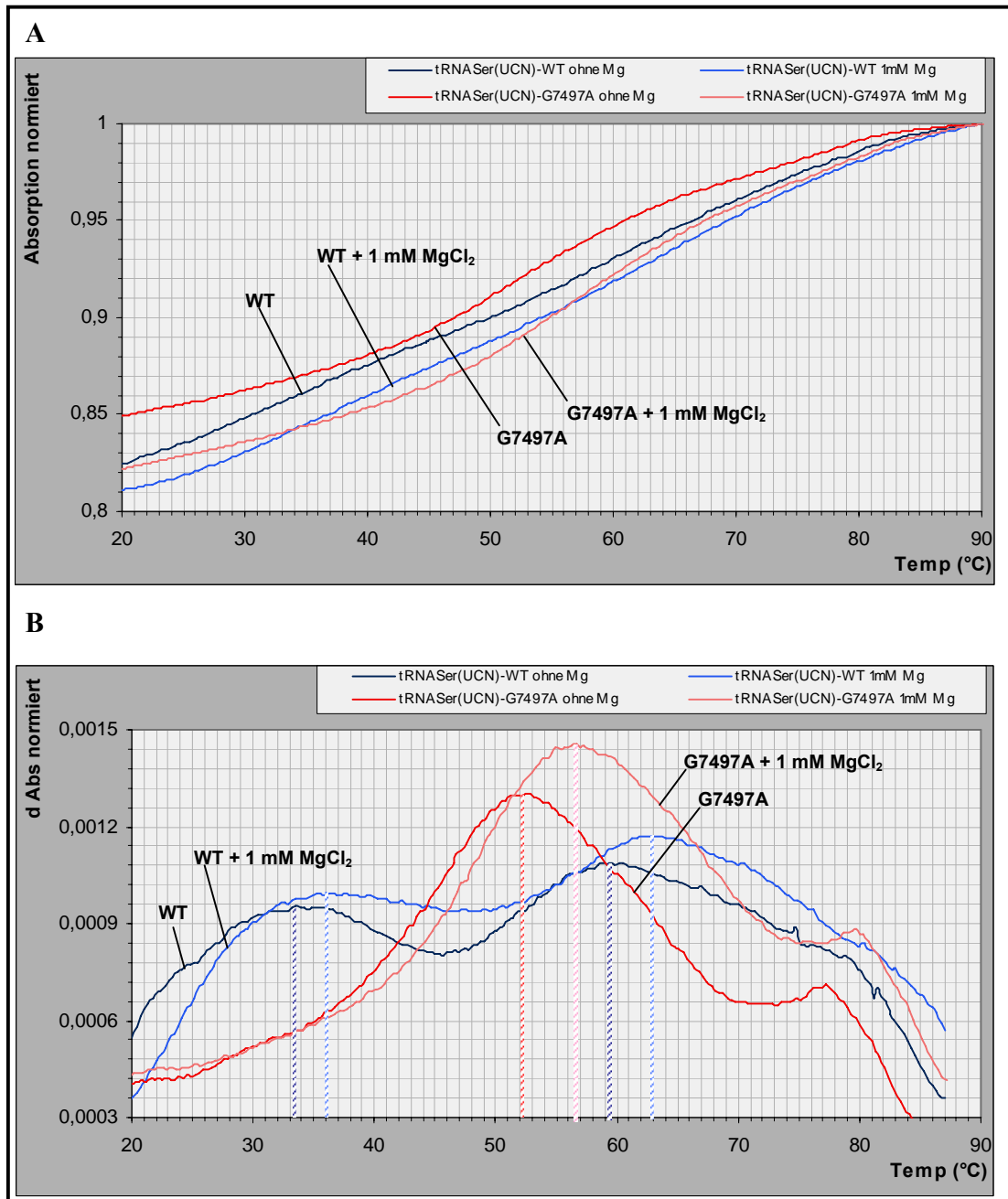


Abbildung 4.20: Normalisierte UV-Schmelzkurven (**A**) und deren ersten Ableitungen (**B**) von tRNA^{Ser(UCN)}-WT und -G7497A Mutante ohne MgCl₂ (WT, T_{m1} = 33,2 °C und T_{m2} = 59,3 °C; G7497A, T_m = 51,6 °C) und mit 1 mM MgCl₂ (WT + 1mM MgCl₂, T_{m1} = 36,0 °C und T_{m2} = 62,8 °C; G7497A + 1mM MgCl₂, T_m = 56,5 °C). Hyperchromizität beträgt etwa: WT, 18 %; WT + 1mM MgCl₂, 19 %; G7497A, 15,5 % und G7497A + 1mM MgCl₂, 18,3 %.

Die Faltung von RNA-Molekülen ist ein sehr komplizierter Prozess, in dem die Abstoßungskraft der negativen Ladungen des Polyphosphat-Rückgrates durch die Bindung von mono- und/oder divalenten Metallionen kompensiert wird. Die Metallionen stabilisieren dabei die native tertiäre Struktur. Um den Effekt der Na^+ -Konzentration auf die Stabilität der Struktur der tRNA zu untersuchen, wurde die Änderung der Schmelztemperatur in Gegenwart von 100 mM NaCl-Konzentration gemessen. Natrium-Ionen haben gewöhnlich einen stabilisierenden Effekt auf die Struktur der Nukleinsäuren und der T_m steigt mit zunehmender Na^+ -Konzentration [Puglisi and Tinoco, 1989]. Es wurde bereits eine Erhöhung der T_m -Werte durch Zugabe von 1 mM MgCl_2 um 3 °C bei WT und 5 °C bei der Mutante beobachtet. Die Zugabe von 100 mM NaCl erhöhte die T_m -Werte sowohl bei dem WT als auch bei der Mutante um weitere 5 °C (Tabelle 4.3).

	Ohne Mg^{2+} und Na^+ Ionen	1 mM MgCl_2	1mM MgCl_2 + 100 mM NaCl
WT T_{m1} ($\pm 0,2$ °C)	33,2	36,0	41,0
T_{m2} ($\pm 0,2$ °C)	59,3	62,8	66,0
Hyperchromizität (%)	18,0	19,0	18,8
G7497A T_m ($\pm 0,2$ °C)	51,6	56,5	61,0
Hyperchromizität (%)	15,5	18,3	16,3

Tabelle 4.3: Übersicht der Schmelztemperaturen der tRNA^{Ser(UCN)}-WT und G7497A Mutante in Abhängigkeit von Mg^{2+} und Na^+ Konzentrationen.

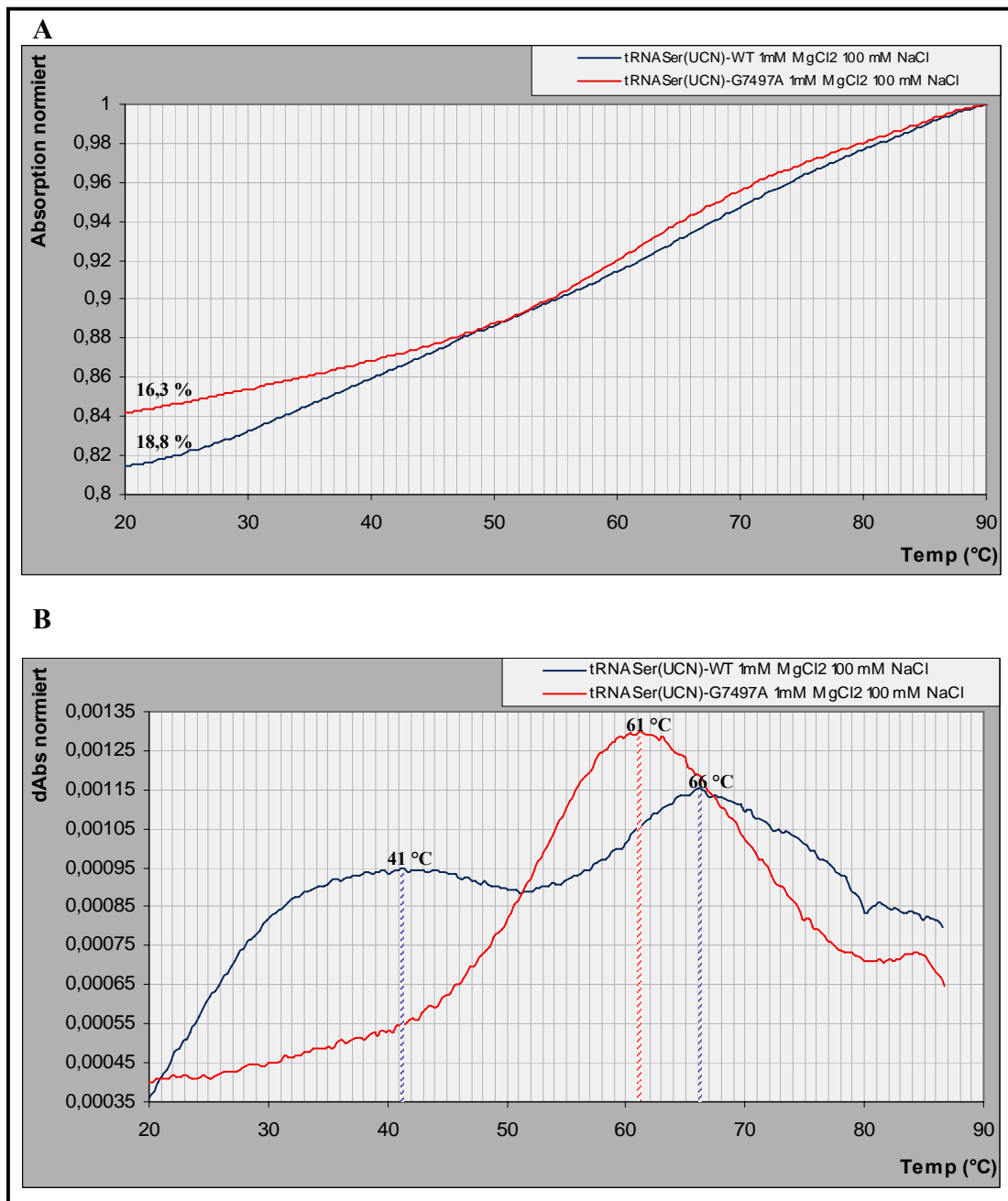


Abbildung 4.21: Normalisierte UV-Schmelzkurven (**A**) und deren erste Ableitungen (**B**) von tRNA^{Ser(UCN)}-WT und -G7497A Mutante bei 1 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl (T_{m1} = 41,0 °C und T_{m2} = 66,0 °C für WT; T_m = 61,0 °C für die G7497A Mutante). Die Hyperchromizität beträgt etwa: 18,8 % bei WT; 16,3 % für die G7497A Mutante.

Um die Bildung von tRNA-Dimeren auszuschließen, wurde die Schmelzkurvenanalyse bei verschiedenen Konzentrationen an tRNAs durchgeführt [Wittenhagen and Kelley, 2002].

Beide Kurven (Abbildung 4.22); für $OD_{260} = 0,4$ und für $OD_{260} = 1,6$ lassen sich gut überlagern. Auch liegen die Schmelzpunkte in beiden Fällen bei gleichen Werten. Damit ist die T_m unabhängig von der tRNA-Konzentration, was die Duplex-Bildung der tRNAs ausschließt.

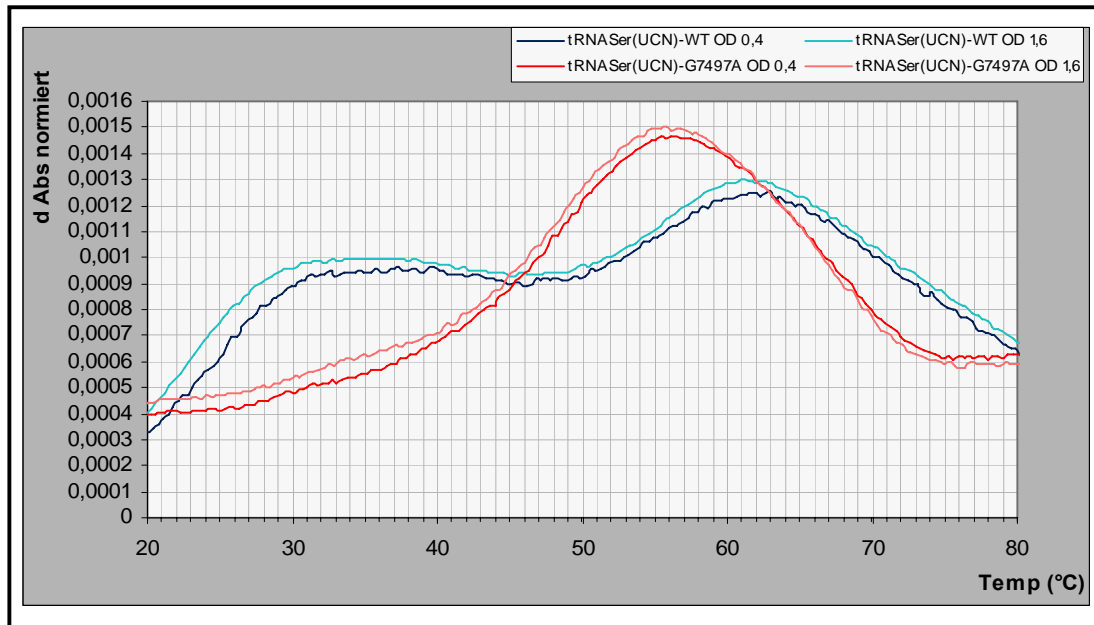


Abbildung 4.22: Normalisierte 1. Ableitung der tRNA^{Ser(UCN)}-WT und -G7497A Mutante für $OD_{260} = 0,4$ (blau bzw. rot) und für $OD_{260} = 1,6$ (hell blau bzw. hell rot).

4.6 Untersuchung der Struktur von tRNA^{Ser(UCN)}-Derivaten mittels temperaturabhängiger PAGE unter nicht denaturierenden Bedingungen

Vergleiche der tRNA^{Ser(UCN)}-Sequenz von Menschen und Menschenaffen ergaben hohe Homologien. So sind humane und Gorilla Sequenz zu 97 % und humane und Orang-Utan Sequenz zu 93 % homolog (Tabelle 4.4).

Serine (UCN)	Acc-stem	D-stem	D-loop	D-stem	Ac-stem	Anticd-loop	Ac-stem	T-stem	T-loop	T-stem	Acc-stem			
	1	8 10		22	26 27	32	39	44	49		61	66	73	
Homo sapiens	GAAAAAG	T CATG	GAGGC	CATG	GG GTTGG	CTTGAAA	CCAGC	TTTG	GGGGG	TTCGATT	CCTTC	CTTTTTT	G	Mensch
Gorilla gorilla	GAAAAAG	T CATG	AAGGT	CATG	GG GTTGG	CTTGAAA	CCAGC	TTTG	GGGGG	TTCGATT	CCTTC	CTTTTTT	G	Gorilla
Pan paniscus	GAAAAAG	T CATG	GGGT	CATG	GG GTTGG	CTTGAAA	CCAGC	TTTA	GGGGG	TTCGATT	CCTTC	CTTTTTT	G	Zwergschimpanse
Pan troglodytes	GAAAAAG	T CATG	GAGGT	CATG	GG GTTGG	CTTGAAA	CCAGC	TTTA	GGGGG	TTCGATT	CCTTC	CTTTTTT	G	Gemeine Schimpanse
Pongo pygmaeus	GAAAAAG	T CATG	GGGT	TATG	GG GTTGG	CTTGAAA	CCAGC	TTTA	GGGGG	TTCGATT	CCTTC	CTTTTTT	G	Orang-Utan
Hylobates lar	GAAAAAG	T CATA	GAGGT	TATG	GG GCTGG	CTTGAAA	CCAGT	TTTA	GGGGG	TTCGATT	CCTTC	CTTTTTT	G	Weißhandgibbon
Papio hamadryas	GAAAAAG	T TATA	GGGC	TATA	AG GCTGG	CTTGAAA	CCAGT	TTTA	GGGGG	TTCGACT	CCCTC	CTTTTTT		Mantelpavian

Tabelle 4.4: Sequenzalignment von tRNA^{Ser(UCN)} von Primaten.

Die pathogene Base U22 kommt in mitochondrialer tRNA^{Ser(UCN)} bei anderen Primaten vor (auch bei Menschenaffen, wie z.B. in der Orang Utan Familie), die vollständig funktionsfähige mt tRNAs sind. Eine Erklärung dafür könnte eine Kompensation der Struktur durch vier zusätzliche Transitionen sein; G46A im variablen Loop, A15G, C20U im D-Loop und G51A im T-Stem. Mittels einer Gel-Shift-Untersuchung konnte die Kompensation der Struktur geklärt werden. Dafür wurden Transkripte von humaner tRNA^{Ser(UCN)}-WT, von der pathogenen G7497A Mutante, von zwei Chimären, die zusätzlich zu dem pathogenen G22U noch G46A bzw. A15G + C20U Transitionen tragen, und vom WT Orang Utan am 5'-Ende radioaktiv markiert (2.5.3). Das Gel-Shiftexperiment wurde bei zwei verschiedenen Temperaturen (25 °C und 40 °C) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.23 dargestellt. Wie zu erkennen ist, führt eine zusätzliche Transition G46A im variablen Loop zu einer längeren Laufstrecke, was darauf hindeutet, dass die

Struktur dadurch noch kompakter wird. Dies ist ein Hinweis auf die Beteiligung von G46 an tertiären Wechselwirkungen und somit scheidet G46 als Kandidat für eine Kompensation aus. Die Vermutung über die Kompensation der Struktur über zusätzlichen Basenaustausch wurde durch das Einführen von zwei weiteren Mutationen im D-Loop A15G und C20U bestätigt. Die Banden von Orang-Utan WT und Chimäre2 laufen dieselbe Strecke wie die humane WT tRNA. Alle Spuren präsentieren eine zusätzliche Bande, die auf eine zweite Konformation hindeutet. Die zweite Bande legt bei allen Transkripten bei 25°C dieselbe Strecke zurück, die sich, außer bei der pathogenen Mutante, bei 40 °C verlängert.

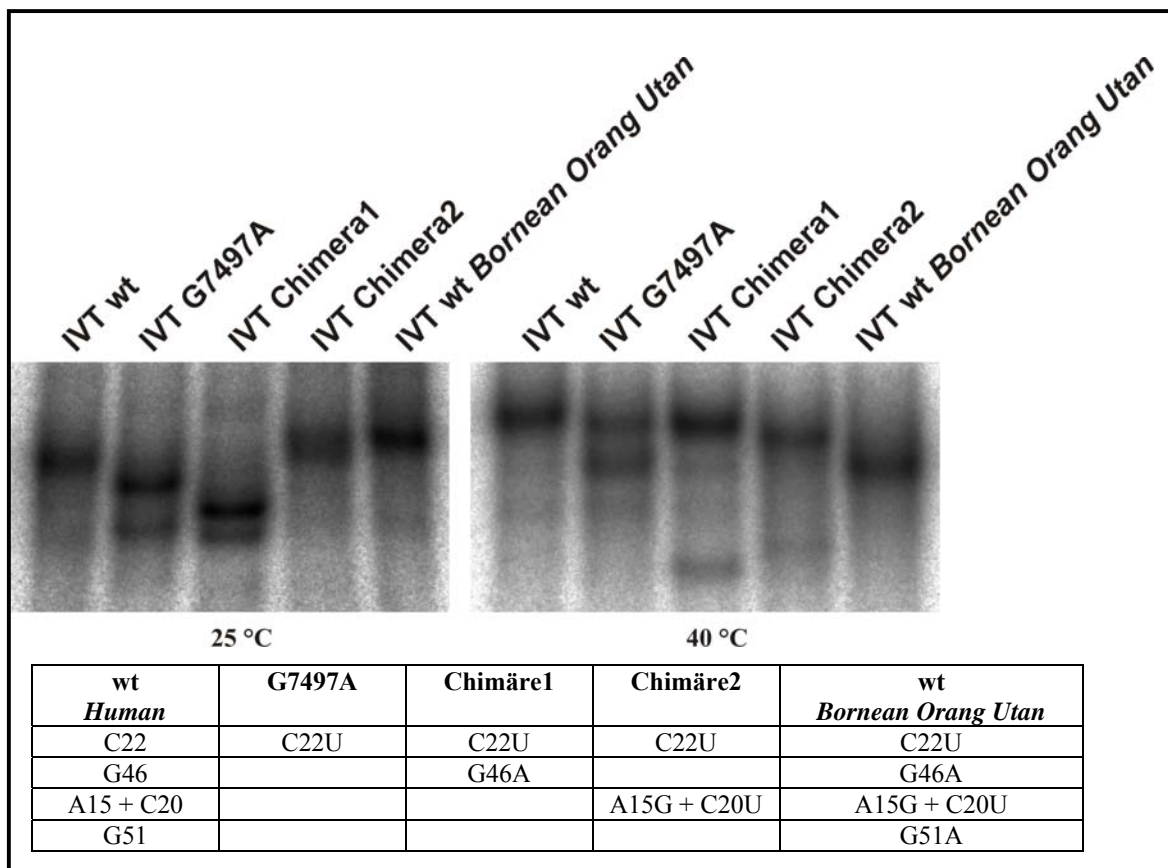


Abbildung 4.23: Native Gelelektrophorese von Transkripten von tRNA^{Ser(UCN)}-WT und Derivaten. IVT, *in vitro* Transkript.

4.7 Temperaturabhängige Modifikation von tRNA^{Ser(UCN)}-Transkripten mit mt S-100 Extrakt

Die Modifikationseffizienzen von tRNA^{Ser(UCN)}-WT und G7497A Mutante wurden bei verschiedenen Temperaturen verglichen. In Abbildung 4.24 sind Modifikationskinetiken von Transkripten bei drei verschiedenen Temperaturen dargestellt. Die mit [α -³²P]-NTPs *in vitro* synthetisierten humanen mitochondrialen tRNA^{Ser(UCN)} Transkripte (2.5.2) wurden mit 3 μ l mt S-100 Extrakt (4,3 μ g/ μ l) in einem einfachen M8 Puffer (2.2) 0, 20, 40, 60 und 120 min bei 37 und 45 °C bzw. mit 9 μ l mt S-100 Extrakt bei 20 °C inkubiert. Die Aktivität des Extraktes bezüglich der Pseudouridylierung ist bei 37 °C optimal, und bei 20 °C stark und bei 45 °C leicht herabgesetzt. Um dasselbe Modifikationsniveau zu erreichen, war bei 20 °C im Vergleich zu 37 °C eine dreifache Konzentration an Enzym notwendig.

Die Auswirkung der Mutation auf die Modifikationseffizienz ist bei allen Konditionen deutlich zu erkennen. Die Aktivität des Pus4 Enzymes ist bei der Mutante um 30 % herabgesetzt. Die Modifikationsniveau beträgt bei 20 °C und 37 °C beim WT 0,9 Ψ mol/mol tRNA und 0,7 Ψ mol/mol tRNA bei der Mutante. Die Ergebnisse der Modifikation bei 37 °C stimmen mit den Ergebnissen von Einzelmutationen (Abbildung 4.4) überein. Bei 45 °C sind es 0,7 Ψ mol/mol tRNA für den WT und 0,5 Ψ mol/mol tRNA für die Mutante. Durch temperaturabhängige Experimente der Enzymkinetiken konnte gezeigt werden, dass die G7497A Mutante ein schlechteres Substrat für die Pseudouridin-Synthasen darstellt. Die Aktivität des Enzymes kann durch ein GU-Basenpaar am Ende der Helix des D-Armes entscheidend verringert werden. Man nimmt an, dass für eine optimale Funktion des Enzymes der D-Stem eine normale helikale Struktur ausbilden muss, die ihrerseits die Bildung der tertiären Struktur der tRNA beeinflusst.

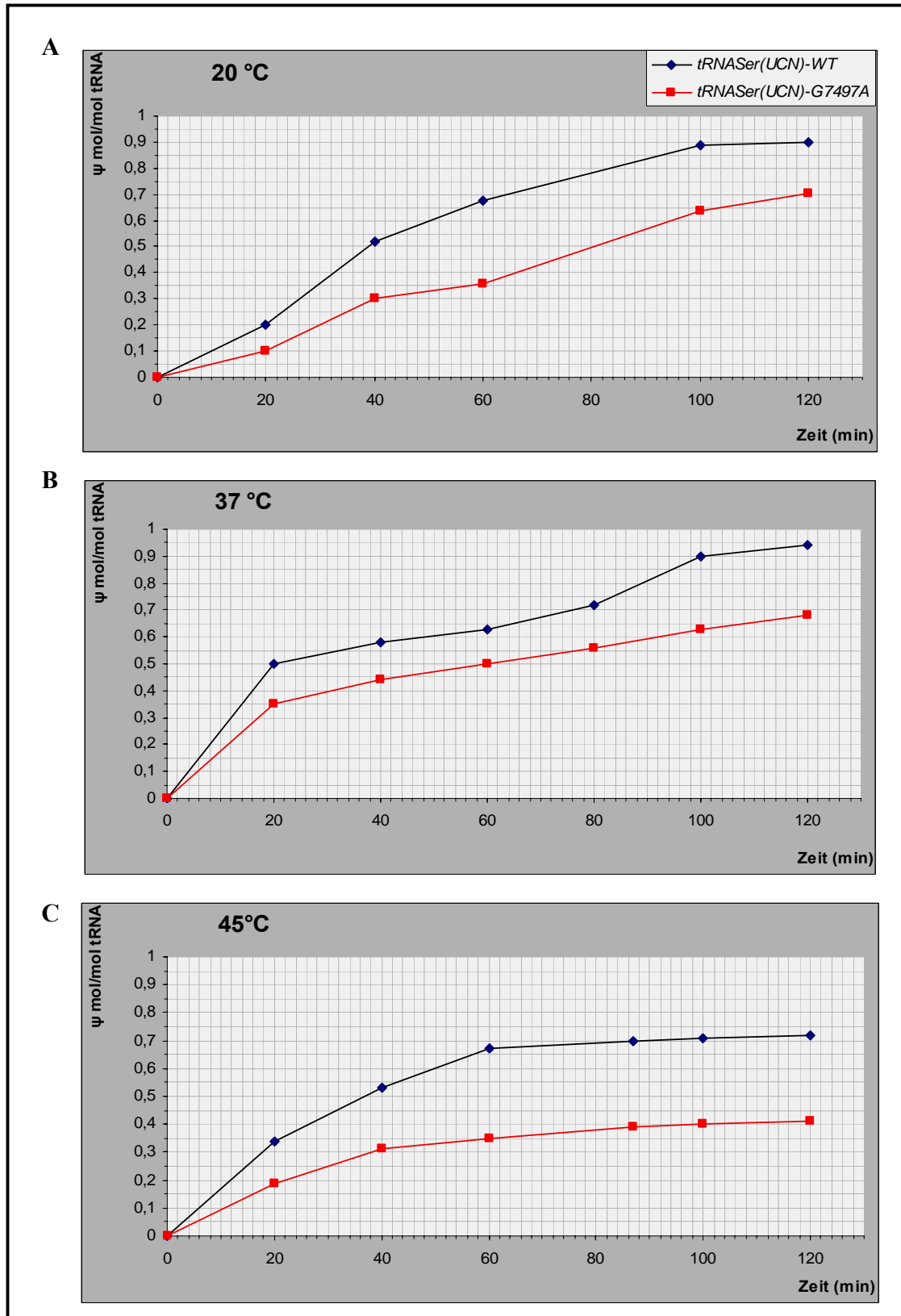


Abbildung 4.24: Temperaturabhängige Modifikationskinetiken mit mt S-100 Extrakt. (A) bei 20 °C, (B) bei 37 °C und (C) bei 45 °C.

4.8 Modifikation der tRNA^{Ser(UCN)}-Transkripte mit rekombinanten Pus4p (YNL292w) und Pus1p (YPL212C) Enzymen aus *Saccharomyces cerevisiae*

Auch die Modifikation mit der Pseudouridin-Synthase 4 (Pus4), die den Uridinrest in der Position 55 zu Ψ modifiziert, konnte analog zu dem mitochondrialen Extrakt benutzt werden. In der Literatur finden sich zahlreiche Untersuchungen, die sich mit dem Mechanismus der Erkennung der tRNA-Elemente durch das Pseudouridin Synthase 4 aus *Saccharomyces cerevisiae* (scPus4p) auseinandersetzen ([Becker et al., 1997]). Die Pseudouridin Synthase 1 (Pus1) von *Saccharomyces cerevisiae* (scPus1p) zeigt katalytische Aktivität in sieben Positionen von tRNAs, wozu sowohl U28 als auch U29 gehören. In der humanen mt tRNA^{Ser(UCN)} liegt die U28 normalerweise nicht modifiziert vor, lässt sich aber mit Pus1 aus *S.cerevisiae* modifizieren.

Für die Modifikationsexperimente war es erforderlich, die Hefe Pus4 und Pus1 Enzyme rekombinant herzustellen und chromatographisch aufzureinigen. Nach der Induktion der Proteinexpression erschien bei einem Molekulargewicht von etwa 50,000 Da für Pus4 bzw. 60,000 Da für Pus1 unter denaturierenden SDS-Gelelektrophoresebedingungen eine Bande (Abbildung 4.25). Diese Größen stimmen mit dem Molekulargewicht für die Hefe Pus4 (47,4 kDa [Becker et al., 1997]) und Pus1 (63 kDa [Arluison et al., 1998]) aus der Literatur überein. Die Aufreinigung erfolgte nach Extraktion des Proteins über eine HisTrap-HP-Affinitätssäule, und wurde anschließend dialysiert. Deshalb wurde anschließend eine Dialyse durchgeführt. Hierdurch wurden homogene Proteine erhalten. Die Überproduktion der Proteine führte zu Aggregatbildungen, so dass nicht die gesamten rekombinanten Proteine in der Lösung aktiv waren. Die gesamte Konzentration von Pus1 betrug 27 μM und die von Pus4 1 μM .

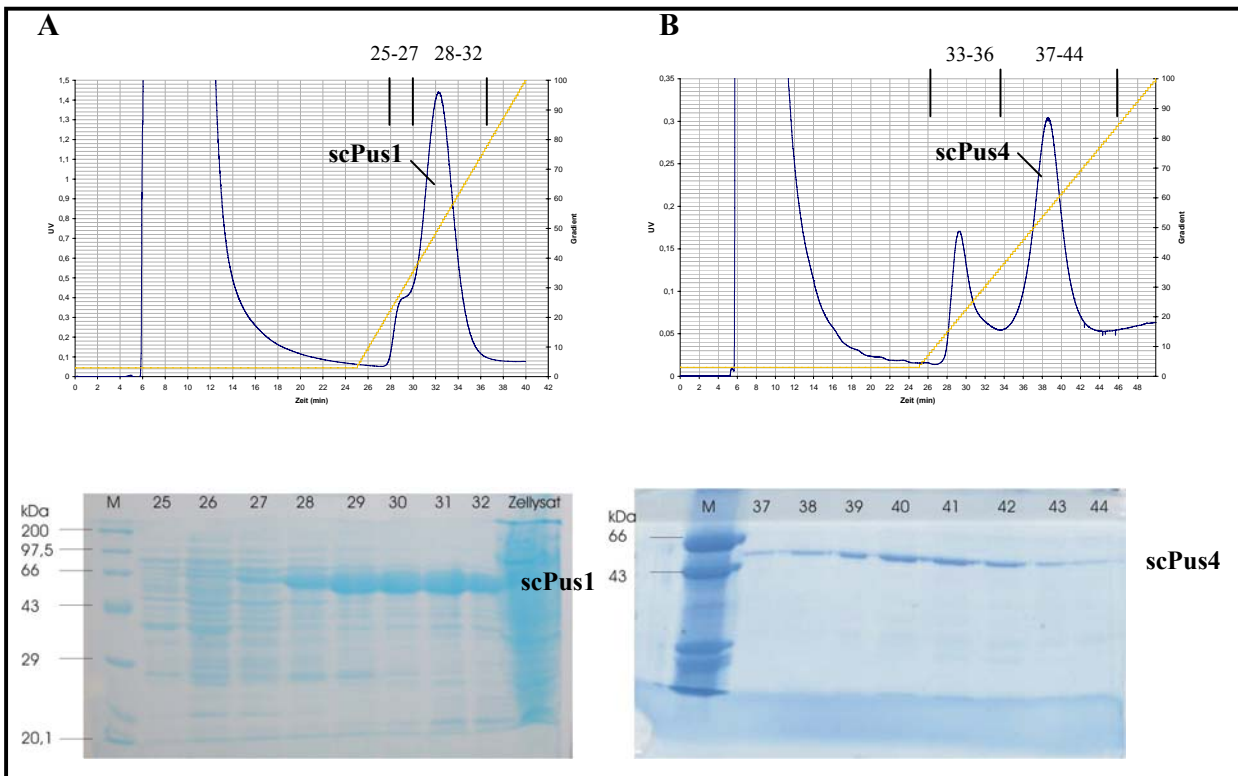


Abbildung 4.25: Aufreinigung rekombinanter Hefe Pus1 (**A**) und Pus4 (**B**) Proteine mittels HisTrap HP Säule (oben) und SDS-PAGE (unten). M, Größenmarker. Die Proteingrößen des Markers sind links angegeben. Die Spurenzahlen entsprechen den Zahlen des Fraktionssammlers bei der Chromatographie. Details der Trennung sind unter 2.16 (Material und Methoden) angegeben.

Die mit [α - 32 P]-NTPs *in vitro* synthetisierten hum mt tRNA^{Ser(UCN)} Transkripte (2.5.2) wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Pus1 bzw. Pus4 Enzymen in einem einfachen Pus-MOD Puffer (2.2) 120 min bei 37 °C inkubiert.

Der WT wird von beiden Pseudouridin-Synthasen zu einem höheren Prozentsatz modifiziert wie die Mutante. Für die Modifizierung mit Pus4 an U55 Position erreichten sowohl WT als auch Mutante das Sättigungsplateau bei einer Enzymkonzentration von 0,2 μ M. Bei der Modifizierung mit Pus1 an U28/29 wurde das Plateau von der WT tRNA bereits bei einer Pus1-Konzentration von 0,05 μ M, von der Mutante jedoch erst bei 0,2 μ M (Abbildung 4.26).

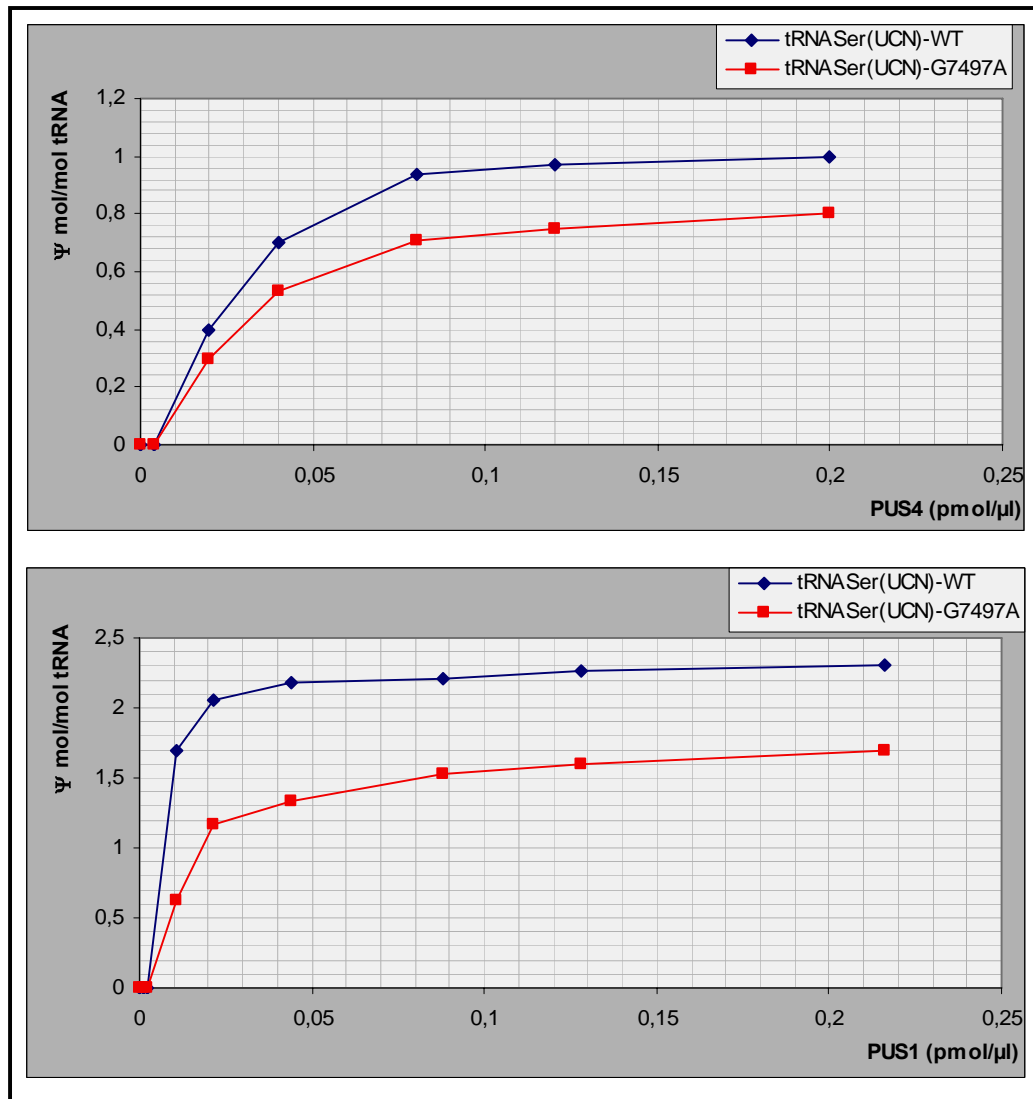


Abbildung 4.26: Modifikation der tRNA^{Ser(UCN)}-Transkripte (400000 cpm/Ansatz) mit verschiedenen Konzentrationen von Pus4 (A) und Pus1 (B) Enzymen.

Der Vergleich von Enzymkinetiken mit *in vitro* synthetisierten tRNA-Transkripten zeigt also, dass die C22U Mutation einen starken Einfluss auf die Erkennung sowohl durch humane mitochondriale Enzyme als auch durch rekombinante Hefe Pus4 und Pus1 Enzyme hat.

4.9 UV-Schmelzkurven von modifizierten Transkripten

Durch Schmelzkurvenanalyse sollte untersucht werden, ob die Schmelztemperatur und dadurch die Stabilität der tRNAs durch das Vorhandensein von Modifikationen beeinträchtigt wird. Dafür wurden die einzelnen tRNAs *in vitro* transkribiert (2.5.2) und mittels denaturierender PAGE (2.6.2) aufgereinigt. Nach der Modifikation der tRNAs mit den entsprechenden Enzymen (2.16) wurden die Ansätze nochmals über denaturierende PAGE (2.6.2) aufgereinigt. Die Werte der Modifikationsraten wurden mit Hilfe von BODIPY-markierten Nukleotiden mittels Kapillarelektrophorese erhalten, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Lyko im DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum) durchgeführt wurde (Tabelle 4.5).

Modifikation	Pus4	Pus1	Pus4 + Pus1
WT (mol Ψ / mol tRNA)	0,7	1,25	1,5
G7497A (mol Ψ / mol tRNA)	0,7	1,0	1,25

Tabelle 4.5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Kapillarelektrophorese.

Die Abbildung 4.27 **A** und **B** enthält die Ergebnisse für das Schmelzen von tRNA^{Ser(UCN)}-WT und **C** und **D** für die G7497A Mutante. In den Schmelzkurven des WTs sind, wie im Abschnitt 4.5, auch zwei Übergänge zu sehen, während die Mutante nur einen aufweist. Von der ersten Ableitung lassen sich die T_m -Werte ablesen; dabei stehen T_{m1} für die Denaturierungstemperatur am ersten und T_{m2} am zweiten Übergang (Tabelle 4.6).

Modifikation	nicht modifiziert		Pus4		Pus1		Pus4 + Pus1	
	1mM MgCl ₂		1mM MgCl ₂		1mM MgCl ₂		1mM MgCl ₂	
		100mM NaCl		100mM NaCl		100mM NaCl		100mM NaCl
WT T_{m1} ($\pm 0,2$ °C)	37,6	41,0	37,6	42,6	37,6	49,2	38,9	50,4
T_{m2} ($\pm 0,2$ °C)	63,7	66,2	62,8	66,8	61,2	67,8	62,8	68,4
Hyperchromizität (%)	19,5	18,8	19,2	18,7	18,9	16,9	18,2	15,7
G7497A T_m ($\pm 0,2$ °C)	56,9	61,0	54,7	60,8	58,0	63,4	56,9	61,2
Hyperchromizität (%)	17,7	16,3	19,4	18,3	17,6	16,0	19,4	17,5

Tabelle 4.6: Übersicht der Schmelztemperaturen der tRNA^{Ser(UCN)}-WT und -G7497A Mutante in Abhängigkeit von Mg²⁺ und Na⁺ Konzentrationen.

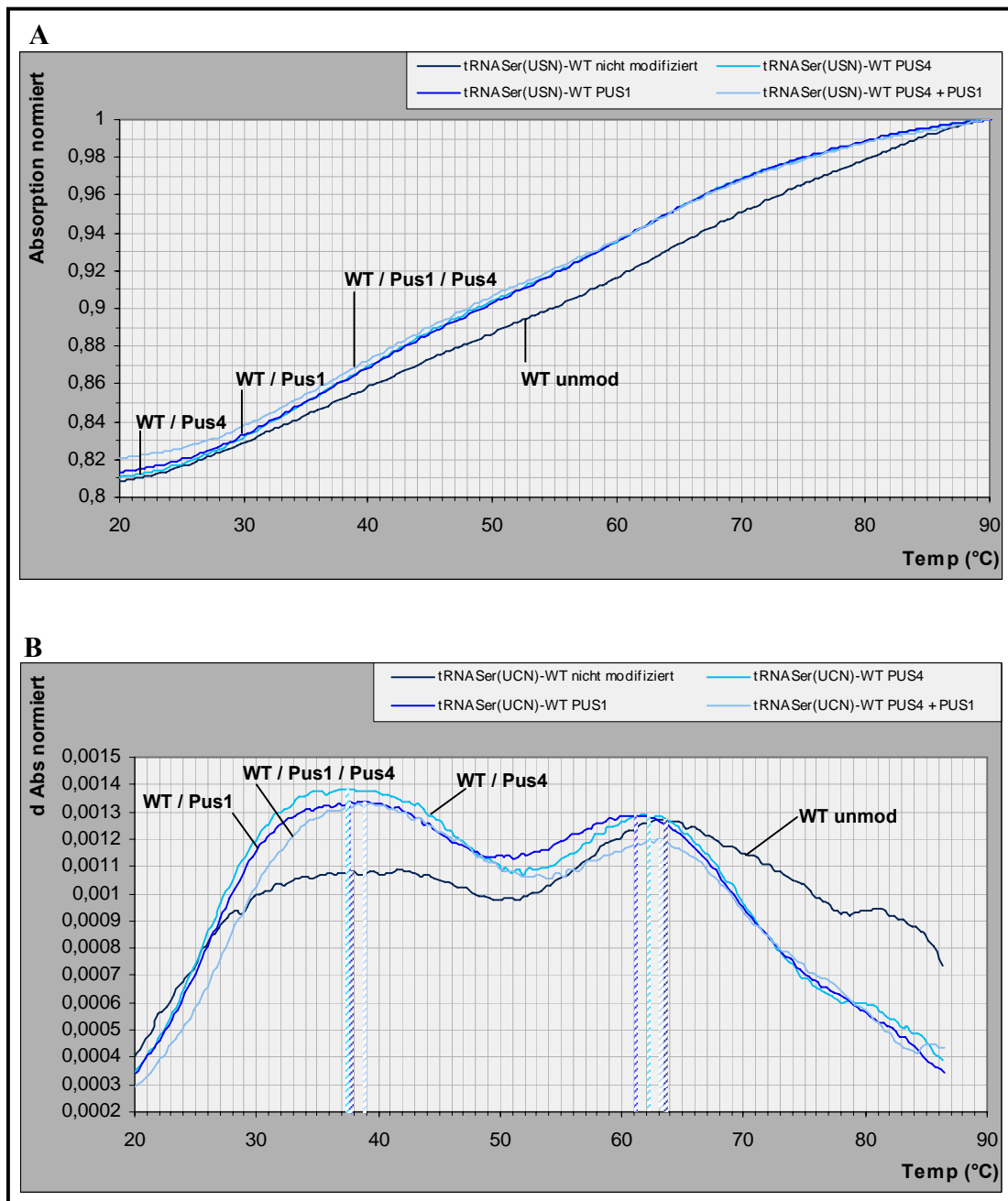
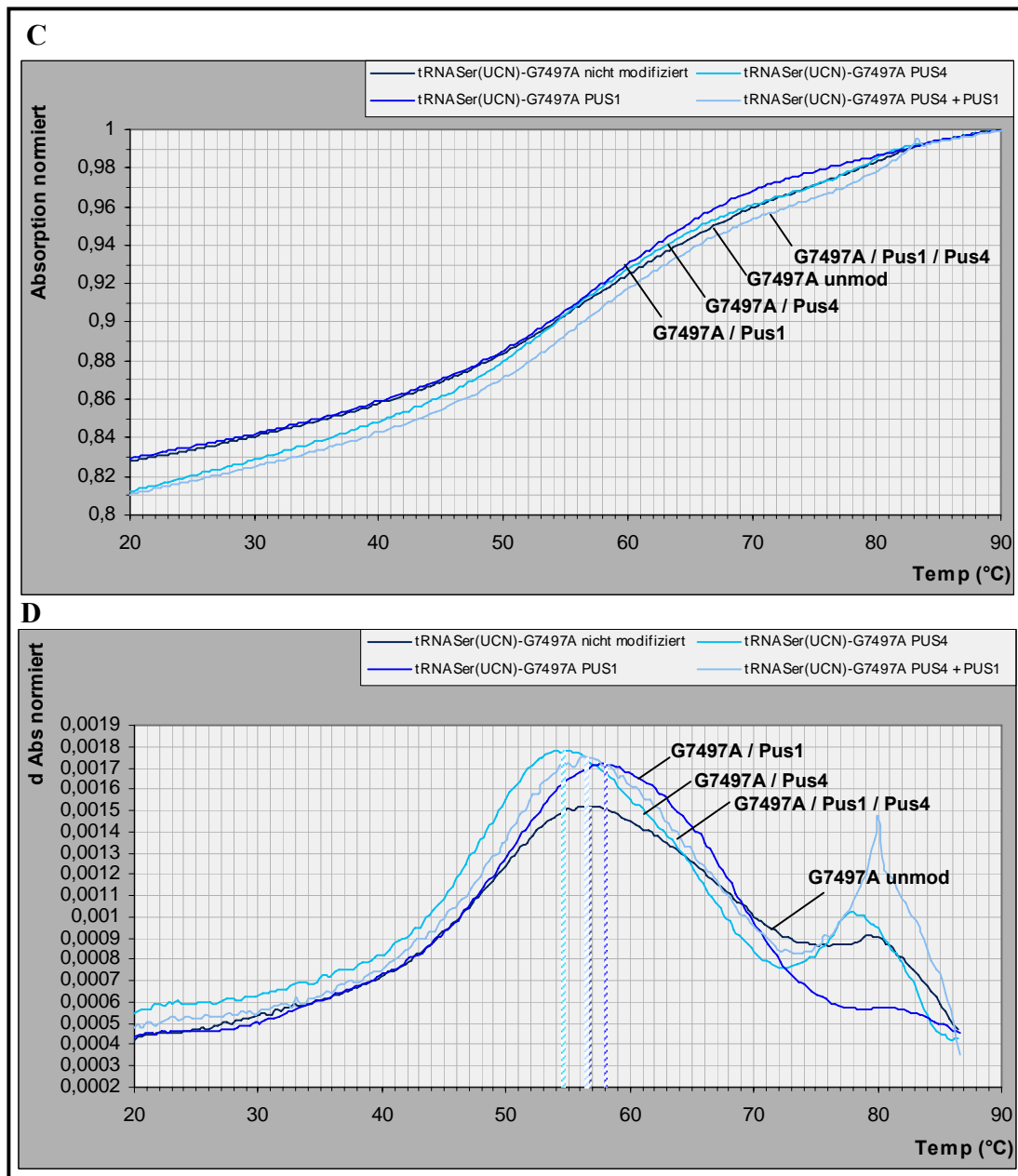
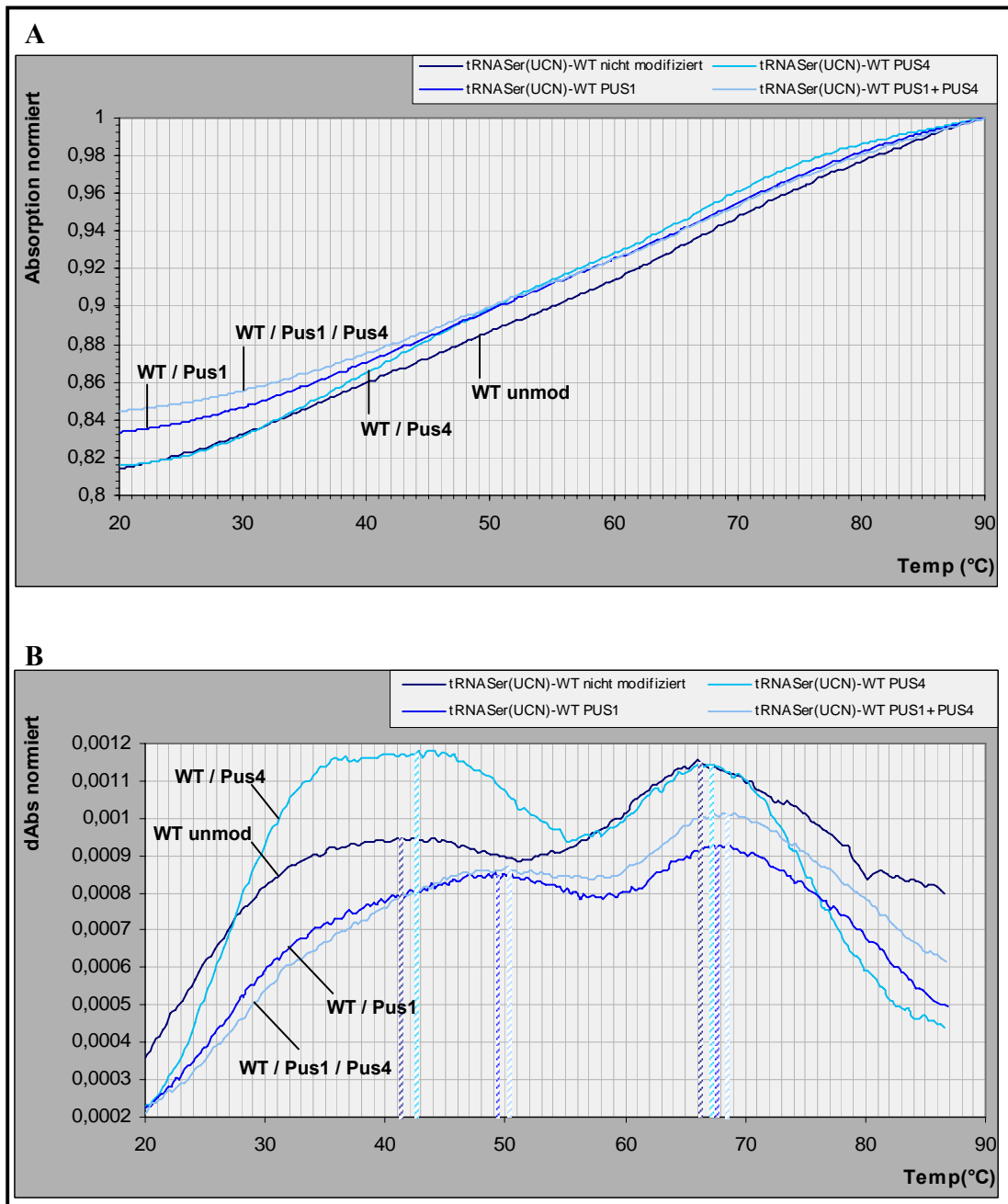


Abbildung 4.27: Vergleich der Schmelzkurven (A, C) und deren 1. Ableitung (B, D) von tRNA^{Ser(UCN)}-WT (A, B) und -G7497A Mutante (C, D) in Abhängigkeit von den Modifikationen. **WT unmod**, nicht modifiziertes WT Transkript ($T_{m1} = 37,6$ °C, $T_{m2} = 63,7$ °C); **WT/Pus1**, WT modifiziert mit Pus1 ($T_{m1} = 37,6$ °C, $T_{m2} = 61,2$ °C); **WT/Pus4**, WT modifiziert mit Pus4 ($T_{m1} = 37,6$ °C, $T_{m2} = 54,7$ °C); **WT/Pus1/Pus4**, WT modifiziert mit Pus1 und Pus4 ($T_{m1} = 38,9$ °C, $T_{m2} = 62,8$ °C); **G7497A unmod**, nicht modifiziertes G7497A Transkript ($T_m = 56,9$ °C); **G7497A/Pus1**, G7497A modifiziert mit Pus1 ($T_{m1} = 58,0$ °C); **G7497A/Pus4**, G7497A modifiziert mit Pus4 ($T_{m1} = 54,7$ °C); **G7497A/Pus1/Pus4**, G7497A modifiziert mit Pus1 und Pus4 ($T_{m1} = 56,9$ °C).

(Abbildung 4.27 fortgesetzt)



Um den Effekt der Na^+ -Konzentration auf die Stabilität der Struktur der modifizierten tRNAs zu untersuchen, wurde die Änderung der Schmelztemperatur in Abhängigkeit von 100 mM NaCl-Konzentration gemessen. Die negativ geladenen Phosphatrückgrate der Nukleinsäuren stoßen sich gegenseitig ab und führen somit zu einer Destabilisierung der Doppelhelix; man erhält damit die Erhöhung des T_m -Wertes [Puglisi and Tinoco, 1989]. Es wurde tatsächlich eine Erhöhung der T_m -Werte durch Zugabe von 100 mM NaCl beobachtet. Bei den nicht modifizierten tRNAs, sowohl bei dem WT als auch bei der Mutante, wurde die T_m um 3 bis 4 °C erhöht. Bei den mit Pus4 modifizierten Transkripten wurde sie um 5 bis 6 °C erhöht. Die Transkripte, die mit Pus1 oder beiden Enzymen modifiziert waren, zeigten eine Erhöhung des T_m -Wertes um 12 °C für den ersten Übergang beim WT und 5 bis 6 °C für den zweiten Übergang. Die Mutante zeigte ebenso eine Erhöhung des T_m -Wertes um 5 bis 6 °C (Abbildung 4.28).



(fortgesetzt)

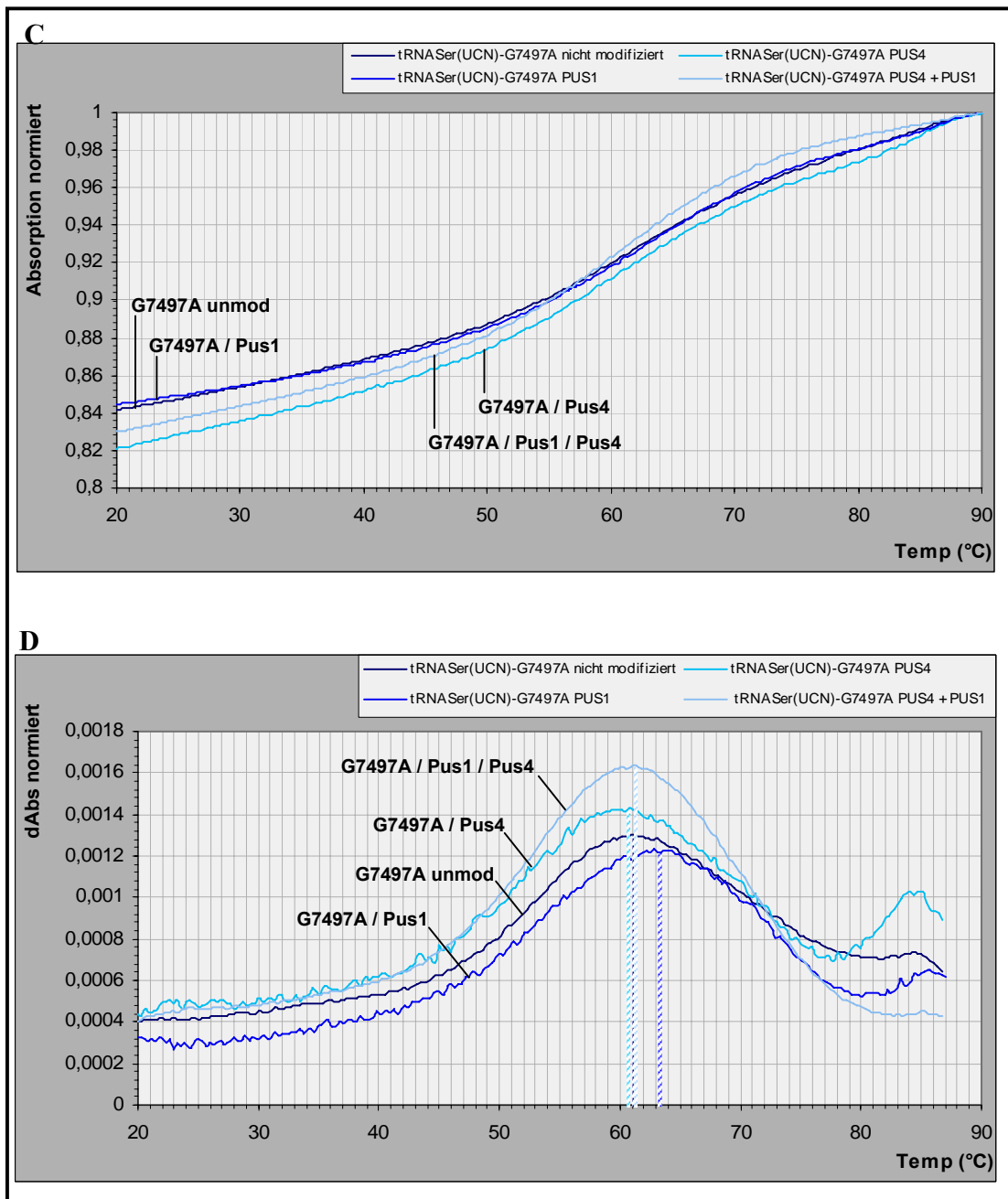


Abbildung 4.28: Vergleich der Schmelzkurven (A, C) und deren 1. Ableitung (B, D) von tRNA^{Ser(UCN)}-WT (A, B) und-G7497A Mutante (C, D) in Abhängigkeit von den Modifikationen bei der Anwesenheit von 1 mM MgCl₂ und 100 mM NaCl. **WT unmod**, nicht modifiziertes WT Transkript ($T_{m1} = 41,0$ °C, $T_{m2} = 66,2$ °C); **WT/Pus1**, WT modifiziert mit Pus1 ($T_{m1} = 42,6$ °C, $T_{m2} = 66,8$ °C); **WT/Pus4**, WT modifiziert mit Pus4 ($T_{m1} = 49,2$ °C, $T_{m2} = 67,8$ °C); **WT/Pus1/Pus4**, WT modifiziert mit Pus1 und Pus4 ($T_{m1} = 50,4$ °C, $T_{m2} = 68,4$ °C); **G7497A unmod**, nicht modifiziertes G7497A Transkript ($T_m = 61,0$ °C); **G7497A/Pus1**, G7497A modifiziert mit Pus1 ($T_{m1} = 60,8$ °C); **G7497A/Pus4**, G7497A modifiziert mit Pus4 ($T_{m1} = 63,4$ °C); **G7497A/Pus1/Pus4**, G7497A modifiziert mit Pus1 und Pus4 ($T_{m1} = 61,2$ °C).

Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die Modifikationen der tRNA^{Ser(UCN)} einen Einfluss auf das Laufverhalten in nativen Gelen zeigen.

Die Northern-Blot-Analysen der nativen tRNA^{Ser(UCN)} aus Osteosarcoma Zellen und *in vitro* Transkripten wurden durchgeführt. Die Sonde erzeugt sowohl bei den Transkripten als auch bei den nativen tRNAs Hybridisierungssignale (Abbildung 4.29). Bei der nativen tRNA der Mutante tritt nur eine Produktbande auf und legt eine längere Laufstrecke zurück. Beim WT treten zwei Produktbanden auf, die einen modifizierten und einen nicht modifizierten Zustand der tRNA beschreiben. Die zwei Banden bei den Transkripten der Mutante, die mit Pus1 bzw. mit Pus1 und Pus4 modifiziert wurde, sprechen sowohl für eine nicht modifizierte als auch eine teilmodifizierte tRNA.

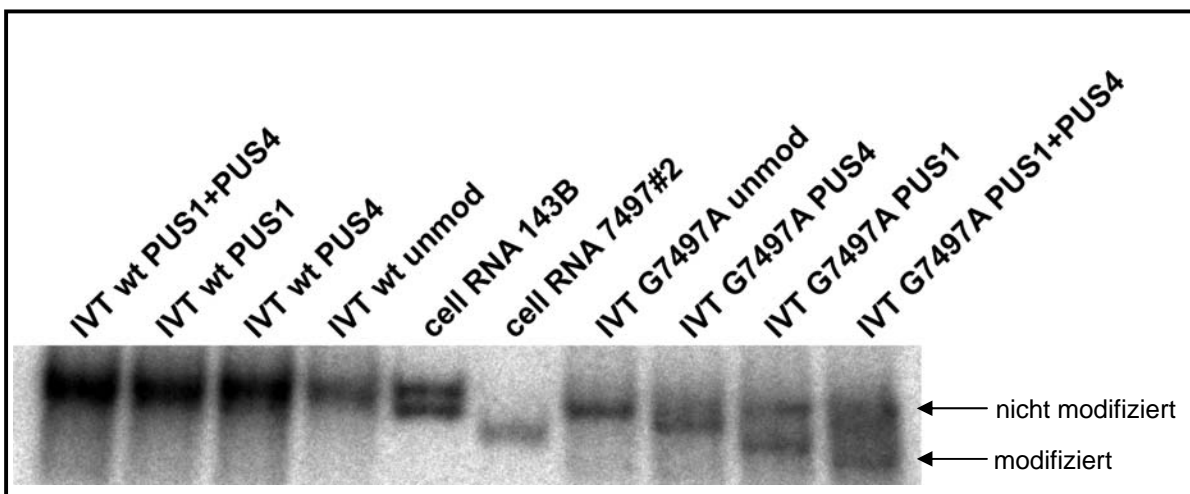


Abbildung 4.29: Untersuchung der tRNA^{Ser(UCN)}-Struktur mittels PAGE unter nativen Bedingungen. IVT, *in vitro* Transkript. Pus1, rekombinante Pseudouridin-tRNA-Synthase 1 aus Hefe. Pus4, rekombinante Pseudouridin-tRNA-Synthase 4 aus Hefe. 143B, tRNA^{Ser(UCN)}-WT nativ; 7497#2, G7497A Mutante nativ.

Die native PAGE zeigte mit den Schmelzkurvenanalysen vergleichbare Ergebnisse. Die Struktur der WT tRNA wird durch Modifikationen nicht stark beeinflusst, während bei der Mutante die Banden mit modifizierten Transkripten eine längere Strecke zurücklegen als die mit nicht modifizierten Transkripten.

4.10 Enzymatische Kartierung der modifizierten Transkripte

Für die Strukturanalyse wurden die *in vitro* Transkripte preparativ mit rekombinanten Enzymen modifiziert (2.13) und an dem 5'-Ende mit [α - 32 P]- γ ATP markiert (2.5.3).

Die enzymatische Kartierung der modifizierten Transkripte ergab im Verdauungsmuster zwischen den nicht modifizierten und mit rekombinanten Enzymen modifizierten Transkripten keinen Unterschied (Abbildung 4.30).

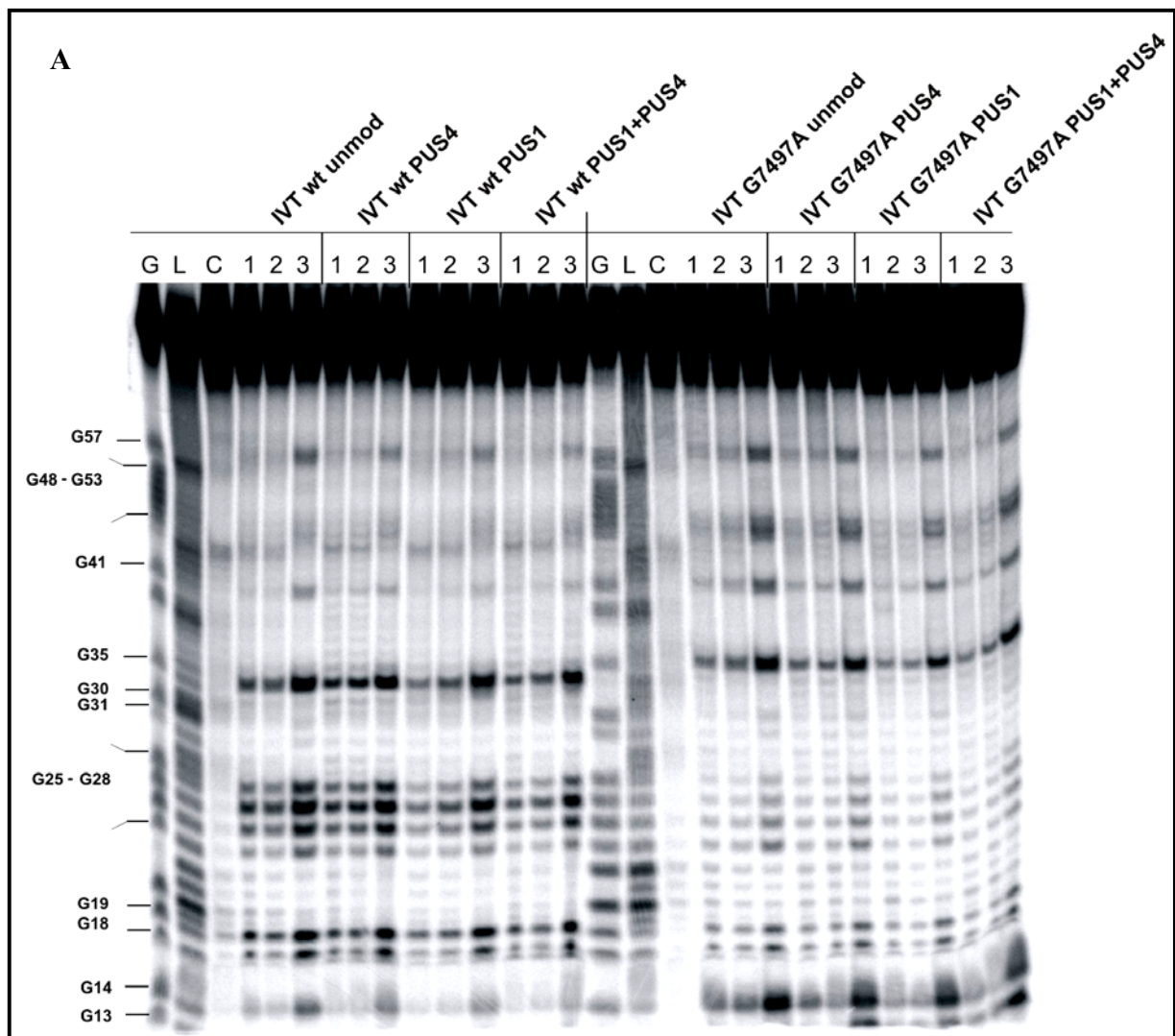
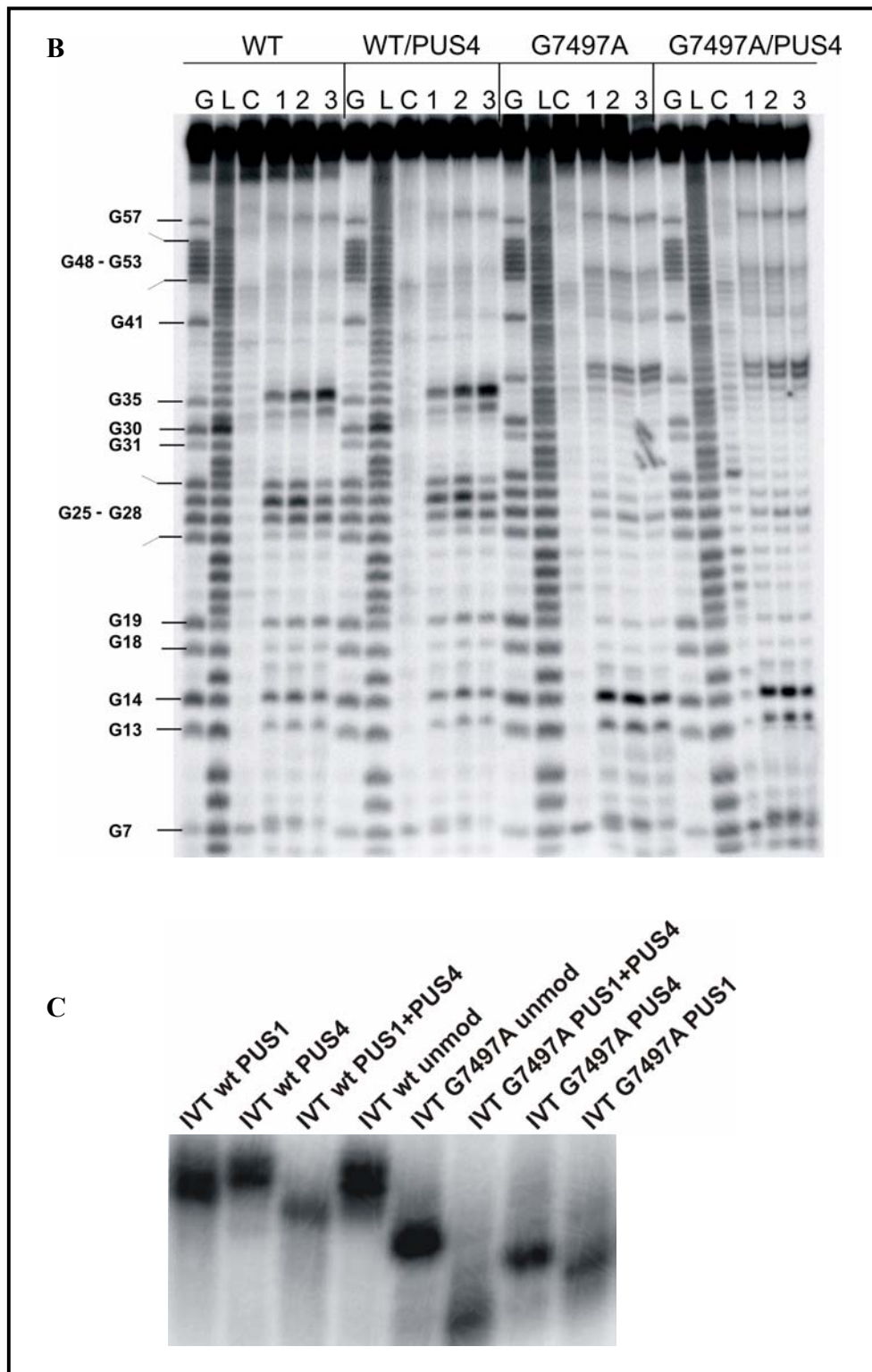


Abbildung 4.30: Enzymatische Kartierung der modifizierten Transkripte. Gelelektrophoretische Auftrennung der mit RNase T1 (**A**) und Nuklease S1 (**B**) gespaltenen Fragmente. (**C**) Natives Gel von 5'-markierten *in vitro* Transkripten. IVT, *in vitro* Transkript. Pus1, rekombinante Pseudouridin-tRNA-Synthase 1 aus Hefe. Pus4, rekombinante Pseudouridin-tRNA-Synthase 4 aus Hefe.

(Abbildung 4.30 fortgesetzt)



5 Diskussion

Mitochondriale Myopathien sind Erkrankungen mit einer Phänotypvielfalt, die durch strukturelle und funktionelle Störungen der Mitochondrien bedingt ist. Die Biochemie der Mitochondrien ist sehr komplex; sie reicht von dem Krebszyklus bis zu der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS). Die Pathophysiologie mitochondrialer Erkrankungen entsteht durch einen steigenden Funktionsverlust und durch den Tod der von Mutationen betroffenen Zellen. Im Zentrum steht dabei die Störung des OXPHOS-Systems und der damit verbundene Energieverlust, doch auch andere Faktoren wie erhöhter oxidativer Stress und ein reduzierter oder fehlerhafter Umsatz an mitochondrialen Proteinen tragen ebenfalls zum Krankheitsbild bei [Hao et al., 2002]. Die Ursache von mitochondrialen Funktionsstörungen können Defekte in nukleären oder mitochondrialen Genen sein. Heute sind neben mehr als 100 Deletionen, Duplikationen und Insertionen mehr als 80 verschiedene Punktmutationen im humanen mitochondrialen Genom beschrieben [Florentz et al., 2003]. Ein Großteil dieser Mutationen liegt in den Genen, die für tRNA-Moleküle kodieren, und der Einfluss der tRNA Struktur auf die Pathogenität wurde bereits mehrfach beschrieben [Wittenhagen and Kelley, 2003] [Sohm et al., 2003] [Wittenhagen and Kelley, 2003].

Die schnelle Zunahme der Kenntnisse über das menschliche Erbgut durch eine Vielzahl an neu entdeckten Gendefekten sowie deren Entstehungsmechanismen können zu neuen Diagnose- und Therapie-Verfahren von menschlichen Erkrankungen führen.

Die Stabilität der tRNA-Architektur hängt von tertiären Interaktionen zwischen der sogenannten „Core“-Region der tRNA ab [Giege et al., 1993] [Dirheimer et al., 1995]. Interaktionen zwischen tRNA und Ribosom verlangen eine ähnliche Struktur von allen tRNAs. Die einzelnen enzymatischen tRNA-Interaktionspartner, wie z.B. Aminoacylsynthetasen, benötigen jedoch feine Unterschiede in tRNAs für die korrekte Erkennung. Auch bei der posttranskriptionellen Modifikation von tRNAs spielt die Architektur der tRNA eine große Rolle [Grosjean et al., 1996] [Helm, 2006]. Die Modifikation einzelner Nukleoside in tRNAs stellt einen wichtigen Vorgang während der tRNA-Reifung *in vivo* dar. Das Fehlen von Modifikationen in tRNAs wirkt sich je nach tRNA-Spezies unterschiedlich aus. Die Struktur und Stabilität von tRNAs können durch Modifikationen beeinflusst werden.

Die Struktur der klassischen tRNAs ist in allen drei Reichen (Archaea, Eubakteria und Eukarya) hoch konserviert. Obwohl mitochondriale tRNAs zumeist eine kompakte kleeblattförmige

Struktur besitzen, unterscheiden sie sich von den klassischen tRNAs sowohl in ihren Stem- und Loop-Längen, als auch in ihrem Modifikationsniveau. Etwa ein Nukleotid von 8-10 Nukleotiden in cytosolischen tRNAs und nur eines von 17-18 Nukleotiden in mitochondrialen tRNAs von Säugern werden posttranskriptional modifiziert [Sprinzl and Vassilenko, 2005]. Durch zahlreiche nicht-Watson-Crick Basenpaare in den Stem-Regionen sind mitochondriale tRNAs instabiler als klassische.

Trotz vieler Kenntnisse über die tRNA-Struktur sind die Wechselwirkungen zwischen diesen tRNA Strukturelementen noch nicht vollständig aufgeklärt, und der Einfluß von modifizierten Nukleotiden in mitochondrialen tRNAs ist im Wesentlichen unerforscht. Das Ziel dieser Arbeit war es, durch Anwendung verschiedener biochemischer Methoden das Zusammenspiel von Nukleotidmodifikation und tRNA-Struktur vor dem Hintergrund pathogener Mutationen zu untersuchen. Im Detail wurden Transkripte der mitochondrialen tRNA^{Lys}, tRNA^{Leu(CUN)}, tRNA^{Gln} und tRNA^{Ser(UCN)} auf ihre Substrateigenschaften in einem *in vitro* Modifikationsassay mit mitochondrialem S-100 Extrakt aus HeLa Zellen getestet, und die Strukturen dieser Transkripte durch chemische und enzymatische Kartierung untersucht. Im besonderen Fall von tRNA^{Ser(UCN)} wurden weitergehende Untersuchungen durch UV-Schmelzkurven vor und nach präparativer Modifikation mit rekombinanten Pseudouridin-Synthasen aus *Saccharomyces cerevisiae* (scPus1p und scPus4p) durchgeführt. Von den erhaltenen Ergebnissen, die unten detailliert diskutiert werden, lassen sich allgemeine Erkenntnisse ableiten. Posttranskriptionelle Modifikationen spielen eine wichtige Rolle in der strukturellen und wahrscheinlich auch in der metabolischen Stabilität der tRNAs, wobei die Aktivität der Modifikationsenzyme durch Mutationen im Kernbereich der tRNA entscheidend verringert wird.

Zusammenhang zwischen posttranskriptioneller Modifikation und Struktur von humaner mitochondrialer tRNA^{Lys}

Eine extreme Variabilität des klinischen Bildes findet man bei der so genannten MERRF-Mutation an Position 8344 in der tRNA^{Lys}. Sie wurde zwar ursprünglich mit den definierten mitochondrialen Erkrankungsbildern assoziiert vorgefunden, konnte aber mittlerweile mit einer Reihe weitere Syndrome in Verbindung gebracht werden (myoklonische und tonisch-klonische Epilepsie, mitochondriale Myopathie, neurosensorischer Taubheit, Ataxie und Demenz). Studien der COX-Aktivität in Fibroblasten Zellen aus Patienten zeigten eine um 20 % reduzierte Aktivität von Cytochrom C Oxidase [Antonicka et al., 1999]. Die korrekte Faltung der tRNA^{Lys} ist von

posttranskriptioneller Modifikation abhängig [Helm et al., 1998] [Helm and Attardi, 2004]. Das unmodifizierte *in vitro* Transkript von tRNA^{Lys} faltet sich in eine alternative haarnadelähnliche Struktur. Die Methylierung des Adenins in der Position 9 stabilisiert die Kleeblattstruktur von tRNA^{Lys} (Abbildung 5.1).

Durch die Arbeitsgruppe von Attardi [Helm et al., 1999] wurde gezeigt, dass die tRNA^{Lys} in der humanen pT4 Zelllinie für die A8344G Mutante und in der pT3 Zelllinie für den WT im Gegensatz zu der tRNA^{Leu(UUR)} untermodifiziert war. Eine Erklärung dafür könnte die alternative Faltung der tRNA^{Lys} sein (Abbildung 5.1). Bei *in vitro* Transkripten dieser tRNA entsteht ein Gleichgewicht zwischen Species mit Haarnadel- bzw. Kleeblattstruktur. Die m¹A9 Modifikation verschiebt nur bei dem WT das Gleichgewicht in Richtung Kleeblattstruktur, nicht aber bei der Mutante (Voigts-Hoffmann, nicht publiziert). Auch die Schmelzpunkte der Mutante sind im Vergleich zu dem WT um etwa 3 °C in die Richtung geringerer Temperatur verschoben (T_{m1} = 56 °C, T_{m2} = 67 °C für WT und T_{m1} = 59 °C, T_{m2} = 70 °C für die Mutante) (Helm, nicht publiziert).

Nach Inkubation von tRNA^{Lys}-WT mit mitochondrialem Proteinextrakt wurden m¹A, m²G und Ψ detektiert. Bei tRNA^{Lys}-A8344G konnte zwar Ψ nachgewiesen werden, jedoch im Vergleich zum WT zu einem deutlich geringeren Prozentsatz. Die weiteren zwei Modifikationen m¹A und m²G waren sogar ausschließlich beim WT nachweisbar.

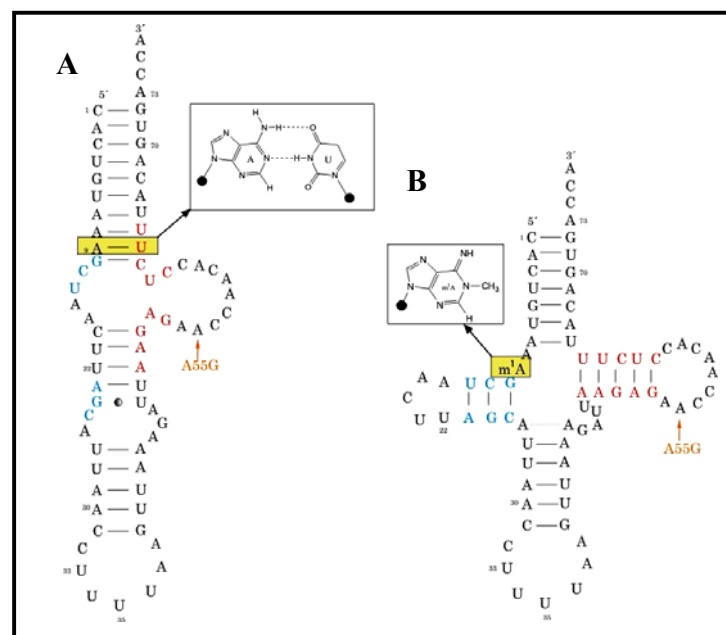


Abbildung 5.1: Zwei alternative Strukturen von tRNA^{Lys}-WT Transkript; (A) Haarnadelstruktur. (B) Kleeblattstruktur. Blau und rot kennzeichnen die D- bzw. T-Stem in der Kleeblattstruktur.

Zusammenhang zwischen posttranskriptioneller Modifikation und Struktur von humaner mitochondrialer tRNA^{Gln}

Eine weitere Mutation (T4336C), deren Pathogenität mit Parkinson in Zusammenhang gebracht wurde, befindet sich in einem Gen, welches für tRNA^{Gln} kodiert. Bei der posttranskriptionellen Modifikation mit mitochondrialem Extrakt wurde höhere Pseudouridin-Synthase-Aktivität bei Mutante nachgewiesen, obwohl die enzymatische und chemische Kartierung keinen eindeutigen Struktur-Unterschied zwischen dem WT und der Mutante ergab. Die Kartierungsdaten dokumentierten, dass die Transkripte von tRNA^{Gln}-WT und -T4336C Mutante in einer klassischen L-Struktur gefaltet sind.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine neue Modifikation m¹Ψ nachgewiesen werden, die aber wegen geringer Relevanz nicht weiter verfolgt wurde.

Zusammenhang zwischen posttranskriptioneller Modifikation und Struktur von humaner mitochondrialer tRNA^{Leu(CUN)}

Fu *et al.* [Fu *et al.*, 1996] berichteten 1996 von der neuen Mutation G12315A in der tRNA^{Leu(CUN)}, die mit CPEO und Taubheit in Verbindung gebracht wird. Ein Jahr später wurde von Weber *et al.* [Weber *et al.*, 1997] eine weitere Mutation (A12320G) in der tRNA^{Leu(CUN)} identifiziert. Die Analysen der Muskel- und Blutzellen sowie der Fibroblasten haben einen Defekt der Aktivität der Atmungskette nur in Muskelzellen gezeigt.

Mit Hilfe der chemischen und enzymatischen Kartierung konnte gezeigt werden, dass durch die Mutationen G12315A und A12320G Strukturänderungen von tRNA^{Leu(CUN)} bewirkt werden. Durch die G52A Transition im T-Stem wird die Tertiärstruktur instabiler, wohingegen die Transition A57G die tertiäre Interaktionen zwischen T- und D-Loop stabilisiert. Diese Aussage wurde durch Untersuchung des Schmelzverhaltens der tRNA-Transkripte unterstützt. Der Vergleich der Kurven zeigte einen deutlichen Unterschied in der tRNA-Struktur zwischen WT und beiden Mutanten. Die Schmelzpunkterniedrigung der G12315A Mutante und auch der steile Anstieg des ersten Überganges ist mit schwach ausgebildeten sekundären bzw. tertiären Strukturen, verursacht durch die G52A Mutation, zu begründen. Bei der A12320G Mutante entfalten sich die tertiären Bindungen später und dadurch verschiebt sich der T_m-Wert des zweiten Übergangs, an dem die Sekundärstrukturen schmelzen, um 3 °C. Dieser Befund lässt vermuten, dass die tRNA-Struktur der A12320G Mutante durch die A57G Transition kompakter wird als beim WT und die tRNA-Struktur von der G12315A Mutante durch die G52A Transition

instabiler ist als die des WT. Die Schmelzkurven-Daten stimmen mit den Befunden aus dem Spaltungsmuster des Nukleaseverdaus bzw. mit den Blei-Modifizierungsmustern überein, die ihrerseits bereits auf eine veränderte tRNA-Struktur hinwiesen.

Bei der Bestimmung der Modifikationseffizienzen konnte ein geringeres Modifikationsniveau bei beiden Mutanten detektiert werden. Nach Inkubation der tRNA-Transkripte mit mitochondrialem Proteinextrakt wurden in der tRNA^{Leu(CUN)} sowohl bei dem WT als auch bei den Mutanten zu Ψ modifizierte Us in den Positionen 27/28 detektiert, im WT jedoch zu einem signifikant höheren Prozentsatz. Unterschiedlich waren auch die Modifikationseffizienzen an der m¹A9 Position.

Zusammenhang zwischen posttranskriptioneller Modifikation und Struktur von humaner mitochondrialer tRNA^{Ser(UCN)}

Trotz des gesicherten Zusammenhangs zwischen der G7497A Mutation der mtDNA und dem klinischen Bild der progressiven Myoklonus-Epilepsie und Gehörlosigkeit [Jaksch et al., 1998] sind die Beziehungen zwischen Genotyp und Phänotyp noch nicht geklärt. Die Studien der pathogenen Punktmutationen G7497A und T7512C in dem tRNA^{Ser(UCN)}-Gen zeigten in Osteosarcoma Zellen eine reduzierte Menge zur Verfügung stehender funktioneller mt tRNAs auf 10 %, was zu einer Verminderung der Proteinsynthese um 40 % führt [Mollers et al., 2005].

Die native humane mitochondriale tRNA^{Ser(UCN)} wird posttranskriptional an fünf Positionen modifiziert. Wir vermuteten, dass die Verringerung der Proteinsynthese in G7497A und T7512C gegenüber den Kontrollzellen um etwa 68 % bzw. 58 % [Mollers et al., 2005] die Folge einer nicht ausreichenden Modifikation der tRNA war, die zu einem schnelleren Abbau der tRNA führt. Diese Hypothese wurde mit Hilfe der 2D-Dünnschichtchromatographie von posttranskriptionellen modifizierten und mit Nukleasen verdauten Transkripten unterstützt. So lag die Modifikationsrate der Mutanten um den Faktor 1,5 niedriger als beim WT.

Sowohl mit temperaturabhängiger chemischer und enzymatischer Kartierung als auch durch Schmelzkurvenanalyse konnten einige grundlegende Eigenschaften der Faltung von tRNA^{Ser(UCN)}-WT und Mutanten aufgeklärt werden.

Die Spaltfragmente von allen drei tRNAs mit T2-, S1- und V1-Kartierung zeigten keine eindeutigen Unterschiede im Verdauemuster im Vergleich zum T1-Verdau. Für die genaue Analyse der tRNA-Struktur wurde die T1 RNase Kartierung bei sechs verschiedenen Temperaturen durchgeführt (20, 25, 30, 35, 40 und 45 °C). In allen Fällen stimmten die Daten aus allen Messmethoden sehr gut überein, und wiesen auf einen deutlichen Unterschied in der

tRNA-Struktur hin. Offenbar ist ein gewisser Strukturanteil der tRNA^{Ser(UCN)}-G7497A noch stärker gefaltet, so dass die Struktur dadurch noch stärker stabilisiert ist. Diese Hypothese wurde mittels Schmelzkurvenanalyse bestätigt. Die humane mt tRNA^{Ser(UCN)}-WT durchläuft bei mäßiger Ionenstärke (100 mM Na⁺, 1 mM Mg²⁺) während des Schmelzens zwei definierte Übergänge. Dagegen ist bei der G7497A Mutante nur ein Übergang zu sehen, was bedeutet, dass die Tertiärstruktur der tRNA so kompakt vorliegt, dass sie gleichzeitig mit der Sekundärstruktur aufgelöst wird.

Weitere Hinweise auf eine kompaktere Struktur der G7497A Mutante wurden durch native Gelelektrophorese erhalten. Die Gelshift-Studien zeigten eindeutig, dass die C→U Transition zu einer Strukturänderung der G7497A Mutante führt und nicht aber die Transition A→G der T7512C.

G•U Basenpaare, die als Wobble-Paare bezeichnet werden, sind sehr oft vorkommende Basenpaare in tRNAs. Die humane mt tRNA^{Ser(UCN)}-WT enthält 6 G•U Basenpaare. Sie passen relativ gut in die Watson-Crick Geometrie der RNA-Helix (G(O6)...U(N3) und G(N1)...U(O2)) und erzeugen nur eine geringfügige Ausbuchtung des Phosphatrückgrates [Masquida et al., 1999]. Eine kleine Änderung der Geometrie des D-Armes also erfolgt durch die G22U Mutation und führt so variablen Loop und D-Arm der tRNA in räumliche Nähe zueinander, was eine tertiäre Wechselwirkung zwischen G46 und dem G13•U22 Basenpaar ermöglichen könnte. Es ist eine oft vorkommende Wechselwirkung in klassischen tRNAs, die man aber nicht mittels NMR von mt tRNA^{Ser(UCN)} aus Rind erhalten konnte [Watanabe et al., 1994].

Der Vergleich der tRNA^{Ser(UCN)}-Sequenz vom Menschen und von Menschenaffen ergaben hohe Homologien. So sind humane und Gorilla-Sequenz zu 97 % und humane und Orang-Utan Sequenz zu 93 % homolog. Die G46A Transition führte zu einer kompakteren Struktur der G7497A Mutante, was darauf hindeutet, dass eine Interaktion zwischen diesem Guanin und dem G13•U22 Basenpaar bestehen könnte. Dies könnte eine Erklärung für die längere Laufstrecke dieser Chimäre1 sein. Die Laufstrecken der Chimäre2 und der Orang-Utan-WT Transkripte entsprachen der humanen mitochondrialen Wildtyp-Laufstrecke. Die Kompensation der G22U Mutation durch zwei anderen Mutationen (A15G und C20U) deutet darauf hin, dass der beobachtete Gel-Shift Effekt der G7497A Mutante auf die veränderte tRNA-Struktur zurückzuführen ist.

Die Auswirkung der Mutation auf die Modifikationseffizienz ist bei der temperaturabhängigen Experimenten deutlich zu erkennen. Die Aktivität des Pus4 Enzyms ist bei der Mutante um 30 % herabgesetzt. Die T-Stem/-Loop Struktur der tRNA dient dem Pus4 Enzym als Erkennungsmerkmal für ihr tRNA-Substrat und wird so zur effizienten Pseudouridinylierung benötigt [Becker et al., 1997]. Durch temperaturabhängige Experimente der Enzymkinetiken konnte gezeigt werden, dass die G7497A Mutante ein schlechteres Substrat für das Pseudouridin Synthase Enzym darstellt. Die Aktivität des Enzyms kann durch ein G•U-Basenpaar am Ende der Helix des D-Armes entscheidend verringert werden. Man nimmt an, dass für eine optimale Funktion des Enzyms der D-Stem eine normale helikale Struktur ausbildet, die ihrerseits die Bildung der tertiären Struktur der tRNA beeinflusst.

Weitere Hinweise, die auf eine Abhängigkeit zwischen C22 Mutation und der posttranskriptionellen Modifikation der tRNA hindeuten, wurden bei der Durchführung von Aktivitätstests mit Pus1 und Pus4 Enzymen aus *Saccharomyces cerevisiae* erhalten. Der Vergleich mit Enzymkinetiken von *in vitro* synthetisierten tRNA-Transkripten zeigte, dass die C22U Mutation einen starken Einfluss auf die Erkennung sowohl durch humane mitochondriale Enzyme als auch durch rekombinante Hefe Pus4 und Pus1 Enzyme hat.

Die Stabilisierung der tRNA-Struktur durch Modifikation wurde bereits mit Hilfe von UV-Schmelzkurven von nativen tRNAs und unmodifizierten Transkripten von tRNA^{Ser(UCN)} aus Rind gezeigt [Hayashi et al., 1998]. Durch Schmelzkurven von teilmodifizierten und unmodifizierten Transkripten konnte dies bestätigt werden. Das Verfahren wurde mit modifizierten Transkripten durchgeführt, die durch posttranskriptionelle Modifikation mit rekombinante Pus1 oder/und Pus4 aus *S.cerevisiae* hergestellt wurden. Ein wichtiges Kriterium für die Schmelzkurvenanalyse stellt der Modifikationsgrad der zu untersuchenden tRNA-Moleküle dar. Die mittels Kapillarelektrophorese erhaltenen Werte (70 %) waren ausreichend für eine Vergleichsanalyse. Für eine Aussage über die Stabilität der tRNA-Transkripte wurde die Schmelztemperatur (T_m), als Temperatur bei der die Hälfte der Transkripte denaturierend vorliegt, bestimmt (Tabelle 4.6). Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte untersucht werden, ob die Modifikationen der tRNA^{Ser(UCN)} einen Einfluss auf das Laufverhalten der tRNAs in nativen Gelen haben. Bei den hier durchgeführten Hybridisierungsexperimenten wurden Ergebnisse erhalten, die einen eindeutigen Unterschied im Laufverhalten im nativen Gel zwischen dem WT und der G7497A Mutante zeigten. Im Fall der modifizierten Transkripte wurden zusätzliche Banden erhalten. Die

weniger weit gelaufene Bande entsprach dem nicht modifizierten Transkript und lag bei allen modifizierten Transkripten auf derselben Höhe wie das nicht modifizierte Transkript. Trotz Strukturunterschieden, die auf denaturierendem Gel zu sehen waren, ergab die enzymatische Kartierung der modifizierten Transkripte keinen Unterschied zu den nicht modifizierten.

Schlußfolgerung

Mitochondriale Enzephalomyopathien beruhen auf Störungen in der mitochondrialen Atmungskette. Die erste mitochondriale Myopathie wurde im Jahr 1962 beschrieben [Luft et al., 1962]. Seitdem sind über 150 Mutationen im humanen mitochondrialen Genom mit pathogener Auswirkung bekannt geworden [Florentz et al., 2003]. Mehr als die Hälfte dieser Mutationen liegen in den Genen, die für tRNA-Moleküle kodieren. Die klinischen Symptome sind unter anderem Schwerhörigkeit, Epilepsie und progressive Demenz. In der mitochondrialen DNA finden sich Punktmutationen und auch große Deletionen. Die häufigste Punktmutation ist die A3243G Mutation in tRNA^{Leu(UUR)}, die sich bei etwa 80 % der Patienten mit MELAS-Syndrom findet. Bei Patienten mit MERRF-Syndrom findet man in rund 80 % der Fälle die A8344G Mutation in tRNA^{Lys}.

Trotz vieler Kenntnisse über die tRNA-Struktur sind die Wechselwirkungen zwischen diesen tRNA Strukturelementen noch nicht vollständig aufgeklärt, und der Einfluß von modifizierten Nukleotiden ist in mitochondrialen tRNAs im Wesentlichen unerforscht.

Einen Zusammenhang zwischen der posttranskriptionellen Modifikation an der Wobble-Position von tRNAs und Pathogenität wurde schon gezeigt [Kirino et al., 2005]. In dieser Arbeit wurde Pathogenität unter einem anderen Aspekt von Modifikationen untersucht, und zwar dem, der Stabilität der tRNA-Struktur beeinflusst. Für eine optimale Funktion der Enzyme sind bestimmte Strukturen in der tRNA notwendig, die durch die Mutation verändert werden, und dadurch die Modifikationseffizienz beeinflussen. Hierbei kann man die verminderte Modifikationseffizienzen der Mutanten mit der Änderung der tRNA-Struktur erklären.

Damit wurde die Hypothese unterstützt, dass die meisten pathogenen Mutationen im Kernbereich der tRNA deren Struktur signifikant beeinflussen. Mit Ausnahme einer Mutation T4336C in tRNA^{Gln}, welche die Aktivität der Pseudouridin-Synthase im Vergleich zu dem Wildtyp erhöhte, zeigten die meisten pathogenen Mutationen eine Verringerung der Aktivität der Modifikationsenzymen.

6 Literaturverzeichnis

- Ahn, H.J., Kim, H.W., Yoon, H.J., Lee, B.I., Suh, S.W. and Yang, J.K. (2003) Crystal structure of tRNA(m1G37)methyltransferase: insights into tRNA recognition. *Embo J*, **22**, 2593-2603.
- Andachi, Y., Yamao, F., Muto, A. and Osawa, S. (1989) Codon recognition patterns as deduced from sequences of the complete set of transfer RNA species in *Mycoplasma capricolum*. Resemblance to mitochondria. *J Mol Biol*, **209**, 37-54.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. and Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-465.
- Andreu, A.L., Tanji, K., Bruno, C., Hadjigeorgiou, G.M., Sue, C.M., Jay, C., Ohnishi, T., Shanske, S., Bonilla, E. and DiMauro, S. (1999) Exercise intolerance due to a nonsense mutation in the mtDNA ND4 gene. *Ann Neurol*, **45**, 820-823.
- Antonicka, H., Floryk, D., Klement, P., Stratilova, L., Hermanska, J., Houstkova, H., Kalous, M., Drahota, Z., Zeman, J. and Houstek, J. (1999) Defective kinetics of cytochrome c oxidase and alteration of mitochondrial membrane potential in fibroblasts and cytoplasmic hybrid cells with the mutation for myoclonus epilepsy with ragged-red fibres ('MERRF') at position 8344 nt. *Biochem J*, **342 Pt 3**, 537-544.
- Arлуison, V., Hountondji, C., Robert, B. and Grosjean, H. (1998) Transfer RNA-pseudouridine synthetase Pus1 of *Saccharomyces cerevisiae* contains one atom of zinc essential for its native conformation and tRNA recognition. *Biochemistry*, **37**, 7268-7276.
- Ashraf, S.S., Sochacka, E., Cain, R., Guenther, R., Malkiewicz, A. and Agris, P.F. (1999) Single atom modification (O-->S) of tRNA confers ribosome binding. *Rna*, **5**, 188-194.
- Attardi, G. and Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu Rev Cell Biol*, **4**, 289-333.
- Auffinger, P. and Westhof, E. (1998) Simulations of the molecular dynamics of nucleic acids. *Curr Opin Struct Biol*, **8**, 227-236.
- Barrell, B.G., Anderson, S., Bankier, A.T., de Bruijn, M.H., Chen, E., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. and Young, I.G. (1980) Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 3164-3166.
- Becker, H.F., Motorin, Y., Planta, R.J. and Grosjean, H. (1997) The yeast gene YNL292w encodes a pseudouridine synthase (Pus4) catalyzing the formation of psi55 in both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 4493-4499.
- Behm-Ansmant, I., Massenet, S., Immel, F., Patton, J.R., Motorin, Y. and Branlant, C. (2006) A previously unidentified activity of yeast and mouse RNA:pseudouridine synthases 1 (Pus1p) on tRNAs. *Rna*, **12**, 1583-1593.
- Bereiter-Hahn, J. and Voth, M. (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech*, **27**, 198-219.
- Berk, A.J. and Sharp, P.A. (1977) Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids. *Cell*, **12**, 721-732.
- Berry, M.J., Tujebajeva, R.M., Copeland, P.R., Xu, X.M., Carlson, B.A., Martin, G.W., 3rd, Low, S.C., Mansell, J.B., Grundner-Culemann, E., Harney, J.W., Driscoll, D.M. and Hatfield, D.L. (2001) Selenocysteine incorporation directed from the 3'UTR: characterization of eukaryotic EFsec and mechanistic implications. *Biofactors*, **14**, 17-24.

- Bjork, G.R., Jacobsson, K., Nilsson, K., Johansson, M.J., Bystrom, A.S. and Persson, O.P. (2001) A primordial tRNA modification required for the evolution of life? *Embo J*, **20**, 231-239.
- Bonnefond, L., Fender, A., Rudinger-Thirion, J., Giege, R., Florentz, C. and Sissler, M. (2005) Toward the full set of human mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases: characterization of AspRS and TyrRS. *Biochemistry*, **44**, 4805-4816.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brandon, M.C., Lott, M.T., Nguyen, K.C., Spolim, S., Navathe, S.B., Baldi, P. and Wallace, D.C. (2005) MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. *Nucleic Acids Res*, **33**, D611-613.
- Breitschopf, K. and Gross, H.J. (1994) The exchange of the discriminator base A73 for G is alone sufficient to convert human tRNA(Leu) into a serine-acceptor in vitro. *Embo J*, **13**, 3166-3169.
- Brown, R.S., Dewan, J.C. and Klug, A. (1985) Crystallographic and biochemical investigation of the lead(II)-catalyzed hydrolysis of yeast phenylalanine tRNA. *Biochemistry*, **24**, 4785-4801.
- Brown, T.A. and Clayton, D.A. (2006) Genesis and wanderings: origins and migrations in asymmetrically replicating mitochondrial DNA. *Cell Cycle*, **5**, 917-921.
- Bullard, J.M., Cai, Y.C., Demeler, B. and Spremulli, L.L. (1999) Expression and characterization of a human mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol*, **288**, 567-577.
- Bullard, J.M., Cai, Y.C. and Spremulli, L.L. (2000) Expression and characterization of the human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase. *Biochim Biophys Acta*, **1490**, 245-258.
- Cabello-Villegas, J., Tworowska, I. and Nikonowicz, E.P. (2004) Metal ion stabilization of the U-turn of the A37 N6-dimethylallyl-modified anticodon stem-loop of Escherichia coli tRNAPhe. *Biochemistry*, **43**, 55-66.
- Cabello-Villegas, J., Winkler, M.E. and Nikonowicz, E.P. (2002) Solution conformations of unmodified and A(37)N(6)-dimethylallyl modified anticodon stem-loops of Escherichia coli tRNA(Phe). *J Mol Biol*, **319**, 1015-1034.
- Chambers, I., Frampton, J., Goldfarb, P., Affara, N., McBain, W. and Harrison, P.R. (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *Embo J*, **5**, 1221-1227.
- Chimnarong, S., Gravers Jeppesen, M., Suzuki, T., Nyborg, J. and Watanabe, K. (2005) Dual-mode recognition of noncanonical tRNAs(Ser) by seryl-tRNA synthetase in mammalian mitochondria. *Embo J*, **24**, 3369-3379.
- Chimnarong, S., Jeppesen, M.G., Shimada, N., Suzuki, T., Nyborg, J. and Watanabe, K. (2004) Crystallization and preliminary X-ray diffraction study of mammalian mitochondrial seryl-tRNA synthetase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **60**, 1319-1322.
- Clayton, D.A. (2000) Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Hum Reprod*, **15** Suppl 2, 11-17.
- Clayton, D.A. (2003) Mitochondrial DNA replication: what we know. *IUBMB Life*, **55**, 213-217.
- Comi, G.P., Bordoni, A., Salani, S., Franceschina, L., Sciacco, M., Prella, A., Fortunato, F., Zeviani, M., Napoli, L., Bresolin, N., Moggio, M., Ausenda, C.D., Taanman, J.W. and Scarlato, G. (1998) Cytochrome c oxidase subunit I microdeletion in a patient with motor neuron disease. *Ann Neurol*, **43**, 110-116.
- Croteau, D.L., Stierum, R.H. and Bohr, V.A. (1999) Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat Res*, **434**, 137-148.
- Cusack, S. (1995) Eleven down and nine to go. *Nat Struct Biol*, **2**, 824-831.

- de Bruijn, M.H., Schreier, P.H., Eperon, I.C., Barrell, B.G., Chen, E.Y., Armstrong, P.W., Wong, J.F. and Roe, B.A. (1980) A mammalian mitochondrial serine transfer RNA lacking the "dihydrouridine" loop and stem. *Nucleic Acids Res*, **8**, 5213-5222.
- Dirheimer, G., Keith, G., Dumas, P. and Westhof, E. (1995) Primary, secondary, and tertiary structures of tRNAs. *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function*, 93-126.
- Edland, S.D., Tobe, V.O., Rieder, M.J., Bowen, J.D., McCormick, W., Teri, L., Schellenberg, G.D., Larson, E.B., Nickerson, D.A. and Kukull, W.A. (2002) Mitochondrial genetic variants and Alzheimer disease: a case-control study of the T4336C and G5460A variants. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, **16**, 1-7.
- Evans, W.J. (1995) What is sarcopenia? *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, **50 Spec No**, 5-8.
- Fechter, P., Rudinger, J., Giege, R. and Theobald-Dietrich, A. (1998) Ribozyme processed tRNA transcripts with unfriendly internal promoter for T7 RNA polymerase: production and activity. *FEBS Lett*, **436**, 99-103.
- Fernandez-Vizarra, E., Berardinelli, A., Valente, L., Tiranti, V. and Zeviani, M. (2006) Nonsense mutation in pseudouridylate synthase 1 (PUS1) in two brothers affected by myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia (MLASA). *J Med Genet*.
- Florentz, C., Sohm, B., Tryoen-Toth, P., Putz, J. and Sissler, M. (2003) Human mitochondrial tRNAs in health and disease. *Cell Mol Life Sci*, **60**, 1356-1375.
- Fries, J.F. (1980) Aging, natural death, and the compression of morbidity. *N Engl J Med*, **303**, 130-135.
- Fu, K., Hartlen, R., Johns, T., Genge, A., Karpati, G. and Shoubridge, E.A. (1996) A novel heteroplasmic tRNA^{Leu}(CUN) mtDNA point mutation in a sporadic patient with mitochondrial encephalomyopathy segregates rapidly in skeletal muscle and suggests an approach to therapy. *Hum Mol Genet*, **5**, 1835-1840.
- Fukai, S., Nureki, O., Sekine, S., Shimada, A., Tao, J., Vassilyev, D.G. and Yokoyama, S. (2000) Structural basis for double-sieve discrimination of L-valine from L-isoleucine and L-threonine by the complex of tRNA(Val) and valyl-tRNA synthetase. *Cell*, **103**, 793-803.
- Gattermann, N., Retzlaff, S., Wang, Y.L., Hofhaus, G., Heinisch, J., Aul, C. and Schneider, W. (1997) Heteroplasmic point mutations of mitochondrial DNA affecting subunit I of cytochrome c oxidase in two patients with acquired idiopathic sideroblastic anemia. *Blood*, **90**, 4961-4972.
- Giege, R., Florentz, C. and Dreher, T.W. (1993) The TYMV tRNA-like structure. *Biochimie*, **75**, 569-582.
- Giege, R., Sissler, M. and Florentz, C. (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res*, **26**, 5017-5035.
- Giles, R.E., Blanc, H., Cann, H.M. and Wallace, D.C. (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 6715-6719.
- Goto, Y., Nonaka, I. and Horai, S. (1990) A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, **348**, 651-653.
- Gray, M.W. (1989) Origin and evolution of mitochondrial DNA. *Annu Rev Cell Biol*, **5**, 25-50.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, **283**, 1476-1481.
- Green, D.R. and Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.
- Grosjean, H. (2005) Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*, 26-45.
- Grosjean, H., Edqvist, J., Straby, K.B. and Giege, R. (1996) Enzymatic formation of modified nucleosides in tRNA: dependence on tRNA architecture. *J Mol Biol*, **255**, 67-85.

- Hao, B., Gong, W., Ferguson, T.K., James, C.M., Krzycki, J.A. and Chan, M.K. (2002) A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. *Science*, **296**, 1462-1466.
- Hao, H., Bonilla, E., Manfredi, G., DiMauro, S. and Moraes, C.T. (1995) Segregation patterns of a novel mutation in the mitochondrial tRNA glutamic acid gene associated with myopathy and diabetes mellitus. *Am J Hum Genet*, **56**, 1017-1025.
- Hayashi, I., Kawai, G. and Watanabe, K. (1998) Higher-order structure and thermal instability of bovine mitochondrial tRNA^{SerUGA} investigated by proton NMR spectroscopy. *J Mol Biol*, **284**, 57-69.
- Hayashi, I., Yokogawa, T., Kawai, G., Ueda, T., Nishikawa, K. and Watanabe, K. (1997) Assignment of imino proton signals of G-C base pairs and magnesium ion binding: an NMR study of bovine mitochondrial tRNA(SerGCU) lacking the entire D arm. *J Biochem (Tokyo)*, **121**, 1115-1122.
- Helm, M. (2006) Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic Acids Res*, **34**, 721-733.
- Helm, M. and Attardi, G. (2004) Nuclear control of cloverleaf structure of human mitochondrial tRNA(Lys). *J Mol Biol*, **337**, 545-560.
- Helm, M., Brule, H., Degoul, F., Capanec, C., Leroux, J.P., Giege, R. and Florentz, C. (1998) The presence of modified nucleotides is required for cloverleaf folding of a human mitochondrial tRNA. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1636-1643.
- Helm, M., Brule, H., Friede, D., Giege, R., Putz, D. and Florentz, C. (2000) Search for characteristic structural features of mammalian mitochondrial tRNAs. *Rna*, **6**, 1356-1379.
- Helm, M., Giege, R. and Florentz, C. (1999) A Watson-Crick base-pair-disrupting methyl group (m1A9) is sufficient for cloverleaf folding of human mitochondrial tRNA^{Lys}. *Biochemistry*, **38**, 13338-13346.
- Hermann, G.J. and Shaw, J.M. (1998) Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 265-303.
- Holbrook, S.R., Sussman, J.L., Warrant, R.W., Church, G.M. and Kim, S.H. (1977) RNA-ligand interactions. (I) Magnesium binding sites in yeast tRNA^{Phe}. *Nucleic Acids Res*, **4**, 2811-2820.
- Hollenbeck, P.J. (1996) The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci*, **1**, d91-102.
- Holt, I.J., Harding, A.E. and Morgan-Hughes, J.A. (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, **331**, 717-719.
- Holt, I.J., Harding, A.E., Petty, R.K. and Morgan-Hughes, J.A. (1990) A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet*, **46**, 428-433.
- Hou, Y.M. (1997) Discriminating among the discriminator bases of tRNAs. *Chem Biol*, **4**, 93-96.
- Hou, Y.M. and Schimmel, P. (1988) A simple structural feature is a major determinant of the identity of a transfer RNA. *Nature*, **333**, 140-145.
- Huang, Z. and Szostak, J.W. (1996) A simple method for 3'-labeling of RNA. *Nucleic Acids Res*, **24**, 4360-4361.
- Hutchin, T.P., Parker, M.J., Young, I.D., Davis, A.C., Pulleyn, L.J., Deeble, J., Lench, N.J., Markham, A.F. and Mueller, R.F. (2000) A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Ser(UCN)) gene in a family with non-syndromic sensorineural hearing impairment. *J Med Genet*, **37**, 692-694.
- Ishitani, R., Nureki, O., Nameki, N., Okada, N., Nishimura, S. and Yokoyama, S. (2003) Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a posttranscriptional modification enzyme. *Cell*, **113**, 383-394.

- Jacobs, H.T., Hutchin, T.P., Kappi, T., Gillies, G., Minkkinen, K., Walker, J., Thompson, K., Rovio, A.T., Carella, M., Melchionda, S., Zelante, L., Gasparini, P., Pyykko, I., Shah, Z.H., Zeviani, M. and Mueller, R.F. (2005) Mitochondrial DNA mutations in patients with postlingual, nonsyndromic hearing impairment. *Eur J Hum Genet*, **13**, 26-33.
- Jaksch, M., Klopstock, T., Kurlemann, G., Dorner, M., Hofmann, S., Kleinle, S., Hegemann, S., Weissert, M., Muller-Hocker, J., Pongratz, D. and Gerbitz, K.D. (1998) Progressive myoclonus epilepsy and mitochondrial myopathy associated with mutations in the tRNA(Ser(UCN)) gene. *Ann Neurol*, **44**, 635-640.
- Jakubowski, H. (1996) Proofreading in trans by an aminoacyl-tRNA synthetase: a model for single site editing by isoleucyl-tRNA synthetase. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2505-2510.
- Janssen, R.J., Nijtmans, L.G., Heuvel, L.P. and Smeitink, J.A. (2006) Mitochondrial complex I: Structure, function and pathology. *J Inherit Metab Dis*.
- Jarrous, N. and Altman, S. (2001) Human ribonuclease P. *Methods Enzymol*, **342**, 93-100.
- Jorgensen, R., Sogaard, T.M., Rossing, A.B., Martensen, P.M. and Justesen, J. (2000) Identification and characterization of human mitochondrial tryptophanyl-tRNA synthetase. *J Biol Chem*, **275**, 16820-16826.
- Kameoka, K., Isotani, H., Tanaka, K., Azukari, K., Fujimura, Y., Shiota, Y., Sasaki, E., Majima, M., Furukawa, K., Haginomori, S., Kitaoka, H. and Ohsawa, N. (1998) Novel mitochondrial DNA mutation in tRNA(Lys) (8296A-->G) associated with diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**, 523-527.
- Kasamatsu, H., Robberson, D.L. and Vinograd, J. (1971) A novel closed-circular mitochondrial DNA with properties of a replicating intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **68**, 2252-2257.
- Keightley, J.A., Hoffbuhr, K.C., Burton, M.D., Salas, V.M., Johnston, W.S., Penn, A.M., Buist, N.R. and Kennaway, N.G. (1996) A microdeletion in cytochrome c oxidase (COX) subunit III associated with COX deficiency and recurrent myoglobinuria. *Nat Genet*, **12**, 410-416.
- Keith, G. (1995) Mobilities of modified ribonucleotides on two-dimensional cellulose thin-layer chromatography. *Biochimie*, **77**, 142-144.
- Kim, S.H., Suddath, F.L., Quigley, G.J., McPherson, A., Sussman, J.L., Wang, A.H., Seeman, N.C. and Rich, A. (1974) Three-dimensional tertiary structure of yeast phenylalanine transfer RNA. *Science*, **185**, 435-440.
- Kirino, Y., Goto, Y., Campos, Y., Arenas, J. and Suzuki, T. (2005) Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 7127-7132.
- Kogelnik, A.M., Lott, M.T., Brown, M.D., Navathe, S.B. and Wallace, D.C. (1996) MITOMAP: a human mitochondrial genome database. *Nucleic Acids Res*, **24**, 177-179.
- Kozlov, A.V., Staniek, K. and Nohl, H. (1999) Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett*, **454**, 127-130.
- Krasilnikov, A.S., Yang, X., Pan, T. and Mondragon, A. (2003) Crystal structure of the specificity domain of ribonuclease P. *Nature*, **421**, 760-764.
- Lafontaine, D.L., Bousquet-Antonelli, C., Henry, Y., Caizergues-Ferrer, M. and Tollervey, D. (1998) The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes Dev*, **12**, 527-537.
- Langford, G.M. (1995) Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 82-88.

- Lee, H.C., Yin, P.H., Lu, C.Y., Chi, C.W. and Wei, Y.H. (2000) Increase of mitochondria and mitochondrial DNA in response to oxidative stress in human cells. *Biochem J*, **348 Pt 2**, 425-432.
- Leontis, N.B., Stombaugh, J. and Westhof, E. (2002) The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Res*, **30**, 3497-3531.
- Leontis, N.B. and Westhof, E. (2001) Geometric nomenclature and classification of RNA base pairs. *Rna*, **7**, 499-512.
- Levinger, L., Morl, M. and Florentz, C. (2004) Mitochondrial tRNA 3' end metabolism and human disease. *Nucleic Acids Res*, **32**, 5430-5441.
- Li, F., Xiong, Y., Wang, J., Cho, H.D., Tomita, K., Weiner, A.M. and Steitz, T.A. (2002) Crystal structures of the *Bacillus stearothermophilus* CCA-adding enzyme and its complexes with ATP or CTP. *Cell*, **111**, 815-824.
- Li, R., Greinwald, J.H., Jr., Yang, L., Choo, D.I., Wenstrup, R.J. and Guan, M.X. (2004) Molecular analysis of the mitochondrial 12S rRNA and tRNA^{Ser}(UCN) genes in paediatric subjects with non-syndromic hearing loss. *J Med Genet*, **41**, 615-620.
- Lill, R. and Kispal, G. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, **25**, 352-356.
- Limbach, P.A., Crain, P.F. and McCloskey, J.A. (1994) Summary: the modified nucleosides of RNA. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2183-2196.
- Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L. and Afzelius, B. (1962) A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest*, **41**, 1776-1804.
- Marcelino, L.A. and Thilly, W.G. (1999) Mitochondrial mutagenesis in human cells and tissues. *Mutat Res*, **434**, 177-203.
- Marck, C. and Grosjean, H. (2002) tRNomics: analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. *Rna*, **8**, 1189-1232.
- Marquez, V., Wilson, D.N., Tate, W.P., Triana-Alonso, F. and Nierhaus, K.H. (2004) Maintaining the ribosomal reading frame: the influence of the E site during translational regulation of release factor 2. *Cell*, **118**, 45-55.
- Masquida, B., Sauter, C. and Westhof, E. (1999) A sulfate pocket formed by three GoU pairs in the 0.97 Å resolution X-ray structure of a nonameric RNA. *Rna*, **5**, 1384-1395.
- Masquida, B. and Westhof, E. (2000) On the wobble GoU and related pairs. *Rna*, **6**, 9-15.
- Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W. and Uhlenbeck, O.C. (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res*, **15**, 8783-8798.
- Mollers, M., Maniura-Weber, K., Kiseljakovic, E., Bust, M., Hayrapetyan, A., Jaksch, M., Helm, M., Wiesner, R.J. and von Kleist-Retzow, J.C. (2005) A new mechanism for mtDNA pathogenesis: impairment of post-transcriptional maturation leads to severe depletion of mitochondrial tRNA^{Ser}(UCN) caused by T7512C and G7497A point mutations. *Nucleic Acids Res*, **33**, 5647-5658.
- Morton, C.C. (2002) Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum Mol Genet*, **11**, 1229-1240.
- Mudge, S.J., Williams, J.H., Eyre, H.J., Sutherland, G.R., Cowan, P.J. and Power, D.A. (1998) Complex organisation of the 5'-end of the human glycine tRNA synthetase gene. *Gene*, **209**, 45-50.

- Muller-Hocker, J. (1989) Cytochrome-c-oxidase deficient cardiomyocytes in the human heart--an age-related phenomenon. A histochemical ultracytochemical study. *Am J Pathol*, **134**, 1167-1173.
- Muller-Hocker, J. (1992) Mitochondria and ageing. *Brain Pathol*, **2**, 149-158.
- Nagaike, T., Suzuki, T., Tomari, Y., Takemoto-Hori, C., Negayama, F., Watanabe, K. and Ueda, T. (2001) Identification and characterization of mammalian mitochondrial tRNA nucleotidyltransferases. *J Biol Chem*, **276**, 40041-40049.
- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H. and Hirokawa, N. (1994) KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell*, **79**, 1209-1220.
- Nichols, R.C., Raben, N., Boerkoel, C.F. and Plotz, P.H. (1995) Human isoleucyl-tRNA synthetase: sequence of the cDNA, alternative mRNA splicing, and the characteristics of an unusually long C-terminal extension. *Gene*, **155**, 299-304.
- Numata, T., Ishimatsu, I., Kakuta, Y., Tanaka, I. and Kimura, M. (2004) Crystal structure of archaeal ribonuclease P protein Ph1771p from *Pyrococcus horikoshii* OT3: an archaeal homolog of eukaryotic ribonuclease P protein Rpp29. *Rna*, **10**, 1423-1432.
- O'Hanlon, T.P. and Miller, F.W. (2002) Genomic organization, transcriptional mapping, and evolutionary implications of the human bi-directional histidyl-tRNA synthetase locus (HARS/HARSL). *Biochem Biophys Res Commun*, **294**, 609-614.
- O'Hanlon, T.P., Raben, N. and Miller, F.W. (1995) A novel gene oriented in a head-to-head configuration with the human histidyl-tRNA synthetase (HRS) gene encodes an mRNA that predicts a polypeptide homologous to HRS. *Biochem Biophys Res Commun*, **210**, 556-566.
- Okabe, M., Tomita, K., Ishitani, R., Ishii, R., Takeuchi, N., Arisaka, F., Nureki, O. and Yokoyama, S. (2003) Divergent evolutions of trinucleotide polymerization revealed by an archaeal CCA-adding enzyme structure. *Embo J*, **22**, 5918-5927.
- Palade, G.E. (1953) An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem*, **1**, 188-211.
- Park, S.J., Hou, Y.M. and Schimmel, P. (1989) A single base pair affects binding and catalytic parameters in the molecular recognition of a transfer RNA. *Biochemistry*, **28**, 2740-2746.
- Patton, J.R., Bykhovskaya, Y., Mengesha, E., Bertolotto, C. and Fischel-Ghodsian, N. (2005) Mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA): missense mutation in the pseudouridine synthase 1 (PUS1) gene is associated with the loss of tRNA pseudouridylation. *J Biol Chem*, **280**, 19823-19828.
- Peattie, D.A. and Gilbert, W. (1980) Chemical probes for higher-order structure in RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 4679-4682.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. and Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature*, **258**, 598-599.
- Puglisi, J.D. and Tinoco, I., Jr. (1989) Absorbance melting curves of RNA. *Methods Enzymol*, **180**, 304-325.
- Puranam, R.S. and Attardi, G. (2001) The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol Cell Biol*, **21**, 548-561.
- R. Giege, M.H., and C.Florentz. (2001) *Classical and Novel Chemical Tools for RNA Structure Probing*. Pergamon Press, Oxford.
- Robertus, J.D., Ladner, J.E., Finch, J.T., Rhodes, D., Brown, R.S., Clark, B.F. and Klug, A. (1974) Structure of yeast phenylalanine tRNA at 3 Å resolution. *Nature*, **250**, 546-551.

- Rogg, H., Brambilla, R., Keith, G. and Staehelin, M. (1976) An improved method for the separation and quantitation of the modified nucleosides of transfer RNA. *Nucleic Acids Res*, **3**, 285-295.
- Romby, P., Carbon, P., Westhof, E., Ehresmann, C., Ebel, J.P., Ehresmann, B. and Giege, R. (1987) Importance of conserved residues for the conformation of the T-loop in tRNAs. *J Biomol Struct Dyn*, **5**, 669-687.
- Rossmannith, W., Tullo, A., Potuschak, T., Karwan, R. and Sbisà, E. (1995) Human mitochondrial tRNA processing. *J Biol Chem*, **270**, 12885-12891.
- Rother, M., Wilting, R., Commans, S. and Bock, A. (2000) Identification and characterisation of the selenocysteine-specific translation factor SelB from the archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J Mol Biol*, **299**, 351-358.
- Rotig, A. and Munnich, A. (2003) Genetic features of mitochondrial respiratory chain disorders. *J Am Soc Nephrol*, **14**, 2995-3007.
- Rould, M.A., Perona, J.J. and Steitz, T.A. (1991) Structural basis of anticodon loop recognition by glutamyl-tRNA synthetase. *Nature*, **352**, 213-218.
- Rozenski, J., Crain, P.F. and McCloskey, J.A. (1999) The RNA Modification Database: 1999 update. *Nucleic Acids Res*, **27**, 196-197.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Schapira, A.H. (1999) Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta*, **1410**, 159-170.
- Schiffer, S., Rosch, S. and Marchfelder, A. (2003) Recombinant RNase Z does not recognize CCA as part of the tRNA and its cleavage efficiency is influenced by acceptor stem length. *Biol Chem*, **384**, 333-342.
- Schmiedel, J., Jackson, S., Schafer, J. and Reichmann, H. (2003) Mitochondrial cytopathies. *J Neurol*, **250**, 267-277.
- Schwartz, M. and Vissing, J. (2002) Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*, **347**, 576-580.
- Shen, N., Guo, L., Yang, B., Jin, Y. and Ding, J. (2006) Structure of human tryptophanyl-tRNA synthetase in complex with tRNA^{Trp} reveals the molecular basis of tRNA recognition and specificity. *Nucleic Acids Res*, **34**, 3246-3258.
- Shiba, K., Schimmel, P., Motegi, H. and Noda, T. (1994) Human glycyl-tRNA synthetase. Wide divergence of primary structure from bacterial counterpart and species-specific aminoacylation. *J Biol Chem*, **269**, 30049-30055.
- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. and Ames, B.N. (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10771-10778.
- Shoffner, J.M., Lott, M.T., Lezza, A.M., Seibel, P., Ballinger, S.W. and Wallace, D.C. (1990) Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell*, **61**, 931-937.
- Simon, D.K. and Johns, D.R. (1999) Mitochondrial disorders: clinical and genetic features. *Annu Rev Med*, **50**, 111-127.
- Sohm, B., Frugier, M., Brule, H., Olszak, K., Przykorska, A. and Florentz, C. (2003) Towards understanding human mitochondrial leucine aminoacylation identity. *J Mol Biol*, **328**, 995-1010.
- Sprinzl, M., Horn, C., Brown, M., Ioudovitch, A. and Steinberg, S. (1998) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res*, **26**, 148-153.

- Sprinzi, M. and Vassilenko, K.S. (2005) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res*, **33**, D139-140.
- Srinivasan, G., James, C.M. and Krzycki, J.A. (2002) Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science*, **296**, 1459-1462.
- Steinberg, S. and Cedergren, R. (1994) Structural compensation in atypical mitochondrial tRNAs. *Nat Struct Biol*, **1**, 507-510.
- Steinberg, S., Leclerc, F. and Cedergren, R. (1997) Structural rules and conformational compensations in the tRNA L-form. *Journal of Molecular Biology*, **266**, 269-282.
- Stuart, J.W., Gdaniec, Z., Guenther, R., Marszalek, M., Sochacka, E., Malkiewicz, A. and Agris, P.F. (2000) Functional anticodon architecture of human tRNA^{Lys3} includes disruption of intraloop hydrogen bonding by the naturally occurring amino acid modification, t6A. *Biochemistry*, **39**, 13396-13404.
- Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., Su, D., Bartlam, M. and Rao, Z. (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, **121**, 1043-1057.
- Sundaram, M., Durant, P.C. and Davis, D.R. (2000) Hypermodified nucleosides in the anticodon of tRNA(Lys) stabilize a canonical U-turn structure. *Biochemistry*, **39**, 15652.
- Szymanski, M., Deniziak, M.A. and Barciszewski, J. (2001) Aminoacyl-tRNA synthetases database. *Nucleic Acids Res*, **29**, 288-290.
- Taanman, J.W. (1997) Human cytochrome c oxidase: structure, function, and deficiency. *J Bioenerg Biomembr*, **29**, 151-163.
- Tarnopolsky, M.A., Maguire, J., Myint, T., Applegarth, D. and Robinson, B.H. (1998) Clinical, physiological, and histological features in a kindred with the T3271C melas mutation. *Muscle Nerve*, **21**, 25-33.
- Tolkunova, E., Park, H., Xia, J., King, M.P. and Davidson, E. (2000) The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual alternative splicing of the primary transcript. *J Biol Chem*, **275**, 35063-35069.
- Truscott, K.N., Brandner, K. and Pfanner, N. (2003) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol*, **13**, R326-337.
- Valnot, I., Kassis, J., Chretien, D., de Lonlay, P., Parfait, B., Munnich, A., Kachaner, J., Rustin, P. and Rotig, A. (1999) A mitochondrial cytochrome b mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome c reductase (complex III) deficiency. *Hum Genet*, **104**, 460-466.
- van den Ouweland, J.M., Lemkes, H.H., Ruitenbeek, W., Sandkuijl, L.A., de Vijlder, M.F., Struyvenberg, P.A., van de Kamp, J.J. and Maassen, J.A. (1992) Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet*, **1**, 368-371.
- Veltri, K.L., Espiritu, M. and Singh, G. (1990) Distinct genomic copy number in mitochondria of different mammalian organs. *J Cell Physiol*, **143**, 160-164.
- Vogel, A., Schilling, O., Spath, B. and Marchfelder, A. (2005) The tRNase Z family of proteins: physiological functions, substrate specificity and structural properties. *Biol Chem*, **386**, 1253-1264.
- von Heijne, G. (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *Embo J*, **5**, 1335-1342.
- Wallace, D.C. (1993) Mitochondrial diseases: genotype versus phenotype. *Trends Genet*, **9**, 128-133.
- Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**, 1482-1488.

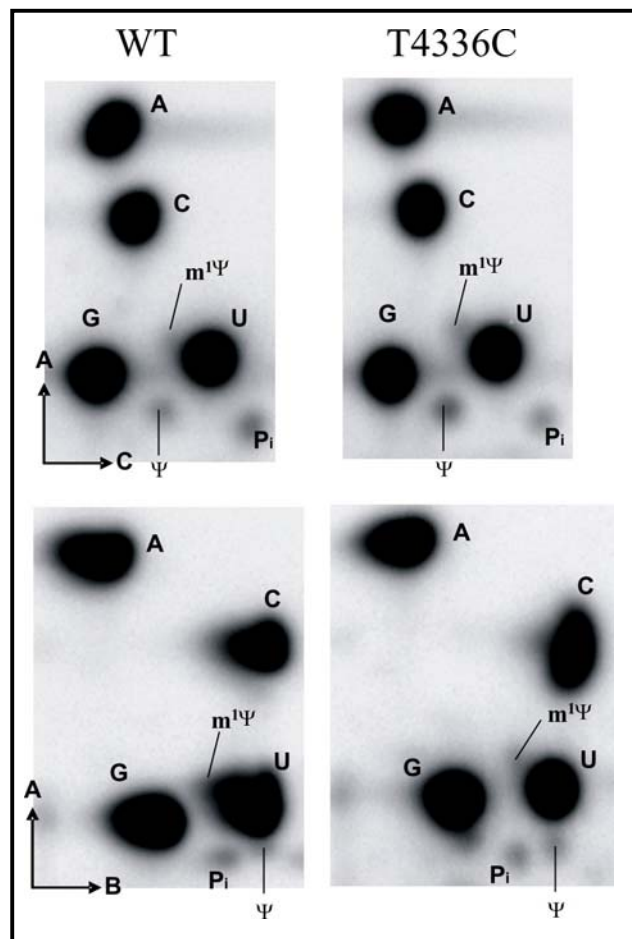
- Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J., 2nd and Nikoskelainen, E.K. (1988a) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, **242**, 1427-1430.
- Wallace, D.C., Zheng, X.X., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Hodge, J.A., Kelley, R.I., Epstein, C.M. and Hopkins, L.C. (1988b) Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell*, **55**, 601-610.
- Watanabe, Y., Kawai, G., Yokogawa, T., Hayashi, N., Kumazawa, Y., Ueda, T., Nishikawa, K., Hirao, I., Miura, K. and Watanabe, K. (1994) Higher-order structure of bovine mitochondrial tRNA(SerUGA): chemical modification and computer modeling. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5378-5384.
- Weber, K., Wilson, J.N., Taylor, L., Brierley, E., Johnson, M.A., Turnbull, D.M. and Bindoff, L.A. (1997) A new mtDNA mutation showing accumulation with time and restriction to skeletal muscle. *Am J Hum Genet*, **60**, 373-380.
- Westhof, E., Dumas, P. and Moras, D. (1983) Loop stereochemistry and dynamics in transfer RNA. *J Biomol Struct Dyn*, **1**, 337-355.
- Wittenhagen, L.M. and Kelley, S.O. (2002) Dimerization of a pathogenic human mitochondrial tRNA. *Nat Struct Biol*, **9**, 586-590.
- Wittenhagen, L.M. and Kelley, S.O. (2003) Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function. *Trends Biochem Sci*, **28**, 605-611.
- Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L. and Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science*, **277**, 60-66.
- Yaffe, M.P. (1999) The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science*, **283**, 1493-1497.
- Yarian, C., Marszalek, M., Sochacka, E., Malkiewicz, A., Guenther, R., Miskiewicz, A. and Agris, P.F. (2000) Modified nucleoside dependent Watson-Crick and wobble codon binding by tRNA^{Lys}UUU species. *Biochemistry*, **39**, 13390-13395.
- Yarian, C., Townsend, H., Czestkowski, W., Sochacka, E., Malkiewicz, A.J., Guenther, R., Miskiewicz, A. and Agris, P.F. (2002) Accurate translation of the genetic code depends on tRNA modified nucleosides. *J Biol Chem*, **277**, 16391-16395.
- Zeviani, M., Muntoni, F., Savarese, N., Serra, G., Tiranti, V., Carrara, F., Mariotti, C. and DiDonato, S. (1993) A MERRF/MELAS overlap syndrome associated with a new point mutation in the mitochondrial DNA tRNA(Lys) gene. *Eur J Hum Genet*, **1**, 80-87.
- Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H. and Dean, D.R. (1998) Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an iscSUA-hscBA-fdx gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J Biol Chem*, **273**, 13264-13272.

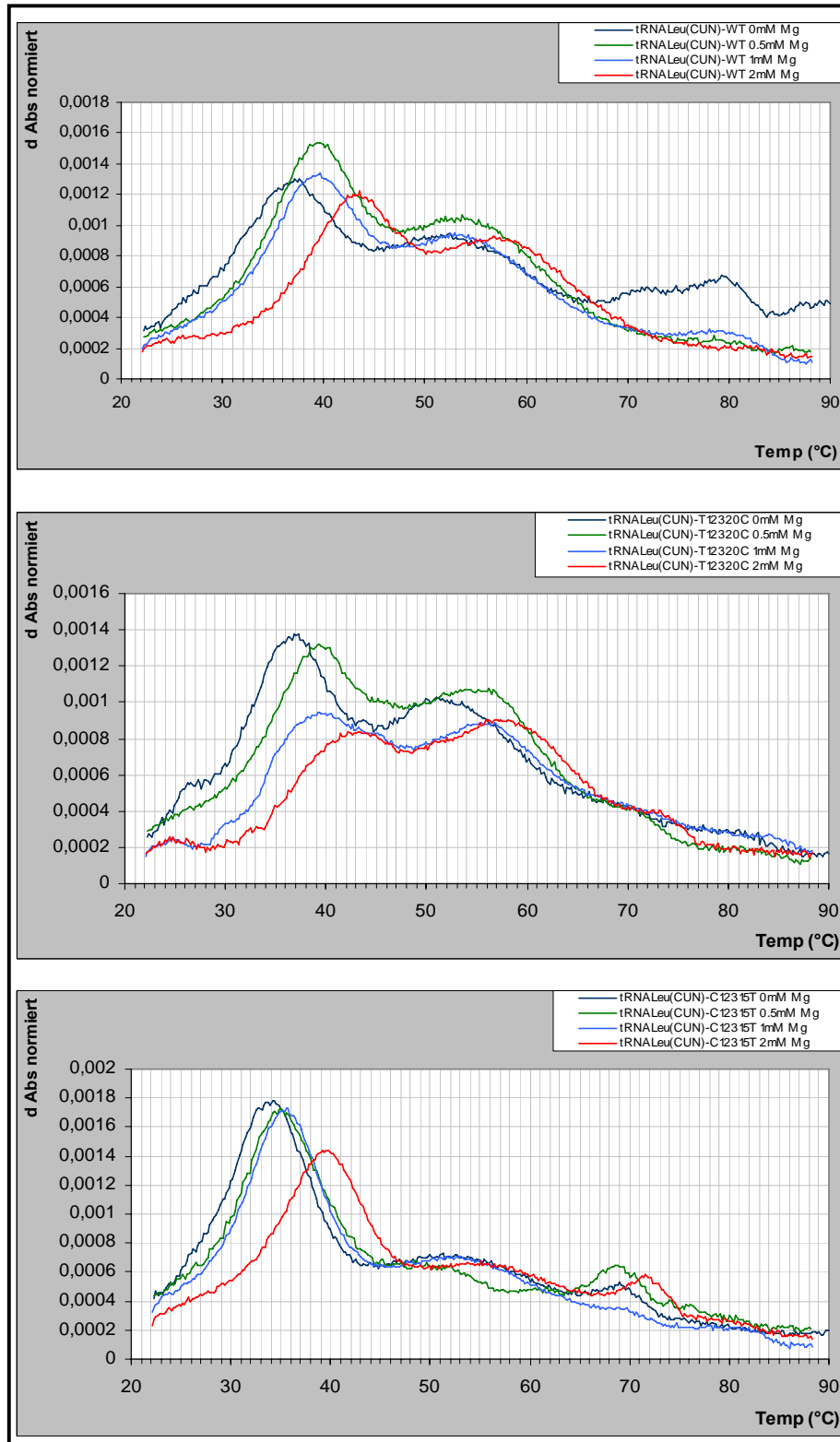
7 Anhang

Anhang 1: Posttranskriptionelle Modifikation der tRNA^{Gln}.

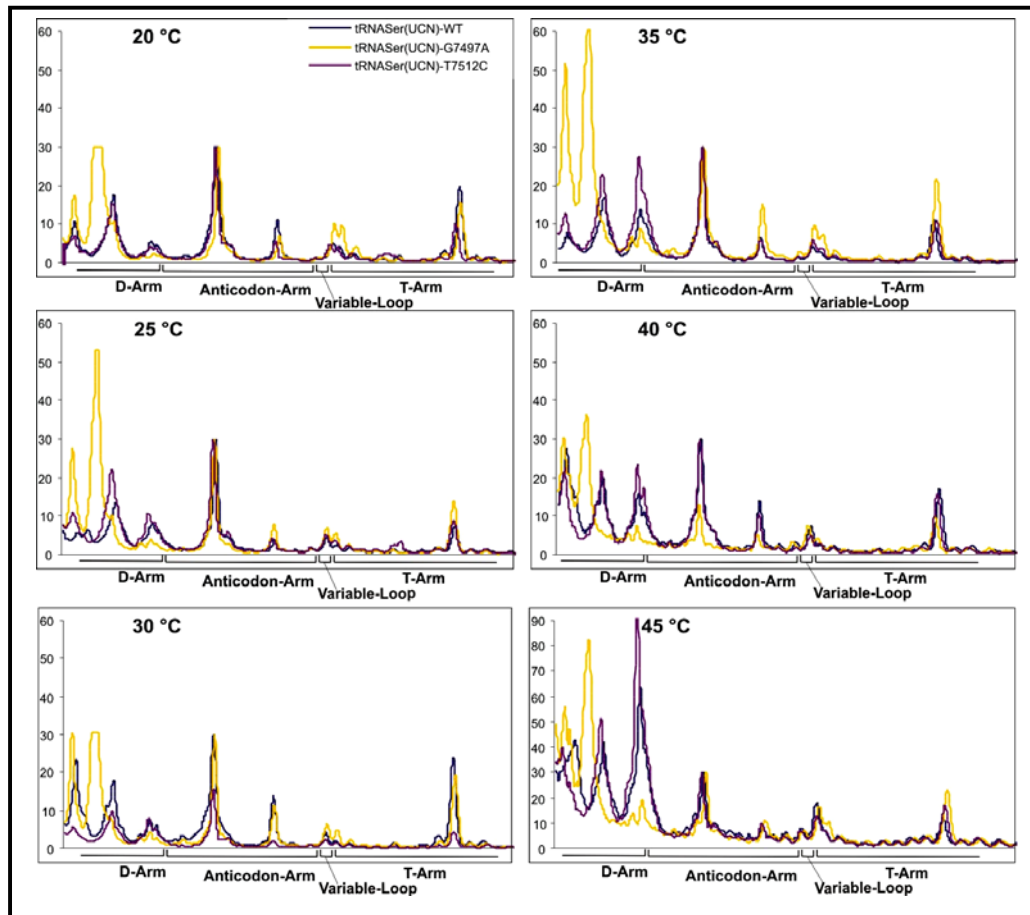
2D-Dünnschichtchromatographie: A, Adenosinmonophosphat; C, Cytidinmonophosphat; U, Uridinmonophosphat; G, Guanosenmonophosphat; m¹A, 1-Methyladenosinmonophosphat; m¹G, 1-Methylguanosenmonophosphat; m²G, N²-Methylguanosenmonophosphat; Ψ, Pseudouridinmonophosphat; m¹Ψ, 1-Methylpseudouridinmonophosphat.

DC-Laufpuffer: A, Isobuttersäure / Ammoniak / H₂O (66/1/33; v/v/v); B, Phosphat-Puffer pH 6,8 (0,1 M) / Ammoniumsulfat / 1-Propanol (100/60/1,5; v/w/v); C, HCl reinst / Isopropanol / H₂O (15/70/15; v/v/v).

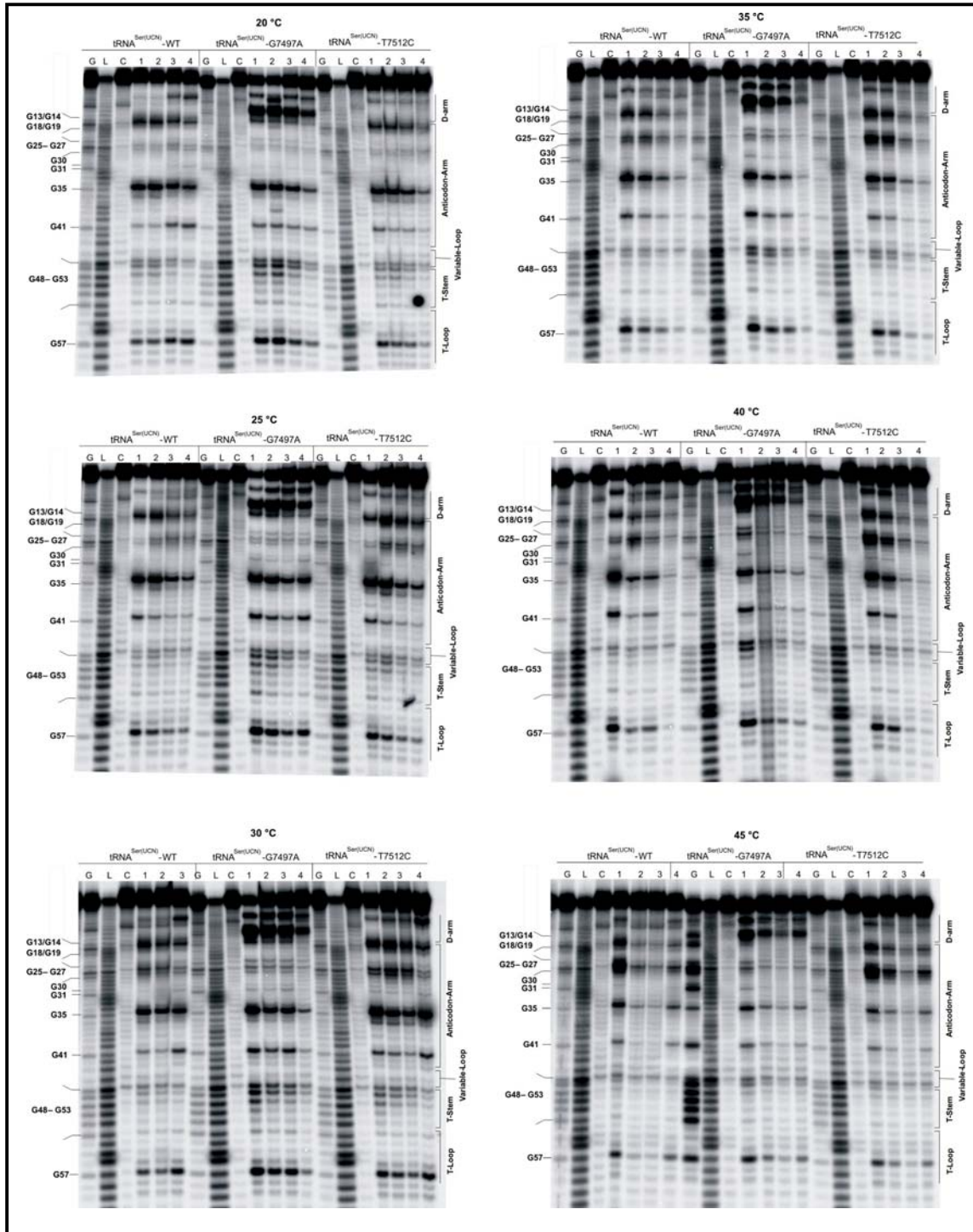


Anhang 2: Schmelzkurvenanalyse von tRNA^{Leu(CUN)}-WT, -12320G und - G12315A *in vitro* Transkripten in Anwesenheit von 0, 0.5, 1 und 2 mM MgCl₂.

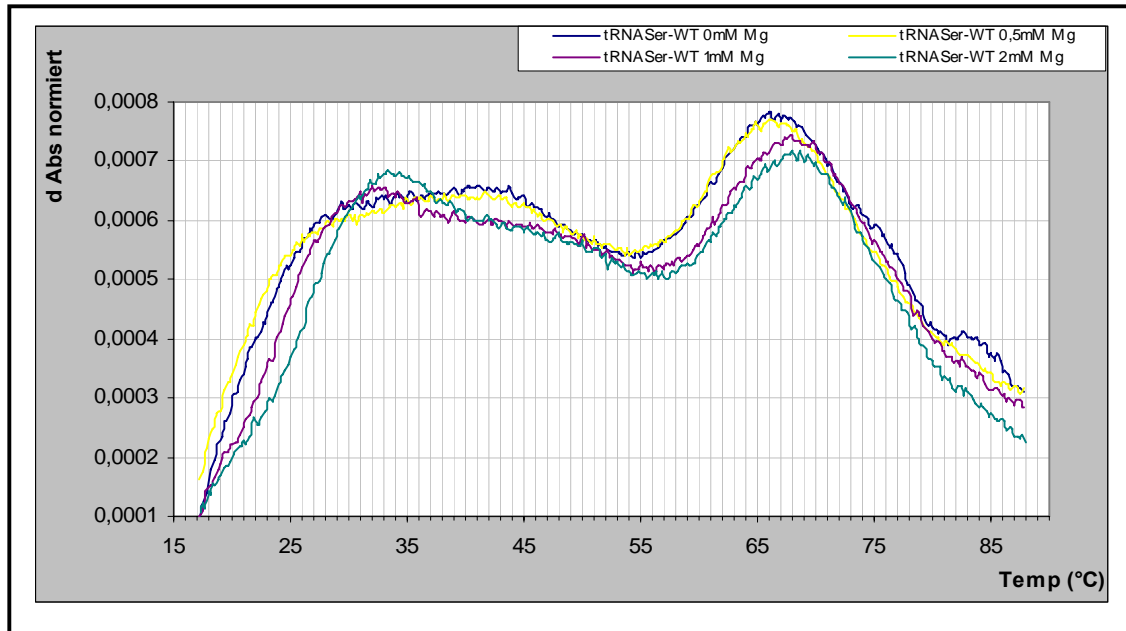
Anhang 3: RNase T1 Kartierung von tRNA^{Ser(UCN)} 3'-markierten *in vitro* Transkripten bei 20 – 45 °C. G, Spaltung mit RNase T1 unter denaturierenden Bedingungen; L, alkalische Hydrolyseleiter; C, Kontrolle (Inkubation ohne Nukleasen); Spuren 1-4, RNase T1-Verdau.



(Anhang 3 fortgesetzt)



Anhang 4: Erste Ableitungen der tRNA^{Ser(UCN)}-WT in vitro Transkripten in Anwesenheit von 0, 0,5, 1 und 2 mM MgCl₂ in 50 mM Phosphatpuffer und 100 mM NaCl.



Anhang 5: Publikationen und Poster

Mollers, M., Maniura-Weber, K., Kiseljakovic, E., Bust, M., **Hayrapetyan, A.**, Jaksch, M., Helm, M., Wiesner, R.J. and von Kleist-Retzow, J.C. (2005) A new mechanism for mtDNA pathogenesis: impairment of post-transcriptional maturation leads to severe depletion of mitochondrial tRNA^{Ser(UCN)} caused by T7512C and G7497A point mutations. *Nucleic Acids Res*, **33**, 5647-5658.

Maniura-Weber, K., Helm, M., Engemann, K., Eckertz, S., Mollers, M., Schauen, M., **Hayrapetyan, A.**, von Kleist-Retzow, J.C., Lightowers, R.N., Bindoff, L.A., Wiesner, R.J. (2006) Molecular disfunction associated with the human mitochondrial 3302A>G mutation in the MTTL 1 (mt-tRNA^{Leu(UUR)}) gene. *Nucleic Acids Res*, **34**, 6404-6415.

Hayrapetyan, A., von Kleist-Retzow, J.C., Mollers, M., Maniura-Weber, K., Jaksch, M., Wiesner, R.J., Helm, M. (2005) Human mitochondrial tRNA nucleotide modification activities: the effect of pathogenic mutation G7497A in tRNA^{Ser(UCN)}. *Gordon Research Conferences "RNA Editing"* Ventura, CA, USA (Poster).

Hayrapetyan, A., Bust, M., Wiesner, R.J., Helm, M. (2006) Subtle structural cross talk induced by the pathogenic mutation G7497A in mitochondrial tRNA^{Ser(UCN)} affects nucleotide modification and stability. *4th Meeting of the GBM Study Section "RNA-Biochemistry"*. Kassel, Deutschland (Poster).

