

**Bakterielle Ribonuklease P-Enzyme**  
**- Evaluierung als *Drug Target* und Analysen zur**  
**Substraterkennung**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Apothekerin Isabell Schencking**

aus Hildesheim

Marburg (Lahn) 2021

Erstgutachter: **Prof. Dr. Roland K. Hartmann**

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Arnold Grünweller**

Eingereicht am: 29. September 2021

Tag der mündlichen Prüfung: 22. November 2021

Hochschulkennziffer: 1180

## Zusammenfassung

Die Ribonuklease P (RNase P) ist ein essentielles und ubiquitär vorkommendes Enzym, das für die Maturierung von Vorläufer-tRNAs (prä-tRNAs) am 5'-Ende verantwortlich ist. Die architektonische Vielfalt der RNase P ist dabei einzigartig. In Bakterien, Archaeen und den Zellkernen sowie Organellen vieler Eukaryonten setzt sich die RNase P aus einer katalytischen RNA-Untereinheit und einer variierenden Anzahl von Proteinen zu einem Komplex zusammen (ein Protein in Bakterien, mindestens vier in Archaeen und bis zu zehn in Eukaryonten). Darüber hinaus wurde eine Variante der Protein-basierten RNase P (PRORP), der eine RNA-Untereinheit fehlt, in menschlichen Mitochondrien und anschließend in Landpflanzen und einigen Protisten identifiziert.

Da sich das pro- und eukaryontische RNase P-Holoenzym strukturell deutlich voneinander unterscheiden, stellt die bakterielle RNase P einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Entwicklung neuartiger Antibiotika dar. Im Kontext dieser Arbeit sollte evaluiert werden, inwiefern sich die bakterielle Proteinuntereinheit mit etwaigen Kleinmolekülen adressieren lässt. Als Ausgangspunkt dienten zwei publizierte RNase P-Inhibitoren mit Thiosemicarbazid-Kern bzw. Isoflavon-Grundkörper. In initialen Testungen des Thiosemicarbazids RNPA2000 traten Löslichkeitsprobleme auf, was ein erster Hinweis darauf war, dass die Verbindung eine Protein-Aggregation auslösen könnte. Die durch Kleinmoleküle hervorgerufene Protein-Aggregation ist eine Hauptquelle für falsch-positive Ergebnisse im Rahmen von Studien zur Identifizierung neuer, potentieller Arzneimittelwirkstoffe. Um dieser Problematik nachzugehen, wurden folgende Kontrollexperimente durchgeführt: (i) Zugabe eines Detergens zu den kinetischen Reaktionen des Enzyms, (ii) Variation der Konzentration von RNase P-Holoenzym / Proteinuntereinheit, (iii) Bestimmung der Löslichkeit des potentiellen Inhibitors unter Assay-Bedingungen, (iv) Analyse der Co-Sedimentation der Proteinuntereinheit und des Kleinmoleküls sowie (v) Testung auf Wachstumshemmung eines *Bacillus subtilis*-Stamms, bei dem das eukaryontische, Protein-basierte Enzym für die prä-tRNA-Prozessierung zuständig ist. Mithilfe der genannten Experimente konnte für RNPA2000 gezeigt werden, dass es sich nicht um einen spezifischen RNase P-Inhibitor handelt, sondern die beobachteten inhibitorischen Effekte vielmehr auf unspezifische Protein-Aggregation zurückzuführen sind. Des Weiteren konnte für das Isoflavon Irginolhexaacetat und Purpurin, einem weiteren publizierten RNase P-Inhibitor, gezeigt werden, dass es sich bei diesen Verbindungen ebenfalls um Protein-Aggregatoren handelt. Folglich konnte in dieser Arbeit aufgedeckt werden, dass *bis dato* kein spezifischer Kleinmolekül-Inhibitor literaturbekannt ist, der an die Proteinuntereinheit bindet. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden daraufhin komplett neuartige Strukturen untersucht, die die 5'-Flanken-Bindetasche der Proteinuntereinheit adressieren sollten. Hierzu wurde ein Struktur-basierter und *Docking*-gestützter Ansatz verfolgt. Zunächst zeigte dabei eine

Verbindung mit einer Sulfonat-Gruppe eine schwache RNase P-Inhibition. Im Rahmen von Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen und der damit einhergehenden Derivatisierung wurden jedoch auch hier Löslichkeitsprobleme und Protein-Aggregation beobachtet, sodass diese Stoffklasse letztlich nicht weiterverfolgt wurde. Zusammenfassend scheint die Proteinuntereinheit der bakteriellen RNase P sehr anfällig gegenüber Protein-Aggregation zu sein, sodass sich das Adressieren dieses Proteins mit Kleinmolekülen als sehr schwierig gestaltet. Als antibakterielle Zielstruktur von Kleinmolekülen ist das Protein demnach abschließend weniger geeignet.

Neben dem in Eukaryonten vorkommenden PRORP-Enzym wurde eine andere Protein-basierte RNase P in *Aquifex aeolicus* (*Aquifex aeolicus* RNase P, AaRP) und verwandten hyperthermophilen Bakterien der Familie Aquificaceae identifiziert. Wie PRORP gehört auch AaRP zu den Metallonukleasen mit PIN (PilT N-Terminus) -Domäne, obwohl es einer anderen Untergruppe zugeordnet wird. Das monomere Protein ist verhältnismäßig klein (~23 kDa), oligomerisiert letztlich aber zu einem ~280 kDa großen Dodekamer. Mithilfe bioinformatischer Recherchen konnten zudem Homologe von AaRP, die als HARPs (*Homologs of Aquifex RNase P*) bezeichnet werden, vor allem in hyperthermophilen Bakterien und vielen Archaeen identifiziert werden.

Eines dieser HARPs, das *Thermodesulfator indicus* HARP, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Dabei stand die Frage im Vordergrund, welche Regionen des prä-tRNA-Substrats für die Substraterkennung von entscheidender Bedeutung sind. Die enzymkinetische Testung von Substratvarianten der prä-tRNA<sup>Gly</sup> ergab, dass in einem Substrat, welches lediglich aus intaktem Akzeptorstamm und T-Arm mit 5'-Flanke und 3'-CCA-Ende besteht, die wichtigen Determinanten für die Substraterkennung vorhanden sind. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass weder die 5'-Flanke noch das 3'-Ende der prä-tRNA an für die Prozessierung essentiellen Enzyminteraktionen mit dem *Thermodesulfator indicus* HARP beteiligt sind. Dies deutet auf eine gewisse Ähnlichkeit zum PRORP-Enzym aus *Arabidopsis thaliana* hin, das im Gegensatz zur bakteriellen, RNA-basierten RNase P nicht mit der 5'-Flanke und dem 3'-CCA-Ende interagiert. Allerdings scheint der für das PRORP-Enzym bereits beschriebene Längenmess-Mechanismus von Akzeptorstamm und T-Arm bei dem *Thermodesulfator indicus* HARP deutlich relaxiert, sodass die Spaltstelle bei der Verlängerung des T-Stamms an das Ende der Akzeptorstamm-Helix verschoben wird.



## Abstract

Ribonuclease P (RNase P) is an essential 5'-precursor-tRNA (pre-tRNA) processing enzyme in all domains of life. The architectural diversity of RNase P enzymes is unique. In Bacteria, Archaea, and in the nuclei and organelles of many Eukarya, RNase P is a complex consisting of a catalytic RNA subunit and a varying number of proteins (one protein in Bacteria, at least four in Archaea, and up to ten in Eukarya). In addition, a variant of protein-only RNase P (PRORP) lacking an RNA subunit has been identified in human mitochondria and subsequently in terrestrial plants and some protists.

As the prokaryotic and eukaryotic RNase P holoenzymes differ significantly in their structure, the bacterial RNase P is a promising target for the development of novel antibiotics. The aim of this work was to evaluate, whether the bacterial protein subunit can be addressed with small molecules. Two published RNase P inhibitors with a thiosemicarbazide core and an isoflavone skeleton, respectively, served as a starting point. During initial experiments testing the thiosemicarbazide RNPA2000, solubility problems were observed, suggesting that the compound may induce protein aggregation. Small molecule-induced protein aggregation is one major source of false-positive results in drug discovery campaigns. To address this issue, the following control experiments were conducted: (i) addition of detergent to the enzyme kinetic reactions, (ii) variation of RNase P holoenzyme / protein subunit concentration, (iii) determination of the solubility of the potential inhibitor under assay conditions, (iv) analysis of cosedimentation of the protein subunit and the small molecule, and (v) testing for growth inhibition of a *Bacillus subtilis* strain whose RNase P activity is provided by the eukaryal PRORP. These experiments demonstrated that RNPA2000 is not a specific RNase P inhibitor, but rather induces nonspecific protein aggregation leading to the observed inhibitory effects. Additionally, it could be shown, that the isoflavone iriginolhexaacetate and purpurin, another published RNase P inhibitor, also act as protein aggregators. Therefore, this work revealed that, to date, there are no specific small molecule inhibitors known in literature that bind to the protein subunit. To address the 5'-leader cavity of the protein subunit, completely novel structures were investigated. For this purpose, a structure-based and docking-assisted approach was pursued. Initially, one compound harboring a sulfonate group showed a slight RNase P inhibition. However, during structure-activity relationship studies, solubility problems and protein aggregation reappeared, excluding this class of compounds for further investigations. In summary, the protein subunit of bacterial RNase P is highly susceptible to protein aggregation and addressing this protein with small molecules appears to be very difficult. Consequently, this protein is less suitable as an antibacterial target of small molecules.

In addition to the PRORP enzyme found in Eukarya, another protein-based RNase P has been identified in *Aquifex aeolicus* (*Aquifex aeolicus* RNase P, AaRP) and related hyperthermophilic

Bacteria of the family Aquificaceae. Like PRORP, AaRP also belongs to the PIN (PiIT N-Terminus) domain-like superfamily, although it belongs to a different subgroup. The monomeric protein is rather small (~23 kDa), but oligomerizes to a ~280 kDa dodecamer. Within bioinformatic studies homologs of AaRP, termed HARPs (Homologs of Aquifex RNase P), were identified in some predominantly hyperthermophilic Bacteria and many Archaea.

A focus of this work was to investigate the HARP of *Thermodesulfatator indicus*, particularly with regard to substrate recognition. Enzyme kinetic testing of substrate variants of pre-tRNA<sup>Gly</sup> revealed that in the substrate, consisting of an intact acceptor stem and T-arm with 5'-leader und 3'-CCA-end, the important determinants for substrate recognition are present. Furthermore, neither 5'-leader nor 3'-end of the pre-tRNA were shown to be involved in essential enzyme interactions with the *Thermodesulfatator indicus* HARP. This suggests some similarity to the PRORP enzyme of *Arabidopsis thaliana*, which, unlike the bacterial, RNA-based RNase P, also does not interact with the 5'-leader and 3'-end of pre-tRNA substrates. However, the length-measuring mechanism of the acceptor stem and T-arm, already described for the PRORP enzyme, appears to be markedly relaxed in the *Thermodesulfatator indicus* HARP, such that the cleavage site is shifted to the end of the acceptor stem helix upon elongation of the T-stem.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>I</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 RNase P .....	1
1.2 RNA-basierte Holoenzyme .....	3
1.2.1 Bakterielle RNase P.....	3
1.2.2 Archaeale RNase P.....	10
1.2.3 Eukaryontische RNase P.....	12
1.3 Protein-basierte Form .....	14
1.3.1 PRORP .....	14
1.3.2 AaRP und HARP .....	18
1.4 RNase P als antibakterielles Target .....	21
1.4.1 Antibiotikaentwicklung .....	21
1.4.2 Inhibitoren der bakteriellen RNase P.....	25
<b>2 ZIELSETZUNG</b> .....	<b>32</b>
2.1 Inhibitoren der bakteriellen RNase P .....	32
2.2 Untersuchungen zum <i>Thermodesulfatator indicus</i> HARP .....	32
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>34</b>
3.1 Material .....	34
3.1.1 Chemikalien .....	34
3.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	34
3.1.3 Enzyme.....	35
3.1.4 Kits.....	35
3.1.5 Puffer und Lösungen .....	36
3.1.6 Geräte .....	36
3.1.7 Oligonukleotide .....	37
3.1.8 Verwendete Bakterienstämme .....	39
3.1.9 Verwendete Plasmide.....	39
3.2 Methoden .....	40
3.2.1 Bakterielle Zellkultur .....	40
3.2.2 Allgemeine Nukleinsäure Techniken .....	46
3.2.3 DNA-Methoden .....	48
3.2.4 RNA-Methoden .....	60
3.2.5 Proteinbiochemische Methoden .....	63
3.2.6 Enzymkinetische Methoden.....	72

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....</b>	<b>84</b>
4.1	Inhibitoren der bakteriellen RNase P	84
4.1.1	Derivate publizierter RNase P-Inhibitoren .....	87
4.1.2	Untersuchungen zu den publizierten RNase P-Inhibitoren .....	100
4.1.3	Neuartige Inhibitoren der bakteriellen RNase P .....	150
4.1.4	Zusammenfassung .....	184
4.1.5	Ausblick .....	187
4.2	Untersuchungen zum <i>Thermodesulfatator indicus</i> HARP	191
4.2.1	Substraterkennung .....	191
4.2.2	Strukturelle Analysen .....	214
4.2.3	Zusammenfassung .....	225
4.2.4	Ausblick .....	227
<b>5</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>230</b>
5.1	Referenzverzeichnis	230
5.2	Ergebnisse der Inhibitoren-Testungen	246
5.2.1	Ergebnisse der Enzymkinetik .....	246
5.2.2	Ergebnisse des Hemmhoftests .....	257
5.2.3	Nicht lösliche Verbindungen .....	266
5.3	Plasmidkarten	267
5.3.1	Plasmide zur rekombinanten Proteinexpression .....	267
5.3.2	Plasmide für Komplementationsexperimente .....	275
5.3.3	Plasmide für <i>in vitro</i> -Transkriptionen .....	281
5.4	Publikationen	295
5.5	Konferenzbeiträge	296
5.6	Lebenslauf	297
5.7	Eidesstattliche Erklärung	298
5.8	Danksagung	299

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: tRNA-Prozessierung am 5'-Ende.....	1
Abb. 2: Formen der RNase P .....	2
Abb. 3: Bakterielle P RNA .....	4
Abb. 4: <i>T. maritima</i> Holoenzym .....	6
Abb. 5: Substraterkennung der bakteriellen RNase P.....	8
Abb. 6: Übergangszustand der Phosphodiesterhydrolyse .....	10
Abb. 7: Archaeales Holoenzym .....	11
Abb. 8: Humanes, nukleäres Holoenzym.....	13
Abb. 9: PRORP-Struktur und tRNA-Bindung .....	16
Abb. 10: Dodekamer-Struktur des <i>H. halophila</i> HARPs .....	20
Abb. 11: Zeitstrahl der Antibiotikaentwicklung .....	21
Abb. 12: Strukturen der P RNA-Inhibitoren .....	27
Abb. 13: RNase P-Inhibitoren, die im Rahmen von <i>HTS</i> identifiziert wurden .....	30
Abb. 14: Plasmidkarte pUC18 <i>S. aureus rnpB</i> .....	54
Abb. 15: Plasmidkarte pET28a(+) <i>S. aureus rnpAnHis</i> .....	55
Abb. 16: Strategien der ortsgerichteten <i>in vitro</i> -Mutagenese .....	56
Abb. 17: Plasmidkarte pSP_delta Ac3 .....	57
Abb. 18: Plasmidkarte pSP_Aab9T .....	58
Abb. 19: Plasmidkarte pDG148(+)_Thein2060cHis .....	59
Abb. 20: <i>Thermus thermophilus</i> prä-tRNA <sup>Gly</sup> .....	73
Abb. 21: Beispielhafte Substrat-Zeit Umsatzkurven für Inhibitoren .....	77
Abb. 22: Beispielhaftes Kinetikgel.....	80
Abb. 23: Beispielhafte Bestimmung des IC <sub>50</sub> -Werts.....	82
Abb. 24: Auswertung nach modifiziertem <i>Michaelis-Menten</i> -Model .....	82
Abb. 25: <i>T. maritima</i> RNA-allein Aktivität.....	84
Abb. 26: <i>T. maritima</i> Enzymkontrollen .....	85
Abb. 27: Durchführung der enzymkinetischen Testungen.....	86
Abb. 28: RNPA2000 und dessen Derivate 1-5 mit Variationen am Hydrazid-Teil.....	88
Abb. 29: NL20 und dessen Derivate 6 und 7 mit Variationen am Hydrazid-Teil .....	88
Abb. 30: NL20-Derivate 8-10 mit unterschiedlich substituierten Phenyl-Resten auf Seiten des Carbonsäurehydrazid- und des Imid-Teilgerüsts .....	89
Abb. 31: Derivate 11-18 mit vicinalem Diol und Imid-, Carbonsäureamid-, Diacylhydrazin- sowie Carbonsäureester-Teilgerüst .....	90
Abb. 32: 2,3-Dihydroxy-Succinamid-Derivate 19-23 mit verschiedenen Resten an N <sup>1</sup> und N <sup>4</sup> .....	91

Abb. 33: Rhodanin-Derivate 24-31 mit einem Furanyl-, Thiophenyl- oder Phenyl-Substituenten in der 5-Position .....	92
Abb. 34: Ir6Ac, Chrysin, Quercetin und die Derivate 32 sowie 33 .....	94
Abb. 35: N-Phenylbenzamide 34-41 nach Öffnung des 4-Pyranonrings von Ir6Ac .....	95
Abb. 36: N-Phenylbenzamid-Derivate 42-45 mit Hydroxy-, Methoxy- oder Dimethoxy-phenyl-Rest .....	96
Abb. 37: Verbindungen 46-51 mit Harnstoff-, N-Acyl-Carbonsäurehydrazid-, Bernsteinsäure-mono-Amid- oder Maleinsäureimid-Teilgerüst.....	97
Abb. 38: Hemmhofstest der Ir6Ac-Derivate .....	98
Abb. 39: <i>Pan-Assay Interference Compounds</i> .....	100
Abb. 40: Schematische Darstellung der Protein-Aggregation .....	102
Abb. 41: (1-Methylsulfonyl)piperazin-4-amid-Derivate 52-61 .....	150
Abb. 42: N-(4-(N-phenylsulfamoyl)phenyl)acetamide 62-67, 4-Arylpiperazin-amide 68 & 69 und 1-(4-Methoxyphenyl)-2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethan-1-on (70) .....	151
Abb. 43: Hemmhofstest der Sulfonamid-Derivate .....	151
Abb. 44: Gegenüberstellung der Verbindung 62 und Sulfamethoxazol .....	152
Abb. 45: Bindetasche der 5'-Flanke .....	153
Abb. 46: 1,3- bzw. 1,4- Diaminobenzol-Derivate 71-76 mit Bernsteinsäure, Glutarsäure oder 2-Acetoxyessigsäure-Teilgerüst.....	154
Abb. 47: Bindetasche des <i>T. maritima</i> P Proteins .....	155
Abb. 48: Carbonsäure- und Carbonsäureester-Derivate 77-92 mit Carbonsäureestern oder -amiden als verknüpfendem Element und Variation der Verknüpfung sowie Substitution des Benzolrings für die $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung .....	156
Abb. 49: Sulfon- und Sulfonsäure-Derivate 93-99.....	157
Abb. 50: Testung der in Abb. 49 dargestellten Verbindungen .....	158
Abb. 51: Bindungspose von Verbindung 94.....	159
Abb. 52: Hemmhofstest der Verbindungen aus dem initialen <i>Screening</i> .....	160
Abb. 53: Weitergehende Testung von Verbindung 94 mit <i>T. maritima</i> RNase P .....	161
Abb. 54: Protein-Aggregatoren - Sensitivität gegenüber der Proteinkonzentration.....	162
Abb. 55: Weitergehende Testung von Verbindung 94 mit dem <i>B. subtilis</i> Holoenzym .....	164
Abb. 56: Weitergehende Testung von Verbindung 94 mit dem <i>S. aureus</i> Holoenzym .....	165
Abb. 57: <i>Prodrug</i> -Strategie von Verbindung 94 .....	167
Abb. 58: Phenylbutylether 101 und N-Butylanilin 102 nach Derivatisierung von Verbindung 94 .....	168
Abb. 59: Derivate 103-118 ausgehend von Verbindung 94 mit monozyklischem (103-106), dicyklischem (107-111) oder tricyklischem Rest R (112) bzw. mit unterschiedlich verbrückten Benzolringssystemen (113-118).....	169

Abb. 60: Testung der Sulfonate 107-118 mit di- oder trizyklischem System bzw. mit zwei verbrückten Aromaten .....	170
Abb. 61: Benzylphenylether-Derivate 119- 123 mit variabler Linkerlänge und veränderter Verknüpfungsposition .....	171
Abb. 62: Testung der Sulfonat-Derivate 119-123.....	172
Abb. 63: Derivate 124-134 ausgehend von Verbindung 94 mit Elektronen-ziehenden Substituenten in der <i>ortho</i> -, <i>meta</i> - und <i>para</i> -Position sowie mit Elektronen-schiebenden Substituenten in der <i>meta</i> -Position bzw. Mehrfachsubstitution des Benzolrings.....	173
Abb. 64: <i>Docking</i> -Posen der Verbindungen mit hydrophoben bzw. Elektronen-ziehenden Substituenten an der Benzyl-Gruppe des Benzylphenylethers.....	174
Abb. 65: Testung der Sulfonate 124-134 mit Substitutionen am Benzolring des Benzylrestes .....	175
Abb. 66: Löslichkeitsexperimente zu den von Verbindung 94 ausgehenden Derivaten .....	177
Abb. 67: Testungen mit dem <i>T. maritima</i> Enzym bei 10-fachem Proteinüberschuss.....	179
Abb. 68: Schematische Darstellung der Holoenzym-Assemblierung.....	180
Abb. 69: Co-Sedimentation einer Enzymkinetik-Reaktion mittels Silberfärbung.....	180
Abb. 70: Architektur der Bindetaschen von Lisinopril und der 5'-Flanke des <i>T. maritima</i> RnpA-Proteins im Vergleich .....	183
Abb. 71: Inhibitoren des bakteriellen P Proteins als alternative Ausgangspunkte .....	188
Abb. 72: Struktur des Phenothiazins Toluidinblau.....	190
Abb. 73: C-terminaler versus N-terminaler His <sub>6</sub> - <i>Tag</i> .....	192
Abb. 74: Enzymkinetik-Parameter der prä-tRNA <sup>Gly</sup> .....	192
Abb. 75: Substratinteraktionen des bakteriellen Ribonukleoproteins und des eukaryontischen PRORPs .....	194
Abb. 76: Substratvarianten der 5'-Flanke.....	195
Abb. 77: Effekte der Längenvariationen der prä-tRNA 5'-Flanke.....	196
Abb. 78: Substratvarianten der 3'-Flanke.....	197
Abb. 79: Einfluss der Variationen der 3'-Extensionen des prä-tRNA <sup>Gly</sup> -Substrats .....	199
Abb. 80: Substratvarianten mit Deletionen ganzer tRNA-Domänen.....	201
Abb. 81: Auswertung für das ΔAc3-Substrat.....	202
Abb. 82: Effekte der Deletion von tRNA-Domänen .....	204
Abb. 83: Spaltstellenanalyse der Akzeptorstamm-Varianten.....	205
Abb. 84: Spaltstellen-Analyse der T-Domänen-Varianten.....	207
Abb. 85: <i>Alignment</i> der HARP-Proteinsequenzen.....	215
Abb. 86: Komplementationsanalysen von Proteinmutanten .....	217
Abb. 87: Analytische Gelfiltration.....	219

Abb. 88: Einfluss des His <sub>6</sub> -Tags auf die Aktivität .....	220
Abb. 89: <i>T. indicus</i> Homologiemodell .....	221
Abb. 90: Oligomerisierung der HARPs .....	224



## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: ausgewählte Chemikalien.....	34
Tab. 2: Verbrauchsmaterialien.....	34
Tab. 3: Enzyme .....	35
Tab. 4: Kits .....	35
Tab. 5: Puffer und Lösungen .....	36
Tab. 6: Geräte .....	36
Tab. 7: Oligonukleotide.....	37
Tab. 8: Bakterienstämme .....	39
Tab. 9: Plasmide .....	39
Tab. 10: Reaktionsbedingungen bei der <i>in vitro</i> -Transkription .....	61
Tab. 11: <i>in vitro</i> -Transkriptionen ausgehend von linearisierten Plasmiden.....	61
Tab. 12: <i>in vitro</i> -Transkriptionen ausgehend von PCR-Produkten .....	62



## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
$\times g$	Vielfaches der Erdbeschleunigung $g$
°C	Grad Celsius
$\mu\text{F}$	Mikrofarad
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{L}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$^{32}\text{P}$	Phosphor-32 Isotop
$A_{260}$	Lichtabsorption bei 260 nm Wellenlänge
$A_{280}$	Lichtabsorption bei 280 nm Wellenlänge
AaRP	<i>Aquifex aeolicus</i> RNase P
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>absorbance units</i>
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cam	Chloramphenicol
C-Domäne	katalytische Domäne
cLogP	berechneter Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
cm	Zentimeter
CM	Carboxymethyl-Gruppe
cpm	<i>counts per minute</i>
CR	konservierte Region
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
denat.	denaturierend
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Enzym
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FF	<i>fast flow</i>

FPLC	<i>Fast-Protein Liquid Chromatography</i>
FRET	<i>Förster-Resonanzenergietransfer</i>
g	Gramm
GL	Glas
h	Stunde
HARP	<i>Homologs of Aquifex RNase P</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hERG	<i>human Ether-A-Go-Go Related Gen</i>
HP	<i>high performance</i>
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horseradish peroxidase</i> )
HTS	Hochdurchsatz-Screening ( <i>High-throughput screening</i> )
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
lr6Ac	Iriginolhexaacetat
$K_{1/2}$	enzymkinetischer Parameter, Enzymkonzentration bei halbmaximaler Ratenkonstante
kan	Kanamycin
kb	Kilobase
$k_{cat}$	Wechselzahl
kDa	Kilodalton
$K_M$	<i>Michaelis-Menten-Konstante</i>
$k_{obs}$	Ratenkonstante
Kryo-EM	Kryoelektronenmikroskopie
kV	Kilovolt
L	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LNA	<i>locked nucleic acid</i>
LogP	Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
M	molar
MIC	minimale Hemm-Konzentration
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure
MRPP3	mitochondriales RNase P Protein 3
ms	Millisekunden
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
Neo	Neomycin
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar

nt	Nukleotid
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Ribonukleosidtrisphosphat
NYN	<i>Nedd4-BP1, YacP Nuclease</i>
OAc	Acetatgruppe
OD <sub>600</sub>	optische Dichte/Extinktion bei 600 nm Wellenlänge
p.	<i>page</i>
p.a.	per analysis
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAINS	<i>Pan Assay Interference Compounds</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglykol
pI	isoelektrischer Punkt
PIN	<i>PiIT N-terminal</i>
pKa	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
pmol	picomol
PNA	Peptid-Nukleinsäure
PNK	Polynukleotidkinase
pp.	<i>pages</i>
PPR	<i>pentatricopeptide repeat</i>
PRORP	<i>protein-only / proteinaceous RNase P</i>
ptGly	prä-tRNA <sup>Glycin</sup>
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
rNTP	Ribonukleosidtriphosphate
rpm	Runden pro Minute
S-Domäne	Spezifitäts-Domäne
SDR	<i>short-chain dehydrogenase / reductase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
S <sub>N</sub> 2-Reaktion	bimolekulare nucleophile Substitution
ssDNA	Einzelstrang-DNA
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thein2060cHis	<i>Thermodesulfator indicus</i> HARP mit C-terminalem His <sub>6</sub> -Tag
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

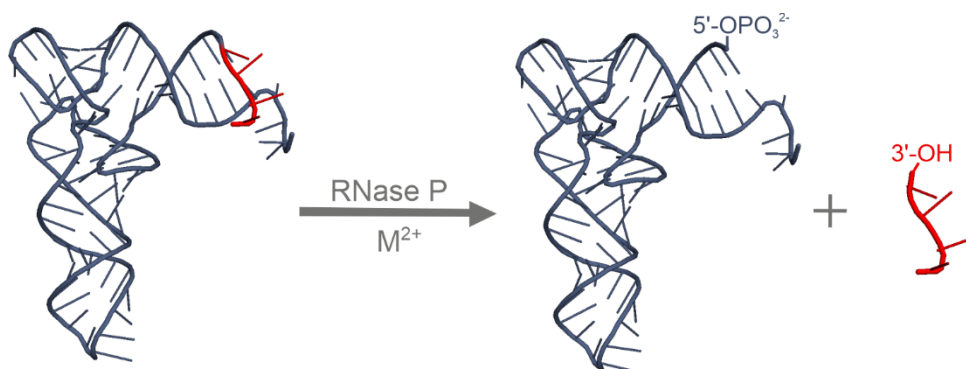
TRMT10C	tRNA Methyltransferase 10C
tRNA	transfer-RNA
U	Unit(s) (Einheit für Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
Vbdg.	Verbindung
vgl.	vergleiche
$v_{\max}$	enzymkinetischer Parameter, maximale Ratenkonstante
vs.	versus (gegen)
w/v	Masse pro Volumen
WHO	<i>Weltgesundheitsorganisation</i>
z.B.	zum Beispiel
$\epsilon$	molarer Extinktionskoeffizient
$\Omega$	Ohm

Einzelne Aminosäuren wurden im Ein- bzw. Dreibuchstabencode aufgeführt.

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 RNase P

Im Rahmen der Proteinbiosynthese transportieren transfer-RNAs (tRNAs) Aminosäuren, die an das 3'-Ende der tRNA gebunden werden, an die Ribosomen. Entsprechend dem genetischen Code findet dort die Translation der mRNA zum Polypeptid statt. Transfer-RNAs sind somit essentiell für die Proteinbiosynthese. Wie viele andere Transkripte werden auch tRNAs zunächst als Vorläufer-tRNAs produziert. Diese prä-tRNAs enthalten zusätzlich flankierende Sequenzen am 3'- und 5'-Ende und unterliegen einigen posttranskriptionalen Reifungsprozessen. Bei dieser Maturierung werden bestimmte Nukleosidpositionen modifiziert, - wenn vorhanden - Introns entfernt, die 3'- und 5'-Ende flankierenden Sequenzen abgeschnitten und die CCA-Sequenz am 3'-Ende hinzugefügt, sofern diese nicht bereits im tRNA-Gen kodiert ist (Hartmann *et al.*, 2009; Hopper, 2013; Wellner *et al.*, 2018). Für die Prozessierung des 5'-Endes ist die Ribonuklease P (RNase P) zuständig, die die 5'-Flanke der prä-tRNA endonukleolytisch abspaltet (Abb. 1).



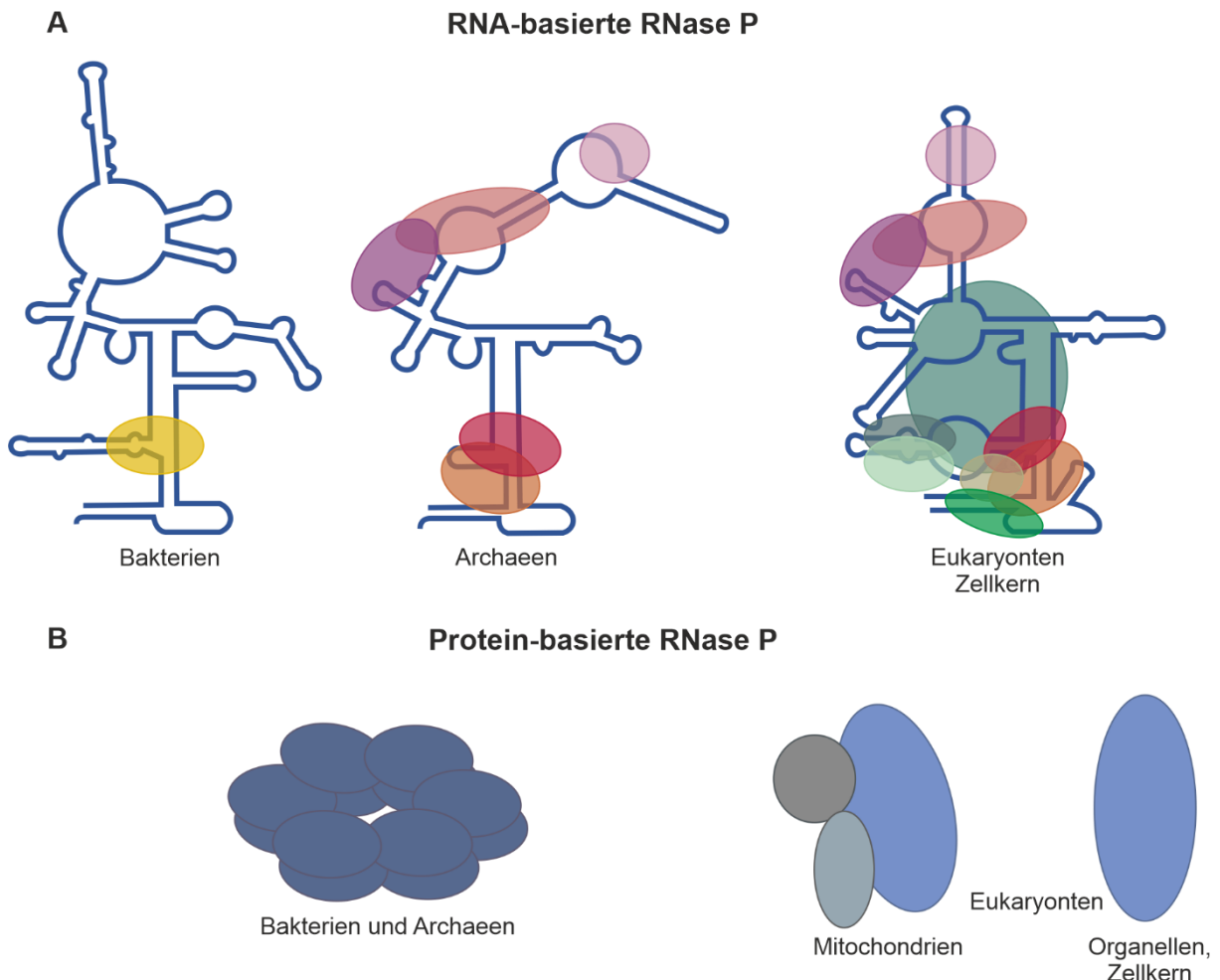
**Abb. 1: tRNA-Prozessierung am 5'-Ende**

Die 5'-Flanke der prä-tRNA wird endonukleolytisch abgespalten und es entsteht die mature tRNA mit 5'-Phosphat- und die 5'-Flanke mit 3'-OH-Gruppe. Diese Reaktion wird durch die RNase P in Gegenwart von Metallionen M<sup>2+</sup> (zumeist Mg<sup>2+</sup>) als Cofaktor katalysiert. Abbildung modifiziert nach Klemm *et al.*, 2016 (PDB: 6AH3).

Im Rahmen der hydrolytischen Spaltung der Phosphodiesterbindung, die mithilfe von Metallionen katalysiert wird, entsteht die mature tRNA mit einem 5'-Phosphat-Ende und die 5'-Flanke mit einer 3'-Hydroxylgruppe (Klemm *et al.*, 2016).

Die RNase P kommt in allen drei Domänen des Lebens (Bakterien, Archaeen und Eukaryonten) vor, wenn auch in unterschiedlichen Formen. Zunächst wurde die bakterielle RNase P entdeckt, die aus einer katalytischen RNA-Untereinheit und einer Protein-Untereinheit besteht und somit ein Ribozym darstellt (Guerrier-Takada *et al.*, 1983; Reich *et al.*, 1986). Die RNase P RNA (P RNA) ist *in vitro* unter erhöhten Salzkonzentrationen auch ohne Protein-Komponente katalytisch aktiv (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Für die RNase P-Aktivität *in vivo* ist das RNase P Protein (P Protein oder RnpA genannt) essentiell

(Schedl *et al.*, 1975; Gößringer *et al.*, 2006). Diese RNA-basierte Form des Enzyms ist auch in Archaeen und Eukaryonten vorzufinden, allerdings mit einem erhöhten Anteil an Proteinkomponenten. Das archaeale Enzym enthält vier bis fünf und das eukaryontische Enzym neun bis zehn Proteinkomponenten (Abb. 2A). Alle fünf archaealen Proteine haben Homologe im eukaryontischen Enzym (Andrews *et al.*, 2001; Jarrous & Altman, 2001; Jarrous & Gopalan, 2010).



**Abb. 2: Formen der RNase P**

**(A)** RNA-basierte RNase P. Die katalytisch aktive RNA ist blau gezeichnet und die Protein-Komponenten sind als Ovale dargestellt. Zueinander homologe Proteine sind als Ovale in der gleichen Farbe hinterlegt. **(B)** Protein-basierte RNase P. Die katalytisch aktiven Proteine sind blau und zueinander homologe Proteine im gleichen Blauton dargestellt.

Lange Zeit ging man davon aus, dass die RNase P ausschließlich als RNA-basierte Form vorkommt, bis 2008 die humane mitochondriale RNase P, die sich aus drei verschiedenen Proteinuntereinheiten zusammensetzt, identifiziert wurde (Abb. 2B) (Holzmann *et al.*, 2008). Dieser Protein-basierten Enzymform fehlt jegliche RNA-Komponente und eines der drei Proteine (MRPP3) wurde als katalytisch aktive Endonuklease beschrieben. Jenes Protein ist, wenn auch zumeist als singuläres Enzym, unter den Eukaryonten weit verbreitet, kommt in Bakterien und Archaeen aber nicht vor (Gobert *et al.*, 2010; Lechner *et al.*, 2015). Vielmehr wurde in diesen zwei Domänen eine andere Protein-basierte RNase P entdeckt. Bestehend



aus nur einer Protein-Untereinheit wurde diese Form zunächst in *Aquifex aeolicus* identifiziert. Mittels bioinformatischer Analyse wurden dazu homologe Proteine (HARP; *Homologs of Aquifex RNase P*) in weiteren Archaeen und Bakterien gefunden und weiter charakterisiert (Nickel *et al.*, 2017).

## 1.2 RNA-basierte Holoenzyme

### 1.2.1 Bakterielle RNase P

Die bakterielle RNA-Untereinheit (P RNA) ist 340 bis 400 Nukleotide lang und nimmt etwa 90 % der molaren Masse des Holoenzym ein. Die P RNA ist hoch strukturiert und besteht aus zwei unabhängig voneinander gefalteten Domänen: der katalytischen Domäne (C-Domäne) und der Spezifitäts-Domäne (S-Domäne) (Pan, 1995; Loria & Pan, 1996). Der katalytische Kern der P RNA ist hoch konserviert. So lassen sich fünf konservierte Regionen (CR I-V) in Bakterien, Archaeen und Eukaryonten finden (Chen & Pace, 1997). Während diese konservierte Region für die Katalyse und die damit verbundene Bindung von Metallionen zuständig ist, sind periphere Strukturelemente in die Ausbildung von Tertiärstruktur-Interaktionen involviert und sorgen damit für die Stabilität der P RNA (Darr *et al.*, 1992; Steitz & Steitz, 1993; Haas *et al.*, 1994; Warnecke *et al.*, 1996). Anhand der peripheren Strukturelemente, die eine gewisse Variabilität innerhalb der bakteriellen P RNAs aufweisen, lassen sich diese in den sogenannten A- und B-Typ unterteilen. Ein Vertreter des Typs A (*ancestral*) ist die *Thermotoga maritima* P RNA. Die *Bacillus subtilis* P RNA in Abb. 3 hingegen ist dem Typ B (Bacillus) zuzuordnen. Zusätzlich wird in der Literatur auch ein C-Typ (Chloroflexi) beschrieben, der strukturell zwischen Typ A und Typ B einzuordnen ist (Haas & Brown, 1998; Harris *et al.*, 2001).

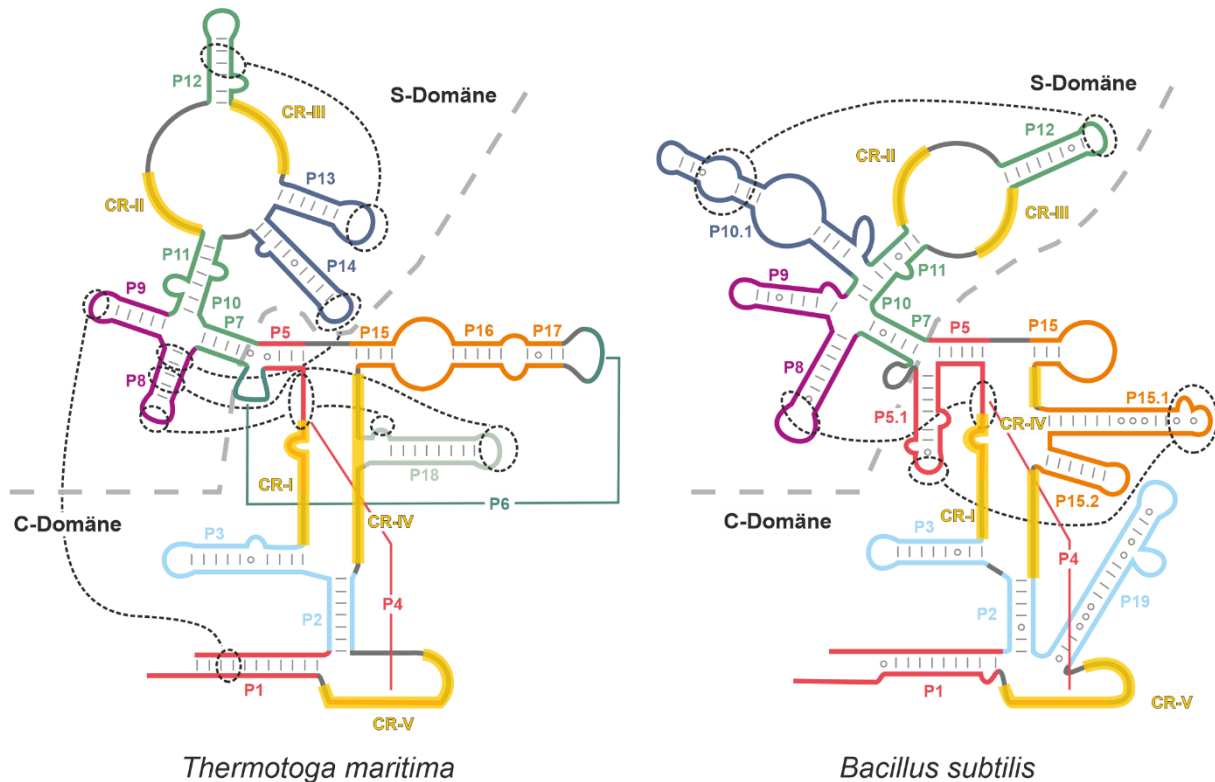


Abb. 3: Bakterielle P RNA

Sekundärstrukturen der *Thermotoga maritima* (Typ A, links) und der *Bacillus subtilis* (Typ B, rechts) P RNA. Die katalytische (C-) und die Spezifitäts-(S-) Domäne sind durch eine graue, gestrichelte Linie voneinander getrennt. Die konservierten Regionen (CR) I-V sind gelb hervorgehoben. Tertiär-Interaktionen sind als gestrichelte Ovale, die mit gestrichelten Linien verbunden sind, dargestellt. Koaxial gestapelte Helices sind in der gleichen Farbe abgebildet. Verändert nach Gößringer *et al.*, 2021.

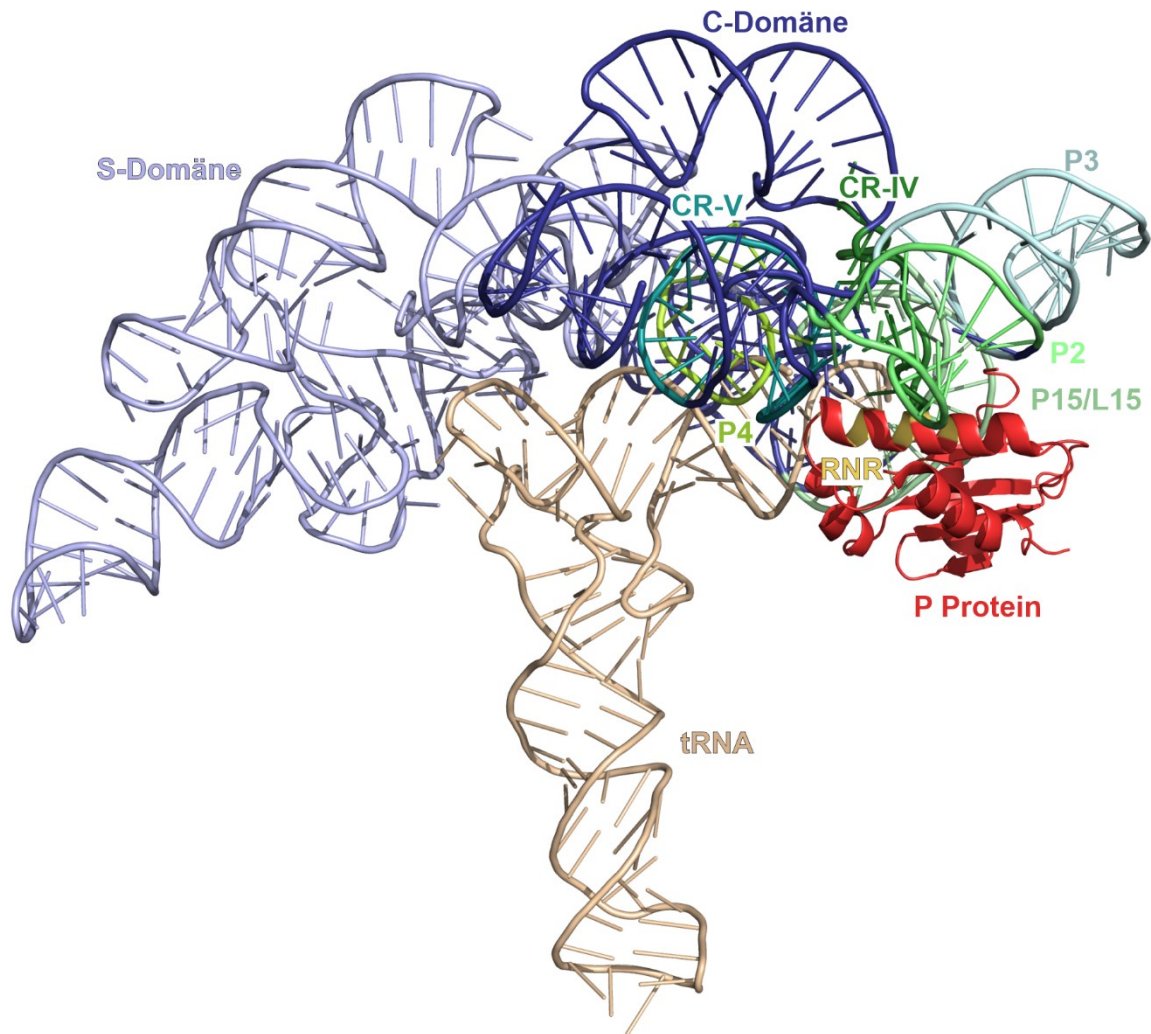
Die katalytische Domäne umfasst ca.  $\frac{2}{3}$  aller P RNA-Nukleotide, enthält das katalytische Zentrum und beinhaltet die konservierten Regionen CR-I, CR-IV und CR-V. Auch ohne die S-Domäne ist die katalytische Domäne in der Lage, prä-tRNA-Substrate zu prozessieren (Wu *et al.*, 2012). Die Helices P1-P5 in der katalytischen Domäne sind sowohl im A- als auch im B-Typ vorzufinden. Das P4 Element mit der Pseudoknoten-Struktur ist universell konserviert und bindet Metallionen, die für die Katalyse essentiell sind (Harris & Pace, 1995; Hartmann & Hartmann, 2003). Charakteristisch für den A-Typ sind die Helices P6 und P16-P18, während Helices P5.1, P15.1, P15.2 nur in B-Typ P RNAs vorkommen (Haas & Brown, 1998). Die Spezifitäts-Domäne interagiert mit dem Substrat und enthält die konservierten Regionen CR-II und CR-III (Pan *et al.*, 1995; Reiter *et al.*, 2010). Die Helices P7-P12 dieser Domäne sind in beiden Typen der bakteriellen P RNAs vertreten. Die Elemente P13 und P14 hingegen sind spezifisch für den A-Typ und das Element P10.1 für den B-Typ (Haas & Brown, 1998).

Eine wichtige Tertiär-Interaktion zwischen C- und S-Domäne ist der Kontakt zwischen L8 und P4. In Typ A-P RNAs stabilisieren zusätzlich die Interaktionen L14-P8, L13-P12, L18-P8 und L9-P1 die Struktur, wobei die beiden letztgenannten Interaktionen nicht immer vorzufinden sind (Massire *et al.*, 1998; Torres-Larios *et al.*, 2005). In Typ B P RNAs sorgen die

Interaktionen L12-P10.1 und L5.1-L15.1, zusätzlich zur bereits genannten Interaktion L8-P4, für die nötige Stabilität (Kazantsev *et al.*, 2005; Walczyk, Willkomm, *et al.*, 2016).

Zur Bildung eines *in vivo*-funktionalen Holoenzym bindet die katalytische P RNA einen Protein-Cofaktor. Bei diesem RNase P Protein handelt es sich um ein kleines, basisches Protein (~13 kDa groß mit einem pI von ~10) mit einer  $\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$ -Topologie (Stams *et al.*, 1998). Vergleicht man die verschiedenen P Proteine untereinander, so stimmen nur 20-30 % der Aminosäuren überein. Dennoch ähneln sich die dreidimensionalen Strukturen der P Proteine (Stams *et al.*, 1998; Spitzfaden *et al.*, 2000; Kazantsev *et al.*, 2003) und so lassen sich diese zwischen verschiedenen Bakterien austauschen (Gößringer & Hartmann, 2007). Die P Proteine verfügen über zwei RNA-bindende Domänen, die sowohl die P RNA als auch das Substrat binden (Kurz *et al.*, 1998; Niranjankumari, Stams, *et al.*, 1998; Biswas *et al.*, 2000; Sharkady & Nolan, 2001). Das RNR-Motiv beinhaltet viele basische Aminosäuren wie auch die beiden namensgebenden Arginine und ist hoch konserviert. Es bindet an die Elemente P2, P3 und P4 inklusive der konservierten Regionen CR-IV und CR-V des katalytischen Zentrums der P RNA (Reiter *et al.*, 2010). Wie der Abb. 4 zu entnehmen ist, ist neben dem katalytischen Zentrum auch P15 in die Protein-RNA-Interaktion involviert.

Die zweite RNA-bindende Domäne, die zentrale Tasche (*central cleft*), wird von der N-terminalen  $\alpha$ -Helix und einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt gebildet und bindet die 5'-Flanke der prä-tRNA (Stams *et al.*, 1998; Reiter *et al.*, 2010). Durch diese Interaktion wird zum einen die Substrat-Enzym-Affinität unter physiologischen Bedingungen erhöht und zum anderen die Produkt-Freisetzung beschleunigt, welches in der RNA-allein Reaktion den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Reich *et al.*, 1988; Crary *et al.*, 1998; Kurz *et al.*, 1998). Außerdem führt die Bindung des P Proteins zur Stabilisierung des katalytischen Zentrums, erhöht die Affinität der für die Katalyse essentiellen  $Mg^{2+}$ -Ionen und erweitert das Substratspektrum (Kurz & Fierke, 2002; Guo *et al.*, 2006; Sun & Harris, 2007). Infolgedessen ist das P Protein *in vivo* essentiell, obwohl die Aminosäuren selbst nicht direkt an der katalytischen Reaktion beteiligt sind. Neben den prä-tRNAs werden auch Vorläufer der 4.5S RNA (Bothwell *et al.*, 1976; Peck-Miller & Altman, 1991) und der tmRNA (Komine *et al.*, 1994) sowie einige *riboswitches* (Altman *et al.*, 2005), virale RNAs (Mans *et al.*, 1990) und Phagen-induzierte regulatorische RNAs (Hartmann *et al.*, 1995; Hernandez-Cid *et al.*, 2012) vom bakteriellen Holoenzym prozessiert.



**Abb. 4: *T. maritima* Holoenzym**

Tertiärstruktur des *Thermotoga maritima* RNase P-Holoenzym mit gebundener tRNA (PDB:3Q1Q; Reiter *et al.*, 2010). Die S-Domäne der P RNA ist hellblau und die C-Domäne dunkelblau dargestellt. Helices, die in die Interaktion mit dem P Protein eingebunden sind, wurden durch grüne und türkise Farbtöne hervorgehoben. Das RNR-Motiv des P Proteins (rot) ist gelb und die tRNA beige eingefärbt.

### Substraterkennung

Die Substraterkennung der prä-tRNA durch das Holoenzym erfolgt hauptsächlich über Interaktionen mit der P RNA. Diese sind in der Kristallstruktur des ternären Komplexes aus dem *T. maritima* Holoenzym und der tRNA deutlich erkennbar und stimmen mit den zuvor in zahlreichen biochemischen und genetischen Studien beschriebenen Interaktionen überein (Reiter *et al.*, 2010; Gößringer *et al.*, 2021). Der Anticodonarm der tRNA ist vom Holoenzym abgewandt, während Akzeptorstamm und T-Arm in Richtung der flachen P RNA zeigen (Abb. 5). Die Interaktionen finden in zwei Bereichen der tRNA statt: zum einen im Akzeptorstamm nahe der Spaltstelle und zum anderen an der Ecke der L-förmigen tRNA. In letztgenannter Region bildet ein ungepaartes Adenosin der Helix P11 (A198 in *T. maritima* P RNA) ein *A-minor*-Motiv mit dem terminalen Basenpaar des T-Stamms direkt neben der T-Schleife (G<sub>53</sub>:C<sub>61</sub>) aus (Abb. 5C) (Pan *et al.*, 1995; Loria & Pan, 1997; Siew *et al.*, 1999). Die Interaktion wird durch das benachbarte *Hoogsteen*-Basenpaar der tRNA (U<sub>54</sub>:A<sub>58</sub>) stabilisiert, da dieses Wasserstoffbrücken zu den beiden benachbarten Basen des für die Interaktion essentiellen Adenosins der P RNA ausbildet. In unmittelbarer Nähe kommt es zur Interaktion zwischen ungestapelten Basen der T- bzw. D-Schleife der tRNA und Basen der konservierten Regionen CR-II und CR-III der Spezifitäts-Domäne der P RNA (Abb. 5D) (Hardt *et al.*, 1995; Loria & Pan, 1997; Loria *et al.*, 1998). Das Basenpaar G<sub>19</sub>:C<sub>56</sub>, welches die T-Schleife mit der D-Schleife verknüpft, bindet durch Basenstapelung an zwei ebenfalls ungestapelte Basen (A<sub>112</sub> und G<sub>147</sub> in *T. maritima* P RNA), die durch die beiden T-Schleifen der CR-II und CR-III exponiert sind. Diese beiden Interaktionen verdeutlichen, wie essentiell die Spezifitäts-Domäne für die Substraterkennung ist.

Darüber hinaus kommt es nahe der Spaltstelle zur Basenpaarung der Nukleotide des 3'-NCCA-Endes mit den komplementären Basen aus der katalytischen Domäne der P RNA in der L15-Schleife (Kirsebom & Svärd, 1994; Svärd *et al.*, 1996; Busch *et al.*, 2000; Wegscheid & Hartmann, 2007). Im Falle der *T. maritima* RNase P werden folgende *Watson-Crick* Basenpaare ausgebildet: A<sub>73</sub>:U<sub>256</sub>, C<sub>74</sub>:G<sub>255</sub> und C<sub>75</sub>:G<sub>254</sub> (Abb. 5A). Eine weitere Interaktion in dieser Region sind Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den tRNA-Nukleotiden G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> und C<sub>72</sub> und Nukleotiden der Elemente P4 (U<sub>315</sub> in *T. maritima* P RNA), J5/15 (C<sub>212</sub> und A<sub>213</sub> in *T. maritima* P RNA) und P5 (G<sub>211</sub> in *T. maritima* P RNA) (Reiter *et al.*, 2010). Hervorzuheben ist hierbei das Nukleotid A<sub>213</sub>, welches zusätzlich mit dem Nukleotid an Position -1 (N<sub>-1</sub>) der prä-tRNA 5'-Flanke interagiert und  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit C<sub>72</sub> am Ende des Akzeptorstamms eingeht (Zahler *et al.*, 2003; Reiter *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2014) (Abb. 5B).



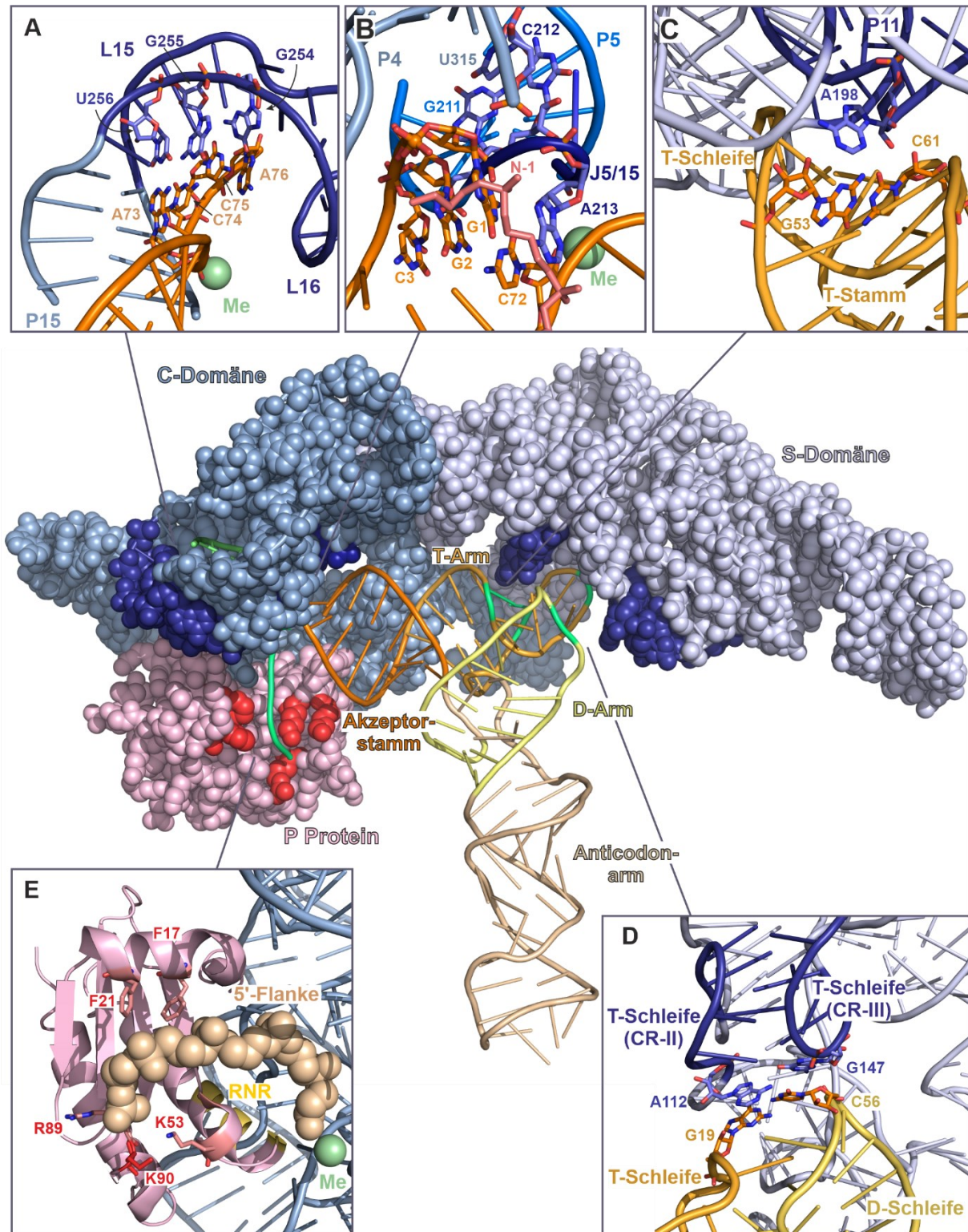


Abb. 5: Substraterkennung der bakteriellen RNase P

Tertiärstruktur des *Thermotoga maritima* RNase P-Holoenzym mit gebundener tRNA und 5'-Flanke (PDB: 3Q1R; Reiter *et al.*, 2010). Für die 5'-Flanke konnte durch *Soaking*-Experimente lediglich die Struktur des Phosphatrückgrats aufgelöst werden. Die C-Domäne (mittelblau), die S-Domäne (hellblau) und das P Protein (hellrot) sind in Analogie zu Abb. 4 in der Raum-füllenden Ansicht dargestellt. Bereiche, die in die Interaktion mit der prä-tRNA eingebunden sind, sind dunkelblau bzw. dunkelrot hervorgehoben. Die strukturellen Domänen der tRNA sind gelb-orange eingefärbt und Regionen der Kontaktflächen zum Holoenzym sind grün markiert. Essentielle Elemente der Substraterkennung sind im Detail (A-E) gezeigt. In diesen Ausschnitten wurden folgende Farben für die einzelnen Atome gewählt: Stickstoff: blau und Sauerstoff: rot. Verändert nach Gößringer *et al.*, 2021.

Auch wenn das P Protein nicht mit der murenen tRNA interagiert, trägt es durch die Interaktion mit der 5'-Flanke zur Substraterkennung bei. Wie oben beschrieben, bindet die 5'-Flanke in die zentrale Tasche des Proteins. In diese Interaktion sind nicht nur die Nukleotide N<sub>2/3</sub> bis N<sub>5</sub> involviert, sondern vermutlich noch darüber hinaus jene bis N<sub>7/8</sub> (Abb. 5E) (Koutmou *et al.*, 2010; Niland *et al.*, 2016, 2017). Die Beteiligung vornehmlich basischer und aromatischer Aminosäuren an dieser Interaktion lässt vermuten, dass es sich bei diesen Interaktionen sowohl um hydrophile als auch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen handelt.

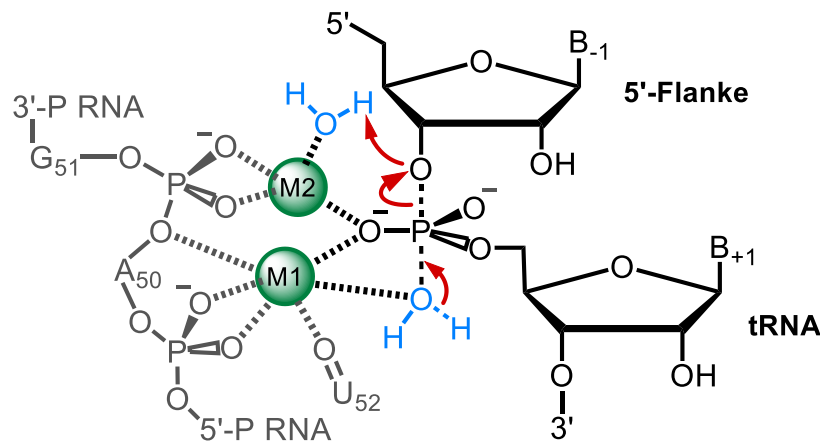
Für eine korrekte Spaltung von Substraten sind nicht alle an der Substraterkennung beteiligten Strukturelemente essentiell. So werden auch haarnadelartige Substrate, bestehend aus 5'-Flanke, 3'-CCA-Motiv und einer Helix, welche den koaxial gestapelten Akzeptorstamm und T-Arm nachahmt, an der kanonischen Spaltstelle prozessiert (McClain *et al.*, 1987; Hansen *et al.*, 2001). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass selbst das Verkürzen der Helix auf drei bzw. vier Basenpaare immer noch zu einer korrekten Substratspaltung führte (Hansen *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2012). Dies macht eine Interaktion vergleichbar mit der tRNA in der Region von D- und T-Schleife unmöglich. Dementsprechend scheinen vor allem die Interaktionen nahe der Spaltstelle im bakteriellen Enzym entscheidend für eine korrekte Prozessierung zu sein.

### **Katalysemechanismus**

Die endonukleolytische Hydrolyse der Phosphodiesterbindung verläuft über einen Zwei-Metallionen-Mechanismus (Steitz & Steitz, 1993), welcher bereits für Protein-basierte Enzyme wie die DNA-Polymerase I und die Alkalische Phosphatase beschrieben wurde (Han *et al.*, 1991; Coleman, 1992). Allerdings ist im Falle der RNase P bisher noch nicht vollständig geklärt, wie viele Metallionen im katalytischen Zentrum tatsächlich vorzufinden sind. So sind vermutlich weitere Metallionen neben den beiden, die für die Katalyse essentiell sind, involviert (Smith & Pace, 1993; Reiter *et al.*, 2010; Klemm *et al.*, 2016). Diese wären zwar nicht direkt an der Reaktion beteiligt, jedoch für die korrekte RNA-Faltung und Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes verantwortlich (Reiter *et al.*, 2010). Aus der RNase P-katalysierten Reaktion geht eine 5'-Flanke mit 3'-Hydroxylgruppe und eine mature tRNA mit 5'-Phosphatgruppe hervor.

Der erste Schritt der S<sub>N</sub>2-Reaktion ist der nukleophile Angriff eines als Hydroxylanion-aktivierten Wassermoleküls auf das Phosphatrückgrat der prä-tRNA (Abb. 6). Dieser Schritt der Reaktion wird durch Metallion 1 ermöglicht, welches das Nukleophil koordiniert und damit aktiviert (Cassano *et al.*, 2004). Daraus resultiert ein penta-koordiniertes Phosphoratom im trigonal-bipyramidalen Übergangszustand, welcher durch beide Metallionen stabilisiert wird. Dabei wird durch die Koordination beider Metallionen an den sogenannten *pro-R<sub>p</sub>*-Sauerstoff des Übergangszustandes die zusätzlich entstandene negative Ladung stabilisiert (Steitz & Steitz, 1993). Durch Phosphorthioat-Modifikationen an den beiden nicht-bindenden

Sauerstoffatomen konnte gezeigt werden, dass es tatsächlich der *pro-R<sub>p</sub>*-Sauerstoff ist, welcher in die Metallionen-Koordination involviert ist (Warnecke *et al.*, 1996, 1999; Chen *et al.*, 1997). Im nächsten Schritt kommt es zum Zerfall des Übergangszustandes unter Ausbildung eines Oxyanions am 3'-Ribose-Sauerstoff der 5'-Flanke. Das Oxyanion wird durch Metallion 2, welches als Lewis-Säure agiert, stabilisiert und im Weiteren durch ein ebenfalls an Metallion 2 koordiniertes Wassermolekül protoniert (Steitz & Steitz, 1993). Somit sind für die Katalyse beide Metallionen nötig und es bedarf einer genauen Positionierung dieser durch die P RNA. Die Metallionen werden durch nicht-bindende Sauerstoffatome des Phosphatrückgrats sowie Sauerstoffatome der Nukleotidbasen koordiniert. All jene Sauerstoffatome sind Teil der hoch konservierten Helix P4 der katalytischen P RNA (Christian *et al.*, 2000; Crary *et al.*, 2002; Reiter *et al.*, 2010). Bei den beiden Metallionen handelt es sich vermutlich um zweiwertige Magnesiumionen; es konnte aber auch in Anwesenheit von ausschließlich Manganionen eine Katalyse beobachtet werden (Guerrier-Takada *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1992).



**Abb. 6: Übergangszustand der Phosphodiesterhydrolyse**

Nach nukleophilem Angriff eines zuvor aktivierten Wassermoleküls (blau) auf den Phosphodiester kommt es zunächst zur Ausbildung eines trigonal-bipyramidalen Übergangszustandes. Dieser wird durch die Koordination eines nicht in die Diesterbindung involvierten Sauerstoffatoms über seine freien Elektronenpaare an zwei Metallionen (grün) stabilisiert. Der 3'-Ribose-Sauerstoff der 5'-Flanke fungiert als Abgangsgruppe, wobei das entstehende Oxyanion durch Metallion 2 stabilisiert und durch ein weiteres Wassermolekül (blau) protoniert wird. Modifiziert nach Klemm *et al.*, 2016.

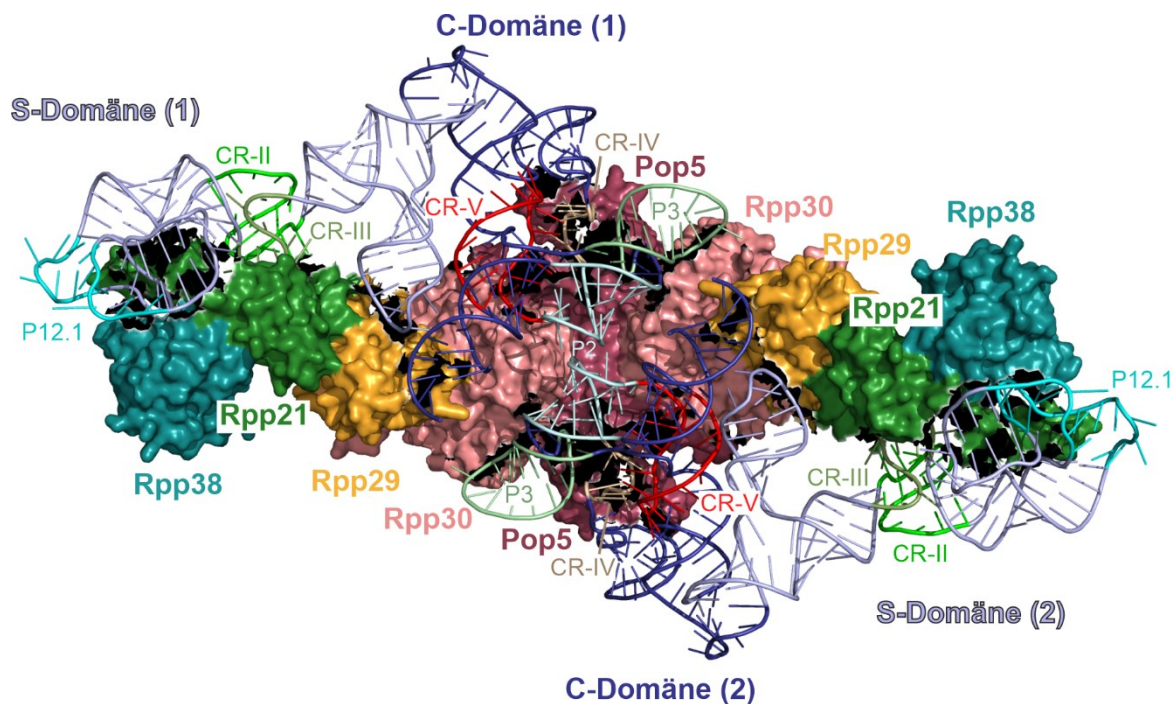
### 1.2.2 Archaeale RNase P

Die archaeale RNase P besteht aus einer katalytischen RNA-Untereinheit und vier bis fünf Proteinkomponenten, wodurch der Proteinanteil im Holoenzym von 10 % auf 40 % im Vergleich zum bakteriellen Enzym erhöht ist. Anhand der P RNA lassen sich die Enzyme der Archaeen in drei Typen unterteilen. Der Typ A (*ancestral*) kommt am häufigsten vor und unterscheidet sich von der bakteriellen Typ A-RNA im Wesentlichen durch das Fehlen der Regionen P13/P14 und P18 (Harris *et al.*, 2001). Durch diese strukturelle Veränderung wird weder das aktive Zentrum noch die Substraterkennung beeinflusst, jedoch können für die Stabilität der P RNA essentielle Tertiärinteraktionen nicht mehr ausgebildet werden (vgl. Abb. 3, Seite 4). Dieser Stabilitätsverlust der P RNA wird durch die zusätzlichen



Protein-Untereinheiten kompensiert. Trotz alledem wurde für die archaeale Typ A-P RNA auch eine RNA-allein Aktivität beobachtet (Pannucci *et al.*, 1999). Bei dem Typ M (Methanococci) fehlen zusätzlich die Elemente P8, P16, P6 und L15 (Harris *et al.*, 2001). Dies führt zu einem weiteren Stabilitätsverlust durch den Wegfall der Interaktion zwischen L8 und P4 und zum Ausbleiben der wichtigen Substratinteraktion der L15-Schleife mit dem 3'-CCA-Motiv, sodass für diese P RNA keine RNA-allein Aktivität mehr beobachtet werden konnte (Pannucci *et al.*, 1999). Der Typ T (Thermoproteaceae) stellt die kleinste P RNA dar, die im Vergleich zur bakteriellen P RNA lediglich aus der katalytischen Domäne besteht und im Gegensatz zum Typ M noch die Regionen P15, P16 und P6 enthält (Lai *et al.*, 2010). Bezüglich der fünf Protein-Komponenten ist keines homolog zu dem bakteriellen P Protein, jedoch sind alle zu den entsprechenden Proteinen des eukaryontischen Holoenzym homolog (Hall & Brown, 2002).

Anhand der kürzlich publizierten Kryo-Elektronenmikroskop-Struktur der Typ M RNase P aus *Methanocaldococcus jannaschii* wird die Architektur des gesamten Holoenzym und die Anordnung der einzelnen Proteine deutlich (Abb. 7) (Wan *et al.*, 2019).



**Abb. 7: Archaeales Holoenzym**

Tertiärstruktur der *Methanocaldococcus jannaschii* RNase P (PDB: 6K0A; Wan *et al.*, 2019). Die P RNA ist als Cartoon blau dargestellt (C-Domäne: dunkelblau; S-Domäne: hellblau), wobei 1 und 2 die jeweiligen Monomere bezeichnet. Regionen der P RNA, die mit den Proteinen interagieren, wurden in anderen Farben hervorgehoben. Für die Proteine wurden die Oberflächendarstellung sowie Rot- und Grüntöne gewählt. Modifiziert nach Schencking *et al.*, 2020.

Das gesamte Holoenzym besitzt eine dimere Konformation mit zwei P RNA-Molekülen und einem zentralen (Pop5-Rpp30)<sub>2</sub> Heterotetramer, über welches die Dimerisierung vermittelt wird. Dieses Heterotetramer bindet zwei P RNAs in der Nähe des katalytischen

Zentrums (CR-IV, CR-V, P2 und P3) und sorgt somit für dessen Stabilität (Wan *et al.*, 2019). Außerdem wird die Spezifitäts-Domäne der P RNA durch die anderen drei Proteine stabilisiert. Diese binden wiederum als Heterotrimer Rpp29-Rpp21-Rpp38 an jede Seite des zentralen Heterotetramers. Rpp29 bindet hierbei an Rpp30 und dient als verknüpfendes Element zwischen der katalytischen und der Spezifitäts-Domäne. Rpp21 bindet indessen an die durch CR-II und CR-III gebildeten T-Schleifen, wohingegen Rpp38 an das für die archaeale P RNA charakteristische, verlängerte P12 Element bindet (Wan *et al.*, 2019). Insgesamt sorgen die Proteine für eine Stabilisierung der P RNA und deren korrekte Positionierung für die Katalyse. Bezüglich der Substraterkennung liegen nur wenige Studien vor und detaillierte Aussagen sind anhand der Struktur des Komplexes aus Holoenzym und tRNA mit einer Auflösung von ~4 Å nur schwer möglich (Wan *et al.*, 2019). Die Basenstapelung zwischen T- und D-Schleife der tRNA und den T-Schleifen der Spezifitäts-Domäne der P RNA aus der bakteriellen RNase P scheint auch im archaealen Enzym vorhanden zu sein. Daneben wird eine *A-minor*-Interaktion nahe der Spaltstelle diskutiert (Wan *et al.*, 2019).

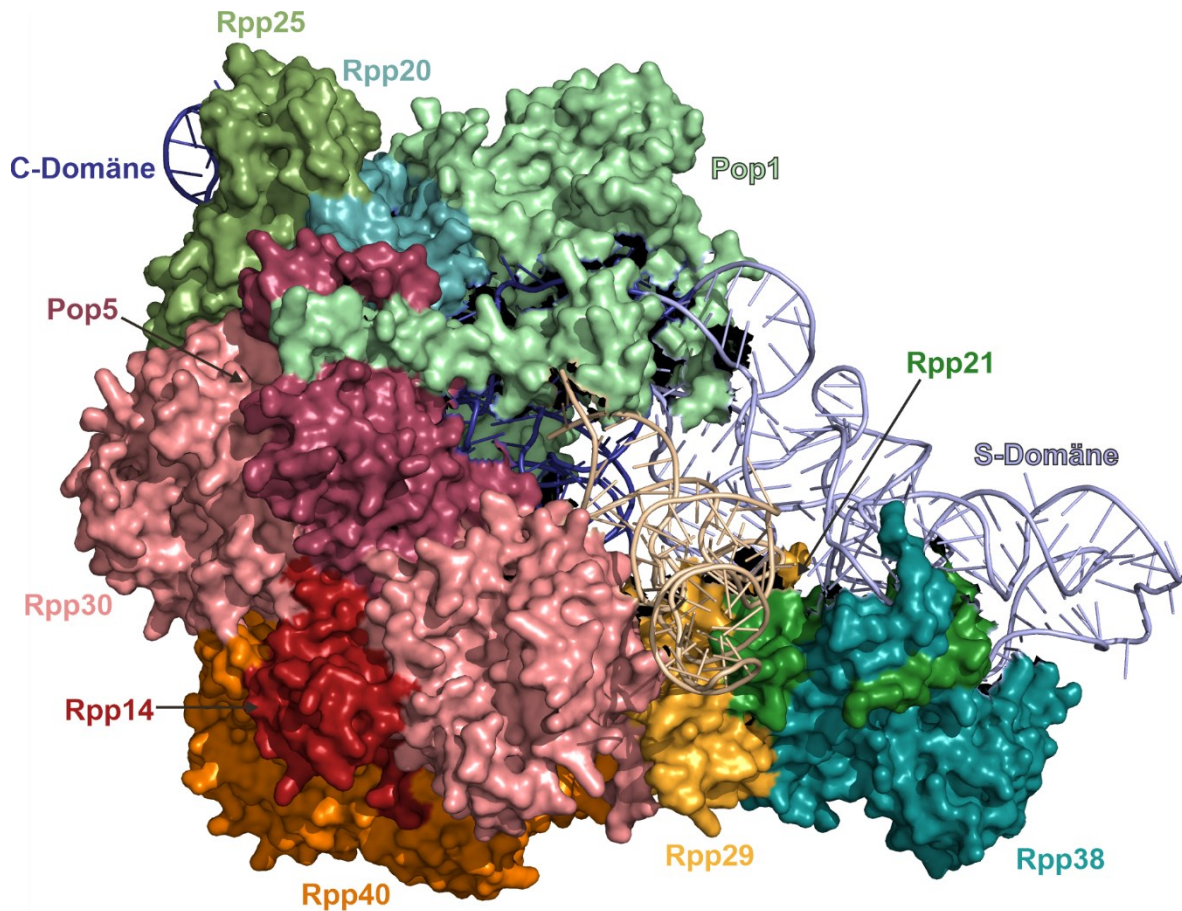
### 1.2.3 Eukaryontische RNase P

Das eukaryontische Holoenzym, welches im Zellkern lokalisiert ist, wurde am besten in Hefe und im Menschen untersucht. In Hefe besteht das Enzym aus einer RNA-Untereinheit und neun Protein-Untereinheiten, wohingegen im humanen System eine weitere Proteinkomponente vorzufinden ist (Jarrous, 2002; Walker & Engelke, 2006). Somit ist der Proteinanteil im Vergleich zum archaealen System weiter erhöht und nimmt etwa 70 % der Holoenzym-Gesamtmasse ein.

Die P RNA ähnelt in ihrer Komplexität der Typ M-RNA in Archaeen. Es sind lediglich die Elemente P1, P2, P3, P4, P7, P8, P9, P10, P11 und P12 inklusive der konservierten Regionen CR-I bis CR-V vorhanden, wobei die P3 Haarnadelstruktur der bakteriellen und archaealen P RNAs durch eine Helix-Schleife-Helix-Struktur ersetzt ist (Frank *et al.*, 2000). Obwohl die Struktur damit weniger Stabilität insbesondere in der Region P7-P10/11 aufweist, konnte dennoch eine schwache aber spezifische RNA-allein Aktivität festgestellt werden (Kikovska *et al.*, 2007). Die eukaryontische P RNA ist weniger konserviert; allerdings sind die Sequenzunterschiede vornehmlich in den peripheren Elementen zu finden (Frank *et al.*, 2000). Die eukaryontische P RNA ist im Vergleich zur archaealen P RNA noch Protein-abhängiger geworden, da 9-10 Proteine für ein *in vivo*-funktionales Enzym an die P RNA binden. Die Struktur dieses Holoenzym wurde für das humane Enzym sowie das Hefeenzym mittels Kryoelektronenmikroskopie gelöst (Lan *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018). Anhand des humanen Enzyms soll im Folgenden der strukturelle Aufbau des Holoenzym erläutert werden (Wu *et al.*, 2018).

Neben den fünf zum archaealen Enzym homologen Proteinen umfasst das humane Holoenzym fünf weitere Proteinkomponenten (Pop1, Rpp25, Rpp20, Rpp14 und Rpp40)

(Eder *et al.*, 1997; Jarrous, 2002; Walker & Engelke, 2006). Die insgesamt zehn Proteine, von denen keines zum bakteriellen RNase P Protein homolog ist, umschließen die P RNA so, dass nur eine Region der P RNA frei zugänglich bleibt (Abb. 8). Die RNA-Untereinheit interagiert mit jedem einzelnen der Proteine (Wu *et al.*, 2018).



**Abb. 8: Humanes, nukleäres Holoenzym**

Tertiärstruktur des humanen Holoenzym (PDB: 6AHR; Wu *et al.*, 2018). Die P RNA ist als *Cartoon* blau und die tRNA beige dargestellt (C-Domäne: dunkelblau; S-Domäne: hellblau). Für die Proteine wurde die Oberflächendarstellung gewählt. Proteine, die zum archaealen Enzym homolog sind, tragen die gleiche Farbe wie in Abb. 7. Modifiziert nach Schencking *et al.*, 2020.

Das größte Protein ist das Pop1-Protein (~115 kDa), das sowohl mit der katalytischen als auch der Spezifitäts-Domäne der P RNA interagiert (Wu *et al.*, 2018). An Pop1 bindet ein Heterodimer, bestehend aus Rpp20 und Rpp25, welches mit dem für die eukaryontische P RNA spezifischen Element P3 Wechselwirkungen eingeht (Perederina *et al.*, 2007, 2010; Esakova *et al.*, 2008). An dieses Dimer sowie an Pop1 bindet das zentrale Heteropentamer Pop5-Rpp14-(Rpp30)<sub>2</sub>-Rpp40. Im Vergleich zum archaealen Enzym mit einem zentralen (Pop5-Rpp30)<sub>2</sub> Heterotetramer ist eine Pop5 Untereinheit gegen Rpp14 ausgetauscht und ein weiteres Protein (Rpp40) dazugekommen. Pop5 und ein Rpp30-Molekül interagieren nahe dem katalytischen Zentrum mit CR-IV und CR-V, während Rpp14, Rpp40 und das zweite Molekül Rpp30 durch Interaktionen mit P1, P2 und P19 auch zur Stabilität der katalytischen Domäne beitragen (Wu *et al.*, 2018). An dieses Heteropentamer bindet das Rpp29-Rpp21-

Rpp38 Heterotrimer, das in Analogie zum archaealen System zur Stabilität der Spezifitäts-Domäne beiträgt: Rpp29 fungiert wie im archaealen Enzym als verknüpfendes Element zwischen C- und S-Domäne, Rpp21 stabilisiert die CR-II/III Region und Rpp38 bindet an das Element P12.1 (Wu *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2019).

Der Aufbau des Hefe-Holoenzym ist grundsätzlich ähnlich, allerdings fehlen die Proteine Rpp14 und Rpp40. Anstelle dieser beiden Proteine bildet das für die Hefe spezifische Protein Pop8 ein zentrales Heterotetramer mit den zu Pop5 und Rpp30 homologen Proteinen (Pop8-(Rpp30)<sub>2</sub>-Pop5) (Lan *et al.*, 2018). Als ein weiterer Unterschied ist die Struktur von Pop1 zu nennen. Diese weicht deutlich von der Struktur im humanen Enzym ab und scheint an die veränderte P RNA-Struktur angepasst zu sein (Lan *et al.*, 2018). Neben der Funktion der Stabilisierung der P RNA für die Katalyse, wie im archaealen System, sind die Proteine im eukaryontischen Enzym auch direkt an der Substratinteraktion beteiligt. So bindet Pop1 das prä-tRNA-Substrat am terminalen Akzeptorstamm-Basenpaar (Lan *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018). Diese Interaktion ist vergleichbar mit der für das bakterielle Enzym erwähnten A213-Interaktion, wobei allerdings eine RNA-RNA-Interaktion durch eine Protein-RNA-Interaktion ersetzt ist. Anhand der Kryo-EM-Struktur der humanen bzw. der Hefe RNase P mit gebundener tRNA wird eine zweite Substratinteraktions-Region deutlich (Lan *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018). Zusätzlich wird neben der Interaktion nahe der Spaltstelle auch die Ecke der L-förmigen tRNA erkannt, in der es, wie im bakteriellen Enzym auch, zu einer Basenstapelung zwischen T- und D-Schleife der tRNA und CR-II bzw. CR-III der P RNA kommt. Diese zwei Interaktionen stehen im Einklang mit dem anhand von biochemischen Studien beschriebenen Längenmess-Mechanismus zwischen Spaltstelle und Ellbogen-Region der tRNA (Carrara *et al.*, 1995; Yuan & Altman, 1995).

## 1.3 Protein-basierte Form

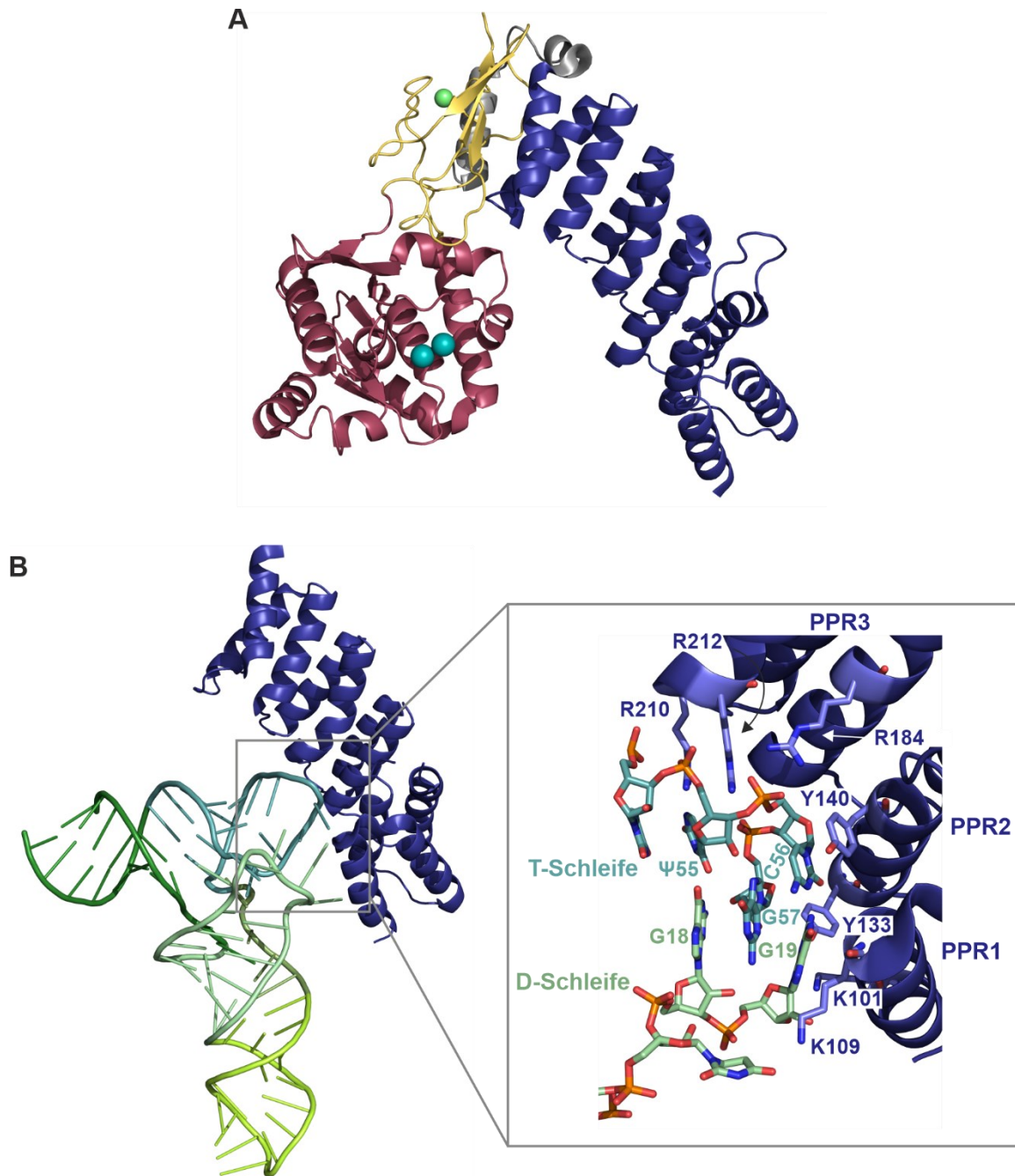
### 1.3.1 PRORP

Neben der RNA-basierten RNase P ist in Eukaryonten auch eine ausschließlich Protein-basierte Form vorzufinden. Diese wurde zunächst in humanen Mitochondrien identifiziert und charakterisiert (Holzmann *et al.*, 2008). Sie setzt sich aus drei Untereinheiten zusammen: (1) der tRNA Methyltransferase 10C TRMT10C (MRPP1), (2) dem SDR5C1, welches zur *short-chain dehydrogenase / reductase*-(SDR-) Familie gehört (MRPP2) und (3) der Metallonuklease MRPP3 (mitochondriales RNase P Protein 3), welche die katalytische Komponente darstellt. Gleichwohl sind alle drei Untereinheiten für eine effiziente prä-tRNA-Prozessierung *in vitro* essentiell und der *knockdown* der einzelnen Komponenten *in vivo* führte jeweils zu einer Akkumulation von prä-tRNAs (Holzmann *et al.*, 2008; Lopez Sanchez *et al.*, 2011). SDR5C1 werden verschiedene biologische Funktionen zugesprochen wie z.B. die L-3-Hydroxy-2-Methylacyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation von

kurzkettigen Fettsäuren sowie Isoleucin, aber auch die Oxidation von verschiedenen Alkoholen und Hydroxysteroiden. Ebenso wurde die Funktion als Amyloid- $\beta$ -bindendes Protein beschrieben (Luo *et al.*, 1995; Yan *et al.*, 1997; He *et al.*, 1999). TRMT10C gehört zu den TRM10-Enzymen, die als S-Adenosylmethionin-abhängige Methyltransferasen die N<sup>1</sup>-Methylierung von Guanosin oder Adenosin an Position 9 von tRNAs katalysieren (Jackman *et al.*, 2003). Welche Rolle allerdings SDR5C1 und TRMT10C in dem ternären Komplex für die prä-tRNA-Prozessierung übernehmen, ist bisher noch unklar (Schencking *et al.*, 2020). Es wird diskutiert, dass die Metallonuklease MRPP3 durch die Bindung des Dimers TRMT10C-SDR5C1 in eine aktive Konformation überführt wird, die erst dann in der Lage ist, die für die Katalyse essentiellen Metallionen zu binden. Dies wurde anhand von MRPP3-Kristallstrukturen, welche die katalytische Domäne von MRPP3 in einer inaktiven Konformation zeigen, geschlussfolgert. Allerdings sollte dabei berücksichtigt werden, dass für die Kristallisation nicht das Volllängen-Protein sondern eine verkürzte, katalytisch inaktive Variante gewählt wurde (Li *et al.*, 2015; Reinhard *et al.*, 2015).

Bioinformatisch gestützte Recherchen identifizierten homologe Proteine der Metallonuklease MRPP3 unter anderem in *Arabidopsis thaliana* und *Trypanosoma brucei* (Gobert *et al.*, 2010; Taschner *et al.*, 2012). Für diese konnte gezeigt werden, dass sie als singuläres Protein die RNase P-Funktion sowohl im Zellkern als auch den Mitochondrien / Chloroplasten ausüben (Gutmann *et al.*, 2012). Die Enzymklasse, die unter Eukaryonten weit verbreitet ist, wurde PRORP genannt, was für *proteinaceous* oder *protein-only RNase P* steht (Lechner *et al.*, 2015). Komplementationsstudien mit den *T. brucei* und *A. thaliana* PRORP-Enzymen zeigten, dass die singulären Protein-Enzyme die Funktion der RNA-basierten RNase P sowohl in Hefen (Taschner *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2014) als auch in Bakterien (Gobert *et al.*, 2010) übernehmen können. Die PRORP-Enzyme aus *A. thaliana* sind dabei am besten untersucht. Insgesamt gibt es drei Varianten: PRORP1, welches in Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiert ist, PRORP2 und PRORP3, die im Zellkern vorzufinden sind (Gobert *et al.*, 2010). PRORP1 ist *in vivo* essentiell, während eine Deletion von PRORP2 und PRORP3 hingegen nur in Kombination letal ist (Gutmann *et al.*, 2012). Weiterhin sind die Isoformen einander strukturell sehr ähnlich (~80 % Sequenzidentität) und ca. 60 kDa groß. Anhand der für PRORP1 und PRORP2 gelösten Kristallstrukturen wird deutlich, dass die Enzyme aus drei verschiedenen Domänen bestehen (Howard *et al.*, 2012; Karasik *et al.*, 2016). Die PRORP-Enzyme haben eine charakteristische  $\Lambda$ -Form, bei der die N-terminale *pentatricopeptide repeat*- (PPR-) Domäne den einen Arm und die C-terminale Metallonuklease-Domäne den anderen Arm darstellt. Diese beiden Domänen sind an der Spitze der  $\Lambda$ -Form über eine Zink-bindende Domäne miteinander verknüpft (Abb. 9A).





**Abb. 9: PRORP-Struktur und tRNA-Bindung**

(A) Tertiärstruktur von PRORP1 aus *Arabidopsis thaliana* (PDB: 6AHR; Howard *et al.*, 2012). Die katalytische Metallonuklease-Domäne ist rot, die Zink-bindende Domäne gelb und die PPR-Domäne dunkelblau dargestellt. Das Zinkion ist grün eingefärbt und die zwei potentiell katalytischen Metallionen türkis. Modifiziert nach Schencking *et al.*, 2020. (B) Bindung der PPR-Domäne an die T- und D-Schleife der tRNA (PDB: 6LVR). Links ist die Tertiärstruktur der PPR-Domäne von PRORP1 (blau) mit gebundener tRNA<sup>Phe</sup> (Grüntöne) gezeigt. Der Akzeptorstamm ist dunkelgrün, der T-Arm türkis, die D-Domäne hellgrün und der Anticodon-Arm gelb-grün dargestellt. Rechts ist die Bindetasche in einer näheren Ansicht gezeigt. PRORP1 und die tRNA sind gefärbt wie im linken Bild und folgende Farben wurden für die einzelnen Atome gewählt: Phosphor: orange, Stickstoff: blau und Sauerstoff: rot. Verändert nach Teramoto *et al.*, 2020.

Das PPR-Motiv setzt sich aus hintereinander gereihten Helix-Turn-Helix-Motiven, bestehend aus je ca. 35 Aminosäuren, zusammen (Small & Peeters, 2000; Giegé, 2013). Im Falle von PRORP1 sind es insgesamt 5,5 PPR-Wiederholungen, also insgesamt elf  $\alpha$ -Helices. Daraus resultiert eine rechtsgängige superhelikale Struktur, die für PPR-Proteine typisch ist. Die

Funktion dieser N-terminalen Domäne besteht in der Bindung des prä-tRNA-Substrats (Pinker *et al.*, 2017). Die zentrale Zink-bindende Domäne, die ein antiparalleles 4-strängiges  $\beta$ -Faltblatt und zwei Schleifenregionen beinhaltet, verleiht dem Protein eine gewisse Flexibilität und ermöglicht so, dass die PPR-Domäne in der für die Katalyse richtigen Orientierung zur Metallonuklease-Domäne angeordnet ist (Howard *et al.*, 2012). Weiterhin weist die Metallonuklease-Domäne eine *Rossmannoid*-Faltung mit einem zentralen  $\beta$ -Faltblatt aus fünf parallelen  $\beta$ -Strängen auf, das an beiden Seiten von  $\alpha$ -Helices umgeben ist (Howard *et al.*, 2012; Matelska *et al.*, 2017). PRORP gehört somit zur Nuklease-Familie mit PIN (PiIT N-terminal) -Domäne. Innerhalb der PIN-Domänen Enzyme ist PRORP allerdings nicht, wie häufig beschrieben, der NYN (Nedd4-BP1, YacP Nuclease) -Gruppe zugehörig, sondern stellt aufgrund struktureller Unterschiede eine separate Untergruppe dar (Matelska *et al.*, 2017; Gobert *et al.*, 2019). Das katalytische Zentrum befindet sich in der C-terminalen Region der zentralen  $\beta$ -Stränge und enthält vier hoch konservierte Aspartat-Aminosäuren, die die Metallionen für die Katalyse koordinieren (Howard *et al.*, 2012). Ähnlich zum RNA-basierten Enzym erfolgt die Katalyse ebenfalls über einen Zwei-Metallionen-Mechanismus (Howard *et al.*, 2015), bei dem Metallion 1 ein Wassermolekül für den nukleophilen Angriff aktiviert und Metallion 2 die Bildung eines 3'-Oxyanions ermöglicht. Beide Metallionen stabilisieren zusätzlich den Übergangszustand, indem sie im PRORP-Enzym an den *pro-S<sub>p</sub>*-Sauerstoff des zu spaltenden Phosphodiesters binden und nicht wie im RNA-basierten Enzym an den *pro-R<sub>p</sub>*-Sauerstoff (vgl. Abb. 6, Seite 10) (Howard *et al.*, 2015; Walczyk, Gößringer, *et al.*, 2016). Die Architektur des aktiven Zentrums der beiden RNase P-Formen unterscheidet sich deutlich, da im RNA-basierten Enzym die Metallionen über die nicht-bindenden Sauerstoffatome des P RNA Phosphatrückgrats koordiniert werden (Abb. 6, Seite 10) und im Protein-basierten Enzym über Carboxylgruppen von Aspartat-Seitenketten (Howard *et al.*, 2015).

Die Bindung der prä-tRNA-Substrate scheint im PRORP Enzym zum einen über die PPR-Domäne, die die Ecke der L-förmigen tRNA bindet, und zum anderen über die Metallonuklease-Domäne, die nahe der Spaltstelle an das Substrat bindet, zu erfolgen (Abb. 9B). Typisch für PPR-Proteine ist eine Sequenz-spezifische Bindung der RNA-Substrate vor allem über die Positionen 5 und 35 eines PPR-Motivs (Yagi *et al.*, 2013). Wie die Kristallstruktur der PPR-Domäne aus PRORP1 mit gebundener tRNA kürzlich zeigen konnte, trifft dies aber nicht auf PRORP zu (Teramoto *et al.*, 2020). Hier interagieren die PPR-Elemente 1-3 mit der T- und D-Schleife der tRNA (Abb. 9B). Vor allem G19 und C56 der tRNA, die die T-Schleife mit der D-Schleife verbinden und auch bei der Substratinteraktion in der RNA-basierten RNase P eine Rolle spielen, sind für die Substraterkennung durch die PPR-Domäne essentiell. G19 wird durch Tyr133 (PPR1) über Wasserstoffbrücken gebunden, wohingegen C56 mit Tyr140 (PPR2)  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen eingeht. Ferner bindet  $\Psi$ 55 über

eine Wasserstoffbrücke an Arg210 (PPR3) und weitere Arginine (Arg184, Arg212) bilden Salzbrücken zum Phosphatrückgrat der T-Schleife aus (Teramoto *et al.*, 2020). Die D-Schleife wird über Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken vom Enzym erkannt (Lys101 und Lys109 in PPR1) (Teramoto *et al.*, 2020). Diese Aminosäuren (Lys 101, Lys109, Tyr133, Tyr140, Arg184 und Arg212) wurden bereits im Vorfeld durch biochemische Mutationsanalysen als essentiell für die Substratbindung identifiziert (Chen *et al.*, 2016; Klemm *et al.*, 2017). Im Gegensatz dazu ist die Interaktion der Metallonuklease-Domäne nahe der Spaltstelle weniger untersucht. Allerdings konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur bakteriellen, RNA-basierten RNase P kaum oder nur vereinzelt spezifische Interaktionen nahe der Schnittstelle stattfinden. So scheint die Basenidentität des G<sub>1</sub>-C<sub>72</sub> Basenpaares im Akzeptorstamm sowie die von N<sub>1</sub> kaum von Relevanz zu sein (Brillante *et al.*, 2016). Ebenso wenig sind die 3'- und 5'-Flanken in eine Interaktion mit PRORP involviert (Gobert *et al.*, 2013; Brillante *et al.*, 2016; Karasik *et al.*, 2016). Vielmehr ist für die richtige Positionierung des Substrats die Länge des Akzeptorstamms und der T-Domäne von Bedeutung, vergleichbar mit dem für das eukaryontische, RNA-basierte Enzym beschriebenen Längenmess-Mechanismus (Brillante *et al.*, 2016).

### 1.3.2 AaRP und HARP

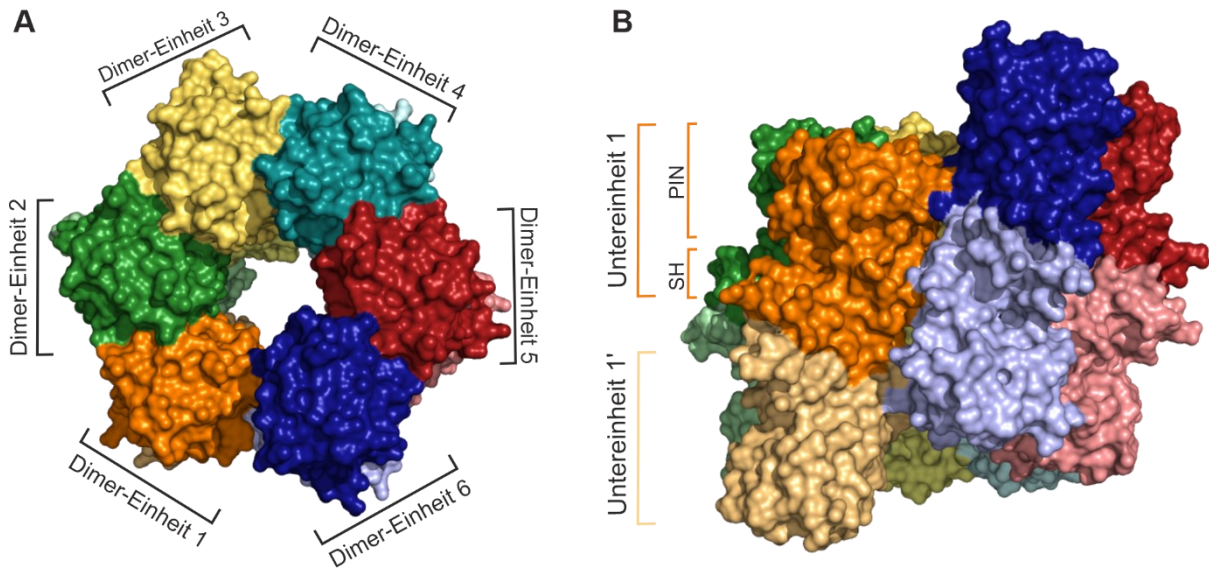
Eine andere RNase P-Form findet man bei dem Bakterium *Aquifex aeolicus*. Das kleine Genom dieses Bakteriums (1,55 Mbp) enthält weder das für das RNase P Protein kodierende *rnpA* Gen noch das *rnpB* RNA-Gen (Swanson, 2001; Willkomm *et al.*, 2002). Dennoch wurde eine RNase P-Aktivität im *A. aeolicus* Zellextrakt nachgewiesen (Lombo & Kaberdin, 2008; Marszalkowski *et al.*, 2008). 2017 konnte schließlich die RNase P aus *A. aeolicus* identifiziert werden. Bei der A. aeolicus RNase P (AaRP) handelt es sich um ein ~23 kDa großes Protein, das von dem Gen *aq\_880* kodiert wird (Nickel *et al.*, 2017). Dieses Gen erlangte *A. aeolicus*, wie viele andere auch (Aravind *et al.*, 1998; Koonin *et al.*, 2001), vermutlich über einen horizontalen Gentransfer aus einem archaealen Organismus. Bioinformatisch wurde diese neuartige RNase P der Familie der Metallonukleasen mit PIN-Domäne zugeordnet, allerdings einer anderen Untergruppe (VapC-ähnliche Nukleasen) als PRORP (Matelska *et al.*, 2017; Daniels *et al.*, 2019). AaRP konnte sowohl die endogene *E. coli* RNase P in dem *E. coli* BW-Stamm, bei dem die Expression des *rnpB* Gens unter Kontrolle eines Arabinose-Promotors steht, als auch die RNase P in *Saccharomyces cerevisiae* nach Deletion des für die P RNA kodierenden Gens ersetzen (Nickel *et al.*, 2017). Des Weiteren konnte für das rekombinante Protein eine Spaltung des prä-tRNA-Substrats an der kanonischen Spaltstelle *in vitro* gezeigt werden, dessen kinetische Parameter mit denen von PRORP3 vergleichbar sind (Nickel *et al.*, 2017). Das relativ kleine Protein oligomerisiert zu einem ~280 kDa großen Homooligomer, was vermutlich zu einer Hitzestabilisierung im thermophilen *A. aeolicus* führt (Feyh *et al.*, 2021;



Teramoto *et al.*, 2021). Mutationsanalysen zufolge sind vier Aspartatreste an der Koordination von Metallionen für die Katalyse beteiligt (Nickel *et al.*, 2017; Wäber, 2019).

Bioinformatische Analysen identifizierten Homologe (*Homologs of Aquifex RNase P*) dieser RNase P-Form in vielen Archaeen und einigen Bakterien. Für zwei dieser Homologe, für das bakterielle HARP aus *Thermodesulfator indicus* und das archaeale HARP aus *Methanothermobacter thermautotrophicus*, wurde die Spaltung einer prä-tRNA durch die rekombinanten Proteine *in vitro* sowie eine Komplementation von *E. coli* BW *in vivo* gezeigt (Nickel *et al.*, 2017). Somit scheinen auch diese Proteine in der Lage zu sein, prä-tRNAs zu prozessieren. Da alle charakterisierten Archaeen, die ein HARP kodieren, auch die RNA-basierte Form kodieren und dies ebenfalls auf einige Bakterien zutrifft (Nickel *et al.*, 2017; Daniels *et al.*, 2019), stellt sich die Frage, warum diese Organismen zwei funktionsfähige RNase P-Enzyme besitzen bzw. ob eines der Enzyme auch noch weitere Funktionen oder gar eine andere Hauptfunktion hat. Angesichts der Tatsache, dass für die Archaeen *Haloferax volcanii* und *Methanosarcina mazei*, die *in vitro* eine Prozessierung der prä-tRNA<sup>Gly</sup> an der kanonischen Spaltstelle zeigten, relativ einfach HARP-Gen-Deletionen erhalten werden konnten und diese auch keinen Wachstums-Phänotypen unter Standardbedingungen, Temperatur- und Salzstress (*H. volcanii*) oder Stickstoffmangel (*M. mazei*) aufwiesen, scheint die RNA-basierte RNase P die hauptsächliche RNase P-Funktion zu übernehmen (Schwarz *et al.*, 2019).

Ein weiteres HARP mit *in vitro* RNase P-Aktivität ist jenes aus *Halorhodospira halophila*, für welches eine Kryo-EM-Struktur gelöst werden konnte (Feyh *et al.*, 2021). Ähnlich zum AaRP-Protein bildet dieses HARP ein Homooligomer, und zwar ein 295 kDa-großes Dodekamer (Abb. 10). Die sechs Dimer-Einheiten assemblieren in einer schraubenartigen und damit asymmetrischen Anordnung. Ein einzelnes Monomer besteht aus einer PIN-artigen Metallonuklease-Domäne, welche die  $\alpha$ -Helices 1-4 sowie 7 & 8 und vier  $\beta$ -Stränge umfasst. Zusätzlich verfügt jedes Monomer über eine *Spike*-Helix-Domäne ( $\alpha$ -Helices 5 & 6) (Feyh *et al.*, 2021). Über hydrophobe Wechselwirkungen sowie zwei Salzbrücken interagiert diese Domäne des einen Monomers mit derselben Domäne eines anderen Monomers und vermittelt somit die Dimerisierung. Die Oligomerisierung dieser Dimere erfolgt sodann über polare Interaktionen zwischen der  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5-Schleife einer Dimer-Untereinheit und der  $\alpha$ 7- $\alpha$ 8-Schleife sowie Helix 8 einer anderen Untereinheit. Anhand von AaRP-Deletionsmutanten der C-terminalen Helix 8 wurde geschlossen, dass die Oligomerisierung für die Funktion essentiell ist (Feyh *et al.*, 2021).



**Abb. 10: Dodekamer-Struktur des *H. halophila* HARPs**

(A) Strukturaufbau in der Ansicht von oben. Die sechs Dimer-Einheiten sind unterschiedlich gefärbt. (B) Seitenansicht des Dodekamers zur Veranschaulichung der schraubenartigen Assemblierung. Die Dimer-Untereinheiten sind wie in A gefärbt, wobei das eine Monomer einen kräftigen Farbton und das andere denselben Farbton, jedoch leicht verblasst, trägt. Anhand von Untereinheit 1 (orange) wird der Aufbau eines Monomers gezeigt, das aus einer *Spike*-Helix (SH-) -Domäne und PIN-Metallonuklease-Domäne besteht. Verändert nach Feyh *et al.*, 2021; PDB: 7OG5.

Hinsichtlich der Interaktion mit dem prä-tRNA-Substrat scheint die SH-Domäne von Bedeutung zu sein, da Mutationen basischer Aminosäuren dieser Region im AaRP-Protein zu inaktiven Varianten führten (Feyh *et al.*, 2021). Basierend auf einem AaRP-Modell der tRNA-Bindung interagiert die SH-Domäne eines Dimers mit der T-Schleife der tRNA. Diese SH-Domäne befindet sich in einem für die tRNA-Bindung und -Positionierung optimalen Abstand zum katalytischen Zentrum, bestehend aus vier Aspartaten, des benachbarten Dimers (Feyh *et al.*, 2021). Folglich könnte die Bindung einer prä-tRNA über zwei benachbarte Dimere erfolgen. Das tRNA-Bindungsmodell mit gelöster AaRP-Struktur unterstützt die Hypothese der Bindung der tRNA über zwei benachbarte Dimere und der Interaktionen mit der T-Schleife der tRNA (Teramoto *et al.*, 2021). Ob neben den Interaktionen der basischen Aminosäuren mit dem Phosphatrückgrat auch aromatische Aminosäuren durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen zur Bindung der tRNA beitragen, lässt sich derzeit noch nicht zweifelsfrei belegen und dieses bedarf daher noch weitergehender Untersuchungen. Hinsichtlich Oligomerisierung und Dimerisierung lässt sich an dieser Stelle sagen, dass sich die Strukturen des *H. halophila* HARPs und die des AaRPs sehr ähnlich sind (Teramoto *et al.*, 2021). Die Bildung eines Dodekamers scheint damit für die Proteinklasse der HARPs folglich charakteristisch zu sein und ein Tetramer stellt vermutlich die kleinste funktionale Einheit für prä-tRNA-Bindung und -Prozessierung dieser Proteine dar.

## 1.4 RNase P als antibakterielles Target

### 1.4.1 Antibiotikaentwicklung

Als erstes Antibiotikum wurde von PAUL EHRLICH um 1907 die Arsen-haltige Verbindung Salvarsan zur Syphilis-Therapie entdeckt, die heute allerdings nicht mehr zugelassen ist (Ferrie, 2014). Angesichts des Erfolgs untersuchte die Firma von FRIEDRICH BAYER in den 1920er Jahren Azoverbindungen hinsichtlich ihres antibiotischen Potentials und fand mit Prontosil eine gut wirksame Verbindung, die ab 1935 dann kommerziell erhältlich war (Wainwright & Kristiansen, 2011). Allerdings ist hier nicht die Azogruppe für die Wirkung verantwortlich, da die Verbindung ein Prodrug von Sulfanilamid ist (da Cunha *et al.*, 2019). Somit gehört es zur Klasse der Sulfonamide, von der auch heute noch Verbindungen wie beispielsweise Sulfamethoxazol, welches in Kombination mit Trimethoprim zur Behandlung von Harnwegsinfekten eingesetzt wird, Verwendung finden (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Mit der Entdeckung des Penicillins im Jahr 1928 und dessen klinischer Anwendung, welche durch die Herstellung im größeren Maßstab möglich wurde, begann schließlich die „Goldene Ära“ der Antibiotika-Entwicklung, die etwa von 1940 bis in die 1960er Jahre andauerte (Ligon, 2004). In dieser Zeitspanne wurden viele der bis heute noch wichtigen Klassen der Antibiotika entdeckt (Abb. 11).

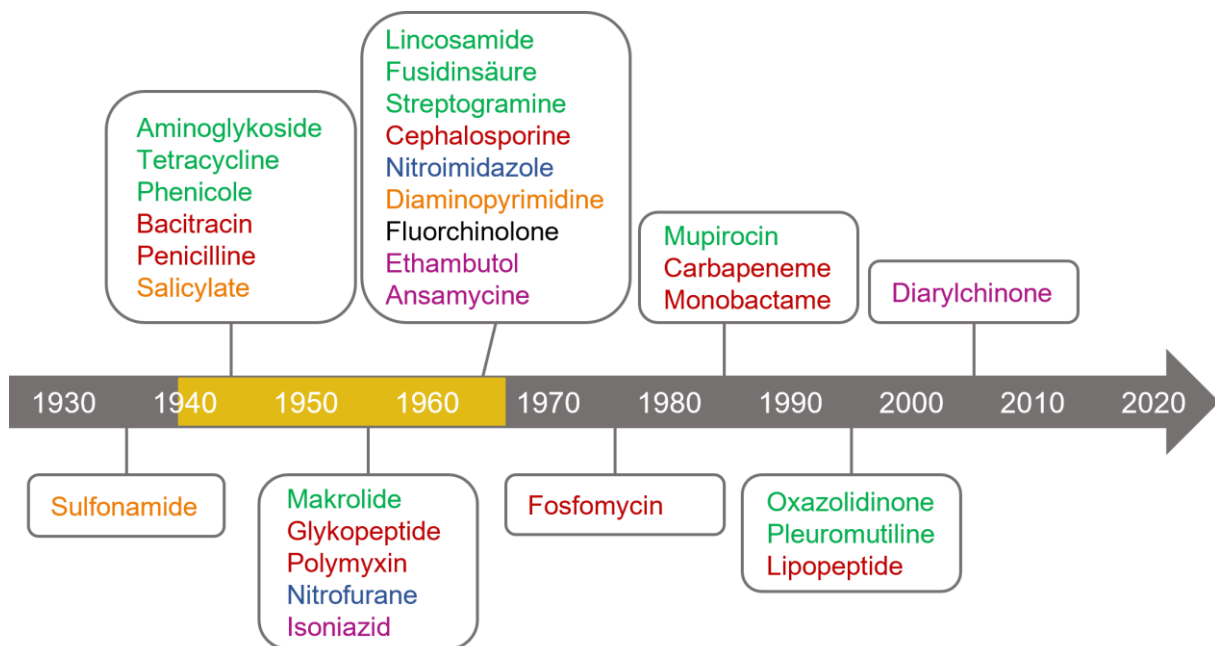


Abb. 11: Zeitstrahl der Antibiotikaentwicklung

Dargestellt ist die Entwicklung antibiotischer Wirkstoffklassen in chronologischer Reihenfolge, wobei die Entwicklung immer für zehn Jahre (beispielsweise 1940-1950) zusammengefasst ist. Für die zeitliche Einordnung wurde jeweils der Zeitpunkt der ersten klinischen Anwendung gewählt. Dieser kann von dem Zeitpunkt der Entdeckung der Wirkstoffklasse durchaus abweichen, der häufig für die chronologische Darstellung gewählt wurde. So wurde Penicillin beispielsweise bereits 1928 entdeckt jedoch erst um 1942 erstmals klinisch angewendet. Die „Goldene Ära“ der Antibiotika-Entwicklung ist gelb hervorgehoben. Der Farbcode der einzelnen Antibiotika-Klassen ist auf den Wirkmechanismus bzw. die Zielstruktur zurückzuführen; grün: Bindung an das Ribosom, rot: Inhibition der Zellwandsynthese bzw. Ausbildung einer intakten Zellmembran (bei den Penicillinen, Cephalosporinen, Carbapenem und Monobactamen handelt es sich um  $\beta$ -Laktamantibiotika), orange: Eingriff in den Folsäure-Stoffwechsel, blau: Bildung toxischer Metabolite, lila: Wirkstoffe mit antimykobakterieller Wirkung. Fluorchinolone (schwarz) inhibieren die bakterielle Gyrase. Modifiziert nach Hutchings *et al.*, 2019.

Bei den meisten dieser Verbindungen wie beispielsweise den  $\beta$ -Laktamen, Aminoglykosiden, Tetracyclinen und Makroliden handelt es sich um Naturstoffe aus Bakterien oder Pilzen (Hutchings *et al.*, 2019). Für die heutige Anwendung werden die Verbindungen allerdings zumeist semi-synthetisch oder synthetisch hergestellt (da Cunha *et al.*, 2019). Eine weitverbreitete Zielstruktur unter diesen Antibiotika ist das Ribosom, an welches Aminoglykoside, Tetracycline, Chloramphenicol und Makrolide binden und damit die Proteinbiosynthese hemmen. Ferner nehmen einige Antibiotika-Klassen Einfluss auf die Zellwandsynthese (Penicilline, Cephalosporine, Bacitracin und Glykopeptide) oder hemmen die Ausbildung einer intakten Zellmembran (Polymyxin). Des Weiteren wird in den Folsäurestoffwechsel eingegriffen (Sulfonamide, Salicylate und Diaminopyrimidine). Außerdem werden reaktive Metabolite gebildet, die unter anderem DNA-Schäden hervorrufen, (Nitrofurane, und -imidazole) oder es wird die bakterielle Gyrase inhibiert (Fluorchinolone) (Kapoor *et al.*, 2017; Hutchings *et al.*, 2019). Folglich standen um 1970 zahlreiche Verbindungen mit unterschiedlichen Zielstrukturen zur Therapie bakterieller Infektionen zur Verfügung. Ab 1970 wurden diese Verbindungen dann primär medizinisch-chemisch optimiert. So wurden bis heute lediglich vier neue Antibiotika-Klassen entwickelt, die in die Zellwandsynthese eingreifen (Fosfomycin, Carbapeneme, Monobactame und Lipopeptide), und drei weitere Gruppen, die die Proteinbiosynthese inhibieren (Mupirocin, Oxazolidinone und Pleuromutiline), wobei Pleuromutiline bereits um 1950 entdeckt, jedoch erst weitaus später klinisch eingesetzt wurden (Hutchings *et al.*, 2019).

Demgegenüber steht die beobachtete Resistenzentwicklung und die daraus resultierende Notwendigkeit neuartiger Antibiotika (Wright, 2007). Als problematisch wurden die Bakterien eingestuft, die unter dem Akronym ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, und *Enterobacter* Spezies) zusammengefasst werden (De Oliveira *et al.*, 2020). Von diesen wiederum ist die aktuelle Resistenzentwicklung der gramnegativen Bakterien *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und der Enterobacteriaceae (vor allem *Klebsiella pneumoniae* aber auch *Escherichia coli* oder *Enterobacter cloacae*) besonders hervorzuheben, da diese aufgrund ihrer Carbapenem-Resistenz 2017 von der WHO (*World Health Organization*) mit höchster Priorität innerhalb der globalen Prioritätenliste der Antibiotika-resistenten Bakterien bewertet wurden (Tacconelli *et al.*, 2018). Carbapeneme wurden als Reserveantibiotika mit einem großen Spektrum sowohl gegenüber grampositiven als auch gramnegativen Bakterien entwickelt. Der Vorteil der Carbapeneme gegenüber den anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Penicilline und Cephalosporine) besteht darin, dass diese weniger anfällig für die Hydrolyse und damit die Inaktivierung durch  $\beta$ -Laktamasen sind (Papp-Wallace *et al.*, 2011). Neben der Inaktivierung von Antibiotika gelten grundsätzlich die verminderte Aufnahme, ein vermehrter Efflux beispielsweise durch Effluxpumpen und eine

Modifikation der Zielstruktur als weitere Resistenzmechanismen (Wright, 2007; Zaman *et al.*, 2017).

Aktuell befinden sich 43 neuartige Antibiotika in der klinischen Entwicklung. Lediglich 25 % dieser Verbindungen werden einer neuen Klasse zugeordnet oder weisen einen neuartigen Wirkmechanismus auf. Für etwa die Hälfte aller Kandidaten konnte eine Aktivität gegen die gramnegativen Bakterien, die als äußerst kritisch eingestuft wurden und für die neue Antibiotika besonders benötigt werden, gezeigt werden. Diese stellen jedoch allesamt lediglich Derivate bekannter Antibiotikaklassen dar und weisen damit nur geringes innovatives Potential auf (Theuretzbacher, Bush, *et al.*, 2020; The Pew Charitable Trusts, 2021). Als einzige Verbindung mit neuer Wirkweise, die auch gegen die gramnegativen Problemkeime Wirkung zeigte, ist Murepavadin zu nennen. Diese peptidische Verbindung interagiert mit dem Transport der Lipopolysaccharide, die dann in die äußere Membran eingebaut werden. Dessen Entwicklung zur intravenösen Applikation wurde allerdings nach Abbruch der klinischen Studie in der Phase III aufgrund von deutlichen Anzeichen auf Nierenversagen eingestellt (U.S. National Library of Medicine; Martin-Loeches *et al.*, 2018). Dennoch wird das Potential dieser Verbindung in Form einer inhalativen Applikation im Rahmen der präklinischen Entwicklung weitergehend untersucht (Theuretzbacher, Bush, *et al.*, 2020).

Bei Cefiderocol (Handelsname Fetroja™) handelt es sich indessen um ein 2019 zugelassenes Cephalosporin. Der Vorteil dieser Verbindung besteht zum einen in der verbesserten Aufnahme in die Bakterien, da das Molekül eine als Siderophor fungierende Catecholgruppe besitzt, also Eisenionen bindet, wodurch die Aufnahme über das Eisentransportsystem ermöglicht wird. Zum anderen ist die Substanz stabil gegen alle vier Klassen der  $\beta$ -Laktamasen und gilt damit als eine Alternative zur Behandlung Carbapenem-resistenter Stämme (Ito *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2019). Wie auch Cefiderocol stellen die meisten der in der klinischen Entwicklung befindlichen Verbindungen Derivate der bekannten Klassen der  $\beta$ -Laktame (Penicilline, Cephalosporine, Monobactame und Carbapeneme) dar. Das Ziel dieser neuen Derivate ist es, zumeist in Kombination mit entsprechenden  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren, Klassen-spezifische Resistenzmechanismen zu umgehen. Allerdings scheinen vor allem für *P. aeruginosa* und *A. baumannii* die Resistenzmechanismen divers zu sein. Neben der Inaktivierung durch  $\beta$ -Laktamasen spielen die verminderte Aufnahme durch die äußere Membran sowie Effluxpumpen und modifizierte Penicillin-bindende Proteine eine Rolle (Theuretzbacher *et al.*, 2019; Theuretzbacher, Bush, *et al.*, 2020). Darüber hinaus sind auch neue Derivate der Tetracycline und Polymyxine in der klinischen Entwicklung vertreten, die ebenfalls gegen die besonders kritischen gramnegativen Bakterien eine Wirkung zeigten (Grossman *et al.*, 2017; Falagas *et al.*, 2018; Brown *et al.*, 2019; French *et al.*, 2020).

Zur Behandlung von Infektionen mit grampositiven Bakterien wiederum befinden sich derzeit zwei Klassen mit neuartigem Wirkmechanismus in der klinischen Entwicklung. Während

Inhibitoren der Enoyl-ACP-Reduktase FabI die Fettsäure-Biosynthese beeinflussen, hat der Einsatz von Verbindungen gegen das Strukturprotein FtsZ eine Inhibition der Zellteilung zur Folge (Kaul *et al.*, 2015; Theuretzbacher, Bush, *et al.*, 2020; Wittke *et al.*, 2020). Neben diesen Verbindungen mit neuartigen Zielstrukturen gibt es auch Gyrasehemmer mit neuer chemischer Grundstruktur, die zudem an eine andere Region als die bekannten Fluorchinolone binden (Basarab *et al.*, 2015; Lahiri *et al.*, 2015).

In der präklinischen Entwicklung liegt der Fokus auf der Entwicklung von Antibiotika mit neuartigen Zielstrukturen gegen gramnegative Bakterien (Theuretzbacher, Outterson, *et al.*, 2020). Ein Problem, vor allem bei gramnegativen Bakterien, stellt das Überwinden der Zellwand etwaiger Verbindungen dar. Die äußere Membran gramnegativer Bakterien, die aus Lipopolysacchariden besteht, ist selbst eher hydrophil und verhindert somit das Eindringen großer, hydrophober Verbindungen in die Zelle. Die innere Membran hingegen als hydrophobe Phospholipid-Doppelschicht hemmt die Permeation hydrophiler Verbindungen in die Zelle (Lewis, 2020). Somit stellt die Zellwand gramnegativer Bakterien eine äußerst effektive Barriere dar. Aus diesem Grund sind vor allem Zielstrukturen, die auf der äußeren Membran lokalisiert sind, in den Fokus geraten, da ein Überwinden dieser dann nicht mehr von Nöten ist (Lewis, 2020). Des Weiteren werden Ansätze verfolgt, bereits auf dem Markt befindliche Medikamente durch entsprechende  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren oder Inhibitoren von Effluxpumpen in ihrer Wirkung zu steigern (Lamut *et al.*, 2019).

Neben diesen eher klassischen Ansätzen befinden sich aber auch komplett neuartige Konzepte der antibiotischen Therapie in der präklinischen Entwicklung, wie beispielsweise die Phagentherapie. Bakteriophagen sind Viren, die ausschließlich Bakterien infizieren, diese lysieren und somit als bakterizide Wirkstoffe fungieren können. Phagen binden an Rezeptoren auf der bakteriellen Zelloberfläche, die genetische Information dringt in das Bakterium ein, es kommt zur viralen Replikation und schließlich zum Freisetzen neuer Phagenpartikel durch die Lyse des Bakteriums (Brives & Pourraz, 2020). Bedingt durch die hohe Spezifität der entsprechenden Rezeptoren zeichnen sich Phagen durch ein schmales Spektrum aus. Diesem kann durch die Verwendung von Gemischen, bestehend aus verschiedenen Phagen, begegnet werden (Kortright *et al.*, 2019). Dennoch scheint die Anwendung als Breitband-Antibiotikum eher unwahrscheinlich. Zudem ist die Pharmakokinetik von Phagen äußerst komplex, da sich diese beim Durchlaufen des beschriebenen Replikationszyklus ständig selbst vermehren (Abdelkader *et al.*, 2019). Etwaiger Sachverhalt ist bei der Verwendung einzelner Phagenenzyme nicht mehr gegeben und so ist deren Entwicklung weniger komplex. Hierfür eignen sich besonders Endolysine, welche die Bakterienzelle durch die Hydrolyse des Peptidoglykans lysieren. Es befinden sich bereits zwei Endolysine zur intravenösen Therapie von *Staphylococcus aureus* Infektionen in der klinischen Entwicklung (Theuretzbacher & Piddock, 2019). Allerdings ergibt sich auch hier die Problematik, dass die

Peptidoglykan-Schicht bei gramnegativen Bakterien aufgrund der äußeren Membran schlecht zu erreichen ist (Theuretzbacher & Piddock, 2019). Ebenso werden Mikrobiotika-modulierende Therapien, Antivirulenz-Strategien und Antikörper-Konzepte in der präklinischen Entwicklung verfolgt (Theuretzbacher, Outterson, *et al.*, 2020).

#### 1.4.2 Inhibitoren der bakteriellen RNase P

Die bakterielle RNase P ist als neuartige Zielstruktur für die Antibiotikaentwicklung interessant, da sowohl das für die RNA-Untereinheit kodierende Gen (*rnpB*) als auch das für die Protein-Untereinheit kodierende Gen (*rnpA*) für das Überleben der Mikroorganismen essentiell ist (Kobayashi *et al.*, 2003; Gößringer *et al.*, 2006; Wegscheid *et al.*, 2006; Willkomm *et al.*, 2016). Zudem unterscheidet sich der Enzymaufbau von Bakterien und Eukaryonten deutlich, wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurde (vgl. 1.2.1, 1.2.3 und 1.3.1). Dadurch wird eine Inhibition der bakteriellen RNase P, ohne Effekte auf die humane RNase P in Zellkern oder Mitochondrien auszulösen, ermöglicht. Grundsätzlich können hierbei beide Makromoleküle, sowohl die P RNA als auch das P Protein, adressiert werden.

##### P RNA als Zielstruktur

Eine Strategie zur Inhibition der katalytischen RNA-Untereinheit ist der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden. Als besonders geeignete Zielregion für Antisense-Inhibitoren wurde die L15-Schleife identifiziert (Childs *et al.*, 2003; Willkomm *et al.*, 2003). Zum einen ist diese Region von außen gut zugänglich, liegt zeitgleich aber in der Nähe des aktiven Zentrums. Zum anderen ist jene Region nicht in der humanen P RNA vorhanden, was einen spezifischen Effekt ermöglicht. Des Weiteren ist die L15-Schleife in der Substratinteraktion über Basenpaarung mit dem 3'-CCA-Ende involviert. Ein RNA 14-mer, welches diese Region adressiert, sowie dessen LNA- (*locked nucleic acid*) und PNA- (*peptide nucleic acid*) Varianten, zeigten eine 50%ige Inhibition der *E. coli* P RNA *in vitro* bei Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich (Gruegelsiepe *et al.*, 2003, 2006). Durch die Bindung des Antisense-Oligonukleotids wird die korrekte Faltung der katalytischen RNA gestört, die Bindung des Substrats aus sterischen Gründen unterbunden und die Bindung der für die Katalyse relevanten Metallionen beeinträchtigt (Gruegelsiepe *et al.*, 2006). Ein Problem von negativ-geladenen Antisense-Oligonukleotiden stellt jedoch das Überwinden der bakteriellen Zellwand dar. Zur Erhöhung der Zellgängigkeit wurde das PNA 14-mer, welches im Gegensatz zum RNA 14-mer eine erhöhte Nuklease-Stabilität aufweist, über einen Monoglycin-Linker an ein invasives Peptid geknüpft. Dieses Konjugat hemmte bei einer Konzentration von 10 µM das Wachstum des *E. coli* AS19-Stamms mit Lipopolysaccharid-Defekt (Sekiguchi & Iida, 1967; Gruegelsiepe *et al.*, 2006). Auch konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen Sequenz-spezifischen Effekt für die *E. coli* P RNA handelt, da die heterologe, Plasmid-kodierte Expression der *B. subtilis* P RNA die Effekte verminderte (Gruegelsiepe *et al.*, 2006). Ein

großes Problem bleibt jedoch das Überwinden von Plasmamembranen und damit verbunden die zelluläre Aufnahme dieser großen, hydrophilen Polyanionen. Die Zellgängigkeit kann durch chemische Modifikationen, Verknüpfung mit beispielsweise Lipiden oder Peptiden und die Verpackung als Nanopartikel optimiert werden (Shen & Corey, 2018; Gagliardi & Ashizawa, 2021). Dessen ungeachtet werden die meisten der zehn von der FDA (U.S. *Food and Drug Administration*) zugelassenen Oligonukleotid-Medikamente lokal appliziert (Roberts *et al.*, 2020). Ein weiterer Nachteil bei der Therapie mit Antisense-Oligonukleotiden sind die hohen Produktionskosten. Die Therapie mit Nusinersen (zur Behandlung der spinalen Muskelatrophie) beispielsweise kostet im ersten Jahr \$ 750.000 und jedes weitere Jahr \$ 350.000 (Roberts *et al.*, 2020).

Aminoglykoside sind antibakterielle Wirkstoffe, die primär an die 30S-Untereinheit des bakteriellen Ribosoms binden und die Proteinbiosynthese inhibieren. Die Grundstruktur ist ein Aminocyclitol, das über glykosidische Bindungen mit einem oder mehreren Aminoazuckern verknüpft ist. Aminoglykoside sind also sehr polare Verbindungen, deren Aminogruppen unter physiologischen Bedingungen zum Teil positiv geladen sind. Durch diesen kationischen Charakter und die konformative Flexibilität eignen sie sich grundsätzlich zum Adressieren von RNAs. So konnte gezeigt werden, dass Aminoglykoside auch an die P RNA binden und das Holoenzym inhibieren. Die stärksten Effekte wurden mit Neomycin B (Abb. 12) beobachtet, das bei einer Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  zu einer 50%igen Inhibition des *E. coli* Holoenzym führte (Mikkelsen *et al.*, 1999). Der beobachtete Effekt war abhängig von der verwendeten  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen Konzentration sowie vom pH-Wert. Bei erhöhtem pH-Wert, der mit einer Deprotonierung der Aminogruppen einhergeht, wurden die Effekte vermindert, sodass die positive Ladung der Aminogruppen für die Effekte essentiell erscheint. Durch Bleispaltung konnte gezeigt werden, dass Neomycin mit der Bindung der für die Katalyse notwendigen Metallionen interferiert (Mikkelsen *et al.*, 1999). Um die Spezifität der beobachteten Effekte zu erhöhen und diese selbst zu verstärken, wurden Aminoglykosid-Arginin-Konjugate getestet. Jenes Derivat, bei dem alle sechs Aminogruppen mit einem Arginin verknüpft wurden, zeigte eine um Faktor ~500 erhöhte Aktivität gegenüber der *E. coli* RNase P (Eubank *et al.*, 2002). Derivate, die mit Lysin- oder Guanidin-Resten an denselben Positionen verknüpft wurden, waren auch aktiver als Neomycin B selbst, jedoch weniger aktiv als die entsprechenden Arginin-Derivate (Kawamoto *et al.*, 2008). Diese Konjugate konkurrieren ebenfalls mit den für die Katalyse wichtigen Magnesium-Ionen um die Bindung an die P RNA und für die 50%ige Inhibition des humanen Enzyms war eine um Faktor ~10 erhöhte Konzentration erforderlich (Eubank *et al.*, 2002; Kawamoto *et al.*, 2008). Jedoch scheint die Spezifität dieser Derivate eher gering, da Neomycin B auch an das prä-tRNA-Substrat bindet und zwar im ähnlichen Konzentrationsbereich wie dem beschriebenen  $\text{IC}_{50}$ -Wert (Liu *et al.*, 2014). Neben der



geringen Selektivität ist auch die Zellgängigkeit vor allem der Aminoglykosid-Arginin-Konjugate aufgrund ihrer Größe und Ladung als problematisch einzuschätzen.

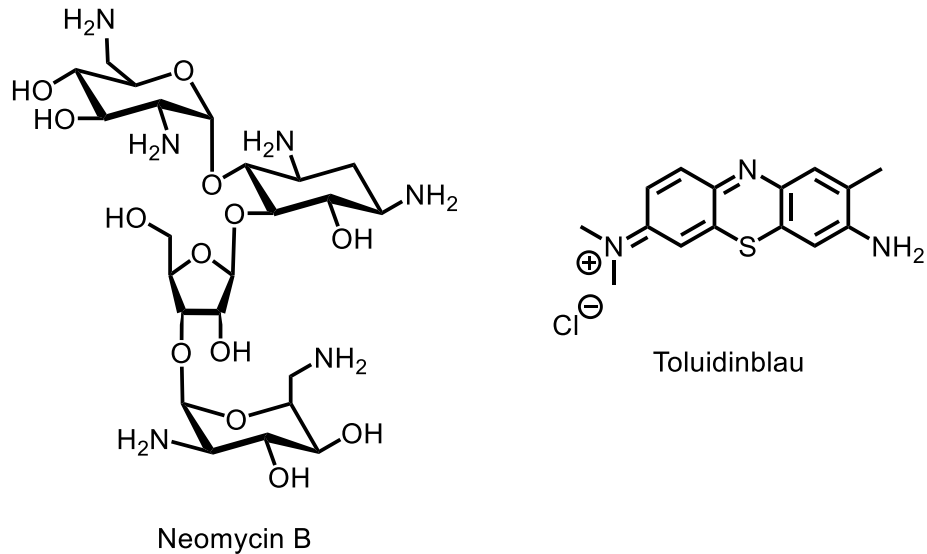


Abb. 12: Strukturen der P RNA-Inhibitoren

Neben Aminoglykosiden binden auch Phenothiazine an verschiedene RNAs wie die ribosomale RNA in *E. coli*, die HIV *trans-activation response element* RNA und weitere virale RNAs (Wu *et al.*, 2016). Jedoch ist die Bindung der Phenothiazine nicht nur auf RNAs beschränkt, sondern konnte auch für diverse Proteine gezeigt werden. So wurden weit über 50 *Targets* für diese Stoffklasse beschrieben (Gaulton *et al.*, 2012). Auch für die RNase P aus *E. coli*, *Mycoplasma hyopneumoniae* und *Mycobacterium tuberculosis* konnte eine Inhibition durch Phenothiazine wie beispielsweise Toluidinblau (Abb. 12) im Bereich von ~8-45  $\mu\text{M}$  festgestellt werden (Wu *et al.*, 2016). Außerdem wurden auch Neuroleptika mit Phenothiazin-Grundgerüst wie Chlorpromazin getestet. Diese waren jedoch weniger aktiv, was auf die relativ großen Alkylsubstituenten am zyklischen Stickstoff zurückzuführen sein könnte (Wu *et al.*, 2016). Im Vergleich zu den Aminoglykosiden waren die beobachteten Effekte dabei weniger vom pH-Wert und der Salzkonzentration abhängig und scheinen somit weniger auf elektrostatischen Wechselwirkungen zu beruhen. Für die Phenothiazine wurden Bindestellen sowohl in der S- als auch in der C-Domäne der P RNA gezeigt. Neben der Bindung an die P RNA wurde ebenso eine Bindung an die prä-tRNA festgestellt (Wu *et al.*, 2016). Aus diesem Grund stellt auch hier die geringe Spezifität ein Problem dar.

Zusammenfassend handelt es sich lediglich bei den Antisense-Oligonukleotiden um spezifische Inhibitoren der bakteriellen RNase P mit den allerdings oben aufgeführten Nachteilen.

### **Hits aus HTS (*high-throughput screening*)**

Um neuartige Kleinmoleküle zur Inhibition der bakteriellen RNase P zu identifizieren, wurden unabhängig voneinander drei Enzym-basierte Hochdurchsatz-*Screenings* durchgeführt. In einem dieser Ansätze wurde dafür zunächst ein Fluoreszenzpolarisations-Assay entwickelt, um im Gegensatz zum konventionellen Gel-basierten Assay mit  $^{32}\text{P}$ -markierter prä-tRNA eine Vielzahl von Verbindungen innerhalb kurzer Zeit testen zu können (Liu *et al.*, 2014). Die Prozessierung des am 5'-Ende mit Fluorescein markierten prä-tRNA-Substrats durch die *B. subtilis* RNase P wurde enzymkinetisch untersucht und wies keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der kinetischen Parameter zum 5'-Ende mit Monophosphat auf. Bei dieser Analyse wurde ebenfalls eine Inhibition durch Neomycin B beobachtet, welche vergleichbar mit den bereits beschriebenen Effekten war (Liu *et al.*, 2014). Weitergehende Optimierungen für den Hochdurchsatz ermöglichten schließlich die Testung von etwa 2900 Verbindungen. Nach dem Primärscreen wurden dann Verbindungen, die auch an das Substrat banden und deren Effekte keine Konzentrationsabhängigkeit besaßen, aussortiert, sodass lediglich Iriginolhexaacetat (Ir6Ac; Abb. 13) als tatsächlich aktive Verbindung aus dem *Screen* hervorging (Liu *et al.*, 2014). Um dieses Ergebnis zu validieren, wurde Ir6Ac zusätzlich im Gel-basierten Assay mit  $^{32}\text{P}$ -markiertem Substrat untersucht und zeigte auch dort inhibitorische Effekte, sodass eine Bindung an den Fluoreszenzfarbstoff ausgeschlossen werden konnte. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert liegt bei  $\sim 0,8 \mu\text{M}$  und aufgrund der Effekte auf  $K_M$  und  $k_{\text{cat}}$  scheint es sich um eine gemischte Inhibition zu handeln (Liu *et al.*, 2014). Jedoch bleibt offen, ob Ir6Ac an die P RNA oder das P Protein bindet, da es lediglich in Holoenzym-Kinetiken untersucht wurde.

In den beiden anderen Ansätzen wurde gezielt nach Inhibitoren der Protein-Untereinheit der RNase P gesucht. In einem ebenfalls Fluoreszenz-basierten Hochdurchsatz-*Screening* wurden dabei  $\sim 30.000$  Verbindungen untersucht. Allerdings beruhte dieser Assay nicht auf der RNase P-katalysierten Prozessierung von prä-tRNAs sondern auf einer postulierten grundsätzlichen RNase-Aktivität, die dem RnpA zugeschrieben wurde. Nach Inkubation von *S. aureus* RnpA mit *S. aureus* Gesamt-RNA wurde die Menge an verbliebener RNA quantitativ mit dem *Quant-iT RiboGreen* Farbstoff bestimmt (Olson *et al.*, 2011). Nach Überprüfung der Ergebnisse über einen Gel-basierten Assay wurden fünf Inhibitoren identifiziert, unter anderem RNPA1000, das Thiosemicarbazid RNPA2000 und RNPA3000 mit Rhodanin-Grundstruktur (Abb. 13) (Olson *et al.*, 2011). Für RNPA1000 wurde gezeigt, dass es den postulierten zellulären RnpA-vermittelten RNA-Abbau hemmt und eine antibakterielle Aktivität gegenüber einigen grampositiven, humanpathogenen Keimen, unter anderem einem multiresistenten *S. aureus* Stamm (*Minimum Inhibitory Concentration* =  $26 \mu\text{g/mL}$ ), besitzt. Des Weiteren reduzierte RNPA1000 die *S. aureus* Pathogenese in einem Maus-Infektionsmodell. Jedoch wurden nach 48 Stunden bei einer Konzentration von  $25 \mu\text{g/mL}$

cytotoxische Effekte auf HepG2-Zellen beobachtet (Olson *et al.*, 2011). RNPA2000 zeigte gleichwohl antibakterielle Effekte gegen grampositive Keime. Hinsichtlich des multiresistenten *S. aureus* Stamms waren diese etwas stärker (MIC = 16 µg/mL) (Eidem *et al.*, 2015). Es wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert für die RNase P-katalysierte Prozessierung von prä-tRNAs von 130 µM (Eidem *et al.*, 2015) bzw. 140 µM (Lounsbury *et al.*, 2018) ermittelt. Diese Effekte wurden auch auf zellulärer Ebene über *Northern Blot*-Analysen bestätigt. Hieraus schlussfolgerten die Autoren, dass es sich bei RNPA2000 um eine antimikrobielle Verbindung mit Doppelfunktion handelt, die sowohl den RNA-Abbau als auch die prä-tRNA-Prozessierung hemmt (Eidem *et al.*, 2015). Letzteres konnte für RNPA1000 nicht im zellulären Kontext gezeigt werden, sodass RNPA2000 gegenüber RNPA1000 überlegen schien. Außerdem handelte es sich bei RNPA1000 um bakteriostatische Effekte, bei RNPA2000 hingegen um bakterizide (Eidem *et al.*, 2015). Hinsichtlich der humanen Cytotoxizität blieb RNPA2000 bis zu einer Konzentration von 256 µg/mL über 24 Stunden unauffällig; wie sich die Verbindung über einen längeren Zeitraum verhält, bleibt hingegen unklar (Eidem *et al.*, 2015). RNPA1000 wurde aufgrund der cytotoxischen Effekte nicht weitergehend verfolgt. Vielmehr fokussierte man sich auf RNPA2000 und dessen Optimierung, da die Verbindung auch vielversprechende physiko-chemische Eigenschaften wie eine gute Wasserlöslichkeit (> 200 µM) aufwies, keine Inhibition von CYP-Enzymen zeigte und keine Interaktion mit dem hERG-Kanal einging (Eidem *et al.*, 2015). Im Rahmen von Studien zu Struktur-Wirkungs-Beziehungen (*structure activity relationship*, SAR) wurden daraufhin Verbindungen mit erhöhter *in vitro*-Aktivität im Vergleich zu RNPA2000 gefunden, die antibakterielle Aktivität konnte indessen nicht verstärkt werden (Lounsbury *et al.*, 2018). RNPA3000 aus dem initialen *Screening* wurde bisher kaum weitergehend untersucht. Es ist lediglich beschrieben, dass die antibakteriellen Effekte weniger ausgeprägt sind als bei den beiden anderen Verbindungen, weshalb der Fokus vermutlich auf die beiden anderen Verbindungen gelegt wurde (Lounsbury, 2016). In einem dritten Hochdurchsatz-*Screening* fand ein Assay basierend auf dem FRET-Mechanismus Verwendung. Hierzu wurde ein Minihelix-Substrat, bestehend aus einer 3 bp Helix mit 5'-Flanke und 3'-CCA-Ende, am 3'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 488 markiert und ein Quencher an das 5'-Ende gekoppelt (Madrigal-Carrillo *et al.*, 2019). Folglich konnte ein Fluoreszenzsignal erst gemessen werden, wenn die 5'-Flanke des Substrats abgespalten wurde. Somit konnte die RNase P-Reaktion über die Zeit mit steigendem Fluoreszenzsignal verfolgt werden. Es wurden ~2500 Verbindungen im *Screening* unter Verwendung der *T. maritima* RNase P getestet und nach Verifizierung über einen Gel-basierten Assay wurden vier aktive Verbindungen identifiziert, von denen sich Purpurin als die vielversprechendste erwies (Abb. 13). Für Purpurin wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert von ~100 µM gemessen (Minihelix-Substrat). Ferner konnte gezeigt werden, dass es auch die Prozessierung einer kanonischen prä-tRNA inhibiert und an das RnpA-Protein bindet

(Madrigal-Carrillo *et al.*, 2019). Außerdem wurde durch *Soaking*-Experimente die Kristallstruktur des *T. maritima* RnpA mit gebundenem Purpurin gelöst. Demnach bindet Purpurin in einer eher hydrophoben Bindetasche, die auch für die Substratinteraktion von Relevanz ist, und verdrängt somit das Substrat (Madrigal-Carrillo *et al.*, 2019).

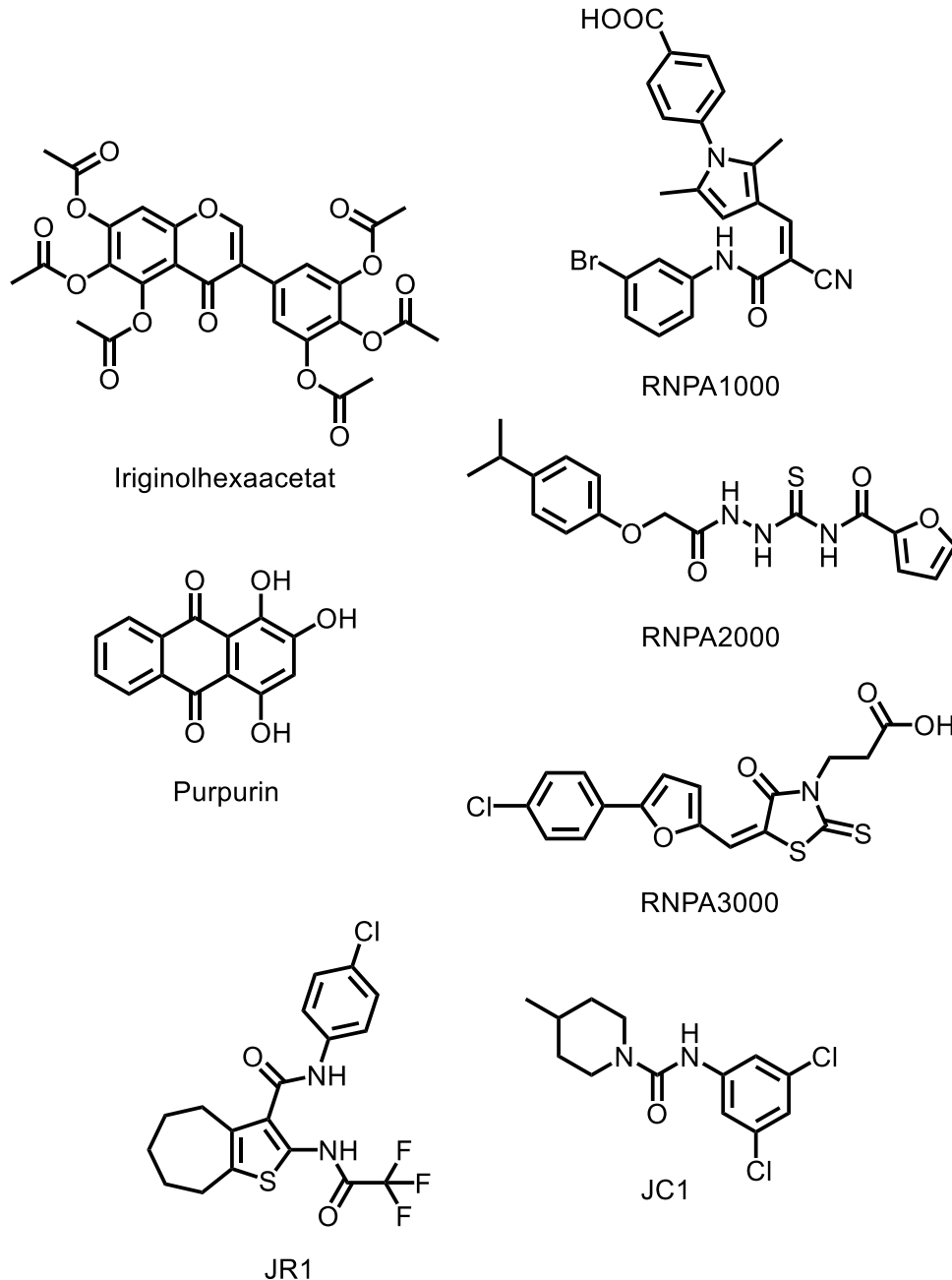


Abb. 13: RNase P-Inhibitoren, die im Rahmen von HTS identifiziert wurden

Neben diesen Enzym-basierten Assays wurde auch ein Zell-basierter Assay durchgeführt. Grundidee bei diesem Assay war, dass der Isoleucyl-tRNA-Synthetase-Inhibitor Mupirocin mit einem potentiellen RNase P-Inhibitor eine synergistische antimikrobielle Aktivität entfalten sollte, da beide Verbindungen in den selben Signalweg eingreifen (Blanchard *et al.*, 2016). Im Rahmen dieses Screenings wurde das 2-Acyaminocycloalkylthiophen JR1 und das

Piperidincarboxamid JC1 identifiziert (Abb. 13). Für beide Verbindungen konnten antibakterielle Effekte (MIC = 0,5 µg/mL für JR1 und 1 µg/mL für JC1) sowie eine Inhibition der prä-tRNA-Prozessierung beobachtet werden. Zudem konnte ein postulierter RpnA-vermittelter RNA-Abbau *in vitro* (IC<sub>50</sub>-Werte zwischen 7 und 210 µM) bei gleichzeitig geringer Cytotoxizität (4× MIC) über 24 Stunden gezeigt werden (Colquhoun *et al.*, 2019). Allerdings wurde mit keiner Verbindung eine zelluläre Anreicherung von prä-tRNAs festgestellt. Derivatisierungen des JR1-Grundkörpers führten dann zu Verbindungen mit einer um Faktor ~10 verbesserten antibakteriellen Aktivität, für die zudem erstmals eine Akkumulation von prä-tRNAs innerhalb der Zelle gezeigt werden konnte. Die beste Verbindung wurde in einem murinen Modell der bakteriellen Keratitis getestet, zeigte hierbei aber keinen signifikanten Effekt (Chojnacki *et al.*, 2021). Neuste *Docking*-Studien zeigen für das Thiosemicarbazid RNPA2000 sowie für das Piperidincarboxamid JC1 eine mögliche Bindetasche auf (Suigo *et al.*, 2021). Diese befindet sich in unmittelbarer Nähe zum hochkonservierten RNR-Motiv, über welches das P Protein an die P RNA bindet. Folglich könnte die Assemblierung eines funktionalen Holoenzym unterbunden werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden weitere Derivate der beiden Verbindungsklassen zum Ableiten von Struktur-Wirkungs-Beziehungen dargestellt. Auffällig war dabei, dass der Ersatz des Thiosemicarbazids im RNPA2000 zu einem Aktivitätsverlust führte und dieses somit essentiell zu sein scheint (Suigo *et al.*, 2021).

## 2 ZIELSETZUNG

### 2.1 Inhibitoren der bakteriellen RNase P

Wie in der Einleitung ausführlich erläutert, werden neuartige Zielstrukturen für die Entwicklung von Antibiotika benötigt. Als eine solche Zielstruktur eignet sich grundsätzlich die bakterielle RNase P, da es ein essentielles Enzym ist und sich strukturell vom humanen Enzym unterscheidet. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Kleinmoleküle untersucht werden, die vorwiegend an die Proteinuntereinheit der bakteriellen RNase P binden. Als Ausgangspunkt hierfür dienten Verbindungen, die im Rahmen von verschiedenen *High-Throughput Screenings* als RNase P-Inhibitoren identifiziert wurden (Liu *et al.*, 2014; Eidem *et al.*, 2015; Madrigal-Carrillo *et al.*, 2019). Der Schwerpunkt lag dabei auf den beiden vielversprechendsten Verbindungen: dem Thiosemicarbazid RNPA2000 und dem Isoflavon Irginolhexaacetat (Ir6Ac). Diese wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. SCHLITZER (Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) umfangreich derivatisiert, mit dem Ziel, die RNase P-Inhibition zu optimieren. Die Testung der Derivate sollte dabei im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* enzymkinetisch mit der *T. maritima* RNase P erfolgen, da für dieses Protein eine hochaufgelöste Kristallstruktur zur Verfügung stand (Kazantsev *et al.*, 2003) und sich damit über Computer-gestützte Verfahren (*Docking*) mögliche Interaktionen eines Kleinmoleküls mit dem Protein vorhersagen lassen. Darüber hinaus sollte der sogenannte Hemmhofest durchgeführt werden, um das antibakterielle Potential der Verbindungen *in vivo* zu ermitteln. Hierfür fand der *E. coli* AS19-Stamm mit Lipopolysaccharid-Defekt Verwendung (Sekiguchi & Iida, 1967). Parallel dazu sollten die Ausgangsverbindungen hinsichtlich ihres Inhibitionsmechanismus untersucht werden. Im Falle von Ir6Ac galt es dabei zu klären, ob die inhibitorischen Effekte Protein-abhängig sind oder vielmehr auf eine Bindung an die RNA-Untereinheit der RNase P zurückzuführen sind.

### 2.2 Untersuchungen zum *Thermodesulfator indicus* HARP

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der Proteinklasse der HARPs (*Homologs of Aquifex RNase P*). Bei dieser RNase P handelt es sich um eine Protein-basierte Form, die aus nur einem einzigen Polypeptid mit einer Größe von ~23 kDa besteht (Nickel *et al.*, 2017). Diese Form der RNase P wurde zunächst in dem hyperthermophilen Bakterium *Aquifex aeolicus* entdeckt, später konnten aber auch Homologe in Bakterien und Archaeen identifiziert werden (Nickel *et al.*, 2017). Eines dieser Homologe ist das HARP aus *Thermodesulfator indicus*, für das eine verhältnismäßig gute RNase P-Aktivität *in vitro* beobachtet wurde (Nickel *et al.*, 2017) und das im Rahmen dieser Arbeit weitergehend charakterisiert werden sollte.

Mithilfe verschiedener Substratvarianten sollte dabei die Substraterkennung dieser minimalen RNase P-Form untersucht werden. So sollten, analog zu bereits publizierten Studien mit *Arabidopsis thaliana* PRORP3, Varianten der 5'-Flanke und des 3'-Endes sowie Substrate, bei denen einzelne Domänen der tRNA deletiert wurden, getestet werden (Brillante *et al.*, 2016). Die Prozessierung dieser Substratvarianten sollte enzymkinetisch unter *single-turnover* Bedingungen erfolgen. Ebenso sollte die Spaltstellen-Selektion anhand von Substraten mit veränderter T-Stamm-Länge und veränderter Größe der T-Schleife untersucht werden. Die Ergebnisse entsprechender Studien mit der *Aquifex aeolicus* RNase P (AaRP) und dem *Methanothermobacter thermotrophicus* HARP ermöglichen hierbei zudem einen Vergleich der Enzyme hinsichtlich der Substraterkennung (Wäber, 2019; nicht publizierte Daten M. GÖßRINGER).

Des Weiteren wurde für das AaRP bereits gezeigt, dass vier Aspartat-Aminosäuren für die Funktion essentiell sind und dass das relativ kleine Protein zu einem großen Dodekamer oligomerisiert (Nickel *et al.*, 2017; Wäber, 2019; Feyh *et al.*, 2021). Inwiefern diese beiden Beobachtungen auch auf das *T. indicus* HARP zutreffen, sollte anhand von Komplementationsexperimenten mit dem *E. coli* BW-Stamm und analytischer Gelfiltration ebenfalls überprüft werden. Auch sollte vor allem in Hinblick auf weitergehende Arbeiten beleuchtet werden, inwieweit ein *N*- bzw. *C*-terminaler Affinitäts-Tag die RNase P-Aktivität sowie die Oligomerisierung des rekombinanten Proteins beeinflusst.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

Tab. 1: ausgewählte Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
1 kb DNA ladder ready to load	Cytogen GmbH, Wetzlar
100 bp DNA ladder ready to load	Cytogen GmbH, Wetzlar
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
BSA	Sigma Aldrich, St. Louis USA
BSA ultrapure (50 mg/mL)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Clarity Western ECL Substrat	BioRad, Hercules USA
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GelRed™	Biotium, Fremont USA
GlycoBlue™ Coprecipitant	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IPTG	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PageRuler Plus Prestained Protein Leiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ribonukleosidtriphosphate (rNTPs)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

##### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Aldrich, St. Louis USA
Dialyseschlauch ZelluTrans MWCO 12000-14000	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Dialyseschlauch ZelluTrans MWCO 6000-8000	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Einmal-Impföse steril 1 $\mu$ L	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Einmalküvetten	Sarstedt, Nürmbrecht
Einmalpipettenspitzen	Sarstedt, Nürmbrecht
Einmalpipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Nürmbrecht
Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen
Elektroporationsküvetten 0,2 cm	BioRad, München
Falcontubes 15 / 50 mL	Sarstedt, Nürmbrecht
Filtropur BT 50 bottle top filter, 500 mL	Sarstedt, Nürmbrecht
Frischhaltefolie	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Glasperlen $\varnothing$ 0,1 mm	Biospec, Bartlesville USA
Glasperlen $\varnothing$ 1,25-1,55 mm	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Handschuhe, Nitril	Sempermed, Wien Österreich
HisTrap™ HP 1 mL	Cytiva, Marlborough USA
HiTrap™ CM FF 5 mL	Cytiva, Marlborough USA
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen 2 mL	Sarstedt, Nürmbrecht
Lysing Matrix B, 2 mL Röhrchen	MP Biomedicals, Solon USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago USA
PCR Soft Tubes 0,2 mL	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf



Bezeichnung	Hersteller
PCR-Reaktionsgefäße Mulipty <sup>®</sup> -μStrip Pro 8-Strip	Sarstedt, Nürmbrecht
Petrischalen 92 × 16 mm	Sarstedt, Nürmbrecht
PVDF-Membran Immobilon-E	Merck, Darmstadt
Reaktionsgefäß 5,0 mL mit Schraubdeckel	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 mL und 2 mL	Sarstedt, Nürmbrecht
Schlauchfolie	VWR International, Radnor USA
serologische Pipetten 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL	Sarstedt, Nürmbrecht
Skalpell	B. Braun, Melsungen
Spritzenvorsatzfilter Filtropur S 0,2 μm	Sarstedt, Melsungen
Testblättchen ROTILABO <sup>®</sup> Ø 6 mm	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Whatman-Papiere 7 × 8,4 cm	BioRad, Hercules USA
Zentrifugalfilter, Nylon 0,2 μm	VWR International, Radnor USA
Zentrifugalfilter, Ultrafree <sup>®</sup> -MC 0,22 μm	Merck KGaA, Darmstadt

### 3.1.3 Enzyme

Tab. 3: Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
5× HOT CYTOPol Blend Master Mix (mit 10 mM MgCl <sub>2</sub> )	Cytogen GmbH, Wetzlar
<i>BtgI</i>	New England BioLabs GmbH, Ipswich USA
<i>DraI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
FastAP Thermosensitive alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
FastDigest <i>Bam</i> HI	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
FastDigest <i>Bpu</i> 1102I	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
FastDigest <i>Dpn</i> I	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
FastDigest <i>Nde</i> I	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Invitrogen <sup>™</sup> Platinum <sup>™</sup> SuperFi <sup>™</sup> PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Lysozym	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe
Phusion <sup>™</sup> High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
<i>Sac</i> I	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
T4-Polynukleotidkinase	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
T7-RNA-Polymerase	eigene Aufreinigung
Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Thrombin	Cytiva, Marlborough USA

### 3.1.4 Kits

Tab. 4: Kits

Bezeichnung	Hersteller
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
GeneJET <sup>™</sup> Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Pierce <sup>™</sup> Silver Stain Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Wizard <sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega GmbH, Walldorf

### 3.1.5 Puffer und Lösungen

Tab. 5: Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller / Zusammensetzung / Verweis
1× PBS Gibco	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
10 % APS	10 g APS auf 100 mL ddH <sub>2</sub> O
10× CutSmart®-Puffer	New England BioLabs GmbH, Ipswich USA
10× FastAP-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
10× FastDigest-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
10× HF Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
10× PNK-Puffer A	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
10× T4-DNA-Ligase-Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
10× Taq Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
5× TBE-Puffer	Seite 46
Acrylamid M-Bis 50 %	GERBU Biotechnik GmbH, Heidelberg
Ampicillin-Lösung	100 mg/mL Ampicillin-Na, sterilfiltriert
Blocker™ Casein in TBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Bradford Reagenz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Chloramphenicol-Lösung	34 mg/mL Chloramphenicol, sterilfiltriert
Coomassie-Lösung	Seite 63
DNA-Probenpuffer	Seite 46
EDB-Puffer	Seite 79
F-Puffer	Seite 79
GelRed-Färbelösung	10 µL Stammlösung auf 100 mL 1× TBE
Glukose-Lösung	42 % (42 g Glukose auf 100 mL ddH <sub>2</sub> O), sterilfiltriert
Kanamycin-Lösung	50 mg/mL Kanamycinsulfat, sterilfiltriert
KN-Puffer	Seite 73
Lämmli-Puffer	Seite 63
LB-Medium	Seite 40
PAA-Lösung, 20 % denaturierend	Seite 46
RNA-Proben-Puffer	Seite 47
Roti-Aqua-Phenol, Roti-Phenol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sammelgel-Puffer	Seite 63
Trenngel-Puffer	Seite 63
Xylose-Lösung	42 % (42 g Xylose auf 100 mL ddH <sub>2</sub> O), sterilfiltriert

### 3.1.6 Geräte

Tab. 6: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Elektrophoresekammer PerfectBlue™ Mini S und L	VWR International, Radnor USA
Analysenwaage	OHAUS, Nänikon Schweiz
Autoklav V 95	Systeme GmbH, Linden
Bakterien-Brutschrank BE400	Memmert, Büchenbach
Bi-Destillierapparat Destamat	Heraeus, Hanau
Chromatographiesystem ÄKTApurifier	GE Healthcare, Chicago USA
Elektroporator Gene Pulser Xcell™	BioRad, Hercules USA
FastPrep24	MP Biomedicals, Solon USA
Geldokumentation ChemiDoc MP	BioRad, Hercules USA
Geldokumentation: Dark Hood DH-50 und Gerix 1000	Biostep, Burkhardtsdorf

Bezeichnung	Hersteller
Heizblock Biometra TB2	Analytik Jena AG, Jena
Imaging Plate BAS-MS	Fujifilm, Minato Japan
Kontaminationsmonitor LB 122	Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg
Kühlzentrifuge Fresco 17	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop DM IL LED	Leica, Wetzlar
Magnetrührer Rotilabo®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magnetrührer Yellow Line	IKA, Staufen im Breisgau
Mikrowelle 8020E	Privileg, Benton Harbor USA
Mini-PROTEAN® Gelgießständer	BioRad, Hercules USA
Peristaltikpumpe CTP 300	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Meter Inolab	WTW, Weilheim
Phosphorimager FLA-3000	Fujifilm, Minato Japan
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet® pro	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
Präzisionswaage TP-3002	Denver Instrument, Göttingen
Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instrument, Garbsen
Scanner Calibrated Imaging Densitometer	BioRad, Hercules USA
Schüttelinkubator 3033	GFL, Burgwedel
SDS-Elektrophoresekammer	BioRad, Hercules USA
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	
Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Brookfield USA
Spannungsquelle PowerPac 3000	BioRad, Hercules USA
Spannungsquelle PowerPac HV	BioRad, Hercules USA
Spannungsquelle Standard Power Pack P25	Analytik Jena AG, Jena
Spektralphotometer 7305	Janeway, Stone UK
Spektralphotometer UV5 Nano	Mettler-Toledo, Columbus USA
Spritzenpumpe Perfusor segura FT	B. Braun, Melsungen
Thermocycler T1 Biometra	Analytik Jena AG, Jena
Thermocycler T-Gradient 96 Biometra	Analytik Jena AG, Jena
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Trans-Blot Turbo	BioRad, Hercules USA
Tri-Carb 2810TR Szintillationsmesser	Perkin Elmer, Waltham USA
UV-Lampe	CAMAG, Muttenzy Schweiz
Vortexer	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Wasserbad W200	Memmert GmbH & Co. KG, Büchenbach

### 3.1.7 Oligonukleotide

Tab. 7: Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
11_Saur mpA fwd	CCA TGG ATG TTA TTG GAA AAA GCT TAC CGA ATT AAA AAG AA
12_Saur mpA rev	CTC GAG CTT AAT CTT TTT ATT AAA AAC TTT GGC AAT TTTA AGT
15_Saur mpAnHis pET fwd	TTT TTT <u>CAT ATG</u> TTA TTG GAA AAA GCT TAC CGA ATT AAA AAG AA ( <i>Nde</i> I Schnittstelle unterstrichen)
16_Saur mpAnHis pET rev	TTT TTT <u>GCT CAG CTT</u> ACT TAA TCT TTT TAT TAA AAA CTT TGG CAA TTT TAA GT ( <i>Bpu</i> 1102I Schnittstelle unterstrichen)

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'
19_Saur rnpB T7 fwd	TTT TTT <u>GAG CTC</u> TTA ATA CGA CTG ACT ATA GGT GAT ATT TTG GGT AAT CGC TAT ATT ATA TAG ( <i>SacI</i> Schnittstelle unterstrichen)
20_Saur rnpB T7 rev	TTT TTT <u>GGA TCC</u> ACT AGT AGT GAT ATT TCT ATA AGC CAT G ( <i>Bam</i> HI Schnittstelle unterstrichen)
21_Saur rnpB PCR rev	ACT AGT AGT GAT ATT TCT ATA AGC CAT G
22_pSB3'hh delAc3 fwd	TTT CGC GGG TTC AAG TCC CG
23_pSB3'hh delAc3 rev	TGC TCT ACC GAC TGA GCT ACT CCC
35_Aab9T+1bp fwd	AAG TCG GCG CCT CCC GCT CCA GTC
36_Aab9T+1bp rev	GAA CGG CGC AGG AGC TGG CTC CCG CGA AAG GGA AAA TCC
37_Aab9T+2bp fwd	GGA TTT TCC CTT TCG CGG GAG CCA GCT CCT GCG CCG GTT CAA GTC CGG CGC CTC CCG CTC CAG TC
38_Aab9T+2bp rev	TAT AGT GAG TCG TAT TAG GCG AGC TCG AAT
39_Aab9T-1bp fwd	AAG TGC GCC TCC CGC TCC AGT C
40_Aab9T-1bp rev	GAA GCG CAG GAG CTG GCT CCC GCG AAA GGG AAA ATC C
41_T4-Loop fwd	CGC GGG AGC CAG CTC CTG CGG GGA AAC CCG CCT CCC GCT CCA GTC
42_T4-Loop rev	GAC TGG AGC GGG AGG CGG GTT TCC CCG CAG GAG CTG GCT CCC GCG
43_pSB3'hh T7	ATA TAT ATA TAT ATA ATA CGA CTC ACT ATA GG
44_Aab9Tmut for	CTC GAG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT TTT CCC TTT CGC GGG AGC CAG CTC CTG
45_Aab9Tmut rev	GAC TGG AGC GGG AGG CGG GTA AAA GGC CCG CAG GAG CTG GC
46_Thein2060cHis_D15A_for	GAA AGA GAA AGA TTA ATT CCT GCC ACC AGT GTT TTT ACC AA
47_Thein2060cHis_D15A_rev	TTG GTA AAA ACA CTG GTG GCA GGA ATT AAT CTT TCT CTT TC
48_Thein2060cHis_D146A_rev	TTC TAT GTC TTC TTT GGA AGC AAC AAT ACC TTC TCG TAA GGC C
49_Thein2060cHis_D146A_for	GGC CTT ACG AGA AGG TAT TGT TGC TTC CAA AGA AGA CAT AGA A
50_Thein2060cHis_D150A_rev	ATC AAG TTC AAG AGC TAA AAG AAT TAA TTC TAT GGC TTC TTT GG
51_Thein2060cHis_D150A_for	CCA AAG AAG CCA TAG AAT TAA TTC TTT TAG CTC TTG AAC TTG AT
52_Thein2060cHis_D168A_rev	TTT TAT CTG CTA GGT TAA GAA TAC CGC GAG CAG CAG AAA GTA ATA ACC C
53_Thein2060cHis_D168A_for	GGG TTA TTA CTT TCT GCT GCT CGC GGT ATT CTT AAC CTA GCA GAT AAA A
T7-Dig	ATA TAT ATA TAT ATA ATA CGA CTC ACT ATA GG
TtGly_1r	AGC GGG AGA CGG GAC TT
TtGly_2r	TGG AGC GGG AGA CGG GAC TT
TtGly_3r	TCC TCA CGG ACT CAT CAG
CDR4	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT TTT CCC TTT CGC GGG AGT AGA CCG ACC TTG CCA AGG TCG GGT CGC GGG TTC AAG TCC CGT CTC CCG CTC CAA TA
DR4for	TAA TAC GAC TCA CTA TAG G
DR4rev	TAT TGG AGC GGG AGA CG

### 3.1.8 Verwendete Bakterienstämme

Tab. 8: Bakterienstämme

Bezeichnung	relevanter Genotyp	Referenz
<i>B. subtilis</i> d7	<i>trpC2 metB10 SPβ<sup>-</sup> (Ery<sup>r</sup>), rnpA:P<sub>Xylose</sub></i>	Gößringer <i>et al.</i> , 2006
<i>E. coli</i> AS19	Lipopolysaccharid-Defekt	Sekiguchi & Iida, 1967
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) λ(DE3)	Studier <i>et al.</i> , 1990
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub></i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) λ(DE3) pLysS(cm <sup>R</sup> )	Studier, 1991
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam <sup>R</sup> )	Novagen

### 3.1.9 Verwendete Plasmide

Tab. 9: Plasmide

Bezeichnung	relevanter Genotyp	Verwendung	Referenz
pDG148	pBR322-pUB110 <i>KanR</i> <i>lacI P<sub>spac</sub></i>	Es folgte <i>eine</i> Inkubation über Nacht bei 37 °C. Komplementationsexp erimente mit <i>B. subtilis</i> d7 und <i>E. coli</i> BW	Stragier <i>et al.</i> , 1988
pDW66	<i>B. subtilis</i> P RNA	<i>in vitro</i> -Transkription	Smith <i>et al.</i> , 1992
pET28a(+)	<i>rep ori KanR T7lac</i> ; his-tag, thrombin-site	Proteinexpression	Novagen
pPWT1	<i>B. subtilis</i> P Protein	Proteinexpression	Niranjanakumari, Kurz, <i>et al.</i> , 1998
pUC18	<i>rep ori Ap<sup>R</sup> lacP-lacZ</i>	<i>in vitro</i> -Transkription	ThermoFisher Scientific
pUC19	<i>rep ori Ap<sup>R</sup> lacP-lacZ</i>	<i>in vitro</i> -Transkription	NEB

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Bakterielle Zellkultur

Für die Aufzucht von Bakterienzellen wurde LB-Medium verwendet, das wie alle für die bakterielle Zellkultur verwendeten Medien und Puffer zuvor bei 121 °C und 1 bar für 20 Minuten autoklaviert wurde. Zur langfristigen Lagerung wurden Glycerin-Kulturen angelegt. Hierzu wurden 500 µL einer Übernachtskultur mit 500 µL autoklaviertem Glycerin gemischt und anschließend bei -80 °C gelagert.

LB-Medium	
Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
NaCl	10 g/L
pH-Wert	7,0

#### 3.2.1.1 Zellaufzucht in Flüssigmedium

Für analytische Zwecke wurden 3-5 mL Übernachtskulturen entweder direkt aus Glycerinkulturen oder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte inokuliert. Für präparative Zwecke (Plasmidisolation bzw. Proteinexpression) wurde das Volumen auf bis zu 500 mL erhöht. Zur Selektion wurden die Antibiotika Chloramphenicol (cam, 34 µg/mL), Kanamycin (kan, 50 µg/mL) und / oder Ampicillin (amp, 100 µg/mL) zugegeben. Die Übernachtskulturen wurden bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) für 10-15 Stunden inkubiert. Falls notwendig wurde zum Überprüfen des Bakterienwachstums die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) mit einem Spektralphotometer bestimmt.

#### 3.2.1.2 Zellaufzucht auf Agarplatten

Für die Herstellung fester Nährböden wurden 15 g/L Agar zum LB-Medium vor dem Autoklavieren hinzugefügt. Nach Aufkochen des Agars und anschließendem Abkühlen wurde dann ab einer Temperatur von 50 °C das entsprechende Antibiotikum zur Selektion zugegeben und das Medium in Petrischalen gegossen. Zum Erhalten von Einzelkolonien wurde mit Hilfe einer Einweg-Impföse eine kleine Menge der Glycerinkultur im Dreiösenausstrich ausplattiert. Die Agarplatte wurde anschließend für 10-15 h über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 3.2.1.3 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Für das Einschleusen von Plasmid-DNA in *E. coli* Zellen sind chemisch kompetente Zellen von Nöten. Zur Herstellung dieser wurden zwei verschiedene Varianten gewählt.

Für den *E. coli* Stamm DH5α wurde zunächst eine Hauptkultur mit einer Übernachtskultur angeimpft ( $OD_{600} \sim 0,1$ ) und bei 37 °C unter Schütteln (160 rpm) inkubiert. Bei Erreichen einer  $OD_{600}$  von 0,5-0,6 wurde das Wachstum der Bakterien gestoppt, indem die Zellen für 10-15 Minuten auf Eis gestellt wurden. Die anschließende Zellernte wurde bei 3200 × g und

4 °C für 7 Minuten durchgeführt. Das Zellpellet wurde in TFB 1-Lösung resuspendiert und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in TFB 3-Lösung aufgenommen und in Aliquots von 300 µL abgefüllt. Diese wurden sodann in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80 °C gelagert.

TFB 1		TFB 3	
MOPS	10 mM	MOPS	100 mM
RbCl	10 mM	CaCl <sub>2</sub>	50 mM
pH-Wert	7,0 mit NaOH eingestellt	KCl	10 mM
		Glycerin	15 %
		pH-Wert	6,5 mit NaOH eingestellt

Für die *E. coli* Stämme Rosetta (DE3), BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS, die für die rekombinante Proteinüberexpression genutzt wurden, wurde davon abweichend verfahren. Hier wurde zum Animpfen der Hauptkultur die Übernachtskultur 1:100 in LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,2-0,5 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach anschließender Inkubation von 10 Minuten auf Eis wurden die Zellen bei 3200 × g und 4 °C für 7 Minuten geerntet. Das Zellpellet wurde in 1/10 des Volumens der Hauptkultur in TSS-Puffer aufgenommen. Die Zellen wurden in 50 µL-Aliquots in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80 °C gelagert.

TSS	
PEG8000	12,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	30 mM
DMSO	5 %
LB-Medium	ad 50 mL

### 3.2.1.4 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

300-500 ng Plasmid-DNA bzw. 4 µL des *DpnI*-Verdau (3.2.3.4) im Falle der *in vitro*-Mutagenese (3.2.3.9) wurden zu 50 µL chemisch kompetenten *E. coli* Zellen gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Lediglich im Falle einer Ligation wurde von diesem Protokoll abgewichen und der komplette Ligationsansatz (20 µL) wurde mit 30 µL chemisch kompetenten DH5α-Zellen gemischt. Im Anschluss an die Inkubation der Zellen auf Eis wurde ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C induziert. Nach 2 Minuten Inkubation auf Eis wurden 500 µL LB-Medium dazu pipettiert und die Zellen für 1 Stunde bei 37 °C und 800 rpm inkubiert. Danach wurden die Zellen geerntet (Zentrifugation für 4 Minuten bei 2300 × g und Raumtemperatur), das Pellet wurde in 50 µL LB-Medium resuspendiert und auf Selektivplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht.

### 3.2.1.5 Herstellung elektro-kompetenter Zellen

Für das Einbringen von Plasmid-DNA in den *B. subtilis* d7-Stamm wurde eine Elektroporation durchgeführt, für die zunächst elektrokompetente Zellen hergestellt wurden.



Hierzu wurde eine 50 mL-Kultur (LB-Medium mit 1 % Xylose und 5 µg/mL Chloramphenicol) mit einer Einzelkolonie inokuliert und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C geschüttelt. Die Hauptkultur (200 mL Wachstumsmedium mit 1 % Xylose und 5 µg/mL Chloramphenicol) wurde mit 12,5 mL der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C geschüttelt. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,85-0,95 wurden die Zellen bei 5000 × g für 8 Minuten geerntet. Das Zellpellet wurde drei Mal mit Waschlösung gewaschen.

Wachstumsmedium		Waschlösung	
Sorbitol	0,5 M	Sorbitol	0,5 M
in LB-Medium		Mannitol	0,5 M
		Glycerin	10 %

Final wurde das Zellpellet in 5 mL Waschlösung resuspendiert und die Zellsuspension in je 300 µL-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und fortan bei -80 °C gelagert.

### 3.2.1.6 Elektrotransformation von *B. subtilis* Zellen

Bei der Elektrotransformation werden durch eine kurz angelegte elektrische Spannung Poren in der Zellmembran erzeugt, wodurch Makromoleküle (in diesem Fall Plasmid-DNA) in die Zelle diffundieren können.

Nach Auftauen der elektrokompentenen Zellen wurden 80 µL Zellen mit 5 µL Plasmid (± 200-500 ng) auf Eis gemischt. Dieses Gemisch wurde in eine 2 mm-Elektroporationsküvette überführt, es wurde ein Strompuls (2,5 kV / 50 µF / 100 Ω / τ = 5 ms) verabreicht und sofort 1 mL *outgrowth*-Medium (+ 1 % Xylose) dazugegeben.

<i>outgrowth</i> -Medium	
Sorbitol	0,5 M
Mannitol	0,38 M
in LB-Medium	

Nach Inkubation über 2 Stunden bei 37 °C unter Schütteln (800 rpm), wurden die Zellen für 5 Minuten bei 2300 × g zentrifugiert und 800 µL Überstand abgenommen. Die Zellen wurden in dem restlichen Medium resuspendiert und anschließend auf Agarplatten (2 % Xylose, 5 µg/mL Chloramphenicol und 20 µg/mL Kanamycin) ausplattiert. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C.

### 3.2.1.7 Komplementationsexperimente mit *B. subtilis* d7

Für RnpA-Komplementationsexperimente fand der *B. subtilis* d7-Stamm Verwendung, in dem das endogene *rnpA*-Gen unter der Kontrolle eines Xylose-Promotors steht (Gößringer *et al.*, 2006). Dies hat zur Folge, dass die Zellen nur unter Xylose-Bedingungen wachsen, da beispielsweise unter Glukose-Bedingungen aufgrund einer fehlenden RNase P-Funktionalität kein Wachstum möglich ist. Wird Glukose als Kohlenstoffquelle verwendet, können die *B. subtilis* d7-Zellen nur dann wachsen, wenn die endogene RNase P substituiert



wird, beispielsweise mit einem Plasmid-kodierten homologen oder heterologen RNase P-Protein.

Für die Komplementationsexperimente wurde eine 3 mL-Übernachtskultur (2 % Xylose, 20 µg/mL Kanamycin und 5 µg/mL Chloramphenicol) mit dem entsprechenden Stamm inokuliert. Am nächsten Morgen wurde eine 40 mL-Vorkultur (2 % Xylose, 20 µg/mL Kanamycin und 5 µg/mL Chloramphenicol) mit der Übernachtskultur angeimpft, sodass die resultierende OD<sub>600</sub> ~0,1 betrug. Erreichten die Zellsuspensionen eine OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 (exponentielle Wachstumsphase), wurden die Zellen zur Ernte für 10 Minuten bei 3200 × g und Raumtemperatur zentrifugiert. Zum Entfernen der Xylose wurde das Zellpellet zweimal mit LB-Medium gewaschen. Hierzu wurde das Zellpellet in 40 mL LB-Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Final wurde das Zellpellet in 40 mL LB-Medium aufgenommen und eine 1:25.000 Verdünnung der Zellsuspension in LB-Medium hergestellt. 100 µL dieser Verdünnung wurden sodann auf Agarplatten (2 % Xylose bzw. 2 % Glukose, 20 µg/mL Kanamycin und 5 µg/mL Chloramphenicol) mit Glaskügelchen ausplattiert. Die Analyse der Platten erfolgte über 48 Stunden. Zu Dokumentationszwecken wurden Bilder mit dem Geldokumentationssystem gemacht. Als Positivkontrolle diente ein Plasmid, welches das *B. subtilis* RnpA exprimiert (pDG Bsu RnpA). Dieser Stamm sollte sowohl unter Xylose als auch unter Glukose wachsen. Als Negativkontrolle diente der Leervektor (pDG), bei dem lediglich ein bakterielles Wachstum unter Xylose-Bedingungen erwartet wurde.

### 3.2.1.8 Komplementationsexperimente mit *E. coli* BW

Bei dem *E. coli* BW-Stamm steht die Expression des *mnpB*-Gens, das für die P RNA kodiert, unter Kontrolle eines Arabinose-Promotors (Wegscheid & Hartmann, 2006). Folglich wachsen die Zellen nur unter Arabinose-Bedingungen, da beispielsweise unter Glukose-Bedingungen aufgrund einer fehlenden RNase P-Funktionalität kein Wachstum möglich ist. Wird Glukose als Kohlenstoffquelle verwendet, können die *E. coli* BW-Zellen nur dann wachsen, wenn die endogene RNase P komplementiert wird, z.B. durch eine Plasmid-kodierte P RNA oder eine Protein-basierte RNase P.

Für die Komplementationsexperimente wurden die entsprechenden Stämme auf einer Agarplatte mit den für die Selektion notwendigen Antibiotika (Ampicillin und Chloramphenicol) sowie 10 mM Arabinose ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine Einzelkolonie zum Waschen in 500 µL LB-Medium resuspendiert, für 2 Minuten bei 1500 × g zentrifugiert und anschließend erneut in 500 µL LB-Medium aufgenommen. 10 µL dieser Suspension wurden auf zuvor (für mindestens eine Stunde) getrocknete Agarplatte mit 10 mM Arabinose bzw. Glukose und 100 µg/mL Ampicillin sowie 34 µg/mL Chloramphenicol getropft. Dabei wurden stets drei technische Replikate angesetzt. Die Platten wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, ohne diese zu bewegen. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37 °C über 5 Tage. Das Zellwachstum

wurde alle 24 Stunden mittels Geldokumentationsanlage dokumentiert. Als Negativkontrolle wurde der pDG-Leervektor verwendet und als Positivkontrolle ein Plasmid mit *E. coli* P RNA-Sequenz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern das bakterielle *T. indicus* HARP sowie dessen Mutanten die RNase P komplementieren können. Um zu überprüfen, ob die untersuchten Proteine auch löslich innerhalb der Zelle vorlagen, wurde nach Abschluss des Komplementationsexperiments je ein Zell-Spot von der Arabinose-Platte in 500 µL LB-Medium aufgenommen und bei 2300 × g für 4 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 mL Lysepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 500 µg Lysozym und Überführen der Zellsuspension in 2 mL Röhrchen mit 0,1 mm Kügelchen (*Lysing Matrix B*) wurden die Zellen mittels FastPrep (je 4 m/s, 20 Sekunden) in drei Zyklen aufgeschlossen. Um die Kügelchen zu entfernen, erfolgte im Anschluss eine Zentrifugation bei 2300 × g für eine Minute. Der Überstand von je zwei technischen Replikaten wurde zusammengenommen und erneut bei 9600 × g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert, um die löslichen Proteine von den unlöslichen zu trennen. Das Pellet dieses Zentrifugationsschritts wurde in 90 µL TuS-Puffer resuspendiert.

Lysepuffer		TuS-Puffer	
Tris-HCl	25 mM	Tris-HCl pH 7,4	50 mM
NaCl	100 mM	NaCl	100 mM
EDTA	2 mM	Harnstoff	8 M
Triton X-100	0,1 %		
pH-Wert	8,0		
Protease-Inhibitor	1 Tablette / 10 mL		

Zum Konzentrieren der löslichen Proteine im Überstand (~1 mL) wurde eine TCA-Fällung durchgeführt. Dazu wurde so viel TCA dazugegeben, dass die finale Konzentration 10 % (v/v) betrug. Die Fällung der Proteine erfolgte für 30 Minuten auf Eis. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 16200 × g und 4 °C wurde das Proteinpellet mit 200 µL Aceton p.a. gewaschen und anschließend erneut für 10 Minuten bei 16200 × g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Das Proteinpellet der TCA-Fällung wurde abschließend in 90 µL TuS-Puffer aufgenommen. Das anschließende SDS-Gel (3.2.5.1) wurde mit je 15 µL Probe beladen und die Detektion erfolgte mittels Western Blot (3.2.5.3).

### 3.2.1.9 Hemmhofstest

Um potentiell antibakterielle Verbindungen, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. SCHLITZER (Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) entstanden, nicht nur auf enzymkinetische Inhibition *in vitro* zu testen, sondern auch die potentielle Hemmung des Bakterienwachstums zu untersuchen, wurde ein Hemmhofstest durchgeführt. Für diese Experimente wurde der *E. coli* AS19-Stamm (Sekiguchi & Iida, 1967; Gruegelsiepe *et al.*, 2006) verwendet, welcher sich durch einen Lipopolysaccharid-Defekt auszeichnet. Aufgrund dieses Defekts sollten etwaige Verbindungen leichter in die

Bakterienzelle aufgenommen werden. Zunächst wurde am Vorabend des Experiments eine 3 mL-Übernachtskultur mit einer Einzelkolonie inokuliert. Am nächsten Morgen wurde dann mit 10 µL dieser Übernachtskultur wiederum eine 3 mL-Übertagkultur inokuliert und für ca. 6 Stunden bei 220 rpm und 37 °C inkubiert. Die OD<sub>600</sub> sollte nach diesem Zeitfenster bei 3,5-4 liegen. Die Bakterienkultur wurde anhand des gemessenen OD<sub>600</sub>-Werts auf eine OD<sub>600</sub> von 0,06 mit LB-Medium verdünnt. 100 µL dieser verdünnten Bakterienkultur wurden mithilfe von Glaskügelchen auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen. Um eine vergleichbare Schichtdicke des LB-Agars zu gewährleisten, wurde beim Gießen dieser Platten jeweils ein konstantes Volumen von 20,0 mL verwendet. Nach Ausplattieren der Bakterienkultur wurden vier Filterpapierplättchen mit größtmöglichem Abstand mit einer sterilen Pinzette auf der LB-Agarplatte platziert und leicht angedrückt. Auf diese Plättchen wurden 10 µL der zu testenden Substanz pipettiert. Als Negativkontrolle wurden 10 µL DMSO p.a. verwendet. Als Positivkontrolle dienten 10 µg Ampicillin, welches 10 µL einer 2,86 mM Lösung entspricht. Für die zu testenden Verbindungen wurde im Regelfall eine 50 mM-Lösung verwendet, sofern es die Löslichkeit hergab. Die Platten wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit Deckel nach oben stehen gelassen, sodass die Verbindungen vordiffundieren und die Filterplättchen anhaften konnten. Die Platten wurden anschließend über Nacht (15-16 Stunden) mit Deckel nach unten im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zur Dokumentation wurden die Platten am folgenden Tag mit dem Geldokumentationssystem fotografiert und der Durchmesser der aufgetretenen Hemmhöfe mittels Lineal gemessen.

Um im Weiteren die Spezifität der Effekte zu untersuchen, wurde der *B. subtilis* d7-Stamm verwendet, bei dem das *rpnA*-Gen unter Kontrolle eines Xylose-Promotors steht (Gößringer *et al.*, 2006). Unter Verwendung eines *B. subtilis* d7-Stamms, der die Protein-basierte RNase P aus *A. thaliana* (PRORP3) Plasmid-basiert exprimiert, lassen sich Aussagen treffen, ob die beobachteten antibakteriellen Effekte auf eine spezifische Inhibition der bakteriellen RNase P zurückzuführen sind oder eher unspezifischer bzw. toxischer Natur sind. Hierfür wurden zunächst Übernachtskulturen und Vorkulturen angesetzt mit anschließendem Entfernen der Xylose wie unter 3.2.1.7 beschrieben. Die finale Zellsuspension wurde sodann allerdings nicht 1:25.000 (wie in den Komplementationsexperimenten) sondern lediglich 1:100 mit LB-Medium verdünnt. Somit sollte ein dichtes Bakterienwachstum über Nacht sichergestellt werden, welches zur Bewertung von Hemmhöfen von Nöten ist. Es wurden 100 µL dieser Verdünnung auf einer LB-Agarplatte (2 % Xylose bzw. 2 % Glukose, 20 µg/mL Kanamycin und 5 µg/mL Chloramphenicol) ausplattiert. Im Weiteren wurden dann die Filterplättchen platziert und die zu untersuchenden Substanzen, wie oben für den *E. coli* AS19-Stamm beschrieben, aufgetragen.

### 3.2.2 Allgemeine Nukleinsäure Techniken

#### 3.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele wurden verwendet, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen. Die Konzentration der Agarose in einem Bereich von 0,5 % bis 1,5 % (m/V) wurde entsprechend der erwarteten Größe des Fragments gewählt. Die Agarose wurde in 1× TBE-Puffer aufgenommen und zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen der klaren Lösung auf 50-60 °C wurden 0,05 µL/mL GelRed-Lösung für die anschließende Detektion unter UV-Licht zugesetzt. 1 Volumenteil des DNA-Probenpuffers wurde mit 4 Volumenteilen der Probe gemischt. Die Elektrophorese wurde in 1× TBE-Puffer horizontal bei einer Spannung von 90-120 V/cm durchgeführt. Unter einer Anregungswellenlänge von 254-366 nm wurde das emittierte Fluoreszenzsignal in einer Geldokumentationsanlage erfasst.

5× TBE		5× DNA-Probenpuffer	
Tris	445 mM	Bromphenolblau	0,05 %
Borsäure	445 mM	Xylencyanolblau	0,05 %
EDTA	10 mM	Tris HCl pH 7,4	10 mM
		EDTA pH 8,0	1 mM
		Glycerin	70 %

#### 3.2.2.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Denaturierende Polyacrylamid (PAA)-Gele wurden verwendet um Nukleinsäuren (v.a. RNA) ihrer Größe nach aufzutrennen. Durch das Denaturieren der Nukleinsäure mittels Zugabe von Harnstoff (8 M) gehen Sekundär- und Tertiärstrukturen verloren. Die Gelmatrix entsteht durch eine radikalische Polymerisationsreaktion von Acrylamid und Bisacrylamid. Diese wird durch die Zugabe des Radikalstarters Ammoniumperoxodisulfat (APS) und des Polymerisierungskatalysators Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestartet. Entscheidend für den Grad der Quervernetzung des Gels und der daraus resultierenden Trennleistung ist zum einen das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid und zum anderen die Endkonzentrationen der beiden Bestandteile. Grundsätzlich wurde für das Ansetzen der Gellösung eine Stammlösung aus 48 % Acrylamid und 2 % Bisacrylamid verwendet. Für die RNase P katalysierte Prozessierung der prä-tRNA (3.2.6) wurden denaturierende PAA-Gele mit 20 % (v/v) Acrylamidkonzentration verwendet.

20 % PAA-Lösung	
Harnstoff	8 M
PAA	20 % (v/v)
TBE	1×

Lediglich für das Gelaufreinigen von *in vitro*-Transkripten (3.2.4.1) und von 5'-Markierungen (3.2.4.3) wurde die PAA-Konzentration auf 8 % (v/v) verringert. Der Gellösung wurden  $1/100$  Volumen 10 % (w/v) APS und  $1/1000$  Volumen TEMED zugesetzt und diese wurde anschließend zwischen zwei Glasplatten gegossen. Die vertikale Gelelektrophorese wurde in 1× TBE durchgeführt. Die Proben wurden mit Probenpuffer im

Verhältnis 1:1 versetzt und anschließend für 3 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Vor dem Start des Gels wurden die Taschen gründlich gespült und im Anschluss die Proben zügig aufgetragen.

2× RNA-Probenpuffer, denaturierend	
BPB Bromphenolblau	0,02 % (w/v)
XCB Xylencyanolblau	0,02 % (w/v)
Harnstoff	2,6 M
Formamid	66 % (v/v)
TBE pH 8,0	2×

Die Gelelektrophorese wurde in der Regel bei 25 mA durchgeführt, konnte aber in Abhängigkeit von der Gelgröße und der Konzentration an Polyacrylamid variieren. Das Fortschreiten der Elektrophorese konnte anhand der beiden Farbstoffe im Probenpuffer verfolgt werden. Im Falle eines denaturierenden 20 %-Gels laufen Nukleinsäuren einer Länge von 12 bzw. 55 Nukleotiden auf der Höhe des Bromphenol- bzw. Xylencyanolblaus. Zur Detektion der Nukleinsäuren wurde eine GelRed-Färbung für 15 Minuten unter Schütteln durchgeführt. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und die Analyse erfolgte mit der Geldokumentationsanlage. Für präparative Zwecke hingegen erfolgte die Detektion mittels UV-Licht (3.2.4.1). Als dritte Variante wurde der *Phosphorimager* für die Auswertung von Gelen mit <sup>32</sup>P-markierter RNA (3.2.6.4) verwendet.

### 3.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei deren Absorptionsmaximum von 260 nm. Hierzu wurden 2 µL der zu untersuchenden Lösung am UV5 Nano-Spektrometer vermessen. Als Nullabgleich diente das jeweilige Lösungsmittel, zumeist ddH<sub>2</sub>O. Das ermittelte Absorptionsspektrum diente zum einen zur Konzentrationsbestimmung, zum anderen war hierdurch auch eine Aussage über die Qualität der gemessenen Probe möglich. Neben der Absorption bei 260 nm wurde diese auch bei einer Wellenlänge von 280 nm und 230 nm bestimmt. Da 280 nm das Absorptionsmaximum von Proteinen darstellt, konnte über den Quotient  $A_{260}/A_{280}$  eine gewisse Aussage über Proteinverunreinigungen getroffen werden. Im Falle von DNA-Proben sollte der Quotient bei 1,8 liegen, bei RNA-Proben hingegen bei 2,0. Ein deutlich erniedrigter Wert deutet indessen auf Proteinverunreinigungen hin. Über den Quotienten  $A_{260}/A_{230}$ , der > 2 sein sollte, sind hingegen Rückschlüsse auf beispielsweise phenolische Verunreinigungen möglich.

Die Berechnung der Konzentration erfolgte anhand der nach dem *Lambert-Beerschen* Gesetz modifizierten Gleichung:

$$c = \frac{A * k}{b}$$

(A=Absorption, k=Korrekturfaktor ( $k_{RNA}=40 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ;  $k_{ssDNA}=37 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ;  $k_{dsDNA}=50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ), b=Pfadlänge)

### **3.2.2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Diese Methode dient zum Entfernen von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen. Zuerst wurde das Probenvolumen mit Wasser auf mindestens 300 µL aufgefüllt, was die bevorstehende Phasentrennung letztlich erleichtern sollte. Im Anschluss daran wurde das identische Volumen an Phenol dazugegeben. Während im Falle einer DNA-Aufreinigung Phenol pH 7,5-8 verwendet wurde, kam bei einer RNA-Aufreinigung hingegen Aqua-Phenol pH 4,5-5 zum Einsatz, um somit auch vorhandene DNA zu entfernen. Zum Mischen der Probe wurde für 2 Minuten gevortext und im Anschluss zur Phasentrennung für 5 Minuten bei 5900 × g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde (zum Weiterarbeiten) abgenommen und die untere, organische Phase, in der sich die Proteine befinden sollten, verworfen. Zu der wässrigen Phase wurde sodann in gleichen Teilen Chloroform hinzugegeben und im Weiteren zum Mischen und zur Phasentrennung identisch wie für das zuvor beschriebene Phenol verfahren. Die obere, wässrige Phase wurde anschließend erneut abgenommen und einer Ethanol-Fällung unterzogen.

### **3.2.2.5 Ethanol-Fällung**

Ethanol-Fällungen von Nukleinsäuren wurden verwendet, um DNA bzw. RNA zu konzentrieren und um Salze zu entfernen. Hierzu wurden  $\frac{1}{10}$  Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,0 und das 2,5-fache Volumen an absolutem Ethanol zur wässrigen Lösung gegeben. Die Fällung erfolgte im Regelfall entweder über Nacht bei -20 °C oder für 20 Minuten bei -80 °C. Während Salze überwiegend im Ethanol-Überstand verbleiben, fallen Nukleinsäuren bei diesem Schritt aus. Im Anschluss wurde für mindestens 1 Stunde bei 4 °C und 12900 × g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, das Nukleinsäure-Pellet wurde für etwa 5 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und schließlich in einem angemessenen Volumen ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

## **3.2.3 DNA-Methoden**

### **3.2.3.1 Präparation von Plasmid-DNA**

Zur Isolation von doppelsträngiger Plasmid-DNA wurde sowohl das GeneJet Plasmid Mini Kit als auch das Plasmid Midi und Maxi Kit verwendet. Für das GeneJet Plasmid Mini Kit wurden 3-5 mL Übernachtskultur eingesetzt. Dieser kleine Ansatz wurde durchgeführt, wenn das isolierte Plasmid für Klonierungen verwendet werden sollte. Für den größeren Maßstab mittels Plasmid Midi / Maxi Kit wurde das Volumen der Übernachtskultur auf 50 mL bzw. 400 mL erhöht. Diese Präparationen wurden im Weiteren als Templat für *in vitro*-Transkriptionen (3.2.4.1) genutzt. Die Kits wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet und die Elution der Plasmid DNA erfolgte in einem angemessenen Volumen ddH<sub>2</sub>O.

### 3.2.3.2 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient zur Vervielfältigung von DNA-Molekülen. Diese wurde zum einen im Rahmen von Klonierungen verwendet und zum anderen um das DNA-Templat für die *in vitro*-Transkription anzureichern. Für Klonierungsarbeiten kam die Invitrogen™ Platinum™ SuperFi™ DNA-Polymerase als Master-Mix zur Anwendung. In diesem Master-Mix sind die Polymerase sowie MgCl<sub>2</sub> und die Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) bereits enthalten. Somit mussten lediglich Templat und Primer wie folgt zugesetzt werden:

PCR - SuperFi		
2× Platinum™ SuperFi™ PCR Master Mix		1×
Primer <i>forward</i>		500 nM
Primer <i>reverse</i>		500 nM
5× SuperFi™ GC Enhancer		1×
Templat		0,4 ng/μL
ddH <sub>2</sub> O		ad 50 μL

Im Allgemeinen wurden 30 Zyklen nach folgendem Schema durchgeführt:

Thermoprogramm SuperFi			
initiale Denaturierung	98 °C	30 Sekunden	
Denaturierung	98 °C	10 Sekunden	} 30 Zyklen
<i>Primerannealing</i>	58 °C	10 Sekunden	
Elongation	72 °C	30 Sekunden	
finale Elongation	72 °C	5 Minuten	

Die Temperatur für das *Primerannealing* wurde in Abhängigkeit der verwendeten Primer variiert. Im Anschluss an die PCR wurde das Ergebnis über ein Agarosegel (3.2.2.1) analysiert und über Säulchen aufgereinigt (3.2.3.3).

Zur Vervielfältigung der DNA-Template, die zur Herstellung der 3'-Substratvarianten CCA, ΔCCA und 40-nt verwendet wurden, wurde die Phusion Polymerase wie folgt genutzt:

PCR - Phusion		
Phusion™ DNA Polymerase		0,02 U
Primer <i>forward</i>		1 μM
Primer <i>reverse</i>		1 μM
5× HF-Puffer		1×
dNTPs		0,25 mM
DMSO		3 %
Templat		0,3 ng/μL
ddH <sub>2</sub> O		ad 50 μL

Um eine ausreichende Menge an Templat für die nachfolgende *in vitro*-Transkription zu erhalten, wurden 10 Ansätze je 50 µL vorbereitet und folgendes Thermoprogramm durchgeführt:

Thermoprogramm Phusion		
initiale Denaturierung	98 °C	30 Sekunden
Denaturierung	98 °C	10 Sekunden
<i>Primerannealing</i>	57 °C	30 Sekunden
Elongation	72 °C	15 Sekunden
finale Elongation	72 °C	1 Minute

} 35 Zyklen

Zur Templat-Herstellung des ΔD-Substrats wurde die Taq-Polymerase wie folgt genutzt:

PCR - Taq	
Taq DNA Polymerase	0,05 U
Primer <i>forward</i>	1 µM
Primer <i>reverse</i>	1 µM
10× Taq-Puffer	1×
dNTPs	0,25 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Templat	0,3 ng/µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL

Für eine ausreichende Templatmenge wurden 5 Ansätze benötigt.

Thermoprogramm Taq		
initiale Denaturierung	94 °C	3 Minuten
Denaturierung	94 °C	35 Sekunden
<i>Primerannealing</i>	50 °C	35 Sekunden
Elongation	72 °C	40 Sekunden
finale Elongation	72 °C	5 Minuten

} 30 Zyklen

### 3.2.3.3 Säulchen-Aufreinigung

PCR-Produkte sowie Restriktions-verdaute PCR-Produkte wurden mit dem *Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up* Kit aufgereinigt. Hierbei werden nicht eingebaute Nukleotide, Enzyme und Puffer-Bestandteile vom DNA-Produkt abgetrennt. Die Aufreinigung läuft dabei über Säulchen, in denen die DNA an eine Silikamembran bindet. Die Reinigung erfolgte nach Herstellerangaben und es wurde in 50 µL ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.2.3.4 DpnI-Verdau

Der *DpnI*-Verdau dient dazu, nach einer PCR die Matrizen-DNA abzubauen. *DpnI* hydrolysiert spezifisch 5'-GATC-Sequenzen mit methylierten Adeninen. Da lediglich die Templat-DNA methyliert vorliegt, kann diese selektiv abgebaut werden. Für die Reaktion wurden 20 µL des PCR-Ansatzes verwendet und 1 µL *DpnI* dazugegeben. Dieser Ansatz wurde für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.3.5 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme schneiden DNA spezifisch nach oder vor ihrer jeweiligen 4-6 Nukleotid langen Erkennungssequenz. Im Rahmen von Klonierungen ermöglichte dies das Einbringen



eines Inserts in einen Zielvektor. Wurden sowohl das durch PCR-amplifizierte Insert inklusive der relevanten Erkennungssequenz als auch der Zielvektor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, so konnte das Insert im nächsten Schritt über Ligation (3.2.3.7) in den Zielvektor eingebracht werden. In dieser Arbeit kamen überwiegend *FastDigest*-Enzyme zum Einsatz. Diese Enzyme sind alle in einem Universalpuffer aktiv, sodass der Restriktionsverdau mit zwei Enzymen gleichzeitig erfolgen konnte. Um zu verhindern, dass der Zielvektor bereits während des Restriktionsverdaus religiert, wurde die thermosensitive Alkaline-Phosphatase (Fast-AP) zugesetzt. Auch dieses Enzym entfaltet in dem Universalpuffer seine Aktivität. Welche Restriktionsenzyme für die jeweilige Klonierung im Einzelnen verwendet wurden, ist dem Abschnitt 3.2.3.9 zu entnehmen. Der Restriktionsverdau wurde grundsätzlich wie folgt durchgeführt:

Restriktionsverdau	Plasmid	Insert
DNA	bis 2 µg	bis 0,5 µg
10× <i>FastDigest</i> Puffer	2 µL	2 µL
<i>FastDigest</i> Enzym A	1 µL	1 µL
<i>FastDigest</i> Enzym B	1 µL	1 µL
Fast AP	1 µL	-
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µL	ad 20 µL

Der Verdau erfolgte für 1 Stunde bei 37 °C und wurde durch das Entfernen des Enzyms mittels Säulchen-Aufreinigung (3.2.3.3) gestoppt.

Ein weitaus größerer Ansatz wurde für das Linearisieren von Plasmiden, die als Templat für die *in vitro*-Transkription dienen, benötigt. Für das pSBpt3-hh Plasmid und dessen Varianten wurde das *Bam*HI *FastDigest*-Enzym verwendet. Es wurde in einem 100 µL Ansatz 150-200 µg Plasmid für ~6 Stunden bei 37 °C analog zum Restriktionsverdau für Klonierungen verdaut. Zur Linearisierung des *pUC19\_Tma mpB*-Plasmids fand das *Btg*I-Enzym wie folgt Verwendung:

<i>Btg</i> I-Verdau	
Plasmid	30-50 µg
10× <i>CutSmart</i> Puffer	7 µL
Enzym	6 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 70 µL

Der Restriktionsverdau erfolgte für 3 Stunden bei 37 °C. Im Anschluss wurde der Restriktionsverdau über eine Agarose-Gelelektrophorese (3.2.2.1) analysiert und einer Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.2.4) mit nachfolgender Ethanol-Fällung (3.2.2.5) zur Reinigung unterzogen, bevor das linearisierte Plasmid als Templat für die *in vitro*-Transkription (3.2.4.1) eingesetzt wurde.

### 3.2.3.6 5'-Phosphorylierung von DNA

Zur 5'-Phosphorylierung von DNA wurde die Polynukleotidkinase des *E. coli* Phagen T4 (T4 PNK) verwendet. Hierbei wird die terminale Phosphatgruppe des ATPs auf die freie 5'-Hydroxylgruppe der DNA übertragen. Es wurde folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

5'-Phosphorylierung	
<i>DpnI</i> -Verdau	10 µL
10× T4 PNK Puffer A	2 µL
T4 PNK	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	7 µL

Dieser Ansatz wurde für 40 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde das Enzym für 10 Minuten bei 75 °C durch Hitze inaktiviert. Nur nach erfolgreicher Phosphorylierung konnte im Anschluss das PCR-Produkt einer ortsgerichteten *in vitro*-Mutagenese (3.2.3.9) ligiert werden.

### 3.2.3.7 Ligation von DNA

Eine Ligation wurde durchgeführt, um zum einen ein DNA-Fragment in einen linearisierten Vektor zu integrieren und zum anderen um das im Zuge einer *in vitro*-Mutagenese entstandene PCR-Produkt, das mit *back-to-back* Primern generiert wurde, zu zirkularisieren. Um eine Phosphodiesterbindung zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppe zu generieren, wurde die DNA-Ligase des *E. coli* Phagen T4 gemäß folgendem Ansatz verwendet:

Ligation	
linearisierter Vektor	1 µL
Insert	3 µL
10× T4 DNA-Ligase Puffer	2 µL
T4 DNA-Ligase	1 µL
ddH <sub>2</sub> O	13 µL

Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur für 2,5 Stunden durchgeführt. Anschließend wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert, um die Ligase zu inaktivieren. Im Falle einer *in vitro*-Mutagenese wurden 20 µL des Phosphorylierungs-Ansatzes eingesetzt und das Reaktionsvolumen auf 30 µL erhöht.

### 3.2.3.8 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR diente zur Überprüfung, ob der Vektor inklusive des Inserts erfolgreich transformiert wurde. Ein initialer Denaturierungsschritt ermöglicht es hierbei aus aufgenommenen Bakterienkolonien gesuchte DNA-Sequenzen nachzuweisen. Für die PCR wurde der *5× HOT CYTOPol Blend Master Mix* verwendet und pro Kolonie ein 10 µL-Ansatz wie folgt angesetzt:

Kolonie-PCR	
5× HOT CYTOPol Blend Master Mix	2 µL
Primer 1 (10 µM)	0,25 µL
Primer 2 (10 µM)	0,25 µL
ddH <sub>2</sub> O	7,5 µL

Die zu untersuchende Einzelkolonie wurde mittels Pipettenspitze gepickt, auf eine LB-Agarplatte mit Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen und anschließend in den vorgelegten 10 µL-Ansatz aufgenommen. Als Primer wurden jene Oligonukleotide verwendet, die auch für die spätere Sequenzierung Verwendung fanden.

Die PCR wurde mit folgendem Thermoprogramm durchgeführt:

Kolonie-PCR Thermoprogramm		
95 °C	15 Minuten	
95 °C	30 Sekunden	} 25 Zyklen
60 °C	30 Sekunden	
72 °C	1 Minute	
72 °C	10 Minuten	

Die Größe des entstandenen PCR-Produkts wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.2.2.1) analysiert. Hierzu wurden 3,5 µL des Reaktionsansatzes aufgetragen. In Anwesenheit des Inserts sollte das PCR-Produkt im Vergleich zum Leervektor deutlich größer sein.

### 3.2.3.9 Klonierungen

#### pUC18 *S. aureus rnpB*

Die Klonierung dieses Konstrukts erfolgte mittels Restriktionsenzymen. Das *S. aureus rnpB* Gen wurde über eine PCR (3.2.3.2) ausgehend vom Plasmid pHY300 *S. aureus* P<sub>Bs rnpB</sub> rnpBwt (Wegscheid & Hartmann, 2007) unter Verwendung von Primer 19 und 20 (Tab. 7, Seite 37) amplifiziert. Das PCR Produkt sowie der pUC18 Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sac*I geschnitten (3.2.3.5), was eine Ligation (3.2.3.7) des Inserts mit dem Vektor ermöglichte.

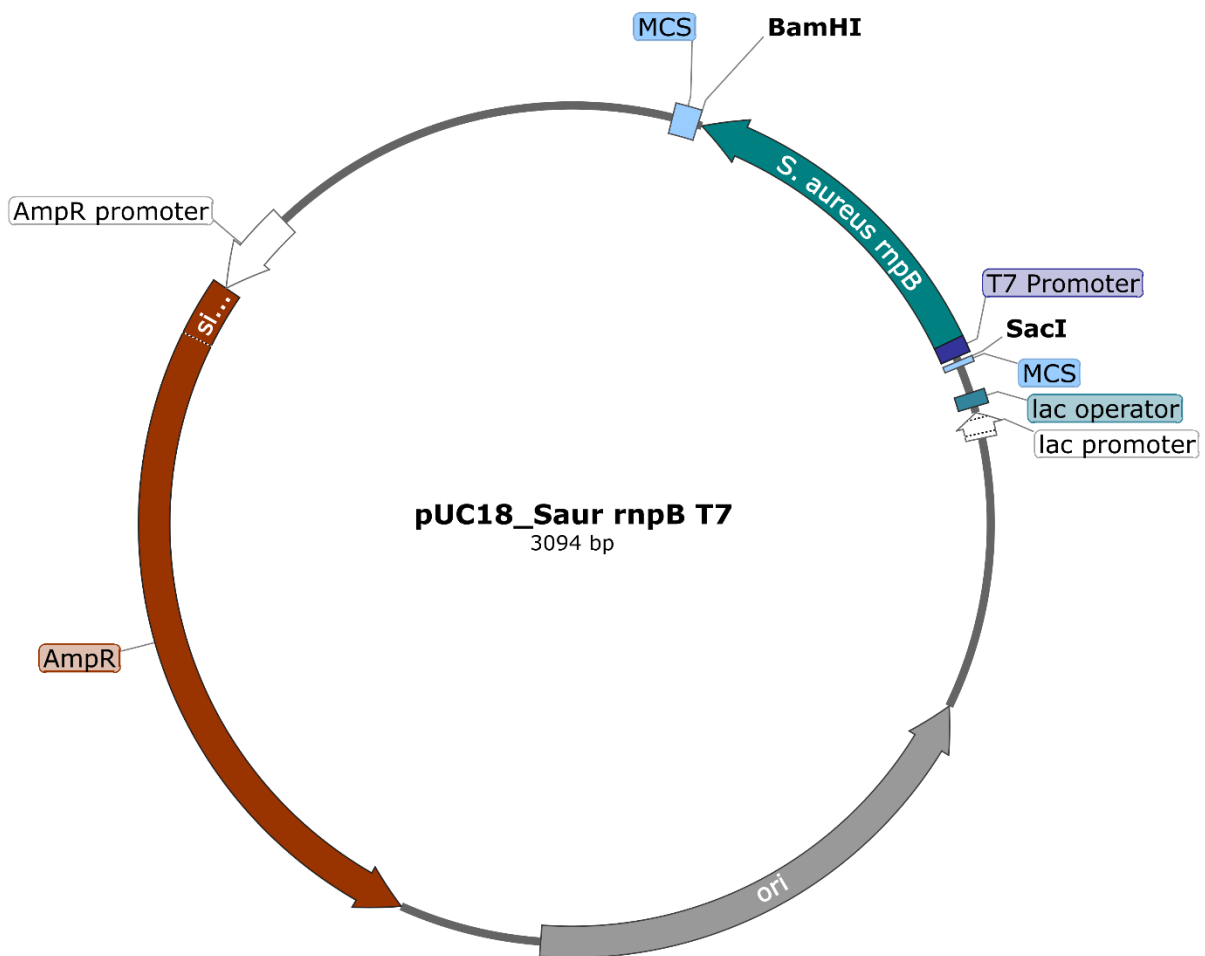
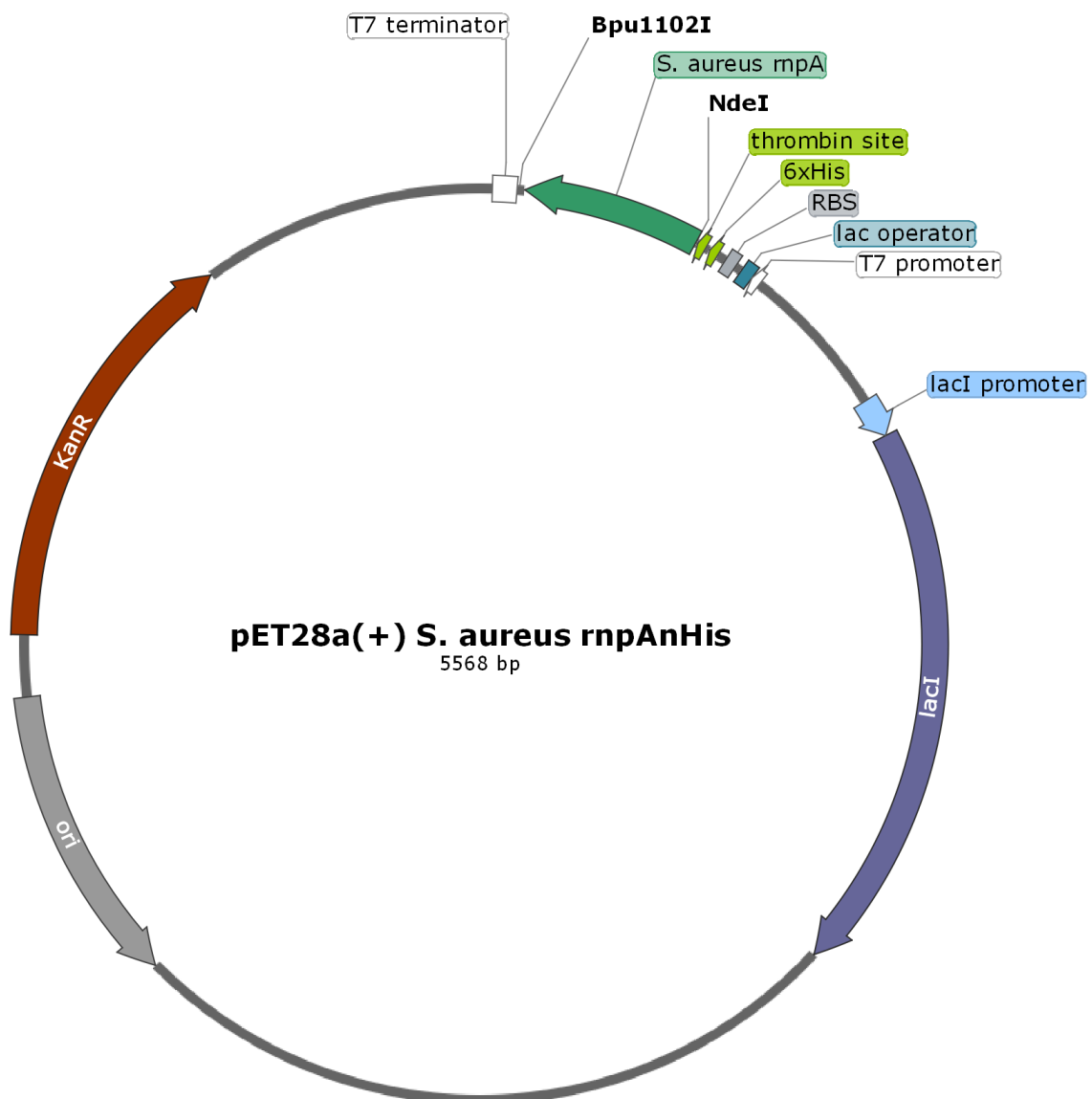


Abb. 14: Plasmidkarte pUC18 *S. aureus rnpB*

Plasmidkarte des pUC18 Vektors mit klonierter Sequenz für die *S. aureus* P RNA. Dargestellt sind das Ampicillinresistenzgen (rot), der Replikationsursprung (ori; grau), der Laktose- (*lac*) Promoter (weiß) und Operator (blau), die *multiple cloning site* (MCS; hellblau) und die klonierte Sequenz des *S. aureus rnpB* Gens (türkis) inklusive T7 Promoter (dunkelblau). Die Schnittstellen für das *Bam*HI und *Sac*I Restriktionsenzym sind ebenfalls aufgeführt, da diese für die Klonierung verwendet wurden. Außerdem wurde mit *Bam*HI das Plasmid als Templat für die *in vitro*-Transkription (3.2.4.1) linearisiert.

**pET28a(+)** *S. aureus* *rnpAnHis*

Auch für dieses Konstrukt erfolgte die Klonierung mit Restriktionsenzymen. Das *S. aureus* *rnpA*-Gen wurde vom Plasmid pDG\_ *S. aureus* *rnpA* (Gößringer & Hartmann, 2007) mit den Primern 11 und 12 amplifiziert (Tab. 7, Seite 37). Anschließend erfolgte eine Zwischenklonierung in den pJET 1.2 Vektor mittels *CloneJET PCR Cloning Kit*. Dieses Plasmid diente dann als Templat für eine weitere PCR mit dem Primerpaar 15 / 16. Es wurde sowohl das PCR-Produkt als auch der Vektor pET28a(+) mit den Enzymen *NdeI* und *Bpu1102I* geschnitten und im Anschluss das geschnittene PCR-Produkt in den Vektor ligiert.

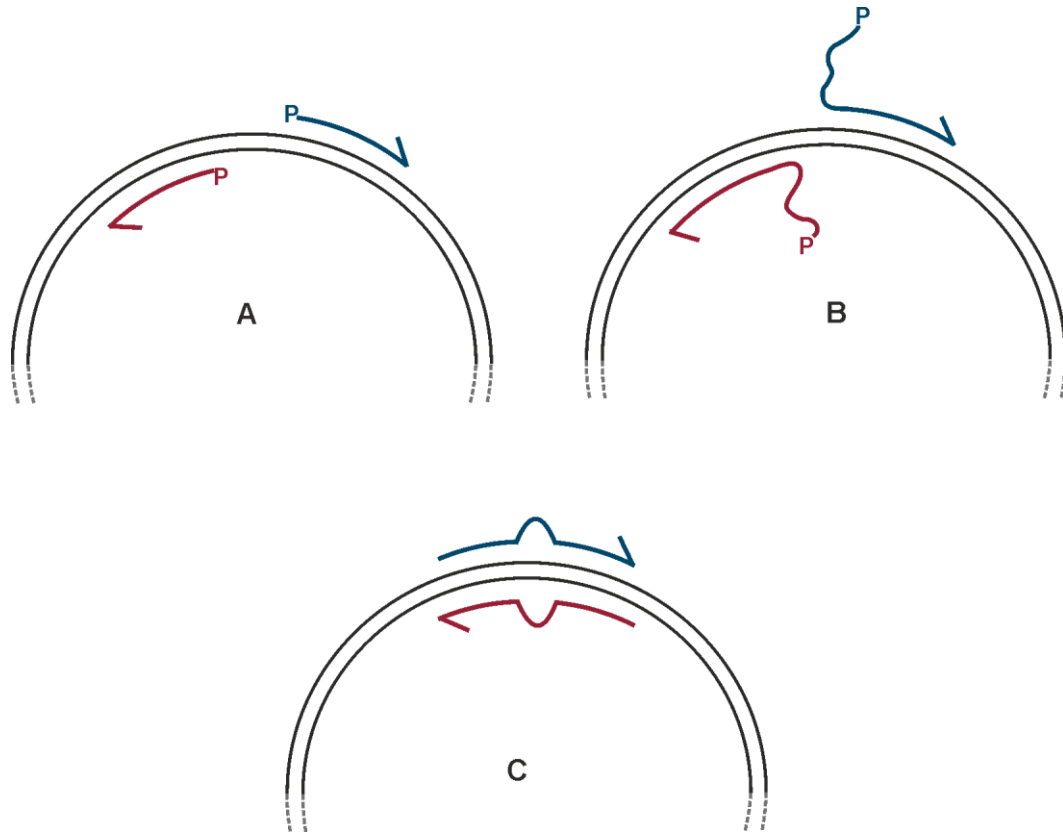


**Abb. 15: Plasmidkarte pET28a(+)** *S. aureus* *mpAnHis*

Plasmidkarte des pET28a(+) Vektors mit klonierter Sequenz für das *S. aureus* RnpA. Gezeigt sind das Kanamycinresistenzgen (rot), der Replikationsursprung (ori; grau), die Ribosomenbindestelle (RBS; grau), das für den *lac*-Repressor kodierende Gen *lacI* (dunkelblau) inklusive Promoter (hellblau) und Operator (blau), der T7 Promoter und Terminator (weiß), der *N*-terminale His-Tag inklusive Thrombin Schnittstelle (grün) und die klonierte Sequenz des *S. aureus* *mpA*-Gens (dunkelgrün). Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bpu1102I* und *NdeI*, welche für die Klonierung verwendet wurden, sind ebenfalls aufgeführt.

### prä-tRNA-Substrate

Prä-tRNA<sup>Gly</sup>-Substratvarianten wurden über die ortsgerichtete *in vitro*-Mutagenese erstellt, um Nukleotidsequenzen mit spezifischen Primern zu deletieren, zu insertieren oder zu mutieren. Im Wesentlichen fanden die Strategien A-C Verwendung. Diese werden anhand von Beispielen im Weiteren erläutert.

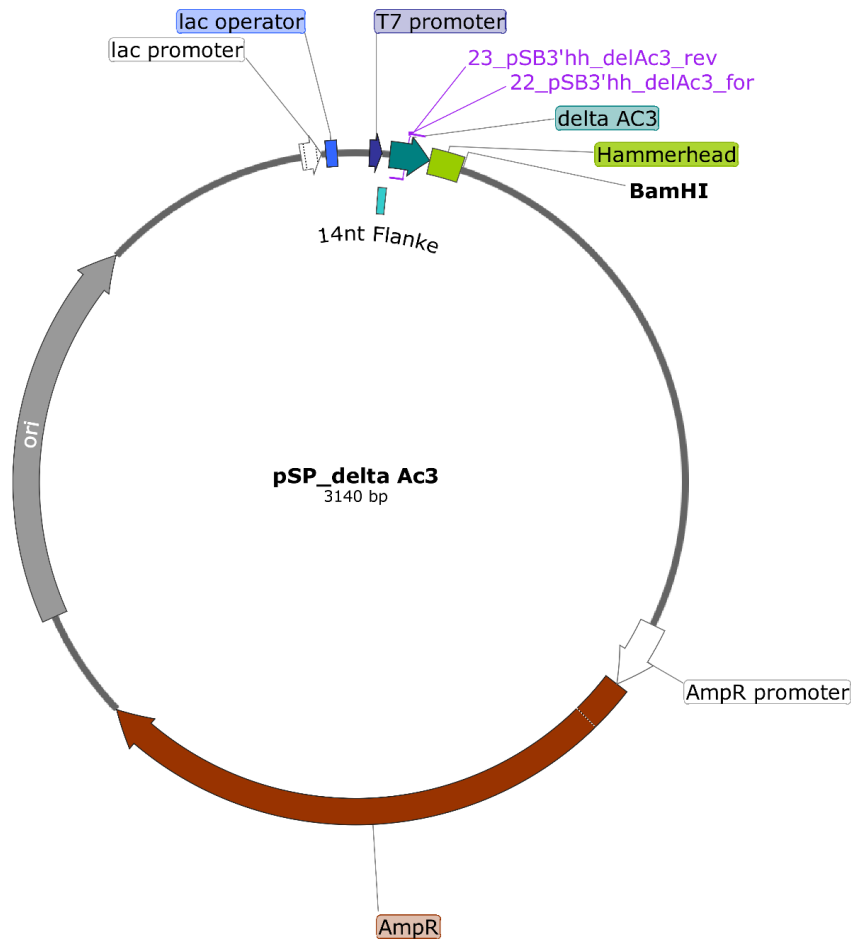


**Abb. 16: Strategien der ortsgerichteten *in vitro*-Mutagenese**

Die Primer sind rot bzw. blau dargestellt. Das P steht für eine entsprechende Phosphorylierung. **(A)** Deletionsmutagenese durch *back-to-back* Primer. **(B)** Insertionsmutagenese durch *back-to-back* Primer. **(C)** Mutagenese mit zueinander komplementären Primern zur Deletion, Insertion oder zum Austausch einiger Nukleotide. Hierbei ist im Gegensatz zu Strategie A und B keine Phosphorylierung und anschließende Ligation nötig.

pSP  $\Delta$ Ac3

Das Konstrukt für das  $\Delta$ Ac3-Substrat wurde ausgehend von dem pSBpt3-hh Plasmid erstellt. Hierbei wurde über die Strategie A (Abb. 16) die Sequenz für den Anticodonarm unter Verwendung von Primer 22 und 23 (Tab. 7, Seite 37) deletiert. Durch die Wahl dieser Primer entsteht eine Lücke zwischen diesen Beiden, welche während der PCR nicht amplifiziert wird und somit im Plasmid nicht mehr vorzufinden ist.

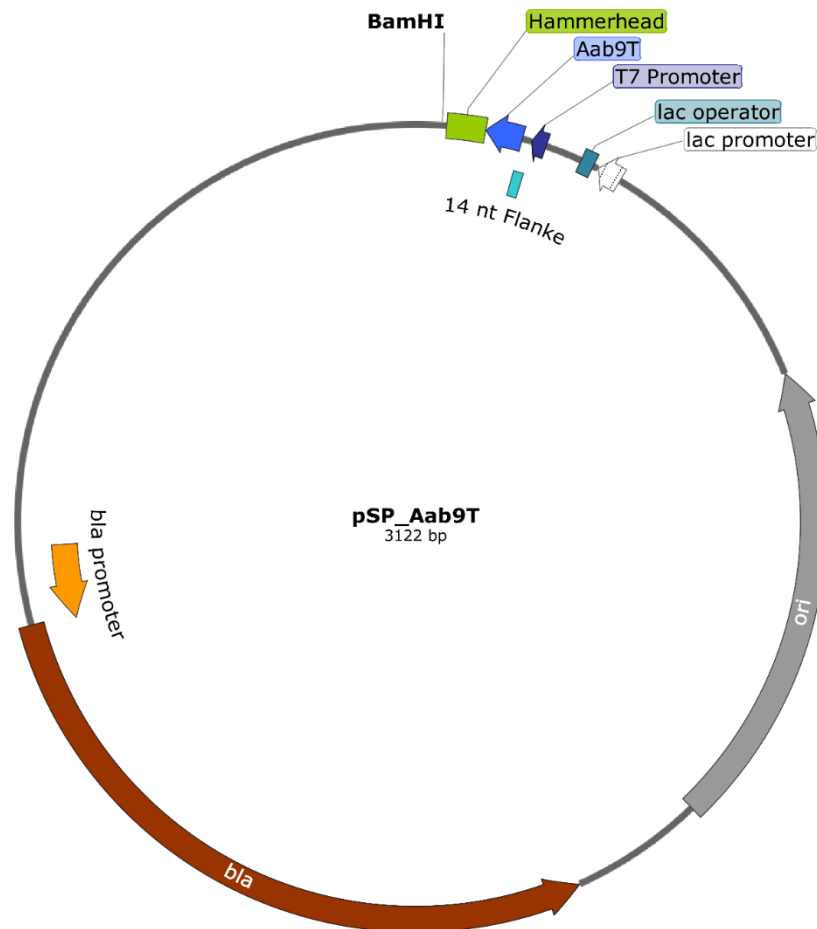


**Abb. 17: Plasmidkarte pSP\_delta Ac3**

Plasmidkarte des pSP\_delta Ac3 Vektors, welcher ausgehend vom pSBpt3-hh Plasmid erstellt wurde. Dargestellt sind das Ampicillinresistenzgen (rot), der Replikationsursprung (ori; grau), der Laktose- (*lac*) Promoter (weiß) und Operator (blau), der T7 Promoter (dunkelblau), die Sequenz des  $\Delta$ Ac3 Substrats (grün), die 14-nt Flanke (türkis) und der *hammerhead* (hellgrün). Außerdem sind die für die Klonierung verwendeten Primer (lila) aufgeführt. Die Schnittstelle für das *Bam*HI Restriktionsenzym ist ebenfalls gezeigt, da dieses zur Linearisierung im Zuge der *in vitro*-Transkription (3.2.4.1) verwendet wurde

pSP Aa<sub>b9</sub>T – Varianten

Für alle weiteren Substratvarianten diente das in Abb. 18 dargestellte Plasmid als Ausgangspunkt für die *in vitro*-Mutagenesen. In dem Aa<sub>b9</sub>T-Substrat sind T-Arm und Akzeptorstamm über 9 Nukleotide miteinander verknüpft. Der D-Arm und Anticodonarm sind in diesem Substrat nicht vorzufinden.



**Abb. 18: Plasmidkarte pSP\_Aab9T**

Plasmidkarte des pSP\_Aab9T Vektors (Brillante *et al.*, 2016). Dargestellt sind das Ampicillinresistenzgen (*bla*; rot), der Replikationsursprung (*ori*; grau), der Laktose- (*lac*) Promoter (weiß) und Operator (blau), der T7 Promoter (dunkelblau), die Sequenz des Aa<sub>b9</sub>T Substrats (hellblau), die 14-nt Flanke (türkis) und der *hammerhead* (hellgrün). Außerdem ist die Schnittstelle des *Bam*HI-Enzyms eingezeichnet, das für die Linearisierung im Zusammenhang mit der *in vitro*-Transkription (3.2.4.1) verwendet wurde. Dieses Plasmid diente als Templat für weitere Substratvarianten.

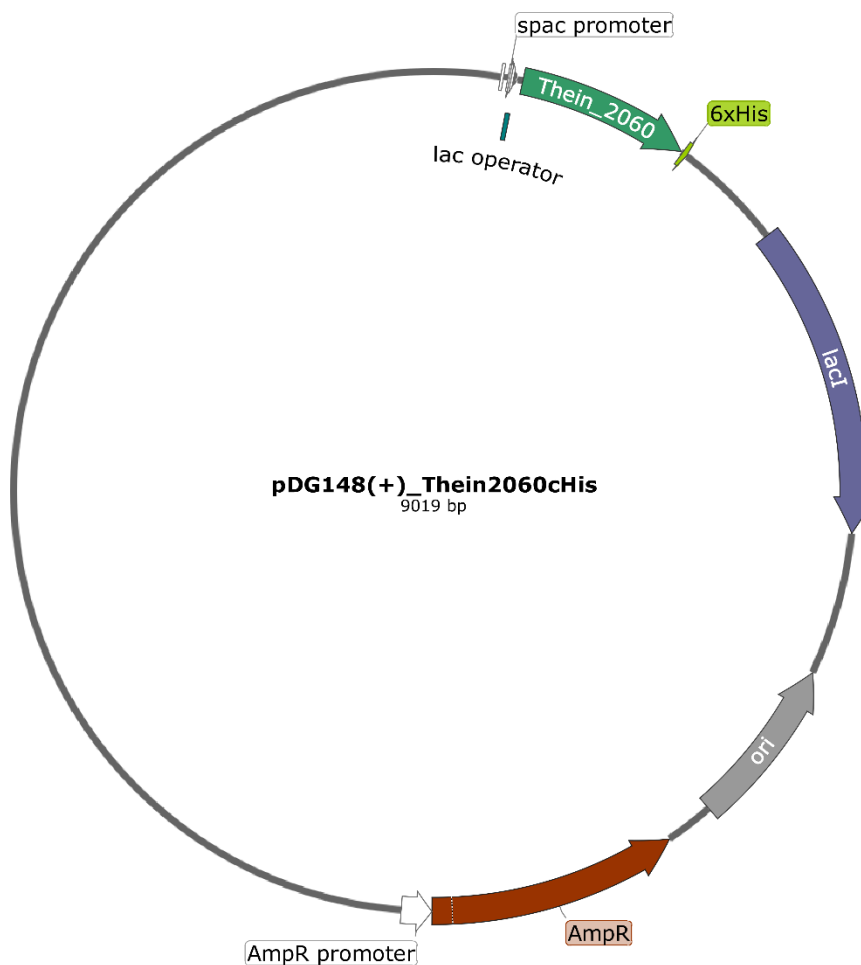
Es wurden Varianten erstellt, um den T-Stamm in seiner Länge zu verkürzen (pSP\_Aa<sub>b9</sub>T-1bp) oder zu verlängern (pSP\_Aa<sub>b9</sub>T+1bp bzw. pSP\_Aa<sub>b9</sub>T+2bp). Zur Erstellung dieser Plasmide wurden die Strategien A und B (Abb. 16) verwendet. Eine Insertion (Strategie B) wurde über Überhang-Primer erreicht. Teilweise wurden hierüber aber auch zusätzlich Nukleotidsequenzen verändert. Für das Konstrukt pSP\_Aa<sub>b9</sub>T+1bp wurden Primer 35 und 36, für pSP\_Aa<sub>b9</sub>T+2bp Primer 37 und 38 und für das Konstrukt pSP\_Aa<sub>b9</sub>T-1bp Primer 39 und 40 verwendet (Tab. 7, Seite 37). Als eine weitere Modifikation wurde die T-Schleife durch einen *Tetra*loop ersetzt (pSP\_Aa<sub>b9</sub>T4loop). Hierfür wurde die Strategie C (Abb. 16) genutzt, bei der



zueinander komplementäre Primer verwendet wurden, um einige Nukleotide zu deletieren bzw. zu substituieren. Im Rahmen dieser Klonierung wurden Primer 41 und 42 eingesetzt. Alle Sequenzen bzw. Plasmidkarten dieser Substratvarianten sind dem Anhang (5.3.3, Seite 291) zu entnehmen.

### Thein2060cHis Mutanten

Für die Klonierung der Proteinmutanten wurde vom Wildtyp *T. indicus* HARP (Abb. 19) ausgegangen. Es sollten dabei einzelne Aspartat-Aminosäuren zu Alaninen mutiert werden. Die *in vitro*-Mutagenese erfolgte dafür mit zwei zueinander komplementären Primern (Strategie C, Abb. 16).



**Abb. 19: Plasmidkarte pDG148(+)\_Thein2060cHis**

Plasmidkarte des pDG148(+) Vektors mit Sequenz für das *T. indicus* HARP (Wäber, 2019). Gezeigt sind das Ampicillinresistenzgen (rot), der Replikationsursprung (ori; grau), das für den *lac*-Repressor kodierende Gen *lacI* (dunkelblau) inklusive Operator (blau), der Spac Promoter (weiß), der C-terminale His-Tag (grün) und die Sequenz des *T. indicus* HARPs (dunkelgrün).

Für die D15A-Mutante wurden die Primer 46 und 47 und für die D146A-Variante die Primer 48 und 49 verwendet (Tab. 7, Seite 37). Für die Alanin-Mutation an Position D150 wurden die Primer 50 und 51 eingesetzt und für jene an Position D168 das Primerpaar 52 / 53. Die Plasmidkarten sowie die Sequenzen der Proteinmutanten sind dem Anhang (5.3.2, Seite 275) zu entnehmen.

### 3.2.4 RNA-Methoden

#### 3.2.4.1 *In vitro*-Transkription

Für die *in vitro* RNA-Synthese wurde die T7-RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7 verwendet. Die T7-RNA-Polymerase erkennt eine hochspezifische Promotor Sequenz (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TA-3') und beginnt danach direkt mit der Polymerisation. Für die Synthese einer RNA bestimmter Länge wurde eine sogenannte *run-off*-Transkription durchgeführt. Hierfür wurden zuvor linearisierte Vektoren oder PCR-Produkte als Templat verwendet. Vor dem Ansetzen einer präparativen Transkription (1 mL) wurde die Effizienz der Reaktion in einem 50 µL-Ansatz überprüft und, wenn nötig, optimiert. Eine 1 mL-Reaktion wurde beispielhaft wie folgt angesetzt:

<i>in vitro</i> -Transkription	
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 µL
2 M MgCl <sub>2</sub>	5,1 µL
1 M HEPES; pH 7,5	80 µL
0,1 M Spermidin	10 µL
0,1 M DTT	100 µL
Pyrophosphatase 200 U/mL	10 µL
Templat DNA	40-60 µg
NTP Mix, je 25 mM	160 µL
DMSO	50 µL
T7-RNA-Polymerase	50 µL

Die Reaktion erfolgte über 4 Stunden bei 37 °C. Nach 2 Stunden Inkubation wurde erneut Enzym dazugegeben. Im Anschluss an die *in vitro*-Transkription wurde diese in mehreren Schritten aufgereinigt. Bevor mit der Aufreinigung begonnen wurde, wurde über ein denaturierendes PAA-Gel (3.2.2.2) überprüft, ob die Reaktion erfolgreich verlief. Um die Polymerase und die Templat-DNA zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion (3.2.2.4) mit anschließender Ethanol-Fällung (3.2.2.5) durchgeführt. Im Weiteren wurde der Ansatz über ein denaturierendes PAA-Gel (3.2.2.2) präparativ aufgereinigt, um das DNA-Templat quantitativ und eventuell entstandene Nebenprodukte zu beseitigen. Hierfür wurde im Regelfall ein 8%iges Gel verwendet. Unter UV-Licht (bei 254 nm) wurde die gewünschte Bande detektiert, anhand einer entsprechenden Kontrolle identifiziert und aus dem Gel ausgeschnitten. Die anschließende Gelelution erfolgte unter Schütteln (900 rpm) in 1 M Natriumacetat (pH 5,0) über Nacht bei 4 °C in einem solch großen Volumen, dass alle Gelstücke gerade mit Flüssigkeit bedeckt waren. Am nächsten Morgen wurde die Gelelution mittels Zentrifugalfilter filtriert, um Gelstücke vollständig zu entfernen. Zum Ankonzentrieren wurde eine erneute Ethanol-Fällung durchgeführt (3.2.2.5). Schließlich wurde das RNA-Pellet in einem angemessenen Volumen ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und die Konzentration bestimmt (3.2.2.3).

Die genauen Bedingungen für die Reaktionen nach Optimierung sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen:

**Tab. 10: Reaktionsbedingungen bei der *in vitro*-Transkription**

<i>in vitro</i> transkribierte RNA	Plasmid Templat	Lineari-sierung	PCR Primer	Bedingungen
<i>T. thermophilus</i> prä-tRNA <sup>Gly</sup>	pSBpt3-hh (Busch <i>et al.</i> , 2000)	<i>Bam</i> HI	-	20 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM Spermidin; 80 mM HEPES pH 7,5; 5 mM DTT; 3,75 mM NTPs; 5 ng/μL Pyrophosphatase; 5 % DMSO
<i>T. maritima</i> P RNA	pUC19- Tma rnpB (Reiter <i>et al.</i> , 2010)	<i>Btg</i> I	-	10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM Spermidin; 80 mM HEPES pH 7,5; 10 mM DTT; 4 mM NTPs; 10 ng/μL Pyrophosphatase; 5 % DMSO
<i>S. aureus</i> P RNA	pUC18- Sau rnpB-T7	-	43 / 21	20 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM Spermidin; 80 mM HEPES pH 7,5; 15 mM DTT; 4 mM NTPs; 10 ng/μL Pyrophosphatase; 5 % DMSO
<i>B. subtilis</i> P RNA	pDW 66 (Smith <i>et al.</i> , 1992)	<i>Dra</i> I	-	33 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 mM Spermidin; 80 mM HEPES pH 7,5; 5 mM DTT; 3,75 mM NTPs; 5 ng/μL Pyrophosphatase

Für sämtliche prä-tRNA-Substratvarianten wurde die *in vitro*-Transkription analog zur *T. thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> durchgeführt. Allerdings variierte das Templat dabei jeweils. So diente für einige Substrate ein PCR-Produkt ausgehend vom pSBpt3-hh als Templat, für andere hingegen wurde von zuvor klonierten Plasmiden ausgegangen. Nachfolgend ist zusammenfassend dargestellt, was für jede Substratvariante im Einzelnen als Templat Verwendung fand.

**Tab. 11: *in vitro*-Transkriptionen ausgehend von linearisierten Plasmiden**

<i>in vitro</i> transkribierte RNA	Templat	Linearisierung
prä-tRNA <sup>Gly</sup> L14	pSBpt3-hh (Busch <i>et al.</i> , 2000)	<i>Bam</i> HI
prä-tRNA <sup>Gly</sup> L7	pSP_pTtGly-L7 (Brillante <i>et al.</i> , 2016)	<i>Bam</i> HI
prä-tRNA <sup>Gly</sup> L4	pSP_pTtGly-L4 (Brillante <i>et al.</i> , 2016)	<i>Bam</i> HI
prä-tRNA <sup>Gly</sup> L2	pSP_pTtGly-L2 (Brillante <i>et al.</i> , 2016)	<i>Bam</i> HI
prä-tRNA <sup>Gly</sup> L1	pSP_pTtGly-L1 (Brillante <i>et al.</i> , 2016)	<i>Bam</i> HI
prä-tRNA <sup>Gly</sup> Aa <sub>+2bp</sub>	pSP_Aa <sub>+2bp</sub> (Brillante <i>et al.</i> , 2016)	<i>Bam</i> HI
prä-tRNA <sup>Gly</sup> Aa <sub>-2bp</sub>	pSP_Aa <sub>-2bp</sub> (Brillante <i>et al.</i> , 2016)	<i>Bam</i> HI
ΔAc3	pSP_deltaAc3	<i>Bam</i> HI
Aa <sub>b9</sub> T	pSP_Aa <sub>b9</sub> T (Brillante <i>et al.</i> , 2016)	<i>Bam</i> HI
AaT	pSP_AaT (Brillante <i>et al.</i> , 2016)	<i>Bam</i> HI
Aa <sub>b9</sub> T+1bp	pSP_Aa <sub>b9</sub> T+1bp	<i>Bam</i> HI
Aa <sub>b9</sub> T-1bp	pSP_Aa <sub>b9</sub> T-1bp	<i>Bam</i> HI
Aa <sub>b9</sub> T+2bp	pSP_Aa <sub>b9</sub> T +2bp	<i>Bam</i> HI
Aa <sub>b9</sub> T4loop	pSP_Aa <sub>b9</sub> T4loop	<i>Bam</i> HI

Tab. 12: *in vitro*-Transkriptionen ausgehend von PCR-Produkten

<i>in vitro</i> transkribierte RNA	Templat	Primer
prä-tRNA <sup>Gly</sup> CCA	pSBpt3-hh	T7-Dig / TtGly_2r
prä-tRNA <sup>Gly</sup> ΔCCA	pSBpt3-hh	T7-Dig / TtGly_1r
prä-tRNA <sup>Gly</sup> 40 nt ΔD	pSBpt3-hh CDR4	T7-Dig / TtGly_3r DR4for / DR4rev
Aa <sub>b9</sub> T <sub>mut</sub>	kein Templat notwendig, da Primer zum Teil komplementär	44 / 45

### 3.2.4.2 Dephosphorylierung

Um RNAs mit einer 5'-Hydroxylgruppe zu generieren, wurde eine Dephosphorylierung durchgeführt. Dieser Schritt war notwendig, um im nachfolgenden Schritt eine 5'-Markierung mit [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP zu vollziehen. Für die Dephosphorylierung wurde die Alkalische Phosphatase (Fast-AP) verwendet und folgender Reaktionsansatz vorbereitet:

Dephosphorylierung	
RNA-Substrat (z.B. prä-tRNA <sup>Gly</sup> )	300 pmol
10× Fast AP-Puffer	1 $\mu$ L
Fast AP	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu$ L

Die Reaktion fand für 45 Minuten bei 37 °C statt. Im Anschluss wurde das Enzym für 10 Minuten bei 75 °C durch Hitze inaktiviert.

### 3.2.4.3 Radioaktive 5'-End-Markierung

Für die 5'-End-Markierung von RNA wurde die T4 Polynukleotid Kinase (T4 PNK) aus dem *E. coli* Phagen T4 verwendet. Diese katalysiert die Übertragung der  $\gamma$ -Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf 5'-Hydroxylgruppen einer Nukleinsäure. Für die 5'-End-Markierung wurde folgender Ansatz verwendet:

5'-End-Markierung	
RNA-Substrat (z.B. prä-tRNA <sup>Gly</sup> )	30 pmol
10× T4 PNK-Puffer A	1 $\mu$ L
T4 PNK 10 U/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	2,5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 $\mu$ L

Die Reaktion wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens (10  $\mu$ L) 2× RNA-Probenpuffer erfolgte eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.2.2), um vor allem überschüssige radioaktive Nukleotide abzutrennen. Es wurde zumeist ein 8%iges PAA-Gel verwendet. Das gewünschte Produkt wurde mittels Autoradiographie (3.2.6.4) detektiert. Die Expositionszeit der *Imager*-Platten betrug hierbei lediglich 1 Minute. Die Produktbande konnte mit Hilfe des *Posphorimaging*s zugeordnet und sodann ausgeschnitten werden. Die nachfolgende Gelelution erfolgte über Nacht bei 8 °C unter Schütteln (900 rpm) in 500  $\mu$ L 1 M Natriumacetat pH 5,0. Zum Entfernen der Gelstücke wurde der Ansatz filtriert und im Anschluss einer Ethanol-Fällung durch Zugabe von 1250  $\mu$ L

Ethanol p.a. unterzogen (3.2.2.5). Zur Erhöhung der Sichtbarkeit des RNA-Pellets wurden zusätzlich 2 µL *Glycoblu*e als Co-Fällungsmittel dazugegeben. Nach Resuspension des RNA-Pellets in zumeist 10 µL ddH<sub>2</sub>O erfolgte die Quantifizierung der radioaktiven Markierung mittels Szintillationszähler.

### 3.2.5 Proteinbiochemische Methoden

#### 3.2.5.1 SDS-PAGE

Um Proteine der Größe nach aufzutrennen, wurde die SDS-PAGE (*Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamide gel electrophoresis*) verwendet. Standardmäßig wurden 15 %-Gele genutzt und diese setzten sich wie folgt zusammen:

Trenngel		Sammelgel	
4× Trenngelpuffer	4 mL	4× Sammelgelpuffer	1,8 mL
30 % PAA	8 mL	30 % PAA	1 mL
ddH <sub>2</sub> O	4 mL	ddH <sub>2</sub> O	4,7 mL
TEMED	20 µL	TEMED	20 µL
APS 10 % (w/v)	80 µL	APS 10 % (w/v)	80 µL

4× Trenngelpuffer		4× Sammelgelpuffer	
Tris-HCl pH 8,8	1,5 M	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
SDS (v/v)	0,6 % (w/v)	SDS (v/v)	0,6 % (w/v)

Die Gele wurden zwischen zwei Glasplatten gegossen und zunächst wurde der Raum zwischen den Glasplatten zu <sup>3</sup>/<sub>4</sub> mit Trenngel gefüllt und direkt mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und es wurde mit Sammelgel aufgefüllt. Für die Elektrophorese wurden die Proben mit 4× Lämmli Puffer versetzt und bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert.

4× Lämmli Puffer	
Tris-HCl pH 6,8	100 mM
SDS	8 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	8 % (v/v)
Bromphenolblau	0,04 % (w/v)
Glycerin	30 % (v/v)

Nach Auftragen der Proben inklusive Größenmarker (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*) wurde die Gelelektrophorese für ca. 1 Stunde bei 180 V durchgeführt. Zum Färben der Proteinbanden in dem SDS-Gel, wurde dieses für 20 Minuten in *Coomassie Blue*-Lösung inkubiert.

Coomassie Blue-Lösung	
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,2 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	50 % (v/v)

Das Entfärben erfolgte entweder über Nacht in H<sub>2</sub>O unter leichtem Schwenken oder durch schrittweises Erhitzen des Gels in H<sub>2</sub>O in der Mikrowelle.

### 3.2.5.2 Silberfärbung

Eine weitere Methode zur Detektion von Proteinbanden stellt die Silberfärbung dar. Diese ist im Gegensatz zur Coomassie-Färbung weitaus sensitiver, allerdings muss berücksichtigt werden, dass neben Proteinen auch Nukleinsäuren und beispielsweise Polysaccharide miterfasst werden. Grundprinzip der Silberfärbung ist die Anlagerung von Silberionen aus einer Silbernitratlösung an die negativ geladenen Seitenketten der Proteine. Nach Zugabe eines Reduktionsmittels (beispielsweise Formaldehyd) werden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert und die Proteinbanden werden somit schwarz-braun gefärbt. Für die Silberfärbung wurde das *Pierce Silver Stain Kit* nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.2.5.3 Western Blot

Beim Western Blot werden die Proteine von einem SDS-Gel auf eine Trägermembran übertragen. Anschließend kann die Detektion der Proteine auf der Membran spezifisch über Antikörper erfolgen.

SDS-Gel (3.2.5.1) sowie zwei Whatman-Papiere und eine PVDF-(Polyvinylidenfluorid) Membran, die auf die Größe des Gels zugeschnitten wurden, wurden kurz in Transferpuffer inkubiert. Auf der Blotting-Apparatur, bei der sich die Anode unten und die Kathode oben befindet, wurde zunächst ein Whatman-Papier platziert. Es folgte die PVDF-Membran, dann das SDS-Gel und abschließend wiederum ein Whatman-Papier. Die Proteine wurden für 7 Minuten bei 25 V auf die Membran geblottet.

Transferpuffer		TBST-Puffer	
Tris-HCl	25 mM	Tris-HCl	10 mM
Glycin	192 mM	NaCl	150 mM
Methanol	10 %	Tween	0,1 %
pH-Wert	8,3	pH-Wert	7,6

Die Membran wurde zunächst in einer 1%igen Casein-Blockierlösung für ~1,5 Stunden inkubiert, um freie Bindungsstellen zu blockieren. Es folgte die Inkubation mit dem Erstantikörper verdünnt in 1%iger Casein-Blockierlösung über Nacht bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit TBST-Puffer für je 10 Minuten wurde der Zweitantikörper - erneut in 1%iger Casein-Blockierlösung verdünnt - für etwa 2 Stunden bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Für die Detektion von Proteinen mit His<sub>6</sub>-Tag wurde der Erstantikörper  $\alpha$  His<sub>6</sub>-Tag (6× His Tag Polyclonal Antibody, Thermo Fisher Scientific) 1:10.000 verdünnt und der Zweitantikörper  $\alpha$  Rabbit (Anti-rabbit IgG, HRP-linked, Sigma Aldrich) 1:5.000. Die Detektion wurde mittels ChemiDoc vorgenommen. Dafür wurde nun eine 1:1 Mischung der *Clarity Western ECL Peroxid-* und *Luminol-Lösung* auf die Membran gegeben und für 4 Minuten inkubiert. Durch den HRP-gekoppelten Sekundärantikörper erfolgte die Detektion mittels Chemilumineszenz über 5 Minuten in der ChemiDoc-Apparatur.

### 3.2.5.4 Rekombinantes *T. indicus* HARP

#### Proteinexpression

Für die Proteinexpression wurde der Stamm *E. coli* Rosetta (DE3) verwendet. Dieser wird vor allem zur Überexpression von Proteinen, die in *E. coli* selten verwendete Codons beinhalten, genutzt. Zu diesem Zweck sind tRNAs für entsprechende Codons auf einem zusätzlichen Plasmid kodiert.

Die Expression erfolgte über Nacht bei 37 °C und ~200 rpm in einem Volumen von 500 mL in einem 1 L-Kolben mit Schikanen. Die Kultur wurde hierzu entweder mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder direkt aus der Glycerinkultur angeimpft. Zur Induktion wurde ein selbst-induzierendes Medium verwendet (LB-Medium; 0,05 % Glukose und 0,2 % Laktose). Die Zellernte erfolgte bei 4 °C und 3200 × *g* für 30 Minuten. Sodann wurden die Zellen stets auf Eis gelagert und direkt dem Zellaufschluss und anschließender Reinigung unterzogen.

#### Proteinreinigung

Das rekombinant exprimierte Protein, welches auf dem *high-copy* Vektor pET28a(+) kodiert ist, verfügt über einen His<sub>6</sub>-Tag entweder am N-Terminus oder C-Terminus. Für beide Varianten wurde die Reinigung mittels Affinitätschromatographie identisch durchgeführt. Zunächst wurde das Zellpellet für den Zellaufschluss in ~20 mL NPI-20 Puffer resuspendiert und die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (3 Zyklen, Intensität von 50-60 %, Output 5). Zwischen den Zyklen wurden die Zellen auf Eis gelagert.

NPI-20		NPI-500	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM
NaCl	300 mM	NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM	Imidazol	500 mM
pH-Wert	8,0	pH-Wert	8,0

Anschließend wurde für 30 Minuten bei 4 °C und 8200 × *g* zentrifugiert, um Zellmaterial von den in Lösung befindlichen Proteinen abzutrennen. Für die Proteinreinigung mithilfe von FPLC fanden kommerziell erhältliche Nickel-Sepharose-Säulen (HisTrap™ HP 1 mL) Verwendung. Nach Äquilibrieren der Säule mit NPI-20 Puffer bei einem Fluss von 1 mL/min über 5 Minuten, wurde die Säule mittels Perfusor bei einem Fluss von 60 mL/h beladen. Hierbei wurde durch einen der Säule vorgeschalteten Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm) sichergestellt, dass keine Partikel auf die Säule gelangten, was ein Verstopfen der Säule zur Folge hätte. Während des Beladens der Proteinprobe sollte ausschließlich das Protein mit His<sub>6</sub>-Tag an die Nickelionen der Säulenmatrix binden. Um andere Proteine, die auch kurzweilig an die Säulen binden können, zu entfernen, wurde die beladene Säule mit NPI-20 Puffer bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie gewaschen. Im Optimalfall sollte so nur noch das Protein mit His<sub>6</sub>-Tag an der Säule gebunden vorliegen. Die Flussrate von 1 mL/min wurde dabei beibehalten und die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten bis 500 mM Imidazol über 30 Säulenvolumen. Hierbei wurden insgesamt 10 Fraktionen mit je 3 mL Volumen erhalten. Durch die steigende



Konzentration an Imidazol wurde das Protein mit His<sub>6</sub>-Tag aus der Bindung an die Säule verdrängt. Das *T. indicus* HARP eluierte in der Regel bei einer Imidazolkonzentration von 350-450 mM. Die verschiedenen Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE und darauffolgender Coomassie-Färbung (3.2.5.1) analysiert und auf das Vorhandensein von Protein überprüft. Zur Lagerung des Proteins erfolgte eine Dialyse gegen den *storage buffer*.

<i>storage buffer</i>	
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
KCl	100 mM
EDTA	0,1 mM
DTT	3 mM
Glycerin	50 % (v/v)

Hierzu wurde ein Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 12-14 kDa für das 23,9 bzw. 24,8 kDa-große Protein verwendet. Dieser wurde zunächst in der Mikrowelle aufgeköcht und nach dem Abkühlen mit der Proteinlösung befüllt. Die Dialyse erfolgte mit einem Überschuss des Puffers von mindestens Faktor 100 im Verhältnis zum Volumen der Proteinlösung unter leichtem Rühren zunächst für 1 Stunde und nach Pufferwechsel über Nacht bei 4 °C. Das Protein wurde sodann bei -20 °C gelagert.

### Thrombinspaltung

Das *T. indicus* HARP mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag verfügt über eine Thrombin-Spaltstelle zwischen dem HARP und dem His<sub>6</sub>-Tag, sodass der Affinitäts-Tag durch die Serinprotease Thrombin abgespalten werden kann. Dafür wurde das Protein mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in den Thrombinpuffer dialysiert. Anschließend wurden 1,3 U Thrombin pro mg Protein zur Proteinlösung gegeben. Die Thrombinspaltung erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Thrombinpuffer		MonoQ-Elutionspuffer	
Tris-HCl pH 8,0	10 mM	Tris-HCl pH 8,0	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM	KCl	1 M
KCl	100 mM	EDTA	0,1 mM
EDTA	0,1 mM		
Glycerin	10 % (v/v)		

Um das in der Lösung befindliche Thrombin vom *T. indicus* HARP zu separieren, wurden eine Anionenaustauschchromatographie mit MonoQ-Säule (MonoQ™ 1 mL, 5/50 GL, GE Healthcare) durchgeführt. Die Probe der Thrombinspaltung wurde zunächst bei 4 °C und 16200 × g für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgenommen, um Partikel aus der Lösung zu entfernen. Nach dem Vorbereiten (gemäß Herstellerangaben) und Äquilibrieren der Säule mit Thrombinpuffer bei einem Fluss von 1 mL/min wurde die Säule mit insgesamt etwa 4 mL Proteinlösung bei einem reduzierten Fluss von 0,7 mL/min über den internen 2 mL *superloop* beladen. Daraufhin wurde die Säule mit 10 mL Thrombinpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten gegen den MonoQ-Elutionspuffer bei einem Fluss von 0,7 mL/min über insgesamt 15 mL. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von



1 mL gesammelt und das Protein eluierte bei 400-500 mM KCl. Die verschiedenen Fraktionen wurden anschließend mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (3.2.5.1) analysiert. Zur Lagerung des Proteins wurde das Protein wie oben beschrieben gegen den *storage buffer* dialysiert und bei -20 °C gelagert.

### 3.2.5.5 Rekombinantes *B. subtilis* RnpA

#### Proteinexpression

Für die heterologe Überexpression wurden mit dem Plasmid pPWT1 transformierte *E. coli* BL21(DE3)pLysS Zellen verwendet (Niranjanakumari, Kurz, *et al.*, 1998). Es wurden vier 500 mL-Hauptkulturen mit je 5 mL einer Übernachtskultur für die Expression angeimpft. Das Wachstum bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm) wurde photometrisch verfolgt. Bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,7 wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,4 mM (Endkonzentration) IPTG induziert. Die Expression erfolgte über 4 Stunden bei 37 °C unter Schütteln (200 rpm). Die Zellen wurden bei 3200 × g und 4 °C für 20 Minuten geerntet. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Zellpellet bei -80 °C gelagert.

#### Proteinreinigung

Die Proteinreinigung erfolgte anhand einer publizierten Methode (Niranjanakumari, Kurz, *et al.*, 1998). Hierbei wurde das Zellpellet zunächst in einem Volumen von 20-25 mL Lysepuffer 1 resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen nach Zugabe von Glasperlen (10 % v/v) mit drei FastPrep-Durchläufen (je 4 m/s, 20 Sekunden) aufgeschlossen. Zwischen den Durchläufen wurden die Proben auf Eis gelagert. Nach Zentrifugation bei 8200 × g und 4 °C für 1 Stunde wurde der Überstand mit dem gleichen Volumen (~20 mL) 2× Puffer A versetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von Harnstoff (im 2× Puffer A enthalten) wurden Proteine und Nukleinsäuren denaturiert.

Lysepuffer 1		2x Puffer A	
Tris-HCl	50 mM	NaOAc	100 mM
EDTA	5 mM	EDTA	10 mM
Glycerol	10 %	NaCl	0,2 mM
pH-Wert	8,0	Harnstoff	10 M
		pH-Wert	6,5

Für die Proteinreinigung mittels FPLC wurde eine CM-Sepharose-Säule (HiTrap CM FF, 5 mL) verwendet. Da die RnpA-Proteine sehr basisch sind (isoelektrischer Punkt ~10), wurde eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Puffer A denat. äquilibriert bei einem Fluss von 5 mL/min, mit der Proteinlösung über eine Peristaltikpumpe bei einem Fluss von 2 mL/min beladen und dann bis zum Erreichen einer Basislinie gewaschen. Die Elution erfolgte bei einem linearen Gradienten bis 1 M NaCl (100 % Puffer B denat.) über 5 Säulenvolumen. Somit wurden insgesamt 12,5 Fraktionen je 2 mL gesammelt. Die Flussrate wurde nicht verändert, sondern bei 5 mL/min beibehalten.

Puffer A denat.		Puffer B denat.	
NaOAc	50 mM	NaOAc	50 mM
EDTA	5 mM	EDTA	5 mM
NaCl	0,1 M	NaCl	1 M
Harnstoff	5 M	Harnstoff	5 M
pH-Wert	6,5	pH-Wert	6,5

Das rekombinante *B. subtilis* RnpA Protein eluierte bei einer Konzentration an Na<sup>+</sup>-Ionen von 0,75-1 M. Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (3.2.5.1). Da eine weitere Säule zur Reinigung folgte, wurden alle Fraktionen, die das gewünschte Protein unabhängig von Reinheit und Konzentration enthielten, einer Dialyse unterzogen. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Rühren gegen den Dialysepuffer ohne Harnstoff und sollte somit zur Rückfaltung des Proteins führen.

Dialysepuffer	
NaOAc	50 mM
EDTA	5 mM
NaCl	0,1 M
pH-Wert	6,5

Der zweite Reinigungsschritt erfolgte erneut über einen Kationenaustauscher. Hierzu wurde die gleiche Säule (HiTrap CM FF, 5 mL) verwendet, allerdings unter nativen Bedingungen. Die gesamte Reinigung mit FPLC erfolgte bei einer Flussrate von 5 mL/min. Nach Äquilibrieren der Säule mit Dialysepuffer (5 Säulenvolumen) wurde diese mit der Proteinprobe beladen. Aufgrund des geringeren Probenvolumens wurde hierbei auf den an der FPLC befindlichen *superloop* (2 mL Volumen) zurückgegriffen. Das Waschen der Säule erfolgte mit Puffer A nativ bis zum Erreichen einer stabilen Basislinie.

Puffer A nativ		Puffer B nativ	
NaOAc	50 mM	NaOAc	50 mM
EDTA	5 mM	EDTA	5 mM
NaCl	0,25 M	NaCl	1 M
pH-Wert	6,5	pH-Wert	6,5

Die Elution erfolgte bei einem linearen Gradienten bis 1 M NaCl (100 % Puffer B nativ) über 10 Säulenvolumen. Bei einer Fraktionsgröße von 2 mL wurden insgesamt 25 Fraktionen gesammelt und diese anschließend erneut analysiert (3.2.5.1). Das Protein eluierte bei einer NaCl Konzentration von 800-950 mM. Für die Dialyse über Nacht gegen den Lagerungspuffer wurden jene Fraktionen ausgewählt, in denen das Protein in hoher Konzentration ohne sichtbare Verunreinigung vorlag.

Lagerungspuffer	
Tris-HCl	10 mM
Glycerin	50 %
pH-Wert	8,0

Das Protein wurde bis zur weiteren Verwendung stets bei -20 °C gelagert.

### 3.2.5.6 Rekombinantes *S. aureus* RnpA

#### Proteinexpression

Die Proteinexpression erfolgte in *E. coli* Rosetta (DE3) unter Verwendung von selbst-induzierendem Medium (LB-Medium; 0,05 % Glukose und 0,2 % Laktose). Die Expression von zwei 300 mL-Kulturen wurde über Nacht bei 37 °C und 220 rpm in zwei 500 mL-Kolben mit Schikanen durchgeführt. Nach erfolgter Zellernte bei 1900 × *g* und 4 °C für 1 Stunde wurde das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

#### Proteinreinigung

Das rekombinant überexprimierte Protein trug einen His<sub>6</sub>-Tag am N-terminalen Ende, welcher bereits auf dem *high-copy* Vektor pET28a(+) kodiert war. Der erste Schritt der Reinigung erfolgte in Anlehnung an eine bereits publizierte Methode für das *E. coli* RnpA (Wegscheid & Hartmann, 2006). Hierbei wurde der Zellaufschluss und die Bindung an die Matrix unter nativen Bedingungen vorgenommen, während des ersten Waschschriffs fand allerdings ein Puffer mit Harnstoff Verwendung, der zur Denaturierung des Proteins führen sollte. Die affinitätschromatographische Reinigung erfolgte nicht über ein *batch*-Verfahren (wie für das *E. coli* RnpA) sondern mit FPLC und kommerzieller Nickel-Säule (HisTrap™ HP 1 mL). Für den Zellaufschluss wurde das Zellpellet in 15 mL Lysepuffer 2 resuspendiert. Es wurden 2,5 mL Glasperlen hinzugegeben und anschließend wurden die Zellen in drei Zyklen (je 4 m/s, 20 Sekunden) mittels FastPrep aufgeschlossen. Nach Äquilibrieren der Säule mit demselben Puffer und Zentrifugation der Proteinprobe bei 8200 × *g* und 4 °C für 1 Stunde wurde der Überstand über den *superloop* intern bei einem Fluss von 1 mL/min beladen und mit Waschpuffer gewaschen.

Lysepuffer 2		Waschpuffer	
Tris-HCl	50 mM	Tris-HCl	50 mM
NaCl	300 mM	Imidazol	30 mM
Triton X-100	0,1 %	Harnstoff	8 M
NH <sub>4</sub> Cl	1 M	Triton X-100	0,1 %
pH-Wert	8,0	pH-Wert	8,0

Während der Harnstoff-vermittelten Denaturierung des Proteins kam es allerdings nicht zu einer Präzipitation wie mit dem *E. coli* RnpA (Wegscheid & Hartmann, 2006). Die Säule verstopfte also nicht und so konnte nach dem Erreichen der Basislinie mit der Elution fortgefahren werden. Die Elution erfolgte bei einem linearen Gradienten bis 300 mM Imidazol (100 % Elutionspuffer) über 20 Säulenvolumen bei einer Flussrate von

1 mL/min. Das Protein eluierte bei einer Imidazolkonzentration von 140-300 mM Imidazol. Die insgesamt 10 Fraktionen mit je 2 mL Volumen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (3.2.5.1) analysiert. Sämtliche Fraktionen mit *S. aureus* RnpA wurden vereinigt und über Nacht bei 4 °C unter leichtem Rühren gegen den Dialysepuffer dialysiert, wobei durch das Entfernen des Harnstoffs eine Rückfaltung des Proteins erfolgen sollte.

Elutionspuffer		Dialysepuffer 2	
Tris-HCl	50 mM	Tris-HCl	50 mM
Glycerin	10 %	NaCl	100 mM
Harnstoff	7 M	Glycerin	10 %
EDTA	20 mM	pH-Wert	7,0
Imidazol	0,3 M		
pH-Wert	7,0		

Als zweiter Schritt der Reinigung wurde eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Hierfür wurde eine CM-Sepharose-Säule (HiTrap CM FF, 5 mL), wie auch für die Reinigung des *B. subtilis* RnpAs (3.2.5.5), verwendet. Die Reinigung wurde unter nativen Bedingungen durchgeführt. Nach Äquilibrieren mit Dialysepuffer, Beladen über den internen *superloop* (2 mL) und Waschen der Säule mit Dialysepuffer 2, erfolgte die Elution gegen Elutionspuffer 2 bei einer Flussrate von 5 mL/min über einen linearen Gradienten.

Elutionspuffer 2	
Tris-HCl	50 mM
NaCl	1 M
Glycerin	10 %
pH-Wert	7,0

Die Elution erfolgte über 10 Säulenvolumen in je 2 mL Fraktionen. Das *S. aureus* RnpA eluierte bei 0,75-1 M NaCl. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (3.2.5.1) analysiert. Nach Dialyse gegen Dialysepuffer 2 über Nacht bei 4 °C wurde das Protein bei -20 °C gelagert.

### 3.2.5.7 Photometrische Konzentrationsbestimmung...

#### ...mittels Bradford

Für das *T. indicus* HARP wurde die Konzentration mittels *Bradford*-Test bestimmt. Zunächst wurde eine Referenzkurve mit Rinder-Serum-Albumin (*bovine serum albumin*, BSA) erstellt. Hierzu wurden 7 Lösungen mit steigender Konzentration von 0–20 ng/μL BSA vermessen. Zur Vorbereitung der Proben wurde zunächst Wasser mit der entsprechenden Menge BSA in 800 μL vorgelegt. Anschließend wurde 200 μL Bradford-Reagenz zugegeben, gut durchmischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Sodann wurde die Absorption bei 595 nm am UV5 Nano gemessen. Für die Messproben wurde identisch verfahren und in der Regel Volumina zwischen 1 und 10 μL der Proteinlösung eingesetzt, sodass die ermittelte Absorption innerhalb des Bereichs der Referenzkurve lag.

Während der Probenvorbereitung wurde die Proteinlösung für die Messung verdünnt, was wie folgt berücksichtigt wurde:

$$c(\text{final}) = c(\text{Bradford}) * \frac{1000}{x}$$

(c(final)=Konzentration der Proteinlösung, c(Bradford)=Proteinkonzentration, die am Spektralphotometer während des Bradford-Tests angegeben wird und x=eingesetztes Volumen der Proteinlösung)

### ...mittels Extinktionskoeffizienten

Für die RnpA-Proteine wurde die Konzentration anhand des molaren Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichts ermittelt. Erstgenannter wurde anhand der Primärsequenz über *ProtParam* (Gasteiger *et al.*, 2005) vorhergesagt und lässt Rückschlüsse von der Absorption auf die Konzentration der gemessenen Lösung zu.

Molare Extinktionskoeffizienten	[(M*cm) <sup>-1</sup> ]
<i>S. aureus</i> RnpAnHis	4470
<i>B. subtilis</i> RnpA	5120 (Niranjanakumari, Kurz, <i>et al.</i> , 1998)
<i>T. maritima</i> RnpA	13980

Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm am UV5 Nano in einem Volumen von 2 µL. Als Nullabgleich diente der Puffer der gemessenen Proteinlösung. Über den Quotienten A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> konnten auch Rückschlüsse auf Nukleinsäure-Verunreinigungen gezogen werden. Dieser Wert sollte unter 0,7 liegen. Werte von > 1 hingegen deuten auf eine Kontamination mit Nukleinsäuren hin, welche insbesondere für RNA-bindende Proteine kritisch zu bewerten ist.

### 3.2.5.8 Analytische Gelfiltration

Bei der analytischen Gelfiltration werden die Proteine ihrer Größe nach getrennt. Die poröse Gelmatrix hält kleinere Proteine stärker zurück als große Proteine, sodass kleine Proteine ein entsprechend großes Elutionsvolumen aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die analytische Gelfiltration dazu verwendet, den Oligomerisierungsgrad des *T. indicus* HARPs zu ermitteln. Um die Größe eines Proteins bestimmen zu können, ist zunächst das Aufnehmen einer Standardkurve mit Proteinen bekannter Größe von Nöten.

Für die Analysen wurde die Superose 6-Säule (24 mL, 10/300 GL, GE Healthcare) verwendet. Die Säule wurde nach Herstellerangaben vorbereitet und mit Thrombinpuffer (3.2.5.4, Seite 66) äquibriert. Die Proteinproben wurden zuvor gegen denselben Puffer dialysiert. Für die Standards fand das *Gel Filtration Markers Kit* (Sigma Aldrich) Verwendung. Je ~1 mg Apoferritin (443 kDa), Aldehyddehydrogenase (150 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa) wurden in insgesamt 250 µL Thrombinpuffer aufgenommen. Als zweites Proteingemisch wurden je ~1 mg β-Amylase (200 kDa), bovines Serumalbumin (66 kDa) und Cytochrom C (12,4 kDa) in 250 µL Thrombinpuffer gelöst. Alle Standardproben sowie die zu analysierenden Proteinproben wurden über einen Zentrifugalfilter (Ultrafree®-MC 0,22 µm,

Merck) bei  $15700 \times g$  für 3 Minuten filtriert, um Partikel aus der Lösung verursacht durch ausgefallenes Protein zu entfernen. Grundsätzlich wurde für jeden Lauf, egal ob Standardprotein-Gemisch oder zu analysierende Proteinprobe, wie folgt verfahren: Die Probe wurde über den  $250 \mu\text{L}$  *superloop* auf die Säule gegeben und im Anschluss erfolgte die Elution über 1 Säulenvolumen bei einem Fluss von  $0,5 \text{ mL/min}$ . Während die Elution der Standardproteine nicht fraktioniert und gesammelt wurde, erfolgte die Elution der Proteinproben in  $0,5 \text{ mL}$  Fraktionen. Diese Fraktionen wurden dann mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (3.2.5.1) auf das Vorhandensein des Proteins überprüft. Das Elutionsvolumen der Proteine wurde durch Integration der korrespondierenden Peaks bestimmt (Software Unicorn, GE Healthcare). Anhand der Standardproteine wurde eine exponentielle Standardkurve ermittelt, mit der die Proteingröße der zu analysierenden Proteine durch das ermittelte Elutionsvolumen berechnet werden konnte.

### 3.2.5.9 Co-Sedimentation

Co-Sedimentations-Experimente wurden im Zusammenhang mit den Protein-Aggregatoren durchgeführt. Hierbei galt es zu untersuchen, ob durch das Ausfallen etwaiger niedermolekularer Inhibitoren auch Proteine ausgefällt werden. Als Puffer wurde zumeist der KN-Puffer eingesetzt, der auch für die Enzymkinetik mit RNase P-Holoenzym verwendet wurde (3.2.6.1). Als Kontrollen diente zum einen eine Lösung, die lediglich den zu untersuchenden Inhibitor in der entsprechenden Konzentration enthielt. Zum anderen wurde eine Lösung vorbereitet, die lediglich das zu analysierende Protein (wie das *T. maritima* RnpA) enthielt. Es wurden je  $1 \text{ mL}$  Lösung vorbereitet und  $5 \mu\text{g}$  Protein eingesetzt. Nach Ansetzen der Lösungen wurden diese bei  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  für 30 Minuten bei  $16200 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in  $15 \mu\text{L}$  TuS-Puffer (siehe 3.2.1.8, Seite 44) und  $1 \mu\text{L}$   $1 \%$  Triton X-100 aufgenommen. Die Proben wurden anschließend auf das Vorhandensein des Proteins mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (3.2.5.1) analysiert. Das Gel wurde dazu mit je  $10 \mu\text{L}$  des Überstands sowie dem gesamten Pellet beladen.

### 3.2.6 Enzymkinetische Methoden

Zur enzymkinetischen Untersuchung der RNase P-Aktivität verschiedener Enzyme wurde die *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> (Abb. 20) verwendet, welche eine 14-nt lange 5'-Flanke besitzt. Nach radioaktiver 5'-End-Markierung der prä-tRNA konnten die Reaktionen über *Phosphorimaging* verfolgt werden. Hierzu wurde zumeist ein Reaktionsvolumen von  $20 \mu\text{L}$  verwendet und an vier verschiedenen Zeitpunkten  $4 \mu\text{L}$  Probe gezogen, um schließlich den Substratumsatz über die Zeit verfolgen zu können.

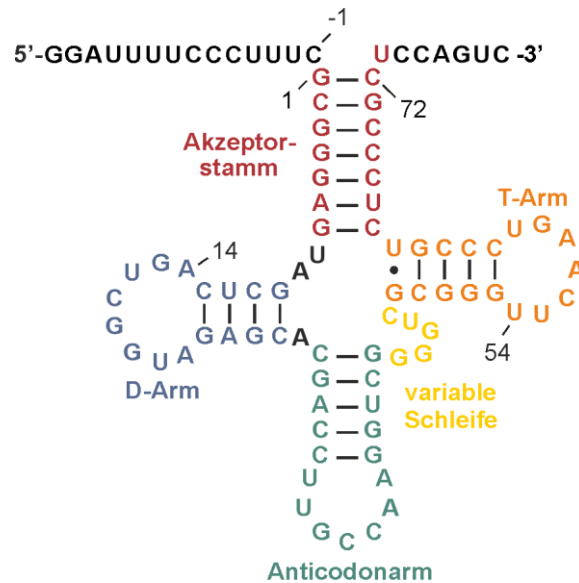


Abb. 20: *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup>

Sekundärstruktur der prä-tRNA<sup>Gly</sup> mit einer 14-nt langen 5'-Flanke. Das 3'-Ende besitzt neben der CCA-Sequenz noch drei weitere Nukleotide. Die charakteristischen Strukturelemente sind farblich hervorgehoben. Der Akzeptorstamm ist rot, der D-Arm blau, der Anticodonarm türkis, die variable Schleife gelb und der T-Arm orange eingefärbt.

### 3.2.6.1 Holoenzym-Reaktion

Die Holoenzym-Reaktionen wurden in der Regel unter *multiple-turnover* Bedingungen durchgeführt. So führte ein 10-facher Überschuss des Substrats dazu, dass jedes Enzymmolekül mehrere Substratmoleküle umsetzte. Dieser Überschuss wurde durch Zugabe von prä-tRNA ohne 5'-End-Markierung erreicht. Spuren der prä-tRNA mit 5'-End-Markierung wurden zur Visualisierung zugefügt, konnten jedoch für die Berechnung der benötigten Substratmenge vernachlässigt werden. In Holoenzym-Reaktionen sollten potentielle Inhibitoren auf die RNase P-Inhibition untersucht werden. Die Enzymkinetiken wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µL und in KN-Puffer durchgeführt.

5× KN-Puffer	
HEPES-KOH pH 7,4	100 mM
NH <sub>4</sub> OAc	750 mM
Spermidin	10 mM
Spermin	0,25 mM
2-Mercaptoethanol	20 mM

Im ersten Schritt wurde das Holoenzym bestehend aus RNA- und Protein-Untereinheit assembliert. Das Volumen der Holoenzym-Assemblierung richtete sich dabei danach, wie viele Holoenzym-Reaktionen direkt im Nachgang parallel durchgeführt werden sollten. Sollten beispielsweise drei Inhibitoren getestet werden, so wurden insgesamt inklusive DMSO-Kontrolle vier Reaktionsansätze benötigt und für diese wurde die Holoenzym-Assemblierung in einem großen Ansatz (Mastermix) durchgeführt. Somit konnten Schwankungen innerhalb einer Testreihe möglichst geringgehalten werden. Für jede einzelne Testreihe wurde eine neue Holoenzym-Assemblierung durchgeführt. Nach Zugabe von DMSO

bzw. Kleinmolekül und deren Inkubation mit Holoenzym erfolgte im zweiten Schritt der Reaktionsstart durch Zugabe des Substrats zum Enzym-Inhibitor / DMSO-Gemisch.

### ***T. maritima* RNase P**

Für Enzymkinetik-Experimente mit *T. maritima* RNase P wurde eine Magnesiumchlorid-Konzentration von 10 mM gewählt. Die Reaktionstemperatur betrug 50 °C und die Enzymkonzentration 50 nM, wobei RNA- und Proteinuntereinheit im stöchiometrischen Verhältnis zueinander eingesetzt wurden. Bei 10-fachem Substratüberschuss betrug die Konzentration an prä-tRNA<sup>Gly</sup> folglich 500 nM. Zur Visualisierung wurden zusätzlich 5'-[<sup>32</sup>P]-markierte prä-tRNA<sup>Gly</sup> eingesetzt, welche auf 5000 Cherenkov cpm pro 20 µL Reaktion eingestellt wurde. Zunächst wurde die Holoenzym-Assemblierung durchgeführt. Hierzu wurde folgender Ansatz vorbereitet:

Holoenzym-Assemblierung	
<i>T. maritima</i> P RNA	71,4 nM
KN pH 7,4	1,2×
MgCl <sub>2</sub>	11,4 mM
<i>T. maritima</i> P Protein	71,4 nM

Mit Ausnahme des P Proteins wurden alle Reaktionskomponenten zusammen pipettiert und zunächst für 5 Minuten bei 65 °C erhitzt. Es folgte ein schrittweises Abkühlen (2 Minuten 50 °C und 2 Minuten 40 °C) auf 25 °C. Somit sollte eine korrekte Faltung der RNA sichergestellt werden. Dann wurde das P Protein zum Ansatz dazugegeben und die Holoenzym-assemblierung erfolgte für 15 Minuten bei 25 °C. Das Holoenzym wurde in je 14 µL aliquotiert und 2 µL DMSO bzw. potentieller Inhibitor wurden dazugegeben. Somit betrug das Volumen des Enzymmixes stets 16 µL. Die Inkubation von Holoenzym und Inhibitor / DMSO erfolgte für weitere 15 Minuten bei 25 °C. Im Anschluss wurde der Ansatz auf die Reaktionstemperatur von 50 °C gebracht und es folgte eine weitere Inkubation über 5 Minuten.

Parallel dazu wurde der Substratmix vorbereitet.

Substratmix	
5'-[ <sup>32</sup> P]-prä-tRNA <sup>Gly</sup>	1250 cpm/µL
prä-tRNA <sup>Gly</sup>	2,5 µM
KN pH 7,4	1×
MgCl <sub>2</sub>	10 mM

Die Inkubation erfolgte identisch zum Enzymmix: zunächst bei 65 °C für 5 Minuten, dann 50 °C für 2 Minuten und 40 °C für 2 Minuten, 25° C über 30 Minuten und schließlich 50 °C für 5 Minuten.

Zum Reaktionsstart wurden 4 µL Substratmix auf 16 µL Enzymmix gegeben, sodass das Reaktionsvolumen letztlich 20 µL betrug. Die finalen Konzentrationen im Reaktionsansatz sind nachstehender Tabelle zu entnehmen. Die DMSO-Konzentration variierte zwischen 2 % und



10 %. Die eingesetzte Inhibitor-Konzentration orientierte sich an den in der Literatur beschriebenen Konzentrationen oder war von initialen Löslichkeitsexperimenten abhängig.

Reaktion	
<i>T. maritima</i> P RNA	50 nM
<i>T. maritima</i> P Protein	50 nM
5'-[ <sup>32</sup> P]-prä-tRNA <sup>Gly</sup>	250 cpm/μL
prä-tRNA <sup>Gly</sup>	500 nM
KN pH 7,4	1×
MgCl <sub>2</sub>	10 mM

### ***B. subtilis* RNase P**

Für Enzymkinetik-Experimente mit der *B. subtilis* RNase P wurde eine Magnesiumchlorid-Konzentration von 5 mM, eine Reaktionstemperatur von 37 °C, eine Enzymkonzentration von 10 nM und folglich für einen 10-fachen Substratüberschuss eine Substratkonzentration von 100 nM verwendet. Das Verhältnis von P Protein und P RNA war anfangs stöchiometrisch, wurde nach erneuter Proteinreinigung jedoch auf ein Verhältnis von 2:1 für eine vergleichbare Enzymaktivität angepasst. Es wurde zunächst mit der Holoenzym-Assemblierung begonnen.

Holoenzym-Assemblierung	
<i>B. subtilis</i> P RNA	14,3 nM
KN pH 7,4	1,2×
MgCl <sub>2</sub>	5,7 mM
<i>B. subtilis</i> P Protein	14,3/28,6 nM

Mit Ausnahme des P Proteins wurden alle Komponenten zusammengegeben, bei 55 °C für 5 Minuten erhitzt und danach bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Nach Zugabe des P Proteins erfolgte die Holoenzym-Assemblierung für 5 Minuten bei 37 °C. Das Holoenzym wurde sodann in einem Volumen von je 14 μL aliquotiert und 2 μL DMSO bzw. potentieller Inhibitor wurden hinzugegeben, sodass das Volumen des Enzym-DMSO / Inhibitor-Gemisches 16 μL betrug. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 37 °C. Parallel wurde folgender Substratmix vorbereitet:

Substratmix	
5'-[ <sup>32</sup> P]-prä-tRNA <sup>Gly</sup>	1250 cpm/μL
prä-tRNA <sup>Gly</sup>	500 nM
KN pH 7,4	1×
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

Die Inkubation des Substratmixes erfolgte analog zu der des Enzymmixes: 55 °C für 5 Minuten gefolgt von 35 Minuten bei 37 °C. Zum Starten der Reaktion wurden 4 μL des Substratansatzes auf 16 μL Enzymmix gegeben.

Nachfolgend sind die daraus resultierenden Konzentrationen in der 20 µL-Reaktion aufgeführt.

Reaktion	
<i>B. subtilis</i> P RNA	10 nM
<i>B. subtilis</i> P Protein	10/20 nM
5'-[ <sup>32</sup> P]-prä-tRNA <sup>Gly</sup>	250 cpm/µL
prä-tRNA <sup>Gly</sup>	100 nM
KN pH 7,4	1×
MgCl <sub>2</sub>	5 mM

### **S. aureus RNase P**

Für Enzymkinetik-Experimente mit der *S. aureus* RNase P wurde eine Magnesiumionen-Konzentration von 10 mM, eine Enzymkonzentration von 50 nM und eine Substratkonzentration von 500 nM verwendet. Die Reaktion erfolgte wie für die *B. subtilis* RNase P bei 37 °C. Auch die Holoenzym-Assemblierung wurde in Analogie zum *B. subtilis* Enzym durchgeführt. Für eine adäquate Enzymaktivität wurde das P Protein in zweifachem Überschuss im Vergleich zur P RNA eingesetzt. Es wurde mit der Holoenzym-Assemblierung begonnen:

Holoenzym-Assemblierung	
<i>S. aureus</i> P RNA	71,4 nM
KN pH 7,4	1,2×
MgCl <sub>2</sub>	11,4 mM
<i>S. aureus</i> P Protein	142,8 nM

Bis auf das P Protein wurden alle Assaykomponenten vereinigt und für 5 Minuten bei 55 °C und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe des P Proteins erfolgte die Holoenzym-Assemblierung bei 37 °C für 5 Minuten. Von dem Holoenzym wurden je 14 µL aliquotiert, 2 µL DMSO bzw. Inhibitor-Lösung wurden dazugegeben und die 16 µL wurden für weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Parallel wurde folgender Substratmix vorbereitet:

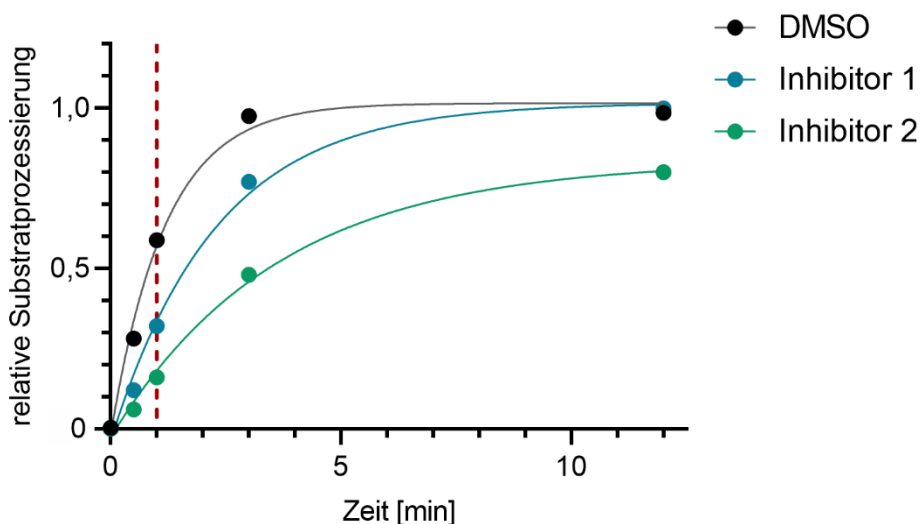
Substratmix	
5'-[ <sup>32</sup> P]-prä-tRNA <sup>Gly</sup>	1250 cpm/µL
prä-tRNA <sup>Gly</sup>	2,5 µM
KN pH 7,4	1×
MgCl <sub>2</sub>	10 mM

Die Inkubation wurde wie folgt durchgeführt: 55 °C für 5 Minuten gefolgt von 35 Minuten bei 37 °C. Zum Starten der Enzymreaktion wurden 4 µL des Substratmixes auf 16 µL Enzym-Inhibitor / DMSO-Gemisch gegeben. Für die 20 µL-Gesamtreaktion ergaben sich somit folgende Konzentrationen:

Reaktion	
<i>S. aureus</i> P RNA	50 nM
<i>S. aureus</i> P Protein	100 nM
5'-[ <sup>32</sup> P]-prä-tRNA <sup>Gly</sup>	250 cpm/µL
prä-tRNA <sup>Gly</sup>	500 nM
KN pH 7,4	1×
MgCl <sub>2</sub>	10 mM

### Initiale Inhibitor-Kinetik

Zur Testung neuartiger, potentieller Inhibitoren aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. SCHLITZER (Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) wurde das *T. maritima* Enzym verwendet, da hierfür eine hochaufgelöste Kristallstruktur für das Design der Verbindungen zur Verfügung stand. Um möglichst viele Verbindungen in kürzester Zeit testen zu können, wurde keine komplette Enzymkinetik mit Probenentnahme nach verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt, sondern lediglich an einem definierten Zeitpunkt der Substratumsatz bestimmt und mit der entsprechenden DMSO-Kontrolle verglichen. Als Zeitpunkt hierfür wurde eine Minute gewählt. Wie der Abb. 21 beispielhaft zu entnehmen ist, befindet sich dieser Zeitpunkt im linearen Anstieg der Regressionsgeraden. Somit sollten inhibitorische Effekte bestmöglich erfasst werden. Zu einem weitaus späteren Zeitpunkt (beispielsweise nach 5 Minuten) wäre lediglich Inhibitor 2 aus Abb. 21 erfasst worden, Inhibitor 1 hingegen nicht.



**Abb. 21: Beispielhafte Substrat-Zeit Umsatzkurven für Inhibitoren**

Der Anteil an prozessiertem Substrat wurde gegen die Zeit in Minuten aufgetragen. Anhand der vier Datenpunkte (Kreise) wurde eine Regressionsgerade ermittelt. Für  $x = 1$  Minute ist eine rote gestrichelte Linie eingezeichnet. Anhand dieser ist zu erkennen, dass zu diesem Zeitpunkt sowohl für Inhibitor 1 (blau) als auch Inhibitor 2 (grün) eine Inhibition festzustellen ist, da für beide Inhibitoren der Anteil an prozessiertem Substrat deutlich unterhalb der DMSO-Kontrolle liegt.

Da lediglich nach einer Minute 4  $\mu\text{L}$  Probe benötigt wurden, konnte das Reaktionsvolumen von 20  $\mu\text{L}$  auf 10  $\mu\text{L}$  reduziert werden. Ein weiteres Reduzieren des Volumens wäre theoretisch denkbar. Davon wurde jedoch abgesehen, weil das Pipettieren äußerst geringer Volumina ( $< 1 \mu\text{L}$ ) schließlich die Ungenauigkeit und damit das Fehlerpotential erhöht. Für die Testung der Verbindungen wurden 10 % DMSO verwendet und als Positivkontrolle diente der literaturbekannte Inhibitor Neomycin B (Mikkelsen *et al.*, 1999). Es wurde wie für die *T. maritima* Holoenzymkinetik (siehe Seite 74) verfahren. Nach erfolgter Holoenzym-Assemblierung wurden je 7  $\mu\text{L}$  des Holoenzym aliquotiert und 1  $\mu\text{L}$  DMSO p.a., ddH<sub>2</sub>O, Neomycin-Lösung oder in DMSO gelöster Inhibitor zugegeben. Bei welcher Konzentration die

potentiellen Inhibitoren initial getestet wurden, orientierte sich an zuvor durchgeführten mikroskopischen Untersuchungen zur Löslichkeit. Für das Herstellen von Verdünnungen wurde stets DMSO p.a. verwendet. Es folgte eine 15-minütige Inkubation der Inhibitoren mit dem Holoenzym. Nachdem der Ansatz für 5 Minuten auf Reaktionstemperatur gebracht worden war, wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 2 µL Substratansatz gestartet. Nach einer Minute wurden 4 µL Probe gezogen und diese wie unter 3.2.6.4 beschrieben weitergehend analysiert. Mit diesem Protokoll war es möglich, insgesamt 12 Enzymkinetiken parallel nach folgendem Zeitplan durchzuführen:

Set I	1	2	3	DMSO
Start	0	15"	30"	45"
1 min Probe	1'	1'15"	1'30"	1'45"

Set II	Neo	4	5	DMSO
Start	2'	2'15"	2'30"	2'45"
1 min Probe	3'	3'15"	3'30"	3'45"

Set III	6	7	8	DMSO
Start	4'	4'15"	4'30"	4'45"
1 min Probe	5'	5'15"	5'30"	5'45"

' steht für Minute und " für Sekunden.

Die drei DMSO-Kontrollen dienten zum einen dazu, etwaige Schwankungen der Enzymkinetik durch die um 4 Minuten verlängerte Inkubation auszuschließen und zum anderen dazu, konstantere Ergebnisse zu erhalten. Dadurch, dass bei diesen Testungen lediglich ein Zeitwert genommen wurde, unterlagen die Ergebnisse stärkeren Schwankungen. Diesem sollte mit den drei technischen Replikaten der DMSO-Kontrolle begegnet werden. Somit konnte zumindest sichergestellt werden, dass die DMSO-Kontrolle, die für die Normalisierung aller Ergebnisse diente, relativ stabil war. Insgesamt konnten 8 Verbindungen parallel getestet werden. Zeigte eine Verbindung inhibitorische Effekte, wurde diese im nächsten Schritt in einer kompletten enzymkinetischen Analyse (siehe Seite 74) weitergehend untersucht.

### 3.2.6.2 RNA-allein Reaktion

Bei erhöhten Konzentrationen zweiwertiger Kationen ( $Mg^{2+}$ ) ist die RNA-Untereinheit auch in Abwesenheit der Proteinkomponente *in vitro* aktiv. Aus diesem Grund wurde die Magnesiumchlorid-Konzentration auf 100 mM erhöht. Bis auf den Verzicht der P Protein Zugabe wurde ansonsten analog verfahren, wie dies für die entsprechenden Holoenzym-Kinetiken auf den Seiten 74-76 beschrieben ist. Die Experimente wurden durchgeführt, um zu analysieren, ob etwaige Inhibitoren die Protein-Untereinheit oder die RNA-Untereinheit adressieren. Bei Verbindungen, die an die Protein-Untereinheit binden, sollten in der RNA-allein Reaktion demnach keine Effekte beobachtet werden können.

### 3.2.6.3 HARP-Kinetik

Neben den bakteriellen RNA-basierten Enzymen, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine bakterielle Protein-basierte Form der RNase P enzymkinetisch untersucht. Hierbei handelte es sich um das HARP aus dem thermophilen Organismus *Thermodesulfator indicus*. Im Folgenden wird dieses Protein mit Thein2060 abgekürzt. Die enzymkinetischen Experimente wurden unter *single-turnover* Bedingungen mit einem Überschuss an Enzym und lediglich Spuren des 5'-markierten Substrats durchgeführt. Somit setzte jedes Enzymmolekül lediglich ein Substratmolekül um. Der Vorgang der Produktfreisetzung aus dem Enzym wird dabei außer Acht gelassen.

Die Enzymkinetik wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µL in F-Puffer durchgeführt.

10× F-Puffer		EDB-Puffer	
Tris pH 7,0	500 mM	Tris-HCl	50 mM
NaCl	200 mM	NaCl	100 mM
MgCl <sub>2</sub>	45 mM	Glycerin	10 %
BSA (ultrapure)	200 µg/mL	pH-Wert	7,0

Zunächst wurde der Substratansatz mit 2500 cpm/µL 5'-[<sup>32</sup>P]-prä-tRNA in Wasser vorbereitet und für 5 Minuten bei 55 °C und 5 Minuten bei 37 °C präinkubiert. Parallel dazu wurde der Enzymmix angesetzt. Zur Verdünnung des Enzyms wurde der EDB-Puffer verwendet.

Enzymmix	
Thein2060	62,5 nM
10× F-Puffer	1,25×
DTT	6,25 mM
ddH <sub>2</sub> O	ad 24 µL

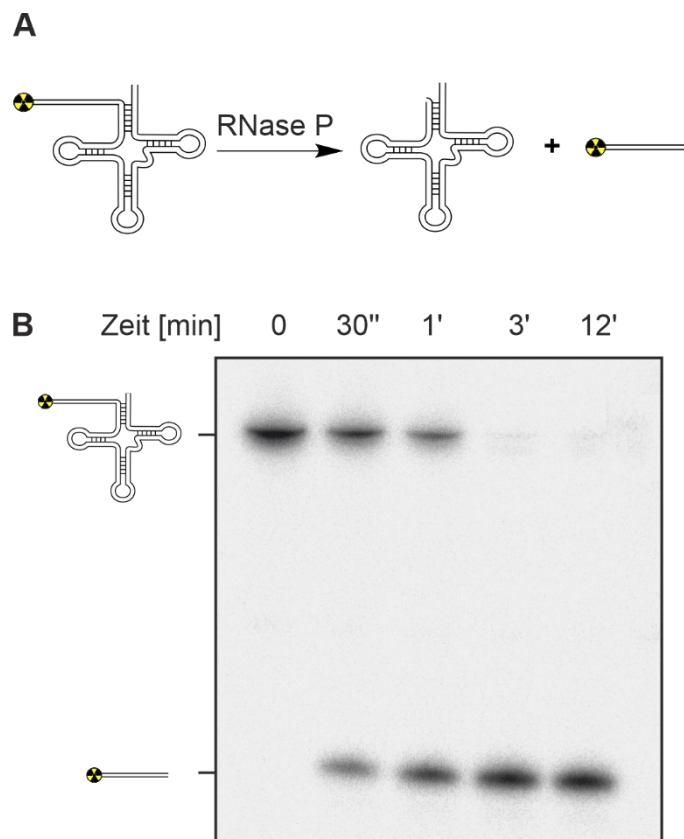
16 µL dieses Ansatzes wurden für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 4 µL Substratansatz zu 16 µL Enzymmix gestartet. Es ergaben sich für die 20 µL-Reaktion folgende Endkonzentrationen:

Reaktion	
Thein2060	50 nM
5'-[ <sup>32</sup> P]- prä-tRNA	500 cpm/µL
10× F-Puffer	1×
DTT	5 mM

### 3.2.6.4 Auswertung

Um den Substratumsatz der Enzymreaktion über die Zeit zu verfolgen, wurde an vier verschiedenen Zeitpunkten je 4 µL Probe gezogen und diese auf 4 µL eiskalten 2× RNA-Probenpuffer (siehe Seite 47) zum Stoppen der Reaktion gegeben. Die vier Zeitpunkte wurden grundsätzlich so gewählt, dass zwei Zeitwerte im linearen Anstiegsbereich des Substratumsatzes (Umsatz < 80 %) und die zwei weiteren Zeitwerte im Plateaubereich lagen (vgl. Abb. 21, Seite 77). So sollte das spätere Auswerten mittels *Fitting* relativ stabile Ergebnisse liefern. Als Nullwert wurde 1 µL aus dem Substratmix mit 3 µL ddH<sub>2</sub>O und 4 µL 2× RNA-Probenpuffer gemischt. Die Proben wurden nach Abschluss aller parallel

durchgeführten Experimente für 3 Minuten bei 95 °C aufgeköcht und anschließend über ein 20%iges, denaturierendes PAA-Gel (3.2.2.2) analysiert. Das Gel lief dafür zumeist bei 25 mA für 2 Stunden und 20 Minuten. Anschließend wurde eine *imaging plate* über Nacht aufgelegt und die Detektion erfolgte am nächsten Morgen am *Phosphorimager*. Die visualisierten Banden wurden über ein Bio-Imaging System (Raytest) und mithilfe der Software AIDA quantifiziert. Die jeweils obere Bande stellt das unprozessierte Substrat, also die prä-tRNA, dar (Abb. 22B). Die untere Bande hingegen ist der abgespaltenen 5'-Flanke zuzuordnen. Die mature tRNA bleibt unsichtbar, da durch die 5'-Prozessierung die radioaktive Markierung am 5'-Ende verloren geht (Abb. 22A).



**Abb. 22: Beispielhaftes Kinetikgel**

**(A)** RNase P-Reaktion mit 5'-[<sup>32</sup>P]-markierter prä-tRNA<sup>Gly</sup>. **(B)** 20%iges, denaturierendes PAA-Gel. Gezeigt sind fünf verschiedene Proben einer Enzymkinetik mit zunehmender Reaktionszeit. Die obere Bande stellt die nicht-prozessierte 5'-[<sup>32</sup>P]-markierte prä-tRNA<sup>Gly</sup> dar und die untere Bande die 5'-[<sup>32</sup>P]-markierte 5'-Flanke. Die mature tRNA<sup>Gly</sup> ist wegen fehlender 5'-[<sup>32</sup>P]-Markierung nach *Phosphorimaging* nicht zu sehen. ", Sekunde; ', Minute.

Somit konnte der Anteil an prozessiertem Substrat wie folgt berechnet werden:

$$tRNA_{\text{prozessiert}} = \frac{5'\text{-Flanke}}{5'\text{-Flanke} + \text{prä-tRNA}}$$

Die weitere Auswertung zur Bestimmung des  $k_{obs}$ -Werts erfolgte mit der Software GraFit. Trägt man den Anteil an prozessiertem Substrat zu den vier verschiedenen Zeitpunkten gegen die Zeit auf, lässt sich die Ratenkonstante  $k_{obs}$  gemäß dem Geschwindigkeitszeitgesetz 1. Ordnung anhand folgender nicht linearer Regressionsgerade bestimmen:

$$A_t = A * (1 - e^{-k_{obs} * t})$$

( $A_t$ =Anteil an prozessierter tRNA zum Zeitpunkt  $t$ ,  $A$ =maximal prozessierbarer Anteil)

Wurde die Enzymkinetik unter *multiple-turnover* Bedingungen durchgeführt, musste die ermittelte Ratenkonstante noch mit dem Faktor 10 aufgrund des 10-fachen Substratüberschusses multipliziert werden.

### Ermittlung inhibitorischer Effekte

Im Falle einer vollständig durchgeführten Enzymkinetik, die die Ermittlung der Ratenkonstante miteinschließt, wurde für die getesteten Verbindungen wie folgt normalisiert:

$$\text{RNase P-Aktivität} = \frac{k_{obs} (\text{Inhibitor in DMSO})}{k_{obs} (\text{DMSO})}$$

Erfolgte die Auswertung jedoch lediglich zu einem einzelnen Zeitpunkt wie unter Punkt 3.2.6.1, Seite 77 beschrieben, war eine Ermittlung der Ratenkonstante nicht möglich. Demnach wurde lediglich der Anteil an prozessierter tRNA betrachtet und es wurde wie folgt normalisiert:

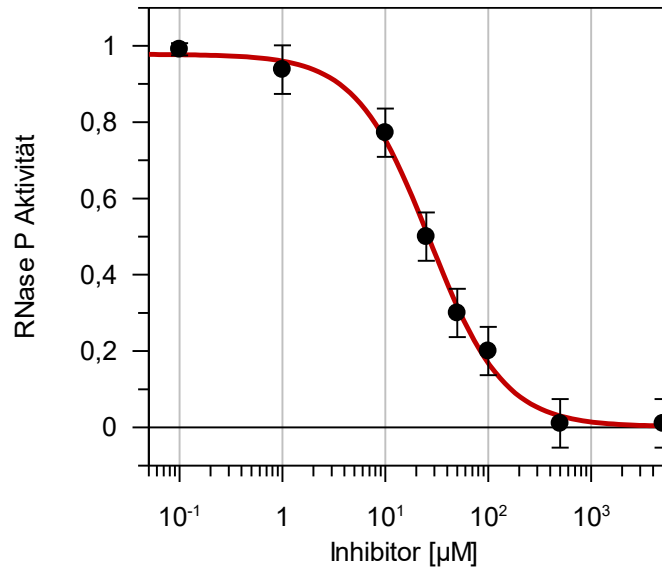
$$\text{RNase P-Aktivität} = \frac{tRNA_{\text{prozessiert}} (\text{Inhibitor in DMSO})}{tRNA_{\text{prozessiert}} (\text{DMSO})}$$

Bei Verbindungen, welche inhibitorische Effekte zeigten, sollte nachfolgend eine Bestimmung des  $IC_{50}$ -Werts vorgenommen werden. Hierzu wurde der Inhibitor von niedrigen Konzentrationen, bei denen keine Effekte zu beobachten waren, bis hin zu Konzentrationen mit vollständiger Inhibition titriert. Anschließend wurde die relative Ratenkonstante als RNase P-Aktivität gegen die Inhibitor-Konzentration aufgetragen (Abb. 23) und es wurde eine Regressionsgerade der sigmoidalen Kurve mittels folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{RNase P-Aktivität} = \frac{1}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^S}$$

( $S$ =Steigungsfaktor,  $I$ =Inhibitor)

Um eine möglichst gute Regressionsgerade zu erhalten, war es wichtig zumindest für je zwei Konzentrationen mit vollständiger bzw. keiner Inhibition die RNase P-Aktivität zu bestimmen.

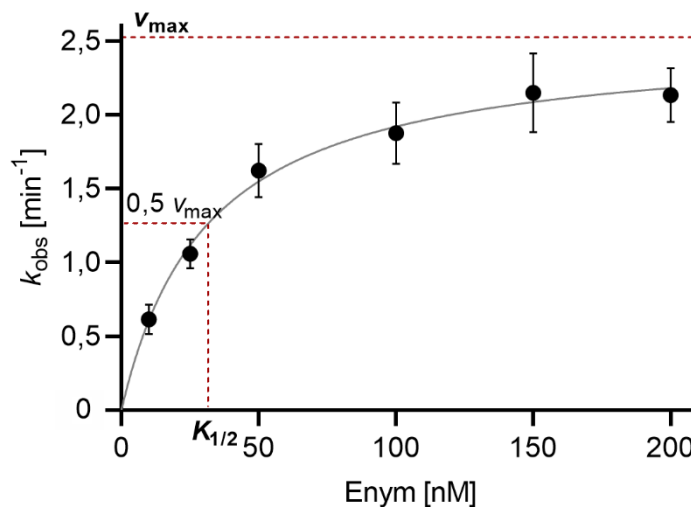


**Abb. 23: Beispielhafte Bestimmung des  $IC_{50}$ -Werts**

Aufgetragen ist die RNase P-Aktivität gegen die Inhibitor Konzentration in  $\mu\text{M}$ . Als RNase P-Aktivität wurde die relative Ratenkonstante aus mindestens drei verschiedenen Experimenten festgelegt. Für die x-Achse ist eine logarithmische Darstellung gewählt.

### Bestimmung enzymkinetischer Parameter

Im Rahmen der Untersuchungen mit dem *T. indicus* HARP sollten auch enzymkinetische Parameter wie der  $K_{1/2}$ -Wert, jene Enzymkonzentration bei halbmaximaler Ratenkonstante, und die maximale Ratenkonstante  $v_{\text{max}}$  ermittelt werden. Hierbei wurden Spuren des 5'-markierten Substrats eingesetzt und die Enzymkonzentration variiert. Als niedrigste Konzentration wurden 10 nM Enzym und als höchste 500 nM verwendet. Zur Bestimmung genannter Parameter wurden die Mittelwerte der Ratenkonstante gegen die Enzymkonzentration aufgetragen und die Regressionsgerade mittels modifizierter *Michaelis-Menten*-Gleichung bestimmt (Abb. 24).



**Abb. 24: Auswertung nach modifiziertem *Michaelis-Menten*-Model**

Auf der y-Achse sind die Ratenkonstanten und auf der x-Achse die Enzymkonzentrationen in nM aufgetragen. Der  $K_{1/2}$ -Wert ist jene Enzymkonzentration, bei der die halbmaximale Ratenkonstante erreicht ist.



Grundsätzlich setzt die *Michaelis-Menten*-Theorie einen Substratüberschuss, also eine Kinetik unter *multiple-turnover* Bedingungen, voraus. Da die Experimente aber unter Enzymüberschuss (*single-turnover*) durchgeführt wurden, wurde die folgende, modifizierte Gleichung verwendet:

$$\vartheta = \frac{v_{max} [E]}{K_{1/2} + [E]}$$

( $v_{max}$ =maximale Ratenkonstante,  $K_{1/2}$ =Enzymkonzentration bei halbmaximaler Ratenkonstante,  $[E]$ = Enzymkonzentration)

Als Fehler für den  $v_{max}$ - und den  $K_{1/2}$ -Wert wurden diejenigen, die sich durch das *Fitting* ergaben, angegeben. Die katalytische Effizienz ist der Quotient aus maximaler Ratenkonstante und  $K_{1/2}$ -Wert. Für diesen enzymkinetischen Parameter wurde der Fehler wie folgt berechnet:

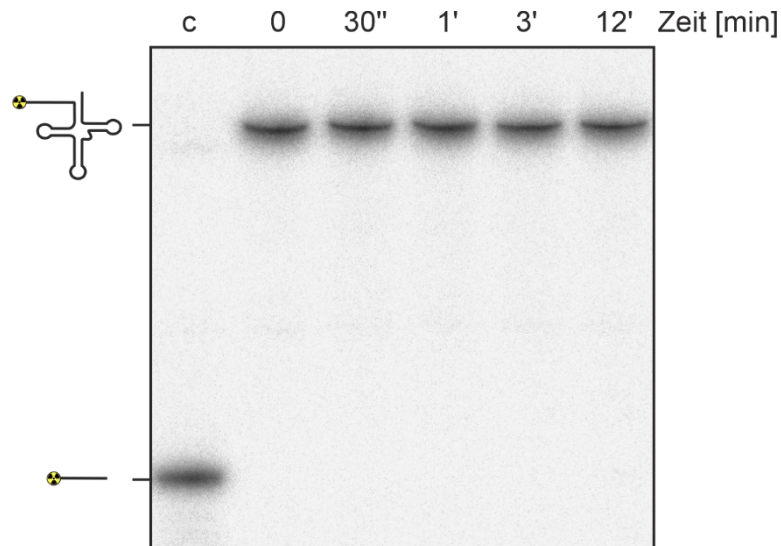
$$\sigma = \frac{v_{max}}{K_{1/2}} \times \sqrt{\left(\frac{\sigma(v_{max})}{v_{max}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma(K_{1/2})}{K_{1/2}}\right)^2}$$

( $v_{max}$ =maximale Ratenkonstante,  $K_{1/2}$ =Enzymkonzentration bei halbmaximaler Ratenkonstante,  $\sigma$  = Fehler)

## 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 4.1 Inhibitoren der bakteriellen RNase P

Für die enzymkinetische Testung von neuartigen Verbindungen wurde die RNase P aus *T. maritima* als Modellenzym verwendet, da die verfügbare hochaufgelöste Kristallstruktur des P Proteins *in silico-Docking* und Kristall-*Soaking* grundsätzlich ermöglicht (Kazantsev *et al.*, 2003). Die Enzymreaktionen wurden bei dem gemäß Literatur beschriebenen Temperatur-optimum von 50 °C durchgeführt (Paul *et al.*, 2001). Zur weiteren Optimierung der Holoenzym-Kinetik wurde die Mg<sup>2+</sup>-Ionen Konzentration von 4,5 mM auf 10 mM erhöht. Unter Verwendung von 50 nM Holoenzym und 500 nM prä-tRNA<sup>Gly</sup>-Substrat wurde letztlich eine Ratenkonstante von  $\sim 12 \text{ min}^{-1} \pm 2 \text{ min}^{-1}$  erreicht. Trotz der erhöhten Konzentration an Mg<sup>2+</sup>-Ionen konnte unter diesen Bedingungen keine RNA-allein Aktivität beobachtet werden, sodass auch Inhibitoren des P Proteins unter den genannten Bedingungen getestet werden können (Abb. 25).

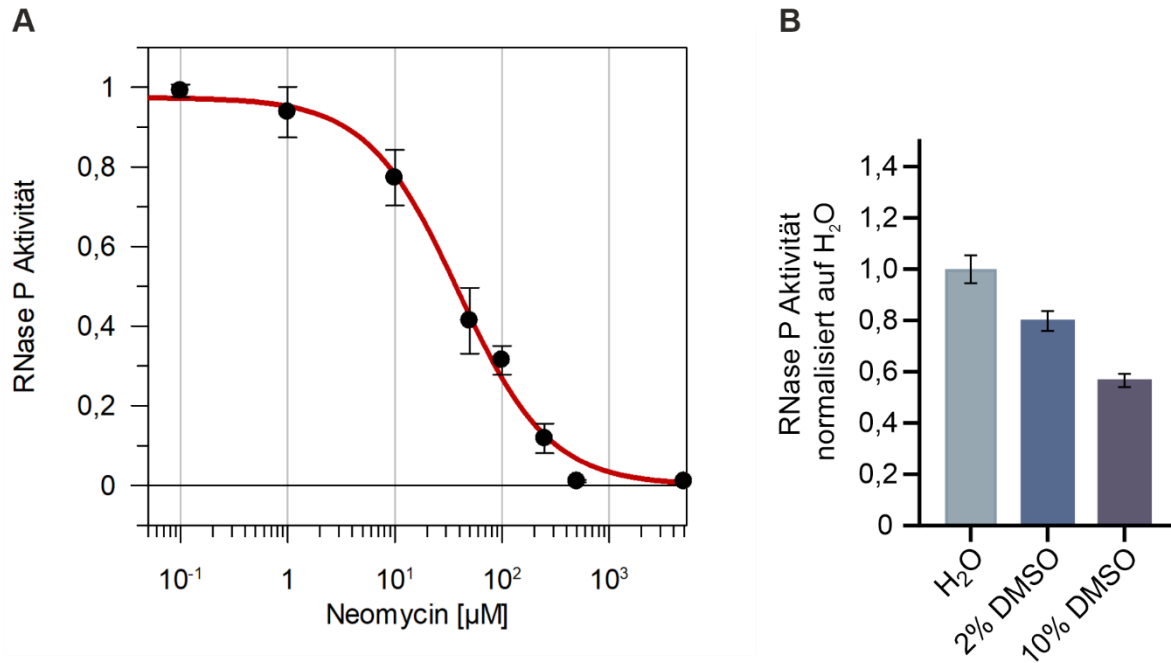


**Abb. 25: *T. maritima* RNA-allein Aktivität**

RNA-allein Reaktion. Die Reaktion wurde mit 50 nM *T. maritima* P RNA sowie 500 nM prä-tRNA<sup>Gly</sup> in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über ein 20%iges, denaturierendes Polyacrylamid (PAA)-Gel und anschließendes *Phosphorimaging*. ', Minute; ", Sekunde; c, Kontrolle (Inkubation mit Holoenzym für 12 Minuten).

Als Positivkontrolle wurde das Aminoglykosid Neomycin B verwendet, für das eine 50%ige Inhibition der *E. coli* RNase P bei einer Konzentration von  $\sim 60 \mu\text{M}$  gezeigt wurde (Mikkelsen *et al.*, 1999). Zunächst sollte als Kontrolle der IC<sub>50</sub>-Wert von Neomycin B für die *T. maritima* RNase P bestimmt werden. Dieser liegt bei  $\sim 40 \mu\text{M}$  und ist somit mit dem publizierten Wert vergleichbar (Abb. 26A). Es konnte also mit dem etablierten Assay für die weiteren Testungen fortgefahren werden. Für die Testung neuer Verbindungen wurde initial lediglich nach einer Minute eine Probe gezogen, um möglichst viele Verbindungen parallel testen zu können. Diese wurden mit der entsprechenden DMSO-Kontrolle, wie unter 3.2.6.4 beschrieben, verglichen. Bei den Testreihen wurde Neomycin B stets bei einer Konzentration

von 100  $\mu\text{M}$  als Positivkontrolle parallel getestet. Da eine Ein-Punkt-Kinetik relativ hohen Schwankungen unterliegt, wurden innerhalb einer Testreihe drei DMSO-Kontrollen durchgeführt. Mit der Auswertung der Testung wurde lediglich dann fortgefahren, wenn alle drei DMSO-Kontrollen weitestgehend konstant waren und für Neomycin B der erwartete Effekt beobachtet wurde.



**Abb. 26: *T. maritima* Enzymkontrollen**

**(A)** IC<sub>50</sub>-Wert-Bestimmung von Neomycin B. Die Kinetiken wurden mit 50 nM *T. maritima* Holoenzym und 500 nM prä-tRNA<sup>Gly</sup> in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Es wurde auf die Wasser-Kontrolle normalisiert, da Neomycinsulfat in Wasser gelöst wurde. Der IC<sub>50</sub>-Wert liegt bei 39,1  $\mu\text{M} \pm 5,5 \mu\text{M}$ . Jeder Datenpunkt basiert auf mindestens drei biologischen Replikaten und ist angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM). **(B)** Einfluss von DMSO auf die Enzymaktivität. Die Kinetiken wurden wie unter (A) beschrieben durchgeführt und ausgewertet.

Um etwaigen Löslichkeitsproblemen der eher hydrophoben Kleinmoleküle zu begegnen (Walczyk, 2016), wurde ein DMSO-Gehalt von 10 % gewählt. Üblicherweise werden lediglich 1-2 % DMSO in Enzymkinetiken verwendet (Tjernberg *et al.*, 2006; Misuri *et al.*, 2017). Unter Verwendung von 10 % DMSO liegt die Enzymaktivität bei etwa 60 % der Aktivität der Wasser-Kontrolle (Abb. 26B). Daher stellt 10 % DMSO einen guten Kompromiss dar, um die potentiellen Inhibitoren bei einer möglichst hohen Konzentration in noch löslicher Form testen zu können. Für RNPA2000, eine der Ausgangsverbindungen, wurde ein IC<sub>50</sub> von  $\sim 140 \mu\text{M}$  bestimmt (Eidem *et al.*, 2015), sodass dessen Derivate durchaus bei 250  $\mu\text{M}$  oder gar 500  $\mu\text{M}$  getestet werden sollten. Welche Konzentration der zu testenden Verbindung initial eingesetzt wurde, richtete sich nach deren Löslichkeit. Zur Abschätzung der Löslichkeit wurden 200  $\mu\text{L}$  einer Lösung in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % DMSO und der Substanz unter dem Mikroskop analysiert. Es wurden folgende Konzentrationen an Verbindung untersucht: 500  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  (Abb. 27 oben). Für die Testung wurde die maximale Konzentration gewählt, bei der eine klare Lösung zu beobachten war. Die für die Testung eingesetzte Konzentration ist im folgenden Abschnitt, sofern sie variierte, in eckigen Klammern in den

Abbildungen mitsamt der jeweiligen Struktur angegeben. Verbindungen, die auch bei 50  $\mu\text{M}$  noch Präzipitation zeigten, wurden aufgrund der schlechten Löslichkeit nicht weiter getestet.

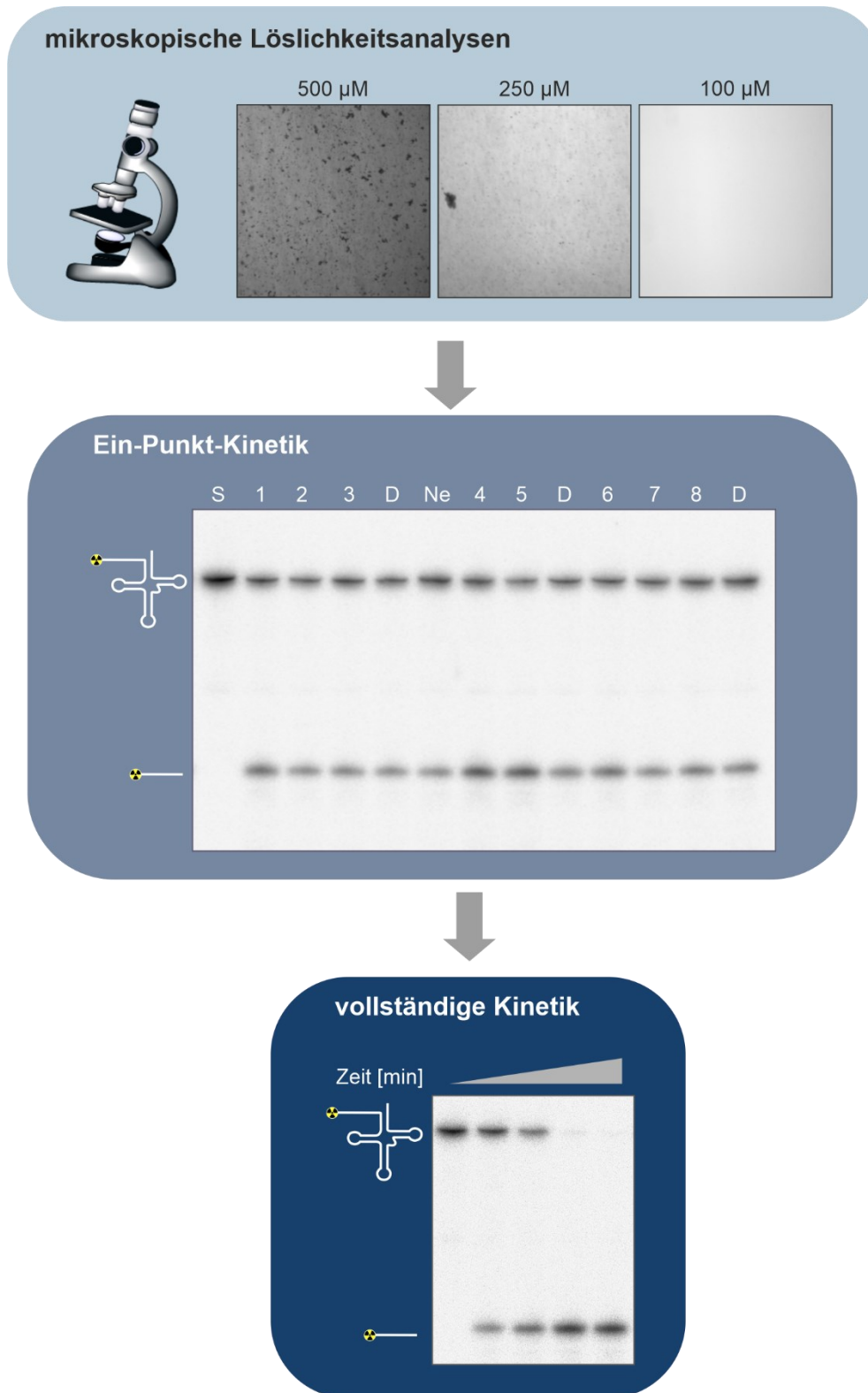


Abb. 27: Durchführung der enzymkinetischen Testungen

(Oben) Mikroskopische Löslichkeitsanalysen. Die Aufnahmen (10-fache Vergrößerung) sind für eine Verbindung beispielhaft bei 500, 250 und 100  $\mu\text{M}$  gezeigt. Da die Lösung hier bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eindeutig klar erschien, wurde die Verbindung schließlich bei 100  $\mu\text{M}$  getestet. (Mitte) Ein-Punkt-Kinetik. 20%iges PAA-Gel (8 M Harnstoff) mit einer Testreihe. S, Substratansatz (ohne Enzymzugabe); D, DMSO; Ne, Neomycin. (Unten) Vollständige Kinetik. 20%iges PAA-Gel (8 M Harnstoff) einer einzelnen Enzymkinetik.

Zusammenfassend wurde für die Testung der Verbindungen wie folgt verfahren: Nach Ermittlung der Konzentration für die Testung anhand von mikroskopischen Löslichkeitsanalysen (Abb. 27 oben), wurden bis zu acht Verbindungen parallel in einer Ein-Punkt-Kinetik getestet (Abb. 27 Mitte). Bei Identifizierung einer inhibitorisch wirkenden Verbindung wurde die initiale Testung mittels einer kompletten Enzymkinetik verifiziert (Abb. 27 unten). Die Synthese sowie das Design aller in diesem Abschnitt (4.1) beschriebenen Verbindungen erfolgte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. SCHLITZER (Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) durch R. E. EMMERICH und E. M. SCHÄFER.

#### 4.1.1 Derivate publizierter RNase P-Inhibitoren

##### RNPA2000-Derivate

RNPA2000 (Abb. 28) ist - wie bereits erwähnt - ein charakterisierter RNase P-Inhibitor des *S. aureus* Enzyms mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $\sim 140 \mu\text{M}$  und einer Thiosemicarbazid-Grundstruktur (Eidem *et al.*, 2015; Lounsbury *et al.*, 2018). Dieser wurde als Ausgangspunkt für die weitergehende Derivatisierung gewählt. Ziel dieser Derivatisierung war es, die RNase P-Inhibition zu steigern. Im Rahmen eines Liganden-basierten Designs sollten dazu in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. SCHLITZER neuartige Strukturen gefunden werden, die weder durch bestehende Patentschriften abgedeckt werden (Dunman *et al.*, 2015, 2016) noch bereits synthetisiert und getestet wurden (Lounsbury, 2016). Zunächst wurden Verbindungen mit Strukturvariationen am Hydrazid-Teilgerüst synthetisiert (Abb. 28), bei denen die *para*-Isopropylphenoxy-Gruppe (RNPA2000) sowohl gegen eine *para*-Isopropyl-*N*-Methylanilin- als auch eine 3,4-Dimethylphenoxy-Gruppe (Verbindung 1 & 2) ausgetauscht wurde. Zusätzlich wurde die Carbonsäurehydrazid-Funktion durch ein Sulfonsäurehydrazid (Verbindung 4 & 5) ersetzt und der Linker zwischen dem Carbonsäurehydrazid-Teilgerüst und dem Benzol-Ringsystem wurde durch das Weglassen der  $\text{CH}_2$ -Gruppe inklusive Ether-Funktion verkürzt (Verbindung 3).

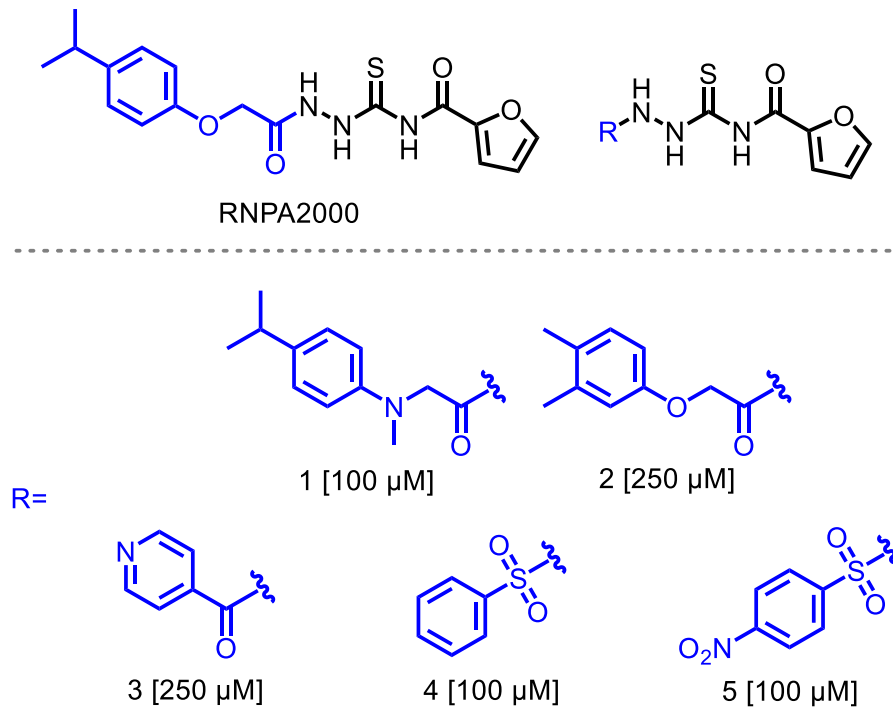


Abb. 28: RNPA2000 und dessen Derivate 1-5 mit Variationen am Hydrazid-Teil

Da für das Thiosemicarbazid bereits zahlreiche Derivate beschrieben sind und sich somit wenig Möglichkeiten für neuartige Strukturen ergeben, wurde bei den nachfolgenden Verbindungen vom Sauerstoff-Analogon NL20 ausgegangen. Für dieses findet sich ein  $IC_{50}$ -Wert von 75  $\mu$ M in der Literatur, womit es bereits aktiver als RNPA2000 selbst ist (Lounsbury, 2016). Ähnlich zum RNPA2000 wurde auch beim NL20 zunächst auf Seiten des Hydrazid-Teilgerüsts derivatisiert (Abb. 29).

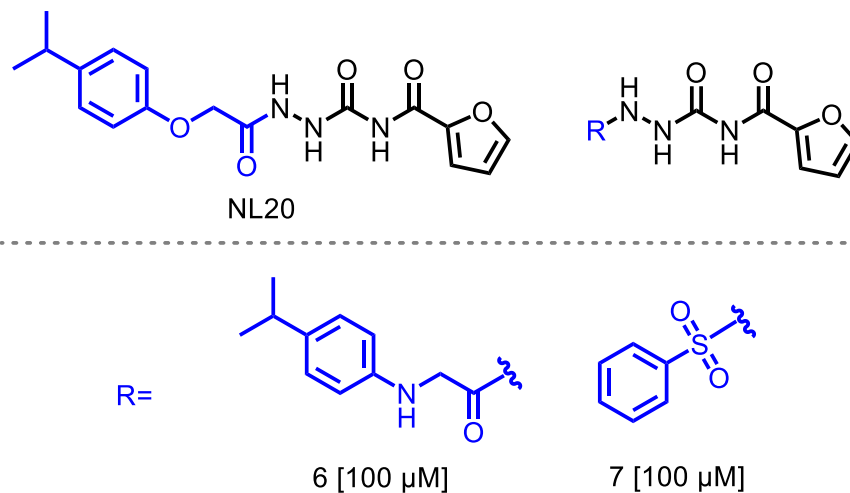
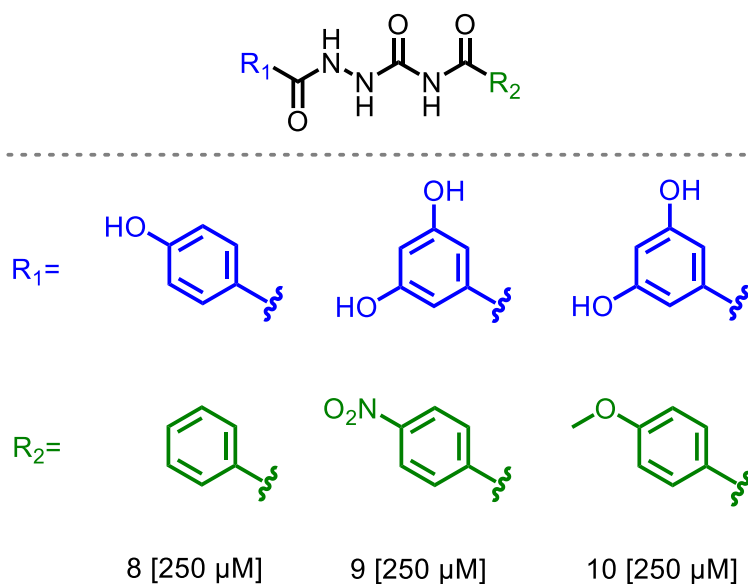


Abb. 29: NL20 und dessen Derivate 6 und 7 mit Variationen am Hydrazid-Teil

Im Weiteren wurden daraufhin die nachstehenden Verbindungen mit Strukturvarianten auf Seiten des Carbonsäurehydrazid- ( $R_1$ ) und des Imid- ( $R_2$ ) Teilgerüsts synthetisiert (Abb. 30). Der Furanring des NL20 wurde durch unterschiedlich substituierte Phenylreste (Elektronen-

schiebend vs. -ziehend) ersetzt und das Carbonsäurehydrazid ohne Etherfunktionalität direkt an ein Hydroxyl-substituiertes, aromatisches System geknüpft.



**Abb. 30: NL20-Derivate 8-10 mit unterschiedlich substituierten Phenyl-Resten auf Seiten des Carbonsäurehydrazid- und des Imid-Teilerüsts**

Die gezeigten Verbindungen wurden enzymkinetisch bei den in den einzelnen Abbildungen (Abb. 28 - Abb. 30) angegebenen Konzentrationen getestet. Keines der Derivate zeigte jedoch eine deutliche Inhibition (siehe Anhang 5.2.1.1, Seite 246). Lediglich Verbindung 6 führte zu einer ~20%igen Inhibition. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass diese Inhibition und die schwache Aktivierung (22 %) durch Verbindung 1 auf experimentelle Schwankungen zurückzuführen sind.

Eine weitere Strategie bestand darin, den Thiosemicarbazid-Kern durch ein vicinales Diol zu ersetzen, das in ähnlichem Maße zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen befähigt ist (Abb. 31A & B). Ein Vorteil dabei war, dass entsprechende Strukturen *bis dato* nicht von etwaigen Patenten erfasst werden und sich damit eine Möglichkeit ergibt, Patentansprüche zu umgehen (Dunman *et al.*, 2015, 2016). Als ein limitierender Faktor ist hier allerdings die Komplexität der Synthesechemie zu nennen. So konnte letztlich nicht jede geplante Verbindung realisiert werden. Für erste Derivatisierungen wurde der Furanring am Imid beibehalten (Abb. 31B) und das vicinale Diol wurde an einen verschiedenartig-substituierten Benzolring geknüpft (Verbindung 11 & 12) oder die Bindung an das aromatische System erfolgte über ein Carbonsäureamid (Verbindung 13). Ausgehend von letztgenannter Verbindung wurde sich dann von der Grundstruktur durch den Austausch des Imids gegen ein Carbonsäureamid noch weiter entfernt (Abb. 31C), sodass letztlich keine zwei Carbonylfunktionalitäten in einem 1,3-Abstand mehr vorzufinden waren (Verbindung 14). Der 1,4-Abstand der beiden Carbonylgruppen wurde hingegen weiterhin beibehalten (in Abb. 31 mit den Nummern 1-4 gekennzeichnet).

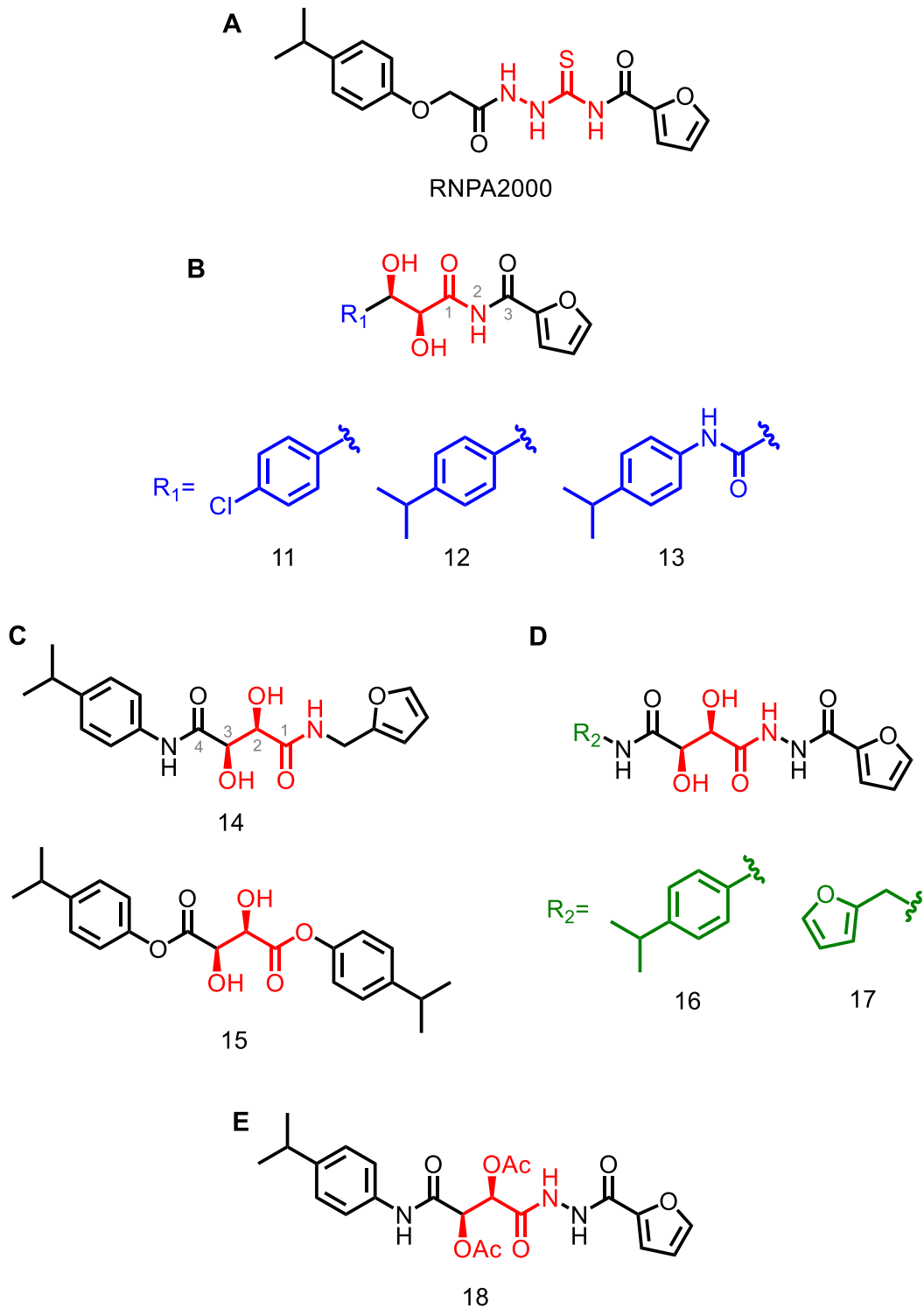


Abb. 31: Derivate 11-18 mit vicinalem Diol und Imid-, Carbonsäureamid-, Diacylhydrazin- sowie Carbonsäureester-Teilgerüst

Im Anschluss daran erfolgte der Austausch der Carbonsäureamide gegen Carbonsäureester (Verbindung 15) bzw. der Austausch des ursprünglichen Imids gegen ein Diacylhydrazin (Abb. 31D; Verbindung 16 & 17). Durch die Strukturvariationen wurde der Linker mit zentralem vicinalen Diol zwischen den beiden aromatischen Systemen in seiner Länge und Funktionalität variiert. Außerdem fiel im Zuge der Synthese eine Verbindung als Zwischenstufe an, in der das vicinale Diol aus Verbindung 16 mit Essigsäure verestert vorlag (Abb. 31E;



Verbindung 18). Ziel dieser recht großschrittigen Derivatisierungen war es, eine aktive Verbindung zu erhalten, die dann weitergehend optimiert werden sollte. Das Einführen eines vicinalen Diols hat dabei jedoch zwei Stereozentren zur Folge. Während alle Derivate zunächst ausnahmslos R-konfiguriert waren, sollte im Weiteren dann auch der Frage nachgegangen werden, inwiefern die Stereochemie bei diesen Verbindungen von Bedeutung ist. Dazu sollte die Konfiguration an einem der C-Atome mit Hydroxylgruppe in die S-Konfiguration überführt werden. Das C-Atom in S-Konfiguration wurde in diesem Fall über ein Carbonsäureamid wiederum an ein aromatisches System gebunden (Abb. 32). Dabei wurde bei Verbindung 19 eine zusätzliche CH<sub>2</sub>-Gruppe (Phenyl vs. Benzyl) eingeschoben. Die Verknüpfung des C-Atoms in R-Konfiguration an das aromatische System erfolgte indessen über ein Imid (Verbindung 19, 21 & 22) oder Carbonsäurehydrazid (Verbindung 20). Bei den Imiden wurde ein Furanring in Analogie zum RNPA2000 gewählt, während es sich bei der Verbindung mit Carbonsäurehydrazid um ein *N*<sub>β</sub>-Methyl-*N*<sub>β</sub>-Phenyl-substituiertes Derivat handelte (Verbindung 20). Zudem wurde ein *N*-unsubstituiertes Carbonsäurehydrazid (Verbindung 23) getestet.

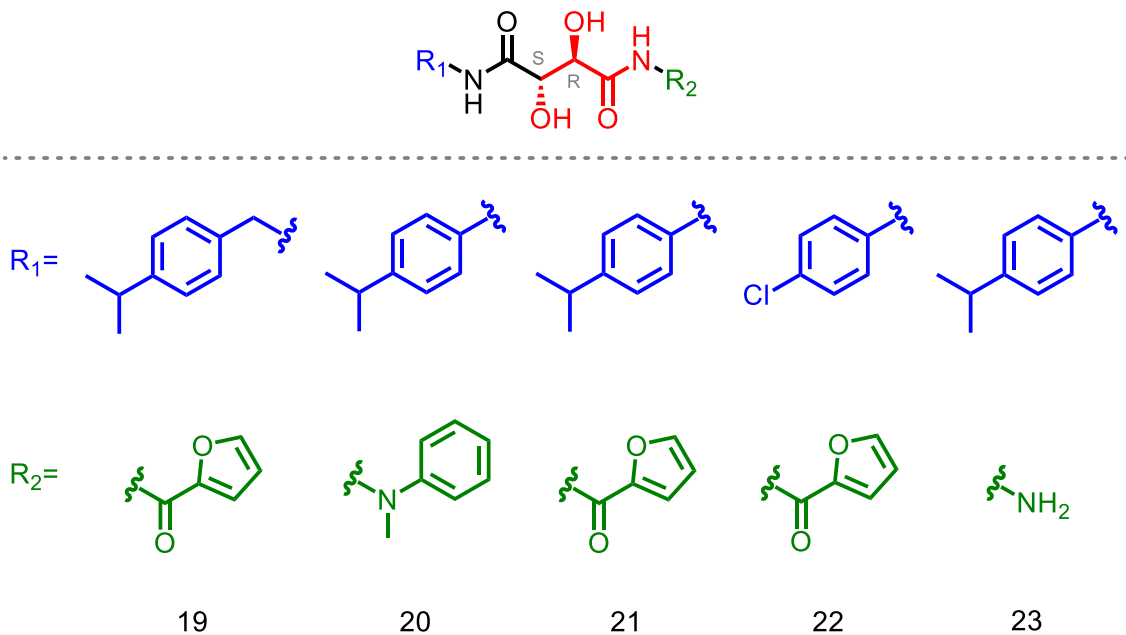


Abb. 32: 2,3-Dihydroxy-Succinamid-Derivate 19-23 mit verschiedenen Resten an N<sup>1</sup> und N<sup>4</sup>

Die Verbindungen mit zentralem vicinalen Diol konnten aufgrund der guten Wasserlöslichkeit allesamt bei 250 µM getestet werden. Die Testung ergab jedoch auch hier, dass keines der Derivate eine RNase P-Inhibition zeigte (siehe Anhang 5.2.1.1, Seite 249). Bei den Verbindungen 11, 13, 16 und 18 kam es sogar zu einer 20-40%igen Aktivierung.

Zusammenfassend wurden damit also insgesamt 23 RNPA2000-Derivate auf eine Hemmung der RNase P getestet. Bei diesen Verbindungen handelte es sich um fünf Derivate, bei denen der Thiosemicarbazid-Kern beibehalten wurde. Fünf weitere Derivate gingen vom RNPA2000-

Sauerstoff-Analogen mit zentralem Semicarbazid aus. Von der Thiosemicarbazid-Ausgangsstruktur wurde bei den 13 vicinalen Diolen noch weiter abgerückt. Die Testung aller Verbindungen erfolgte *in vitro* enzymkinetisch mit der *T. maritima* RNase P und zeigte für keines der Derivate eine signifikante Hemmung.

### RNPA3000 Derivate

Als eine weitere Ausgangsverbindung für Derivatisierungen wurde das Rhodanin RNPA3000 (Abb. 33) gewählt. Diese Verbindung entstammte demselben Hochdurchsatz-Screening wie RNPA2000, wurde *bis dato* aber nicht weitergehend von den Autoren charakterisiert bzw. derivatisiert (Eidem *et al.*, 2015). Für diese Verbindung ist eine schwache antibakterielle Aktivität gegenüber *S. aureus* beschrieben (MIC = 128 µg/mL) (Lounsbury, 2016). Ferner wurde ein IC<sub>50</sub>-Wert für die postulierte RnpA-vermittelte RNase-Aktivität von 15-20 µM gemessen (Dunman *et al.*, 2017). Effekte auf die prä-tRNA-Prozessierung *in vitro* wurden bisher hingegen nicht untersucht.

Für die Derivatisierung von RNPA3000 wurde das Grundgerüst des Rhodanins, welches am N-Atom mit Propionsäure substituiert ist, beibehalten. Dieses Grundgerüst wurde zunächst ohne weiteren Substituenten in der 5-Position dargestellt (Verbindung 24).

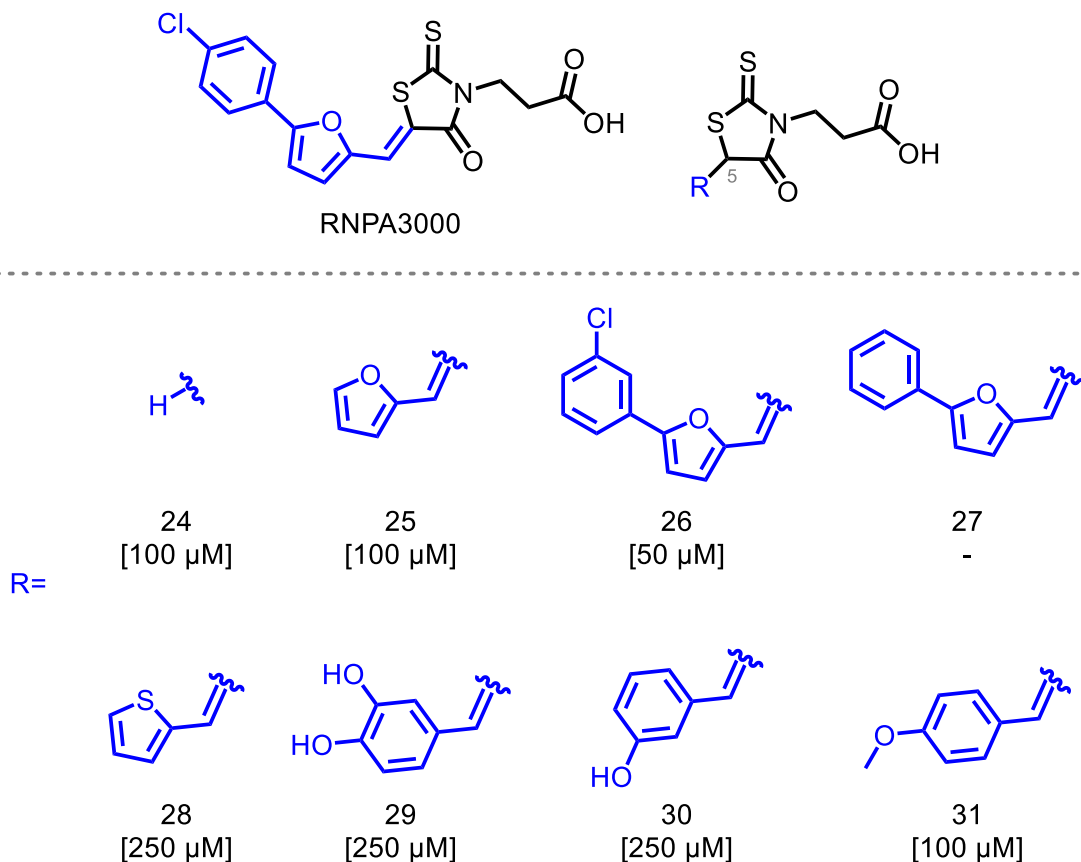


Abb. 33: Rhodanin-Derivate 24-31 mit einem Furanyl-, Thiophenyl- oder Phenyl-Substituenten in der 5-Position

Im nächsten Schritt wurden dann verschiedene Reste an der CH<sub>2</sub>-Gruppe des Rhodanins wie etwa eine 2-Furanylmethylen-Gruppe, vergleichbar zum RNPA3000, eingeführt (Verbindung 25). Diese wurde in der 5-Position des Furanrings weitergehend mit einem Phenyl- (Verbindung 27) bzw. einem *meta*-Chlorphenyl-Rest (Verbindung 26) versehen. Letztgenannte Verbindung unterscheidet sich somit lediglich in der Position des Chlor-Substituenten vom RNPA3000. Es folgte der Ersatz des Furanrings durch einen Thiophenring (Verbindung 28) oder einen 3,4-Dihydroxyphenyl-, 3-Hydroxyphenyl- bzw. einen 4-Methoxyphenyl-Rest (Verbindung 29-31; Benzyliden-Rhodanine).

Von diesen Strukturvarianten konnten aufgrund ihrer Löslichkeit lediglich die Verbindungen 28-30 bei einer Konzentration von 250 µM enzymkinetisch getestet werden, Verbindungen 24, 25 und 31 noch bei 100 µM. All jene Verbindungen waren bei der getesteten Konzentration jedoch bezüglich RNase P-Inhibition inaktiv (siehe Anhang 5.2.1.2, Seite 250). Vor allem bei den Biaryl-Derivaten (RNPA3000, Verbindungen 26 & 27) traten erhebliche Löslichkeitsprobleme auf, was sich unter anderem durch die Lipophilie des zusätzlichen Benzolrings erklären lassen könnte. Bei RNPA3000 und Verbindung 27 wurden keine enzymkinetischen Untersuchungen durchgeführt, da selbst bei einer Konzentration von 50 µM noch Präzipitation eintrat, wie unter dem Mikroskop beobachtet werden konnte. Bei Verbindung 26 konnten bei dieser Konzentration hingegen keine Präzipitate mehr beobachtet werden und eine enzymkinetische Messung zeigte eine Inhibition der *T. maritima* RNase P von ~35 %. Löslichkeitsprobleme bei dieser Verbindung können aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu RNPA3000 aber nicht vollständig ausgeschlossen werden. Denkbar ist, dass Präzipitate der Verbindung 26 für eine eindeutige Detektion mittels Mikroskop zu klein waren. Abschließend kann damit für keines der acht getesteten Rhodanine von einer spezifischen RNase P-Inhibition ausgegangen werden.

### Ir6Ac Derivate

Auch das Isoflavon Iriginolhexaacetat (Ir6Ac; Abb. 34) ist ein beschriebener RNase P-Inhibitor mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $\sim 0,8 \mu\text{M}$  für die *B. subtilis* RNase P, der in dieser Arbeit als dritter Ausgangspunkt für entsprechende Derivatisierungen diente (Liu *et al.*, 2014). Um zunächst zu eruieren, welcher Teil der Struktur für die RNase P-Inhibition essentiell ist, wurde Verbindung 32 als Fragment des Ir6Ac synthetisiert. Außerdem wurden andere bekannte Polyphenole wie das Flavon Chrysin und das Flavonol Quercetin getestet. Inwiefern die Acetoxy-Gruppen dabei von Relevanz sind, wurde nach Veresterung der OH-Gruppen im Chrysin mit Essigsäure untersucht (Verbindung 33).

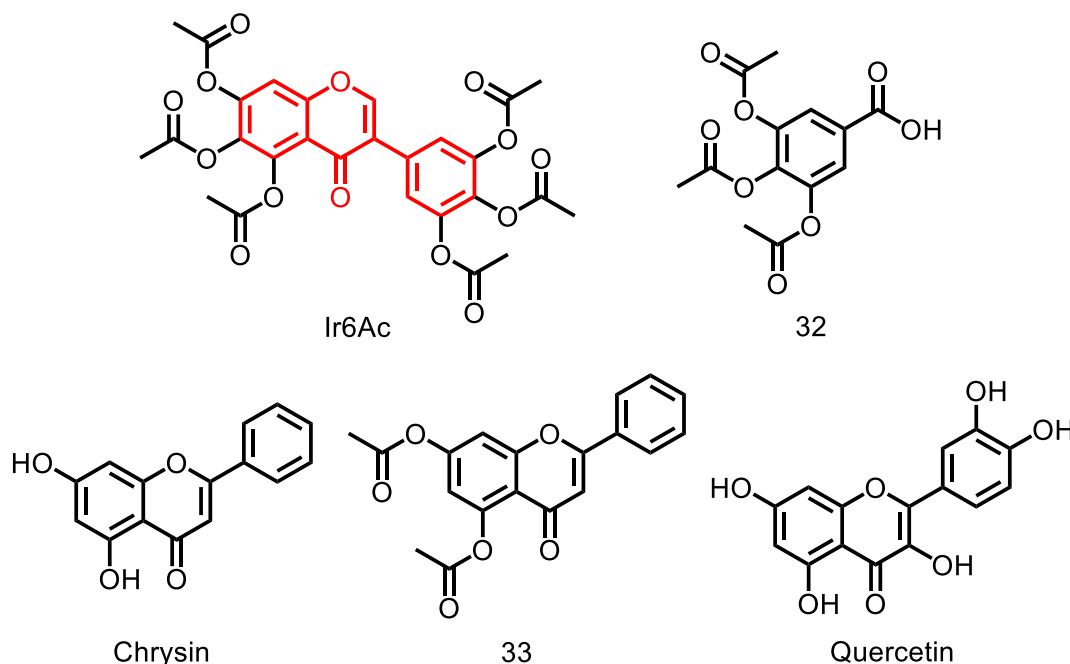


Abb. 34: Ir6Ac, Chrysin, Quercetin und die Derivate 32 sowie 33

In einem Liganden-basierten Design wurde die Isoflavon-Grundstruktur dahingehend verändert, dass der Benzo-kondensierte 4-Pyranonring geöffnet und die beiden aromatischen Ringsysteme über ein Carbonsäureamid miteinander verknüpft wurden. Der Abstand beider Aromaten blieb dabei verglichen mit Ir6Ac unverändert. Durch den partiellen Doppelbindungscharakter des Carbonsäureamids ist zudem weiterhin eine Planarität des Systems gegeben. Ein Vorteil dabei liegt darin, dass diese Grundstruktur keinen *Michael*-Akzeptor ( $\alpha$ -,  $\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindung) mehr aufweist, der ursächlich für Toxizitätsprobleme sein könnte. Der so erhaltene und in Abb. 35A gezeigte Grundkörper wurde durch Substitution der beiden Benzolringe wiederum derivatisiert. Zunächst wurde ein 3,4,5-Trimethoxy-Phenylrest auf Seiten des N-Atoms des Carbonsäureamids gewählt, der eine gewisse Ähnlichkeit zum 3,4,5-Triacetoxy-Phenylrest im Ir6Ac hinsichtlich der Fähigkeit, als Wasserstoffbrückenakzeptor zu fungieren, besitzt (Abb. 35B). Der Benzolring auf Seiten des Carbonsäureamid-Kohlenstoffatoms wurde indessen wie im Ir6Ac in *meta*- und *para*-

Position mit drei Acetoxy-Gruppen versehen (Verbindung 34). Weiterhin wurden dann auch an diesem Benzolring Methoxy- anstelle von Acetoxy-Substituenten eingeführt (Verbindung 35). Um zu untersuchen, inwieweit die Position der Substituenten am Ring relevant für eine etwaige Wirkung ist, wurde zudem eine Verbindung mit 2,3,4-Trimethoxy-Phenylrest (Verbindung 36) und ein Derivat mit unsubstituiertem Benzolring (Verbindung 37) sowie mit 4-Acetylphenyl-Rest (Verbindung 38) synthetisiert und getestet.

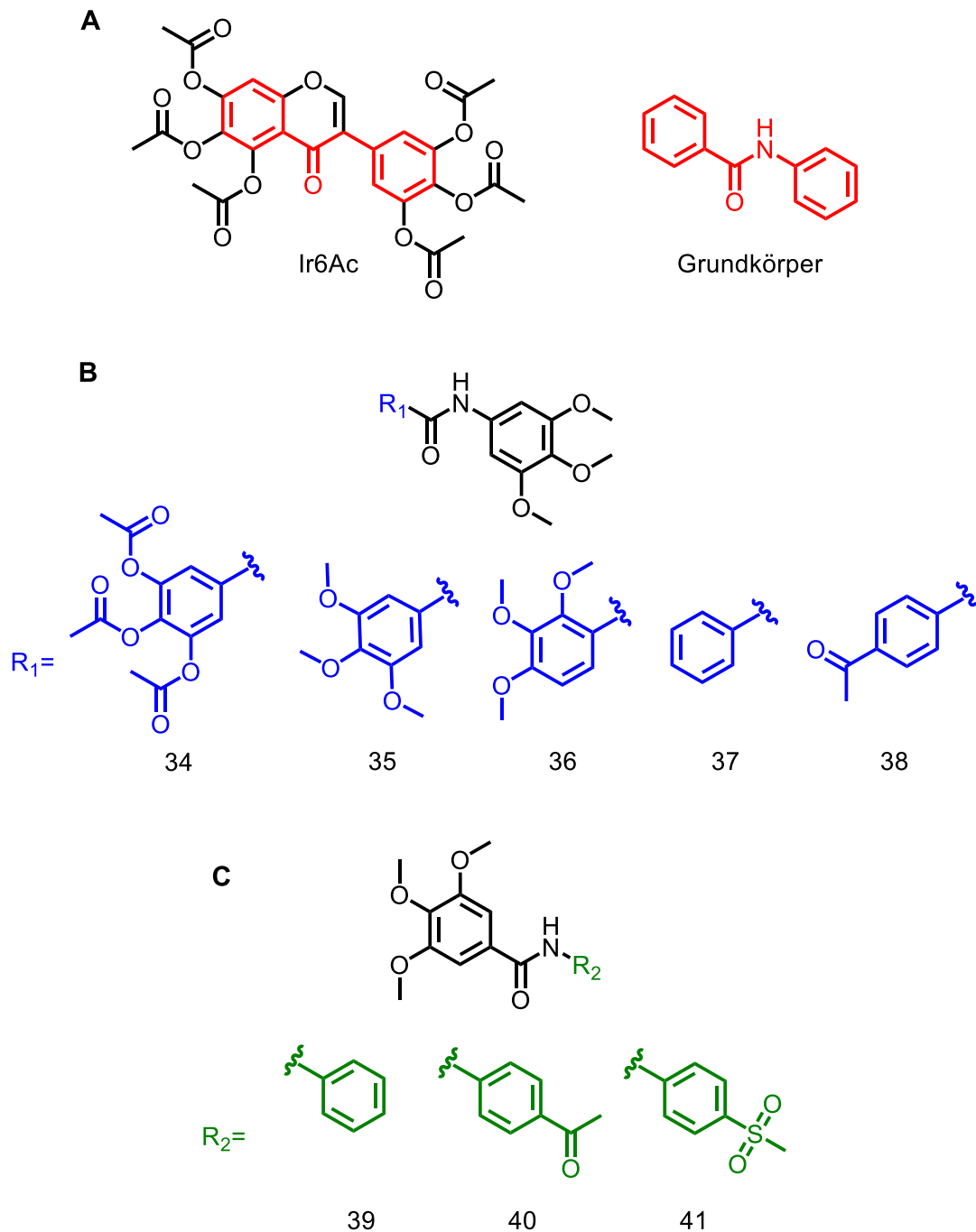


Abb. 35: *N*-Phenylbenzamide 34-41 nach Öffnung des 4-Pyranonrings von Ir6Ac

Im nächsten Schritt wurde der 3,4,5-Trimethoxyphenyl-Substituent am Carbonyl-Kohlenstoffatom beibehalten (Abb. 35C). Als Substituenten am Carbonsäureamid-Stickstoff

wurde sogleich eine Phenyl-, eine 4-Acetylphenyl- und eine 4-(Methylsulfonyl)phenyl-Gruppe getestet (Verbindung 39-41). Beide Substituenten am Benzolring können dabei als Wasserstoffbrückenakzeptoren entsprechende Wechselwirkungen eingehen. Zusätzlich zu diesen Verbindungen entstanden solche, die einen 4-Methoxyphenyl- oder einen 4-Hydroxyphenyl-Rest sowohl auf Seiten des Carbonyl-Kohlenstoffatoms als auch des N-Atoms des Carbonsäureamids besaßen (Verbindung 42 & 44). Auch wurde eine Phenyl-Gruppe mit einer 3,4-Dimethoxyphenyl- oder einer 3,5-Dimethoxyphenyl-Gruppe entsprechend der Abb. 36 kombiniert (Verbindung 43 & 45).

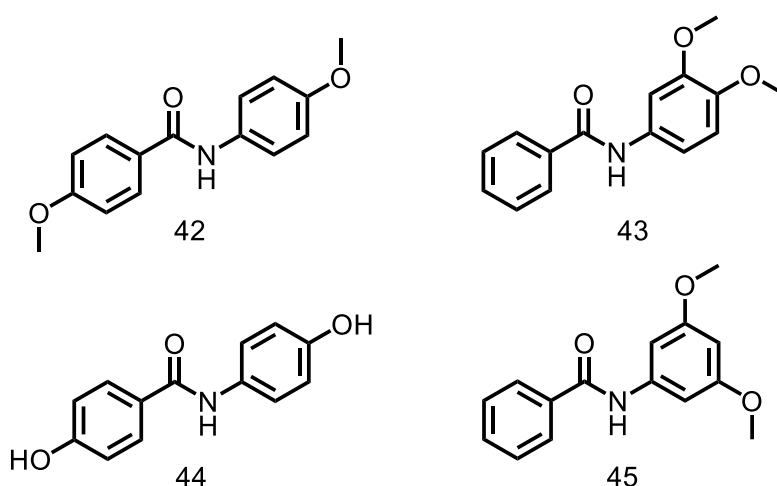
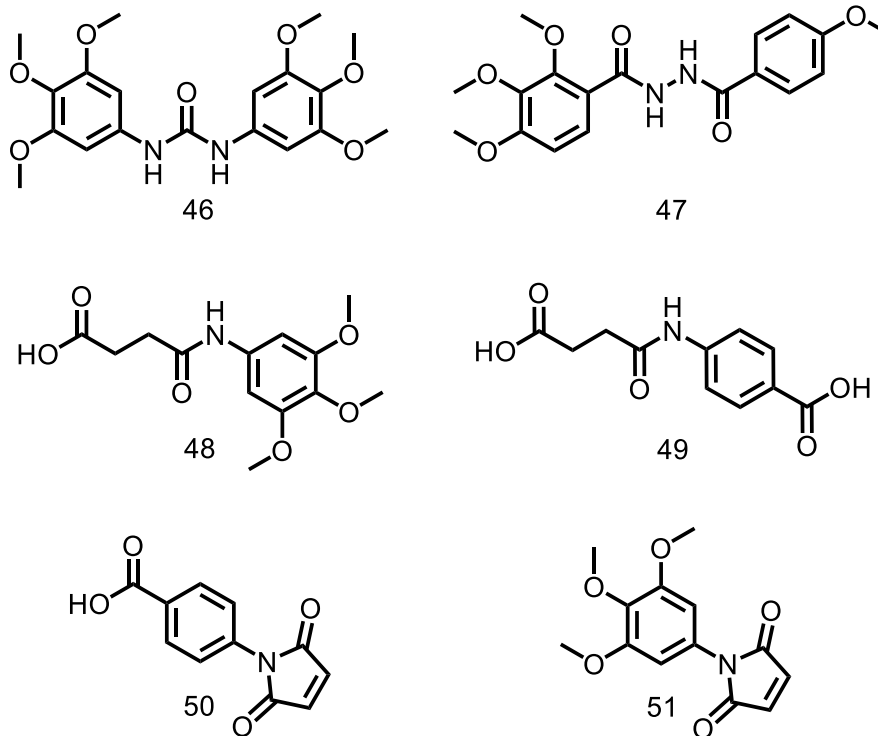


Abb. 36: *N*-Phenylbenzamid-Derivate 42-45 mit Hydroxy-, Methoxy- oder Dimethoxyphenyl-Rest

Neben der Verknüpfung beider Aromaten über ein Carbonsäureamid wurde auch ein Derivat mit Harnstoff- (Verbindung 46) und eines mit *N*-Acyl-Carbonsäurehydrazid-Grundgerüst (Verbindung 47) realisiert (Abb. 37). Durch diese Struktur motive wurde der Abstand der beiden Phenylreste zueinander zunehmend vergrößert. Im Folgenden wurde dann untersucht, ob die beiden aromatischen Systeme für die RNase P-Inhibition überhaupt relevant sind. Dazu wurde die Ausgangsverbindung noch stärker modifiziert. In diesem Zusammenhang entstanden die Verbindungen 48-51 mit Bernsteinsäure-mono-Amid- (Verbindung 48 & 49) und Maleinsäureimid-Teilgerüst (Verbindung 50 & 51).



**Abb. 37: Verbindungen 46-51 mit Harnstoff-, N-Acyl-Carbonsäurehydrazid-, Bernsteinsäure-mono-Amid- oder Maleinsäureimid-Teilgerüst**

Um das antibakterielle Potential der Verbindungen zu eruieren, erfolgte die Testung der beschriebenen Ir6Ac-Derivate nicht enzymkinetisch, sondern über den sogenannten Hemmhofstest. Dies bietet den Vorteil, dass Faktoren wie beispielsweise das Überwinden der bakteriellen Zellwand oder die zelluläre Stabilität miterfasst werden. Bei kinetischen Testungen am Enzym *in vitro* werden solche Parameter außer Acht gelassen, können im Weiteren dann jedoch zum Ausschluss von Verbindungen führen, wenn diese die Zellwand nicht überwinden können oder direkt in der Zelle metabolisiert und dadurch inaktiviert werden. Weitere Vorteile sind zudem, dass mehr Verbindungen in kürzester Zeit getestet werden konnten und die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Löslichkeitsprobleme im Rahmen der Enzymkinetik eher von untergeordneter Bedeutung waren.

Für den Hemmhofstest wurde die mit einer Übernachtskultur angeimpfte Vorkultur so lange bei 37 °C inkubiert, bis sich die Bakterien in der stationären Wachstumsphase befanden. Nach entsprechender Verdünnung der Bakterienkultur zum Erhalt eines Zellrasens wurde diese auf eine Agarplatte ausplattiert, vier Filter pro Platte platziert und 10 µL der DMSO-Stammlösung direkt auf die 6 mm großen Filter gegeben. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C, sodass die Platte gleichmäßig dicht bewachsen war. Die Durchmesser der entstandenen Hemmhöfe um die Filter herum wurden schließlich mit einem Lineal vermessen. Für diese Testungen wurde der *E. coli* AS19-Stamm verwendet, der aufgrund eines Lipopolysaccharid-Defekts keine intakte äußere Membran hat und somit eine erhöhte Permeabilität aufweist (Sekiguchi & Iida, 1967). Entsprechende Kontrollversuche wurden mit Ampicillin und Chloramphenicol durchgeführt (Abb. 38A). Im Fall von Ampicillin wurden 10 µg

auf den Filter gegeben. Dies entspricht 10  $\mu\text{L}$  einer 2,9 mM Lösung. Für die zu testenden Verbindungen wurde diese Menge im Regelfall um den Faktor  $\sim 17$  erhöht und 10  $\mu\text{L}$  einer 50 mM Stammlösung auf die Filter gegeben. Nur für die Verbindungen 33 und 51 wurde hiervon abgewichen, da bedingt durch die Löslichkeit nur eine 25 mM Stammlösung angesetzt werden konnte. Für diese beiden Verbindungen wurden stattdessen 10  $\mu\text{L}$  der 25 mM Stammlösung auf die Filter pipettiert. Für den Großteil der Verbindungen konnte kein antibakterieller Effekt festgestellt werden (siehe Anhang 5.2.2.1, Seite 257). Schwache Effekte wurden für die Carbonsäureamide 39 und 44, Quercetin sowie für die beiden Maleinsäureimid-Derivate beobachtet (Abb. 38B).

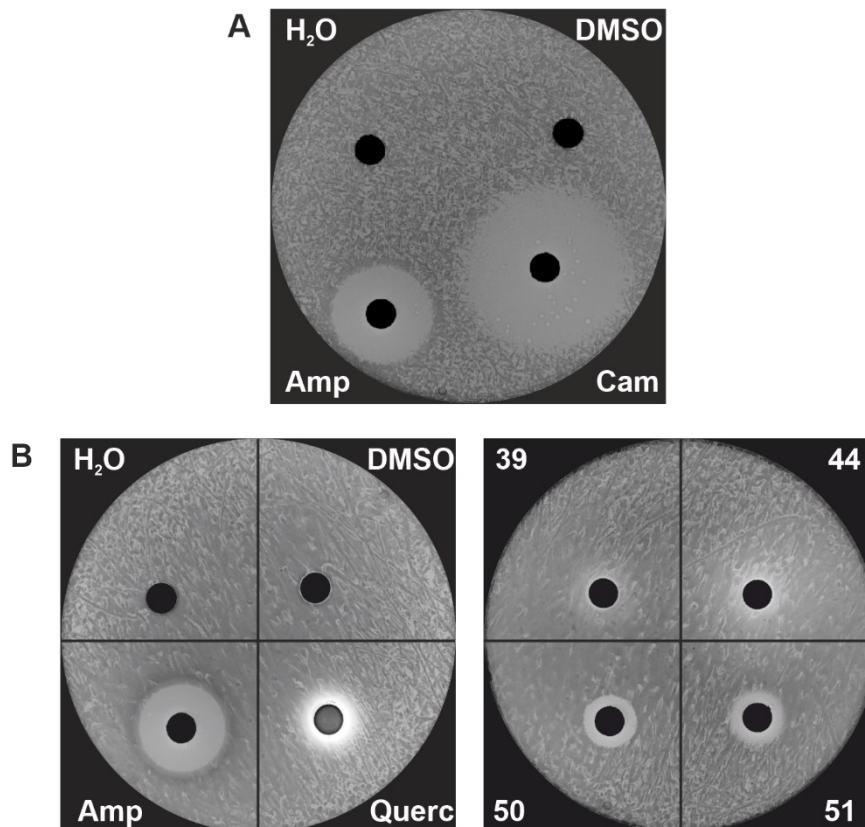


Abb. 38: Hemmhofest der Ir6Ac-Derivate

(A) Agarplatte mit Kontrollen. Je 10  $\mu\text{L}$  der Referenzsubstanzen wurden auf die 6 mm Filter pipettiert. Dabei wurden 10  $\mu\text{g}$  ( $\triangleq$  10  $\mu\text{L}$  einer 2,9 mM Lösung) Ampicillin (Amp) und 30  $\mu\text{g}$  ( $\triangleq$  10  $\mu\text{L}$  einer 9,3 mM Lösung) Chloramphenicol (Cam) eingesetzt. (B) Hemmhöfe der getesteten Verbindungen. Für Ampicillin wurden wie unter (A) beschrieben 10  $\mu\text{g}$  eingesetzt, für die Testverbindungen 10  $\mu\text{L}$  einer 50 mM Lösung bzw. 10  $\mu\text{L}$  einer 25 mM Lösung im Falle von Verbindung 51. Querc, Quercetin.

Im nächsten Schritt wurden die Verbindungen 39, 44, 50 und 51 bei einer Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  in der Enzymkinetik getestet. Dabei zeigte sich, dass keines der Derivate die *T. maritima* RNase P inhibierte (siehe Anhang 5.2.1.3, Seite 251). Somit sind die beobachteten antibakteriellen Effekte nicht auf eine Inhibition der RNase P-Enzymaktivität zurückzuführen. Insbesondere bei Verbindung 44 mit zwei Phenolsubstituenten ist somit vielmehr von toxischen Effekten auszugehen.



Die Ergebnisse der Derivate des Iridinolhexaacetats lassen sich wie folgt zusammenfassen: Zunächst wurden vier Derivate getestet, die ebenfalls den Polyphenolen zuzuordnen sind bzw. Fragmente dieser darstellen, aber anstelle eines Isoflavon-Grundkörpers ein Flavon bzw. Flavonol besaßen. Im Weiteren wurde dann versucht durch den Austausch des Isoflavons gegen ein *N*-Phenylbenzamid ähnlich wirksame Verbindungen zu finden, die synthetisch einfacher zugänglich sind. In diesem Kontext entstanden letztlich insgesamt zwölf Derivate. Neben der *N*-Phenylbenzamid-Grundstruktur wurden weitere sechs Verbindungen mit umfangreichen Modifikationen zum Ersatz des Isoflavons synthetisiert. Die Testung der insgesamt 22 Derivate erfolgte über den Hemmhoftest mit dem *E. coli* AS19-Stamm, der aufgrund eines Lipopolysaccharid-Defekts eine erhöhte Zellpermeabilität aufweist (Sekiguchi & Iida, 1967). Für Quercetin, zwei *N*-Phenylbenzamid-Derivate sowie zwei Maleinsäureimid-Derivate wurden dabei schwache, antibakterielle Effekte beobachtet. Allerdings zeigten diese Verbindungen keine Hemmung der *T. maritima* RNase P *in vitro*.

Parallel zu den Testungen der in diesem Kapitel beschriebenen, neuartigen Derivate sollten die Ausgangsverbindungen zudem weitergehend charakterisiert und analysiert werden. Ziel hierbei war es zu klären, ob die Unwirksamkeit der getesteten Derivate auf die Ausgangsverbindungen selbst zurückzuführen ist.

#### 4.1.2 Untersuchungen zu den publizierten RNase P-Inhibitoren

Während initialer Testungen von RNPA2000 bei einer Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  wurden Löslichkeitsprobleme in Form von Trübungen des Enzymkinetik-Ansatzes beobachtet. Diese Beobachtungen legten die Vermutung nahe, dass die Verbindung RNPA2000 anstelle einer spezifischen Inhibition des bakteriellen RNase P-Enzyms nur eine Proteinaggregation induziert. Dieser Vermutung wurde für die Verbindung RNPA2000 nachgegangen und entsprechender Sachverhalt sollte auch für die Verbindungen Ir6Ac und Purpurin geklärt werden. Die Ergebnisse dieser Studien sind der nachstehenden Publikation zu entnehmen und werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Protein-Aggregatoren gehören zu den sogenannten *Pan Assay Interference Compounds* (PAINS), die vor allem als Hits aus *High-throughput Screenings* oder dem virtuellen *Screening* hervorgehen. Diese Verbindungen rufen einen gewünschten Effekt hervor. Jedoch beruht dieser nicht auf der spezifischen Inhibition eines Enzyms, sondern vielmehr auf einer unspezifischen Wirkung. Die Verbindungen, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen, können zum einen mit dem *Target* unspezifische Interaktionen eingehen, indem sie beispielsweise Proteine denaturieren oder über eine entsprechende Redox-Aktivität das Enzym modifizieren (Abb. 39). Zum anderen sind Interaktionen der zu testenden Substanz mit anderen Komponenten des Assays möglich, z.B. Interferenz mit dem Fluoreszenzsignal durch Lichtabsorption oder Inhibition durch Komplexbildung von essentiellen Metallionen.

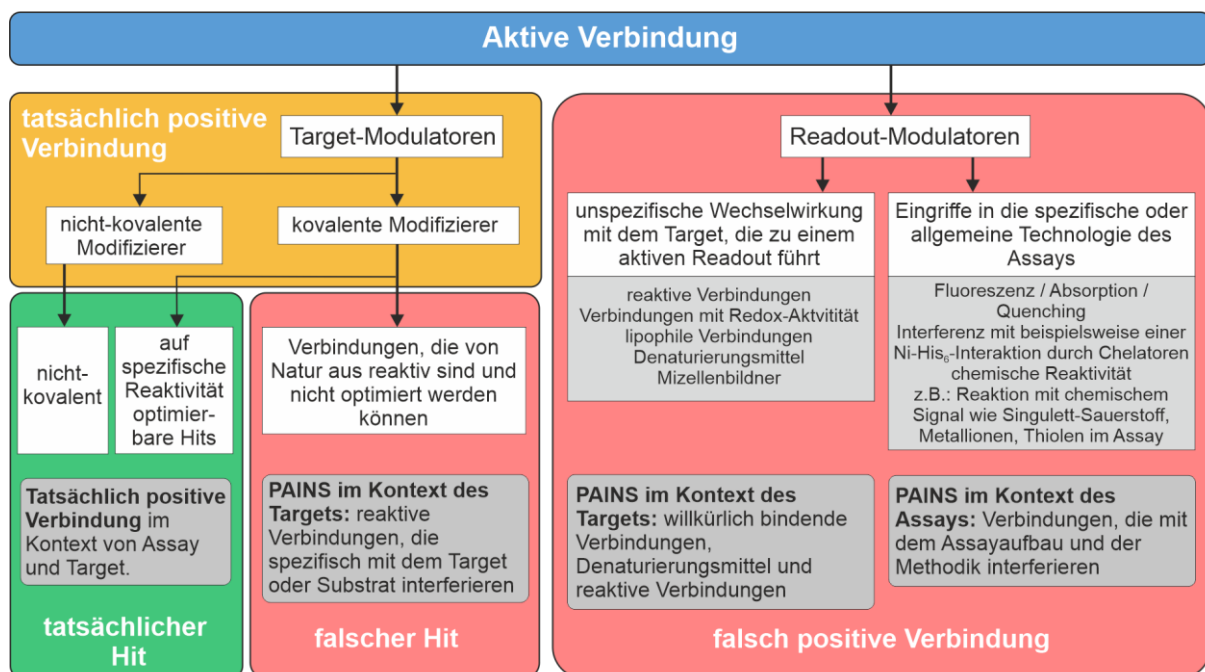


Abb. 39: *Pan-Assay Interference Compounds*

Zugrundeliegende Mechanismen der PAINS. In den roten Kästen sind all jene Verbindungen, die zu den PAINS zählen, aufgeführt. Modifiziert nach Baell & Nissink, 2018.

Demgegenüber stehen Verbindungen, die zu einem tatsächlich positiven Ergebnis führen. Kritisch hierbei wiederum sind Verbindungen, die das Zielprotein kovalent modifizieren wie beispielsweise *Michael*-Akzeptoren. Diese Verbindungen können im Rahmen von Studien zu Struktur-Aktivitäts-Beziehungen kaum optimiert werden und werden deswegen als falsche Hits bezeichnet (Baell & Nissink, 2018).

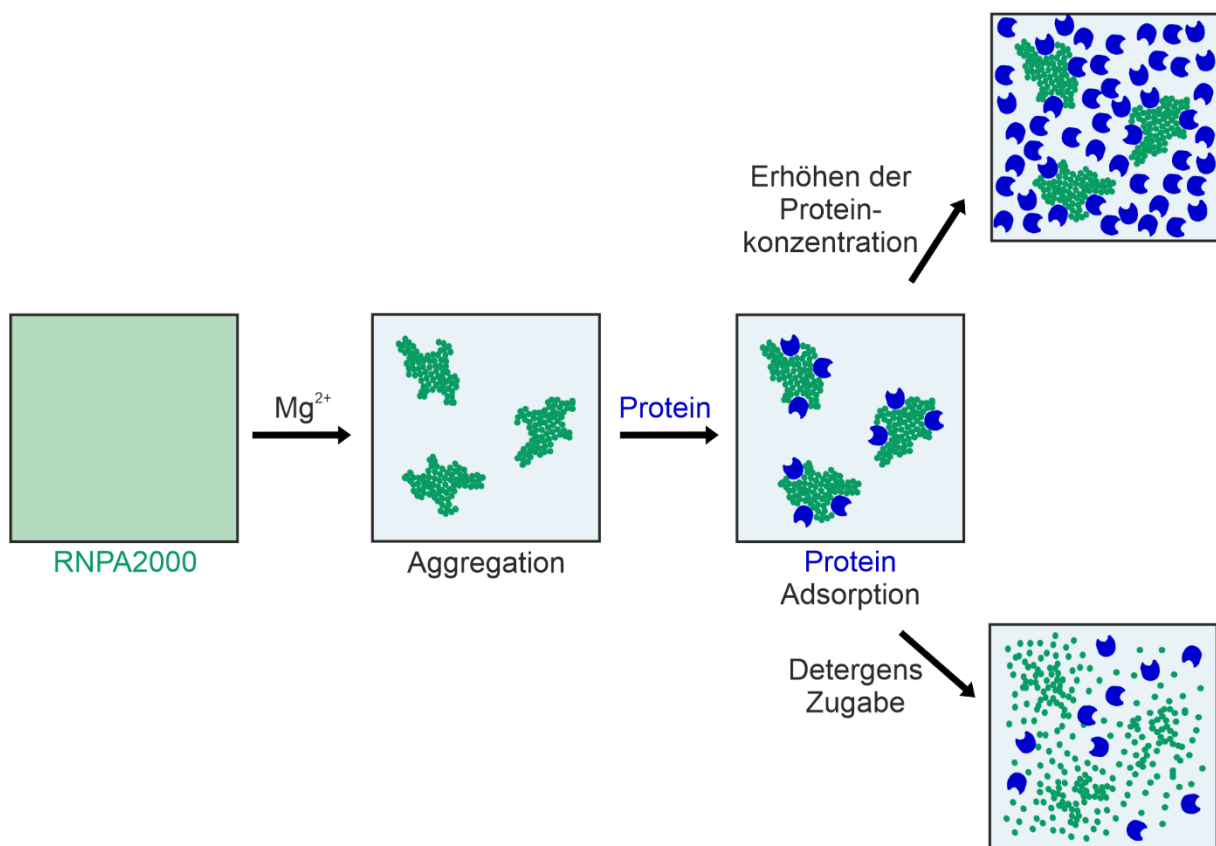
Insbesondere ist die durch Kleinmoleküle induzierte Proteinaggregation eine Hauptquelle für falsch-positive Ergebnisse (McGovern *et al.*, 2002; Sassano *et al.*, 2013; Aldrich *et al.*, 2017; Viviani *et al.*, 2018). Bei der Proteinaggregation wurde postuliert, dass die *Target*-Proteine an die Aggregate der entsprechenden Kleinmoleküle adsorbieren (Coan & Shoichet, 2008). Diese Proteinadsorption ist äußerst unspezifisch, sodass eine Vielzahl von Proteinen betroffen ist und in ihrer Funktion beeinträchtigt wird. Der Funktionsverlust der Proteine wird vermutlich neben der Tatsache, dass sich diese nicht mehr in Lösung befinden, auch durch eine partielle Denaturierung der Proteine verursacht (Coan *et al.*, 2009). Um PAINS möglichst schnell identifizieren zu können, wurden entsprechende computergestützte Filter, wie etwa der *Aggregator Advisor*, entwickelt, die ursächliche Struktur motive erkennen (Irwin *et al.*, 2015). Nichtsdestotrotz sind experimentelle Analysen zur Identifikation von Protein-Aggregatoren unerlässlich.

### **RNPA2000**

Aufgrund der beobachteten Löslichkeitsprobleme wurde die Löslichkeit von RNPA2000 zunächst unter dem Mikroskop analysiert und mittels HPLC bestimmt. Hierbei konnte die bereits publizierte und durchaus akzeptable Wasserlöslichkeit (2 % DMSO, PBS-Puffer) von ~200 µM bestätigt werden. Jedoch sinkt die Löslichkeit um Faktor ~10 durch die Zugabe von Magnesiumchlorid, was eine Komplexbildung von Metallionen vermuten lässt (Abb. 40). Demzufolge liegt der bestimmte IC<sub>50</sub>-Wert von ~140 µM oberhalb der Löslichkeitsgrenze in dem von den Autoren für die Enzymkinetik verwendeten System (25 µM in Tris-Puffer, 2 % DMSO und 5 mM MgCl<sub>2</sub>) (Eidem *et al.*, 2015). Während der Enzymkinetik-Experimente war also ein Teil des RNPA2000 aggregiert bzw. ausgefallen. Da es sich bei der RNase P um eine Metallonuklease handelt, besteht jedoch nicht die Möglichkeit, die Experimente unter Ausschluss von Metallionen zur Verbesserung der Löslichkeit im wässrigen Medium durchzuführen.

Ob durch das Ausfallen des RNPA2000 tatsächlich eine Proteinaggregation induziert wurde, wurde anhand von drei in der Literatur beschriebenen experimentellen Ansätzen untersucht. Erstens kann durch die Zugabe eines Grenzflächen-aktiven Detergens, wie Triton X-100, die Aggregation verhindert werden, sodass die beobachteten Effekte bei einem Protein-Aggregator geschwächt werden sollten (Abb. 40) (McGovern *et al.*, 2003; Feng & Shoichet, 2006; Aldrich *et al.*, 2017; Ehlert *et al.*, 2017; Baell & Nissink, 2018). Bei einem tatsächlichen Inhibitor hingegen sollte die Detergens-Zugabe keinen Einfluss auf die inhibitorischen Effekte

haben. Zweitens ist für Aggregatoren eine hohe Sensitivität gegenüber der Enzymkonzentration beschrieben (Feng *et al.*, 2005; Giannetti *et al.*, 2008; Owen *et al.*, 2012; Aldrich *et al.*, 2017; Viviani *et al.*, 2018). Das Verhältnis von Inhibitor zu Enzym betrug in den Experimenten ~3000:1. Das Verhältnis von Kleinmolekül-Aggregaten zu Enzymmolekülen hingegen ist wesentlich geringer, sodass durch eine Erhöhung der Enzymkonzentration die Adsorption vom Enzym an die Aggregate leicht gesättigt werden kann. Folglich steigt der Anteil an unbeeinflusstem Enzym und die inhibitorischen Effekt werden vermindert (Abb. 40). Sowohl die Zugabe von Triton X-100 als auch die Erhöhung der RnpA-Konzentration um Faktor ~10 führten zu einem Verlust der Inhibition durch RNPA2000, wohingegen die Inhibition durch Neomycin B erhalten blieb.



**Abb. 40: Schematische Darstellung der Protein-Aggregation**

Links ist eine RNPA2000-Lösung ohne  $Mg^{2+}$ -Ionen dargestellt. Da RNPA2000 (grün) gelöst ist, ist diese Lösung grün eingefärbt. Durch die Zugabe von  $Mg^{2+}$ -Ionen (als Pfeil gezeichnet) kommt es vermutlich zur Komplexbildung, was die Aggregation (grün) zur Folge hat. Da nur noch kleine Mengen an RNPA2000 in Lösung verbleiben, ist die Lösung nun nicht mehr grün dargestellt. Bei Protein-Zugabe adsorbieren die Proteinmoleküle (blau) an die Oberfläche der RNPA2000-Aggregate. Durch das Erhöhen der Protein-Konzentration um einen Faktor von beispielsweise 10 kommt es zu einer Sättigung der Adsorption an die RNPA2000-Aggregate, sodass sich der Großteil der Proteine funktional in Lösung befindet (oben). Durch das Hinzufügen eines Detergens wird indessen das Auflösen der Aggregate induziert, sodass auch hier Proteine letztlich wieder funktional in Lösung sind (unten).

In dem dritten Experiment, der Co-Sedimentation, konnte gezeigt werden, dass das RnpA-Protein tatsächlich in Anwesenheit von RNPA2000 ausfällt, und zwar nur in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen. Beim Testen von RNPA2000, dessen Sauerstoff-Analogon NL20 und des Benzofuran-Derivats NL48 unter löslichen Bedingungen (10 % DMSO) konnten sowohl für die

*T. maritima* RNase P, welche für die Kontrollversuche verwendet wurde, als auch für das *S. aureus* Enzym, welches in vorherigen Arbeiten Verwendung fand (Eidem *et al.*, 2015; Lounsbury, 2016; Lounsbury *et al.*, 2018), keinerlei Effekte beobachtet werden. Zusammenfassend konnte damit gezeigt werden, dass die publizierte RNase P-Inhibition *in vitro* auf eine unspezifische Protein-Aggregation zurückzuführen ist, die vermutlich durch eine Metallionen-Komplexierung von RNPA2000 verursacht wird (Abb. 40). Um die Spezifität der antibakteriellen Effekte zu untersuchen, wurde der *B. subtilis* d7-Stamm, bei dem das *rnpA*-Gen unter Kontrolle eines Xylose-Promotors steht, verwendet (Gößringer *et al.*, 2006). Zunächst konnte mit der Protein-basierten RNase P aus *Arabidopsis thaliana* (PRORP3) die ansonsten letale Depletion des RnpA-Proteins komplementiert werden. RNPA2000 führte im Hemmhofstest mit diesem Komplementationsstamm zu vergleichbaren antibakteriellen Effekten wie mit dem Kontrollstamm mit Plasmid-kodiertem *B. subtilis* RnpA, sodass die Effekte von RNPA2000 nicht RnpA-abhängig sind, sondern eher unspezifischer oder toxischer Natur. Wie in der Einleitung dieser Arbeit erläutert, wurde RNPA2000 als ein Inhibitor der RnpA-vermittelten RNase-Aktivität beschrieben (Eidem *et al.*, 2015). Ob das RnpA-Protein allein ohne P RNA eine grundsätzliche RNase-Funktion ausführt, ist jedoch fraglich, da nach Inkubation von RnpA mit Spuren der prä-tRNA über eine Stunde keine Degradation festgestellt wurde.

### **Ir6Ac**

Für das Isoflavon Iroquinolhexaacetat wurde zunächst eine computergestützte Vorhersage durch den *Aggregator Advisor* (Irwin *et al.*, 2015) durchgeführt mit dem Ergebnis, dass diese Verbindung eine gewisse Ähnlichkeit zu einer Verbindung aufweist, die bereits in der Literatur als Aggregator beschrieben ist. Zudem sind Verbindungen mit Isoflavon-Grundgerüst wie beispielsweise Genistein als Aggregatoren bekannt (Sassano *et al.*, 2013; Ingólfsson *et al.*, 2014). Um zu validieren, ob dies auch der Fall für Ir6Ac ist, wurde die Enzymkonzentration variiert. Das Erhöhen der Holoenzymkonzentration (P RNA und RnpA) sowie ausschließlich der RnpA-Konzentration führte zu einem Inhibitionsverlust, was auf die für Protein-Aggregatoren typische Sensitivität gegenüber der Enzymkonzentration hindeutet. Folglich ist die Inhibition durch Ir6Ac auch primär auf eine Protein-Aggregation zurückzuführen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Inhibition Protein-abhängig ist, da in der RNA-alien Reaktion keine Inhibition beobachtet wurde.

### **Purpurin**

Bei dem 1,2,4-Trihydroxyanthrachinon Purpurin wurden ebenfalls Löslichkeitsprobleme während mikroskopischer Analysen bei einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  beobachtet. Des Weiteren konnte im Co-Sedimentations-Experiment RnpA-Protein im Pellet mit 100  $\mu\text{M}$  Purpurin nachgewiesen werden, was dem  $\text{IC}_{50}$ -Wert mit verwendetem Minihelix-Substrat, bestehend aus einer 3 bp Helix mit 5'-Flanke und 3'-CCA-Ende, entspricht

(Madrigo-Carrillo *et al.*, 2019). Somit scheint es sich auch bei der Inhibition dieser Verbindung um Protein-Aggregation zu handeln. Dies steht im Einklang damit, dass Chinone als eine problematische Gruppe der PAINS beschrieben sind (Baell & Holloway, 2010; Yang *et al.*, 2016; Baell & Nissink, 2018). Nichtsdestotrotz waren entsprechende Kristall-*Soaking*-Experimente mit Purpurin erfolgreich und ermittelten eine Bindetasche dessen in der Region, in der auch die 5'-Flanke des Substrats bindet. Fraglich bleibt jedoch, ob die beobachteten Effekte tatsächlich durch eine spezifische Bindung von Purpurin oder doch durch Protein-Aggregation hervorgerufen wurden.


Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit aufgedeckt werden, dass die drei Verbindungen RNPA2000, Ir6Ac und Purpurin die Bildung von Protein-Aggregaten induzieren anstatt als spezifische Inhibitoren zu wirken. Hiermit lässt sich auch erklären, warum aus den Derivatisierungs-Reihen von RNPA2000 und Ir6Ac ausschließlich inaktive Verbindungen hervorgingen. Durch Erhöhen des DMSO-Gehalts auf 10 % wurden keine Aggregations-Effekte mehr festgestellt, da sich die Verbindungen hier vermutlich tatsächlich vollständig in Lösung befanden. Somit hängt die Unwirksamkeit der Verbindungen nicht mit einem Aktivitätsverlust durch die Derivatisierung zusammen, sondern ist darauf zurückzuführen, dass von unspezifischen RNase P-Inhibitoren ausgegangen wurde.

Das Rhodanin RNPA3000 ist nicht Teil der nachstehenden Publikation, da es in der Literatur kaum beschrieben ist (Eidem *et al.*, 2015). Aber auch bei dieser Verbindung wurden Löslichkeitsprobleme festgestellt (Präzipitation bei 50 µM unter dem Mikroskop; siehe Seite 93). Zudem sind Rhodanine in der Literatur ebenfalls als PAINS beschrieben (Baell, 2010; Baell & Nissink, 2018). Aus diesem Grund wurde Verbindung 26, die initial eine 35%ige Inhibition zeigte, nicht weiterverfolgt. Wenngleich es auch hier mit Epalrestat eine Verbindung gibt, die den Weg zum Wirkstoff geschafft hat. Wie in der Diskussion der nachstehenden Publikation erläutert, gestaltet es sich jedoch durchaus schwierig, solche Stoffklassen in einem *Target*-basierten Ansatz zielführend zu bearbeiten.

Da die in der Publikation dargestellten Experimente parallel zu den Testungen der in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Derivate durchgeführt wurden und sich die genannten Probleme relativ schnell abzeichneten, wurden insgesamt nur wenige Derivate synthetisiert und die Verbindungen, die initial eine schwache Inhibition zeigten (wie beispielsweise Verbindung 6), nicht mehr einer vollständigen Enzymkinetik unterzogen. Weiterführende Derivatisierungen wurden letztlich nicht fortgesetzt.



# RNase P Inhibitors Identified as Aggregators

Isabell Schencking,<sup>a</sup> Eva M. Schäfer,<sup>a</sup> J. H. William Scanlan,<sup>a,b</sup> Benjamin M. Wenzel,<sup>a</sup> Rolf E. Emmerich,<sup>a</sup> Torsten Steinmetzer,<sup>a</sup> Wibke E. Diederich,<sup>a,b</sup> Martin Schlitzer,<sup>a</sup>  Roland K. Hartmann<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany

<sup>b</sup>Zentrum für Tumor- und Immunbiologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany

**ABSTRACT** RNase P is an essential enzyme responsible for tRNA 5'-end maturation. In most bacteria, the enzyme is a ribonucleoprotein consisting of a catalytic RNA subunit and a small protein cofactor termed RnpA. Several studies have reported small-molecule inhibitors directed against bacterial RNase P that were identified by high-throughput screenings. Using the bacterial RNase P enzymes from *Thermotoga maritima*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus* as model systems, we found that such compounds, including RNPA2000 (and its derivatives), iriginol hexaacetate, and purpurin, induce the formation of insoluble aggregates of RnpA rather than acting as specific inhibitors. In the case of RNPA2000, aggregation was induced by Mg<sup>2+</sup> ions. These findings were deduced from solubility analyses by microscopy and high-performance liquid chromatography (HPLC), RnpA-inhibitor co-pulldown experiments, detergent addition, and RnpA titrations in enzyme activity assays. Finally, we used a *B. subtilis* RNase P depletion strain, whose lethal phenotype could be rescued by a protein-only RNase P of plant origin, for inhibition zone analyses on agar plates. These cell-based experiments argued against RNase P-specific inhibition of bacterial growth by RNPA2000. We were also unable to confirm the previously reported nonspecific RNase activity of *S. aureus* RnpA itself. Our results indicate that high-throughput screenings searching for bacterial RNase P inhibitors are prone to the identification of “false positives” that are also termed pan-assay interference compounds (PAINS).

**KEYWORDS** RNase P inhibitors, RnpA protein subunit, bacterial RNase P, protein aggregators

**R**Nase P is responsible for the endonucleolytic removal of 5' leader sequences from tRNA precursors (1, 2). The vast majority of known bacteria encode an RNA-based enzyme consisting of a catalytic RNA subunit, ~300 to 400 nucleotides (nt) in length, and a single small protein cofactor of ~13 kDa. Both subunits are essential *in vivo* (3–5). Human cells harbor an RNA-based enzyme with 10 protein subunits in the cell nucleus and a protein-only RNase P in mitochondria (6–8). Both human enzymes lack substantial structural similarities to the bacterial enzyme, a favorable precondition for the development of new antibiotics that selectively inhibit bacterial RNase P enzymes. Beyond this, RNase P fulfils the key condition of belonging to the ~7% of bacterial genes that are indispensable for the survival of bacteria (9, 10).

Specific antisense oligonucleotides were demonstrated to inhibit the catalytic RNA subunit (P RNA) of bacterial RNase P (11–13), but their efficient uptake by bacterial cells remains a major hurdle for therapeutic applications. On the other hand, potential small-molecule inhibitors of P RNA, such as aminoglycosides (14–16) and phenothiazine derivatives (17), showed insufficient P RNA specificity. Apart from targeting the catalytic P RNA subunit, there have been attempts to address the protein subunit (termed RnpA or P protein) of bacterial RNase P by small-molecule inhibitors.

Fierke and coworkers identified iriginol hexaacetate (Ir6Ac; see Table S1 in the supplemental material) as an inhibitor of *Bacillus subtilis* RNase P with a 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of ~0.8 μM (18). As there was no evidence for binding of the compound to the

**Citation** Schencking I, Schäfer EM, Scanlan JHW, Wenzel BM, Emmerich RE, Steinmetzer T, Diederich WE, Schlitzer M, Hartmann RK. 2021. RNase P inhibitors identified as aggregators. *Antimicrob Agents Chemother* 65:e00300-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.00300-21>.

**Copyright** © 2021 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Roland K. Hartmann, [roland.hartmann@staff.uni-marburg.de](mailto:roland.hartmann@staff.uni-marburg.de).

**Received** 15 February 2021

**Returned for modification** 20 March 2021

**Accepted** 1 May 2021

**Accepted manuscript posted online** 10 May 2021

**Published** 16 July 2021

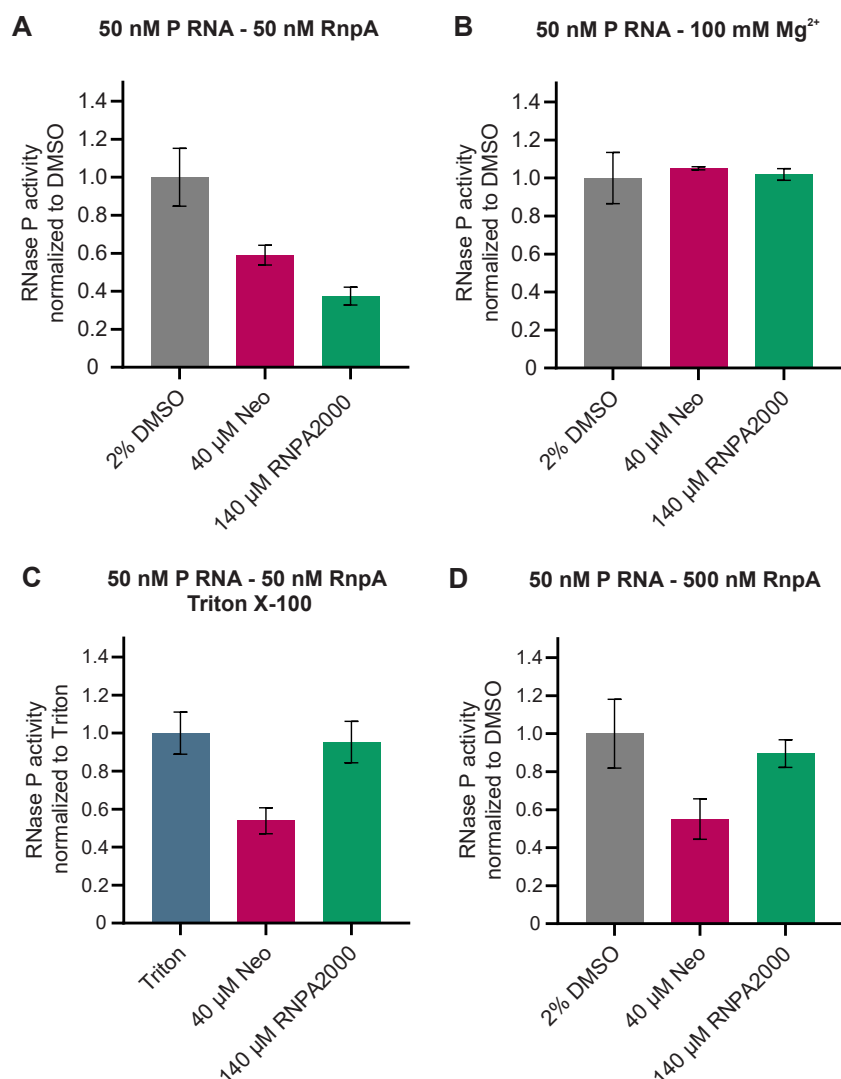
precursor tRNA substrate, Ir6Ac appeared to be a more specific inhibitor of bacterial RNase P than aminoglycosides and phenothiazine derivatives (17, 19). However, it remained elusive whether the compound binds to RnpA or to P RNA. A thiosemicarbazide derivative, RNPA2000 (see Fig. S1 in the supplemental material), was reported to interact with RnpA and to inhibit *in vitro* processing by RNase P of *Staphylococcus aureus* with an  $IC_{50}$  of  $\sim 140 \mu M$  (20, 21). The compound was described to have bactericidal activity (MIC,  $16 \mu g/ml$ ) without eliciting human cell cytotoxicity after 24 h of incubation at  $256 \mu g/ml$ . In addition, the authors described RNPA2000 as a dual-function antimicrobial compound that also inhibits a nonspecific RNA degradation activity reported to be associated with recombinant *S. aureus* RnpA protein at an  $IC_{50}$  of  $125 \mu M$  *in vitro* (20). In structure-activity relationship studies, RNase P inhibition was improved  $\sim 100$ -fold for derivatives of RNPA2000 (with  $IC_{50}$  values of  $1 \mu M$  for the two most effective compounds), but antimicrobial activities were not improved at the same time (21). Recently, a 1,2,4-trihydroxyanthraquinone (purpurin) was identified as an RnpA binder in a screen using a fluorescence-based enzyme assay. Purpurin was reported to inhibit the *Thermotoga maritima* RNase P holoenzyme reaction in the micromolar range ( $IC_{50}$  values of  $\sim 96 \mu M$  and  $\sim 13 \mu M$ , depending on the substrate [22]) and its binding to *T. maritima* RnpA was inferred from biolayer interferometry assays. Finally, a crystal structure of the *T. maritima* RnpA protein in complex with purpurin was reported (PDB entry 6MAX) (22).

During *in vitro* studies of RNase P inhibition by RNPA2000, we noticed solubility problems of the compound in  $Mg^{2+}$ -containing buffers, suggesting that the compound may induce protein aggregation. In particular, hits from high-throughput screening and virtual screening campaigns have often been identified as “false positives” or pan-assay interference compounds (PAINS). These compounds act by a variety of mechanisms, including interference with fluorescent signals, metal ion complexation, covalent protein reactivity, redox cycling, and formation of aggregates (23). In particular, small molecule-induced aggregation is a major source of false-positive results in drug discovery campaigns. Although computational methods to predict potential aggregators have been established (24), experimental analyses are still indispensable for the detection of aggregators. As the three aforementioned RNase P inhibitors have been identified via high-throughput screening and the RnpA protein has been described as “intrinsically unstructured” (25), suggesting increased susceptibility to aggregation, we decided to perform appropriate control experiments using several experimental approaches, as follows: (i) addition of detergent to enzyme kinetic reactions (26), (ii) variation of RNase P holoenzyme/RnpA concentration (27), (iii) solubility determination of the small molecule under assay conditions (28), and (iv) cosedimentation analysis of RnpA protein and the small molecule (26), and, for RNPA2000, growth inhibition of a *Bacillus subtilis* strain whose RNase P activity is provided by a eukaryal protein-only RNase P. All three types of compounds, Ir6Ac, RNPA2000 (and derivatives), and purpurin, showed properties of protein aggregators. Finally, we could not reproduce the reported unspecific RNase activity of *Staphylococcus aureus* RnpA (29).

## RESULTS

**RNPA2000 testing using the *T. maritima* enzyme.** For evaluation and improvement of published RNase P inhibitors, we used the RNase P of *T. maritima* as a model enzyme because a high-resolution crystal structure of the *T. maritima* P protein (RnpA) is available (30), making *in silico* docking and crystal soaking experiments feasible. At the  $IC_{50}$  of RNPA2000 ( $140 \mu M$ ) determined previously for *S. aureus* RNase P, we observed  $\sim 60\%$  inhibition of pre-tRNA processing by *T. maritima* RNase P in our experimental setup (Fig. 1A). This effect was comparable to that reported for *S. aureus* RNase P (20, 31). Neomycin, an aminoglycoside and known RNase P inhibitor, was used as a control. Its  $IC_{50}$  value of  $\sim 40 \mu M$ , determined here (see Fig. S2A in the supplemental material), is also in line with data published for the *Escherichia coli* RNase P holoenzyme (50% inhibition at  $60 \mu M$  [14]). Next, RNPA2000 was tested in the P RNA-alone reaction (without RnpA) to ensure that the compound exclusively acts on the protein subunit. Indeed, as for the *S. aureus* enzyme (20), no inhibitory effect was detectable in the





**FIG 1** Inhibition of *T. maritima* RNase P by RNPA2000. (A) *T. maritima* RNase P holoenzyme activity in the presence of 140  $\mu$ M RNPA2000 (green). Kinetics were performed with 50 nM holoenzyme and 500 nM pre-tRNA<sup>Gly</sup> substrate in kinetic (KIN) buffer with 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Neomycin (Neo; pink) was used for all experiments (A to D) as a control at its 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of ~40  $\mu$ M (see Fig. S2). Mean values ( $\pm$  standard error of the mean [SEM]), normalized to the 2% dimethyl sulfoxide (DMSO)-only control, are based on 6 biological replicates. (B) Effect of 140  $\mu$ M RNPA2000 on the *T. maritima* P RNA-alone reaction, using KIN buffer with 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 nM P RNA, and 500 nM pre-tRNA<sup>Gly</sup>. Mean values ( $\pm$ SEM), normalized to the 2% DMSO-only control, are based on 3 biological replicates. (C) Effect of addition of 0.01% Triton X-100. Relative activity of the *T. maritima* RNase P holoenzyme assayed in KIN buffer with 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Triton X-100, and 2% DMSO. Experiments were performed with 50 nM holoenzyme (equal amounts of P RNA and RnpA) and 500 nM pre-tRNA<sup>Gly</sup>. Mean values ( $\pm$ SEM), normalized to the 2% DMSO-only control, are based on 4 biological replicates. (D) Effect of a 10-fold increase in RnpA concentration. Activity of the *T. maritima* holoenzyme was assayed in KIN buffer with 10 mM MgCl<sub>2</sub> and containing 50 nM P RNA, 500 nM RnpA protein, and 500 nM pre-tRNA<sup>Gly</sup>. Mean values ( $\pm$ SEM), normalized to the 2% DMSO-only control, are based on 3 biological replicates.

RNA-alone reaction (Fig. 1B). As this reaction was performed at 100 mM Mg<sup>2+</sup> to compensate for the absence of the RnpA protein, inhibition by neomycin was essentially abolished as well, which is attributable to the elevated Mg<sup>2+</sup> concentration. Neomycin was shown to compete with Mg<sup>2+</sup> ions for binding to functionally important metal ion binding sites in the catalytic RNA (14). We further tested processing activity by *T. maritima* RNase P in the absence versus presence of 2% and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO). In our setup, activity reached 80% at 2% and 57% at 10% DMSO compared

with the “no DMSO” control (Fig. S2B). This finding opened up the option to analyze RNase P inhibition in 10% DMSO at increased concentrations of compounds with too low solubility at 2% DMSO. We further showed concentration-dependent inhibition of *T. maritima* RNase P by RNPA2000 (see Fig. S3 in the supplemental material). At this point, we observed turbidity of a solution containing 500  $\mu\text{M}$  RNPA2000 in 2% DMSO. Therefore, experiments addressing compound solubility were initiated.

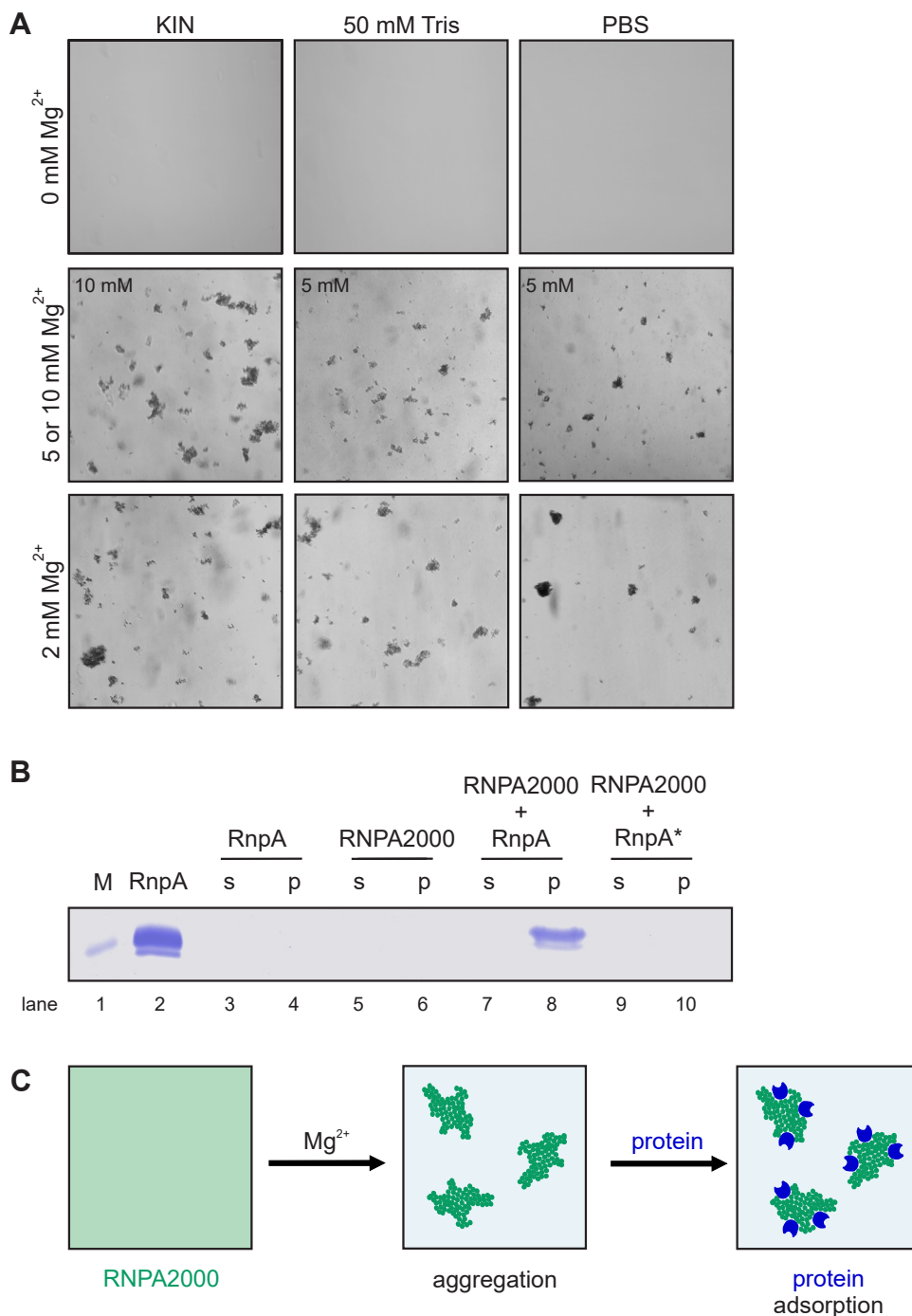
**Solubility analysis of RNPA2000.** Microscopy was performed to evaluate compound solubility. Dunman and coworkers (31) observed solubility of RNPA2000 at 200  $\mu\text{M}$  (in phosphate-buffered saline [PBS] with 2% DMSO), thus inferring the solubility to be  $>200 \mu\text{M}$  (20). Consistent with this, we observed RNPA2000 to be soluble at a concentration of 200  $\mu\text{M}$  in three tested buffer systems (kinetic [KIN], Tris, and PBS; each with 2% DMSO) (Fig. 2A, top). However, upon addition of  $\text{Mg}^{2+}$ , precipitates formed in all three buffer systems (Fig. 2A, middle and bottom). To measure more quantitatively if such precipitates also form at concentrations near the  $\text{IC}_{50}$ , solubility was determined using high-performance liquid chromatography (HPLC). In accordance with the microscopic findings, the solubility of RNPA2000 severely decreased upon addition of  $\text{Mg}^{2+}$  ions (Table 1; see also Fig. S4 in the supplemental material). For the Tris buffer system with 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , conditions that were previously used for kinetics with the *S. aureus* enzyme (20), a solubility of  $\sim 25 \mu\text{M}$  was determined. This is far below the reported  $\text{IC}_{50}$  of  $\sim 140 \mu\text{M}$ , and even increasing the DMSO percentage to 10% had only a small impact (solubility,  $\sim 40 \mu\text{M}$ ; Table 1). For the KIN buffer system, similar results were obtained ( $\sim 30 \mu\text{M}$  for 2% DMSO and  $\sim 60 \mu\text{M}$  for 10% DMSO in the presence of 10 mM  $\text{MgCl}_2$  [the  $\text{Mg}^{2+}$  concentration used for enzyme kinetics]). For both buffers, the solubility of RNPA2000 decreased  $\sim 10$ -fold after addition of  $\text{MgCl}_2$ , indicating metal ion complexation.

**Protein aggregation.** The solubility results suggested that RNPA2000 was not completely dissolved during enzyme kinetics, raising the question of whether the observed inhibition effects were due to aggregation. Small-molecule aggregation has been extensively described as a source of false-positive hits in high-throughput screenings (27, 28, 32, 33). Mechanistically, it was proposed that proteins of interest adsorb to small-molecule aggregates, leading to unspecific inhibition effects (34). Partial protein denaturation induced by aggregation was also suggested as a cause of enzyme inhibition (35). Although the mechanistic details are not completely understood in all cases, there are some characteristics of aggregators studied so far, which can help in identifying such compounds.

As colloidal aggregates can be removed from solution by centrifugation (26, 32, 34), we performed cosedimentation (pulldown) experiments to reveal direct interaction of aggregates and enzymes. Indeed, in the presence of RNPA2000 aggregates, the *T. maritima* RnpA protein was found to be enriched in the centrifugation pellet (Fig. 2B, lane 8). In contrast, this was not seen when the same experiment was carried out in KIN buffer lacking  $\text{Mg}^{2+}$  ions (Fig. 2B, lane 10). This further corroborated the involvement of magnesium ion complexation in the aggregation process. This is schematically illustrated in Fig. 2C.

Addition of nonionic detergents as surface-active agents can prevent aggregation (illustrated in Fig. 3, compare left and right sketches), which manifests as a reduction or loss of the inhibitory effect. This approach has been widely used to detect aggregators in early drug discovery campaigns (23, 33, 36–38). Indeed, when *T. maritima* RNase P processing assays were conducted as in Fig. 1A, but additionally containing 0.01% Triton X-100, inhibition by RNPA2000 vanished almost completely, while inhibition strength by neomycin remained essentially the same (Fig. 1C).

Finally, a strong sensitivity of aggregator inhibition to enzyme concentration has been described (28, 33, 39–41). Although the molar ratio of inhibitor to enzyme is roughly 3,000:1 in our experiments, the ratio of aggregate complexes to enzyme molecules will be much lower. As a consequence, increasing the enzyme concentration (e.g., 10-fold) may easily saturate adsorption of enzyme molecules to aggregates and increase the fraction of unaffected enzyme (illustrated in Fig. 3, compare central and left sketches), thus mitigating



**FIG 2** Protein aggregation. (A) Microscopy of RNPA2000 in different buffers with various Mg<sup>2+</sup> concentrations. Three different buffers were chosen, as follows: (i) KIN buffer, used for enzyme kinetics in the present study, (ii) 50 mM Tris buffer, previously used for kinetic experiments (20), and (iii) phosphate-buffered saline (PBS), used for solubility determinations (31). Solutions (200 μl) with 2% DMSO and 200 μM RNPA2000 were prepared either without or with Mg<sup>2+</sup> at the indicated concentration. After incubation for 15 min at room temperature, solutions were applied to microscopy. (B) SDS-PAGE of a cosedimentation experiment with RNPA2000; s, supernatant; p, pellet. Lane 1, a 15-kDa marker (M); lane 2, 1 μg of *T. maritima* RnpA; lanes 3 and 4, 5 μg *T. maritima* RnpA only; lanes 5 and 6, 140 μM RNPA2000 only; lanes 7 and 8, 5 μg *T. maritima* RnpA and 140 μM RNPA2000. Proteins in lanes 1 and 2 were in double-distilled water (ddH<sub>2</sub>O), samples in lanes 3 to 8 were in KIN buffer containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 2% DMSO, and lanes 9 and 10 were derived from samples containing 5 μg *T. maritima* RnpA and 140 μM RNPA2000 in KIN buffer with 2% DMSO but lacking MgCl<sub>2</sub> (indicated by an asterisk [\*]). (C) Model sketches of protein aggregation induced by RNPA2000. (Left) RNPA2000 is soluble in the absence of Mg<sup>2+</sup> (depicted by the homogeneous greenish color); (middle) addition of Mg<sup>2+</sup> induces the formation of insoluble compound aggregates (green spheres); (right) protein (in blue) adsorbs to green RNPA2000 aggregates.

**TABLE 1** HPLC solubility determination results<sup>a</sup>

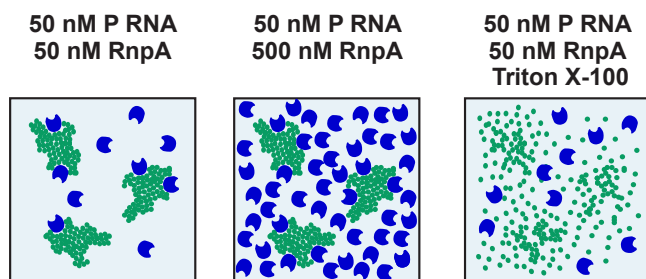
Buffer	MgCl <sub>2</sub> (mM)	DMSO	Solubility (μM)		
			RNPA2000	NL20	NL48
KIN		2%	~200	~75	~35
KIN	5	2%	~25		
KIN	10	2%	~30		
KIN	10	10%	~60	~210	~13
Tris		2%	~200		
Tris	5	2%	~25		
Tris	5	10%	~40		
PBS		2%	~200		

<sup>a</sup>RNPA2000 solubility was determined for different buffers with various amounts of MgCl<sub>2</sub> and dimethyl sulfoxide (DMSO). For NL20 and NL48, solubility was only analyzed in kinetic (KIN) buffer at 2% DMSO and without Mg<sup>2+</sup>, and under the conditions used for enzyme kinetic assays. PBS, phosphate-buffered saline. For each measurement, at least six solutions with increasing concentration were subjected to HPLC. After plotting area under the curve (AUC) values for the corresponding compound concentrations, a linear correlation was obtained. The solubility was determined as the highest concentration at which there was still a linear correlation to be detected. Solubility limits are approximate, as the concentration variation was performed with a resolution of 5 or 10 μM steps. Evaluation for RNPA2000 is exemplarily shown in Fig. S4. Each measurement is based on at least 3 replicates.

inhibition. In standard assays, we used 50 nM each *T. maritima* P RNA and RnpA protein because a molar excess of RnpA did not enhance but even reduced holoenzyme activity. To evaluate concentration sensitivity, we increased the amount of RnpA protein to 500 nM without changing the P RNA concentration (50 nM). In this setup, enzyme inhibition in the presence of 140 μM RNPA2000 decreased from ~60% to ~10%, while inhibition by neomycin remained unaffected (see Fig. 1A and D).

Taken together, the observed solubility problems, the co-pulldown of RNPA2000 and RnpA protein, sensitivity of enzyme inhibition to the presence of Triton X-100, and mitigated inhibition at elevated RnpA concentration are consistent with the notion that effects of RNPA2000 on bacterial RNase P activity are attributable to Mg<sup>2+</sup>-dependent aggregate formation (Fig. 2C). Mechanistically, we propose that Mg<sup>2+</sup> ions induce the formation of RNPA2000 aggregates, which then adsorb RnpA protein molecules to their surface.

**Derivatives of RNPA2000.** As part of structure-activity relationship (SAR) studies, derivatives of RNPA2000 with enhanced potency against bacterial RNase P were identified (21, 31). Among those were compounds NL20 (IC<sub>50</sub>, 75 μM) (31) with a semicarbazide core instead of the RNPA2000 thiosemicarbazide core, and NL48 differing from RNPA2000 by the presence of a benzofuran substituent instead of the furan ring (see Fig. S1), which was reported to be one of the most active compounds against *S. aureus* RNase P (IC<sub>50</sub>, 1 μM) (21, 31). For the two compounds, solubilities (in PBS containing 2% DMSO) were determined to be ~41 (NL20) and 49 μM (NL48) (31). We determined

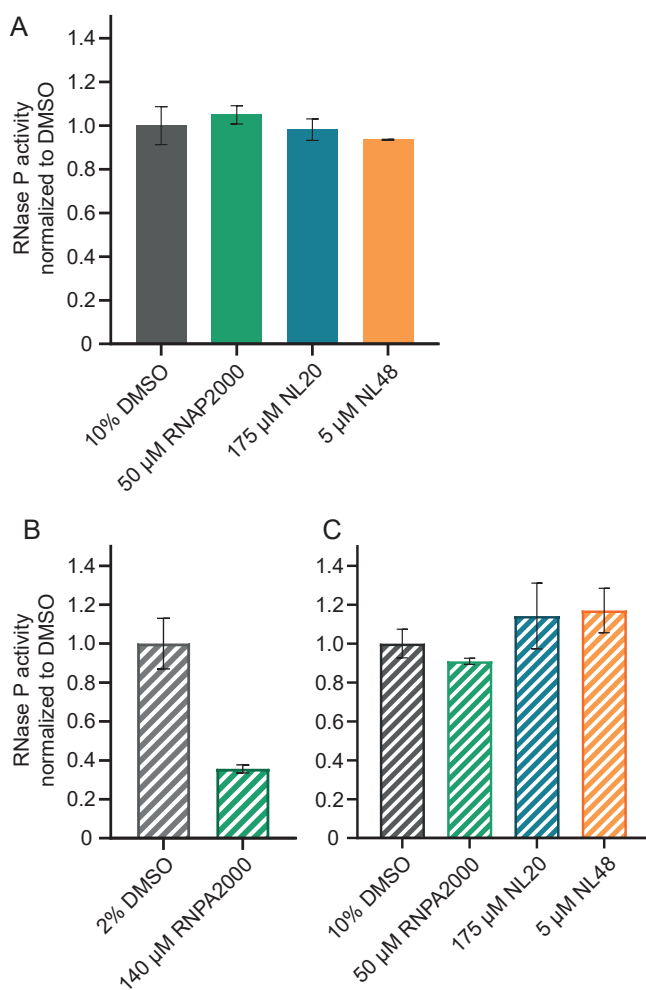


**FIG 3** Model of aggregator effects on RNase P. (Left) After aggregate formation of the small molecule (green spheres), RnpA protein (blue) adsorbs to such aggregates, leading to the depletion of soluble protein that is available for enzyme function. (Middle) Increasing the RnpA concentration (10-fold in the sketch) saturates the contact sites on the aggregates, leaving a fraction of soluble protein, which manifests as attenuated enzyme inhibition. (Right) Triton X-100 interferes with aggregate formation or disrupts aggregates, thereby restoring protein solubility.

the solubilities of NL20 and NL48 to be  $\sim 75 \mu\text{M}$  and  $\sim 35 \mu\text{M}$ , respectively, in KIN buffer with 2% DMSO (Table 1), which are in a similar range as the solubilities determined before using a different method (31). To maximize the likelihood that solubilities of the two compounds upon addition of  $\text{Mg}^{2+}$  are higher than their aforementioned  $\text{IC}_{50}$  values for RNase P inhibition, we analyzed their solubilities at the highest feasible DMSO concentration (10%) under our standard assay conditions (KIN buffer, 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ). We determined solubilities of  $\sim 210 \mu\text{M}$  (NL20) and  $\sim 13 \mu\text{M}$  (NL48) (Table 1), well above the reported  $\text{IC}_{50}$  values of  $75 \mu\text{M}$  (31) and  $1 \mu\text{M}$  (21), respectively. Effects of NL20 and NL48 on the processing reaction catalyzed by *T. maritima* RNase P were then analyzed at concentrations of  $175 \mu\text{M}$  (NL20) and  $5 \mu\text{M}$  (NL48). As a control, we included RNPA2000 at  $50 \mu\text{M}$ , which is just below the solubility limit under these conditions according to Table 1. However, the inhibitory effects published before (20, 21, 31) were not observable under our assay conditions (Fig. 4A), indicating that there is no inhibitory effect when NL20, NL48, or RNPA2000 is fully dissolved. As available information suggests that the compounds were previously tested at only 2% DMSO and in the presence of 5 mM  $\text{Mg}^{2+}$  (20, 31), it is very possible that fractions of compound NL20 and especially of NL48 were insoluble and induced aggregate formation in those studies (20, 21, 31).

**S. aureus RNase P.** Dunman and coworkers identified RNPA2000 as an inhibitor of the RNase P of the human pathogen *S. aureus* (20). As we observed the solubility problems of RNPA2000 and derivatives in both buffer systems, the Tris buffer used in the previous study (20) and the KIN buffer used here (Table 1), we could essentially exclude our KIN buffer system as the cause of RnpA aggregation. Thus, we considered the possibility that the *T. maritima* RnpA protein used here and the one from *S. aureus* might have different propensities to induce protein aggregation. However, we assumed this to be unlikely, taking into account that RnpA proteins share a very similar overall structure (30, 42, 43) and previously identified aggregators inhibited a variety of enzymes via aggregation (27). Indeed, in the presence of  $140 \mu\text{M}$  RNPA2000 in KIN buffer containing 2% DMSO, we saw  $\sim 60\%$  inhibition of *S. aureus* RNase P (Fig. 4B), in line with the previously described inhibition effects (20). However, when performing the enzyme assays at 10% DMSO to combine solubility with compound concentrations as close as possible to or above the reported  $\text{IC}_{50}$  values (20, 21, 31), neither RNPA2000 nor NL20 and NL48 caused substantial inhibition effects (Fig. 4C). These findings support the notion that the inhibition effects reported for *S. aureus* RNase P resulted from protein aggregation as well.

**Analysis of RNPA2000 specificity.** Although protein aggregation is described in literature as an unspecific effect, reported antibacterial effects without human cytotoxicity might indicate a certain specificity (20). To further investigate whether other proteins than RnpA are also affected by aggregation, cosedimentation experiments were performed with nucleic acid binding proteins such as the human helicase eIF4A and T7 RNA polymerase. Similarly as for *T. maritima* RnpA, the presence of  $140 \mu\text{M}$  RNPA2000 enhanced the amount of protein in the pellet (see Fig. S5A and B in the supplemental material). This finding indicates that protein aggregation by RNPA2000 is rather unspecific. Next, the *B. subtilis* d7 strain was used to evaluate whether the observed antibacterial effects are RnpA specific. In the *B. subtilis* d7 strain, expression of the essential *rnpA* gene is under the control of a xylose-inducible promoter (4). Under nonpermissive conditions, RnpA levels are critically depleted, and survival of cells becomes dependent on a functional plasmid-encoded RNase P activity. Complementation experiments revealed that the protein-only RNase P PRORP3 from the plant *Arabidopsis thaliana* is able to restore *B. subtilis* growth under conditions of an otherwise lethal depletion of endogenous RnpA and RNase P holoenzyme activity, although growth was retarded relative to that of d7 cells complemented with the same plasmid but expressing *B. subtilis* RnpA (see Fig. S6 in the supplemental material). Using strain d7, we analyzed the antibacterial effects of RNPA2000 under permissive (in the presence of xylose) versus nonpermissive (in the presence of glucose) conditions. As RnpA expression is negligible in the presence of glucose as a carbon source and PRORP3



**FIG 4** Effect of RNPA2000 and its derivatives NL20 and NL48 on RNase P cleavage. (A) Relative activity of the *T. maritima* RNase P holoenzyme in the presence of the three compounds (chemical structures shown in Fig. S1). Experiments were performed with 50 nM *T. maritima* holoenzyme and 500 nM pre-tRNA<sup>Gly</sup> substrate using KIN buffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10% DMSO. DMSO (10%) was chosen to maximize compound solubility while maintaining substantial enzyme activity (see Fig. S2). The compound concentrations used were selected based on the solubility data shown in Table 1; for NL20 and NL48, compound concentrations were above the IC<sub>50</sub> values reported for inhibition of *S. aureus* RNase P (75  $\mu$ M for NL20 [31] and 1  $\mu$ M for NL48 [21]). Mean cleavage rate constants ( $\pm$  SEM), derived from 3 biological replicates each, were normalized to reaction mixtures containing 10% DMSO without added compound. (B) Relative *S. aureus* RNase P holoenzyme activity in the absence or presence of RNPA2000 assayed in KIN buffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 2% DMSO. P RNA (50 nM) and substrate (500 nM) were used at the same concentrations as for kinetic assays with *T. maritima* RNase P (Fig. 1A). Only the *S. aureus* RnpA concentration was increased to 100 nM for optimal enzyme activity. The RNPA2000 concentration (140  $\mu$ M) corresponds to the previously determined IC<sub>50</sub> value for the same enzyme reaction (20, 31). Mean values ( $\pm$ SEM), normalized to the 2% DMSO control, are based on 4 biological replicates. (C) *S. aureus* RNase P activity assayed in KIN buffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, and 10% DMSO, using the same enzyme and substrate concentrations as in panel B. Compound concentrations were identical to those used in panel A for the *T. maritima* enzyme. Mean values ( $\pm$ SEM), normalized to 10% DMSO, are based on 4 biological replicates.

instead executes the basic RNase P activity in this strain, one would expect that a specific RnpA inhibitor exerts a reduced antibacterial effect on this strain. First of all, we observed different sensitivities of our test strains to ampicillin and RNPA2000 (Table 2): strain YB886, the parental strain used for the construction of strain d7, was the least sensitive one (smallest inhibition zone diameters); d7 strains harboring the pDG148 plasmid vector (d7 vector, d7 RnpA, and d7 PRORP3) tended to be more sensitive than strain d7 under xylose conditions (Table 2 and Fig. S7 in the supplemental material);



**TABLE 2** Disk diffusion test results<sup>a</sup>

Strain	Carbon source	Diameter of inhibition zone (mm) for <sup>c</sup> :		
		Amp	0.1 mM RNPA2000	0.25 mM RNPA2000
YB886	Xylose	15/16/16	7/8/8	9/9/9/10
	Glucose	15/15/15	7/8/7	8/9/9/10
d7 <sup>b</sup>	Xylose	18/15/17	8/8/9	10/10/10
	Glucose	ND	ND	ND
d7 RnpA	Xylose	18/20/20	9/9/9	10/11/13
	Glucose	19/18/21	8/9/9	10/13/12
d7 vector <sup>b</sup>	Xylose	21/21/24	9/9/9	12/12/13
	Glucose	ND	ND	ND
d7 PRORP3	Xylose	22/25/22	9/9/9/10	13/13/20/12
	Glucose	25/19/21	10/9/10/9	16/12/13/13

<sup>a</sup>See Fig. S7.<sup>b</sup>For the d7 strain and the d7 strain transformed with the empty pDG148 vector (d7 vector), no bacterial growth was observed in the presence of glucose (nonpermissive condition); thus, no zone of inhibition could be determined. ND, nondeterminable.<sup>c</sup>The measured diameters (in mm) for 3 or 4 biological replicates each are given (lower limit of measurement precision, 1 mm). The filters themselves had a diameter of 6 mm. Ampicillin (Amp; 10 μg) loaded onto the center of the filter was used as a control.

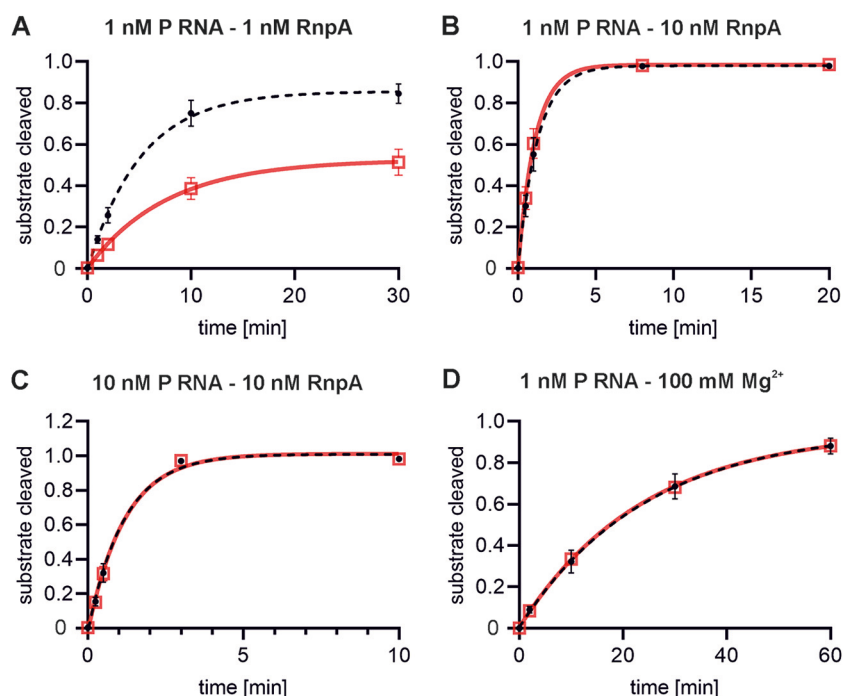
this can be explained by exposure of strains harboring pDG148 plasmids to dual antibiotic (chloramphenicol and kanamycin) stress during growth. Comparison of strains d7 RnpA and d7 PRORP3 (xylose conditions) revealed that the latter strain was more sensitive to ampicillin as well as to 0.25 mM RNPA2000, which can be attributed to PRORP3 acting with lower efficiency than endogenous RNase P, resulting in lower overall fitness. Yet, under glucose conditions, one would have expected a stronger RNPA2000 inhibition effect on strain d7 RnpA than on d7 PRORP3 if RNPA2000 were a specific RnpA inhibitor. However, strain d7 PRORP3 even showed a trend toward stronger inhibition (larger diameter of inhibition zone) than d7 RnpA under nonpermissive glucose conditions (Table 2 and Fig. S7). This finding argues against RnpA-specific inhibition of RNPA2000, but rather points to unspecific or toxic effects.

**Nonspecific RNase activity of *S. aureus* RnpA.** Beyond inhibiting RNase P-catalyzed tRNA 5'-end maturation, RNPA2000 was also described to inhibit RnpA-mediated, nonspecific RNA degradation, which was considered a dual-function antimicrobial activity of RNPA2000 (20). Dunman and coworkers further reported evidence to suggest that RnpA is a component of the *S. aureus* mRNA degradosome and observed degradation of two staphylococcal model RNA substrates, *spa* mRNA and rRNA, in the presence of recombinant *S. aureus* RnpA *in vitro* (29). To reproduce this nonspecific RNase activity of *S. aureus* RnpA, we recombinantly expressed N-terminally tagged *S. aureus* RnpA by two chromatographic steps, namely Ni-nitrilotriacetic acid (NTA) chromatography under denaturing conditions followed by cation exchange chromatography (see the supplemental material). In contrast, in the previous study, N-terminally tagged *S. aureus* RnpA was purified in a single Ni-NTA affinity chromatography step under nondenaturing conditions (29). It is of note that we were not able to purify recombinant *S. aureus* RnpA with satisfactory purity by Ni-NTA chromatography under native conditions (see Fig. S8 in the supplemental material). We then incubated our recombinant *S. aureus* RnpA protein with the pre-tRNA<sup>Gly</sup> substrate that carries single-stranded extensions (14 nt at the 5' end and 6 nt at the 3' end) that mimic unstructured RNAs, while the tRNA moiety is highly structured. After 1 h of incubation at 37°C in the same manner as carried out before (29), no substantial RnpA-mediated degradation of pre-tRNA<sup>Gly</sup> was observed; bovine serum albumin (BSA) served as negative control and RNase T1 as positive control (Fig. 5).

**Iriginol hexaacetate.** At 1 nM *B. subtilis* RNase P, the presence of 10 μM iriginol hexaacetate (Ir6Ac) showed a reduction in the rate constant of pre-tRNA<sup>Gly</sup> cleavage and also in the maximum fraction of cleavable substrate (Fig. 6A). Yet, the inhibitory effect was rather mild, considering that almost complete inhibition was reported at







**FIG 6** Irigonal hexaacetate (Ir6Ac) testing. (A to D) Single exponential fittings (see the supplemental material) for pre-tRNA<sup>Gly</sup> processing by the *B. subtilis* holoenzyme or P RNA alone in the presence of 10  $\mu$ M Ir6Ac (red curves). DMSO (1%) was used as a control (black dashed curves). Experiments were performed in KIN buffer with 1% DMSO and 5 mM (A to C) or 100 mM (D) MgCl<sub>2</sub>. Concentrations of P RNA, RnpA, and pre-tRNA<sup>Gly</sup> substrate were varied. All data are based on at least three biological replicates each. (A) Holoenzyme (1 nM; equal amounts of P RNA and RnpA protein) and 10 nM pre-tRNA<sup>Gly</sup> substrate; (B) 1 nM P RNA, 10 nM RnpA, and 10 nM pre-tRNA<sup>Gly</sup> substrate; (C) 10 nM holoenzyme (equal amounts of P RNA and RnpA) and 100 nM pre-tRNA<sup>Gly</sup> substrate. (D) RNA-alone activity using 1 nM P RNA and 10 nM substrate and assayed at 100 mM Mg<sup>2+</sup>.

in the supplemental material). Processing of a minihelix substrate by *T. maritima* RNase P was reported to be inhibited by purpurin with an IC<sub>50</sub> value of  $\sim$ 100  $\mu$ M at 100 mM MgCl<sub>2</sub> (the minimal substrate was not cleavable at 10 mM Mg<sup>2+</sup>) and in the presence of 10% DMSO. Analysis of cleavage of a pre-tRNA-like substrate in the presence of 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 10% polyethylene glycol 200 (PEG200) instead of DMSO for solubilizing purpurin gave an IC<sub>50</sub> of 13  $\mu$ M (22). Execution of a gel-based cleavage assay with a nonfluorescent minihelix substrate and canonical pre-tRNA at 500  $\mu$ M purpurin excluded an interaction with the fluorescent dye. After confirming purpurin binding to the RnpA protein via biolayer interferometry measurement, a crystal structure of *T. maritima* in complex with purpurin was obtained. The structure suggested binding of purpurin to a hydrophobic patch where the compound interferes with binding of the pre-tRNA 5' leader to RnpA (22). When we analyzed purpurin, we noticed solubility problems. At a concentration of 200  $\mu$ M, precipitation was observed under the microscope in two buffer systems previously used to characterize the interaction with RNase P (22) (Fig. S9B). We also performed a co-pulldown experiment with 100  $\mu$ M purpurin (a concentration that resembled the IC<sub>50</sub> for cleavage of the aforementioned minihelix substrate) in buffer H containing 10% DMSO (Fig. S9C). In the presence (lane 8) and absence (lane 10) of Mg<sup>2+</sup> ions, *T. maritima* RnpA was detected in the pellet, indicating protein aggregation.

## DISCUSSION

In the present study, three published RNase P inhibitors were identified as protein aggregators. Protein aggregation was described as one mechanism leading to promiscuous inhibition. Much effort has been made in the field of medicinal chemistry to identify such compounds and to rid the literature of such inhibitors by either

automated filters or experimental procedures. For two of the three compounds analyzed here, similar compounds were already described in the literature as promiscuous inhibitors. Compounds with the same isoflavone core as Ir6Ac, such as genistein, were reported to act as protein aggregators (32, 44). Not only isoflavones but also flavonoids in general have been categorized as false positives, with quercetin being the most promiscuous, with over 50 reported targets studied in hundreds of publications (32, 36, 45), and for which protein aggregation was identified as the cause of promiscuity (27). Besides such polyhydroxylated natural phytochemicals, quinones resemble one of the most problematic and readily identifiable PAINS (23, 46, 47). Mechanistically, quinones are highly reactive electrophiles that react with protein thiol groups, and hence are termed covalent modifiers (46, 48, 49). Purpurin, an anthraquinone derivative with hydroxyl groups in 1-, 2- and 4-position, might be involved in metal ion complexation, as the two carbonyl functions are in perfect distance to hydroxyl groups for such interactions. However, in our study, general solubility problems of purpurin seemed to be the cause of protein aggregation (see Fig. S9). Nonetheless, purpurin could be a border case, as the compound was soaked into crystals of *T. maritima* RnpA, where it localized to the 5' leader binding cavity (22). Thus, purpurin might give rise to RnpA-specific inhibitors, provided that derivatives with improved aqueous solubility and that retain binding specificity could be developed. The third compound analyzed here, RNPA2000, has a thiosemicarbazide core that, to our knowledge, has not previously been linked with protein aggregation. For RNPA2000, we could show that protein aggregation is induced by metal ion complexation (Fig. 2), and we provided evidence that the reported antibacterial effects are not RnpA-specific but likely are caused by aggregation of multiple proteins. Cell-based evidence (Table 2) also contradicts the claim that RNPA2000 and related compounds specifically target bacterial RnpA.

Promiscuous inhibitors, although they interfere with *in vitro* enzyme-based assays, may well produce a desired cellular readout in initial experiments (50), thus looking quite promising at first sight. One example is tetrahydroquinolines that are described as PAINS in the literature (51). Iodinated tetrahydro-3H-cyclopenta[c]quinolines exhibited high affinity and selectivity toward the G protein-coupled estrogen receptor GPR30 but not toward the classical estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ , which are nuclear receptor transcription factors. Nevertheless, during *in vivo* experiments, issues concerning pharmacokinetics were observed, such as rapid metabolism, problematic plasma protein binding, and poor targeting characteristics (50). Notably, 3 to 6% of the drugs on the market harbor such PAINS structural elements, causing artifactual inhibition and non-drug-like behavior (51). Clotrimazole, for instance, a well-known azole antifungal that was not discovered by a target-based *in vitro* assay, was later identified as a protein aggregator. The drug inhibited three different enzymes ( $\beta$ -lactamase, chymotrypsin, and malate dehydrogenase), was sensitive to detergent, and formed particles detectable by light scattering (52). Protein aggregation by clotrimazole was observed long after drug approval when the compound was tested against the aforementioned enzymes at concentrations (10 to 400  $\mu$ M) largely above the IC<sub>50</sub> value of 0.1  $\mu$ M against the clinical target, *Candida albicans* 14 $\alpha$ -demethylase (53). This indicates that inhibition by protein aggregation in the micromolar concentration range does not exclude specific target inhibition by clotrimazole in the nanomolar range. Likewise, other approved drugs may also induce nonspecific protein aggregation under certain *in vitro* conditions, which are unrelated to their specific medical indication. Nonetheless, this is a balancing act, and the approval of clotrimazole is restricted to topical applications because of pharmacokinetic problems. Conversely, it is unlikely that a compound hit discovered by high-throughput screening that is active through aggregation may be a specific ligand for the investigated target (52). This is illustrated by the experience that none of the compounds with PAINS structural elements that have been identified in target-based high-throughput campaigns has ever become an approved drug (33). Moreover, such structural elements in already approved drugs are associated with pharmacokinetic and/or toxicological problems

(46). Hence, the presence of PAINS structural elements is considered an exclusion criterion from further development, and PAINS should be identified as early as possible during drug discovery to save time and costs.

Our study is the first that identifies reported inhibitors of bacterial RNase P as protein aggregators, demonstrating that the bacterial RNase P protein subunit is highly susceptible to aggregation. RNase P protein subunits (termed RnpA or P proteins) adopt an  $\alpha\beta\beta\beta\alpha\beta\alpha$  fold that is also found in other RNA-binding proteins (42). RnpA proteins have pI values of around 10, owing to many positively charged amino acid side chains involved in binding to the RNase P RNA subunit and to the 5' leader sequence of pre-tRNA substrates. A central cleft formed by the N-terminal  $\alpha$ -helix and the central  $\beta$ -sheet binds the 5' leader, and  $\alpha$ -helix 2, which contains the RNR motif (representing the region of highest amino acid conservation among RnpA proteins), is the primary interaction site with the catalytic RNA subunit. Investigation of the biophysical properties of recombinantly expressed and purified *B. subtilis* RnpA (25) revealed that the protein behaves as an "intrinsically unstructured" or "natively unfolded" protein at low ionic strength (10 mM sodium cacodylate, pH 7). Based on circular dichroism (CD) measurements, the protein was further inferred to possess features of a "molten globule" species, being hydrophobically collapsed and consistent with the formation of an ensemble of conformations with residual extents of  $\beta$ -sheet formation. Addition of anions induces formation of the native fold of the protein in a one-step conformational transition. Analysis of pyrophosphate binding to *B. subtilis* RnpA indicated the binding of two anions per protein molecule. Based on X-ray and nuclear magnetic resonance (NMR) data, one of the two anion binding sites is located between the terminus and  $\alpha$ -helix 2. Pyrophosphate or (ribo)nucleoside triphosphates showed high affinity for RnpA, while phosphate, sulfate, or nucleoside monophosphates bound with intermediate affinity (dissociation constant [ $K_d$ ] values of 10 to 150  $\mu$ M). The osmolyte trimethylamine *N*-oxide (TMAO) was also able to increase the fraction of RnpA in the native state, but in this case the primary reason for protein stabilization by TMAO is thought to be an unfavorable interaction with the peptide backbone that increases the energy of the denatured state (54). TMAO also causes contraction of denatured ensembles (55), thereby lowering the conformational entropy of folding by bringing aliphatic side chains in closer vicinity to each other to favor hydrophobic collapses of proteins. As TMAO did not compete with anions for binding to RnpA, previous work concluded that TMAO favors population of a metastable native state, while occupation of the two anion binding sites results in a more stable native fold of the protein (25). Biologically, the "intrinsically unstructured" state of RnpA may increase the specificity of its interaction with the cognate RNase P RNA subunit. On the other hand, the protein's capacity to fold in the presence of anions, polyphosphates, or nucleotides may mitigate its degradation by cellular proteases when being unfolded. Overall, the findings demonstrate that the folding state of RnpA proteins is highly sensitive to interaction with small molecules, consistent with the aggregation effects observed in our investigation. This malleability of the protein's folding state is expected to aggravate the prospects of finding specific inhibitors of RnpA, particularly when the protein is present in its free form.

Besides being part of the holoenzyme responsible for 5' processing of pre-tRNAs, the RnpA of *S. aureus* was described to mediate nonspecific RNA degradation (20), a finding we were unable to confirm. We purified recombinantly expressed RnpA from *S. aureus* and tested it for RNase activity in the absence of the RNase P RNA subunit. No degradation of a pre-tRNA substrate was observed after 1 h of incubation with *S. aureus* RnpA (Fig. 5). In contrast, a previous study reported vigorous degradation of rRNA and an mRNA substrate by the same protein (29). One reason for this discrepancy could be the different procedure of protein purification. As we were not able to purify the RnpA protein without nucleic acid contamination by the procedure described in (29), we instead performed the first purification step under denaturing conditions to separate the protein from associated nucleic acids, followed by a second purification step under native conditions. Nucleic acid contamination after native affinity chromatography has been described as the reason for aggregation of *T. maritima* and *B. subtilis* RnpA (56, 57). Nucleic acid contamination may also entail copurification of traces

of RNases, which could explain the observed RNA degradation activity of recombinant *S. aureus* RnpA, although Dunman and coworkers ruled this out based on matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) analysis (29). In general, the role of *S. aureus* RnpA in cellular RNA degradation is still under debate. A bacterial two-hybrid study identified the DEAD box RNA helicase CshA as an interaction partner of RnpA within the degradosome (58), but this interaction was not observed in a tandem affinity purification approach (59). *In vitro* pulldown assays then detected an interaction of *S. aureus* RnpA with RNase J1/J2, enolase, and PNPase instead of binding to CshA (60).

## MATERIALS AND METHODS

**Cloning and expression of *S. aureus* *rnpA* and *rnpB* genes.** Cloning of *S. aureus* *rnpA* and *rnpB* genes, T7 *in vitro* transcription, and preparation of RNase P RNA were performed essentially as described previously (61, 62). For further details, see the supplemental material. Dephosphorylation and 5'-[<sup>32</sup>P]-end labeling of pre-tRNA<sup>Gly</sup> was performed as described previously (63, 64). Protocols for the recombinant expression and purification of RnpA proteins from *S. aureus*, *B. subtilis*, and *T. maritima* are detailed in the supplemental material.

**RNase P kinetics.** RNase P processing assays were performed as described previously (61, 65). For details, see the supplemental material.

**Co-pulldown experiments.** For co-pulldown experiments, we prepared 1-ml solutions containing 5  $\mu$ g *T. maritima* RnpA and 140  $\mu$ M RNPA2000 in kinetic (KIN) buffer also used for the kinetic experiments (20 mM HEPES-KOH [pH 7.4], 150 mM NH<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>COO, 2 mM spermidine, 50  $\mu$ M spermine, and 4 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) supplemented with 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 2% DMSO. A sample containing 5  $\mu$ g *T. maritima* RnpA and 140  $\mu$ M RNPA2000 but without MgCl<sub>2</sub> was prepared to control for Mg<sup>2+</sup>-dependent effects. After incubation at room temperature (RT) for 5 min, samples were centrifuged for 30 min at 16,200  $\times$  g and 20°C. The supernatant was withdrawn and the pellet (only visible in the sample with Mg<sup>2+</sup>, RnpA, and RNPA2000) was resuspended in 15  $\mu$ l TuS buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.4], 100 mM NaCl, and 8 M urea) to which 1  $\mu$ l 1% Triton X-100 was added. Then, 10  $\mu$ l of the supernatant and the entire redissolved pellet were loaded onto a 15% SDS gel. After SDS-PAGE, protein bands were detected by staining with Coomassie brilliant blue R-250. RnpA in the supernatant was too dilute (~50 ng/10  $\mu$ l supernatant) to be visible after Coomassie staining.

**HPLC solubility determination.** Solubility of inhibitory compounds was determined by HPLC. A Hitachi (Tokyo, Japan) Primaide system was used, consisting of a 1110 pump, a 1210 auto sampler, a 1310 column oven, and a 1430 diode array detector. The stationary phase was a Machery Nagel 250/4.6 Nucleodur 100-5 C<sub>18</sub> ec (endcapping) column with a CC 8/4 Nucleodur 100-5 C<sub>18</sub> ec precolumn. A mixture of acetonitrile and ultrapure water with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) was used as the mobile phase. The flow rate was adjusted to 1 ml/min, and the acetonitrile content was increased by 1% per min. The injection volume was 99  $\mu$ l each, and the chromatographic separation was performed at 30°C. Detection profiles were recorded at 220 nm and evaluated using EZ Chrom Elite (version 3.3.2 SP2).

Samples of 200  $\mu$ l were prepared. Before addition of the compound, buffer, DMSO, MgCl<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub>O were vigorously mixed. Three different buffers were used, as follows: (i) KIN buffer (see above), (ii) Tris buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]), and (iii) phosphate-buffered saline (PBS [pH 7.4]). After addition of the compound and mixing, samples were incubated for 20 min at RT and applied to the auto sampler.

For each individual experiment, samples with at least 6 increasing concentrations of the test compound were consecutively injected into the HPLC system (with column washing between injections). For each run, the area under the curve (AUC) at the peak of the 220-nm absorption profile was determined. AUC values were plotted against the compound concentration, resulting in an ascending calibration line that descends at concentrations beyond the point of maximum solubility. The inflection point of this type of curve is taken as the solubility limit (see examples in Fig. S4). At least three independent experiments (as described above), starting from independent stock solutions of the test compound, were conducted and used to assess the solubility limit.

**Testing for nonspecific RNase activity of *S. aureus* RnpA.** Trace amounts of 5'-[<sup>32</sup>P]-end-labeled pre-tRNA<sup>Gly</sup> (<5 nM) were preincubated for 5 min at 55°C in 1  $\times$  reaction buffer (2 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, and 50 mM Tris-HCl [pH 6.0]), followed by addition of 2.5  $\mu$ M *S. aureus* RnpA in protein storage buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.0], 100 mM NaCl, and 10% glycerol), or by adding the same volume of storage buffer without protein (control), or by adding 2.5  $\mu$ M BSA (UltraPure BSA; Thermo Fisher Scientific), or by adding 1 U RNase T1 (Thermo Fisher Scientific) as positive control. Samples were incubated for 60 min at 37°C in 1  $\times$  reaction buffer (total volume, 20  $\mu$ l); for RNase T1, a 4- $\mu$ l aliquot was already withdrawn after 2 min. Reaction conditions were similar to those applied previously to demonstrate nonspecific RNase activity of *S. aureus* RnpA (29). After incubation, 4- $\mu$ l aliquots of the reactions were analyzed by 8% denaturing PAGE followed by phosphorimaging.

**Complementation experiments with *B. subtilis* strain d7.** In the *B. subtilis* d7 strain, endogenous RnpA expression is under the control of a xylose-inducible promoter (4). *B. subtilis* cells were streaked from frozen glycerol stocks onto LB agar plates (supplemented with 2% xylose, 20  $\mu$ g/ml kanamycin, and 5  $\mu$ g/ml chloramphenicol) that were incubated overnight at 37°C. A single colony from such a plate was used to inoculate a 3-ml liquid culture that was grown overnight at 37°C under shaking. On the next day, 40 ml prewarmed LB medium, again supplemented with 2% xylose, 20  $\mu$ g/ml kanamycin, and 5  $\mu$ g/ml chloramphenicol, was inoculated with overnight culture to a final optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.1; the culture was grown at 37°C (with shaking) to the mid-exponential phase (OD<sub>600</sub> of 0.6 to 0.8). Cells were harvested (5 min at 2000  $\times$  g and 22°C) and washed twice with LB medium (resuspension

of cells in 40 ml LB followed by centrifugation at  $2000 \times g$  and 22°C for 5 min) to remove xylose and finally redissolved in 40 ml LB medium. After dilution of the cell suspension with LB medium in three steps to a final ratio of 1:25,000, 100- $\mu$ l aliquots were plated on agar plates supplemented with 20  $\mu$ g/ml kanamycin, 5  $\mu$ g/ml chloramphenicol, and either 2% xylose or 2% glucose, followed by incubation at 37°C for 48 h.

**Disk diffusion tests.** For disk diffusion tests, cells were cultivated as described above. Except for strain YB886, cultures were supplemented with the following antibiotics: 5  $\mu$ g/ml chloramphenicol for strain d7 and 5  $\mu$ g/ml chloramphenicol and 20  $\mu$ g/ml kanamycin for strain d7 harboring the plasmid vector pDG148. After harvest and washing, cells were resuspended in the original culture volume (40 ml), then diluted 1:10 with LB medium, and 100- $\mu$ l aliquots of the dilution were plated on agar plates supplemented with the antibiotics specified above and either 2% xylose or 2% glucose; homogeneous plating was achieved by the use of glass beads. For evaluation of antibacterial effects, four filter papers (each with a diameter of 6 mm) were positioned in the plate quarters; after 5 min at RT, 10  $\mu$ l of either DMSO, ampicillin, or RNPA2000 was cautiously pipetted onto the filter paper. Plates were incubated for 15 min at RT for prediffusion of the compounds, followed by incubation for 19 to 21 h at 37°C and measurement of the inhibition zone diameter with a ruler.

**Compound synthesis.** RNPA2000 and its derivatives NL48 and NL20 were synthesized in a three-step procedure. For details, see the supplemental material. Irginol hexaacetate was obtained from Cfm Oskar Tropiczsch GmbH, and neomycin sulfate and purpurin were from Merck Sigma-Aldrich.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 6.4 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rebecca Feyh for preparation of recombinant *B. subtilis* RnpA and Wiebke Obermann for providing the human helicase eIF4A.

## REFERENCES

- Hartmann RK, Gößringer M, Späth B, Fischer S, Marchfelder A. 2009. The making of tRNAs and more—RNase P and tRNase Z. *Prog Mol Biol Transl Sci* 85:319–368. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)00808-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)00808-8).
- Gopalan V, Jarrous N, Krasilnikov AS. 2018. Chance and necessity in the evolution of RNase P RNA 24:1–5. <https://doi.org/10.1261/ma.063107.117>.
- Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. 1983. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 35:849–857. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90117-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90117-4).
- Gössringer M, Kretschmer-Kazemi Far R, Hartmann RK. 2006. Analysis of RNase P protein (*rnpA*) expression in *Bacillus subtilis* utilizing strains with suppressible *rnpA* expression. *J Bacteriol* 188:6816–6823. <https://doi.org/10.1128/JB.00756-06>.
- Waugh DS, Pace NR. 1990. Complementation of an RNase P RNA (*rnpB*) gene deletion in *Escherichia coli* by homologous genes from distantly related eubacteria. *J Bacteriol* 172:6316–6322. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6316-6322.1990>.
- Holzmann J, Frank P, Löffler E, Bennett KL, Gerner C, Rossmannith W. 2008. RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* 135:462–474. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.013>.
- Jarrous N, Gopalan V. 2010. Archaeal/eukaryal RNase P: subunits, functions and RNA diversification. *Nucleic Acids Res* 38:7885–7894. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq701>.
- Schencking I, Rossmannith W, Hartmann RK. 2020. Diversity and evolution of RNase P, p 255–299. In Pontarotti P (ed), *Evolutionary biology—a transdisciplinary approach*. Springer International Publishing, Cham, Switzerland.
- Kobayashi K, Ehrlich SD, Albertini A, Amati G, Andersen KK, Arnaud M, Asai K, Ashikaga S, Aymerich S, Bessieres P, Boland F, Brignell SC, Bron S, Bunai K, Chapuis J, Christiansen LC, Danchin A, Débarbouillé M, Dervyn E, Deuerling E, Devine K, Devine SK, Dreesen O, Errington J, Fillinger S, Foster SJ, Fujita Y, Galizzi A, Gardan R, Eschevins C, Fukushima T, Haga K, Harwood CR, Hecker M, Hosoya D, Hullo MF, Kakeshita H, Karamata D, Kasahara Y, Kawamura F, Koga K, Koski P, Kuwana R, Imamura D, Ishimaru M, Ishikawa S, Ishio I, Le Coq D, Masson A, Mauël C, et al. 2003. Essential *Bacillus subtilis* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4678–4683. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730515100>.
- Willkomm DK, Pfeffer K, Reuter K, Klebe G, Hartmann RK. 2016. RNase P as a drug target, p 235–256. In Liu F, Altman S (ed), *Ribonuclease P*. Springer, New York, NY.
- Gruegelsiepe H, Willkomm DK, Goudinakis O, Hartmann RK. 2003. Antisense inhibition of *Escherichia coli* RNase P RNA: mechanistic aspects. *Chembiochem* 4:1049–1056. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300675>.
- Gruegelsiepe H, Brandt O, Hartmann RK. 2006. Antisense inhibition of RNase P: mechanistic aspects and application to live bacteria. *J Biol Chem* 281:30613–30620. <https://doi.org/10.1074/jbc.M603346200>.
- Walczky D, Willkomm DK, Hartmann RK. 2016. Bacterial type B RNase P: functional characterization of the L5.1-L15.1 tertiary contact and antisense inhibition. *RNA* 22:1699–1709. <https://doi.org/10.1261/rna.057422.116>.
- Mikkelsen NE, Brännvall M, Virtanen A, Kirsebom LA. 1999. Inhibition of RNase P RNA cleavage by aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6155–6160. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6155>.
- Mikkelsen NE, Johansson K, Virtanen A, Kirsebom LA. 2001. Aminoglycoside binding displaces a divalent metal ion in a tRNA-neomycin B complex. *Nat Struct Biol* 8:510–514. <https://doi.org/10.1038/88569>.
- Eubank TD, Biswas R, Jovanovic M, Litovchick A, Lapidot A, Gopalan V. 2002. Inhibition of bacterial RNase P by aminoglycoside-arginine conjugates. *FEBS Lett* 511:107–112. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03322-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03322-1).
- Wu S, Mao G, Kirsebom LA. 2016. Inhibition of bacterial RNase P RNA by phenothiazine derivatives. *Biomolecules* 6:38. <https://doi.org/10.3390/biom6030038>.
- Liu X, Chen Y, Fierke CA. 2014. A real-time fluorescence polarization activity assay to screen for inhibitors of bacterial ribonuclease P. *Nucleic Acids Res* 42:e159. <https://doi.org/10.1093/nar/gku850>.
- Kirk SR, Tor Y. 1999. tRNA<sup>Phe</sup> binds aminoglycoside antibiotics. *Bioorganic Med Chem* 7:1979–1991. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(99\)00170-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(99)00170-4).
- Eidem TM, Lounsbury N, Emery JF, Bulger J, Smith A, Abou-Gharbia M, Childers W, Dunman PM. 2015. Small-molecule inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA-mediated RNA turnover and tRNA processing. *Antimicrob Agents Chemother* 59:2016–2028. <https://doi.org/10.1128/AAC.04352-14>.
- Lounsbury N, Eidem T, Colquhoun J, Mateo G, Abou-Gharbia M, Dunman PM, Childers WE. 2018. Novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA that synergize with mupirocin. *Bioorg Med Chem Lett* 28:1127–1131. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.01.022>.
- Madrigal-Carrillo EA, Díaz-Tufinio CA, Santamaría-Suárez HA, Arciniega M, Torres-Larios A. 2019. A screening platform to monitor RNA processing and protein-RNA interactions in ribonuclease P uncovers a small molecule inhibitor. *Nucleic Acids Res* 47:6425–6438. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz285>.
- Baell JB, Nissink JWM. 2018. Seven year itch: pan-assay interference compounds (PAINS) in 2017—utility and limitations. *ACS Chem Biol* 13:36–44. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00903>.



24. Irwin JJ, Duan D, Torosyan H, Doak AK, Ziebart KT, Sterling T, Tumanian G, Shoichet BK. 2015. An aggregation advisor for ligand discovery. *J Med Chem* 58:7076–7087. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01105>.
25. Henkels CH, Kurz JC, Fierke CA, Oas TG. 2001. Linked folding and anion binding of the *Bacillus subtilis* ribonuclease P protein. *Biochemistry* 40:2777–2789. <https://doi.org/10.1021/bi002078y>.
26. McGovern SL, Helfand BT, Feng B, Shoichet BK. 2003. A specific mechanism of nonspecific inhibition. *J Med Chem* 46:4265–4272. <https://doi.org/10.1021/jm030266r>.
27. McGovern SL, Caselli E, Grigorieff N, Shoichet BK. 2002. A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J Med Chem* 45:1712–1722. <https://doi.org/10.1021/jm010533y>.
28. Viviani LG, Piccirillo E, Cheffer A, de Rezende L, Ulrich H, Carmona-Ribeiro AM, Amaral AT. 2018. Be aware of aggregators in the search for potential human ecto-5'-nucleotidase inhibitors. *Molecules* 23:1876. <https://doi.org/10.3390/molecules23081876>.
29. Olson PD, Kuechenmeister LJ, Anderson KL, Daily S, Beenken KE, Roux CM, Reniere ML, Lewis TL, Weiss WJ, Pulse M, Nguyen P, Simecka JW, Morrison JM, Sayood K, Asojo OA, Smeltzer MS, Skaar EP, Dunman PM. 2011. Small molecule inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA alter cellular mRNA turnover, exhibit antimicrobial activity, and attenuate pathogenesis. *PLoS Pathog* 7:e1001287. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001287>.
30. Kazantsev AV, Krivenko AA, Harrington DJ, Carter RJ, Holbrook SR, Adams PD, Pace NR. 2003. High-resolution structure of RNase P protein from *Thermotoga maritima*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7497–7502. <https://doi.org/10.1073/pnas.0932597100>.
31. Lounsbury N. 2016. PhD thesis. Temple University, Philadelphia, PA.
32. Sassano MF, Doak AK, Roth BL, Shoichet BK. 2013. Colloidal aggregation causes inhibition of G protein-coupled receptors. *J Med Chem* 56:2406–2414. <https://doi.org/10.1021/jm301749y>.
33. Aldrich C, Bertozzi C, Georg GI, Kiessling L, Lindsley C, Liotta D, Merz KM, Schepartz A, Wang S. 2017. The ecstasy and agony of assay interference compounds. *J Med Chem* 60:2165–2168. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00229>.
34. Coan KED, Shoichet BK. 2008. Stoichiometry and physical chemistry of promiscuous aggregate-based inhibitors. *J Am Chem Soc* 130:9606–9612. <https://doi.org/10.1021/ja802977h>.
35. Coan KED, Maltby DA, Burlingame AL, Shoichet BK. 2009. Promiscuous aggregate-based inhibitors promote enzyme unfolding. *J Med Chem* 52:2067–2075. <https://doi.org/10.1021/jm801605r>.
36. McGovern SL, Shoichet BK. 2003. Kinase inhibitors: not just for kinases anymore. *J Med Chem* 46:1478–1483. <https://doi.org/10.1021/jm020427b>.
37. Ehler FGR, Linde K, Diederich WE. 2017. What are we missing? The detergent triton X-100 added to avoid compound aggregation can affect assay results in an unpredictable manner. *ChemMedChem* 12:1419–1423. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201700329>.
38. Feng BY, Shoichet BK. 2006. A detergent-based assay for the detection of promiscuous inhibitors. *Nat Protoc* 1:550–553. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.77>.
39. Feng BY, Shelat A, Doman TN, Guy RK, Shoichet BK. 2005. High-throughput assays for promiscuous inhibitors. *Nat Chem Biol* 1:146–148. <https://doi.org/10.1038/nchembio718>.
40. Owen SC, Doak AK, Wassam P, Shoichet MS, Shoichet BK. 2012. Colloidal aggregation affects the efficacy of anticancer drugs in cell culture. *ACS Chem Biol* 7:1429–1435. <https://doi.org/10.1021/cb300189b>.
41. Giannetti AM, Koch BD, Browner MF. 2008. Surface plasmon resonance based assay for the detection and characterization of promiscuous inhibitors. *J Med Chem* 51:574–580. <https://doi.org/10.1021/jm700952v>.
42. Stams T, Niranjankumari S, Fierke CA, Christianson DW. 1998. Ribonuclease P protein structure: evolutionary origins in the translational apparatus. *Science* 280:752–755. <https://doi.org/10.1126/science.280.5364.752>.
43. Spitzfaden C, Nicholson N, Jones JJ, Guth S, Lehr R, Prescott CD, Hegg LA, Eggleston DS. 2000. The structure of ribonuclease P protein from *Staphylococcus aureus* reveals a unique binding site for single-stranded RNA. *J Mol Biol* 295:105–115. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.3341>.
44. Ingólfsson HI, Thakur P, Herold KF, Hobart EA, Ramsey NB, Periole X, De Jong DH, Zwama M, Yilmaz D, Hall K, Marezky T, Hemmings HC, Blobel C, Marrink SJ, Koçer A, Sack JT, Andersen OS. 2014. Phytochemicals perturb membranes and promiscuously alter protein function. *ACS Chem Biol* 9:1788–1798. <https://doi.org/10.1021/cb500086e>.
45. Gaulton A, Bellis LJ, Bento AP, Chambers J, Davies M, Hersey A, Light Y, McGlinchey S, Michalovich D, Al-Lazikani B, Overington JP. 2012. ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery. *Nucleic Acids Res* 40:D1100–D1107. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr777>.
46. Baell JB, Holloway GA. 2010. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J Med Chem* 53:2719–2740. <https://doi.org/10.1021/jm901137j>.
47. Yang JJ, Ursu O, Lipinski CA, Sklar LA, Oprea TI, Bologa CG. 2016. Badapple: promiscuity patterns from noisy evidence. *J Cheminform* 8:1–14. <https://doi.org/10.1186/s13321-016-0137-3>.
48. Baell J, Walters MA. 2014. Chemistry: chemical con artists foil drug discovery. *Nature* 513:481–483. <https://doi.org/10.1038/513481a>.
49. Metz JT, Huth JR, Hajduk PJ. 2007. Enhancement of chemical rules for predicting mol des reactivity towards protein thiol groups. *J Comput Aided Mol Des* 21:139–144. <https://doi.org/10.1007/s10822-007-9109-z>.
50. Ramesh C, Nayak TK, Burai R, Dennis MK, Hathaway HJ, Sklar LA, Prossnitz ER, Arterburn JB. 2010. Synthesis and characterization of iodinated tetrahydroquinolines targeting the G protein-coupled estrogen receptor GPR30. *J Med Chem* 53:1004–1014. <https://doi.org/10.1021/jm9011802>.
51. Baell JB. 2010. Observations on screening-based research and some concerning trends in the literature. *Future Med Chem* 2:1529–1546. <https://doi.org/10.4155/fmc.10.237>.
52. Seidler J, McGovern SL, Doman TN, Shoichet BK. 2003. Identification and prediction of promiscuous aggregating inhibitors among known drugs. *J Med Chem* 46:4477–4486. <https://doi.org/10.1021/jm030191r>.
53. Trösken ER, Adamska M, Arand M, Zarn JA, Patten C, Völkel W, Lutz WK. 2006. Comparison of lanosterol-14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) of human and *Candida albicans* for inhibition by different antifungal azoles. *Toxicology* 228:24–32. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.08.007>.
54. Wang A, Bolen DW. 1997. A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. *Biochemistry* 36:9101–9108. <https://doi.org/10.1021/bi970247h>.
55. Qu Y, Bolen CL, Bolen DW. 1998. Osmolyte-driven contraction of a random coil protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9268–9273. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.16.9268>.
56. Niranjankumari S, Kurz JC, Fierke CA. 1998. Expression, purification and characterization of the recombinant ribonuclease P protein component from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res* 26:3090–3096. <https://doi.org/10.1093/nar/26.13.3090>.
57. Krivenko AA, Kazantsev AV, Adamidi C, Harrington DJ, Pace NR. 2002. Expression, purification, crystallization and preliminary diffraction analysis of RNase P protein from *Thermotoga maritima*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58:1234–1236. <https://doi.org/10.1107/s0907444902007965>.
58. Roux CM, DeMuth JP, Dunman PM. 2011. Characterization of components of the *Staphylococcus aureus* mRNA degradosome holoenzyme-like complex. *J Bacteriol* 193:5520–5526. <https://doi.org/10.1128/JB.05485-11>.
59. Giraud C, Hausmann S, Lemeille S, Prados J, Redder P, Linder P. 2015. The C-terminal region of the RNA helicase CshA is required for the interaction with the degradosome and turnover of bulk RNA in the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus*. *RNA Biol* 12:658–674. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1035505>.
60. Wang X, Wang C, Wu M, Tian T, Cheng T, Zhang X, Zang J. 2017. Enolase binds to RnpA in competition with PNPase in *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* 591:3523–3535. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12859>.
61. Wegscheid B, Hartmann RK. 2007. *In vivo* and *in vitro* investigation of bacterial type B RNase P interaction with tRNA 3'-CCA. *Nucleic Acids Res* 35:2060–2073. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm005>.
62. Gößringer M, Helmecke D, Köhler K, Schön A, Kirsebom LA, Bindereif A, Hartmann RK. 2014. Enzymatic RNA synthesis using bacteriophage T7 RNA polymerase, p 3–27. In Hartmann RK, Bindereif A, Schön A, Westhof E (ed), *Handbook of RNA biochemistry*, 2nd ed. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.
63. Pavlova LV, Gößringer M, Weber C, Buzet A, Rossmannith W, Hartmann RK. 2012. tRNA processing by protein-only versus RNA-based RNase P: kinetic analysis reveals mechanistic differences. *Chembiochem* 13:2270–2276. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200434>.
64. Nickel AI, Wäber NB, Gößringer M, Lechner M, Linne U, Toth U, Rossmannith W, Hartmann RK. 2017. Minimal and RNA-free RNase P in *Aquifex aeolicus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:11121–11126. <https://doi.org/10.1073/pnas.1707862114>.
65. Paul R, Lazarev D, Altman S. 2001. Characterization of RNase P from *Thermotoga maritima*. *Nucleic Acids Res* 29:880–885. <https://doi.org/10.1093/nar/29.4.880>.

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

### **RNase P inhibitors identified as aggregators**

Isabell Schencking<sup>1</sup>, Eva M. Schäfer<sup>1</sup>, J. H. William Scanlan<sup>1,2</sup>, Benjamin M. Wenzel<sup>1</sup>,  
Rolf E. Emmerich<sup>1</sup>, Torsten Steinmetzer<sup>1</sup>, Wibke E. Diederich<sup>1,2</sup>, Martin Schlitzer<sup>1</sup>,  
Roland K. Hartmann<sup>1,#</sup>

<sup>1</sup>Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg, Marbacher Weg 6,  
35037 Marburg, Germany

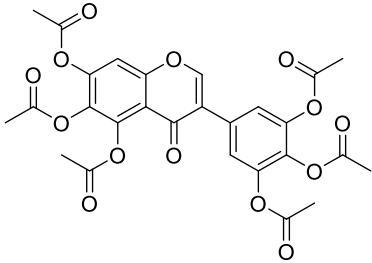
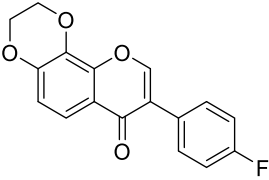
<sup>2</sup>Zentrum für Tumor- und Immunbiologie, Philipps-Universität Marburg, Hans-Meerwein-  
Straße 3, 35043 Marburg, Germany

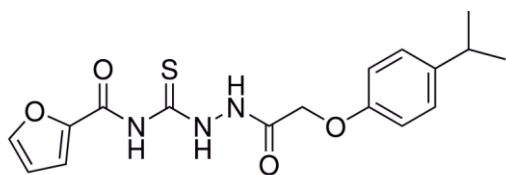
#corresponding author:

E-mail: [roland.hartmann@staff.uni-marburg.de](mailto:roland.hartmann@staff.uni-marburg.de)

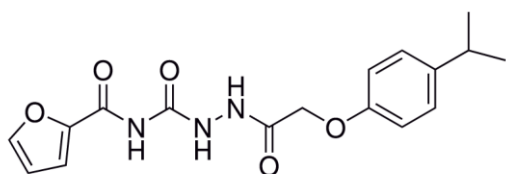
## Supplementary Tables and Figures

**Table S1: Ir6Ac aggregator prediction**

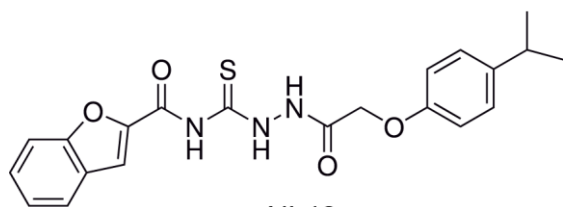
Compound	Structure	Previously reported aggregator (structure)	Tanimoto Similarity Index Value (%)	Reference
Ir6Ac			70	(Ferreira <i>et al.</i> , 2010)



RNPA2000



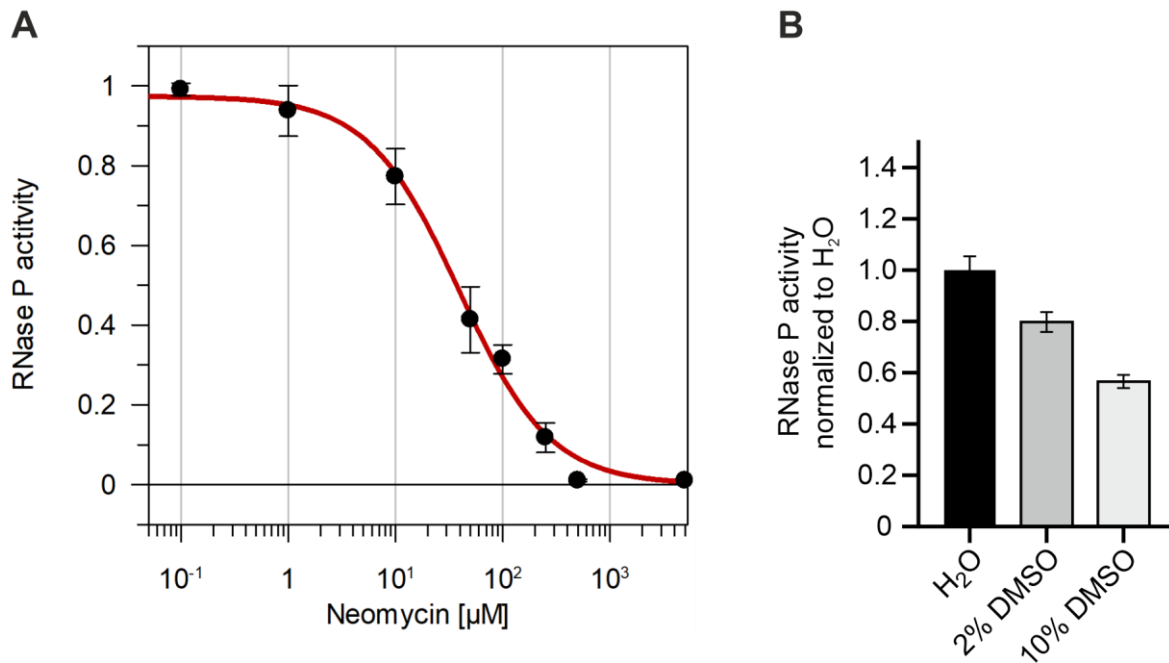
NL20



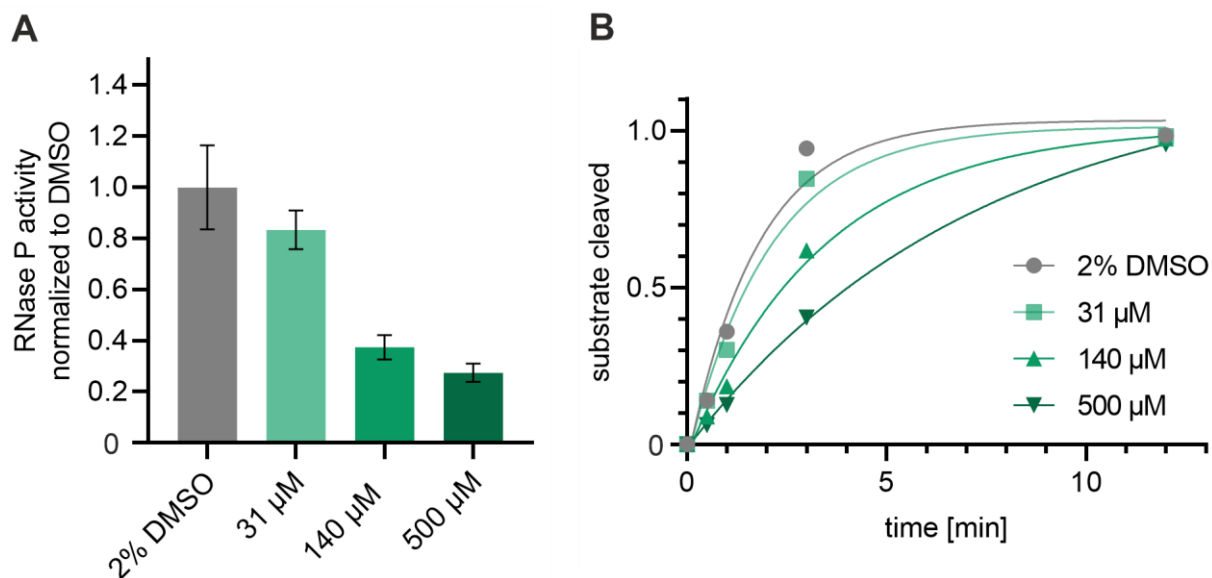
NL48

**Fig. S1: Chemical structures of RNPA2000, NL20 and NL48.** RNPA2000 has a thiosemicarbazide core, NL20 a semicarbazide core, and NL48 differs from RNPA2000 by carrying a terminal benzofuran instead of a furan ring.

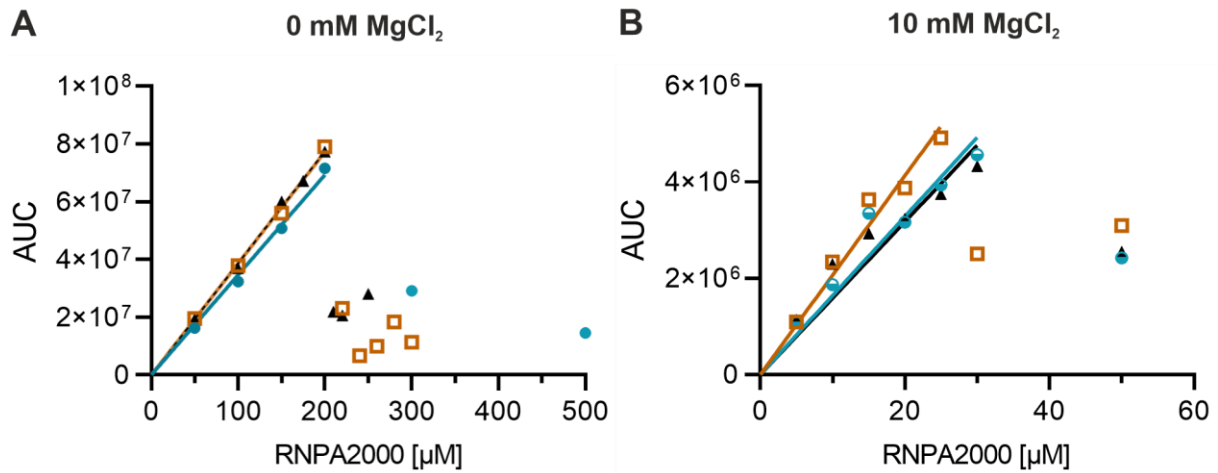




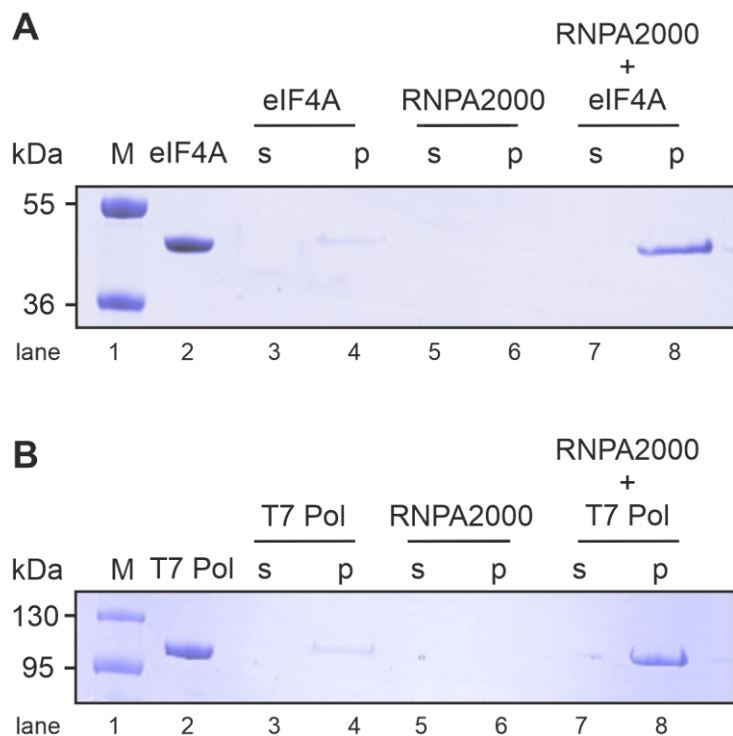
**Fig. S2: *T. maritima* RNase P inhibition controls. (A)**  $IC_{50}$  determination for inhibition with neomycin sulfate. Kinetics were performed with 50 nM *T. maritima* RNase P (equal amount of P RNA and RnpA protein) and 500 nM pre-tRNA<sup>Gly</sup> substrate in KIN buffer with 10 mM MgCl<sub>2</sub> and without DMSO. The  $IC_{50}$  was determined as 39.1  $\mu$ M  $\pm$  5.5  $\mu$ M, obtained by curve fitting (Grafit version 5.0.13, Erithacus Software) to the equation: 
$$RNase\ P\ activity = \frac{1}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^s}$$
, with  $s$  indicating a slope factor and  $I$  the inhibitor (neomycin) concentration. Mean values ( $\pm$  standard error of the mean, SEM) based on at least three replicates were normalized to reactions in the absence of neomycin. **(B)** Influence of DMSO on enzyme activity. Enzyme/substrate concentrations and buffer were the same as in panel A. Mean values ( $\pm$  SEM) based on at least three replicates were normalized to reactions in the absence of DMSO (H<sub>2</sub>O).



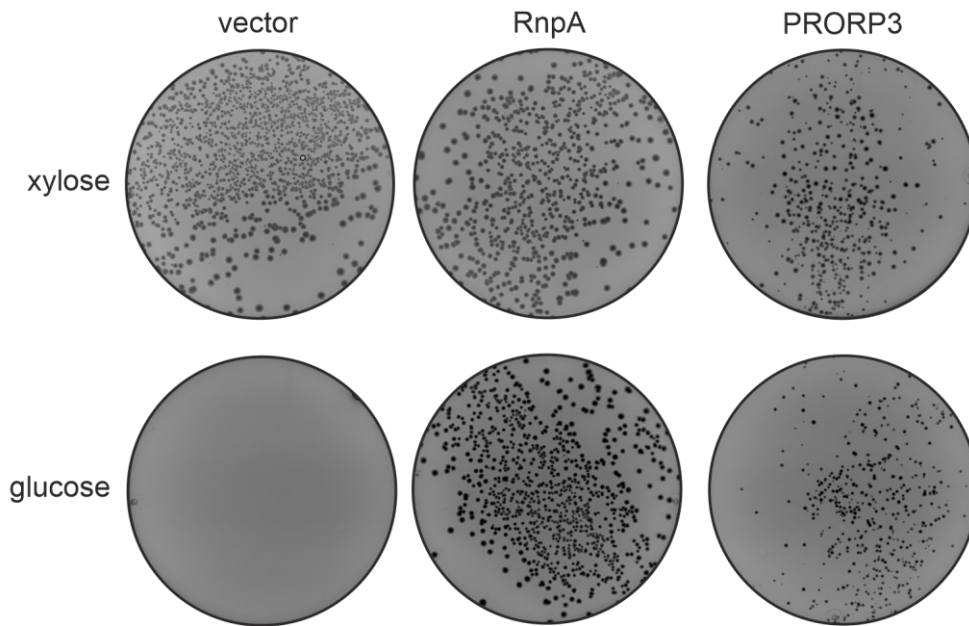
**Fig. S3: Concentration-dependent inhibition of *T. maritima* RNase P by RNPA2000.** **(A)** Conditions were identical to those used in the experiments shown in Fig. 1A of the main text. 140  $\mu$ M RNPA2000 corresponds to the  $IC_{50}$  value reported for inhibition of *Staphylococcus aureus* RNase P (Lounsbury *et al.*, 2018); at 31  $\mu$ M RNPA2000, only minor inhibition was observed previously and 500  $\mu$ M caused almost complete inhibition (Eidem *et al.*, 2015). Mean values ( $\pm$  SEM) based on at least three replicates were normalized to reactions at 2% DMSO but lacking RNPA2000. **(B)** Single exponential fittings for one experimental set that contributed to the summary panel A.



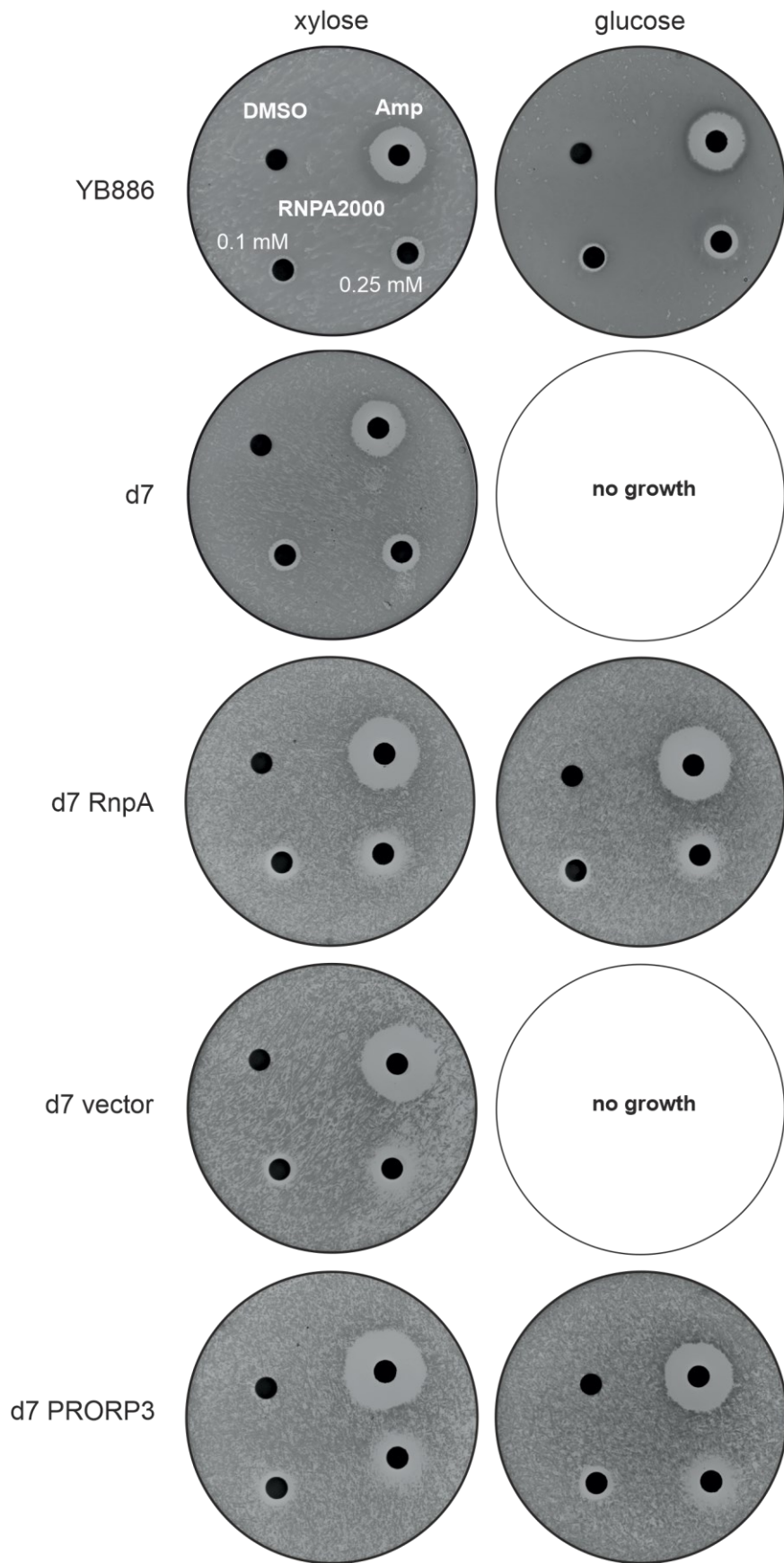
**Fig. S4: HPLC solubility measurements.** Example measurements for RNPA2000 in KIN buffer and 2% DMSO, either **(A)** without Mg<sup>2+</sup> or **(B)** supplemented with 10 mM Mg<sup>2+</sup>. Three independent experiments are marked by different symbols. Concentration ranges were chosen based on initial microscopy results. The determined AUC ('area under the curve') values follow a straight line until this correlation collapses; the last point on the straight line (200 μM in panel A, ~30 μM in panel B) was taken as the solubility limit.



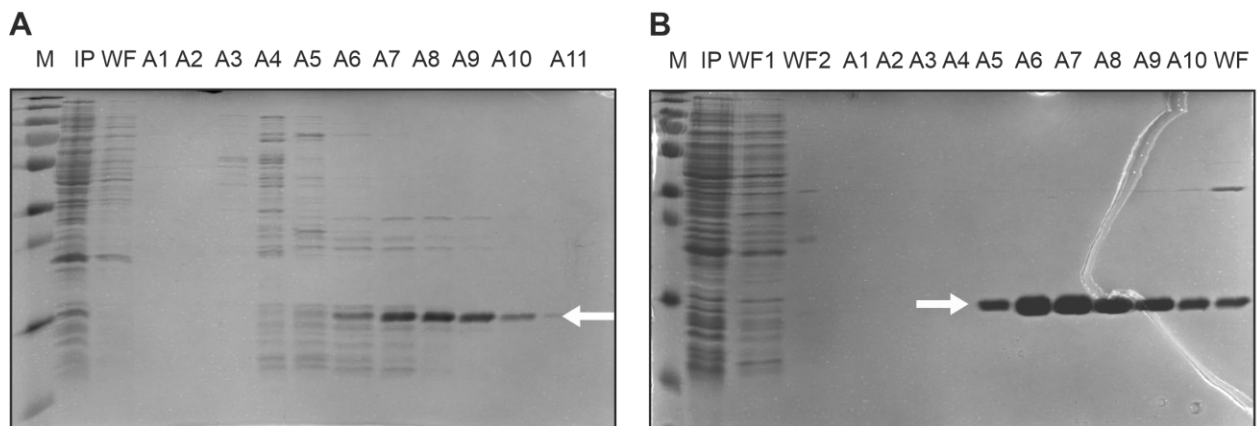
**Fig. S5: Co-sedimentation experiments of nucleic acid binding proteins with RNPA2000.** s, supernatant; p, pellet; lane 1, marker (M) proteins in ddH<sub>2</sub>O, with band sizes (in kDa) indicated on the left; lane 2, 2  $\mu$ g of protein from stock solution; lanes 3 and 4, derived from 1-mL solutions containing 5  $\mu$ g protein only; lanes 5 and 6, derived from 1-mL solutions containing 140  $\mu$ M RNPA2000 only; lanes 7 and 8, derived from 1-mL solutions containing 5  $\mu$ g protein and 140  $\mu$ M RNPA2000. **(A)** SDS-Gel for co-sedimentation analysis with recombinant human helicase eIF4A. Samples in lanes 3-8 were adjusted to the corresponding enzyme storage buffer (20 mM HEPES-KOH pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol and 1 mM DTT) and contained 2% DMSO. **(B)** SDS-Gel for co-sedimentation analysis with T7 RNA polymerase. Samples in lanes 3-8 were adjusted to the corresponding enzyme storage buffer (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.7, 0.5 mM EDTA, 2.5% glycerol and 5 mM NaCl) and contained 2% DMSO. For more details, see Materials and Methods of the main manuscript.



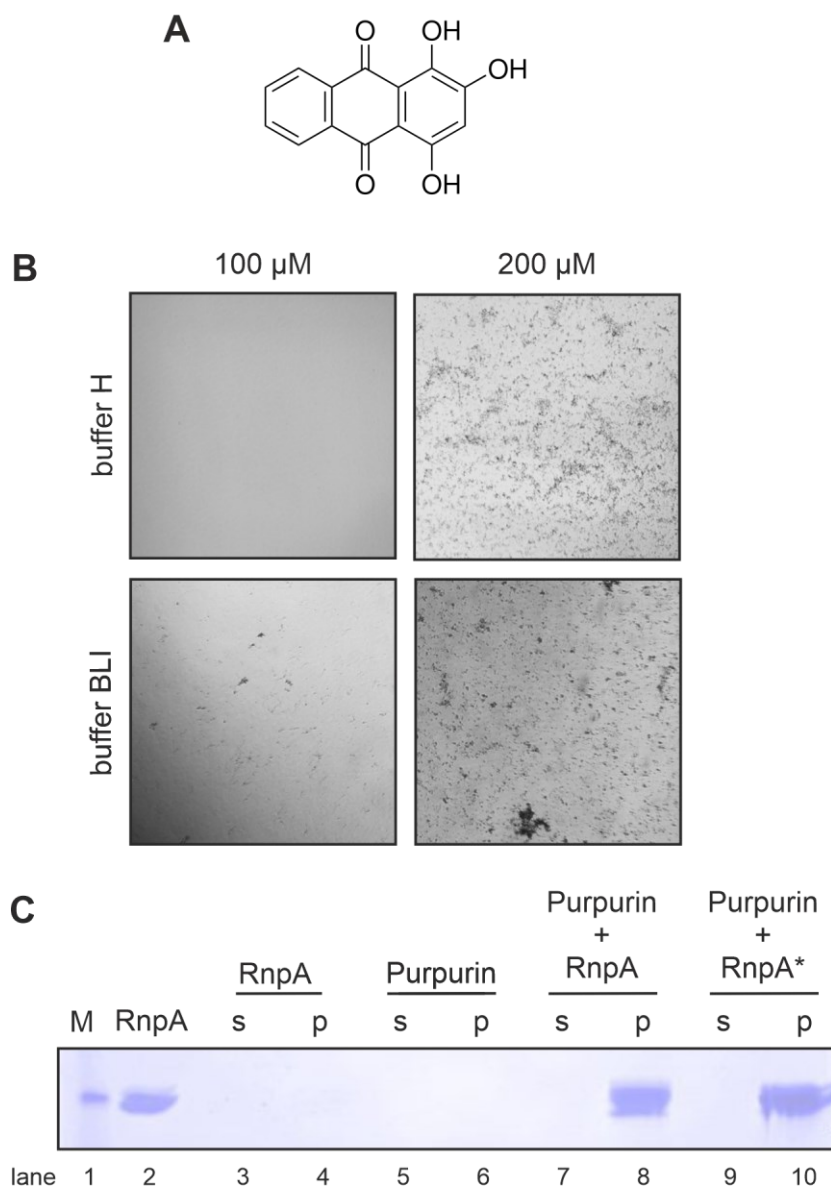
**Fig. S6: PRORP3 complementation of *B. subtilis* strain d7.** Agar plates of *B. subtilis* strain d7 transformed with the empty vector pDG148 (vector) or the same plasmid expressing *B. subtilis* RnpA or *Arabidopsis thaliana* PRORP3. Cells were grown for 42 h at 37°C under permissive (2% xylose) or nonpermissive (2% glucose) conditions. For more details, see Materials and Methods of the main manuscript.



**Fig. S7: Disk diffusion test to analyze the antibacterial effects of RNPA2000.** Shown are LB agar plates of different *B. subtilis* strains: YB886, the progenitor of strain d7 (Gößringer *et al.*, 2006), strain d7 itself, and strain d7 transformed with the empty vector pDG148 or the same plasmid encoding *B. subtilis* RnpA or *Arabidopsis thaliana* PRORP3. Cells were grown overnight at 37°C under permissive (2% xylose) or nonpermissive (2% glucose) conditions. The diameter of the inhibition zone was measured for 3 to 4 biological replicates using a ruler; the data are summarized in Table 2 of the main manuscript.



**Fig. S8: *S. aureus* RnpA purification.** (A) Native purification with Ni-NTA affinity chromatography. The image shows a Coomassie-stained SDS gel loaded with the different elution fractions. The protein was eluted by applying a linear gradient from 20 to 500 mM imidazole over 20 mL (1 mL/min flow rate) obtained by mixing buffer 1 (50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mM NaCl and 20 mM imidazole) and buffer 2 with the same composition but containing 500 mM imidazole. The protein of interest at ~15 kDa is marked with the white arrow. For elution fraction A8 an  $A_{260}:A_{280}$  ratio of 1.93 was determined, indicating the presence of residual RNA associated with RnpA. (B) Ni-NTA affinity chromatography under denaturing conditions. Elution was carried out in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 10% glycerol, 7 M urea and 20 mM EDTA by applying a linear gradient from 20 to 500 mM imidazole over 20 mL with a flow rate of 1 mL/min. For fraction A5, an  $A_{260}:A_{280}$  ratio of 0.665 was determined, indicating the absence of associated nucleic acids. M, protein marker; IP, Input material loaded onto the column; WF, wash fractions; A, elution fractions. For more details, see Supplementary Materials and Methods.



**Fig. S9: Purpurin solubility and RnpA co-sedimentation analysis.** (A) structure of the 1,2,4-Trihydroxyanthraquinone purpurin. (B) Microscopy of purpurin in two different buffers: buffer H (33 mM Tris-HCl, 66 mM HEPES, pH 7.4, 400 mM  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ , 100 mM  $\text{MgCl}_2$  and 10% DMSO) that was previously used for enzyme kinetics with a minihelix substrate, and buffer BLI (20 mM HEPES pH 7.4, 100 mM  $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ , 10 mM  $\text{MgCl}_2$  and 2.5% DMSO) used for bilayer interferometry (Madrigal-Carrillo *et al.*, 2019). 200  $\mu$ L solutions with either 100  $\mu$ M or 200  $\mu$ M purpurin were prepared. (C) SDS-PAGE of a co-sedimentation experiment with purpurin; s, supernatant; p, pellet; lane 1, a 15-kDa marker (M) protein; lane 2, 1  $\mu$ g of *T. maritima* RnpA; lanes 3 and 4, derived from 1-mL solution containing 5  $\mu$ g *T. maritima* RnpA only; lanes 5 and 6, derived from 1-mL solution containing 100  $\mu$ M purpurin only; lanes 7 and 8, derived from 1-mL solution containing 5  $\mu$ g *T. maritima* RnpA and 100  $\mu$ M purpurin. Samples in lanes 3-8 were in buffer H containing 100 mM  $\text{MgCl}_2$  and 10% DMSO. Lanes 9 and 10, as lanes 7 and 8, respectively, but without  $\text{MgCl}_2$  (marked by \*).



## Supplementary Materials and Methods

### Cloning of *S. aureus rnpA* and *rnpB* genes

The *S. aureus rnpB* gene was amplified by PCR from plasmid pHY300 *S. aureus* P<sub>BS</sub> *rnpB rnpBwt* (Wegscheid & Hartmann, 2007) using primers 19\_Saur\_rnpB\_T7 and 20\_Saur\_rnpB\_T7rev. The PCR product was digested with BamHI and SacI and cloned into pUC18 cut with the same restriction enzymes. The *S. aureus rnpA* was amplified from plasmid pDG\_ *S. aureus\_rnpA* (Gößringer & Hartmann, 2007) with primer pair 11\_Saur\_rnpA and 12\_Saur\_rnpArev and cloned into vector pJET 1.2 using the Thermo Fisher Scientific ClonJET PCR Cloning Kit. The resulting pJET derivative plasmid was utilized as template for another PCR performed with primer pair 15\_Saur\_rnpAnHis\_pET and 16\_Saur\_rnpAnHis\_pETrev. After digestion with NdeI and Bpu1102I, this PCR product was cloned into pET28a(+) cut with the same enzymes.

## PCR primers used for amplification of *S. aureus* *rnpA* and *rnpB*

Primer	Sequence 5' → 3'
19_Saur_rnpB_T7	TTTTTTGAGCTCTTAATACGACTGACTATAGGTGATA TTTTGGGTAATCGCTATATTATATAG (SacI site underlined)
20_Saur_rnpB_T7rev	TTTTTTGGATCCACTAGTAGTGATATTTCTATAAGCC ATG (BamHI site underlined)
11_Saur_rnpA	CCATGGATGTTATTGGAAAAAGCTTACCGAATTA AGAA
12_Saur_rnpArev	CTCGAGCTTAATCTTTTTATTA AAAACTTTGGCAATTT TAAGT
15_Saur_rnpAnHis_pET	TTTTTTCATATGTTATTGGAAAAAGCTTACCGAATTA AAAAGAA (NdeI site underlined)
16_Saur_rnpAnHis_pETrev	TTTTTTGCTCAGCTTACTTAATCTTTTTATTA AAAACT TTGGCAATTTTAAGT (Bpu1102I site underlined)
17_pUC18-T7-Sau rnpB	ATATATATATATAATACGACTCACTATAGG
18_pUC18-T7-Sau rnpB rev	ACTAGTAGTGATATTTCTATAAGCATG

## *In vitro* transcription and 5'-[<sup>32</sup>P]-endlabeling of RNA

*T. thermophilus* pre-tRNA<sup>Gly</sup> as well as P RNAs from *T. maritima*, *S. aureus* and *B. subtilis* were synthesized by *in vitro* run-off transcription using T7 RNA polymerase. Transcription reactions, using either linearized plasmid DNAs or PCR products as template, were incubated for 4 h at 37°C under the conditions specified below. Subsequently, RNAs were purified by phenol extraction followed by chloroform extraction and ethanol precipitation (Gößringer *et al.*, 2014). The RNA pellet obtained after centrifugation was redissolved in ddH<sub>2</sub>O and further purified by 8% denaturing (8 M Urea) PAGE. The band of interest was visualized by UV shadowing, excised from the gel and eluted overnight at 4°C in 1 M NaCH<sub>3</sub>COO pH 5.0 under shaking. RNA eluates

were concentrated by ethanol precipitation. Dephosphorylation and 5'-[<sup>32</sup>P]-endlabeling of pre-tRNA<sup>Gly</sup> was performed as described (Pavlova *et al.*, 2012; Nickel *et al.*, 2017).

### Templates used for T7 transcription

<i>in vitro</i> transcribed RNA	Plasmid/PCR template	<i>in vitro</i> transcription conditions
<i>T. thermophilus</i> ptRNA <sup>Gly</sup>	plasmid pSBpt3'hh (Busch <i>et al.</i> , 2000), linearized with BamHI	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 80 mM HEPES pH 7.5, 1 mM spermidine, 5 mM DTT, 5 ng/μL pyrophosphatase, 3.75 mM each NTP, 5% DMSO
<i>T. maritima</i> P RNA	plasmid pUC19-T7-Tma rnpB (Reiter <i>et al.</i> , 2010), linearized with BtgI	10 mM MgCl <sub>2</sub> , 80 mM HEPES pH 7.5, 1 mM spermidine, 10 mM DTT, 10 ng/μL pyrophosphatase, 4 mM each NTP, 5% DMSO
<i>S. aureus</i> P RNA	PCR fragment pUC18-T7-Sau rnpB using primer pair 17/18 (see above)	20 mM MgCl <sub>2</sub> , 80 mM HEPES pH 7.5, 1 mM spermidine, 15 mM DTT, 10 ng/μL pyrophosphatase, 4 mM each NTP, 5% DMSO
<i>B. subtilis</i> P RNA	Plasmid pDW 66 (Smith <i>et al.</i> , 1992), linearized with DraI	33 mM MgCl <sub>2</sub> , 80 mM HEPES pH 7.5, 1 mM Spermidine, 5 mM DTT, 5 ng/μL pyrophosphatase, 3.75 mM each NTP

### Expression and purification of recombinant *S. aureus* rnpA\_nHis

N-terminally His-tagged *S. aureus* RnpA (RnpA\_nHis) was expressed in *E. coli* Rosetta cells at 37°C using auto induction medium [LB medium supplemented with 0.05% (w/v) glucose, 0.2% (w/v) lactose, 50 μg/mL kanamycin and 30 μg/ml chloramphenicol]. Cells were grown overnight at 220 rpm and 37°C and harvested by centrifugation on the next day (30 min at 1160 x g and 4°C). The cells were resuspended in 15 mL lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.3 M NaCl, 0.1 % Triton X-100 and 1 M NH<sub>4</sub>Cl) and, after addition of 10% (v/v) glass beads, transferred to a FastPrep-24 5G instrument (MP Biomedicals)

for cell lysis (4 cycles). The His-tagged protein was purified by affinity chromatography using a HisTrap column and an ÄKTA FPLC system. The purification was carried out under denaturing conditions essentially as described for the *E. coli* RnpA\_nHis protein (Wegscheid & Hartmann, 2006). After equilibration of the column with lysis buffer and loading of the sample, the column was washed with washing buffer WB (30 mM imidazole, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M urea, 0.1% Triton X-100). The protein was eluted by applying a linear gradient from 30 to 300 mM imidazole over 20 mL (flow rate: 1 mL/min) by mixing WB and elution buffer EB (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 10% glycerol, 7 M urea, 20 mM EDTA, 0.3 M imidazole). The protein eluted at 140 to 300 mM imidazole. After dialysis overnight at 4°C against dialysis buffer DB (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 100 mM NaCl, 10% glycerol) for refolding of the protein, the sample was applied to a weak cation exchanger (HiTrap CM Sepharose FF, 5 mL) for further purification. The column was equilibrated with DB buffer, the protein sample was loaded and elution was carried out using a linear gradient from 100 mM to 1 M NaCl by mixing DB and elution buffer EB2 (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 M NaCl, 10% glycerol). The protein eluted at 750 - 900 mM NaCl. The eluate was dialyzed against DB buffer overnight at 4°C and stored at -20°C.

### **Expression and purification of recombinant *B. subtilis* rnpA**

*E. coli* BL21(DE3)pLysS cells transformed with plasmid pPWT1 (Niranjanakumari *et al.*, 1998) were used for protein expression. Recombinant protein was purified as described previously (Niranjanakumari *et al.*, 1998). Briefly, weak cation exchange (HiTrap CM Sepharose FF, 5 mL) chromatography was first performed under denaturing conditions

(10 M urea), followed by a second chromatography step using the same column but run under native conditions.

### **Expression and purification of recombinant *T. maritima* rnpA**

*E. coli* BL21(DE3)pLysS cells, transformed with plasmid pGEX4T-Tma\_rnpA (Krivenko *et al.*, 2002), were used for *T. maritima* RnpA expression. Cells were grown in LB medium at 37°C (5 L baffled Erlenmeyer flasks, 120 rpm, Innova 4230 incubation shaker, New Brunswick Scientific) and protein expression was induced with 0.5 mM IPTG at an OD<sub>600</sub> of 0.4 followed by incubation under shaking for 1 h at 37°C and for 22 h at 15°C. This deviates from the original protocol (Krivenko *et al.*, 2002) using 1 mM IPTG for induction and performing the expression for 6-7 h at 37 °C, but resulted in higher protein yields. Cells were harvested by centrifugation (14,300 x g for 2 h) and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA, 5% glycerol, 0.1% Triton X-100, pH 7.5; 200 mL per 1 L of cell culture) and subjected to cell lysis via sonication (Sonifier 250, Branson; 3 cycles of 5 min at 30% duty cycle and output control 4). The GST tag was cleaved off by adding 15 U/mL Thrombin and incubation overnight at room temperature. After centrifugation at 75,600 x g for 1 h, an extra heating step of the supernatant at 65°C for 30 min (note that *T. maritima* RnpA is thermostable) was performed, which deviates from the original protocol (Krivenko *et al.*, 2002). After another round of centrifugation (75,600 x g, 1 h), the lysate supernatant was dialyzed against dialysis buffer 1 (50 mM Tris-HCl, 4 mM EDTA, 4 M urea, pH 7.5). Using an ÄKTA FPLC system, the lysate was then loaded onto a weak cation exchange column (HiPrep CM FF 16/10, GE Healthcare) that had been equilibrated with binding buffer 1

(50 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, 4 M urea, pH 7.5). The protein was eluted with a linear gradient from 0 to 2 M NaCl (flow rate: 2 ml/min) by mixing binding buffer 1 and elution buffer 1 (50 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, 4 M urea, 2 M NaCl, pH 7.5). The protein eluted at 1.2 to 1.4 M NaCl. For refolding of the protein, dialysis was performed for 4 h against dialysis buffer 2 (50 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7.5) and overnight against dialysis buffer 3 (50 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, 200 mM NaCl, pH 7.5) without urea. For further purification, the dialyzed eluate was loaded onto a strong cation exchange column (Mono S, GE Healthcare) equilibrated with binding buffer 2 (50 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.5). For protein elution, a linear gradient from 0.2 to 2 M NaCl was applied by mixing binding buffer 2 and elution buffer 4 (50 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7.5). The protein eluted at 1.4 to 1.6 M NaCl. After dialysis against storage buffer 4 (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5), the protein was stored at a concentration of ~10 mg/mL at 4°C.

### ***T. maritima* RNase P enzyme kinetics**

All inhibition assays were performed under multiple turnover conditions using a 10-fold excess of substrate over enzyme. Pre-tRNA<sup>Gly</sup> and P RNA were preincubated for 5 min at 65°C, followed by 2 min at 50°C and 2 min at 40°C in reaction buffer KIN (20 mM HEPES-KOH, pH 7.4; 150 mM NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO; 2 mM spermidine; 50 μM spermine; 4 mM β-mercaptoethanol) containing 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Then the RnpA protein was added to the P RNA in stoichiometric amounts and holoenzyme assembly was carried out at 25°C for 15 min. 14-μL aliquots of the preassembled holoenzyme were combined with the potential inhibitor or the corresponding amount of DMSO only (16 μL final volume),

followed by preincubation at 25°C for 15 min. In parallel, the pre-tRNA<sup>Gly</sup> was incubated at 25°C for 30 min, followed by a shift to the optimal reaction temperature (50°C) (Paul *et al.*, 2001) for 5 min. Thereafter, the processing reaction was started by combining 4 µL of substrate solution and 16 µL of enzyme/inhibitor mix or enzyme/DMSO-only solution to a final concentration of 50 nM enzyme and 500 nM substrate, if not stated otherwise. For visualization, trace amounts (< 5 nM) of 5'-[<sup>32</sup>P]-end-labeled pre-tRNA<sup>Gly</sup> were included in the substrate solution adjusted to 5,000 Cherenkov cpm per 20 µL reaction volume. 4-µl aliquots were withdrawn at different time points and analyzed by 20% denaturing PAGE. First-order rate constants of cleavage ( $k_{obs}$ ) were calculated by nonlinear regression analysis (Grafit version 5.0.13, Erithacus Software). fitting the data to the equation for a single exponential:  $A_t = A \times (1 - e^{-k_{obs} \times t})$  ( $A_t$  = amount of tRNA cleaved at time point  $t$ ,  $A$  = fraction of substrate cleaved at the endpoint); as the reaction was performed in the presence of a 10-fold excess of unlabeled pre-tRNA<sup>Gly</sup> over enzyme, the  $k_{obs}$  value obtained by the curve fit was multiplied by 10. For calculating RNase P activity in the presence of a potential inhibitor the following formula was used:

$$\text{RNase P activity [\%]} = \frac{k_{obs} (\text{inhibitor in DMSO})}{k_{obs} (\text{DMSO only})}$$

### ***S. aureus* RNase P enzyme kinetics**

Kinetics using the *S. aureus* RNase P holoenzyme were performed in KIN buffer containing 10 mM MgCl<sub>2</sub> in the presence of 50 nM enzyme and 500 nM substrate. Unlabeled pre-tRNA<sup>Gly</sup> and trace amounts (<5 nM) of 5'-[<sup>32</sup>P]-end-labeled pre-tRNA<sup>Gly</sup> were incubated for 5 min at 55°C and 35 min at 37°C. *S. aureus* P RNA was incubated

for 5 min at 55°C and for 15 min at 37°C before addition of RnpA protein and holoenzyme assembly for 5 min at 37°C. Here, a twofold molar excess of RnpA protein over P RNA was used. The potential inhibitor or the corresponding amount of DMSO only were added to 14 µL of enzyme solution (16 µL final volume) and the mixture was incubated for 15 min at 37°C. After this preincubation step, the reaction (at 37°C) was started by adding 4 µL of pre-tRNA<sup>Gly</sup> solution to 16 µL of enzyme/inhibitor mix or enzyme/DMSO-only solution. Evaluation and calculation of RNase P activity was performed as described above for the *T. maritima* enzyme.

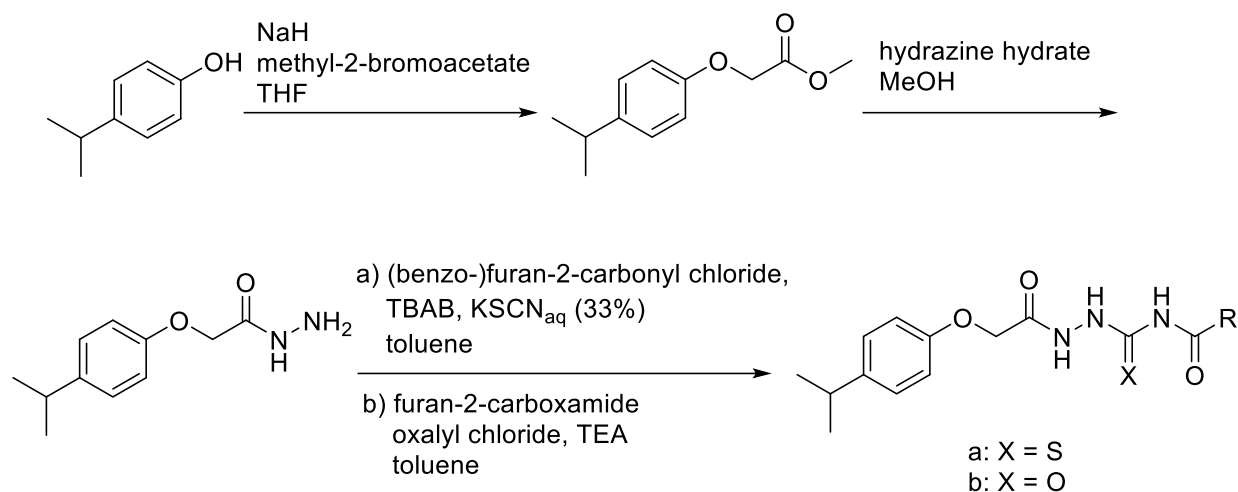
### ***B. subtilis* RNase P enzyme kinetics**

Kinetics with the *B. subtilis* holoenzyme were performed as with the *S. aureus* holoenzyme, except that 5 instead of 10 mM MgCl<sub>2</sub> and stoichiometric amounts of RnpA protein and P RNA were combined for holoenzyme assembly. In addition, holoenzyme/inhibitor incubation was prolonged from 15 to 40 min for Ir6Ac testing. Experiments with Ir6Ac were carried out either with 10 nM enzyme and 100 nM substrate or 1 nM enzyme and 10 nM substrate.

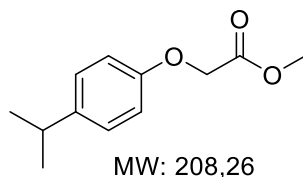
### **Synthesis of RNPA2000, NL20 and NL48**

The key step of the synthesis is formation of the functional diacylthiosemicarbazide or diacylsemicarbazide moieties by the use of heterocumulenes or the intermediate formation of such during the reaction.





### Methyl-2-(4-isopropylphenoxy)acetate



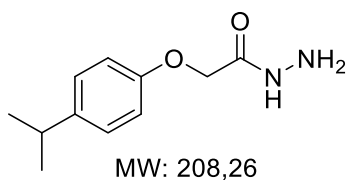
1.2 eq NaH (60 % in paraffin, 260 mg, 6.5 mmol) were suspended in dry THF under an argon atmosphere and stirred at 0 °C for 10 min. 885 mg 4-isopropylphenol (1.2 eq, 6.5 mmol) solved in THF were added carefully to the basic solution and stirred at 0 °C for another 45 min. Then methyl-2-bromoacetate (0.51 mL, 5.4 mmol, 1.0 eq) was dropped slowly into the solution. The reaction mixture was stirred at RT overnight and worked up via extraction from brine into diethyl ether. The combined organic layers were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and the solvent was evaporated under reduced pressure. Methyl-2-(4-isopropylphenoxy)acetate was received quantitatively (5.4 mmol, 1.12 g) (Sarges *et al.*, 1996).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 7.16-7.14 (m, 2H, **H**<sub>2Ar</sub>&**H**<sub>6Ar</sub>), 6.85- 6.83 (m, 2H, **H**<sub>3Ar</sub>&**H**<sub>5Ar</sub>), 4.62 (s, 2H, **CH**<sub>2</sub>), 3.81 (s, 3H, **OCH**<sub>3</sub>), 2.86 (m, 1H, **(CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**CH**) 1.23-1.21 (m, 6H, **(CH**<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**CH**).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ = 169.8 (C=O), 156.0 (C<sub>Ar</sub>OCH<sub>2</sub>), 142.4 (C<sub>Ar</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 127.6 (2C, C<sub>Ar</sub>3&C<sub>Ar</sub>5), 114.6 (2C, C<sub>Ar</sub>2&C<sub>Ar</sub>6), 65.6 (OCH<sub>2</sub>CO), 52.4 OCH<sub>3</sub>), 33.4 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.3 (2C, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>3</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 231.0992; found: 231.0992.

### 2-(4-Isopropylphenoxy)acetohydrazide



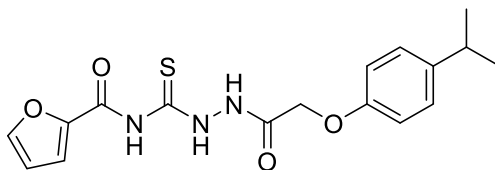
2.37 g methyl-2-(4-isopropylphenoxy)acetate (11.4 mmol, 1.0 eq) were solved in methanol (1.0 mL/mmol ester). 2.0 eq of hydrazine hydrate (22.8 mmol, 1.4 mL) were added and the reaction mixture was refluxed for 5 h. The resulting residue was filtered off and recrystallised from methanol. 2-(4-Isopropylphenoxy)acetohydrazide was received in 85 % (9.67 mmol, 2.01 g) yield (Degenhardt, 2013).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ = 9.28 (1H, NH), 7.15-7.13 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>3&H<sub>Ar</sub>5), 6.88-6.86 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>2&H<sub>Ar</sub>6), 4.44 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.31 (br, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.88-2.77 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.17-1.16 (d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ = 166.8 (C=O), 155.9 (C<sub>Ar</sub>1), 141.0 (C<sub>Ar</sub>4), 127.1 (2C, C<sub>Ar</sub>3&C<sub>Ar</sub>5), 114.5 (2C, C<sub>Ar</sub>2&C<sub>Ar</sub>6), 66.3 (CH<sub>2</sub>), 32.6 (CH), 24.14 (2C, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>[M+H]<sup>+</sup>: 209.1285; found: 209.1290.

## RNPA2000



MW: 361,42

222 mg Furan-2-carbonyl chloride (1.0 eq, 1.7 mmol) were dissolved in toluene (1 ml/mmol) and 3 mol% TBAB (Tetra-n-butylammonium bromide) were added. Then 1.98 mL of an aqueous solution of KSCN (33 %, 3.0 eq) were added and the two layers mixture was stirred intensively for 2 h at RT. The organic layer was separated and 500 mg (1.4 eq, 2.3 mmol) of 2-(4-isopropylphenoxy)acetohydrazide were added to the organic layer. The reaction mixture was stirred at RT for another hour. The resulting solid was filtered and recrystallised from ethanol. RNPA2000 was obtained in 94 % (580 mg, 1.61 mmol) yield (Reeves *et al.*, 1981).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ = 12.31 (br 1H, C(O)NHC(S)), 11.53 (s, 1H, C(S)NHNH), 10.94 (s, 1H, C(S)NHNH), 8.05 (s, 1H, H<sub>Furyl5</sub>), 7.84-7.83 (m, 1H, H<sub>Furyl3</sub>), 7.17-7.16 (m, 2H, H<sub>Isopropylphenol3&H<sub>Isopropylphenol5</sub></sub>), 6.93-6.92 (m, 2H, H<sub>Isopropylphenol2&H<sub>Isopropylphenol6</sub></sub>), 6.75-6.74 (m, 1H, H<sub>Furyl4</sub>), 4.68 (s, 2H, CH<sub>2</sub>O), 2.85-2.80 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.18-1.16 (d, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ = 177.8 (C=S), 165.2 (CH<sub>2</sub>C(O)NHNH), 157.3 (C<sub>Furyl</sub>CO)N), 155.8 (CH<sub>2</sub>OC<sub>Isopropylphenol</sub>), 148.5 (C<sub>Furyl2</sub>), 144.4 (C<sub>Furyl5</sub>), 141.2 (C<sub>Isopropylphenol4</sub>), 127.1 (2C, C<sub>Isopropylphenol3&C<sub>Isopropylphenol5</sub></sub>), 118.7 (C<sub>Furyl3</sub>), 114.6 (2C, C<sub>Isopropylphenol2&C<sub>Isopropylphenol6</sub></sub>), 112.6 (C<sub>Furyl4</sub>), 65.8 (OCH<sub>2</sub>), 32.6 (CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.0 (2C, CH<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

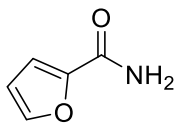
IR  $\tilde{\nu}$  = 3295 (w), 3167 (w), 3128 (w), 3034 (w), 2958 (w), 2864 (w), 1681 (m), 1668 (m), 1610 (w), 1562 (m), 1536 (m), 1512 (m), 1458 (s), 1434 (s), 1390 (m), 1376 (m), 1283 (m), 1236 (s), 1214 (s), 1166 (s), 1095 (s), 183 (m), 1069 (m), 1056 (m), 1026 (m), 975 (m), 937 (m), 894 (m), 886 (m), 841 (m), 828 (s), 813 (m), 756 (s), 738 (s), 635 (s), 590 (s), 562 (s), 503 (s), 42 (m).

HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for  $C_{17}H_{20}N_3O_4S^+$   $[M+H]^+$ : 362.1169; found: 362.1165.

$m/z$  calcd for  $C_{17}H_{19}N_3O_4SNa^+$   $[M+Na]^+$ : 384.0988;  
found: 384.0984.

MP: 181°C.

## Furan-2-carboxamide



MW: 111,10

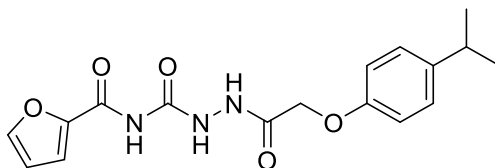
Aqueous concentrated ammonia solution was used as reactive solvent and was cooled to 0 °C then furan-2-carbonyl chloride (20.0 mmol, 2.61 g) was slowly dropped into it. The ice bath was removed and the mixture was stirred at RT for 2 d. The mixture was diluted with water and extracted in ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub> and the solvent was evaporated under reduced pressure. Furan-2-carboxamide was received quantitatively (20.0 mmol, 2.22 g).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ = 7.79- 7.78 (m, 1H, **H**<sub>5Ar</sub>), 7.73 (br, 1H, **NH**), 7.33 (br, 1H, **NH**), 7.09-7.08 (m, 1H, **H**<sub>4Ar</sub>), 6.59- 6.58 (m, 1H, **H**<sub>3Ar</sub>).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ = 159.4 (**C=O**), 148.1 (**C**<sub>2</sub>), 145.0 (**C**<sub>5</sub>), 113.6 (**C**<sub>3</sub>), 111.8 (**C**<sub>4</sub>).

MS(ESI<sup>+</sup>): *m/z* calcd for C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 112.11; found: 112.18 (9%);  
*m/z* calcd for C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 129.14; found: 129.04 (100%);  
*m/z* calcd for C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup> [M+MeOH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>: 144.15; found: 144.07 (3%).

## NL20



MW: 345,36

222 mg (1.0 eq, 2.0 mmol) furan-2-carboxamide was solved in dry toluene under an argon atmosphere. 0.62 mL of oxalyl chloride (3.6 eq, 7.2 mmol) were added and the mixture was refluxed for 5 h under an argon atmosphere. The solvent was evaporated under reduced pressure and the remaining reactive intermediate dissolved in toluene. TEA (1.1 mL, 8.0 mmol, 4.0 eq) was dropped in carefully, 2-(4-isopropylphenoxy)acetohydrazide (417 mg, 2.0 mmol, 1.0 eq) was added as well as a few drops of DMF. The reaction mixture was refluxed for another 2.5 h. A few drops of water were added, and the solvent was reduced under reduced pressure. Water was added and the resulting residue was filtered and recrystallised from ethanol. NL20 was received in 81 % (560 mg, 1.62 mmol) yield (Klabunde *et al.*, 2005).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO- $\text{D}_6$ )  $\delta$  = 10.89 (br, 1H, C(O)NHNHC(O)), 10.33 (br, 1H, C(O)NHNHC(O)), 9.81 (s, 1H, C(O)NHC(O)), 8.02 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{Furyl5}}$ ), 7.68-7.67 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{Furyl3}}$ ), 7.17-7.15 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Isopropylphenol6}}$  &  $\text{H}_{\text{Isopropylphenol6}}$ ), 6.95-6.91 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{Isopropylphenol3}}$  &  $\text{H}_{\text{Isopropylphenol5}}$ ), 6.73-6.72 (m, 1H,  $\text{H}_{\text{Furyl4}}$ ), 4.59 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>), 2.87-2.80 (m, 1H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.18-1.16 (m, 6H, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

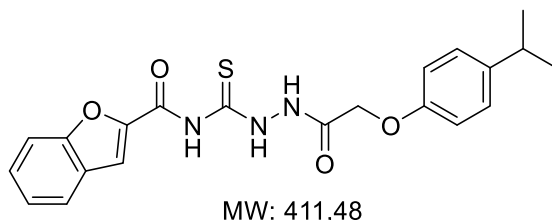
<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-D6) δ = 166.9 (OCH<sub>2</sub>C(O)NHNH), 157.8(C<sub>Ar</sub>C(O)NHC), 155.8 (C<sub>Isopropylphenol1</sub>), 152.9 (HNC(O)NHNH), 147.9 (C<sub>Furyl2</sub>), 145.1 (C<sub>Furyl5</sub>), 141.2 (C<sub>Isopropylphenol4</sub>), 127.1 (2C, C<sub>Isopropylphenol3</sub>&C<sub>Isopropylphenol5</sub>), 117.7 (C<sub>Furyl3</sub>), 114.6 (2C, C<sub>Isopropylphenol2</sub>&C<sub>Isopropylphenol6</sub>), 112.4 (C<sub>Furyl4</sub>), 66.1 (CH<sub>2</sub>O), 32.6 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.05 (2C, CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

IR  $\tilde{\nu}$  = 3385 (w), 3158 (w), 2952 (w), 1733 (m), 1703 (m), 1670 (m), 1607 (w), 1587 (w), 1504 (s), 1454 (m), 1381 (m), 1359 (m), 1282 (m), 1233 (m), 1110 (m), 1045 (m), 1023 (m)930 (m), 864 (m), 844 (m), 805 (m), 770 (s), 750 (s), 689 (s), 562 (s), 544 (s), 523 (s), 461 (m), 426 (m).

HRMS (ESI): *m/z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 346.1397; found: 346.1393.  
*m/z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Na<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 368.1217; found: 368.1216.

MP: 183°C.

## NL48



MW: 411,48

180 mg Benzofuran-2-carbonylchloride (1.0 eq, 0.99 mmol) were solved in toluene (1 ml/mmol) and 3 mol% TBAB were added. Then 0.87 mL of an aqueous solution of KSCN (33 %, 3.0 eq) were added and the two layers mixture was stirred intensively for 2 h at RT. The organic layer was separated and 249 mg of 2-(4-isopropylphenoxy)acetohydrazide were added to the organic layer. The reaction mixture was stirred at RT for 12 hours. The resulting solid was filtered and recrystallised from ethanol. The RNPA2000-derivative was received in 51% (209 mg, 0.50 mmol) yield (Reeves *et al.*, 1981).

$^1\text{H NMR}$  (400 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>)  $\delta$  = 12.27 (s, 1H, NH), 11.76 (s, 1H, NH), 10.99 (s, 1H, NH), 8.22 (d,  $J$  = 0.7 Hz, 1H, H<sub>Benzofuran</sub>), 7.85 (dd,  $J$  = 7.7, 0.9 Hz, 1H, H<sub>Benzofuran</sub>), 7.75 (dd,  $J$  = 8.4, 0.8 Hz, 1H, H<sub>Benzofuran</sub>), 7.56 (ddd,  $J$  = 8.5, 7.3, 1.3 Hz, 1H, H<sub>Benzofuran</sub>), 7.39 (td,  $J$  = 7.6, 0.9 Hz, 1H, H<sub>Benzofuran</sub>), 7.26 – 7.09 (m, 2H, H<sub>Ar</sub>), 6.93 (dd,  $J$  = 6.6, 2.1 Hz, 2H, H<sub>Ar</sub>), 4.69 (s, 2H, COCH<sub>2</sub>), 2.84 (m, 1H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 1.19 (s, 3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH), 1.17 (3H, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH).



<sup>13</sup>C NMR (101 MHz, DMSO-D<sub>6</sub>) δ = 183.4 (NC(S)N), 165.9 (C=O), 158.5 (C=O), 156.3 (C<sub>Ar</sub>), 155.6 (C<sub>Ar</sub>), 146.2 (C<sub>Ar</sub>), 141.7 (C<sub>Ar</sub>), 128.8 (C<sub>Ar</sub>), 127.6 (2 x C<sub>Ar</sub>), 127.2 (C<sub>Ar</sub>), 124.7 (C<sub>Ar</sub>), 124.1 (C<sub>Ar</sub>), 115.3 (2 x C<sub>Ar</sub>), 114.7 (C<sub>Ar</sub>), 112.7 (C<sub>Ar</sub>), 66.2 (OCH<sub>2</sub>), 33.1 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 24.5 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

IR  $\tilde{\nu}$  = 3385 (w), 3252 (w), 2952 (w), 1687 (m), 1660 (m), 1576 (w), 1507 (w), 1466 (w), 1444 (m), 1430 (m), 1391 (m), 1381 (m), 1368 (w), 1291 (m), 1276 (m), 1249 (w), 1213 (m), 1195 (w), 1171 (m), 1140, 1120 (m), 1109 (m), 1063 (w), 1015 (m), 978 (w), 957 (w), 945 (w), 910 (w), 887 (w), 864 (w), 844 (w), 830 (w), 811 (w), 798 (w), 744 (s), 713 (m), 692 (w), 627 (w), 601 (w), 559 (m), 529 (w), 515 (w), 495 (w), 459 (s), 433 (m), 424 (s)

HRMS (ESI):  $m/z$  calcd for C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 412.1326; found: 412.1325.

$m/z$  calcd for C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>SNa<sup>+</sup> [M+Na]<sup>+</sup>: 434.1149;  
found: 434.1145.

MP: 185°C.

## References

- Busch, S., Kirsebom, L. A., Notbohm, H. & Hartmann, R. K. (2000) Differential role of the intermolecular base-pairs G292-C75 and G293-C74 in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* RNase P RNA, *J. Mol. Biol.*, 299(4), pp. 941–951.
- Degenhardt, I. (2013) *PhD thesis*. Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany.
- Eidem, T. M., Lounsbury, N., Emery, J. F., Bulger, J., Smith, A., Abou-Gharbia, M., Childers, W. & Dunman, P. M. (2015) Small-molecule inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA-mediated RNA turnover and tRNA processing, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 59(4), pp. 2016–2028.
- Ferreira, R. S. *et al.* (2010) Complementarity between a docking and a high-throughput screen in discovering new cruzain inhibitors, *J. Med. Chem.*, 53(13), pp. 4891–4905.
- Gößringer, M., Helmecke, D., Köhler, K., Schön, A., Kirsebom, L. A., Bindereif, A. & Hartmann, R. K. (2014) Enzymatic RNA Synthesis using Bacteriophage T7 RNA Polymerase, in Hartmann, R. K. *et al.* (eds) *Handb. RNA Biochem.* 2nd edn. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 3–27.
- Gößringer, M., Far, R. K. K. & Hartmann, R. K. (2006) Analysis of RNase P protein (*rnpA*) expression in *Bacillus subtilis* utilizing strains with suppressible *rnpA* expression, *J. Bacteriol.*, 188(19), pp. 6816–6823.
- Gößringer, M. & Hartmann, R. K. (2007) Function of heterologous and truncated RNase P proteins in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.*, 66(3), pp. 801–813.
- Klabunde, T. *et al.* (2005) Acyl ureas as human liver glycogen phosphorylase inhibitors for the treatment of type 2 diabetes, *J. Med. Chem.*, 48(20), pp. 6178–6193.
- Krivenko, A. A., Kazantsev, A. V., Adamidi, C., Harrington, D. J. & Pace, N. R. (2002) Expression, purification, crystallization and preliminary diffraction analysis of RNase P protein from *Thermotoga maritima*, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 58(7), pp. 1234–1236.
- Lounsbury, N., Eidem, T., Colquhoun, J., Mateo, G., Abou-Gharbia, M., Dunman, P. M. & Childers, W. E. (2018) Novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA that synergize with mupirocin, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 28(6), pp. 1127–1131.
- Madrigal-Carrillo, E. A., Díaz-Tufinio, C. A., Santamaría-Suárez, H. A., Arciniega, M. & Torres-Larios, A. (2019) A screening platform to monitor RNA processing and protein-RNA interactions in ribonuclease P uncovers a small molecule inhibitor, *Nucleic Acids Res.*, 47(12), pp. 6425–6438.
- Nickel, A. I., Wäber, N. B., Gößringer, M., Lechner, M., Linne, U., Toth, U., Rossmannith, W. & Hartmann, R. K. (2017) Minimal and RNA-free RNase P in *Aquifex aeolicus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 114(42), pp. 11121–11126.
- Niranjanakumari, S., Kurz, J. C. & Fierke, C. A. (1998) Expression, purification and characterization of the recombinant ribonuclease P protein component from *Bacillus subtilis*, *Nucleic Acids Res.*, 26(13), pp. 3090–3096.

- Paul, R., Lazarev, D. & Altman, S. (2001) Characterization of RNase P from *Thermotoga maritima*, *Nucleic Acids Res.*, 29(4), pp. 880–885.
- Pavlova, L. V., Gößringer, M., Weber, C., Buzet, A., Rossmann, W. & Hartmann, R. K. (2012) tRNA Processing by Protein-Only versus RNA-Based RNase P: Kinetic Analysis Reveals Mechanistic Differences, *ChemBioChem*, 13(15), pp. 2270–2276.
- Reeves, P., Simmons, A., Rudis, J. A. & Bothwell, T. C. (1981) Phase Transfer Catalysis Preparation Of Acyl Isothiocyanates, *Synth. Commun.*, 11(10), pp. 781–785.
- Reiter, N. J., Osterman, A., Torres-Larios, A., Swinger, K. K., Pan, T. & Mondragón, A. (2010) Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA, *Nature*, 468(7325), pp. 784–791.
- Sarges, R., Hank, R. F., Blake, J. F., Bordner, J., Bussolotti, D. L., Hargrove, D. M., Treadway, J. L. & Gibbs, E. M. (1996) Glucose transport-enhancing and hypoglycemic activity of 2-methyl-2-phenoxy-3-phenylpropanoic acids, *J. Med. Chem.*, 39(24), pp. 4783–4803.
- Smith, D., Burgin, A. B., Haas, E. S. & Pace, N. R. (1992) Influence of Metal Ions on the Ribonuclease P Reaction, *J. Biol. Chem.*, 267(4), pp. 2429–2436.
- Wegscheid, B. & Hartmann, R. K. (2006) The precursor tRNA 3'-CCA interaction with *Escherichia coli* RNase P RNA is essential for catalysis by RNase P in vivo, *RNA*, 12(12), pp. 2135–2148.
- Wegscheid, B. & Hartmann, R. K. (2007) In vivo and in vitro investigation of bacterial type B RNase P interaction with tRNA 3'-CCA, *Nucleic Acids Res.*, 35(6), pp. 2060–2073.

### 4.1.3 Neuartige Inhibitoren der bakteriellen RNase P

#### 4.1.3.1 Piperazin- und Sulfonamid-Derivate

Da von den beschriebenen RNase P-Inhibitoren nicht weiter ausgegangen werden konnte, wurden komplett neuartige Verbindungen gesucht, die das bakterielle RNase P Protein adressieren. In diesem Zusammenhang entstanden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. SCHLITZER (Institut für pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) die in Abb. 41 gezeigten (1-Methylsulfonyl)piperazin-4-amide mit einem Bernsteinsäure- (Verbindung 52 & 53), einem Essigsäure- (Verbindung 54 & 55), einem Oxalsäure- (Verbindung 56) oder einem Benzoesäure-Grundgerüst (Verbindung 57-61) und bis zu drei (1-Methylsulfonyl)piperazin-Einheiten.

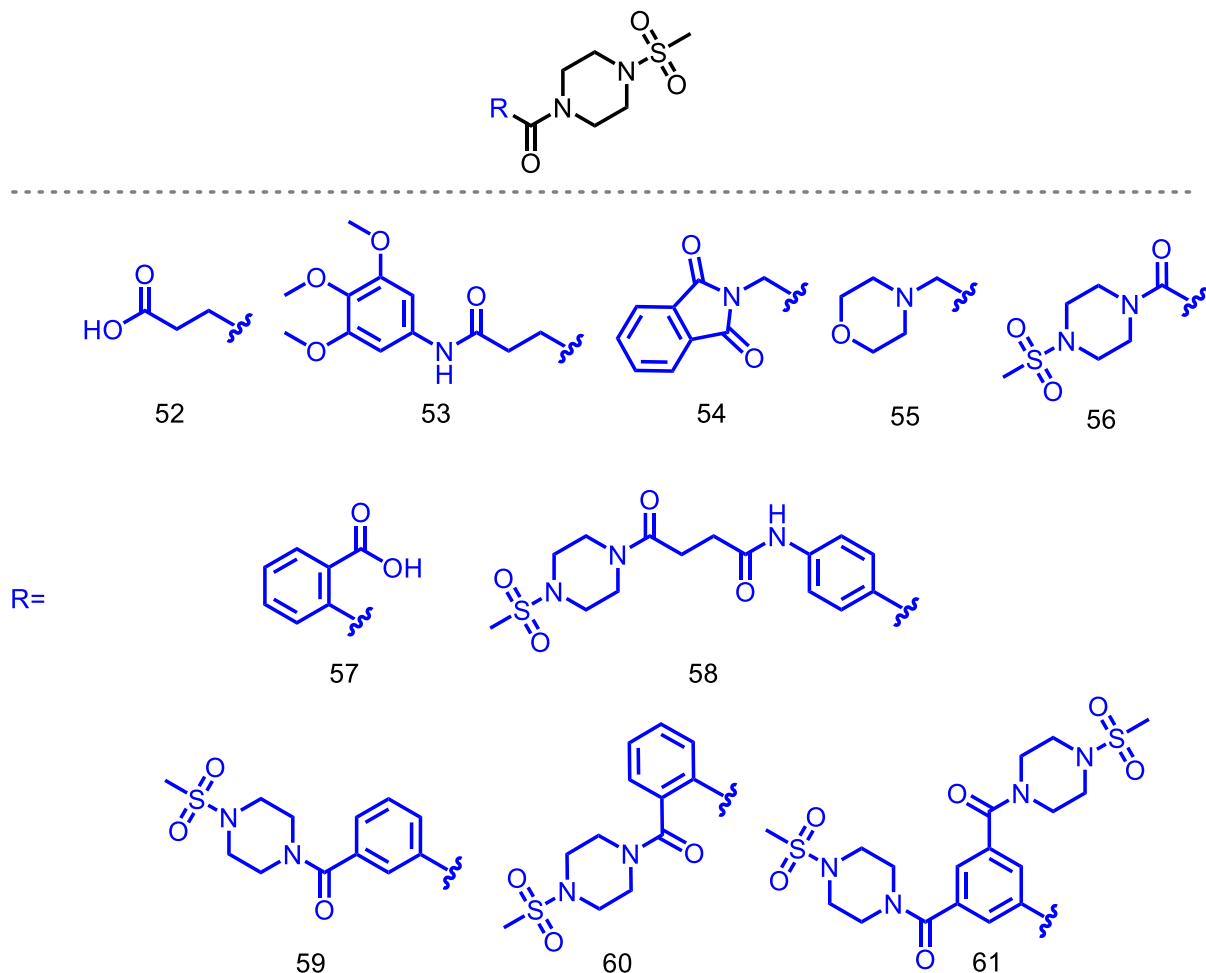


Abb. 41: (1-Methylsulfonyl)piperazin-4-amid-Derivate 52-61

Des Weiteren wurden bisarylierte Sulfonamide synthetisiert, bei denen die Sulfonylgruppe des Sulfonamids mit einer 4-Acetamidophenyl-Gruppe substituiert war (Abb. 42A). Auf Seiten des mono-substituierten N-Atoms wurden Phenylreste mit Elektronen-schiebenden (Verbindung 63-65) oder -ziehenden Substituenten (Verbindung 66 & 67) eingeführt. Außerdem wurden die drei mono-Aryl- bzw. die Alkyl-substituierten Piperazin-Derivate 68-70 (Abb. 42B) mit einem bzw. zwei basischen N-Atomen dargestellt.

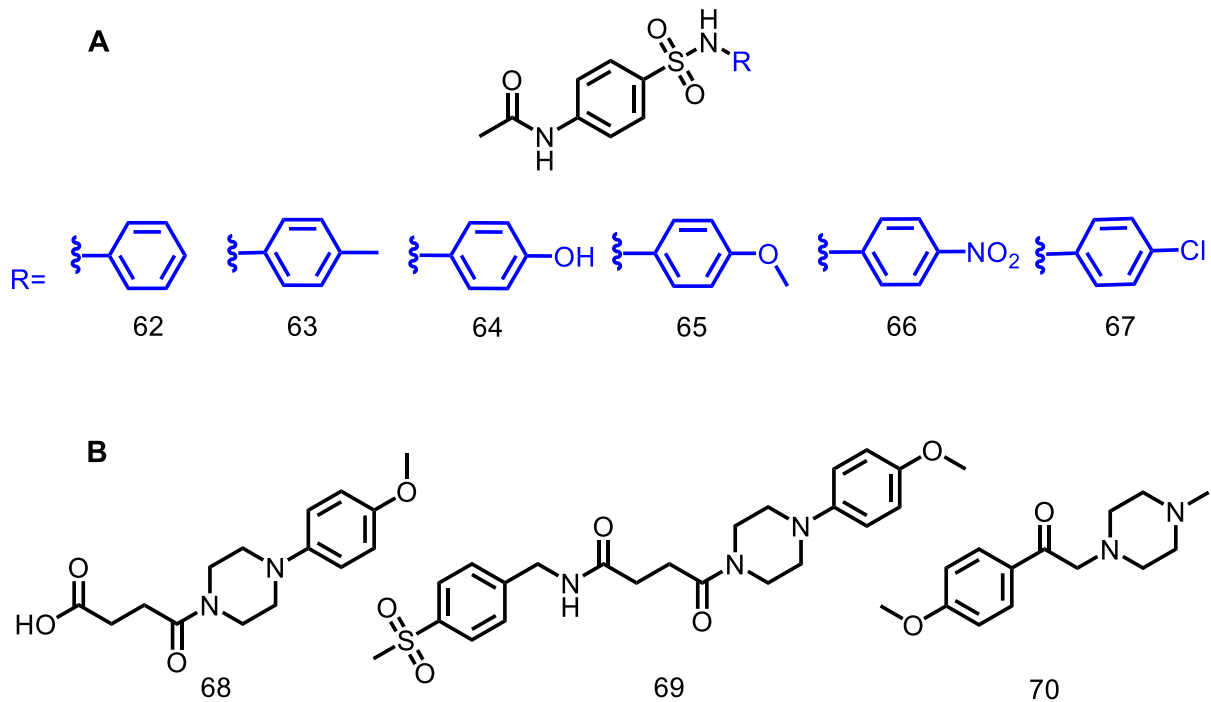


Abb. 42: *N*-(4-(*N*-phenylsulfamoyl)phenyl)acetamide 62-67, 4-Arylpiperazin-amide 68 & 69 und 1-(4-Methoxyphenyl)-2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethan-1-on (70)

Die Testung dieser Verbindungen erfolgte wie die der Ir6Ac-Derivate (Abschnitt 4.1.1, Seite 97) mittels Hemmhofstest. Dabei wurden - wie bereits beschrieben - 10  $\mu$ L der 50 mM DMSO-Stammlösung auf die Filter gegeben. Bedingt durch die Löslichkeit wurde hiervon für einige Verbindungen abgewichen. Für die Verbindungen 59, 61 und 69 wurde eine 25 mM Stammlösung und für die Verbindung 56 eine 16,7 mM Lösung eingesetzt. Von den (1-Methylsulfonyl)piperazin-4-amiden (Verbindungen 52-61) sowie den Piperazin-Derivaten (Verbindungen 68-70) war keine der Verbindungen antibakteriell aktiv (siehe Anhang 5.2.2.2, Seite 260). Von den arylierten Sulfonamiden zeigten Verbindungen 62-65 und 67 einen schwachen Hemmhof (Abb. 43).

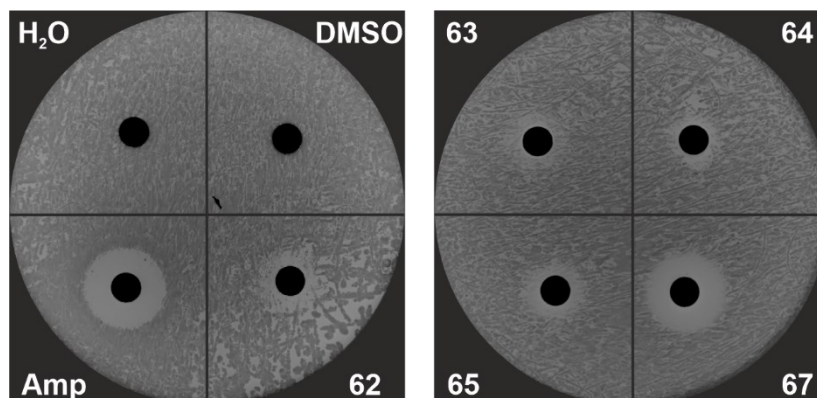


Abb. 43: Hemmhofstest der Sulfonamid-Derivate

Agarplatten der Hemmhof-Testung mit *E. coli* AS19-Stamm. Je 10  $\mu$ L des Lösungsmittels bzw. der Stammlösung wurden auf die 6 mm Filter pipettiert. Es wurden 10  $\mu$ g ( $\pm$  10  $\mu$ L einer 2,9 mM Lösung) Ampicillin (Amp) sowie eine 50 mM Stammlösung der zu testenden Verbindungen eingesetzt.

Die enzymkinetische Testung dieser fünf Verbindungen bei 250  $\mu\text{M}$  mit der *T. maritima* RNase P zeigte jedoch keine Inhibition (siehe Anhang 5.2.1.4, Seite 252). Die antibakteriellen Effekte könnten demzufolge eher auf deren struktureller Ähnlichkeit zu den Sulfonamid-Antibiotika (vgl. Sulfamethoxazol Abb. 44), die durch die Inhibition der 7,8-Dihydropteroat-Synthase in den Folsäure-Stoffwechsel eingreifen (Woods, 1940; Roland *et al.*, 1979; Ovung & Bhattacharyya, 2021), zurückzuführen sein.

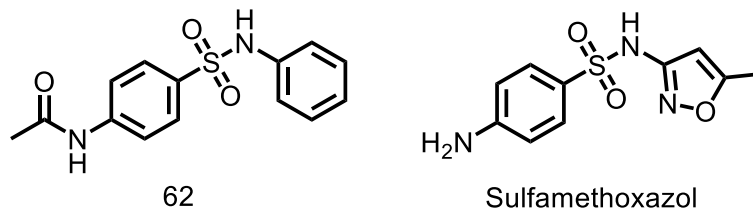


Abb. 44: Gegenüberstellung der Verbindung 62 und Sulfamethoxazol

#### 4.1.3.2 Struktur-basierter Ansatz

Im Weiteren wurde für die Identifizierung neuartiger RNase P-Inhibitoren von einem rationalen Struktur-basierten Ansatz ausgegangen. Idee dabei war es, die Bindetasche der 5'-Flanke an der Protein-Untereinheit zu adressieren (Abb. 45). Dadurch sollte das prä-tRNA-Substrat verdrängt oder dessen Bindung an das P Protein unterbunden werden.

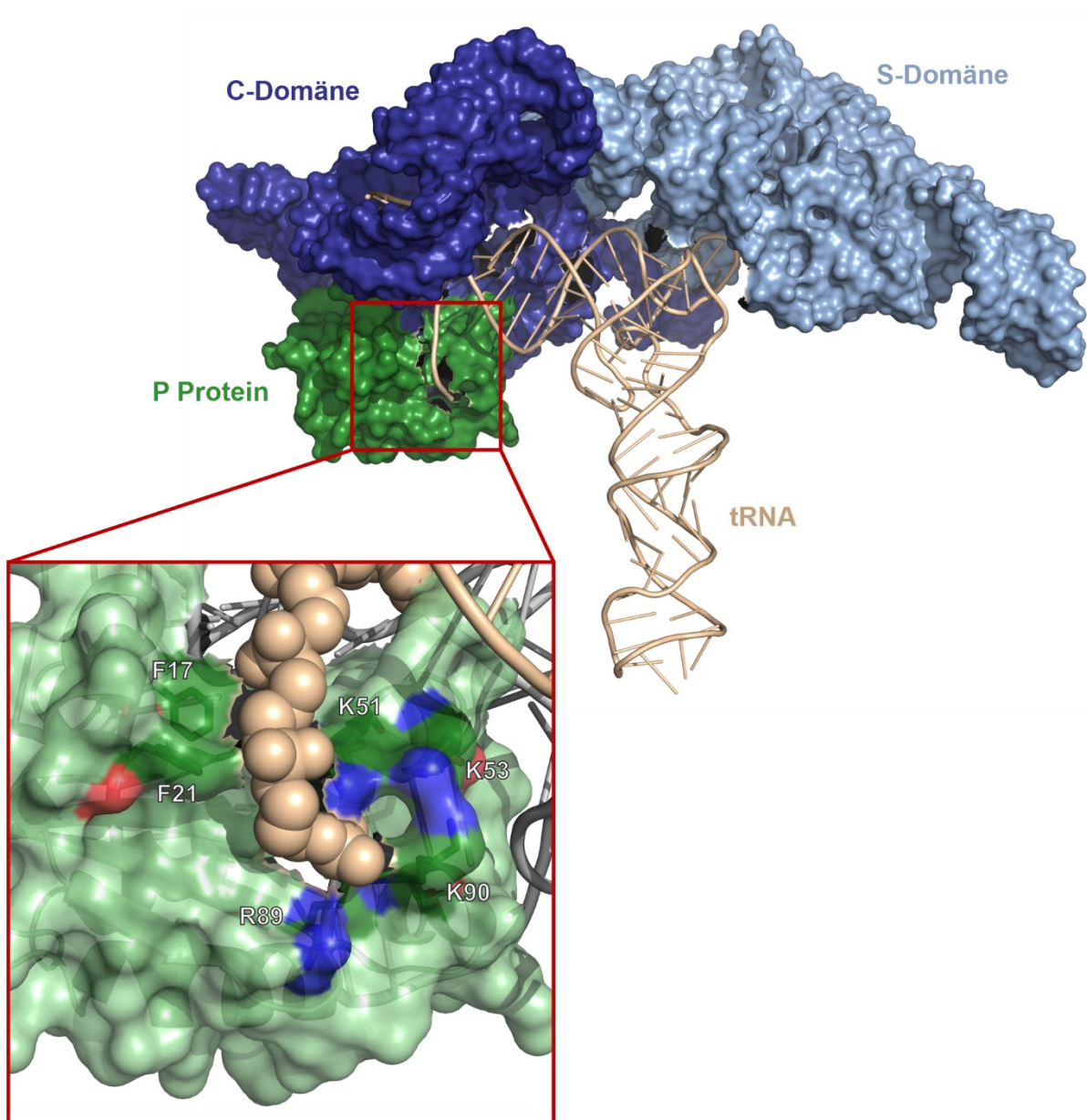


Abb. 45: Bindetasche der 5'-Flanke

*T. maritima* Holoenzym mit tRNA und 5'-Flanke. Die P RNA ist blau (C-Domäne dunkelblau und S-Domäne hellblau), das P Protein grün und die tRNA wie auch die 5'-Flanke beige dargestellt. Die Bindetasche der 5'-Flanke ist im Detail gezeigt (rot umrandet). Aminosäuren, die an der Bindung der 5'-Flanke beteiligt sind, wurden hervorgehoben: N-Atome: blau, O-Atome: rot und C-Atome: dunkelgrün (PDB: 3Q1R).

Da an der Bindung der 5'-Flanke vornehmlich aromatische (F17, F21) und basische Aminosäuren (K51, K53, R89, R90) beteiligt sind, standen hierbei aromatische Verbindungen mit polaren Gruppen zur Bindung an die basischen Aminosäuren im Vordergrund. Als Modellenzym wurde die RNase P aus *T. maritima* gewählt, da für diese eine hochaufgelöste

Protein-Kristallstruktur zur Verfügung stand (Kazantsev *et al.*, 2003). Die Auswahl von Verbindungen, die gut in die Bindetasche passen, deren aromatische Ringsysteme und hydrophile Gruppen sich also im richtigen Abstand zueinander befinden und die damit für etwaige Wechselwirkung korrekt positioniert sind, erfolgte anhand von *Docking*-Studien, die von R. E. EMMERICH (Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. SCHLITZER, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) durchgeführt wurden. Zudem sollten die Verbindungen eine gute Wasserlöslichkeit besitzen, um Löslichkeitsprobleme möglichst zu vermeiden.

### Initiales Screening

In einer ersten Testreihe entstanden basierend auf den *Docking*-Ergebnissen insgesamt 29 Verbindungen. Zu Beginn wurden Verbindungen mit zentralem Benzolring und zwei identischen polaren Resten, die sich entweder in der *meta*- oder der *para*-Position zueinander orientiert befanden, synthetisiert (Abb. 46). Bei den polaren Resten handelte es sich um Dicarbonsäuren- (Bernsteinsäure vs. Glutarsäure) bzw. 2-Acetoxyessigsäure, die über die korrespondierenden Carbonsäureamide an das aromatische System geknüpft wurden. Alle Verbindungen hatten gemeinsam, dass sie spiegelsymmetrisch waren.

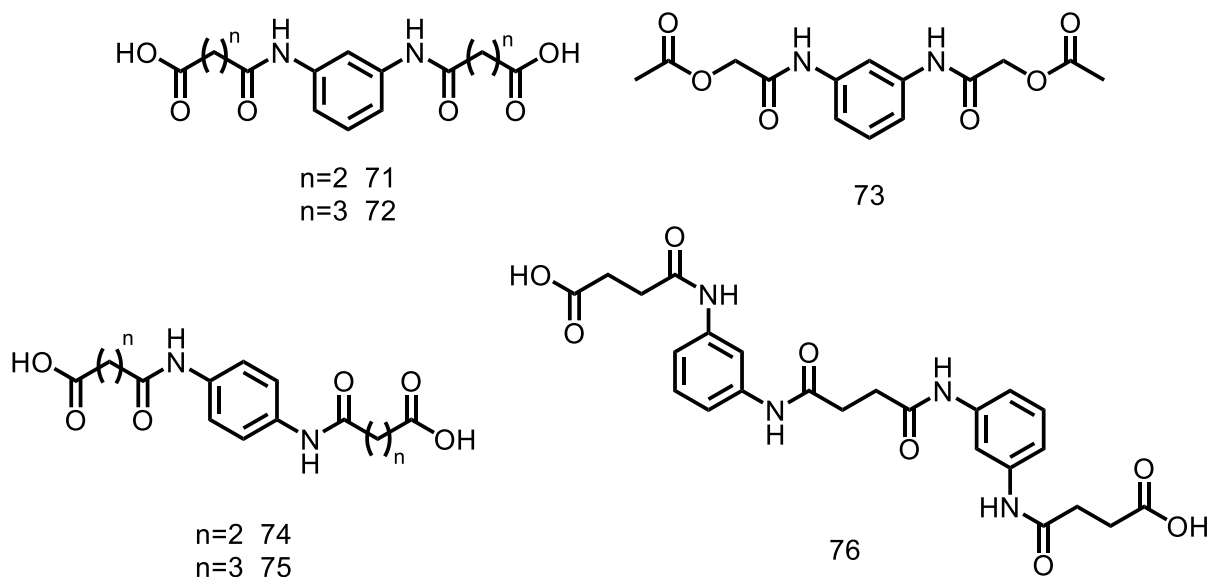
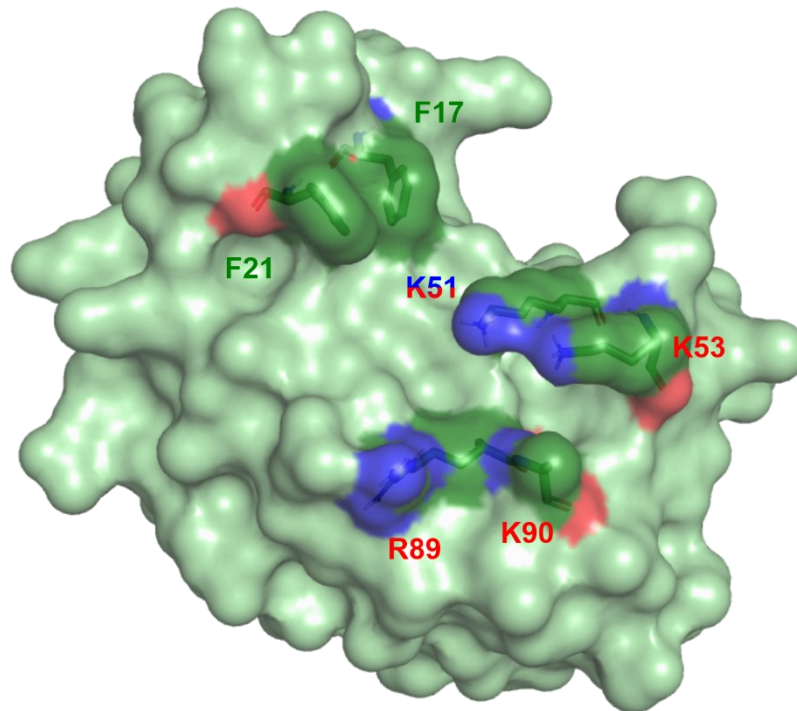


Abb. 46: 1,3- bzw. 1,4- Diaminobenzol-Derivate 71-76 mit Bernsteinsäure, Glutarsäure oder 2-Acetoxyessigsäure-Teilgerüst

Zur Bindung an die basischen Aminosäuren K51, K53, R89 und K90 wurde an Derivaten festgehalten, die eine endständige Carbonsäure- oder Carbonsäureester-Gruppe trugen. Zusammenfassend bestehen die nachfolgenden Verbindungen zum Adressieren der in Abb. 47 gezeigten Bindetasche aus drei Strukturelementen: (i) einer polaren bzw. partiell negativ geladenen Gruppe zur Interaktion mit basischen Aminosäuren (rot), (ii) einem verknüpfenden Element, welches zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen befähigt ist (blau) und (iii) einem Benzolring, welcher entsprechende  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit Phenylalaninen eingehen sollte (grün). Diese Gruppen sind in den beiden nachfolgenden



Abbildungen (Abb. 48 & Abb. 49), welche die dargestellten Verbindungen enthalten, farblich entsprechend hervorgehoben.



**Abb. 47: Bindetasche des *T. maritima* P Proteins**

Das *T. maritima* P Protein ist in der Oberflächen-Darstellung gezeigt. Die für die Bindung der potentiellen Inhibitoren essentiellen Aminosäuren wurden hervorgehoben: N-Atome: blau, O-Atome: rot und C-Atome: dunkel-grün. Der Farbton der Beschriftung dieser Aminosäuren (im Einbuchstabencode) richtete sich nach der potentiellen Interaktion mit den drei Strukturelementen der synthetisierten Verbindungen:  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen: grün, Wasserstoffbrückenbindungen: blau und Wasserstoffbrückenbindungen bzw. Salzbrücken mit den partiell negativ geladenen Gruppen: rot. Proteinstruktur: J. H. W. SCANLAN (AG Prof. Dr. W. DIEDERICH, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg).

Zunächst wurde die endständige Carbonsäure über einen Alkyllinker variierender Länge und ein Carbonsäureamid an einen Benzolring geknüpft (Abb. 48A; Verbindung 77 & 78). Das Carbonsäureamid sollte dabei Wasserstoffbrückenbindungen mit K51 eingehen. Ein weiterer über eine Methylengruppe gebundener Benzolring sollte durch  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit F21 zur Bindung beitragen (Abb. 47).

Im Weiteren wurde die Verknüpfung der beiden aromatischen Ringsysteme um eine Ether-Funktion ergänzt und damit verlängert (Abb. 48B). Außerdem wurde das Carbonsäureamid als verknüpfendes Element gegen einen Carbonsäureester ausgetauscht und die Carbonsäure mit Methanol verestert (Abb. 48C). Die als verknüpfendes Element fungierende Estergruppe wurde zudem um eine Methyleneinheit versetzt am Benzolring angebracht (Abb. 48D). Auch wurden Verbindungen dargestellt, bei denen der endständige Carbonsäureester invertiert vorlag (vgl. Verbindung 85 & 88; Retroisosterie). Zur Verstärkung der  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit Phenylalanin an Position 21 wurde der grün eingefärbte Benzolring mit Elektronen-ziehenden Gruppen substituiert (Abb. 48E). Inwiefern eine polare

Gruppe für die Interaktion mit den basischen Aminosäuren für die Inhibition essentiell ist, sollte anhand von Verbindung 82 und 91 überprüft werden.

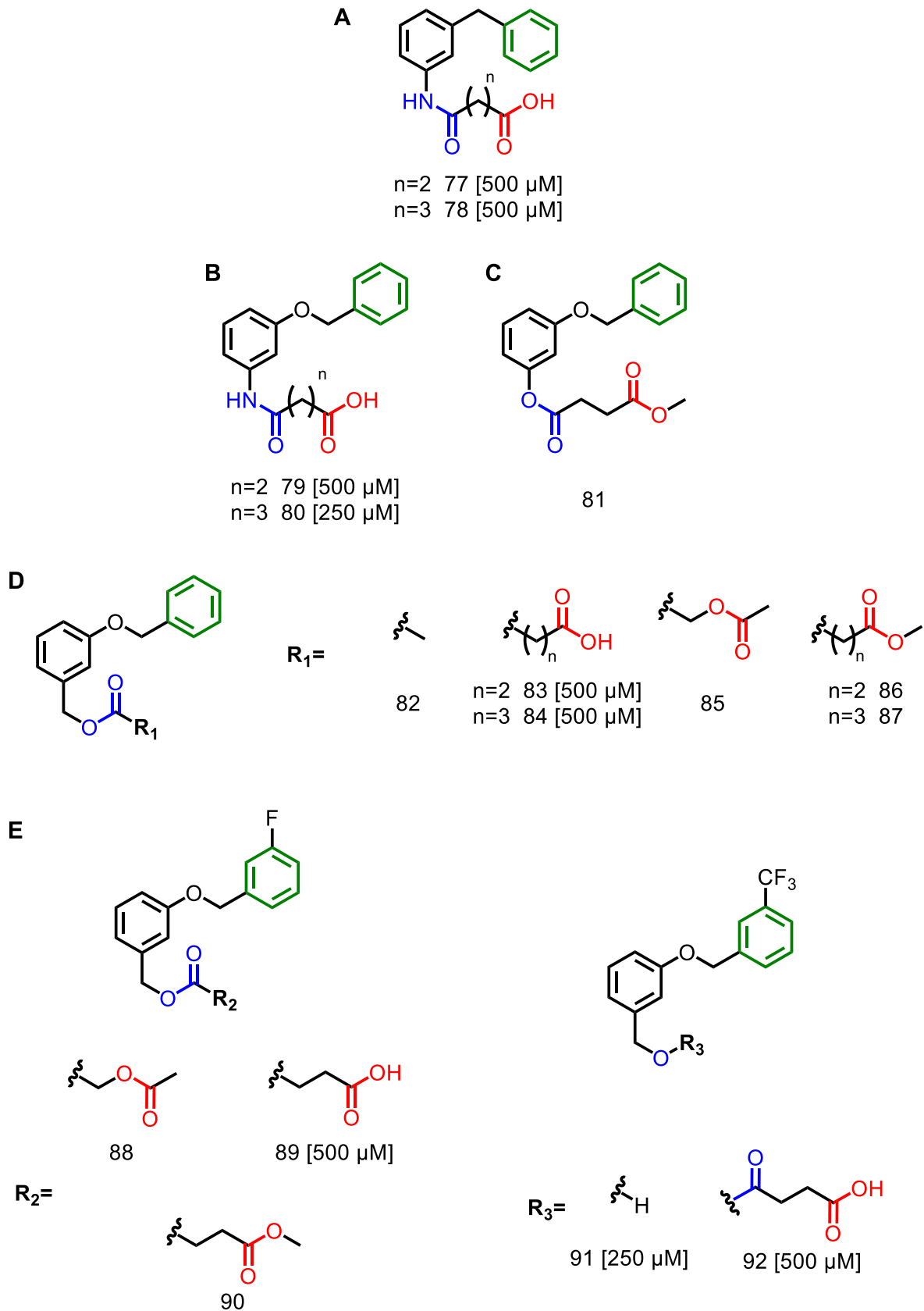


Abb. 48: Carbonsäure- und Carbonsäureester-Derivate 77-92 mit Carbonsäureestern oder -amiden als verknüpfendem Element und Variation der Verknüpfung sowie Substitution des Benzolrings für die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung

Im nächsten Schritt entstanden Sulfon- und Sulfonsäure-Derivate, die ebenfalls wie die Carbonsäuren und Carbonsäureester mit den basischen Aminosäuren interagieren sollten (Abb. 49). Innerhalb dieser Derivate wurde als verknüpfendes Element (blau) ein Carbonsäureester verwendet (Verbindung 93) und dieser in Analogie zu den Derivaten der Carbonsäuren und Carbonsäureester um eine Methyleneinheit vom Benzolring entfernt (Verbindung 95-97) oder gegen einen Ether ausgetauscht (Verbindung 94). Zudem entstand ein Derivat mit einem Elektronen-schiebenden Methylsubstituenten an dem für die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung relevanten Benzolring (Verbindung 97). Im Weiteren wurden dann Sulfonsäure-Derivate mit einem sekundären Amin (mono-substituiertes Anilin) als verknüpfendem Element dargestellt, die folglich als Zwitterionen vorlagen (Verbindung 98 & 99). Außerdem sollte mit Verbindung 99 überprüft werden, welchen Beitrag die  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zur potentiellen Bindung hat.

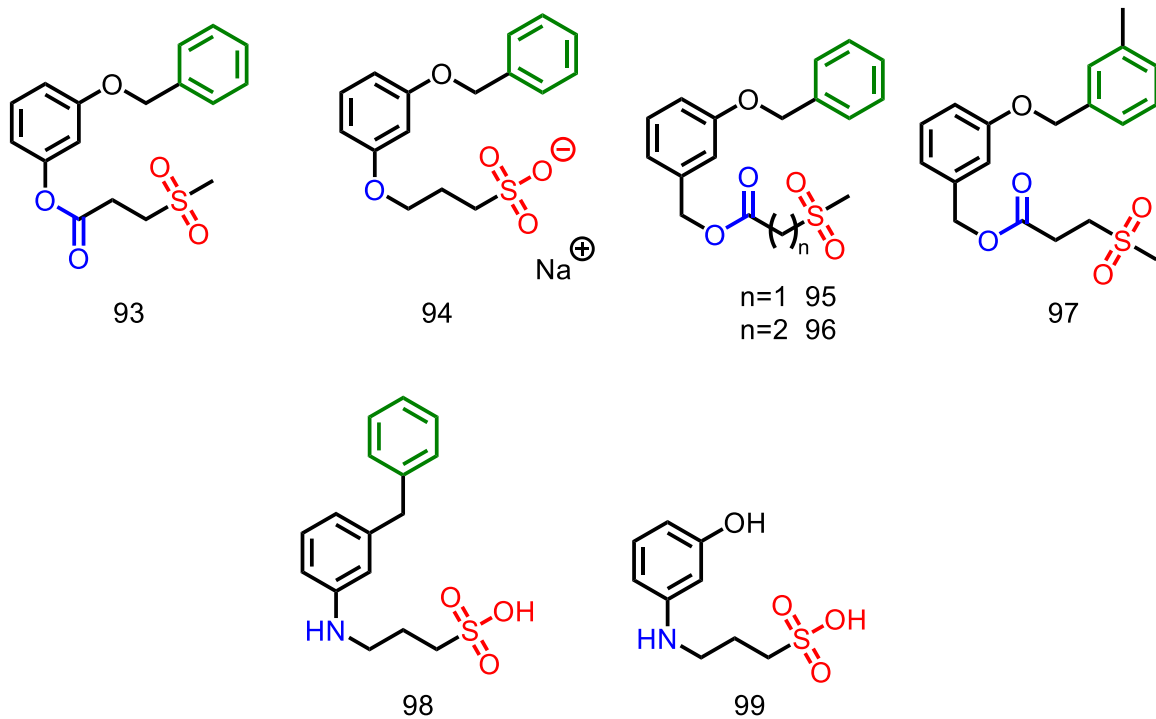
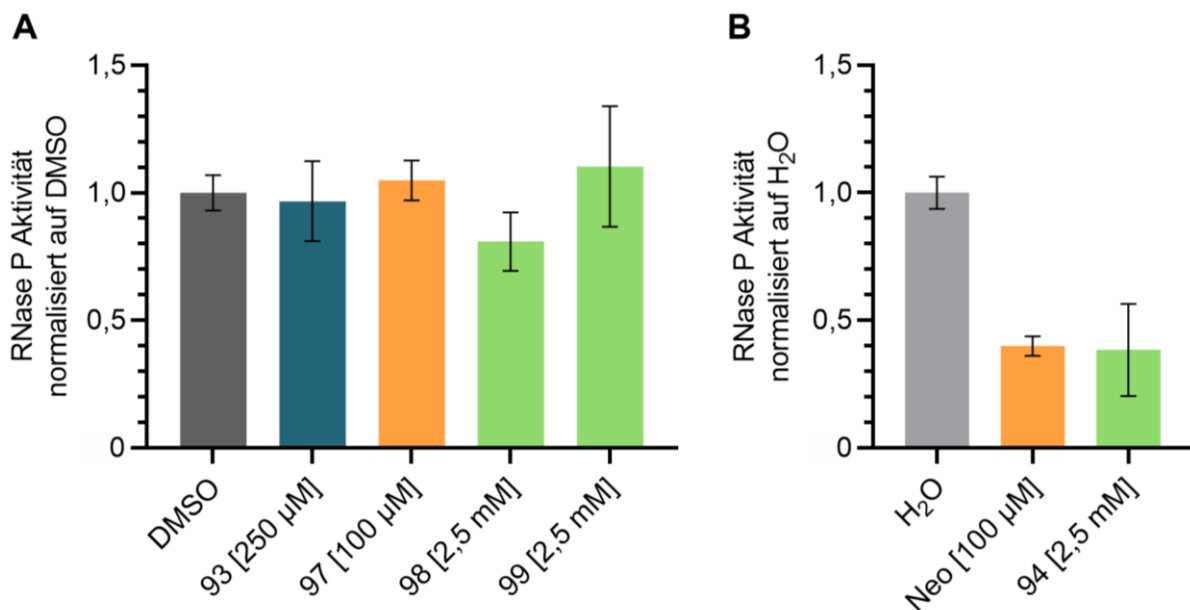


Abb. 49: Sulfon- und Sulfonsäure-Derivate 93-99

Die Testung all dieser Verbindungen erfolgte sowohl in der Enzymkinetik mit der *T. maritima* RNase P als auch über den Hemmhofstest unter Verwendung des *E. coli* AS19-Stamms. Für die enzymkinetische *in vitro*-Testung wurde zunächst anhand der unter dem Mikroskop abgeschätzten Löslichkeit jene Konzentration ermittelt, bei der die initiale Testung dann durchgeführt wurde. Die in Abb. 46 dargestellten Verbindungen konnten allesamt aufgrund ihrer guten Löslichkeit bei 500  $\mu$ M getestet werden. Bei den Carbonsäure-Derivaten aus Abb. 48 ist die Konzentration in den eckigen Klammern angegeben und lag entweder bei 500  $\mu$ M oder 250  $\mu$ M. Bei den Carbonsäureester-Derivaten (Abb. 48) war selbst bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M noch ausgefallene Substanz unter dem Mikroskop zu beobachten,

sodass diese nicht weiter im Rahmen der Enzymkinetik-Experimente untersucht wurden. Allerdings wurden diese Carbonsäureester-Derivate auch vornehmlich zur Testung auf antibakterielle Effekte im Rahmen einer *Prodrug*-Strategie konzipiert. Für keines der Carbonsäure-Derivate konnte eine Inhibition der *T. maritima* RNase P festgestellt werden (siehe Anhang 5.2.1.5, Seite 253 & 254). Die Testergebnisse der Sulfon- und Sulfonsäure-Derivate sind der Abb. 50 zu entnehmen. Von den Sulfonen konnten Verbindung 93 bei 250  $\mu\text{M}$  und Verbindung 97 bei 100  $\mu\text{M}$  getestet werden. Für Verbindungen 95 und 96 hingegen war aufgrund einer Löslichkeit von  $<100 \mu\text{M}$  keine Testung möglich. Die als Zwitterionen vorliegenden Verbindungen 98 und 99 konnte indessen sogar bei einer Konzentration von 2,5 mM getestet werden. Für Verbindung 94, die als Salz vorlag, ergab sich die Besonderheit, dass diese in Wasser gelöst werden konnte und somit auch bei einer Konzentration von 2,5 mM getestet wurde. Um unspezifische Effekte der Sulfonate bei diesen hohen Konzentrationen auszuschließen, wurde Phenylsulfonat (PS) als Kontrolle mit in die Testung eingeschlossen. Während die Sulfone 93 und 97, die beiden Sulfonsäure-Derivate 98, 99 und das Phenylsulfonat die *T. maritima* RNase P nicht inhibierten, kam es durch das Sulfonsäure-Derivat 94 erstmals zu einer, wenn auch schwachen, Hemmung der RNase P. Für eine etwa 60%ige Inhibition war eine Konzentration von 2,5 mM erforderlich.

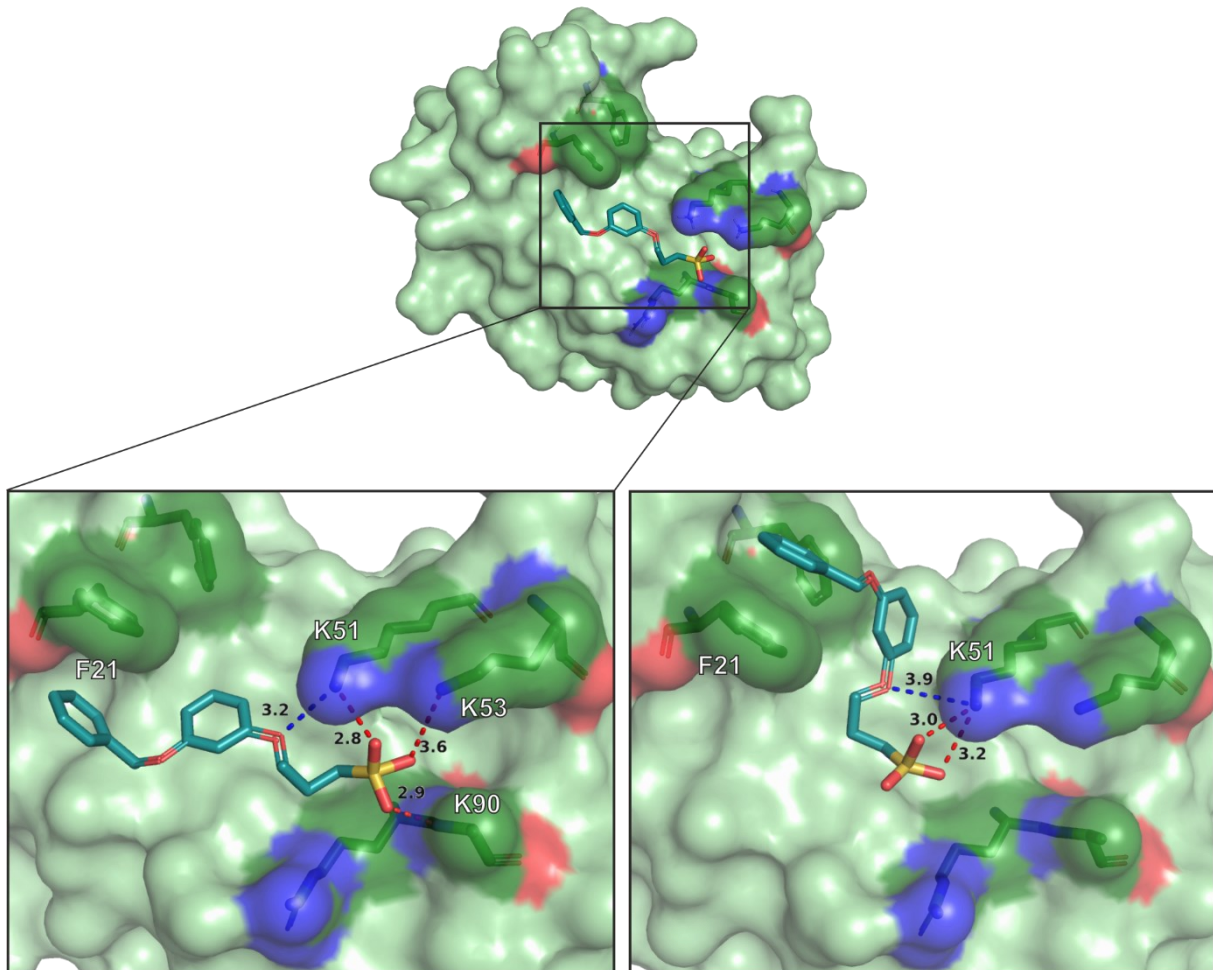


**Abb. 50: Testung der in Abb. 49 dargestellten Verbindungen**

Die Experimente wurden mit 50 nM *T. maritima* Holoenzym und 500 nM Substrat in KN-Puffer mit 10 mM  $\text{MgCl}_2$  durchgeführt. Es wurde eine Minute nach Reaktionsstart eine Probe gezogen. Der Anteil an prozessiertem Substrat dieser Probe wurde auf die entsprechende Lösungsmittel-Kontrolle normalisiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt und basieren auf mindestens drei biologischen Replikaten. **(A)** Testung derjenigen Verbindungen, die in DMSO gelöst wurden und folglich bei 10 % DMSO getestet wurden. Phenylsulfonat (PS) wurde als Kontrolle mit in die Experimente eingeschlossen. Die Normalisierung der Testung erfolgte auf die 10 %-DMSO-Kontrolle. **(B)** Testung der in Wasser gelösten Verbindung 94 und der Neomycin-Kontrolle. Die Normalisierung erfolgte hierbei auf die Wasser-Kontrolle.

Wie den *Docking*-Posen in Abb. 51 zu entnehmen ist, könnte die Bindung von Verbindung 94 über eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung mit Phenylalanin 21 an das Protein erfolgen. Weiterhin scheint

der Phenylpropylether eine Wasserstoffbrückenbindung mit Lysin 51 auszubilden und die endständige Sulfonat-Gruppe mit Lysin 51 bzw. zusätzlich mit Lysin 53 und 90 zu interagieren (Abb. 51).



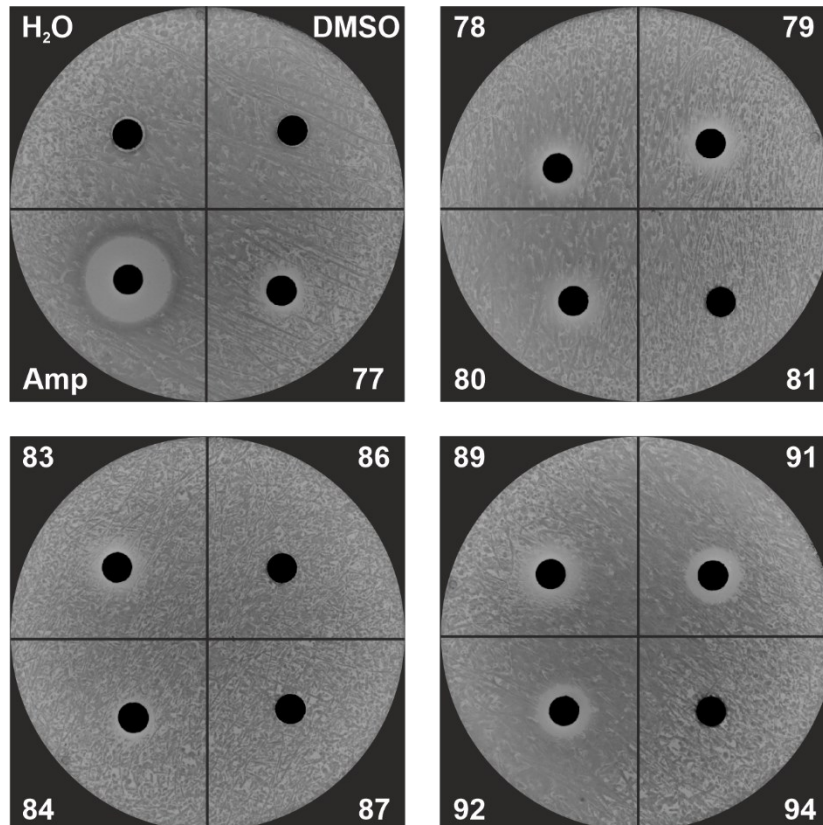
**Abb. 51: Bindungspose von Verbindung 94**

(**Oben**) Übersicht der Bindung von Verbindung 94 an das *T. maritima* P Protein in identischer Darstellung zu Abb. 47. (**Unten**) Detailansicht der beiden potentiellen *Docking*-Posen. In blau dargestellte Interaktionen entsprechen Wasserstoffbrückenbindungen und rote Wechselwirkungen kennzeichnen die Interaktionen der basischen Aminosäure mit dem negativ geladenen Strukturelement. Die Distanzen der Wechselwirkungen sind in Angström angegeben. Proteinstruktur: J. H. W. SCANLAN (AG Prof. Dr. W. DIEDERICH, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg).

Bei der Testung der antibakteriellen Aktivität der Verbindungen zeigten einige Verbindungen einen schwachen Hemmhof (Abb. 52; siehe Anhang 5.2.2.3, Seite 262). Bei diesen Verbindungen handelt es sich um sämtliche Carbonsäure-Derivate aus Abb. 48 (Verbindung 77-80, 83, 84, 89, 92) sowie das Alkohol-Derivat mit Trifluormethyl-Substituent (Verbindung 91). Die entsprechenden Methylester (Verbindung 81, 86, 87 und 90) hingegen wirkten nicht antibakteriell. Da die Carbonsäureester weniger hydrophil sind und somit die bakterielle Zellwand besser überwinden sollten, wäre an sich Gegenteiliges zu erwarten gewesen. Zudem gelten diese als *Prodrugs* der entsprechenden Carbonsäuren, da die Carbonsäureester innerhalb der Zelle durch entsprechende Esterasen hydrolysiert werden sollten. Die beobachteten antibakteriellen Effekte korrelierten jedoch nicht mit einer RNase P-



Inhibition *in vitro*. Demzufolge ist fraglich, worauf die beobachteten Aktivitäten zurückzuführen sind. Verbindung 94, welche *in vitro* zu einer RNase P-Inhibition führte, war hingegen antibakteriell nicht wirksam. Eine Ursache hierfür könnte der geladene Zustand der Verbindung sein, da Sulfonsäuren mit einem sehr niedrigen pKa-Wert [ $\text{pKa}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H})=-1,68$  (Guthrie, 1978)] permanent negativ geladen sind. Somit könnte das Überwinden der Zellwand selbst im *E. coli* AS19-Stamm mit Lipopolysaccharid-Defekt problematisch sein.



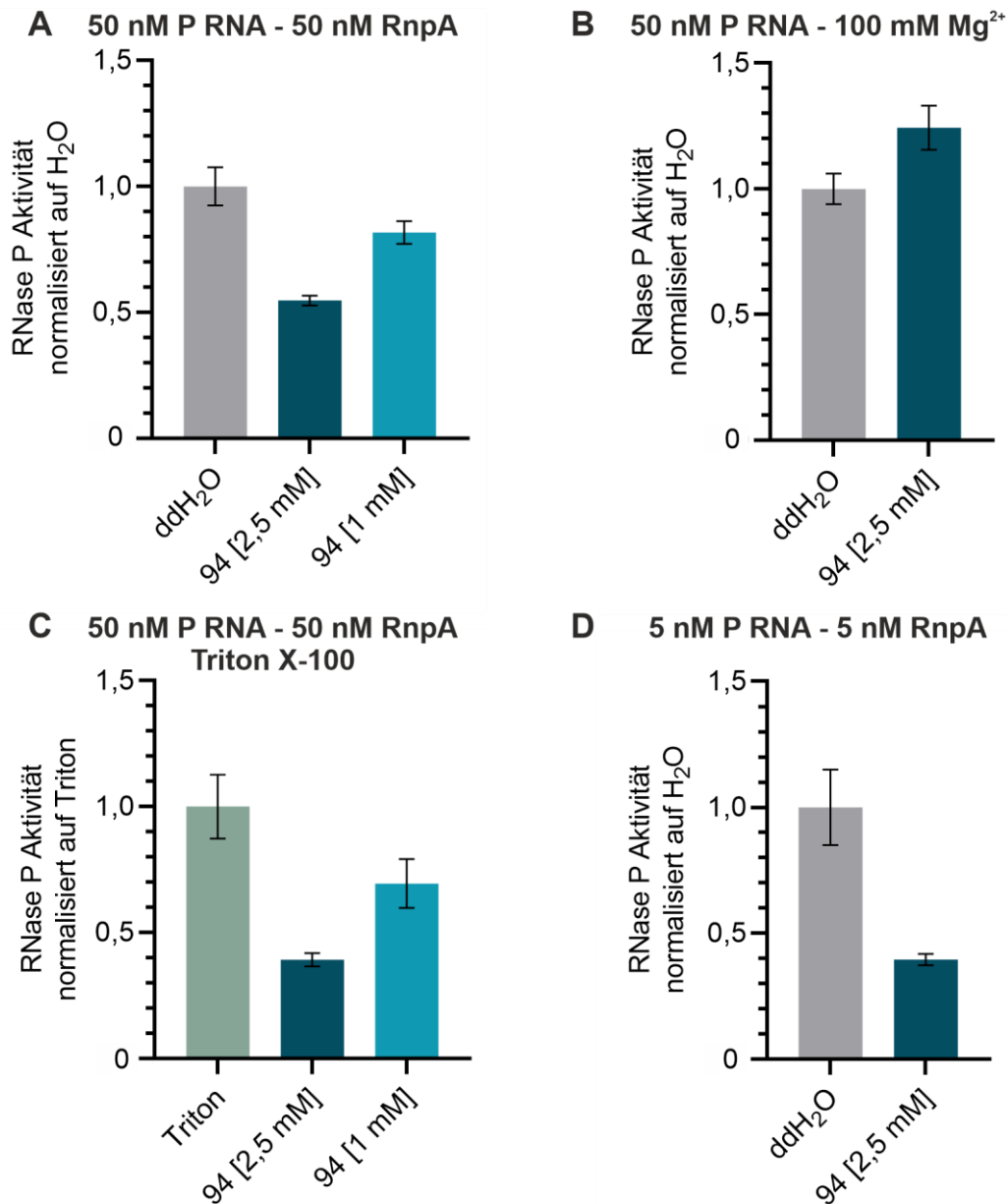
**Abb. 52: Hemmhoftest der Verbindungen aus dem initialen Screening**

Agarplatten nach Inkubation über Nacht. Sowohl Wasser als auch DMSO dienten als Negativkontrolle und  $10\ \mu\text{g}$  ( $\cong 10\ \mu\text{L}$  einer  $2,9\ \text{mM}$  Lösung) Ampicillin (Amp) als Positivkontrolle. Dargestellt ist eine Auswahl der getesteten Verbindungen. Für die gezeigten Verbindungen wurden  $10\ \mu\text{L}$  einer  $50\ \text{mM}$  Stammlösung auf die Filter gegeben. Lediglich bei Verbindung 94 wurde hiervon abgewichen und eine  $25\ \text{mM}$  Stammlösung verwendet.

Zusammenfassend wurde in einem Struktur-basierten Ansatz versucht, das bakterielle P Protein aus *T. maritima* an der Bindetasche der 5'-Flanke mit Kleinmolekülen zu adressieren. Hierzu wurden initial 29 Verbindungen, die anhand von *Docking*-Studien ausgewählt und daraufhin synthetisiert wurden, enzymkinetisch auf eine Hemmung der *T. maritima* RNase P sowie auf antibakterielle Effekte getestet. Neun Derivate zeigten schwache antibakterielle Effekte, jedoch gingen diese nicht mit einer Hemmung der *T. maritima* RNase P *in vitro* einher. Für das Sulfonat 94 wurde eine 60%ige Inhibition der *T. maritima* RNase P bei einer Konzentration von  $2,5\ \text{mM}$  beobachtet. Bevor mit Derivatisierungen dieser Verbindung fortgefahren wurde, sollte eine Protein-Aggregation anhand von im vorherigen Kapitel beschriebenen Experimenten ausgeschlossen werden.

### Weitergehende Untersuchungen von Verbindung 94

Als einzig aktives Derivat hinsichtlich RNase P-Inhibition wurde Verbindung 94 weitergehend analysiert. Zunächst wurde dessen Aktivität in einer vollständigen Enzymkinetik inklusive Bestimmung der Ratenkonstante bestätigt (45 % Inhibition bei 2,5 mM; Abb. 53A). Das Senken der Konzentration auf 1 mM führte immerhin noch zu einer Inhibition um ~20 %.

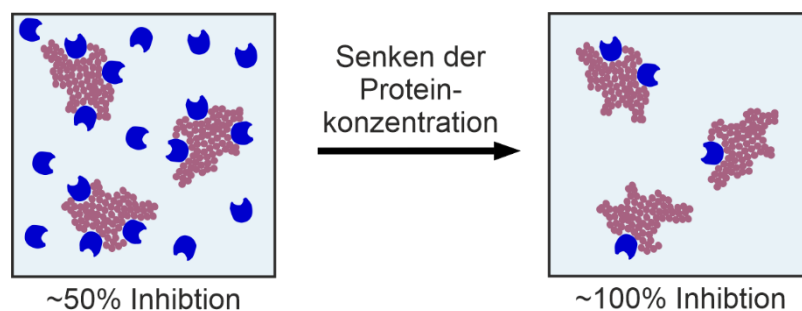


**Abb. 53: Weitergehende Testung von Verbindung 94 mit *T. maritima* RNase P**

(A) *T. maritima* Holoenzym-Aktivität in Anwesenheit von Verbindung 94. Die Kinetiken wurden mit 50 nM Holoenzym und 500 nM Substrat in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Die verwendete Konzentration von Verbindung 94 ist in eckigen Klammern angegeben. Wie in allen Experimenten (A-D) wurde zur Bestimmung der RNase P-Aktivität die ermittelte Ratenkonstante auf die Wasser- (A, B und D) bzw. Tritonkontrolle (C) normalisiert. Die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) basieren auf mindestens drei biologischen Replikaten. (B) Effekte von Verbindung 94 auf die RNA-allein Reaktion unter Verwendung von KN-Puffer mit 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 nM P RNA und 500 nM Substrat. Die Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt und beruhen auf vier biologischen Replikaten. (C) Einfluss von Triton X-100. Die Experimente wurden wie in (A) beschrieben durchgeführt jedoch unter Zusatz von 0,01 % Triton X-100. Die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) basieren auf vier biologischen Replikaten. (D) Effekte einer um Faktor 10 verminderten Enzymkonzentration. Die Experimente wurden in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 nM Holoenzym sowie 50 nM Substrat durchgeführt, um den Substratüberschuss bei einem Faktor von 10 beizubehalten. Die gezeigten Daten (dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM) beruhen auf vier biologischen Replikaten.

Durch eine RNA-allein Reaktion konnte zudem gezeigt werden, dass die Inhibition Protein-abhängig ist, da unter diesen Bedingungen keine Inhibition eintrat (Abb. 53B). Um die im vorherigen Abschnitt beschriebene Problematik der Protein-Aggregation auszuschließen, wurden entsprechende Kontrollexperimente analog zum RNPA2000 durchgeführt. Die Zugabe von Triton X-100 zu einer Konzentration von 1 mM bzw. 2,5 mM Inhibitor führte dabei zu einer schwachen Verstärkung des Effekts um 15-20 %, nicht jedoch zu einem für Protein-Aggregatoren erwarteten Rückgang der Inhibition (Abb. 53C).

Um die Sensitivität von Protein-Aggregatoren gegenüber der Enzymkonzentration zu untersuchen, wurde diese im Folgenden um den Faktor 10 gesenkt, wohingegen für das RNPA2000 ein entsprechendes Experiment durchgeführt wurde, bei dem die Protein-Konzentration um einen Faktor von 10 erhöht war. Nach erneuter Proteinpräparation traten jedoch bei 10-fachem Proteinüberschuss im Vergleich zur P RNA erhebliche Probleme in der Enzymkinetik auf. Diese äußerten sich zum einen in einer niedrigen Ratenkonstante von  $\sim 1,4 \text{ min}^{-1}$  und zum anderen in stark schwankenden Werten (Standardabweichung von  $1,0 \text{ min}^{-1}$ ). Im Vergleich dazu wurde bei Verwendung von 50 nM Holoenzym und einem stöchiometrischen Verhältnis von P RNA zu RnpA eine Ratenkonstante von  $\sim 12 \text{ min}^{-1} \pm 2 \text{ min}^{-1}$  erreicht. Deshalb wurden die Experimente fortan bei einer um Faktor 10 verminderten Enzymkonzentration durchgeführt, bei der eine relativ stabile Ratenkonstante von  $\sim 3,1 \text{ min}^{-1} \pm 0,7 \text{ min}^{-1}$  erzielt wurde. Führt eine Erhöhung der Enzymkonzentration zu einem Verlust der inhibitorischen Effekte, sollte in Analogie dazu im Falle eines Protein-Aggregators eine Senkung der Enzymkonzentration zu einer Verstärkung der Inhibition führen (Abb. 54). Da die Effekte eines Protein-Aggregators auf der Adsorption des Proteins an Kleinmolekül-Aggregate beruhen, sollte bei einer Erniedrigung der Enzymkonzentration keine Sättigung der Adsorption mehr erfolgen und damit alle Protein-Moleküle adsorbiert werden, was wiederum mit einer vollständigen Inhibition einhergehen sollte.



**Abb. 54: Protein-Aggregatoren - Sensitivität gegenüber der Proteinkonzentration**

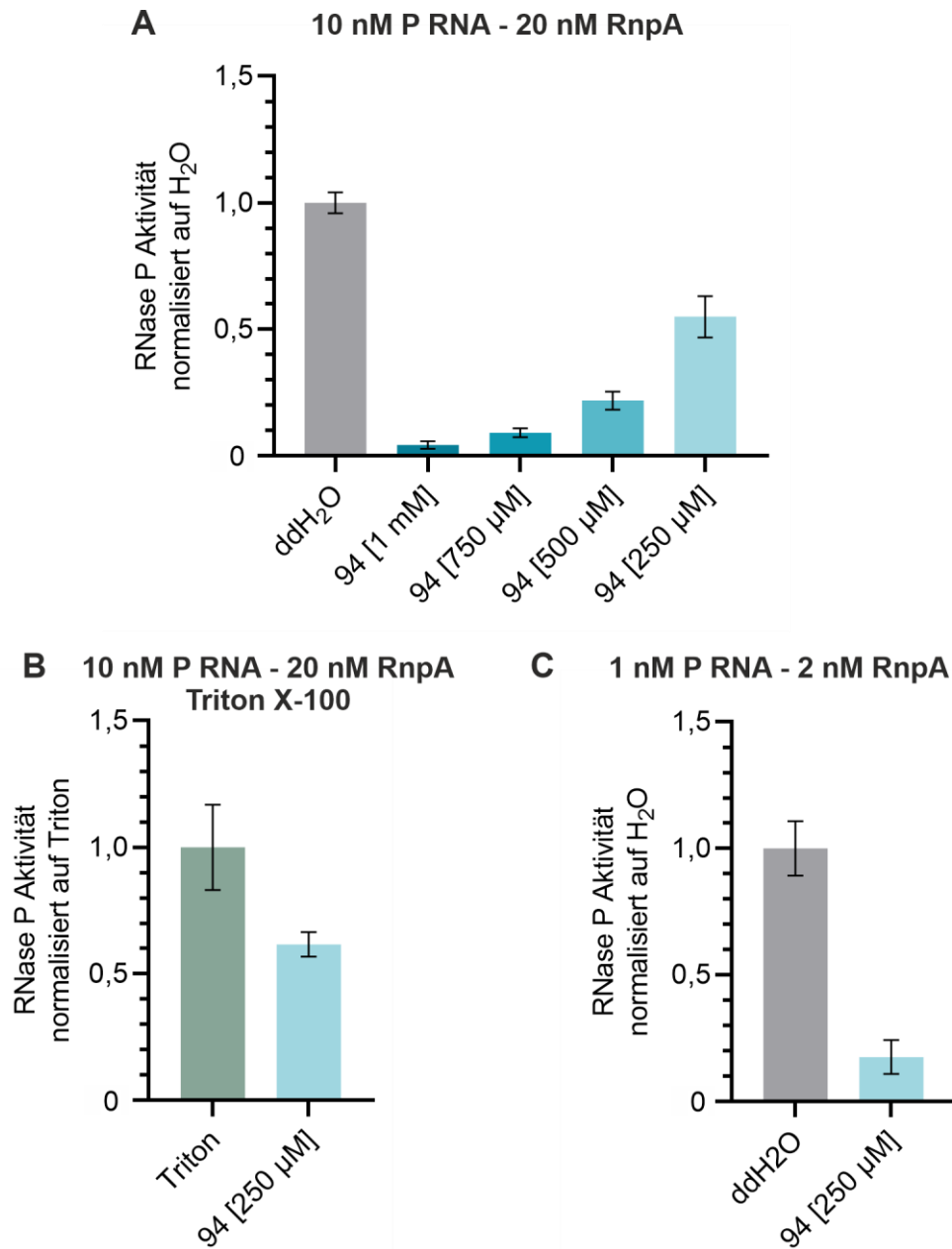
Protein-Aggregation. (**Links**) Adsorption der Protein-Moleküle (blau) an die Kleinmolekül-Aggregate (violett). Die Protein-Adsorption ist bereits gesättigt, sodass ein Teil der Protein-Moleküle noch funktional in Lösung vorliegt und es folglich zu einer ~50%igen Inhibition kommt. (**Rechts**) Durch das Senken der Proteinkonzentration (beispielsweise um einen Faktor von 10) wird keine Sättigung der Protein-Adsorption mehr erreicht. Sämtliche Protein-Moleküle werden an die Kleinmolekül-Aggregate adsorbiert, woraufhin sich kein Protein mehr in Lösung befindet und demzufolge eine vollständige Inhibition beobachtet wird.



Auch in diesem Experiment blieben die inhibitorischen Effekte weitestgehend konstant (65 % Inhibition bei 2,5 mM; Abb. 53D). Durch die Zugabe von Triton X-100 und das Senken der Enzymkonzentration verstärkten sich die beobachteten Effekte um lediglich etwa 15 %. Derartige Unterschiede können als Schwankungen im Rahmen von Enzymkinetiken verstanden werden. Die vorab beschriebenen Experimente mit dem Protein-Aggregator RNPA2000 führten hingegen zu einem fast vollständigen Verlust der Inhibition.

In weiteren Experimenten wurde die Aktivität von Verbindung 94 dann gegenüber RNase P-Enzymen aus anderen Organismen untersucht. In diesem Zusammenhang wurden Testungen mit dem Enzym aus *Bacillus subtilis* durchgeführt. *B. subtilis* ist ein grampositives Bakterium, dessen RNase P der bakteriellen RNase P Typ B zuzuordnen ist und nicht Typ A wie die *T. maritima* RNase P. Außerdem konnte dadurch überprüft werden, inwiefern die Reaktionstemperatur die Inhibition beeinflusst. Die Reaktionen mit der *T. maritima* RNase P wurden bei 50 °C durchgeführt, diejenigen mit dem *B. subtilis* Enzym hingegen bei 37 °C. So könnte die gesenkte Reaktionstemperatur zu einer stärkeren Bindung des entsprechenden Kleinmoleküls führen. Erste Testungen zeigten, dass Verbindung 94 die *B. subtilis* RNase P stärker inhibiert als die *T. maritima* RNase P. Eine Konzentration von 1 mM führte zu einer fast vollständigen Enzyminhibition, 250 µM noch zu einer 45%igen Hemmung (Abb. 55A).

Für die weiteren Kontrollversuche mit Triton X-100 und einer variierten Enzymkonzentration wurden 250 µM von Verbindung 94 gewählt, da in diesem Bereich (~50 % Inhibition) etwaige Schwankungen bzw. Veränderungen des Effekts am besten zu beobachten sind. In Anwesenheit von Triton X-100 wurde weiterhin eine Inhibition beobachtet, und zwar um bis zu 40 % (Abb. 55B). Die Senkung der Enzymkonzentration um den Faktor 10 steigerte die Inhibition etwa um einen Faktor von 2 und damit auf ~80 % (Abb. 55C). Somit wurde also eine gewisse Sensitivität gegenüber der Enzymkonzentration, typisch für Protein-Aggregatoren, festgestellt. Problematisch könnte hier allerdings die sehr niedrige Enzymkonzentration von 1 nM sein, die für diese Experimente verwendet wurde.

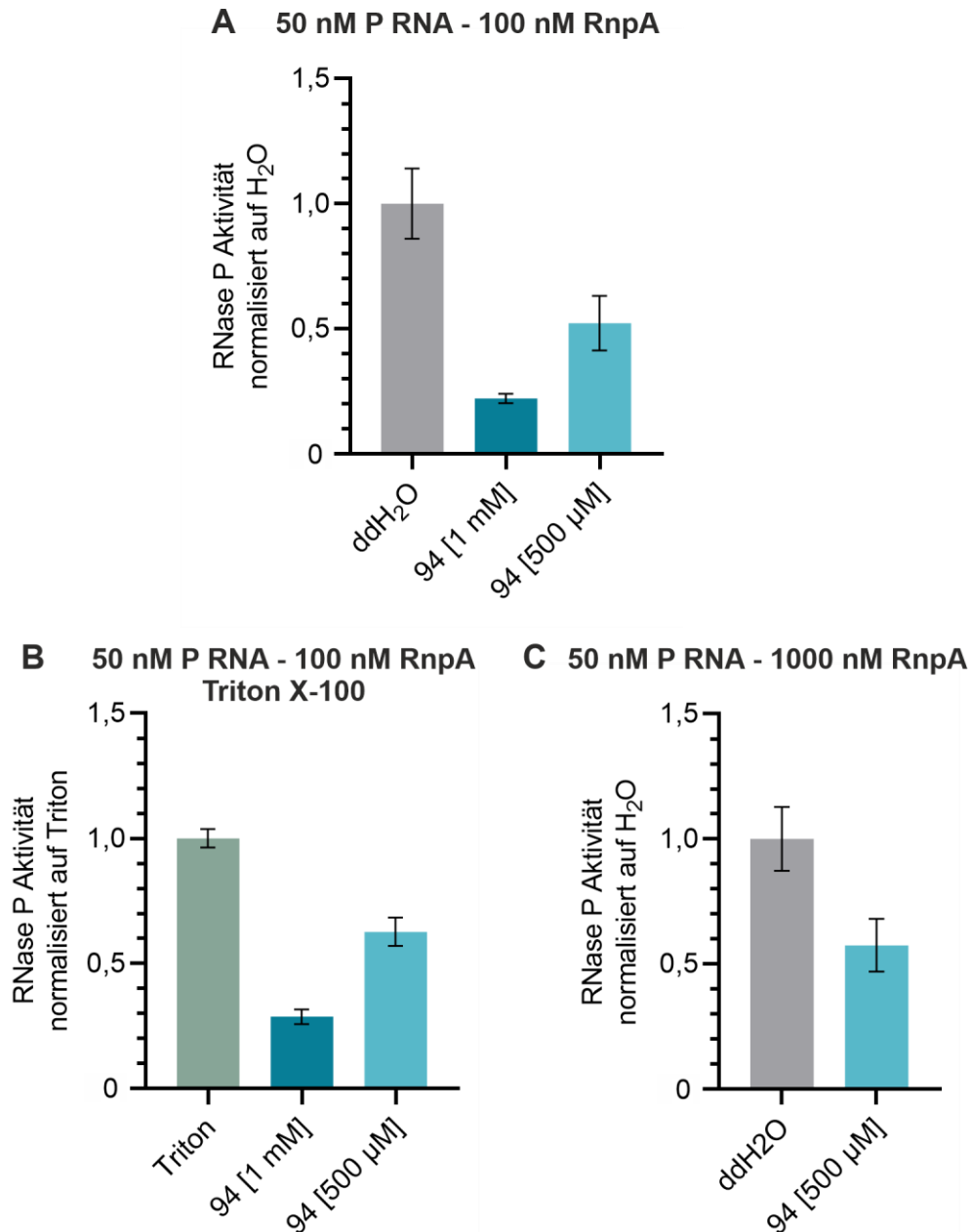


**Abb. 55: Weitergehende Testung von Verbindung 94 mit dem *B. subtilis* Holoenzym**

(A) *B. subtilis* Holoenzym-Aktivität in Anwesenheit von Verbindung 94. Die Kinetiken wurden mit 10 nM P RNA, 20 nM RnpA und 100 nM Substrat in KN-Puffer mit 5 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Die verwendete Konzentration von Verbindung 94 ist in eckigen Klammern angegeben. Wie in allen Experimenten wurde zur Bestimmung der RNase P-Aktivität die ermittelte Ratenkonstante auf die Wasser- (A und C) bzw. Tritonkontrolle (B) normalisiert. Die Mittelwerte (± SEM) basieren auf mindestens drei biologischen Replikaten. (B) Einfluss von Triton X-100. Die Experimente wurden wie in (A) beschrieben durchgeführt jedoch unter Zusatz von 0,01 % Triton X-100. Die Mittelwerte (± SEM) basieren auf drei biologischen Replikaten. (C) Effekte einer um Faktor 10 verminderten Enzymkonzentration. Die Experimente wurden in KN-Puffer mit 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 nM P RNA, 2 nM RnpA und 10 nM Substrat durchgeführt, um den Substratüberschuss bei einem Faktor von 10 beizubehalten. Die gezeigten Daten (dargestellt als Mittelwert ± SEM) beruhen auf drei biologischen Replikaten.

Neben der *B. subtilis* RNase P wurde auch die RNase P aus dem humanpathogenen Bakterium *Staphylococcus aureus* für entsprechende Testungen verwendet. Die inhibitorische Aktivität von Verbindung 94 war hierbei etwas schwächer ausgeprägt als bei der *B. subtilis* RNase P, jedoch stärker als bei der *T. maritima* RNase P. Eine Konzentration von 1 mM

Inhibitor führte zu einer 80%igen Inhibition. Bei 500  $\mu\text{M}$  konnte immerhin noch eine Hemmung um 50 % beobachtet werden (Abb. 56A).



**Abb. 56: Weitergehende Testung von Verbindung 94 mit dem *S. aureus* Holoenzym**

(A) *S. aureus* Holoenzym-Aktivität in Anwesenheit von Verbindung 94. Die Kinetiken wurden mit 50 nM P RNA, 100 nM RnpA und 500 nM Substrat in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Die verwendete Konzentration von Verbindung 94 ist in eckigen Klammern angegeben. Wie in allen Experimenten (A-C) wurde zur Bestimmung der RNase P-Aktivität die ermittelte Ratenkonstante auf die Wasser- (A und C) bzw. Tritonkontrolle (B) normalisiert. Die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) basieren auf mindestens vier biologischen Replikaten. (B) Einfluss von Triton X-100. Die Experimente wurden wie in (A) beschrieben durchgeführt jedoch unter Zusatz von 0,01 % Triton X-100. Die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) basieren auf drei biologischen Replikaten. (C) Effekte einer um Faktor 10 erhöhten Proteinkonzentration. Die Experimente wurden in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 nM P RNA, 1000 nM RnpA sowie 500 nM Substrat durchgeführt. Die gezeigten Daten (dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SEM) beruhen auf vier biologischen Replikaten.

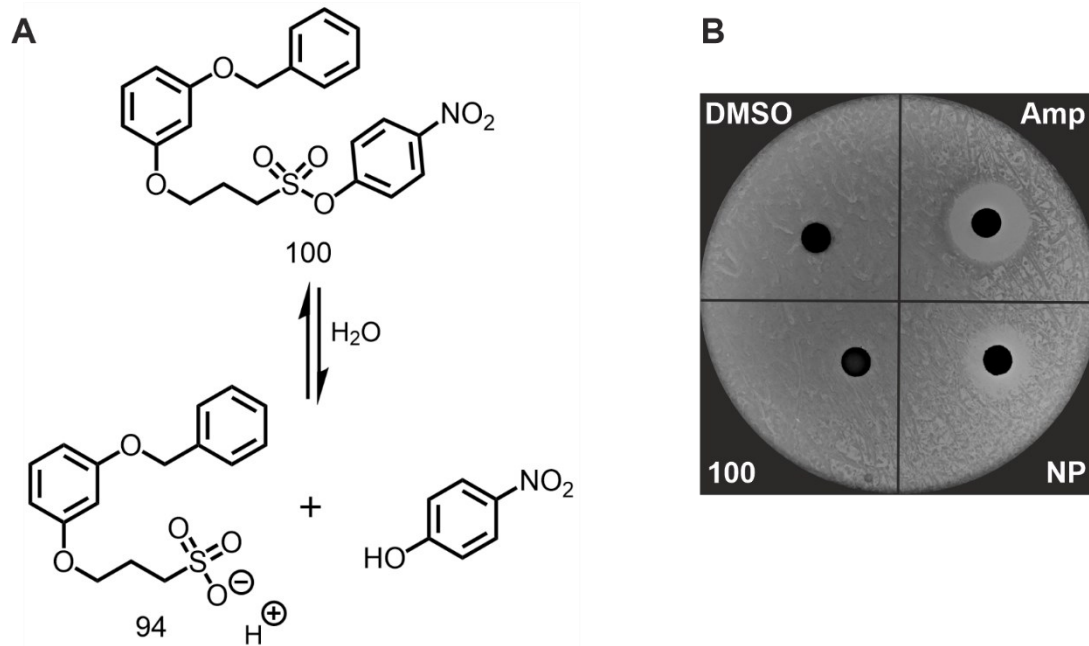
Somit wurden im Folgenden also 500  $\mu\text{M}$  für die Kontrollexperimente verwendet. Weder die Zugabe von Triton X-100 noch die Erhöhung der Proteinkonzentration um einen Faktor von 10

nahmen dabei Einfluss auf die zuvor beobachteten Effekte (Abb. 56B, C). Unter Verwendung von 50 nM P RNA und 100 nM RnpA-Protein betrug die Ratenkonstante lediglich  $\sim 2,8 \text{ min}^{-1} \pm 0,9 \text{ min}^{-1}$ , sodass ein Senken der Enzymkonzentration wenig sinnvoll erschien und sich bei diesem Enzym letztlich dafür entschieden wurde, die Proteinkonzentration zu erhöhen. Das Erhöhen der Proteinkonzentration hatte in diesem Fall sogar einen positiven Einfluss auf die Enzymkinetik in Form einer Erhöhung der Ratenkonstante auf  $47 \text{ min}^{-1} \pm 9 \text{ min}^{-1}$ .

Zusammenfassend konnte für Verbindung 94 eine RNase P-Inhibition neben dem *T. maritima* Enzym auch gegenüber dem *B. subtilis* und *S. aureus* Enzym festgestellt werden. Der Effekt war für das *B. subtilis* Enzym mit einer 45%igen Inhibition unter Zugabe von 250  $\mu\text{M}$  der Verbindung 94 am stärksten. Anhand der Zugabe von Triton X-100, einem nichtionischen Detergens, und einer Variation der Proteinkonzentration sollte überprüft werden, ob es sich bei Verbindung 94 um einen Protein-Aggregator handelt. Die inhibitorischen Effekte blieben sowohl unter Detergens-Zugabe als auch nach Variation der Proteinkonzentration für alle drei getesteten Enzyme weitestgehend konstant. Lediglich Veränderungen der *B. subtilis* Enzymkonzentration zeigten eine Sensitivität gegenüber der Enzymkonzentration auf. An dieser Stelle spricht die Gesamtheit der Experimente eher dafür, dass es sich bei Verbindung 94 sehr wohl um einen Inhibitor handelt und nicht um einen Protein-Aggregator. Aus diesem Grund wurde Verbindung 94 als Ausgangspunkt für weitergehende Derivatisierungen gewählt mit dem Ziel einerseits die durch das *Docking* vorhergesagten Interaktionen zu überprüfen und andererseits die schwachen inhibitorischen Effekte *in vitro* zu verstärken.

Hinsichtlich der antibakteriellen Effekte der Verbindung wurde versucht durch eine *Prodrug*-Strategie das Überwinden der bakteriellen Zellwand zu ermöglichen. Hierfür wurde der in Abb. 57A gezeigte Sulfonsäurearylester synthetisiert, da Sulfonsäurealkylester aufgrund ihrer Eigenschaft als Alkylantien zu agieren nicht infrage kamen (Sanderson & Shield, 1996). Anschließend wurde das Derivat am *E. coli* AS19-Stamm auf seine antibakteriellen Effekte getestet. In diese Testung wurde das Hydrolyse-Produkt Nitrophenol (NP) des Sulfonsäureesters als Kontrolle miteingeschlossen, da dieses toxische Effekte hervorrufen könnte. Diese könnten auf der Oxidation zum reaktiven Semichinon beruhen, das unter Radikalbildung mit Nukleinsäuren und Proteinen reagieren kann (Hansch *et al.*, 2000; Gami *et al.*, 2014). Die Verbindung 100 zeigte selbst keinen Hemmhof, das Nitrophenol hingegen schon (Abb. 57B). Dies deutet darauf hin, dass die Verbindung 100 entweder nicht in die Bakterienzelle gelangte oder der Sulfonsäureester nicht hydrolysiert wurde. Wenn das Derivat in die Zelle gelangt wäre und anschließend (quantitativ) hydrolysiert worden wäre, hätte zumindest ein zum Nitrophenol vergleichbarer Hemmhof zu sehen sein müssen. Da die Verbindung 94 selbst keine antibakteriellen Effekte zeigte, wurden die nachfolgenden Derivate allesamt lediglich einer

enzymkinetischen Testung unterzogen. Für diese Experimente wurde das *T. maritima* Enzym verwendet.



**Abb. 57: Prodrug-Strategie von Verbindung 94**

(A) Struktur des Sulfonsäure-Arylesters 100 sowie dessen bei der Hydrolyse entstehende Produkte. (B) Hemmhofstest der Verbindung 100. Als Kontrolle wurden 10 µg Ampicillin (Amp) verwendet. Von der Verbindung 100 wurden 10 µL einer 50 mM Stammlösung auf den 6 mm großen Filter gegeben. Als weitere Kontrolle wurden 10 µL einer 50 mM Lösung von Nitrophenol (NP), welches bei der Hydrolyse des *Prodrugs* entsteht, eingesetzt.

### Derivatisierungen von Verbindung 94

Um einen möglichst großen Aktivitätsgewinn zu erzielen, standen im Rahmen der Derivatisierungen vor allem Verbindungen mit einer hohen strukturellen Diversität im Fokus. Zunächst wurde in diesem Zusammenhang das 3-Phenoxypropan-1-sulfonat-Teilgerüst variiert. Durch die Verlängerung des ursprünglichen Propyl-Linkers um eine Methyleneinheit (Abb. 58; Verbindung 101) sollte überprüft werden, ob die Sulfonat-Gruppe für entsprechende Wasserstoffbrückenbindungen bzw. Salzbrücken besser positioniert werden kann. Des Weiteren wurde ein Austausch der Ether-Funktion (Phenylalkylether) gegen ein sekundäres Amin vorgenommen, woraufhin ein mono-substituiertes Anilin-Derivat entstand (Verbindung 102). Dabei wurden die Wasserstoffbrückenakzeptor-Eigenschaften vom Ether hin zum Amin vorwiegend in Wasserstoffbrückendonor-Eigenschaften umgekehrt. Da sich Letzteres in wässriger Lösung in einem Gleichgewicht zwischen protonierter und deprotonierter Form befindet, kann es gleichwohl als Wasserstoffbrückenakzeptor fungieren. Es sollten also beide Funktionalitäten in der Lage sein, mit Lysin 51 Wasserstoffbrücken einzugehen. Die enzymkinetische Testung beider Verbindungen bei einer Konzentration von 2,5 mM zeigte jedoch einen Verlust an Aktivität hinsichtlich der RNase P-Inhibition (siehe Anhang 5.2.1.5, Seite 255).

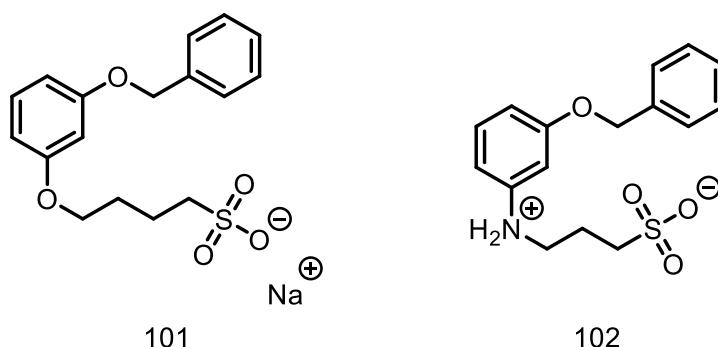


Abb. 58: Phenylbutylether 101 und *N*-Butylanilin 102 nach Derivatisierung von Verbindung 94

Aus diesem Grund wurde das 3-Phenoxypropan-1-sulfonat-Teilgerüst im Weiteren beibehalten und der in Abb. 59 blau dargestellte 3-(Benzyloxy)phenyl-Substituent variiert. Zunächst wurde dieser durch ausschließlich monozyklische Systeme ersetzt (Verbindung 103-106), um zu überprüfen, ob das zweite aromatische System tatsächlich zur Ausbildung vorhergesagter  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen befähigt ist. Bei diesen Verbindungen fehlte der Benzylphenylether gänzlich (Verbindung 103) oder er wurde durch einen verkürzten Methylphenylether (Verbindung 104) bzw. einen sterisch anspruchsvollen *tert*-Butyl-Rest (Verbindung 105 und 106) ersetzt. Im nächsten Schritt entstanden dann durch Anellierung an das Benzolringsystem, planare Verbindungen mit bi- sowie trizyklischem Rest (Verbindung 109-112). Neben einem Derivat mit 2,3-Dihydro-1*H*-inden- wurde eines mit 1,2,3,4-Tetrahydronaphthalin-Rest (Verbindung 107 & 108) dargestellt. Bei Verbindung 109 bis 112 (wobei sich 109 und 111 lediglich hinsichtlich ihrer Konstitution und damit der Art der Verknüpfung voneinander unterscheiden), die einen Naphthalin-, einen Chinolin- oder einen Phenanthren-Rest besaßen, wurde das  $\pi$ -Elektronensystem durch die Derivatisierung erweitert. Zudem wurden Verbindungen mit zwei verbrückten Benzolringen synthetisiert, die der Ausgangsverbindung 94 folglich stärker ähneln. Neben den über die 3- bzw. 4-Position verknüpften Biphenyl-Derivaten (Verbindung 113 und 114), bei denen die beiden Ringsysteme gegeneinander verdrillt angeordnet vorliegen, wurden diese auch über eine Sauerstoffbrücke und damit einen Ether (Verbindung 115) (in diesem Fall jedoch um eine Methyleneinheit im Vergleich zu Verbindung 94 verkürzt und in anderer Position befindlich), ein Keton (Verbindung 116) oder ein Carbonsäureamid (Verbindung 117) miteinander verknüpft. Bei Verbindung 118 fand indessen eine Doppelbindung als Linker Verwendung, sodass es sich bei diesem Rest um ein vollends durchkonjugiertes  $\pi$ -Elektronensystem handelt. Jener Linker war zudem in seiner freien Drehbarkeit vergleichbar zum Carbonsäureamid deutlich eingeschränkt.

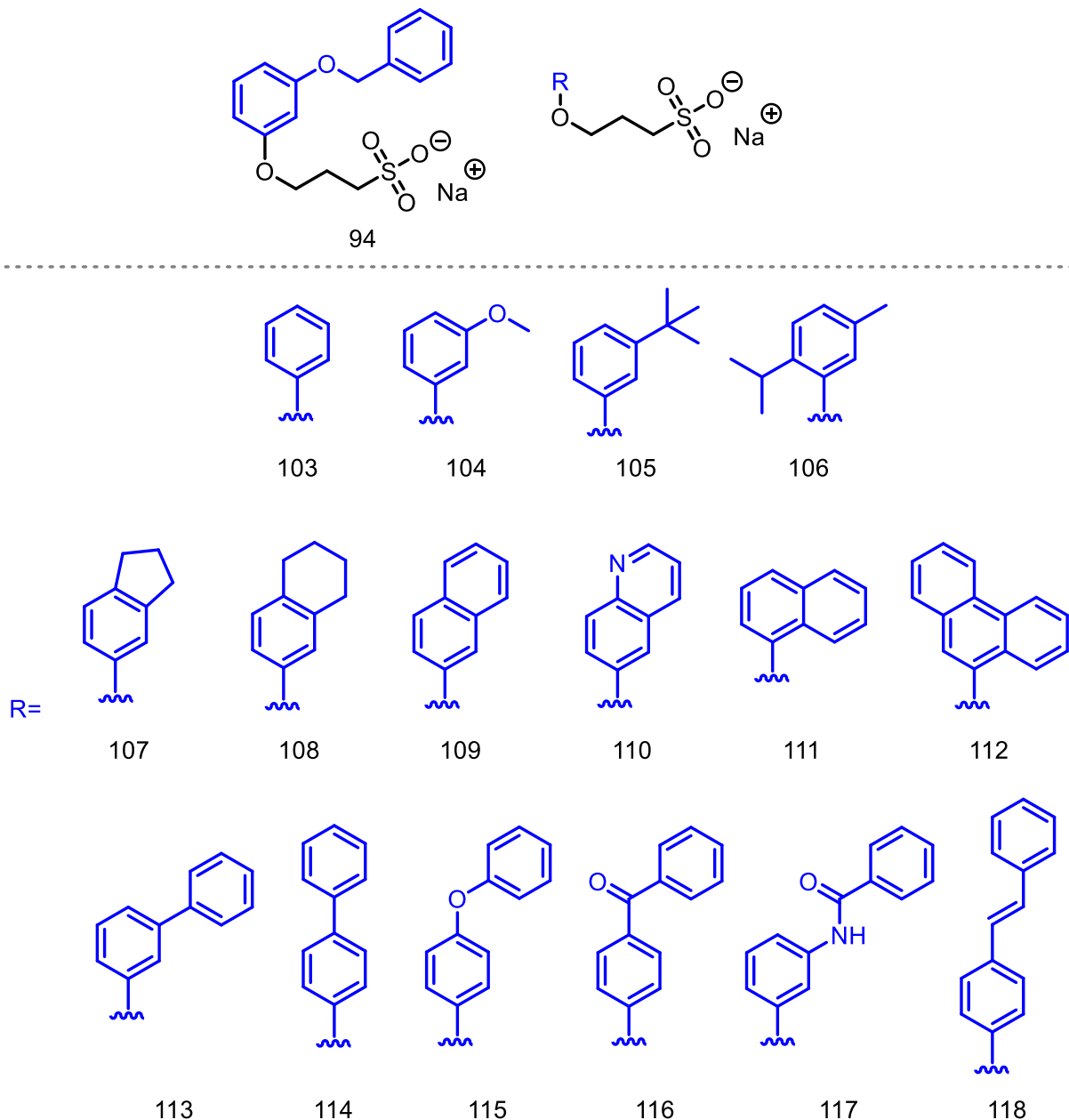
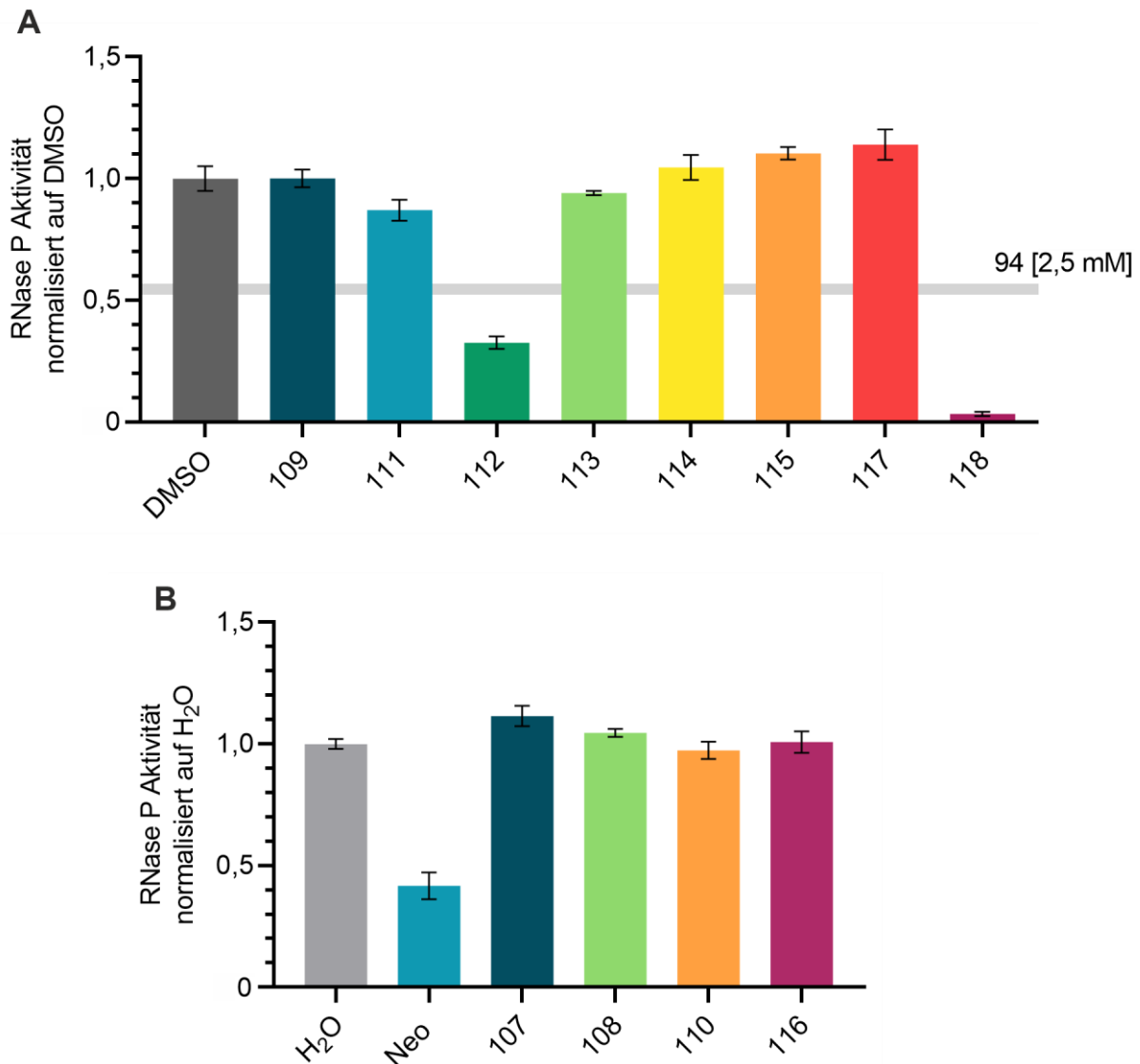


Abb. 59: Derivate 103-118 ausgehend von Verbindung 94 mit monozyklischem (103-106), dicyklischem (107-111) oder tricyklischem Rest R (112) bzw. mit unterschiedlich verbrückten Benzolringssystemen (113-118)

Für die Testung wurden die Verbindungen abhängig vom cLogP-Wert bzw. der erwarteten Wasser-Löslichkeit entweder in Wasser oder DMSO gelöst und dementsprechend auf die Wasser- oder die 10 %-DMSO-Kontrolle normalisiert. Die Verbindungen mit lediglich einem Benzolring waren allesamt, wie anhand der *Docking*-Ergebnisse zu erwarten war, bei einer Konzentration von 2,5 mM inaktiv (Verbindung 103-106; siehe Anhang 5.2.1.5, Seite 255). Von den Verbindungen mit di- bzw. tricyklischem Rest war lediglich jene mit Phenanthren-Gerüst (Verbindung 112) als RNase P-Inhibitor aktiv. Im Vergleich zu Verbindung 94 zeigte diese eine um ~20 % verstärkte Inhibition (Abb. 60).



**Abb. 60: Testung der Sulfonate 107-118 mit di- oder trizyklischem System bzw. mit zwei verbrückten Aromaten**

Die Experimente wurden mit 50 nM *T. maritima* Holoenzym und 500 nM Substrat in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Es wurde eine Minute nach Reaktionsstart eine Probe gezogen. Der Anteil an prozessiertem Substrat dieser Probe wurde auf die entsprechende Lösungsmittel-Kontrolle normalisiert. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler (SEM) dargestellt und basieren auf mindestens drei biologischen Replikaten. Die Testung aller Verbindungen erfolgte bei einer Konzentration von 2,5 mM. **(A)** Testung derjenigen Verbindungen, die in DMSO gelöst und folglich bei 10 % DMSO getestet wurden. Die durch Verbindung 94 bei derselben Konzentration hervorgerufenen Effekte sind zum Vergleich als graue Linie dargestellt. Die Normalisierung dieser Testung erfolgte auf die 10 %-DMSO-Kontrolle. **(B)** Testung der in Wasser gelösten Verbindungen (2,5 mM) und der Neomycin-Kontrolle (Neo) bei 100 µM. Die Normalisierung erfolgte hierbei auf die Wasser-Kontrolle.

Unter den Verbindungen mit zwei verbrückten Benzolringen wurde mit Verbindung 118 eine Verbindung gefunden, die deutlich aktiver war als die Ausgangsverbindung selbst. Diese führte bei einer Konzentration von 2,5 mM zu einer fast vollständigen Inhibition. Zusammenfassend scheinen damit also zwei Benzolringe in entsprechendem Abstand zueinander für die Bindung an das P Protein generell erforderlich zu sein. Daneben konnte die Inhibition im Besonderen durch einen hydrophoben Alkenlinker verstärkt werden.

Im Weiteren sollte daraufhin untersucht werden, welcher Abstand zwischen den beiden Benzolringen für etwaige Wechselwirkungen optimal ist. In diesem Zusammenhang



entstanden die Verbindungen 119-121 mit einem um eine Methyleneinheit verkürzten oder verlängerten Linker (Abb. 61). Zudem wurde überprüft, inwiefern die Position der Benzyloxy-Gruppe relevant ist. Befanden sich bei Verbindung 94 die beiden Etherfunktionen noch in *meta*-Position (vgl. Resorcinol) zueinander, war es bei Verbindung 121 die *ortho*- (vgl. Catechol) und bei Verbindung 122 die *para*-Position (vgl. Hydrochinon).

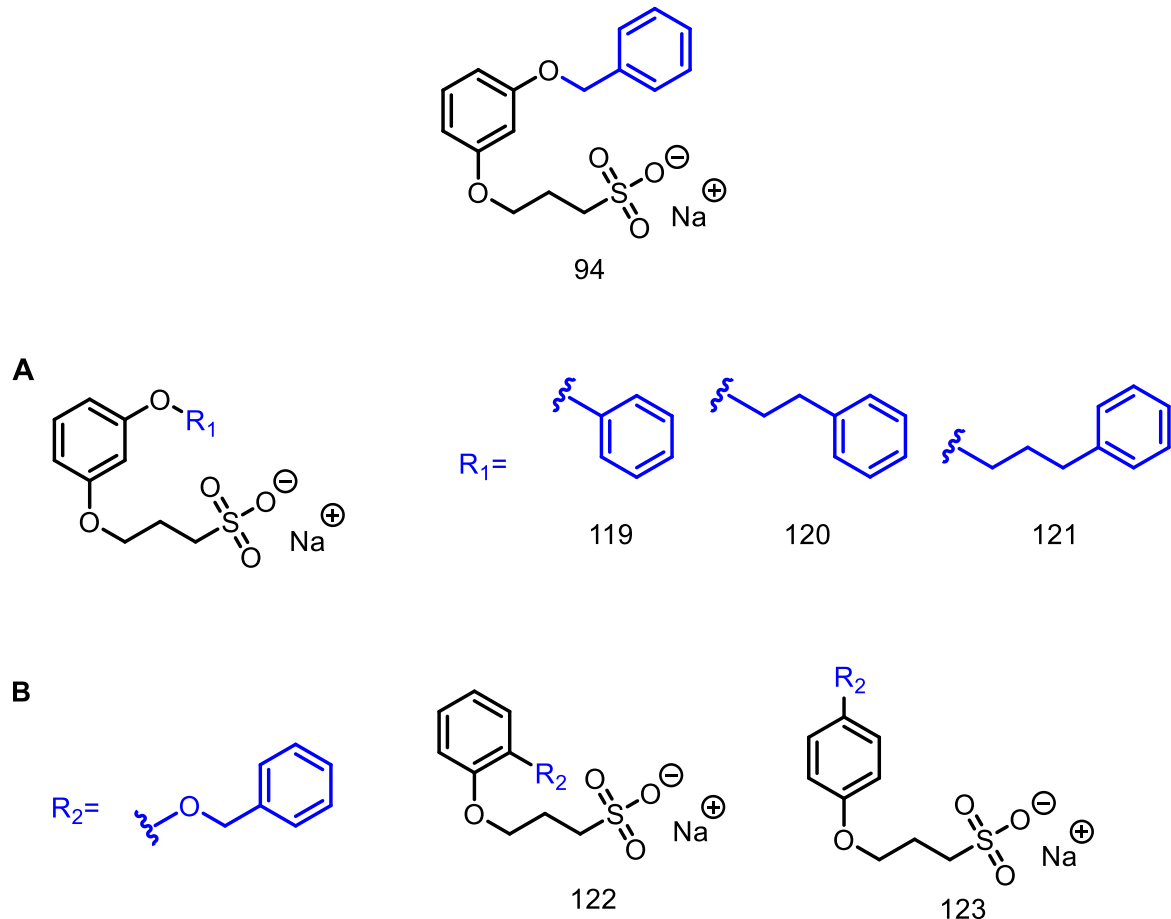
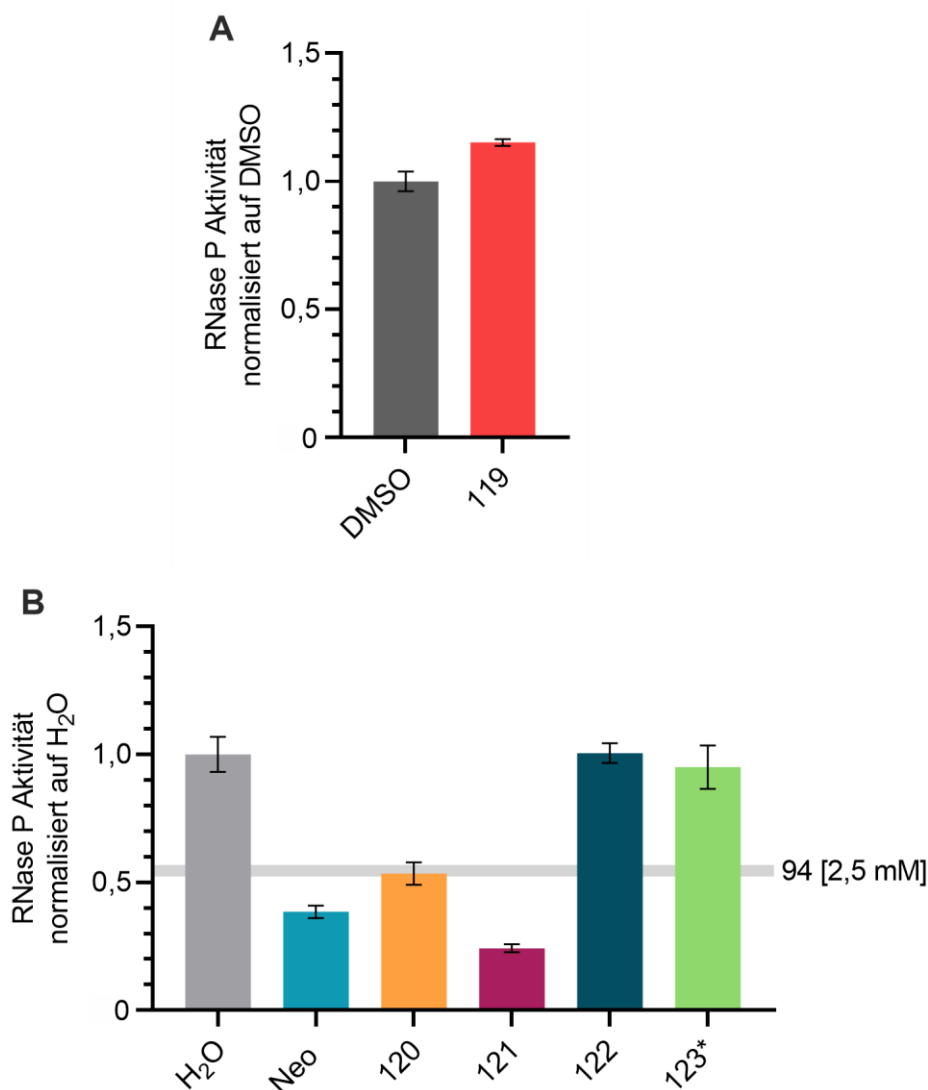


Abb. 61: Benzyloxyether-Derivate 119- 123 mit variabler Linkerlänge und veränderter Verknüpfungsposition

Bezüglich der Linkerlänge ist Abb. 62 zu entnehmen, dass diese durchaus einen Einfluss hat. Die Verkürzung des Linkers (Verbindung 119) führte zu einem Verlust der Inhibition. Eine Ethylengruppe als Linker ist mit der Methylengruppe aus der Ausgangsverbindung 94 hinsichtlich der RNase P-Inhibition durchaus vergleichbar. Eine weitere Verlängerung des Linkers (Propylgruppe) wirkte sich positiv auf die inhibitorischen Effekte aus, da diese um etwa 30 % im Vergleich zu Verbindung 94 verstärkt wurden. Ebenso scheint es für die Inhibition essentiell zu sein, dass sich die beiden Etherfunktionalitäten in *meta*-Position zueinander befinden, da die entsprechenden *ortho*- und *para*-Derivate (Verbindung 122 und 123) keinerlei Wirkung zeigten.



**Abb. 62: Testung der Sulfonat-Derivate 119-123**

Die Experimente wurden mit 50 nM *T. maritima* Holoenzym und 500 nM Substrat in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Eine Minute nach Reaktionsstart wurde eine Probe gezogen. Der Anteil an prozessiertem Substrat dieser Probe wurde auf die entsprechende Lösungsmittel-Kontrolle normalisiert. Die Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt und basieren auf mindestens drei biologischen Replikaten. Die Testung der Verbindungen erfolgte bei einer Konzentration von 2,5 mM. Ausgenommen hiervon ist Verbindung 123, die lediglich bei einer Konzentration von 1 mM getestet werden konnte (durch \* gekennzeichnet). **(A)** Testung derjenigen Verbindung, die in DMSO gelöst wurde und folglich bei 10 % DMSO getestet wurde. Die Normalisierung dieser Testung erfolgte auf die 10 %-DMSO-Kontrolle. **(B)** Testung der in Wasser gelösten Verbindungen und der Neomycin-Kontrolle (Neo) bei 100  $\mu$ M. Die durch Verbindung 94 bei derselben Konzentration hervorgerufenen Effekte sind als graue Linie zum Vergleich dargestellt. Die Normalisierung erfolgte hierbei auf die Wasser-Kontrolle.

Gemäß *Docking*-Studien sollte die Benzyl-Gruppe des Benzylphenylethers  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit Phenylalanin 21 eingehen. Dies sollte durch Substitution des Benzolrings weitergehend analysiert werden. Dazu wurden Verbindungen mit Substituenten sowohl Elektronen-schiebender (Verbindung 131 und 132) als auch -ziehender (Verbindung 124-130) Natur in der *ortho*-, *meta*- und *para*-Position dargestellt (Abb. 63).

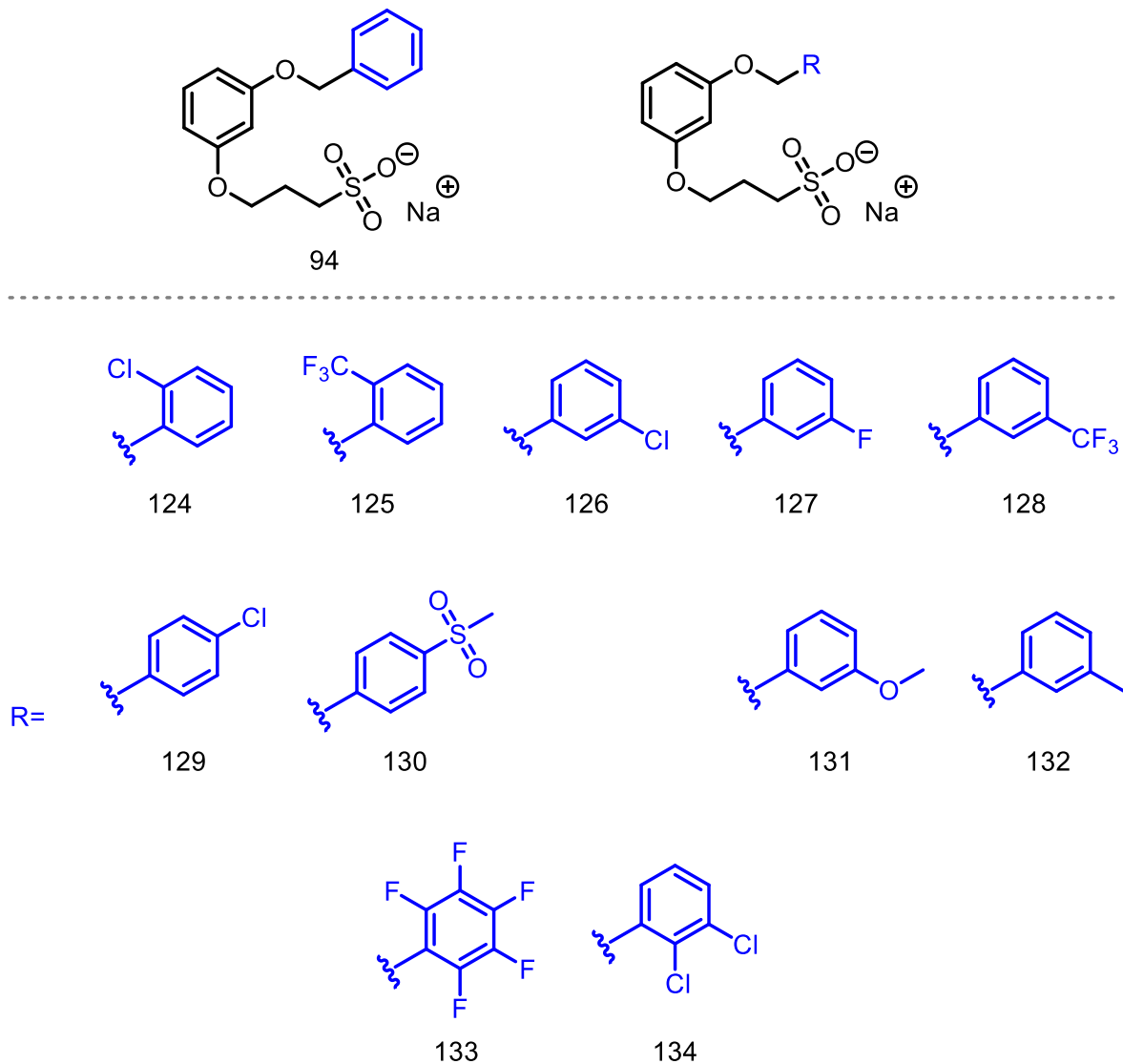
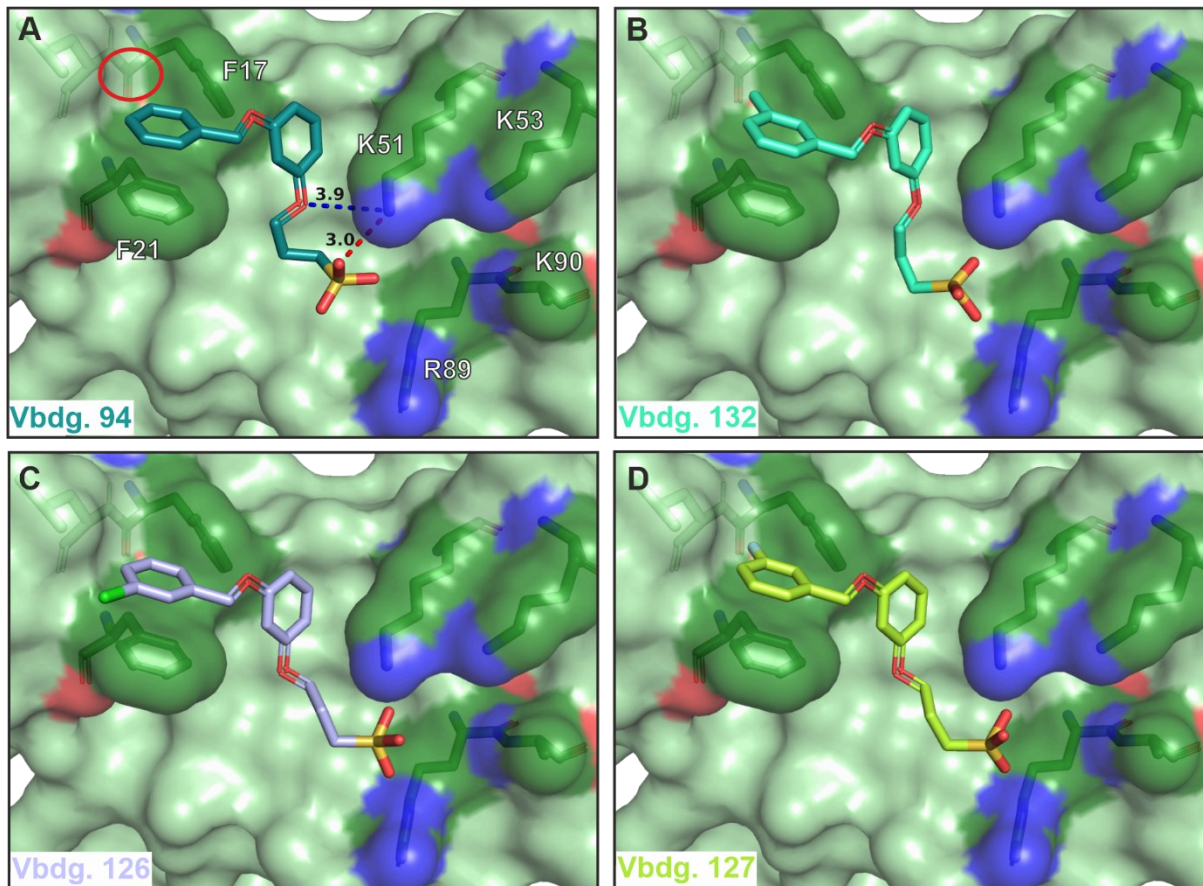


Abb. 63: Derivate 124-134 ausgehend von Verbindung 94 mit Elektronen-ziehenden Substituenten in der *ortho*-, *meta*- und *para*-Position sowie mit Elektronen-schiebenden Substituenten in der *meta*-Position bzw. Mehrfachsubstitution des Benzolrings

Wie anhand der *Docking*-Pose von Verbindung 94 deutlich wird, befindet sich in der Nähe der Benzyl-Gruppe des Benzylphenylethers eine hydrophobe Tasche (Abb. 64A). Diese sollte in hydrophobe Interaktionen mit einer Methyl- oder Trifluormethyl-Gruppe eingebunden werden (Abb. 64B). Ferner sollte durch das Anbringen von Elektronen-ziehende Substituenten an den Benzolring eine verstärkte Inhibition beobachtet werden (Abb. 64C & D), sofern der Benzyl-Rest tatsächlich in  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen involviert ist. Durch die Elektronen-ziehenden Substituenten wird der Benzolring entsprechend Elektronen-arm und könnte als Elektronen-Akzeptor innerhalb eines *Charge-Transfer*-Komplexes mit dem Phenylalanin fungieren.

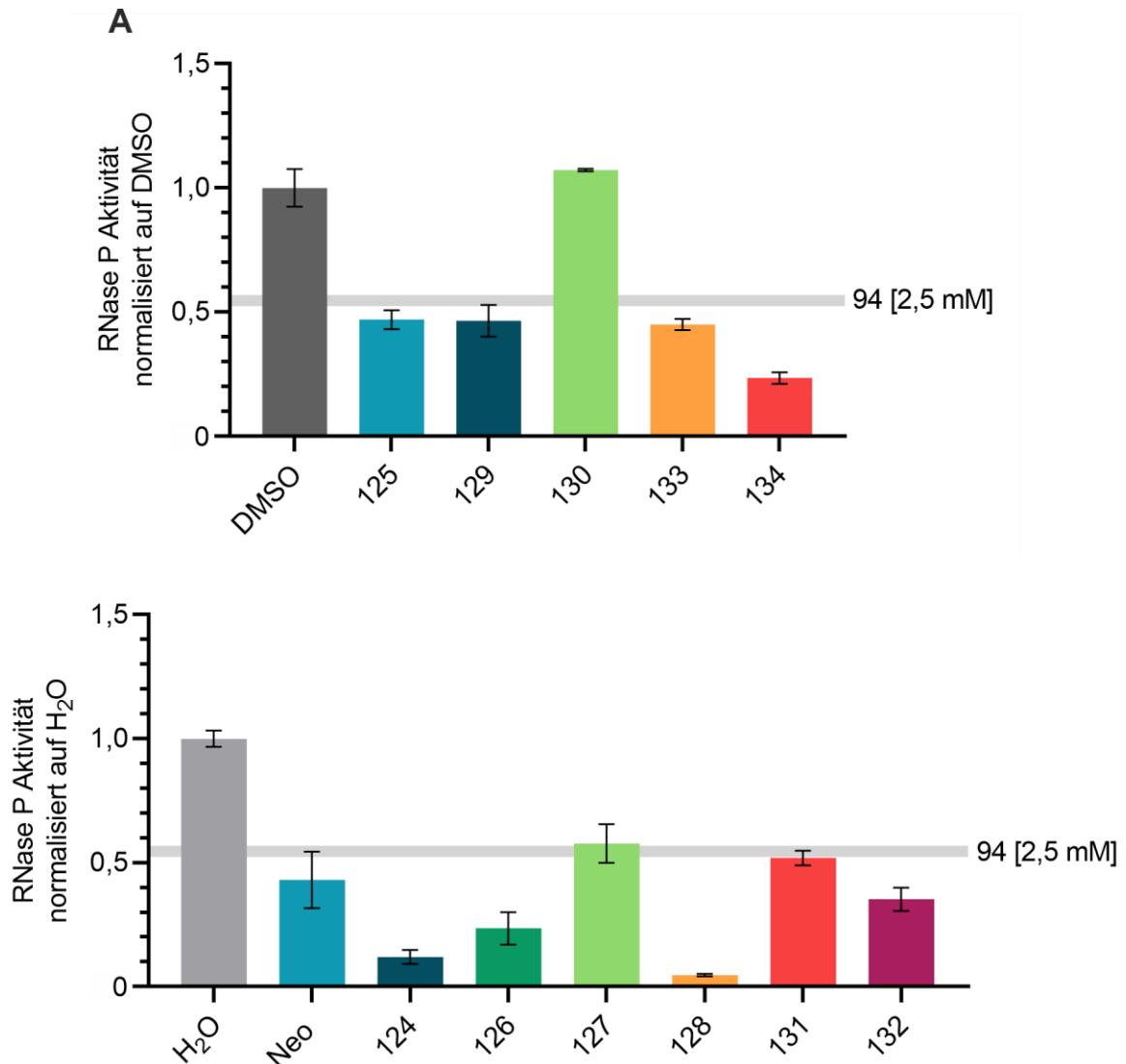


**Abb. 64: Docking-Posen der Verbindungen mit hydrophoben bzw. Elektronen-ziehenden Substituenten an der Benzyl-Gruppe des Benzylphenylethers**

(A) *Docking*-Pose von Verbindung 94. Die Protein-Oberfläche ist hellgrün dargestellt. Die für die Bindung wichtigen Aminosäuren wurden durch folgenden Farbcode für die einzelnen Atome hervorgehoben: C-Atome: dunkelgrün, N-Atome: blau, O-Atome: rot und S-Atome: gelb. Verbindung 94 trägt denselben Farbcode. Allerdings sind die C-Atome in einem türkisen Farbton gezeichnet. Die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Phenylpropylether und Lysin 51 ist blau eingefärbt und die zwischen dem Sulfonat und Lysin 51 rot. Die Distanzen der einzelnen Wechselwirkungen sind in Ångström angegeben. Die hydrophobe Tasche in der Nähe der Benzyl-Gruppe des Benzylphenylethers ist als roter Kreis eingezeichnet und sollte durch eine Methylgruppe in der *meta*-Position (B) adressiert werden. In (C) und (D) sind die *Docking*-Ergebnisse der Verbindungen mit einem Chlor- oder Fluor-Substituenten dargestellt. Proteinstruktur: J. H. W. SCANLAN (AG Prof. Dr. W. DIEDERICH, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg).

Wie Abb. 65 zeigt, führte ein Chlor-Substituent in der *ortho*-Position (Verbindung 124) zu einer um ~40 % verstärkten Inhibition im Vergleich zu Verbindung 94. Die Verbindung mit einem Chlor-Substituenten in *meta*-Position zeigte immerhin noch eine ~75%ige Inhibition (Verbindung 126). Ebenfalls konnte die Inhibition durch einen Trifluormethyl-Substituenten in der *meta*-Position (Verbindung 128) verstärkt werden, sodass bei 2,5 mM eine fast vollständige Inhibition eintrat, was in Einklang mit den *Docking*-Ergebnissen steht (vgl. Abb. 64B). Der Trifluormethyl-Substituent in der *ortho*-Position (Verbindung 125) jedoch führte keine Wirkungssteigerung herbei. Durch einen Fluor-Substituenten in der *meta*-Position (Verbindung 127) sowie einen Chlor-Substituenten in der *para*-Position (Verbindung 129) konnte ebenfalls keine Wirkungssteigerung erzielt werden. Die Multisubstitution mit Elektronen-ziehenden Substituenten führte lediglich bei dem Dichlor-substituierten Derivat (Verbindung 134) zu einer 30%igen Verstärkung der Inhibition. Bei dem Pentafluor-

substituierten Derivat (Verbindung 133) verhielten sich die Effekte hingegen ähnlich zu Verbindung 94.



**Abb. 65: Testung der Sulfonate 124-134 mit Substitutionen am Benzolring des Benzylrestes**

Die Experimente wurden mit 50 nM *T. maritima* Holoenzym und 500 nM Substrat in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Es wurde eine Minute nach Reaktionsstart eine Probe gezogen. Der Anteil an prozessiertem Substrat dieser Probe wurde auf die entsprechende Lösungsmittel-Kontrolle normalisiert. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler (SEM) dargestellt und basieren auf mindestens drei biologischen Replikaten. Die Testung aller Verbindungen erfolgte bei einer Konzentration von 2,5 mM. Die durch Verbindung 94 bei derselben Konzentration hervorgerufenen Effekte sind zum Vergleich als graue Linie dargestellt. **(A)** Testung derjenigen Verbindungen, die in DMSO gelöst und folglich bei 10 % DMSO getestet wurden. Die Normalisierung dieser Testungen erfolgte auf die 10 %-DMSO-Kontrolle. **(B)** Testung der in Wasser gelösten Verbindungen und der Neomycin-Kontrolle (Neo) bei 100 µM. Die Normalisierung erfolgte hierbei auf die Wasser-Kontrolle.

Die bisher beschriebenen Derivate, die im Rahmen der Substitution der Benzyl-Gruppe des Benzylphenylethers entstanden, führten allesamt zu einer Inhibition, die entweder mit der von Verbindung 94 vergleichbar war oder sogar stärker ausfiel. Eine Ausnahme stellt hier die Verbindung mit Methylsulfonyl-Gruppe in der *para*-Position (Verbindung 130) dar, da diese Verbindung keinerlei Inhibition zeigte. Aufgrund ihres Elektronenzugs hätte diese Verbindung aber ebenfalls zu einer stärkeren Inhibition oder zumindest vergleichbaren Effekten führen

sollen. Allerdings ist diese Verbindung im Vergleich zu Verbindung 94 deutlich polarer und damit also auch hydrophiler ( $c\text{LogP}(\text{Vbdg.130}) = -2,49$  vs.  $c\text{LogP}(\text{Vbdg.94}) = -0,85$ ). Verbindung 130 ist sogar nicht nur hydrophiler als Verbindung 94, sondern auch hydrophiler als alle anderen in Abb. 63 gezeigten Verbindungen, deren  $c\text{LogP}$ -Werte in einem Bereich von  $\sim -1,0$  bis  $\sim 0,5$  liegen. Durch die Substitution mit Elektronen-schiebenden Gruppen in der *meta*-Position konnte beim Methyl-substituierten Derivat (Verbindung 132) eine geringfügige Intensivierung der Effekte um 20 % beobachtet werden. Beim Methylether-Derivat (Verbindung 131) wurde hingegen keinerlei Unterschied festgestellt. Abschließend lassen sich aus diesen Substitutionen damit keine eindeutigen Trends hinsichtlich des Elektronenzugs, der Substituenten-Größe oder der Positionierung des Substituenten ableiten.

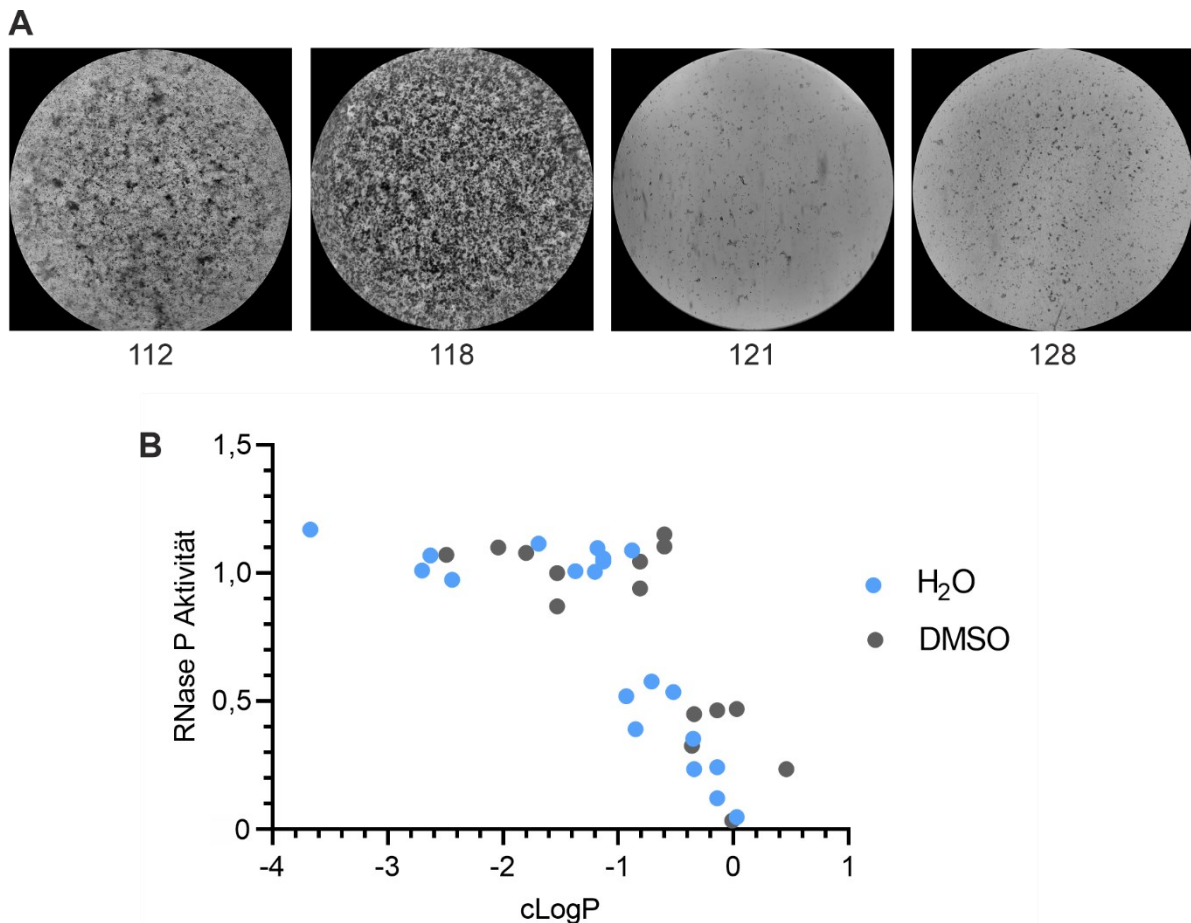
Zusammenfassend wurde im Rahmen der Derivatisierung von Verbindung 94 zunächst das 3-Phenoxypropan-1-sulfonat-Teilgerüst modifiziert, was mit einem Aktivitätsverlust der beiden getesteten Verbindungen einherging. Folglich wurde dieses Teilgerüst im Weiteren beibehalten. Das Ersetzen des 3-(Benzoxy)phenyl-Substituenten durch monozyklische, dicyklische oder tricyklische Reste bzw. unterschiedlich verbrückte Benzolringsysteme führte zu zwei Verbindungen mit gesteigerter RNase P-Inhibition. Außerdem wurde die Linkerlänge zwischen den beiden Benzolringen sowie die Position der Benzyloxy-Gruppe variiert. Eine Propylgruppe als Linker führte dabei zu einer Verstärkung der Effekte, wohingegen die *para*- und *ortho*-Position der Benzyloxy-Gruppe zu einem Verlust der Effekte führte. Abschließend wurde die Benzyl-Gruppe des Benzylphenylethers verschiedenartig substituiert, was zu vier Verbindungen mit gesteigerter RNase P-Inhibition führte. Insgesamt wurden also 34 Derivate getestet, von denen sieben eine deutlich verstärkte Inhibition zeigten.

Aus den verschiedenen Derivatisierungs-Reihen gehen Verbindung 112 mit Phenanthren-Gerüst, Verbindung 118 mit Alkenlinker, Verbindung 121 mit Propylgruppe als Linker und Verbindung 128 mit einer Trifluormethyl-Gruppe in der *meta*-Position des Benzyl-Substituenten als die aktivsten Verbindungen hervor. Diese wurden im Anschluss in einer vollständigen Enzymkinetik getestet und dabei wurde die Konzentration so weit nach unten titriert, bis eine 50%ige Inhibition erreicht wurde. Im Rahmen dieser Experimente wurden mit Verbindung 128 Löslichkeitsprobleme festgestellt, die sich in Form einer Trübung des Kinetik-Ansatzes äußerten. Da alle vier Verbindungen ( $c\text{LogP}$  von  $-0,36$  für Vbdg. 112 bis  $0,03$  für Vbdg. 128) deutlich hydrophober als Verbindung 94 ( $c\text{LogP} = -0,85$ ) erscheinen, wurden für diese mikroskopische Untersuchungen bei der getesteten Konzentration von  $2,5$  mM im Kinetik-Puffer KN durchgeführt. Für alle vier Verbindungen konnte dabei Präzipitat im Mikroskop beobachtet werden (Abb. 66A). Außerdem konnten Verbindungen mit Nitrogruppe in *meta*-Position sowie mit Nitrilgruppe in *meta*- und *para*-Position aufgrund von Löslichkeitsproblemen gar nicht erst getestet werden (siehe Anhang 5.2.3, Seite 266). Diese Löslichkeitsprobleme waren aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den Verbindungen um



Salze handelt, eher unerwartet. Dass von den vier weiter untersuchten Verbindungen zumindest für Verbindung 121 und 128 eine 25 mM Stammlösung in Wasser angesetzt werden konnte, unterstreicht zudem, dass diese Verbindungen an sich sehr gut wasserlöslich sind. Nichtsdestotrotz kann an dieser Stelle die Problematik der Protein-Aggregation nicht ausgeschlossen werden.

Der Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient LogP ist ein Maß für das Verhältnis zwischen der Lipophilie und der Hydrophilie einer Verbindung, wobei positive Werte auf eine entsprechende Lipophilie und damit verbunden einer schlechten Wasserlöslichkeit hindeuten. Trägt man die gemessene Aktivität der RNase P nach Inkubation mit einer etwaigen Verbindung nun gegen deren mit dem Programm ChemDraw<sup>®</sup> ermittelten cLogP-Wert (*c=calculated*) auf, so wird folgendes deutlich: Je lipophiler und damit schlechter wasserlöslich eine Verbindung ist, desto stärker fiel deren gemessene Inhibition aus (Abb. 66B). Dies stellt folglich auch die Verbindung 94 selbst als RNase P-Inhibitor infrage.



**Abb. 66: Löslichkeitsexperimente zu den von Verbindung 94 ausgehenden Derivaten**

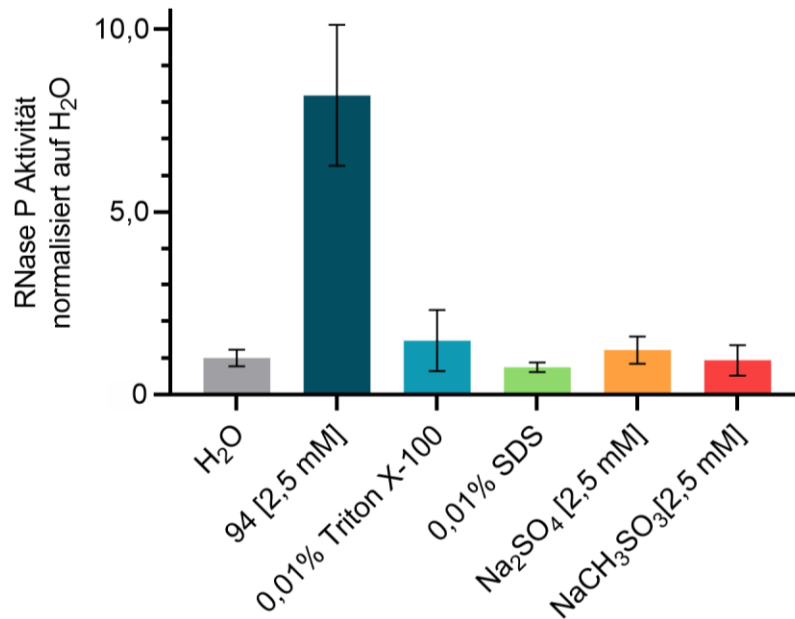
(A) Mikroskopische Aufnahmen der Verbindungen 112, 118, 121 und 128 in KN-Puffer (20 mM HEPES-KOH pH 7,4; 150 mM NH<sub>4</sub>OAc; 2 mM Spermidin; 0,05 mM Spermin; 4 mM 2-Mercaptoethanol). Es wurden 200  $\mu$ L Lösung in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> angesetzt und die jeweilige Verbindung in einer Konzentration von 2,5 mM dazugegeben. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Beobachtung mittels Mikroskop. (B) Zusammenhang zwischen den inhibitorischen Effekten und der Lipophilie der getesteten Verbindungen. Als Maß für die Lipophilie wurde der mit dem Programm ChemDraw<sup>®</sup> ermittelte cLogP-Wert gewählt. Die vorab gemessene RNase P-Aktivität ist gegen den cLogP-Wert aufgetragen. Blau sind die in Wasser gelösten Verbindungen und grau die in DMSO gelösten Verbindungen dargestellt.

Um der Fragestellung nachzugehen, ob es sich bei Verbindung 94 um einen Protein-Aggregator handelt oder nicht, wurde diese mit einem 10-fachen Proteinüberschuss im Vergleich zur P RNA getestet. Wie in Abb. 67 zu sehen ist, erhöht Verbindung 94 die Aktivität um den Faktor ~8 unter Verwendung von 500 nM P Protein und 50 nM P RNA für die *T. maritima* Enzymkinetik. Dies steht nicht im Einklang mit den Ergebnissen der initialen Experimente, bei denen die Verringerung der Enzymkonzentration um einen Faktor von 10 keinen Einfluss auf die Inhibition hatte. Um weitergehend zu analysieren, warum es durch die Verbindung zu einer derartigen Aktivierung des Enzyms kommen konnte, wurden zwei Ansätze verfolgt.

Erstens wurde während der vorherigen Experimente mit Triton X-100 beobachtet (50 nM P Protein und 50 nM P RNA), dass die Zugabe von Detergens an sich die Enzymaktivität steigert. Auch bei Verbindung 94 handelt es sich um eine Verbindung, die strukturell einem Detergens mit einem lipophilen (3-(Benzyloxy)phenyl-Rest) sowie hydrophilen (Sulfonat) Molekülteil gleicht. Um zu untersuchen, ob der Detergens-artige Charakter der Verbindung für die beobachteten Effekte verantwortlich ist, wurden Kontrollexperimente mit den Detergenzien Triton X-100 und SDS durchgeführt. 0,01 % SDS führte dabei zu einer 25%igen Reduktion der Enzymaktivität und 0,01 % Triton X-100 zu einer Steigerung der Enzymaktivität von 50 % (Abb. 67). Die Inhibition durch SDS ist vermutlich auf dessen denaturierende Eigenschaften zurückzuführen. Die schwache Aktivierung durch Triton X-100 erklärt jedoch auch nicht gänzlich die 8-fache Aktivierung durch Verbindung 94.

Zweitens wurde die Anwesenheit von etwaigen Anionen als Erklärung der gesteigerten Enzymaktivität in Erwägung gezogen, da gezeigt werden konnte, dass Anionen wie z.B. Sulfat oder Acetat das P Protein von *B. subtilis* stabilisieren (Henkels *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurden Natriumsulfat und Natriummethansulfonat als Kontrollen in die Experimente miteingeschlossen. Die Zugabe dieser beiden Salze nahm jedoch keinen nennenswerten Einfluss auf die Enzymaktivität. Dies kann wiederum damit erklärt werden, dass in dem für die Kinetiken verwendeten KN-Puffer bereits 150 mM NH<sub>4</sub>OAc sowie 10 mM MgCl<sub>2</sub> enthalten sind, sodass die Zugabe von 2,5 mM Salz zu vernachlässigen sein sollte.





**Abb. 67: Testungen mit dem *T. maritima* Enzym bei 10-fachem Proteinüberschuss**

Die Experimente wurden mit 50 nM P RNA, 500 nM P Protein und 500 nM Substrat in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> durchgeführt. Zur Bestimmung der RNase P-Aktivität wurde die ermittelte Ratenkonstante auf die Wasserkontrolle normalisiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SEM angegeben und beruhen auf mindestens drei biologischen Replikaten.

Eine weitere Frage, die sich nach diesen Experimenten stellt, ist die, warum ein 10-facher Proteinüberschuss an sich schon Probleme bei der Enzymkinetik bereitet. Schließlich ist die Ratenkonstante im Vergleich zu Experimenten mit 50 nM P Protein und P RNA, wie bereits oben beschrieben, um den Faktor ~12 vermindert. Ob das P Protein bereits im Überschuss zur Aggregation bzw. zum Ausfallen neigt, sollte mittels Co-Sedimentation und anschließender Silberfärbung untersucht werden. Hierbei wurden die Enzymkinetiken analog zu den Bedingungen für die in Abb. 67 dargestellten Experimente durchgeführt. Lediglich die Substratmenge wurde von 500 nM auf 1 nM gesenkt, sodass die Enzymreaktionen nicht mehr unter *multiple-turnover*, sondern unter *single-turnover* Bedingungen stattfanden. Grund für diese Änderung war, dass die prozessierte tRNA und das ~15 kDa große P Protein etwa auf gleicher Höhe im Gel liefen und somit nach Silberfärbung als eine Bande sichtbar wurden. Nach dem Senken der Substratmenge wurde die tRNA dann nicht mehr mittels Silberfärbung detektiert (Abb. 69; Spur 5). Der Reaktionsansatz wurde dazu nach einer Minute bei der Reaktionstemperatur von 50 °C für eine halbe Stunde bei 16200 × g und 20 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 15 µL TuS-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 8 M Harnstoff) und 1 µL 1 % Triton X-100 aufgenommen und das Pellet sowie der Überstand auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen.

Wie in Abb. 69 gezeigt, ist der Großteil des Proteins auch bei einem 10-fachen Überschuss, im Vergleich zur P RNA, in Lösung (Spur 6) und fällt nicht aus (Spur 7). Daher scheint dies nicht der Grund für die verminderte Enzymaktivität zu sein. Ein möglicher Grund hingegen

könnte sein, dass ein zu großer Proteinüberschuss hinderlich für die korrekte Holoenzym-Assemblierung ist. Durch die Erhöhung der Proteinmenge wird das Gleichgewicht zwischen der Assoziation und der Dissoziation der beiden Untereinheiten nach dem Prinzip von LE CHATELIER auf die Seite der Assoziation verschoben werden (Abb. 68). Dabei könnte die Rate an nicht korrekt assembliertem Holoenzym zunehmen.

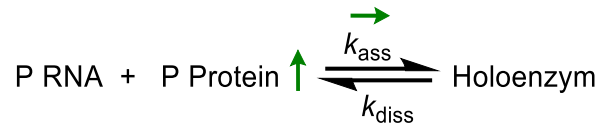


Abb. 68: Schematische Darstellung der Holoenzym-Assemblierung

Bei Durchführung desselben Experiments in Gegenwart von Verbindung 94 (Abb. 69; Spur 8 und 9) ist hingegen ein höherer Anteil an Protein ausgefallen. Dies bestätigt den auf der Korrelation von Lipophilie und Inhibition beruhenden Verdacht, dass es sich auch bei dem Sulfonat 94 um einen Protein-Aggregator handelt. Anscheinend führt ein Proteinüberschuss nicht nur zum Verlust der inhibitorischen Effekte, sondern steigert die Enzymaktivität, indem vermutlich überschüssiges und „störendes“ Protein aus der Lösung entfernt wird.

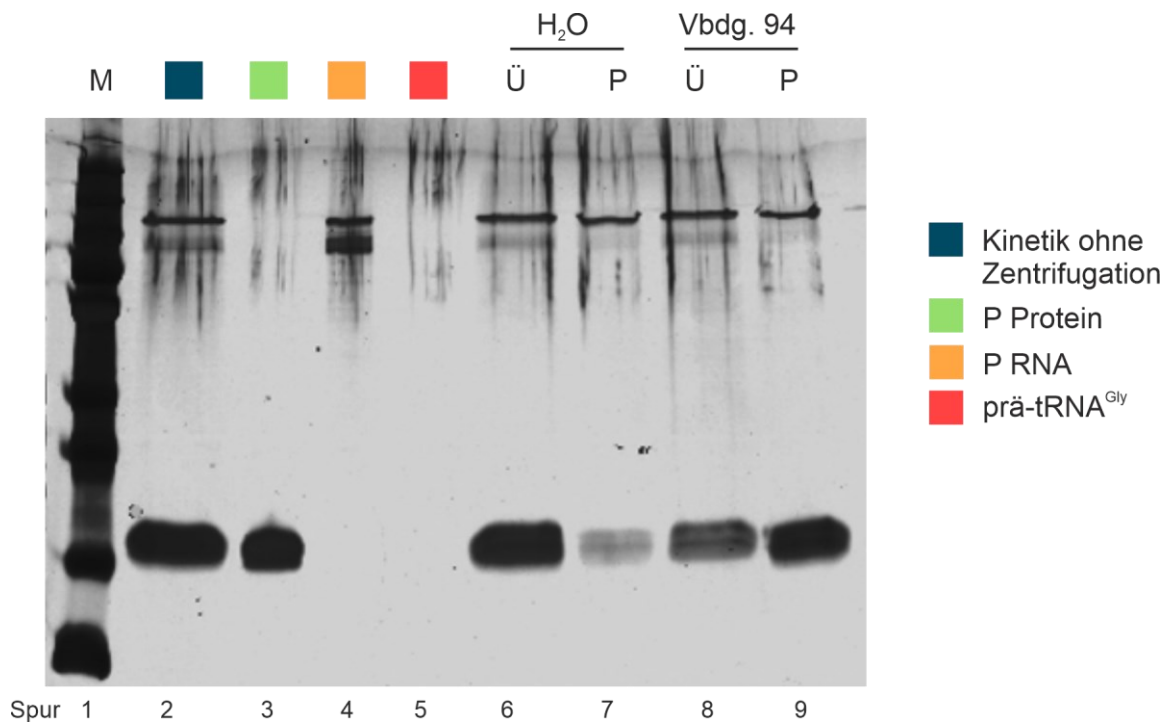


Abb. 69: Co-Sedimentation einer Enzymkinetik-Reaktion mittels Silberfärbung

Die Enzymkinetik wurde mit 50 nM *T. maritima* P RNA, 500 nM *T. maritima* P Protein, 1 nM prä-tRNA<sup>Gly</sup> in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> und einem Gesamtvolumen von 20 µL durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 16200 × g und 20 °C. Das Pellet wurde in 15 µL TuS-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 8 mM Harnstoff) und 1 µL 1 % Triton X-100 aufgenommen. Das gesamte Pellet sowie der Überstand wurden auf das Gel geladen (Spur 6 und 7). Parallel wurde das Experiment mit 2,5 mM Verbindung 94 durchgeführt (Spur 8 und 9). Als Kontrolle diente ein gesamter Kinetik-Ansatz, der nicht zentrifugiert wurde (Spur 2). Des Weiteren wurden P Protein, P RNA und prä-tRNA<sup>Gly</sup> in derselben Menge wie für die Kinetik verwendet, jedoch lediglich in Wasser gelöst als Kontrolle aufgetragen (Spur 3-5). Gezeigt ist ein repräsentatives Gel von insgesamt drei biologischen Replikaten. M, Marker; Ü, Überstand; P, Pellet; Vbdg., Verbindung.

Eine weitere Erklärung dafür, warum eine Erhöhung der P Protein-Konzentration zu einer verminderten RNase P-Aktivität führte, könnte sein, dass - wie anhand kürzlich publizierter

Daten gezeigt wurde - das P Protein in einem Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer in Lösung vorliegt (Zeng *et al.*, 2021). Dieses Gleichgewicht wird beim Erhöhen der Proteinkonzentration auf die Seite des Dimers verschoben (Zeng *et al.*, 2021), was die Holoenzym-Assemblierung und Bindung der 5'-Flanke inhibierend beeinflussen könnte. Die erhöhte Enzymaktivität durch Verbindung 94 könnte demzufolge also darauf zurückzuführen sein, dass durch Aggregation zunächst die Proteinkonzentration gesenkt wird und das Gleichgewicht damit auf die Seite des Monomers verschoben wird oder Verbindung 94 die Dimerisierung gar unterbindet.

Eine Erhöhung der Enzymaktivität wurde jedoch in den Experimenten mit RNPA2000 (Abschnitt 4.1.2) nicht beobachtet. Deshalb scheint dieser Effekt nicht grundsätzlich für Aggregatoren zuzutreffen, sondern eher spezifisch für die Verbindung 94 zu sein.

Abschließend kann basierend auf der Korrelation der Lipophilie der einzelnen Verbindung und den durch sie herbeigeführten Effekten auf die Aktivität der RNase P sowie den Ergebnissen des Co-Sedimentations-Experiments mit anschließender Silberfärbung nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass es sich bei Verbindung 94 um einen Protein-Aggregator handelt. Jedoch ist dies aufgrund der initialen Experimente mit Triton X-100 und der Variation der Enzymkonzentration abschließend nicht ganz eindeutig zu beurteilen. Für zukünftige Studien sollte also, sobald ein einzelnes Experiment auf eine Protein-Aggregation hindeutet, die jeweilige Verbindung zunächst weitreichenden Testungen unterzogen werden, ehe umfangreiche Derivatisierungen erfolgen, oder es sollte direkt Abstand von der etwaigen Verbindung genommen werden. Aufgrund der sehr schwachen Aktivität sowie der Aggregatoren-Problematik wurde Verbindung 94 letztlich ebenfalls nicht weiterverfolgt.

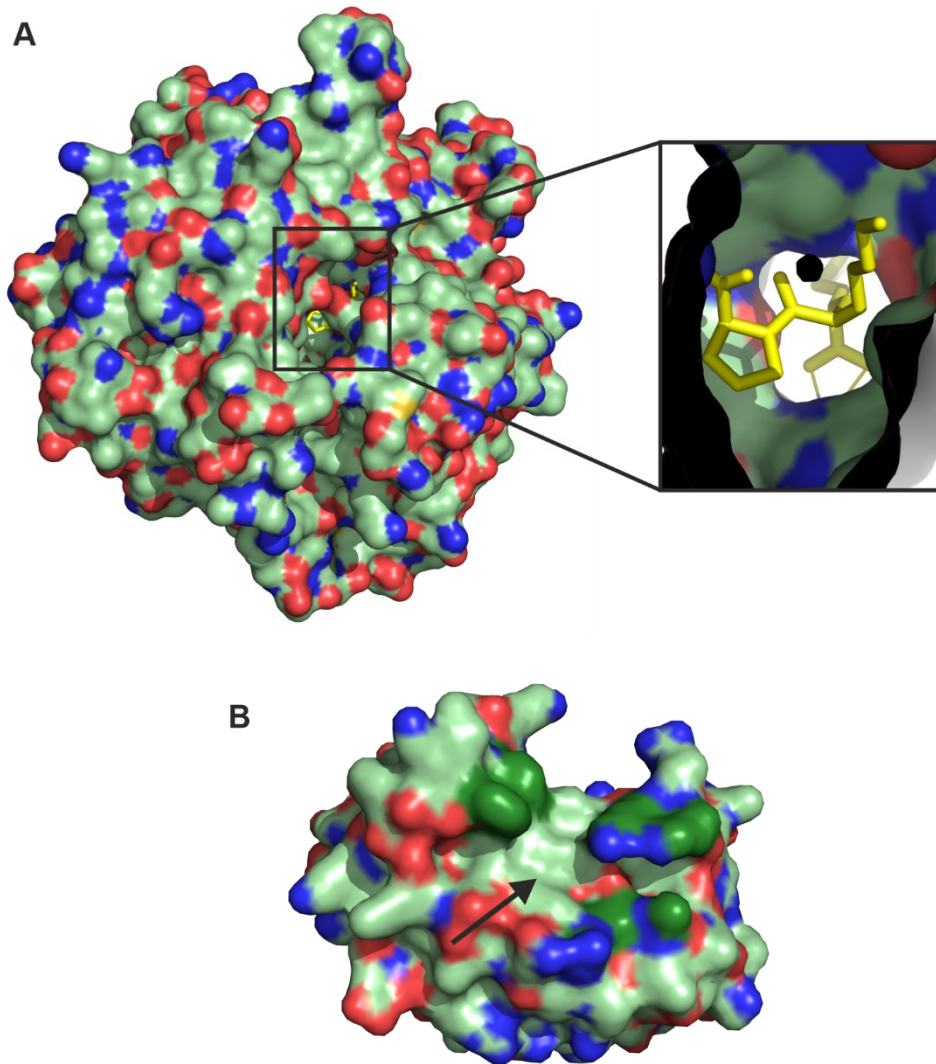
## Diskussion

Grundsätzlich bestätigen die Ergebnisse der Experimente mit Verbindung 94, wonach auch diese Verbindung vermutlich ein Protein-Aggregator ist, die mit den publizierten RNase P-Inhibitoren gemachte Beobachtung, dass das P Protein sehr anfällig gegenüber Protein-Agregatoren ist (Abschnitt 4.1.2). Eine Ursache hierfür könnte sein, dass das Protein zu den "inherently unstructured" bzw. „natively unfolded“ Proteinen gehört (Henkels *et al.*, 2001). Die Zugabe von Anionen wie beispielsweise Sulfat- oder Pyrophosphat-Ionen zu einer Proteinlösung mit geringer Ionenstärke (10 mM Natriumcacodylat pH 7,0) induziert die Bildung der nativen Faltung des Proteins (Henkels *et al.*, 2001). Dies zeigt, dass der Faltungszustand des RNase P Proteins sehr empfindlich gegenüber Interaktionen mit Kleinmolekülen reagiert, was mit der in dieser Arbeit beobachteten Anfälligkeit für Aggregationseffekte einhergeht. Da mit Verbindung 94 für die *S. aureus* und *B. subtilis* RNase P stärkere Effekte beobachtet wurden (Abb. 55 und Abb. 56), scheinen diese sensitiver gegenüber Protein-Aggregation zu

sein als das Enzym aus dem thermophilen Organismus *T. maritima*. Demzufolge verleiht die Thermostabilität dem Enzym auch eine erhöhte Robustheit gegenüber Protein-Aggregatoren. Die grundsätzliche Instabilität des P Proteins könnte auf die Ladung und dessen Größe zurückzuführen sein. Das *T. maritima* P Protein mit einer Größe von ~14,3 kDa ist vergleichsweise klein und hat einen berechneten isoelektrischen Punkt von 11,25 (Gasteiger *et al.*, 2005). Folglich liegt das Protein unter physiologischen Bedingungen positiv geladen vor. Da diese Ladung nur auf einen relativ kleinen Raum verteilt ist, führt dies zu einer erhöhten Ladungsdichte, die ursächlich für die beobachtete Instabilität sein könnte.

Hinsichtlich des Struktur-basierten Ansatzes, welcher das Ziel der Identifikation eines Kleinmoleküls verfolgte, das die 5'-Flanken-Bindetasche des P Proteins adressiert, stellt sich abschließend nun die Frage, inwieweit diese Bindetasche überhaupt zum Binden von Kleinmolekülen geeignet ist. So sind für die Bindung von Kleinmolekülen an Proteine im Wesentlichen nämlich kleine und hydrophobe Taschen bevorzugt bzw. diese erscheinen für ein entsprechendes Vorhaben besonders günstig (Egner & Hillig, 2008; Agoni *et al.*, 2020). Ferner eignen sich vor allem Bindetaschen mit einer Tiefe von 7-11 Å (Egner & Hillig, 2008). Vergleicht man nun allerdings die adressierte Bindetasche im *T. maritima* P Protein mit beispielsweise der Bindetasche des ACE-Hemmers Lisinopril, so wird deutlich, dass die Bindetasche der 5'-Flanke recht groß, durch die vielen basischen Aminosäuren eher polar und zudem flach ist (Abb. 70). Die Bindetasche von Lisinopril hingegen lässt sich eher als eine Art Tunnel beschreiben. Durch die verhältnismäßig flache Architektur der 5'-Flanken-Bindetasche ist diese Lösungsmittel-exponiert, was ein Adressieren mit Kleinmolekülen zunehmend erschwert.

Auf Basis der Kenntnis über die erforderliche Architektur von Bindetaschen für Kleinmoleküle wurden zahlreiche bioinformatische *Tools* entwickelt (Agoni *et al.*, 2020), mit denen sich die *Druggability* eines Proteins vorhersagen lässt bzw. abgeschätzt werden kann, ob das entsprechende Protein über Bindetaschen, die mit Kleinmolekülen adressiert werden können, verfügt und wo diese lokalisiert sind. Die Fragment-basierte *Hotspot Maps*-Berechnung (Radoux *et al.*, 2016) für das *S. aureus* P Protein ergab beispielsweise, dass dieses verglichen mit anderen Proteinen nur eine geringe *Druggability* aufweist (Suigo *et al.*, 2021). Auch das Ergebnis der Struktur-basierten Vorhersage über den Server *Pocket Druggability Prediction* (PockDrug) war für das *T. maritima* Protein wenig vielversprechend (Hussein *et al.*, 2015). Es konnten zwar Bindetaschen identifiziert werden. Diese jedoch wiesen einen sehr geringen *Druggability Score* auf. Natürlich handelt es sich hierbei nur um computergestützte Vorhersagen, die allerdings den Eindruck der experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit zunehmend bestätigen, wonach es sich durchaus schwierig gestaltet, für das RNase P Protein spezifische, niedermolekulare Inhibitoren zu finden.



**Abb. 70: Architektur der Bindetaschen von Lisinopril und der 5'-Flanke des *T. maritima* RnpA-Proteins im Vergleich**  
(A) Struktur des humanen Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE) im Komplex mit dem Inhibitor Lisinopril (gelb). Die Proteinstruktur ist in der Oberflächen-Darstellung gezeigt. Rechts ist ein Ausschnitt der Lisinopril-Bindetasche zu sehen. N-Atome: blau, O-Atome: rot und C-Atome: hellgrün (PDB:1O86; Natesh *et al.*, 2003). (B) Struktur des *T. maritima* P Proteins. Es wurde ebenfalls die Oberflächen-Darstellung gewählt und derselbe Farbcode wie in (A) verwendet. Die Bindetasche der 5'-Flanke ist in dunkelgrün hervorgehoben und durch einen Pfeil gekennzeichnet. Proteinstruktur: J. H. W. SCANLAN (AG Prof. Dr. W. DIEDERICH, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg).

#### 4.1.4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projekts wurden Inhibitoren der bakteriellen RNase P, einer möglichen neuartigen antibakteriellen Zielstruktur, untersucht. Als ein Ansatzpunkt wurde die Verbindung RNPA2000 gewählt, für die ein  $IC_{50}$ -Wert von  $140 \mu\text{M}$  gegenüber der RNase P aus *S. aureus* bestimmt werden konnte (Lounsbury, 2016; Lounsbury *et al.*, 2018). Da in der RNA-allein Reaktion keinerlei Effekte beobachtet wurden, ist davon auszugehen, dass die beobachteten Effekte auf Interaktionen mit dem P Protein beruhen (Eidem *et al.*, 2015). Diese Verbindung sollte nun weitergehend optimiert werden und so wurden in diesem Kontext 23 Derivate getestet, die im Zuge eines Liganden-basierten Ansatzes zum Wirkstoffdesign entstanden sind. Die Testung erfolgte enzymkinetisch mit der *T. maritima* RNase P, wobei verstärkt darauf geachtet wurde, dass sich die Verbindungen vollständig in Lösung befanden. Keine der getesteten Verbindungen zeigte dabei aber eine deutliche Inhibition der *T. maritima* RNase P *in vitro*.

Parallel zur Testung der neuartigen Derivate wurde die Ausgangsverbindung selbst untersucht. Eine Konzentration von  $140 \mu\text{M}$  RNPA2000, was dem publizierten  $IC_{50}$ -Wert entspricht, führte zu einer  $\sim 60\%$ igen Inhibition der *T. maritima* RNase P, sodass die publizierten Ergebnisse durchaus reproduziert werden konnten. Bei höheren Konzentrationen an RNPA2000 von bis zu  $500 \mu\text{M}$  wurde jedoch eine Trübung des Enzymkinetik-Ansatzes beobachtet. Das bedeutet, dass das RNPA2000 nicht vollständig in Lösung gegangen war, sondern ein Teil vielmehr ausgefallen ist. Folglich betrug die Konzentration der Lösung nicht, wie angenommen,  $500 \mu\text{M}$ . Vor allem wirft dies aber die Frage auf, ob die beobachteten Effekte tatsächlich auf spezifische Interaktionen mit dem P Protein zurückzuführen sind oder vielmehr auf einer unspezifischen Protein-Aggregation beruhen. So kann durch die ausgefallene Verbindung das P Protein ebenfalls aggregiert vorliegen. Da die Protein-Aggregation äußerst unspezifisch ist, werden etwaige Effekte als „falsch positiv“ eingestuft und die ursächlichen Verbindungen der Gruppe der sogenannten *Pan Assay Interference Compounds* zugeordnet (Baell & Nissink, 2018).

Ob es sich bei RNPA2000 um eben einen solchen Protein-Aggregator handelt, sollte im Rahmen dieser Arbeit weitergehend untersucht und final geklärt werden. Zur Identifizierung von Protein-Agregatoren sind in der Literatur mehrere Methoden beschrieben, wie beispielsweise der Zusatz von nichtionischen Detergenzien (z. B. Triton X-100). Dieser führt bei Protein-Agregatoren zu einem Verlust der fälschlicherweise beobachteten inhibitorischen Effekte, da Detergenzien als grenzflächenaktive Verbindungen die Bildung von Aggregaten verhindern (Feng & Shoichet, 2006; Owen *et al.*, 2012; Ehlert *et al.*, 2017; Baell & Nissink, 2018). Ein solcher Verlust der Effekte kann ebenfalls durch die Erhöhung der Enzymkonzentration erreicht werden, da die Proteine an der Oberfläche der Kleinmolekül-Aggregate adsorbiert werden und somit eine hohe Sensitivität gegenüber der

Enzymkonzentration besteht (Feng *et al.*, 2005; Giannetti *et al.*, 2008; Aldrich *et al.*, 2017; Viviani *et al.*, 2018). Des Weiteren lässt sich die ausgefallene Verbindung auch durch Zentrifugation aus der Lösung entfernen. Über SDS-PAGE-Analysen kann dann geprüft werden, ob das Protein ebenfalls ausgefallen ist und sich somit im Pellet befindet (McGovern *et al.*, 2003; Coan & Shoichet, 2008; Sassano *et al.*, 2013). Alle drei erläuterten Experimente wurden für das RNPA2000 mit der *T. maritima* RNase P durchgeführt und deuteten durchweg darauf hin, dass es sich bei RNPA2000 um einen Protein-Aggregator handelt. Zudem führten Experimente mit dem *S. aureus* Enzym zu keinerlei Inhibition, sofern die Verbindung gänzlich in Lösung war. Die beobachteten Löslichkeitsprobleme stehen allerdings nicht im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen, guten Wasserlöslichkeit von  $>200 \mu\text{M}$  (Eidem *et al.*, 2015; Lounsbury, 2016). Um dieser Diskrepanz nachzugehen, wurde die Löslichkeit der Verbindung mikroskopisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass das RNPA2000 im PBS-Puffer, der für die Löslichkeitsbestimmung Verwendung fand, gut löslich ist, sodass bei  $200 \mu\text{M}$  eine klare Lösung vorzufinden war. Eine  $200 \mu\text{M}$ -Lösung in dem für die Enzymkinetik-Experimente verwendeten Puffer auf HEPES-Basis, der zusätzlich unter anderem Ammoniumacetat und Magnesiumchlorid enthält, zeigte hingegen deutliche Präzipitation. Als ursächlich für die verminderte Löslichkeit konnte das Magnesiumchlorid ausfindig gemacht werden. Die Ergebnisse konnten zudem über Löslichkeitsbestimmungen mittels HPLC-Analyse bestätigt werden. Durch Zugabe von Magnesiumchlorid zu den drei getesteten Puffersystemen sank die RNPA2000-Löslichkeit etwa um Faktor 10. Um zu überprüfen, inwieweit die beobachteten antibakteriellen Effekte spezifisch sind, wurde der *B. subtilis* d7-Stamm verwendet, bei dem die Expression des *rnpA*-Gens unter Kontrolle eines Xylose-Promotors steht (Gößringer *et al.*, 2006). Hierbei konnte erstmals die endogene RNase P mit der Protein-basierten RNase P aus *Arabidopsis thaliana* (PRORP3) komplementiert werden. Anhand des Hemmhofstests mit diesem Komplementationsstamm wurde außerdem gezeigt, dass es sich bei den antibakteriellen Effekten von RNPA2000 um unspezifische oder toxische Effekte handelt. Zusammenfassend konnte damit also geklärt werden, dass es sich bei RNPA2000, um einen Protein-Aggregator handelt, vermutlich verursacht durch die Komplexierung von Magnesium-Ionen.

Als ein zweiter Ansatzpunkt diente das Isoflavon Iroinohexaacetat (Ir6Ac), welches mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $0,8 \mu\text{M}$  für die *B. subtilis* RNase P bereits deutlich aktiver ist als RNPA2000 (Liu *et al.*, 2014). Diese Verbindung sollte ebenso weitreichend modifiziert werden. Außerdem sollten an dieser Stelle synthetisch leichter zugängliche Verbindungen mit vergleichbaren Effekten gefunden werden. Insgesamt wurden hierzu 22 Derivate getestet. Bei der Testung der Derivate wurde von der enzymkinetischen Testung mit der *T. maritima* RNase P abgewichen und eine Testung auf antibakterielle Effekte mittels Hemmhofstest vorgezogen. Dies brachte den Vorteil mit sich, dass mehr Verbindungen zeitgleich getestet werden konnten

und Faktoren wie das Überwinden der bakteriellen Zellwand oder die zelluläre Stabilität direkt miterfasst wurden. Für den Hemmhoftest wurde der *E. coli* AS19-Stamm mit einem Lipopolysaccharid-Defekt verwendet (Sekiguchi & Iida, 1967). Vier der untersuchten Derivate zeigten dabei eine schwache antibakterielle Wirkung und wurden anschließend enzymkinetisch hinsichtlich einer Inhibition der *T. maritima* RNase P getestet. Keine der Verbindungen führte dabei jedoch zu einer nennenswerten Inhibition.

Analog zum RNPA2000 sollte auch beim Ir6Ac geklärt werden, ob es sich um einen Protein-Aggregator handelt. Die initiale Testung von 10 µM Ir6Ac mit *B. subtilis* RNase P hatte eine ~50%ige Inhibition zur Folge. In Anbetracht der publizierten Daten, bei denen 10 µM Ir6Ac eine vollständige Inhibition verursachten, ist dies ein eher schwacher Effekt. Zusätzlich konnte in der RNA-allein Reaktion keinerlei Inhibition beobachtet werden, sodass an dieser Stelle erstmals gezeigt werden konnte, dass die Effekte ausschließlich auf das P Protein zurückzuführen sind. Nach dem Erhöhen der Enzymkonzentration verschwanden die inhibitorischen Effekte dann vollständig. Folglich scheint es sich auch bei Ir6Ac um einen Protein-Aggregator zu handeln. Dies deckt sich mit zahlreichen Belegen aus der Literatur, in denen andere Isoflavone und Flavonoide als Protein-Aggregatoren beschrieben werden (McGovern & Shoichet, 2003; Gaulton *et al.*, 2012; Sassano *et al.*, 2013; Ingólfsson *et al.*, 2014).

Außerdem wurden acht Derivate des Rhodanins RNPA3000, einem gleichwohl beschriebenen RnpA-Inhibitor, enzymkinetisch getestet (Eidem *et al.*, 2015). Von diesen acht Verbindungen führte lediglich ein Derivat zu einem inhibitorischen Effekt, der jedoch ebenfalls vermutlich auf Löslichkeitsprobleme zurückzuführen ist. Des Weiteren wurden für das Anthrachinon Purpurin, das als RNase P-Inhibitor beschrieben ist (Madrigal-Carrillo *et al.*, 2019), initiale Löslichkeitsanalysen durchgeführt. Diese deuteten ebenfalls auf das Problem der Protein-Aggregation hin, sodass von den publizierten RNase P-Inhibitoren, die aus Hochdurchsatz-Screenings hervorgingen, Abstand genommen wurde.

Stattdessen wurden fortan komplett neuartige Strukturen, die das bakterielle RNase P Protein adressieren sollten, untersucht. In diesem Zusammenhang wurden zunächst 19 Piperazin- und Sulfonamid-Derivate im Hinblick auf ihr antibakterielles Potential getestet. Vier arylierte Sulfonamid-Derivate zeigten dabei im Hemmhoftest mit dem *E. coli* AS19-Stamm geringfügige antibakterielle Effekte. Den enzymkinetischen Testungen mit der *T. maritima* RNase P zufolge sind diese jedoch nicht auf eine RNase P-Inhibition zurückzuführen. Aus einem Struktur-basierten und *Docking*-gestützten Ansatz gingen dann 29 weitere Verbindungen hervor und wurden getestet. Diese Verbindungen sollten die Bindetasche der 5'-Flanke des prä-tRNA-Substrats adressieren. Die Testungen erfolgten sowohl enzymkinetisch mit der RNase P aus *T. maritima* als auch durch den Hemmhoftest. Letzterer führte zu neun schwach aktiven

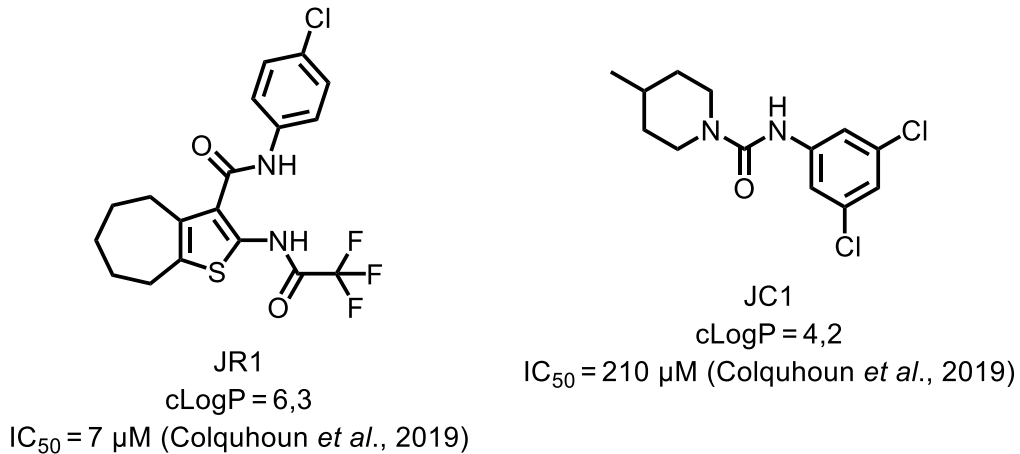


Verbindungen, bei denen es sich vornehmlich um Carbonsäure-Derivate (Abb. 48) handelt. Aufgrund der ausbleibenden Effekte im Rahmen der Enzymkinetik-Experimente sind diese allerdings nicht auf eine RNase P-Inhibition zurückzuführen. Die Enzymkinetik brachte lediglich eine aktive Verbindung, das Sulfonat 94, hervor. Für eine 50%ige Inhibition musste davon eine Konzentration von 2,5 mM eingesetzt werden, sodass es sich nur um einen schwachen Effekt handelte. Eine antibakterielle Aktivität konnte für Verbindung 94 indessen nicht beobachtet werden. In weitergehenden Untersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass der Effekt Protein-abhängig ist und ebenfalls für die *B. subtilis* und die *S. aureus* RNase P besteht. Am stärksten wurde dabei die *B. subtilis* RNase P inhibiert (50 % Inhibition bei 250  $\mu$ M).

Um Protein-Aggregation auch hier ausschließen zu können, wurde für alle drei Enzyme der Einfluss der Zugabe von Detergens und der Variation der Enzym-Konzentration untersucht. Lediglich das Verringern der Enzymkonzentration des *B. subtilis* Enzyms, führte dabei zu einer Verstärkung der Effekte. Da die Effekte ansonsten jedoch konstant blieben, sollte Verbindung 94 durch Derivatisierungen wiederum optimiert werden. Die Untersuchung der 34 daraufhin entstandenen Derivate mittels *T. maritima* RNase P-Kinetik ergab, dass sieben Verbindungen zu einer deutlich verstärkten Inhibition führten. Allerdings wurden während dieser Testungen erneut Löslichkeitsprobleme beobachtet. Dabei scheint die Inhibition mit der Lipophilie zu korrelieren, was durch das Auftragen der gemessenen RNase P-Aktivität gegen die cLogP-Werte deutlich wird. Folglich erscheinen Protein-Aggregationseffekte auch hier möglich. Dies wurde final durch Zentrifugation eines Enzymkinetik-Ansatzes und SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung bestätigt. So konnte eine erhöhte Menge an P Protein unter Zugabe von Verbindung 94 im Pellet detektiert werden.

#### **4.1.5 Ausblick**

Eine Weiterverfolgung der in dieser Arbeit untersuchten Verbindungen erscheint wenig zielführend, da für keine Verbindung von einer spezifischen Wirkung ausgegangen werden kann. Als weitere Kleinmoleküle, die das bakterielle P Protein adressieren, wurden erst kürzlich die Verbindungen JR1 und JC1 identifiziert und weitergehend optimiert (Abb. 71) (Colquhoun *et al.*, 2019; Suigo *et al.*, 2021). Inwiefern es lohnenswert ist, diese Verbindungen als Ausgangspunkt für die weitere Synthese zu wählen, ist jedoch aufgrund derer lipophilen Eigenschaften ebenfalls äußerst fraglich. Aufgrund der hohen cLogP-Werte und einer Testung im mikromolaren Bereich scheint es wahrscheinlich, dass ein Teil der Verbindungen auch hier während der Testung ausgefallen ist. Somit sind entsprechende Kontrollexperimente zwingend erforderlich, um auszuschließen, dass es sich auch bei diesen Verbindungen um Protein-Aggregatoren handelt.



**Abb. 71: Inhibitoren des bakteriellen P Proteins als alternative Ausgangspunkte**

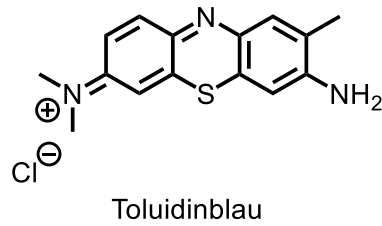
Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit entsteht der Eindruck, dass es sich schwierig gestaltet, das bakterielle P Protein mit Kleinmolekülen zu adressieren. Dieser Eindruck wird dadurch bestärkt, dass ein virtuelles Hochdurchsatz-*Screening* von ~8 Millionen Verbindungen der ZINC Datenbank (Ehlert, 2016; Walczyk, 2016) sowie ein Fragment-basierter Ansatz (J. H. W. SCANLAN, AG Prof. Dr. W. DIEDERICH, Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität Marburg) letztlich erfolglos blieben.

Nichtsdestotrotz ist die bakterielle RNase P als neuartige Zielstruktur für die Entwicklung von Antibiotika interessant, da sie für das bakterielle Überleben essentiell ist und sich von der humanen RNase P durchaus deutlich unterscheidet. Grundsätzlich ergeben sich bei Inhibitoren der bakteriellen RNase P zwei mögliche Zielstrukturen: (i) die katalytisch aktive P RNA und (ii) das P Protein, welches als Cofaktor für eine *in vivo*-funktionale RNase P ebenso essentiell ist. Im Allgemeinen stehen im Bereich der Wirkstoffentwicklung Proteine als Zielstrukturen im Fokus und so sind Methoden zur Identifizierung und Entwicklung von Inhibitoren auf dem Protein-basierten Feld weitaus stärker verbreitet und damit besser etabliert. Damit war es auch naheliegend, zunächst das P Protein als Zielstruktur zu untersuchen. Da jedoch der Ansatz mit den Kleinmolekülen bisher überwiegend erfolglos blieb, sollten zukünftig auch andere Strategien in Betracht gezogen werden.

Im Bereich der Wirkstoffentwicklung gewinnt der gezielte Proteinabbau durch *Proteolysis Targeting Chimeras*, auch PROTACs genannt, immer mehr an Bedeutung. PROTACs sind grundsätzlich bifunktional aufgebaut. Ein Kleinmolekül, welches an das Zielprotein bindet, wird dabei über einen Linker an einen Liganden der E3-Ubiquitin-Ligase geknüpft. Dadurch wird das Zielprotein letztlich ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut (Gao *et al.*, 2020). Insbesondere auf dem Feld der Krebsforschung wurden damit deutliche Fortschritte erzielt und so befinden sich bereits sechs PROTACs in der klinischen Entwicklung (Mullard, 2021). Da es in Bakterien jedoch kein Ubiquitin-Proteasom-System gibt, müssten zunächst Liganden entwickelt werden, um die entsprechenden Proteasen wie beispielsweise ClpP oder Lon zu

rekrutieren und damit PROTACs aus dem eukaryontischen Feld auf die Entwicklung antibiotischer Verbindungen übertragen zu können. Hierbei könnten Liganden in Frage kommen, die an entsprechende Adapter-Proteine, eine *Unfoldase* des Proteolyse-Komplexes oder die Protease selbst binden (Izert *et al.*, 2021). In grampositiven Bakterien könnte außerdem die Protein-Arginin-Kinase McsB adressiert werden. Die Arginin-Phosphorylierung des Zielproteins würde dann die ClpCP-Protease rekrutieren und zum Abbau des Proteins führen (Suskiewicz *et al.*, 2019). Nach erfolgreicher Identifizierung eines solchen Liganden der bakteriellen Proteolyse-Maschinerie könnte dieser an ein Kleinmolekül, das wiederum an das RNase P Protein bindet, geknüpft werden. Ein Vorteil dieser Strategie ist, dass das entsprechende Kleinmolekül das P Protein an einer beliebigen Stelle binden kann und ein solcher Ansatz nicht mehr auf die beiden RNA-Bindestellen limitiert wäre. Alternativ könnte der Proteolyse-Ligand auch an ein Oligonukleotid, analog zu entsprechenden RNA-PROTACs, geknüpft werden, welches schließlich an das P Protein bzw. das RNase P-Holoenzym bindet (Ghidini *et al.*, 2021). Hierfür könnten sich Haarnadel-ähnliche Substrate, bestehend aus 5'-Flanke, 3'-CCA-Ende und einer kurzen Helix, eignen, für die bereits eine RNase P-Prozessierung gezeigt werden konnte (Wu *et al.*, 2012). Die Strategie des gezielten Proteinabbaus würde den Vorteil einer gesteigerten Selektivität mit sich bringen, da Liganden des bakteriellen Proteolyse-Komplexes vermutlich nicht das eukaryontische Proteasom rekrutieren würden. Fraglich ist jedoch, ob solch große Moleküle dann noch die bakterielle Zellwand überwinden können.

Als Inhibitoren der P RNA sind vor allem die *Antisense*-Oligonukleotide hervorzuheben, die sich durch spezifische Effekte auszeichnen (Gruegelsiepe *et al.*, 2003, 2006). Diese Oligonukleotide, die die L15-Region der *E. coli* P RNA adressieren, könnten analog für die P RNA humanpathogener Bakterien entwickelt werden und über entsprechende *delivery*-Strategien für eine *in vivo*-Applikation optimiert werden. Jedoch bringen die *Antisense*-Oligonukleotide die eingangs beschriebenen Nachteile mit sich, sodass auch zum Adressieren der P RNA etwaige Kleinmoleküle wünschenswert wären. Allerdings erscheinen die bisherigen Ansätze von RNA-Inhibitoren wenig vielversprechend. Ein großes Problem dieser Verbindungen liegt darin, dass es sich vornehmlich um aromatische und damit planare Strukturen mit basischen Gruppen handelt. Durch diese Eigenschaften können die Verbindungen mit einer Vielzahl von DNA- und RNA-Molekülen interagieren und sind damit äußerst unspezifisch (Warner *et al.*, 2018; Garner, 2019). Dies trifft auch auf die Phenothiazine wie Toluidinblau zu, die als RNase P-Inhibitoren beschrieben wurden (Abb. 72).



Toluidinblau

**Abb. 72: Struktur des Phenothiazins Toluidinblau**

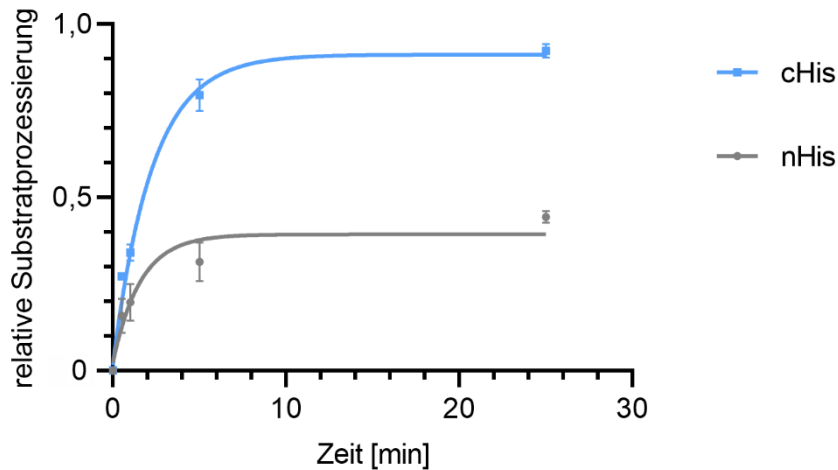
Als Zielstrukturen für Kleinmoleküle eignen sich vor allem RNAs, die sehr strukturiert sind und über viele Tertiärstruktur-Interaktionen verfügen (Warner *et al.*, 2018; Ursu *et al.*, 2020), was durchaus auch auf die bakterielle P RNA zutrifft. Bei solch hoch-strukturierten RNAs steigt die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins adäquater Bindetaschen, ähnlich wie bei den Protein-basierten Ansätzen (Warner *et al.*, 2018). Für das Adressieren einer solchen Bindetasche können Moleküle mit einer perfekten Passform entwickelt werden, sodass infolge dieser Form-Komplementarität spezifische Effekte zu erwarten wären. Zur Entwicklung von Kleinmolekülen, die die bakterielle P RNA adressieren, könnte von den als RNase P-Inhibitoren beschriebenen Phenothiazinen ausgegangen werden. Diese müssten hinsichtlich ihrer Spezifität jedoch noch optimiert werden. Als eine Alternative könnte ein initiales Hochdurchsatz-*Screening* unter Einsatz einer Substanz-Bibliothek, die zur Bindung von RNAs entwickelt wurde (Bodoor *et al.*, 2009), durchgeführt werden. Für das *Screening* könnte in diesem Fall ein Fluoreszenz-basierter Assay verwendet werden wie beispielsweise der bereits etablierte Fluoreszenz-Polarisations-Assay (Liu *et al.*, 2014).

## 4.2 Untersuchungen zum *Thermodesulfatator indicus* HARP

### 4.2.1 Substraterkennung

Das Homolog der *Aquifex aeolicus* RNase P (HARP) aus dem thermophilen und Sulfat-reduzierenden Bakterium *Thermodesulfatator indicus*, das zum Phylum der Thermodesulfobacteria gehört, erwies sich als ein Protein mit *in vitro* RNase P-Aktivität (Nickel *et al.*, 2017). Dieses Enzym ist ebenfalls in der Lage, die bakterielle RNase P im *E. coli* BW-Stamm zu komplementieren (Nickel *et al.*, 2017) und sollte parallel zu entsprechenden Studien mit der *A. aeolicus* RNase P untersucht werden (Nickel *et al.*, 2017; Wäber, 2019). Hierzu wurde das Protein zunächst mit C- oder N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag rekombinant exprimiert und gereinigt. Die Verwendung eines His<sub>6</sub>-Tags hat den wesentlichen Vorteil, dass das Protein verhältnismäßig einfach mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann. Die Proteinausbeuten der jeweiligen Präparationen waren grundsätzlich gering, für das Protein mit N-terminalem Tag jedoch deutlich geringer (~0,5 mg Protein pro Liter Zellkultur) als für das mit C-terminalem Tag (~10 mg Protein pro Liter Zellkultur). Ursache hierfür ist vermutlich die nur geringe Überexpression des Proteins im *E. coli* Rosetta-Stamm. Da für enzymkinetische Untersuchungen allerdings geringe Proteinmengen ausreichen, war eine Optimierung der Präparations-Protokolle nicht erforderlich.

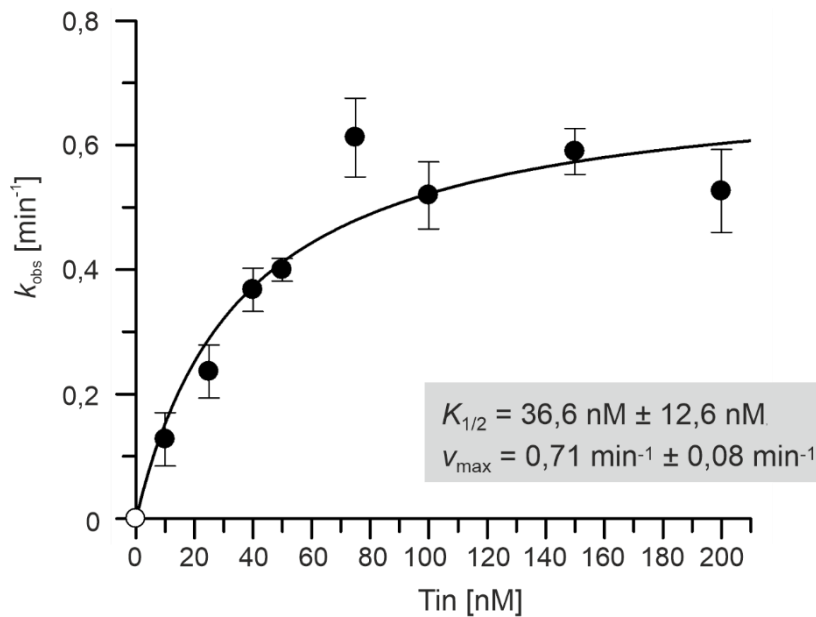
Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob sich die RNase P-Aktivitäten der beiden Proteine mit C- bzw. N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag voneinander unterscheiden. Hierfür wurden Enzymkinetik-Experimente unter *single-turnover* Bedingungen mit 50 nM Enzym und radioaktiv-markierter *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> durchgeführt. Wie der Abb. 73 zu entnehmen ist, liegt zwischen den beiden Proteinen ein deutlicher Unterschied bezüglich der RNase P-Aktivität vor. Während das *T. indicus* HARP mit C-terminalem Polyhistidin-Tag das Substrat innerhalb von 10 Minuten vollständig umsetzte (~90 %), waren bei dem Protein mit N-terminalem Tag auch nach 25 Minuten lediglich ~40 % des Substrats prozessiert. Der N-terminale His<sub>6</sub>-Tag scheint somit einen inhibitorischen Effekt auf die Enzymaktivität zu besitzen. Aus diesem Grund wurde für weitere Analysen das Protein mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag verwendet.



**Abb. 73: C-terminaler versus N-terminaler His<sub>6</sub>-Tag**

Enzymkinetik des *T. indicus* HARPs mit C-terminalem (blau) bzw. N-terminalem (grau) His<sub>6</sub>-Tag. Die Experimente wurden unter *single-turnover* Bedingungen mit 50 nM Enzym in F-Puffer durchgeführt. Die Ergebnisse beruhen auf drei biologischen Replikaten. Die Ausgleichsgeraden wurden anhand der Mittelwerte mittels folgender Gleichung bestimmt:  $A_t = A * (1 - e^{-k_{obs} * t})$ . Dabei steht  $A$  für die Menge an prozessiertem Substrat und  $t$  für die Zeit.

Mit dem C-terminal getaggten *T. indicus* HARP wurden im Anschluss die Ratenkonstanten ( $k_{obs}$ ) für verschiedene Enzymkonzentrationen von 10-200 nM bestimmt, sodass die maximale Ratenkonstante  $v_{max}$  und ein  $K_{1/2}$ -Wert, also diejenige Enzymkonzentration bei halbmaximaler Ratenkonstante, ermittelt werden konnten (Abb. 74).

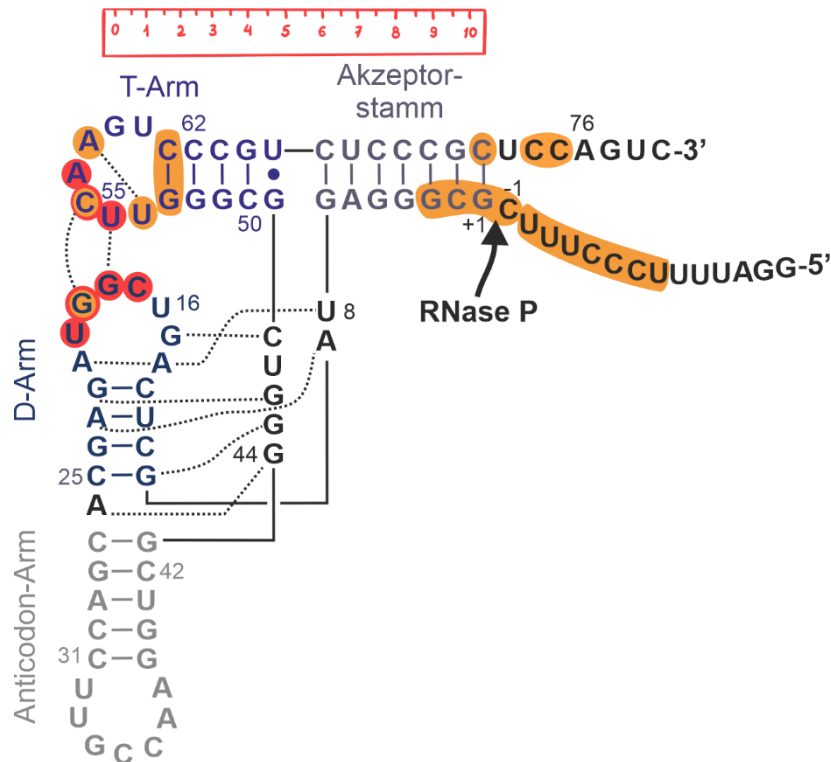


**Abb. 74: Enzymkinetik-Parameter der prä-tRNA<sup>Gly</sup>**

Die Ratenkonstanten  $k_{obs}$  sind gegen die jeweils eingesetzten Enzymkonzentrationen an *T. indicus* HARP ( $T_{in}$ ) mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag aufgetragen. Die Experimente wurden in F-Puffer mit Spuren von 5'-[<sup>32</sup>P]-markierter prä-tRNA<sup>Gly</sup> durchgeführt. Jedem einzelnen Datenpunkt liegen vier bis acht biologische Replikate zugrunde. Die Regressionsgerade wurde anhand folgender Gleichung bestimmt:  $\vartheta = \frac{v_{max} [E]}{K_{1/2} + [E]}$ .

Im Weiteren wurde der Frage nachgegangen, welche Regionen des prä-tRNA-Substrats für die Interaktion mit dem Enzym entscheidend sind. Als Referenzsubstrat wurde die prä-tRNA<sup>Gly</sup> aus *T. thermophilus* verwendet, welche aufgrund eines hohen G/C-Gehalts eine besonders stabile Struktur besitzt und die außerdem alle bei den tRNAs stark konservierten Positionen in ihrer Primärstruktur aufweist. Alle konzipierten Substratvarianten leiteten sich von diesem prä-tRNA<sup>Gly</sup>-Referenzsubstrat ab und deren Prozessierungen wurden enzymkinetisch untersucht. Die Reaktionen hierfür wurden ebenfalls unter *single-turnover* Bedingungen mit einem Überschuss an Enzym durchgeführt, sodass die Produktfreisetzung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt ausgeschlossen werden kann. Die Substrate wurden für diese Experimente am 5'-Ende mit <sup>32</sup>P markiert. Nach Bestimmung der Ratenkonstanten der einzelnen Substratvarianten bei verschiedenen Enzymkonzentrationen wurden die enzymkinetischen Parameter  $K_{1/2}$  und  $v_{max}$  ermittelt, um die Substratumsetzung schließlich mit dem prä-tRNA<sup>Gly</sup>-Standardsubstrat vergleichen zu können.

Die von der *T. thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> abgeleiteten Substrate umfassten Variationen der 5'-Flanke und des 3'-Endes. Außerdem wurden Deletionen und Extensionen einzelner Regionen der tRNA-Struktur in Betracht gezogen. Die Auswahl der Substrate orientierte sich vornehmlich an den Ergebnissen aus Studien zur Substraterkennung des bakteriellen, RNA-basierten Enzyms und des eukaryontischen PRORP-Enzyms. Regionen der tRNA, die für die Substraterkennung dieser beiden Enzyme von Bedeutung sind, wurden in Abb. 75 farblich hervorgehoben. Zusammenfassend finden bei der Substraterkennung des bakteriellen Ribonukleoproteins Interaktionen in der Nähe der Spaltstelle, mit dem 3'-CCA-Ende, der 5'-Flanke sowie D- und T-Schleife statt (siehe Einleitung 1.2.1, Seite 7; Reiter *et al.*, 2010; Gößringer *et al.*, 2021). Die beiden letztgenannten Regionen sind auch für das PRORP-Enzym essentiell. Für eine korrekte Prozessierung ist zudem die Gesamtlänge von koaxial gestapeltem Akzeptorstamm und T-Arm des prä-tRNA-Substrats entscheidend (siehe Einleitung 1.3.1, Seite 17; Brillante *et al.*, 2016; Teramoto *et al.*, 2020). Durch Variation dieser Elemente wurde untersucht, ob sie auch für die Substraterkennung beim *T. indicus* HARP von Bedeutung sind. Die Analysen wurden dabei analog zu den bereits publizierten Studien zur Substraterkennung des *Arabidopsis thaliana* PRORP3-Enzyms durchgeführt (Brillante *et al.*, 2016).



**Abb. 75: Substratinteraktionen des bakteriellen Ribonukleoproteins und des eukaryontischen PRORPs**

Zweidimensionale Darstellung der L-förmigen Tertiärstruktur der *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> nach Brillante *et al.*, 2016. Tertiärinteraktionen sind als gestrichelte Linien gezeichnet. Nukleotide, die anhand der experimentellen Daten mit dem Enzym interagieren, wurden orange (bakterielles Ribonukleoprotein) und rot (PRORP-Enzym) hinterlegt. Das Lineal soll den für das PRORP-Enzym beschriebenen Längenmess-Mechanismus von Akzeptorstamm und T-Arm symbolisieren. Diese Interaktionen wurden den Publikationen von Reiter *et al.*, 2010; Brillante *et al.*, 2016; Teramoto *et al.*, 2020 entnommen und auf die gezeigte prä-tRNA übertragen.

### **Einfluss der 5'-Flankenlänge des prä-tRNA-Substrats**

Für die Prozessierung durch das bakterielle Ribonukleoprotein sind Interaktionen mit der 5'-Flanke essentiell. Die Interaktion zwischen dem P Protein und der 5'-Flanke erstreckt sich von Nukleotid -2/-3 bis zur Position -7/-8 (Crary *et al.*, 1998; Niranjanakumari, Stams, *et al.*, 1998; Rueda *et al.*, 2005). Um Interaktionen des *T. indicus* HARPs mit der 5'-Flanke zu untersuchen, wurde diese von 14 Nukleotiden im prä-tRNA<sup>Gly</sup>-Substrat (ptGly) zunächst auf 7, 4, dann 2 Nukleotide und schließlich 1 Nukleotid verkürzt (Abb. 76). Im Falle einer Interaktion mit Nukleotiden der 5'-Flanke wurde eine deutlich schlechtere Prozessierung der Substrate mit einer verkürzten 5'-Extension erwartet. Durch das schrittweise Verkürzen sollte zudem der Bereich einer potentiellen Interaktion eingegrenzt werden. Bei dem Substrat mit einer 1-nt 5'-Flanke muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass sich durch die terminale 5'-Phosphat-Gruppe eine weitere negative Ladung in unmittelbarer Nähe zur Spaltstelle befindet. Folglich können bei diesem Substrat Prozessierungsdefekte zum einen durch fehlende Interaktionen mit Nukleotiden der 5'-Flanke und zum anderen durch Ladungseffekte im aktiven Zentrum verursacht werden.



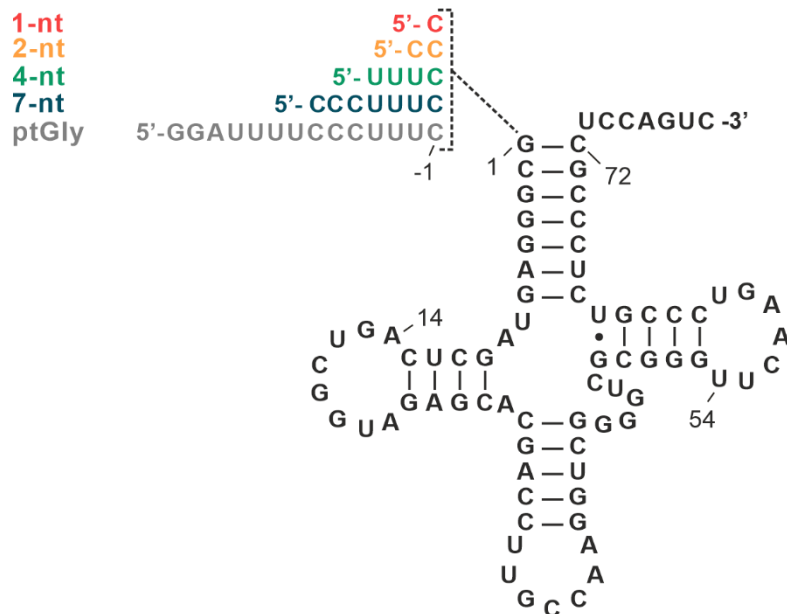
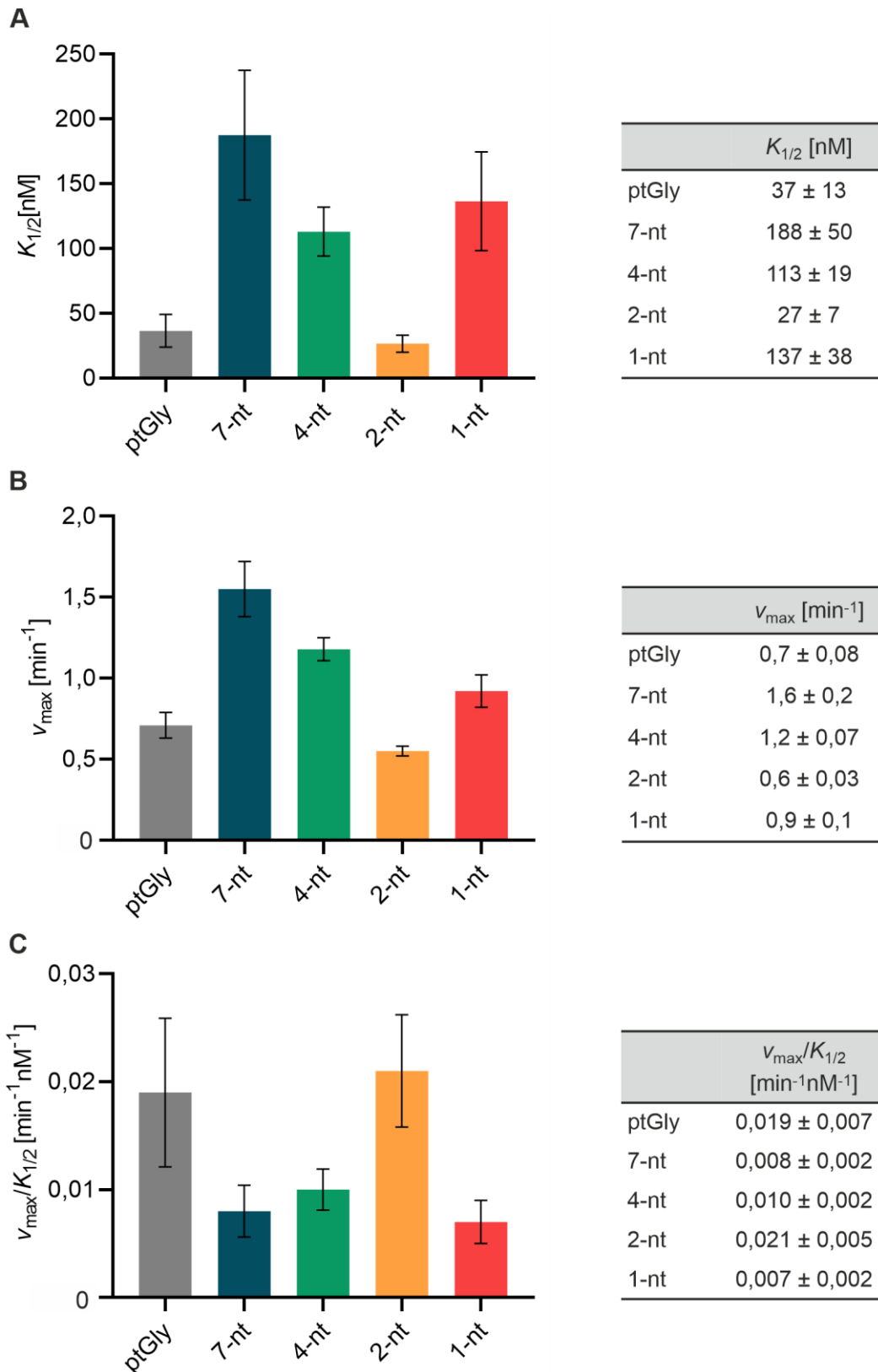


Abb. 76: Substratvarianten der 5'-Flanke

Substrate mit variierender 5'-Flanken-Länge. Ausgehend vom ptGly-Substrat mit einer 14 nt langen 5'-Flanke (grau), wurde diese auf 7 nt (blau), 4 nt (grün), 2 nt (orange) und schließlich 1 nt (rot) verkürzt.

Das Verkürzen der 5'-Flanke von 14 nt auf 7 nt erhöhte den  $K_{1/2}$ -Wert um Faktor  $\sim 5$  während  $v_{\max}$  ebenfalls um Faktor  $\sim 2$  anstieg (Abb. 77). Die Prozessierung der prä-tRNA mit einer 4-nt 5'-Flanke war vergleichbar mit der des 7-nt Substrats. Ein weiteres Verkürzen der 5'-Flanke auf 2 Nukleotide führte zu einer Abnahme des  $K_{1/2}$ -Werts (Faktor  $\sim 4$  im Vergleich zum 4-nt Substrat) und ebenfalls zu einer verminderten maximalen Ratenkonstante (Faktor  $\sim 2$  im Vergleich zum 4-nt Substrat) (Abb. 77). Auffällig ist dabei, dass die enzymkinetischen Parameter denen des ptGly-Standardsubstrats stark ähneln. Die  $K_{1/2}$ -Konstante des 1-nt Substrats bewegte sich in der gleichen Größenordnung wie jene des 7-nt und des 4-nt Substrats. Die maximale Ratenkonstante mit  $0,9 \text{ min}^{-1}$  ist indessen mit dem ptGly-Substrat vergleichbar. Zusammenfassend sind in den Ergebnissen dieser Substratreihe keine eindeutigen Trends erkennbar. Dies wird auch bei der Betrachtung der katalytischen Effizienz deutlich, die lediglich um Faktor  $\sim 3$  variierte. Demzufolge scheinen Interaktionen zwischen dem *T. indicus* HARP und Nukleotiden in diesem Bereich der 5'-Flanke nicht für die Prozessierung essentiell zu sein. Die Änderungen von  $K_{1/2}$  und  $v_{\max}$  waren ebenfalls vergleichsweise moderat:  $K_{1/2}$  variierte maximal um Faktor  $\sim 5$  relativ zum Standardsubstrat und auch die  $v_{\max}$ -Änderungen blieben unter Faktor 3. Studien mit dem *A. thaliana* PRORP3 führten demgegenüber beispielsweise zu Änderungen um Faktor 10 ( $k_{\text{react}}$  1-nt 5'-Flanke versus Standardsubstrat) bis 1000 ( $K_{\text{M(sto)}}$  AaT-Substrat versus Standardsubstrat) (Brillante *et al.*, 2016). Auffällig ist außerdem, dass bei den Substraten mit 4-nt bzw. 7-nt 5'-Flanke sowohl  $K_{1/2}$  als auch  $v_{\max}$  im Vergleich zum Standardsubstrat anstiegen. Grundsätzlich verhalten sich die beiden Parameter aber gegenläufig. Bei einem Substrat, das schlechter prozessiert wird, würde man hingegen vielmehr erwarten, dass  $v_{\max}$  sinkt, während  $K_{1/2}$ , jene Enzymkonzentration bei halbmaximaler Ratenkonstante, steigt.



**Abb. 77: Effekte der Längenvariationen der prä-tRNA 5'-Flanke**

Kinetische Konstanten des *T. indicus* HARPs für die Prozessierung von Substraten mit 5'-Flanken-Sequenzen unterschiedlicher Länge. Graphisch dargestellt ist der  $K_{1/2}$ -Wert (A), die maximale Ratenkonstante  $v_{max}$  (B) und die katalytische Effizienz (C). Zur Ermittlung dieser Konstanten wurden die Mittelwerte der Ratenkonstante von mindestens drei biologischen Replikaten gegen die Enzymkonzentration aufgetragen und eine Regressionsgerade anhand folgender Gleichung  $\vartheta = \frac{v_{max} [E]}{K_{1/2} + [E]}$  bestimmt. Die angegebenen Fehler sind im Falle von  $K_{1/2}$  und  $v_{max}$  jene, die sich durch das *Fitting* ergaben bzw. wurden für die katalytische Effizienz berechnet (siehe 3.2.6.4).

### prä-tRNA-Variationen am 3'-Ende

Während eukaryontische PRORPs nicht mit dem 3'-Ende der tRNA interagieren (Gobert *et al.*, 2013; Brillante *et al.*, 2016; Mao *et al.*, 2016), benötigt das bakterielle Ribonukleoprotein ein 3'-CCA-Ende für die effiziente Prozessierung des prä-tRNA-Substrats (Kirsebom & Svärd, 1994; Svärd *et al.*, 1996; Busch *et al.*, 2000; Wegscheid & Hartmann, 2006, 2007). Folglich war die Analyse der Prozessierung von prä-tRNA-Substraten mit 3'-End-Variationen (Abb. 78) durch das *T. indicus* HARP äußerst interessant. Diese Substrate sind alle mit einer 14-nt 5'-Flanke ausgestattet. Das prä-tRNA<sup>Gly</sup>-Substrat besitzt am 3'-Ende neben der CCA-Sequenz noch eine Extension von drei Nukleotiden und entspricht demnach einem nicht vollständig 3'-prozessierten Substrat. Von diesem Referenzsubstrat ausgehend wurde die Prozessierung von Substratvarianten mit maturem 3'-CCA-Ende (CCA), mit deletiertem CCA 3'-Ende ( $\Delta$ CCA) und mit einer 40-nt 3'-Extension (40-nt) am CCA-Ende getestet.

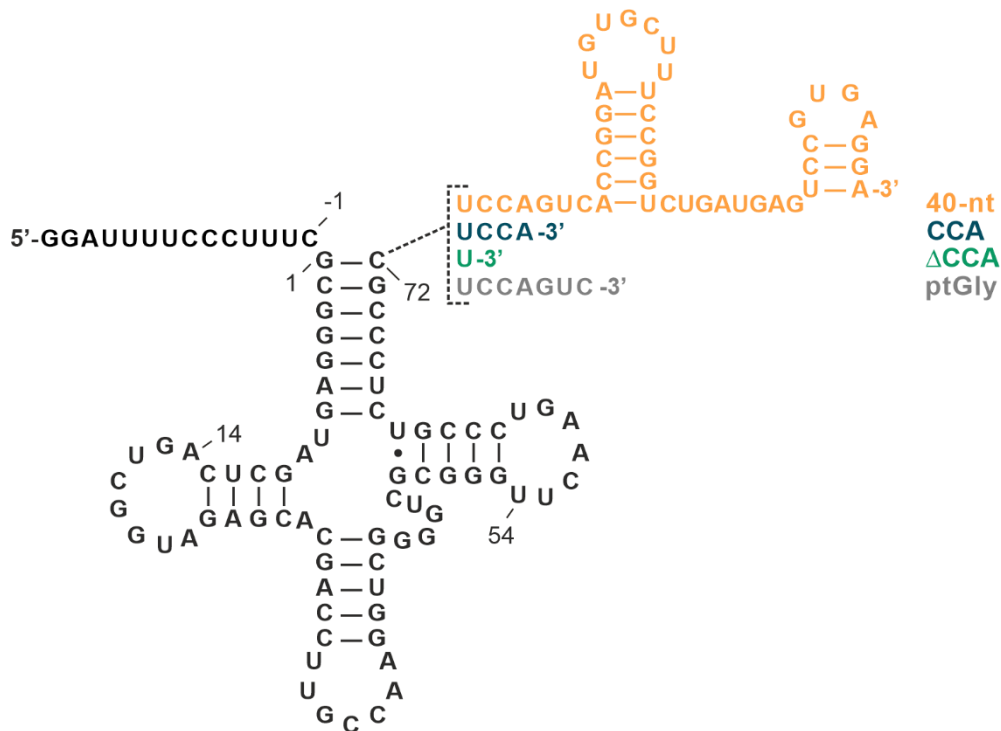
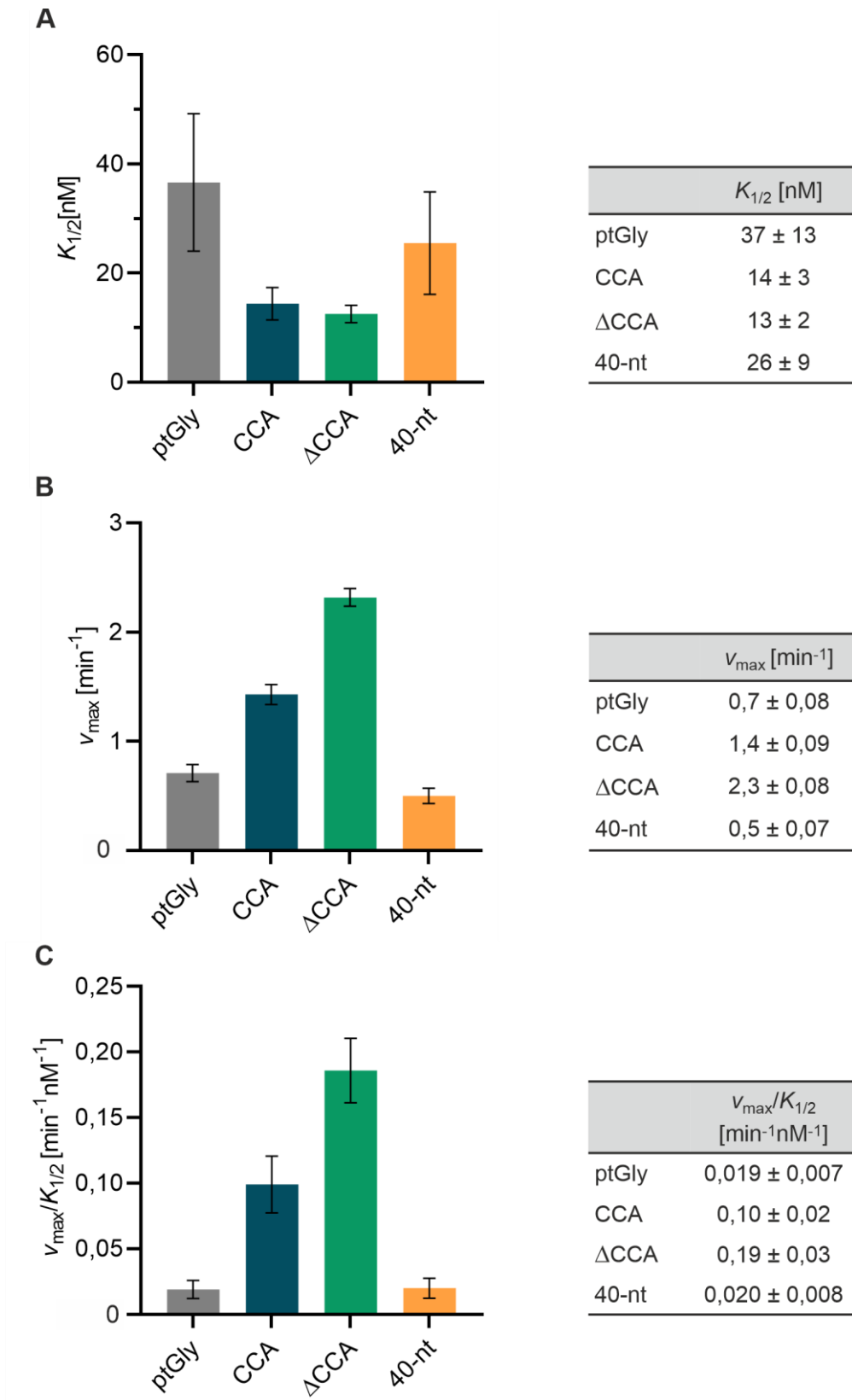


Abb. 78: Substratvarianten der 3'-Flanke

Ausgehend vom ptGly-Substrat (grau) mit der CCA-Sequenz und drei zusätzlichen Nukleotiden am 3'-Ende wurde die 3'-Extension zunächst auf das mature CCA-Ende (blau) verkürzt. Im Weiteren wurde dann auch der CCA 3'-Überhang deletiert ( $\Delta$ CCA, grün). Um den Einfluss sterischer Effekte am 3'-Ende zu untersuchen, wurde zudem ein weiteres Substrat mit einer 40-nt 3'-Extension am CCA-Ende (orange) getestet.

Es zeigte sich, dass der  $K_{1/2}$ -Wert der vier Substrate für das Standardsubstrat am höchsten war (Abb. 79). Außerdem war der  $K_{1/2}$ -Wert des Substrats mit einer 40-nt 3'-Extension ähnlich zum ptGly, während dieser für das CCA- und  $\Delta$ CCA-Substrat etwas niedriger war (Abb. 79). Unter Betrachtung der Fehlerbalken, die sich für die verschiedenen Substratvarianten fast überschneiden, scheint es sich hierbei jedoch um keine signifikanten Effekte zu handeln.

Der höchste  $v_{\max}$ -Wert wurde für das  $\Delta$ CCA-Substrat erreicht, der im Vergleich zum ptGly-Referenzsubstrat um Faktor  $\sim 3$  erhöht ist (Abb. 79). Dieser stieg ebenfalls um Faktor  $\sim 2$  beim CCA-Substrat im Vergleich zum Standardsubstrat an, wohingegen für das 40-nt Substrat kein nennenswerter Unterschied festzustellen war. Das Substrat mit einer 40-nt langen 3'-Extension, wodurch sterische Effekte am 3'-Ende erfasst werden sollten, wurde ähnlich effizient zum Referenzsubstrat prozessiert. Für das  $\Delta$ CCA-Substrat stieg die katalytische Effizienz um Faktor 10 und ist damit für dieses Substrat unter den Substraten mit Variationen am 3'-Ende am höchsten. Dies deutet daraufhin, dass keine Interaktion zwischen dem *T. indicus* HARP und dem 3'-CCA-Ende stattfindet bzw. diese nicht essentiell für die prä-tRNA-Prozessierung ist. 3'-Extensionen haben den Ergebnissen zufolge hingegen einen eher inhibierenden Einfluss auf die Prozessierung, was einen moderaten sterischen Effekt vermuten lässt.

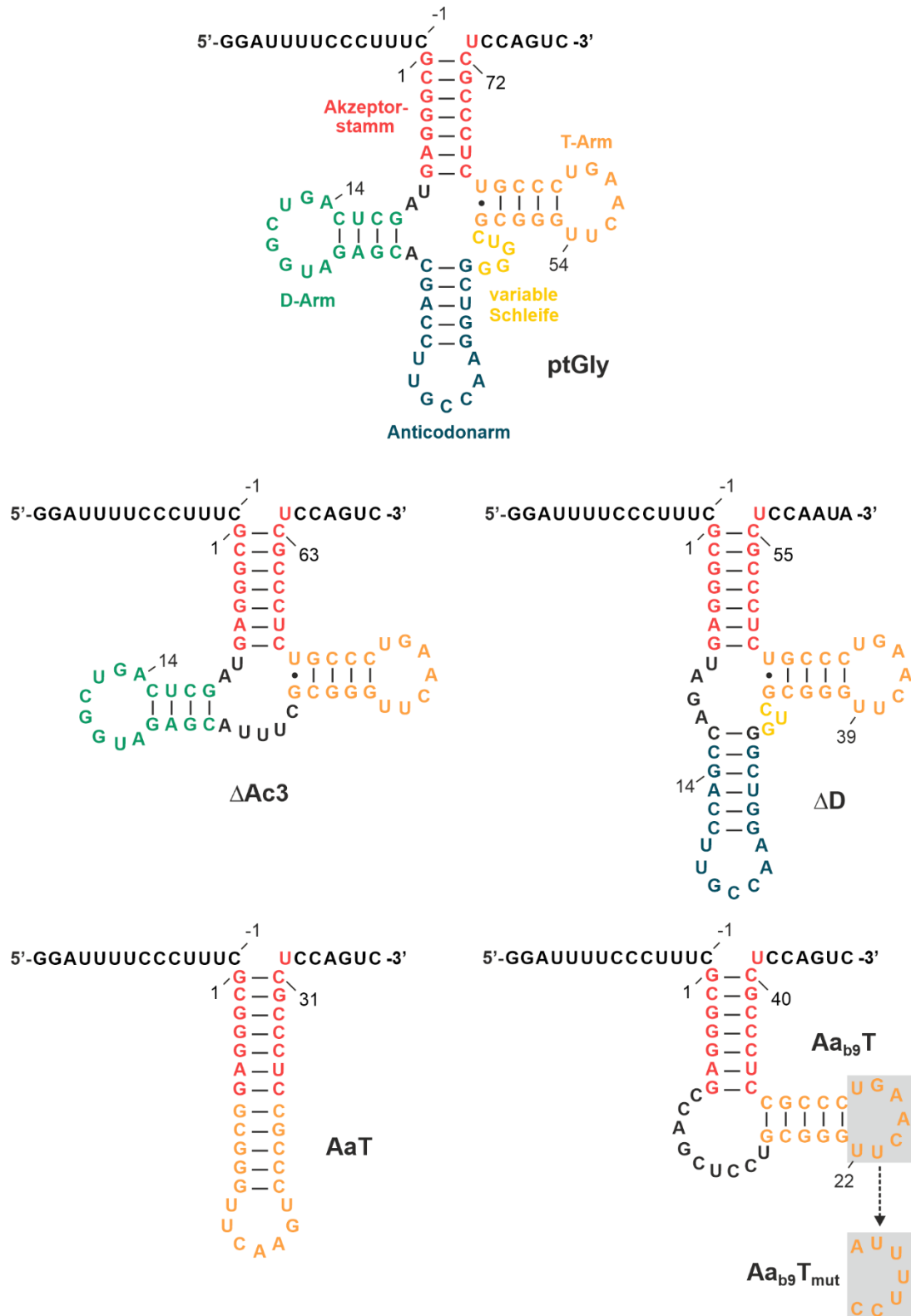


**Abb. 79: Einfluss der Variationen der 3'-Extensionen des prä-tRNA<sup>Gly</sup>-Substrats**

Kinetische Konstanten des *T. indicus* HARPs für die Prozessierung von Substraten mit unterschiedlichen 3'-Enden. Graphisch dargestellt ist der  $K_{1/2}$ -Wert (**A**),  $v_{max}$  (**B**) sowie die katalytische Effizienz (**C**). Zur Ermittlung dieser Konstanten wurde die mittlere Ratenkonstante basierend auf mindestens drei biologischen Replikaten gegen die Enzymkonzentration aufgetragen und eine Regressionsgerade anhand folgender Gleichung  $\vartheta = \frac{v_{max} [E]}{K_{1/2} + [E]}$  erstellt. Die Fehler für  $K_{1/2}$  und  $v_{max}$  basieren auf der Regressionsgeraden und die für die katalytische Effizienz wurden berechnet (siehe 3.2.6.4).

### Deletion einzelner Domänen der tRNA

Die bakterielle RNP-Variante der RNase P und das eukaryontische PRORP-Enzym scheinen primär mit jener Region der L-förmigen tRNA zu interagieren, die von dem T-Arm und Akzeptorstamm gebildet wird. Vor allem die T-Schleife ist in zahlreiche Interaktionen involviert (Loria & Pan, 1997; Loria *et al.*, 1998; Reiter *et al.*, 2010; Brillante *et al.*, 2016; Teramoto *et al.*, 2020). Während bei PRORP auch die D-Schleife von entscheidender Bedeutung für eine effiziente Prozessierung ist (Brillante *et al.*, 2016; Teramoto *et al.*, 2020), blieb die Deletion des D-Arms beim bakteriellen Ribonukleoprotein weitestgehend ohne Effekt (Hardt *et al.*, 1993). Bei beiden Enzymen scheint der Anticodonarm aus der Substratbindetasche des Enzyms herauszuragen, sodass er nicht in entsprechende Wechselwirkungen eingebunden ist (McClain *et al.*, 1987; Hardt *et al.*, 1993; Reiter *et al.*, 2010; Brillante *et al.*, 2016). Ob dies auch auf das *T. indicus* HARP zutrifft, sollte anhand eines Substrats mit deletiertem Anticodonarm ( $\Delta$ Ac3, Abb. 80) untersucht werden. Des Weiteren wurde eine Substratvariante ohne D-Arm ( $\Delta$ D), ein Substrat, das lediglich aus einem koaxial gestapeltem Akzeptorstamm und T-Arm (AaT) besteht, sowie eine weitere Variante, bei der die beiden letztgenannten Domänen über neun zusätzliche Nukleotide miteinander verknüpft sind (Aa<sub>b9</sub>T), untersucht (Abb. 80). Das AaT-Substrat wurde vom *A. thaliana* PRORP3 relativ schlecht prozessiert (Brillante *et al.*, 2016). Die Prozessierung eines vergleichbaren Minimalsubstrats durch das bakterielle Ribonukleoprotein erfolgte hingegen noch sehr effizient (McClain *et al.*, 1987). Durch die neun zusätzlichen Nukleotide im Aa<sub>b9</sub>T-Substrat sollte eine Ausrichtung von Akzeptor- und T-Stamm vergleichbar zu natürlichen tRNAs mit einem 14° Knick zwischen beiden Regionen ermöglicht werden (Holbrook *et al.*, 1978). Außerdem verfügt dieses Substrat über eine erhöhte strukturelle Flexibilität verglichen mit dem AaT-Substrat. Die Prozessierung durch das *A. thaliana* PRORP3-Enzym wurde gegenüber dem AaT-Substrat durch Insertion der neun Nukleotide beim Aa<sub>b9</sub>T-Substrat deutlich verbessert (Brillante *et al.*, 2016). Ausgehend vom Aa<sub>b9</sub>T-Substrat wurde die ursprüngliche Sequenz der T-Schleife von 5'-UUCAAGU zu 5'-CCUUUUA mutiert, um Interaktionen mit dieser Region zu untersuchen. Grundsätzlich sollten anhand dieser Varianten die minimalen strukturellen Anforderungen an das Substrat für die prä-tRNA-Prozessierung durch das *T. indicus* HARP ermittelt werden.



**Abb. 80: Substratvarianten mit Deletionen ganzer tRNA-Domänen**

Sekundärstrukturen der *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> (ptGly) und deren Deletionsvarianten. Die Domänen sind wie folgt gefärbt: Akzeptorstamm: rot, T-Arm: orange, Anticodonarm: blau, D-Arm: grün, variable Schleife: gelb. Neben dem Referenzsubstrat (ptGly, oben) sind die Substrate ohne Anticodonarm ( $\Delta$ Ac3) und ohne D-Arm ( $\Delta$ D) bzw. ein Substrat ausschließlich aus koaxial gestapeltem Akzeptorstamm und T-Arm bestehend (AaT) und ein weiteres, bei dem diese beiden Domänen über eine 9-nt Insertion miteinander verknüpft sind (Aa<sub>b9</sub>T), gezeigt. Weiterhin wurden ausgehend vom Aa<sub>b9</sub>T-Substrat die Nukleotide der T-Schleife mutiert (Aa<sub>b9</sub>T<sub>mut</sub>).

Für das  $\Delta\text{Ac3}$ -Substrat sank der  $K_{1/2}$ -Wert verglichen mit dem prä-tRNA-Standardsubstrat um Faktor  $\sim 11$ , während die maximale Ratenkonstante weitestgehend gleich blieb (Abb. 81). Beim *Fitting* konnten die experimentell ermittelten Werte allerdings nur annähernd durch die verwendete Gleichung beschrieben werden (Abb. 81), sodass die berechneten kinetischen Parameter einem gewissen Fehler unterliegen. Dies muss insbesondere bei der für das  $\Delta\text{Ac3}$ -Substrat angegebenen  $K_{1/2}$ -Konstante - und somit auch bei der katalytischen Effizienz - berücksichtigt werden.

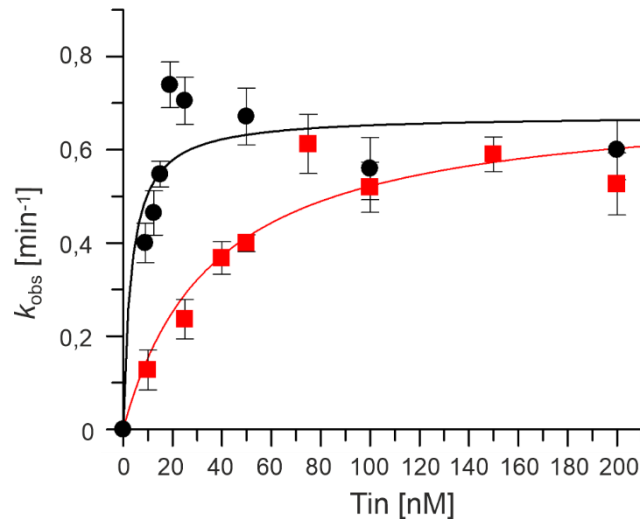


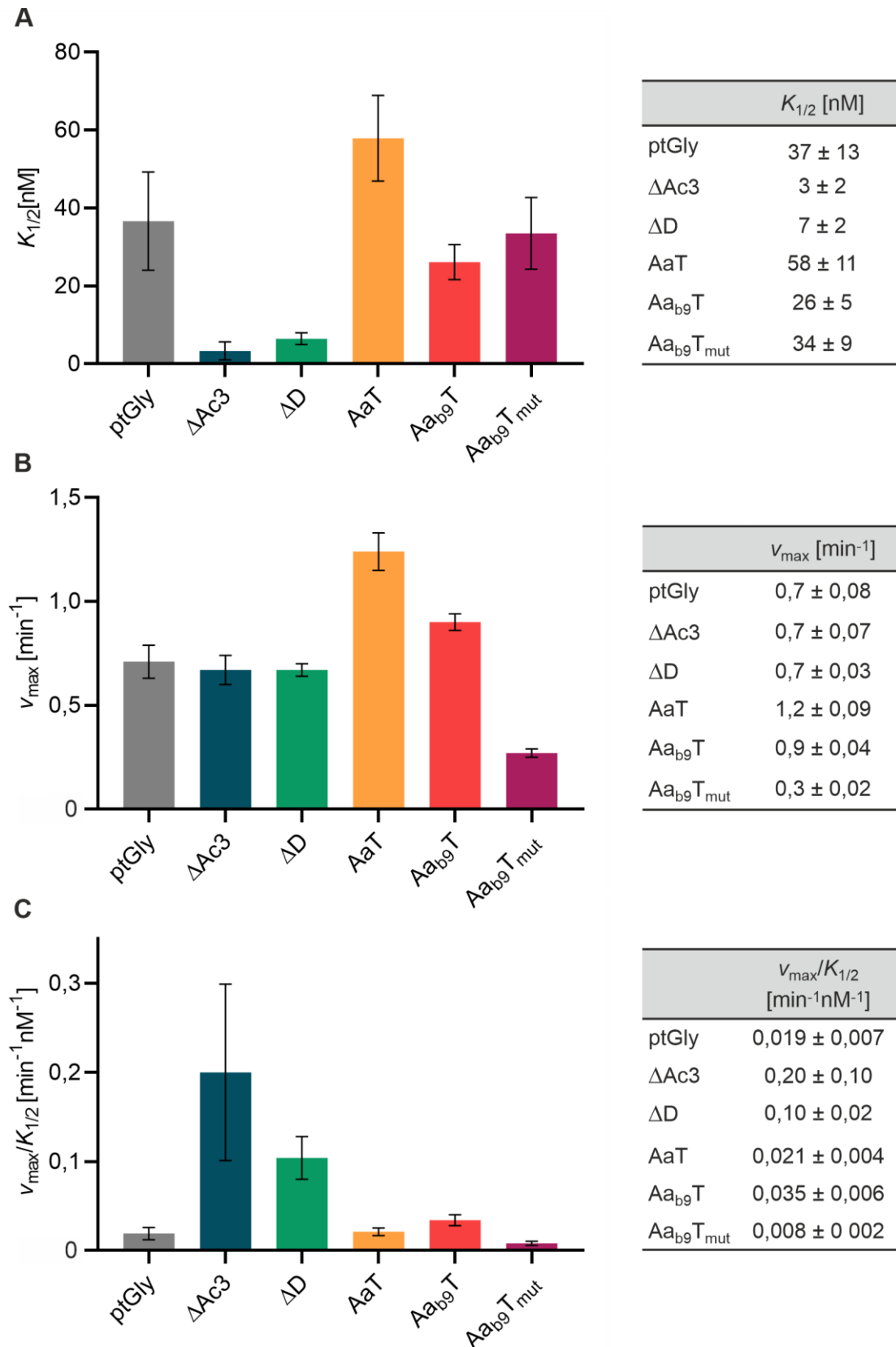
Abb. 81: Auswertung für das  $\Delta\text{Ac3}$ -Substrat

Die Ratenkonstanten  $k_{\text{obs}}$  wurden gegen die Konzentrationen an *T. indicus* HARP ( $T_{\text{in}}$ ) aufgetragen. Zum Vergleich sind neben den Ratenkonstanten des  $\Delta\text{Ac3}$ -Substrats (schwarz) auch die des ptGly-Referenzsubstrats (rot) dargestellt. Ein Datenpunkt basiert auf mindestens drei biologischen Replikaten und ist dargestellt als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler. Die Regressionsgeraden wurden anhand folgender Gleichung ermittelt:  $\vartheta = \frac{v_{\text{max}} [E]}{K_{1/2} + [E]}$ .

Die Prozessierung von Substrat  $\Delta\text{D}$  mit deletiertem D-Arm war vergleichbar mit der des  $\Delta\text{Ac3}$ -Substrats. Im Vergleich zum Referenzsubstrat ptGly war der  $K_{1/2}$ -Wert vom  $\Delta\text{D}$ -Substrat um Faktor  $\sim 5$  vermindert und der  $v_{\text{max}}$ -Wert nahezu unverändert (Abb. 82). Die katalytische Effizienz stieg für beide Substrate, das  $\Delta\text{Ac3}$ - und das  $\Delta\text{D}$ -Substrat, um Faktor  $\sim 10$  bzw.  $\sim 5$  bezogen auf das Standardsubstrat. Die kinetischen Parameter  $K_{1/2}$  und  $v_{\text{max}}$  des AaT-Substrats unterschieden sich hingegen kaum von denen des prä-tRNA<sup>Gly</sup>-Referenzsubstrats. Die Unterschiede im  $K_{1/2}$ - und  $v_{\text{max}}$ -Wert erreichten hier nicht einmal Faktor 2 (Abb. 82). Dies trifft auch auf das Aa<sub>b9</sub>T-Substrat zu. Durch zusätzliche Mutation aller Positionen in der T-Schleife bei dem Substrat Aa<sub>b9</sub>T<sub>mut</sub> konnten nur moderate Effekte auf die kinetischen Parameter im Vergleich zum Referenzsubstrat beobachtet werden.  $K_{1/2}$ -Wert, maximale Ratenkonstante und katalytische Effizienz unterschieden sich maximal um Faktor  $\sim 2,5$ . Die Bedeutung der Basenidentitäten in der T-Schleife für die Prozessierung durch das *T. indicus* HARP können allerdings bei einem direkten Vergleich der Substrate Aa<sub>b9</sub>T und Aa<sub>b9</sub>T<sub>mut</sub> besser beurteilt werden. Während der  $K_{1/2}$ -Wert bei beiden Substraten nahezu vergleichbar war, wurde  $v_{\text{max}}$  durch die Mutationen um Faktor  $\sim 3$  erniedrigt. Dadurch sank die katalytische Effizienz beim



Substrat Aa<sub>b9</sub>T<sub>mut</sub> insgesamt um Faktor ~4,4 im Vergleich zum Substrat Aa<sub>b9</sub>T (Abb. 82). Die katalytische Effizienz aller fünf Substrate ist damit für das Aa<sub>b9</sub>T<sub>mut</sub>-Substrat am geringsten, was auf eine Interaktion des *T. indicus* HARPs mit der T-Schleife hindeutet. Zusammenfassend wurden bei diesen Deletionssubstraten damit keine ganz eindeutigen Effekte auf die Prozessierung durch das *T. indicus* HARP beobachtet. Bemerkenswert ist jedoch, dass trotz vollständiger Deletion einzelner Substratdomänen alle fünf Substrate - inklusive des *Hairpin*-Substrats AaT - mit annähernd gleicher Effizienz im Vergleich zum Referenzsubstrat an der kanonischen Spaltstelle prozessiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass Substratbindung und Katalyse beim *T. indicus* HARP hauptsächlich durch Interaktionen mit der Akzeptorstamm-T-Arm-Domäne vermittelt werden.



**Abb. 82: Effekte der Deletion von tRNA-Domänen**

Katalytische Konstanten für die Prozessierung der Deletionssubstrate durch das *T. indicus* HARP. Gezeigt ist der  $K_{1/2}$  - (A) und der  $v_{max}$  (B) -Wert sowie die katalytische Effizienz (C). Diese Konstanten wurden anhand folgender Regressionsgeraden ermittelt:  $\vartheta = \frac{v_{max} [E]}{K_{1/2} + [E]}$ . Die dargestellten Fehler sind jene, die sich aufgrund des *Fittings* ergaben, oder wurden im Falle der katalytischen Effizienz, wie unter 3.2.6.4 beschrieben, berechnet.

### Variation der T-Stamm-Länge und der T-Schleifen-Sequenz

Bei den PRORP-Enzymen ist für die korrekte Prozessierung der Abstand zwischen der Spaltstelle und der T-Schleife, sprich die Länge von Akzeptorstamm und T-Domäne, sowie eine einzelsträngige 5'-Flanke entscheidend (Brillante *et al.*, 2016). Ob ein ähnlicher Längenmess-Mechanismus auch bei der Spaltstellenselektion von AaRP und *T. indicus* HARP vorliegt, sollte anhand von Substraten mit verlängertem bzw. verkürztem Akzeptor- oder T-Stamm untersucht werden. In einer vorangegangenen Arbeit wurden in diesem Zusammenhang zwei Substrate analysiert, bei denen der 7 bp lange Akzeptorstamm auf 9 bp verlängert (Aa<sub>+2bp</sub>) bzw. auf 5 bp (Aa<sub>-2bp</sub>) verkürzt war (Wäber, 2019). Das Substrat Aa<sub>+2bp</sub> mit einem verlängerten Akzeptorstamm wurde sowohl vom AaRP als auch vom *T. indicus* HARP vorwiegend an der c<sub>-2</sub>-Position, direkt am Übergang von Doppel- zu Einzelstrang, prozessiert (Abb. 83). Das *A. thaliana* PRORP3 hingegen spaltete dieses Substrat an Position c<sub>0</sub> und c<sub>-1</sub>. Bei dem Substrat Aa<sub>-2bp</sub> wurde mit allen drei Enzymen eine Prozessierung an der Position c<sub>0</sub> und c<sub>+1</sub> beobachtet, wobei der Anteil der Prozessierung an der kanonischen Spaltstelle beim *T. indicus* HARP deutlich überwog, während mit den anderen beiden Enzymen die Prozessierung an Position c<sub>0</sub> sowie c<sub>+1</sub> in etwa zu gleichen Teilen erfolgte (Abb. 83).

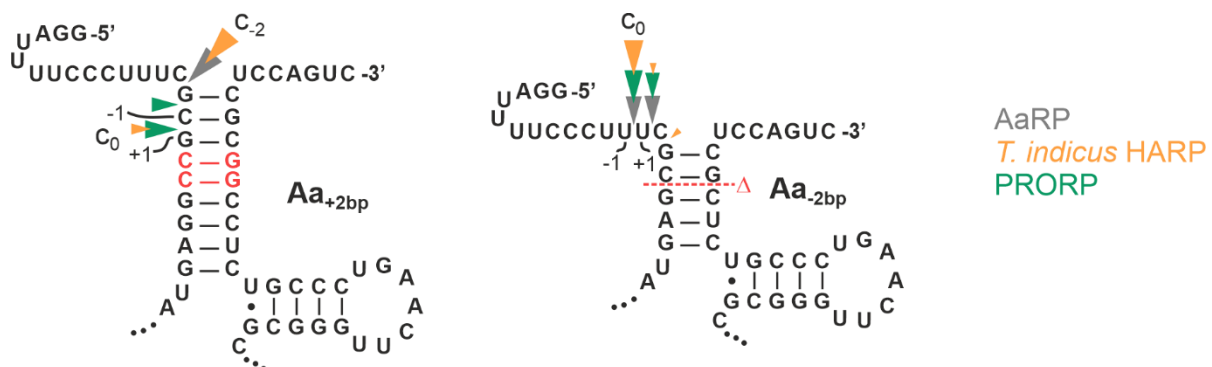


Abb. 83: Spaltstellenanalyse der Akzeptorstamm-Varianten

Prä-tRNA<sup>Gly</sup>-Varianten mit einem durch Insertion oder Deletion von zwei Basenpaaren (rot hervorgehoben) verlängerten oder verkürzten Akzeptorstamm; die anderen Domänen sind identisch zum ptGly (vgl. Abb. 80). Nukleotid +1 und -1 sind definiert als das siebte und achte Nukleotid im 5'-Strang des Akzeptorstamms (von der Basis des Stamms in 3'- zu 5'-Richtung gezählt). Die Prozessierung der beiden gezeigten Substrate erfolgte durch AaRP (grau), *T. indicus* HARP (orange) und PRORP (grün). Die Spaltstelle wurde anhand der Länge der abgespaltenen 5'-Flanke bestimmt und ist in der Abbildung als farbiges Dreieck gekennzeichnet. Die unterschiedliche Größe dieser Dreiecke kennzeichnet Haupt- und Nebenspaltstellen auf Basis von drei biologischen Replikaten (Wäber, 2019).

Zusammenfassend scheint auch für das AaRP und die HARP-Enzyme die Länge vom Akzeptorstamm für die Positionierung des Substrats im katalytischen Zentrum und damit für die Spaltstellenselektion entscheidend zu sein. Im Gegensatz zu den PRORP-Enzymen sind die HARP-Enzyme offensichtlich nicht dazu in der Lage, in Doppelstrang-Bereichen zu spalten. Bei Verlängerung des Akzeptorstamms erfolgte die Spaltung erst im Übergang von Doppel- zu Einzelstrang.

Detailliertere Analysen zum Längenmess-Mechanismus wurden mittels Minimalsubstraten durchgeführt. Um den Einfluss der T-Domänen-Länge selektiv zu untersuchen, wurden die

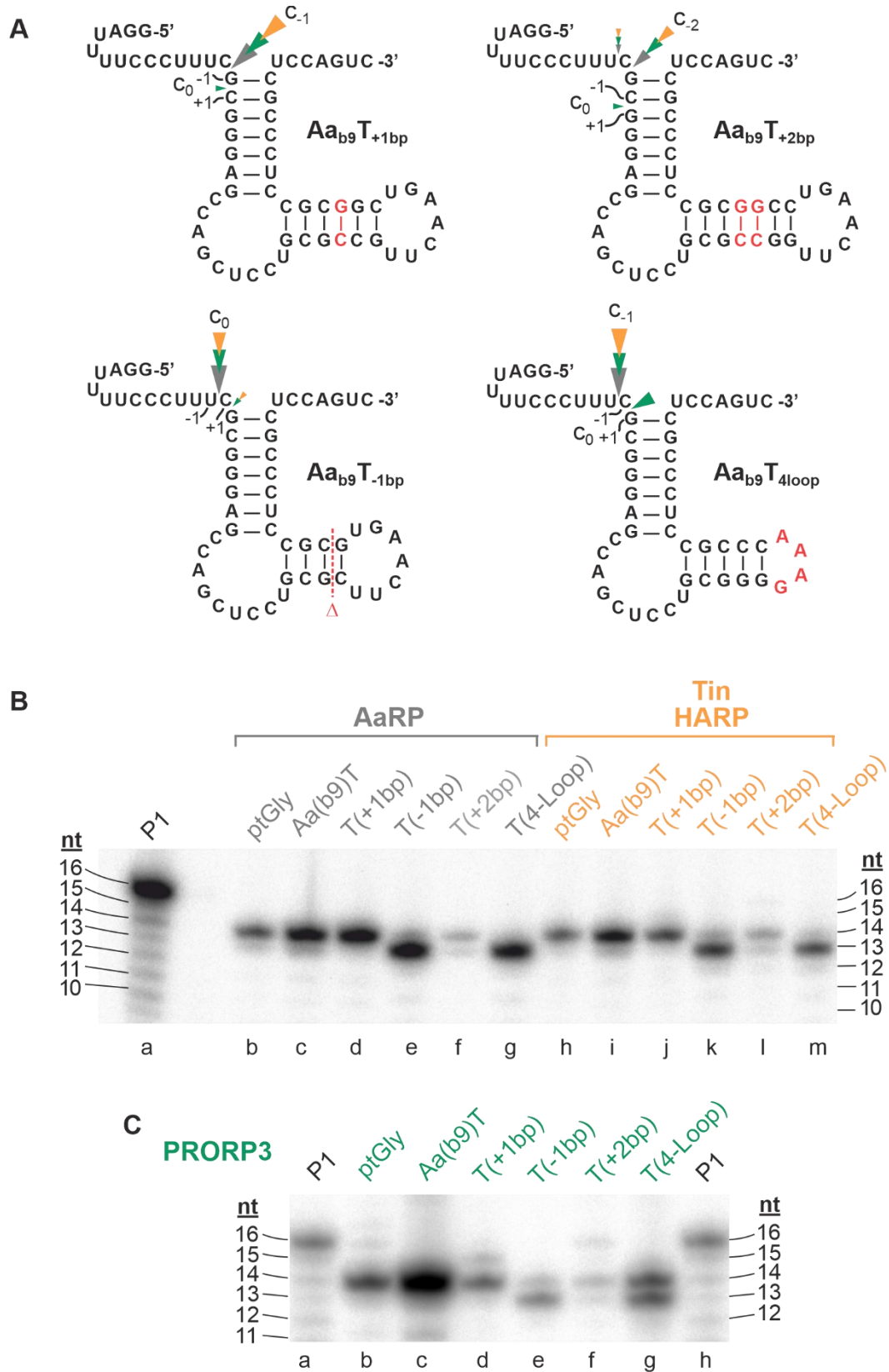
Spaltstellen von Aa<sub>b9</sub>T-Varianten mit unterschiedlich langem T-Stamm sowie veränderter T-Schleife bestimmt (Abb. 84A). Diese Analysen wurden mit AaRP, *T. indicus* HARP und dem als Referenz dienenden *A. thaliana* PRORP3 durchgeführt. Anhand der Länge der gespaltenen 5'-Flanke wurden dabei Rückschlüsse auf die Spaltstelle gezogen und zunächst eine Verlängerung des T-Stamms untersucht.

Das Substrat mit einem um ein Basenpaar verlängerten T-Stamm (T<sub>+1bp</sub>) wurde von allen drei getesteten Enzymen, AaRP, *T. indicus* HARP und PRORP, an der Position c<sub>-1</sub> prozessiert (Abb. 84B, Spur d und j sowie Abb. 84C, Spur d). Lediglich mit PRORP3 wurde auch eine schwache 15-nt lange 5'-Flanke detektiert, was einer Prozessierung an der c<sub>0</sub>-Position innerhalb des Doppelstrang-Bereichs entspricht. Das T<sub>+2bp</sub>-Substrat mit einem um 2 bp verlängerten T-Stamm wurde von allen drei Enzymen hauptsächlich an der Position c<sub>-2</sub> prozessiert. Zudem wurde dieses Substrat von AaRP, *T. indicus* HARP und PRORP3 auch geringfügig an der Position c<sub>-3</sub> gespalten, was zu einer schwachen 13-nt 5'-Flanke führte (Abb. 84B, Spur f und l sowie Abb. 84C, Spur f). Wie beim T<sub>+1bp</sub> wurde auch beim T<sub>+2bp</sub>-Substrat ausschließlich mit PRORP3 ein kleiner Anteil des Substrats an der Position c<sub>0</sub> innerhalb der Akzeptorstamm-Helix prozessiert (Abb. 84C, Spur f). Folglich prozessierten das AaRP und *T. indicus* HARP beide Substrate mit verlängertem T-Stamm hauptsächlich an dem Übergang von Doppel- zu Einzelstrang und nicht an der kanonischen Spaltstelle, die bei diesen Substraten im Doppelstrang-Bereich liegt.

Im nächsten Schritt wurde ein Substrat mit verkürztem T-Stamm analysiert. Dieses T<sub>-1bp</sub>-Substrat mit einem nur 4 bp langen T-Stamm, wurde von allen drei Enzymen überwiegend an der kanonischen Spaltstelle prozessiert, was zu einer 13-nt 5'-Flanke führte (Abb. 84B, Spur e und k sowie Abb. 84C Spur e). Mit *T. indicus* HARP und PRORP wurde außerdem eine schwache 14-nt 5'-Flanke detektiert. Das Substrat mit verkürztem T-Stamm wurde vom AaRP und *T. indicus* HARP im Gegensatz zu den Substraten mit verlängertem T-Stamm nicht am Übergang von doppelsträngiger zu einzelsträngiger Region, sondern vorwiegend an der Position c<sub>0</sub> - dem Längenmess-Mechanismus entsprechend - gespalten. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Akzeptorstamm-Varianten überein. Zusammenfassend ist für die Spaltstellenselektion des AaRPs und *T. indicus* HARPs einerseits ein Übergang von Doppel- zu Einzelstrang im Bereich der Spaltstelle und andererseits auch die Gesamtlänge des Akzeptorstamms und der T-Domäne entscheidend.

Neben dem Einfluss des T-Stamms wurde auch eine T-Schleifen-Variante untersucht. Bei diesem Substrat wurde die T-Schleife durch einen kleineren *Tetra*loop ersetzt (T<sub>4loop</sub>, Abb. 84A). AaRP und *T. indicus* HARP spalteten dieses Substrat an der Position c<sub>-1</sub>, was vergleichbar mit der Prozessierung vom T<sub>-1bp</sub>-Substrat zu einer 13-nt 5'-Flanke führte

(Abb. 84B, Spur g und m). Mit PRORP3 hingegen wurde eine Spaltung sowohl an Position  $c_0$  als auch  $c_{-1}$  beobachtet (Abb. 84C, Spur g).



**Abb. 84: Spaltstellen-Analyse der T-Domänen-Varianten**  
Die Bildunterschrift befindet sich auf der nächsten Seite.

(A) Aa<sub>99</sub>T-Varianten mit einem um ein oder zwei Basenpaar(e) verlängerten oder verkürzten T-Stamm oder mit einer T-Schleife, die durch einen *Tetra*loop ersetzt wurde. Als Nukleotid +1 und -1 werden das zwölfte und dreizehnte Nukleotid des 5'-Strangs von Akzeptor- und T-Stamm bezeichnet (von der Basis des T-Stamms von 3'- in 5'-Richtung gezählt / *bulge* Nukleotide nicht mitgezählt). Die Prozessierung der gezeigten Substrate erfolgte durch AaRP (grau), *T. indicus* HARP (orange) und PRORP (grün). Die Spaltstelle wurde gelelektrophoretisch anhand der Länge der gespaltenen 5'-Flanke ermittelt und ist als farbiges Dreieck dargestellt. Die unterschiedliche Größe kennzeichnet Haupt- und Nebenspaltstellen basierend auf vier biologischen Replikaten. (B) Denaturierende PAGE-Analyse (25 %) der gespaltenen 5'-Flanke. Spuren des 5'-[<sup>32</sup>P]-markierten Substrats wurde für eine Stunde bei 37 °C mit 100 nM des angegebenen Enzyms inkubiert. Als Größenmarker wurde eine Nuklease-P1-Leiter verwendet: Spuren einer 5'-[<sup>32</sup>P]-markierten wurden zu 50 µM unmarkierter 16-mer RNA gegeben, eine Minute bei 70 °C präinkubiert und dann für 45 Sekunden bei 70 °C mit 1 U der Nuklease P1 inkubiert. (C) Denaturierende PAGE-Analyse (25 %) der abgespaltenen 5'-Flanke von PRORP3. Die Experimente wurden wie unter (B) beschrieben durchgeführt, wobei anstelle von 100 nM in diesem Fall 1 µM Enzym verwendet und die Inkubation auf fünf Stunden verlängert wurde.

Insgesamt war die Effizienz der Spaltung von Substraten mit Variationen in der T-Domäne mit PRORP3 bedeutend schlechter als mit AaRP und *T. indicus* HARP. So mussten sowohl die Enzymkonzentration als auch die Inkubationszeit erhöht werden, um noch eine nachweisbare Spaltung mit PRORP detektieren zu können. Das AaRP und *T. indicus* HARP hingegen prozessierten die Substrate mit Ausnahme von T<sub>+2bp</sub> recht effizient. Während die Substrate T<sub>-1bp</sub>, T<sub>+1bp</sub> und T<sub>4loop</sub> nach einstündiger Inkubation fast vollständig (>90 % für AaRP und >75 % *T. indicus* HARP) prozessiert waren, lag die Prozessierung für das T<sub>+2bp</sub> lediglich bei ~60 % (AaRP) bzw. ~25 % (*T. indicus* HARP). Bemerkenswerterweise wurde bei keiner der T-Domänen-Varianten mit AaRP und *T. indicus* HARP eine Spaltung in der Doppelstrang-Region beobachtet.

### Diskussion

Die Ergebnisse zur Substraterkennung und Spaltstellenselektion des *T. indicus* HARPs lassen sich bei Vergleich mit den Ergebnissen aus analogen enzymkinetischen Analysen mit der *Aquifex aeolicus* RNase P (AaRP; Wäber, 2019) und *Methanothermobacter thermotrophicus* HARP (nicht publizierte Daten M. GÖßRINGER) sowie zahlreichen Studien mit bakteriellem Ribonukleoprotein und PRORP aus *Arabidopsis thaliana* (Brillante *et al.*, 2016; Klemm *et al.*, 2016; Gößringer *et al.*, 2021) wie folgt einordnen.

Das Verkürzen der 5'-Flanke der prä-tRNA von 14-nt auf 1-nt Länge hat gezeigt, dass keine essentiellen Interaktionen zwischen dem *T. indicus* HARP-Enzym und Nukleotiden der 5'-Flanke des prä-tRNA-Substrats stattfinden, da sich die katalytische Effizienz aller fünf Substrate (ptGly mit 1-nt, 2-nt, 4-nt, 7-nt und 14-nt 5'-Flanke) maximal um Faktor 3 unterschied. Das AaRP hingegen scheint anhand der enzymkinetischen Analyse Wechselwirkungen mit der 5'-Flanke einzugehen (Wäber, 2019). Dieser Unterschied könnte die erhöhte RNase P-Aktivität des AaRPs gegenüber dem *T. indicus* HARP erklären, da die Affinität zum Substrat gegenüber dem Produkt durch eine Interaktion mit der 5'-Flanke erhöht und folglich die katalytische Effizienz verbessert wird. Unter den HARPs scheint diese Interaktion AaRP-spezifisch zu sein, da auch für das *M. thermotrophicus* HARP keine Interaktion mit der 5'-Flanke beobachtet wurde (nicht publizierte Daten M. GÖßRINGER).

Bei der Analyse der Substrate mit unterschiedlichen 3'-Enden hat sich gezeigt, dass das 3'-CCA-Ende keine Substratdeterminante für das *T. indicus* HARP-Enzym ist. So war die katalytische Effizienz für das Substrat ohne 3'-CCA-Ende ( $\Delta$ CCA) im Gegenteil sogar noch um Faktor  $\sim 2$  besser als für das Substrat mit maturem 3'-CCA-Ende (CCA). Für das AaRP und *M. thermautotrophicus* HARP wurde ebenfalls keine essentielle Interaktion mit dem 3'-CCA-Ende während der enzymkinetischen Analysen der Substratvarianten am 3'-Ende beobachtet (Wäber, 2019; nicht publizierte Daten M. GÖßRINGER). Damit unterscheiden sich die HARP-Enzyme klar von den bakteriellen, RNA-basierten RNase P-Enzymen, bei denen das 3'-CCA-Ende aufgrund von Basenpaar-Interaktionen mit der P RNA-Untereinheit eine wichtige Substratdeterminante darstellt (Kirsebom & Svärd, 1994; Svärd *et al.*, 1996; Busch *et al.*, 2000; Wegscheid & Hartmann, 2007). Generell besitzen 3'-Extensionen einen eher inhibitorischen Effekt auf die Substratprozessierung vom *T. indicus* HARP, da die katalytische Effizienz für das Referenzsubstrat prä-tRNA<sup>Gly</sup> (mit 3-nt Extension am 3'-CCA-Ende) und Substrat 40-nt (mit 40-nt Extension am 3'-Ende) etwa um Faktor 10 schlechter war als für das Substrat  $\Delta$ CCA. Dies könnte sterische Gründe haben.

Frühere Studien ergaben, dass Substrate mit deletiertem D-Arm oder Anticodon-Arm noch effizient von den RNP-Enzymen gespalten werden können (McClain *et al.*, 1987; Hardt *et al.*, 1993; Yuan & Altman, 1995; Sinapah *et al.*, 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie haben gezeigt, dass das *T. indicus* HARP diese Substrate ( $\Delta$ D und  $\Delta$ Ac3) ebenfalls effizient prozessiert. Aufgrund des erniedrigten  $K_{1/2}$ -Werts ist die katalytische Effizienz für beide Deletionsvarianten sogar noch um Faktor  $\sim 5$  besser als für das Referenzsubstrat ptGly. Es kann folglich daraus geschlossen werden, dass die Enzym-Substrat-Bindung beim *T. indicus* HARP - vergleichbar zu den RNP-Enzymen und PRORP (Reiter *et al.*, 2010; Brillante *et al.*, 2016; Lan *et al.*, 2018; Wu *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2019) - hauptsächlich über die koaxial gestapelte Akzeptorstamm-T-Domäne erfolgt. Dies trifft auch auf das AaRP und *M. thermautotrophicus* HARP zu (Wäber, 2019; nicht publizierte Daten M. GÖßRINGER). Diese Ergebnisse schließen jedoch die im AaRP-tRNA-Bindungsmodell beobachtete Interaktion mit der D-Schleife nicht grundsätzlich aus (Feyh *et al.*, 2021). So könnten einzelne Strukturvariationen möglicherweise nur zu schwachen Effekten führen, wenn eine Vielzahl an Interaktionen zur Substraterkennung beitragen. Mit dem bakteriellen Ribonukleoprotein beispielsweise wurde das  $\Delta$ D-Substrat vergleichbar zu dem Standardsubstrat prozessiert (Hardt *et al.*, 1993). Trotzdem konnte eine Interaktion mit der D-Schleife für das bakterielle RNA-basierte Enzym mittels Strukturanalyse gezeigt werden (Reiter *et al.*, 2010). Zusammenfassend zeigen die Daten der enzymkinetischen Analysen lediglich, dass eine Interaktion mit der D-Schleife für die prä-tRNA-Prozessierung durch die HARPs vermutlich nicht essentiell ist.

Ein deutlicher Unterschied zwischen dem *T. indicus* HARP und PRORP bezüglich der Substratprozessierung wurde anhand des Minimalsubstrats AaT festgestellt. Dieses Substrat besteht lediglich aus 5'-Flanke, durchgehender 12-nt Doppelstrang-Helix (entspricht dem koaxial gestapelten Akzeptor-Arm / T-Stamm) und 3-nt Extension am 3'-CCA-Ende und wurde vom PRORP3 aus *A. thaliana* nur äußerst ineffizient gespalten (Brillante *et al.*, 2016). Die Prozessierung von AaT durch das *T. indicus* HARP sowie durch das AaRP und *M. thermotrophicus* HARP (Wäber, 2019; nicht publizierte Daten M. GÖßRINGER) erfolgte hingegen vergleichbar effizient wie die des Referenzsubstrats. Während eine deutliche Steigerung der Spaltungseffizienz bei dem PRORP-Enzym durch Einfügen einer 9-nt Schleifen-Sequenz im 5'-Übergangsbereich zwischen Akzeptor- und T-Stamm (Substrat Aa<sub>b9</sub>T) erreicht werden konnte (v.a. durch Erhöhung von  $v_{max}$ ) (Brillante *et al.*, 2016), konnte diese Substratmodifikation die ohnehin schon effiziente Prozessierung durch das *T. indicus* HARP und AaRP nur unwesentlich verbessern. Demnach sind die Prozessierungseigenschaften der HARPs und des bakteriellen RNP-Enzyms mit Hinblick auf das Minimalsubstrat vergleichbar (McClain *et al.*, 1987) und weisen auf ein hohes Maß an Flexibilität bezüglich der Substratbindung hin.

Ein weiteres Strukturelement der Akzeptorstamm-T-Domäne, das zur Substratbindung beitragen könnte, ist die T-Schleife. Folglich stellte sich die Frage, ob auch die Basenidentitäten in der T-Schleife, von denen einige in tRNAs stark konserviert sind (Giegé *et al.*, 2012), wichtig sind. Das Aa<sub>b9</sub>T<sub>mut</sub>-Substrat mit mutierter T-Schleife zeigte innerhalb der Minimalsubstrate die geringste katalytische Effizienz. Allerdings waren die gemessenen Effekte bezogen auf das Aa<sub>b9</sub>T-Substrat nur schwach, so dass keine eindeutige Aussage möglich ist, ob tatsächlich Basen-spezifische Interaktionen mit der T-Schleife stattfinden. Dies könnte darauf hindeuten, dass eine potentielle T-Schleifen-Interaktion hauptsächlich über elektrostatische Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat vermittelt wird und deswegen weniger von der Basensequenz abhängig ist. Eine solche T-Schleifen-Interaktion würde im Einklang mit den tRNA-Bindungsmodellen für das AaRP (Feyh *et al.*, 2021; Teramoto *et al.*, 2021) stehen, bei denen vorwiegend basische Aminosäuren in die T-Schleifen-Interaktion eingebunden sind. Im Rahmen von Untersuchungen zur Substraterkennung mit dem AaRP zeigte sich allerdings, dass das Substrat mit mutierter T-Schleife durch dieses Enzym deutlich schlechter prozessiert wird als das Aa<sub>b9</sub>T-Vergleichssubstrat (Wäber, 2019). Demnach scheint die Interaktion beim AaRP Sequenz-abhängig zu sein. Als Interaktion mit den entsprechenden Basen der tRNA kämen neben Wasserstoffbrückenbindungen beispielsweise  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen mit aromatischen Aminosäuren oder Kationen- $\pi$ -Wechselwirkungen mit basischen Aminosäuren infrage. Das schwach konservierten Aminosäuren Tyrosin 95 oder auch Lysin 119 und Arginin 123 vom AaRP sind mögliche Kandidaten für solch eine Wechselwirkung



(Teramoto *et al.*, 2021). Generell scheint die T-Schleifen-Interaktion für die RNase P-Prozessierung von großer Bedeutung zu sein und mit einer erhöhten RNase P-Aktivität einherzugehen. Für das *M. thermotrophicus* HARP, welches *in vitro* verglichen mit *T. indicus* HARP und AaRP eine sehr schwache RNase P-Aktivität besaß (Nickel *et al.*, 2017), wurde nach Mutation der Basen in der T-Schleife kein Effekt auf die Prozessierung beobachtet (nicht publizierte Daten M. GÖßRINGER). Die Ergebnisse vergleichbarer Analysen mit dem AaRP hingegen deuten auf eine Basen-spezifische T-Schleifen-Interaktion hin und entsprechend besitzt AaRP unter allen getesteten HARPs auch die höchste RNase P-Aktivität *in vitro* (Nickel *et al.*, 2017; Wäber, 2019).

Alle bisher vorgestellten Substratvarianten wurden an der kanonischen Spaltstelle prozessiert. Wie die Spaltstelle durch die HARPs determiniert wird, war zu Beginn der vorliegenden Studie noch völlig unklar. Die Analysen zum Mechanismus der Spaltstellenselektion wurden in Anlehnung an vergleichbare Studien zum PRORP3 aus *A. thaliana* durchgeführt (Brillante *et al.*, 2016). Hierbei wurden die Spaltstellen von Substraten ausgehend vom Minimalsubstrat Aa<sub>69</sub>T mit einem um ein bzw. zwei Basenpaar(e) verlängerten oder um ein Basenpaar verkürzten T-Arm analysiert. Wenn vom Längenmess-Mechanismus ausgehend die kombinierte Länge von Akzeptorstamm (7 bp) und T-Domäne (5 bp T-Stamm) für die Selektion der Spaltstelle ein wichtiger Faktor ist, so sollte die Spaltung bei den Substraten nach 12 Basenpaaren der Akzeptor-T-Arm-Domäne von der Basis des T-Stamms ausgehend (in Abb. 84 als Position c<sub>0</sub> bezeichnet) erfolgen. Durch die Insertion und Deletion von Basenpaaren im T-Stamm lag diese Position nicht mehr am Übergang von Doppel- zu Einzelstrang, sondern befand sich für die Substrate mit verlängertem T-Stamm in der Akzeptorstamm-Helix und für die Substrate mit verkürztem T-Stamm im 5'-Einzelstrang-Bereich.

Tatsächlich konnte beim Substrat T<sub>-1bp</sub> mit verkürztem T-Arm mit *T. indicus* HARP eine Spaltstelle an Position c<sub>0</sub> bestimmt werden. Bei den beiden Substraten mit verlängertem T-Stamm hingegen erfolgte die Spaltung an Position c<sub>-1</sub> (Substrat T<sub>+1bp</sub>) bzw. c<sub>-2</sub> (Substrat T<sub>+2bp</sub>), also um eine bzw. zwei Positionen in die 5'-Richtung verschoben. Diese beiden Positionen am 5'-Ende des jeweiligen Substrats befinden sich exakt am Übergang von Doppel- zu Einzelstrang. Folglich scheint für die Selektion der Spaltstelle die kombinierte Länge von T-Domäne und Akzeptorstamm, also die Entfernung von der T-Schleife zum aktiven Zentrum des Enzyms, entscheidend zu sein. Dies gilt jedoch nur eingeschränkt, da die HARPs scheinbar nicht in der Lage sind, innerhalb von Doppelstrang-Regionen zu spalten. Folglich ist für die Selektion der Spaltstelle sowohl der Übergang von Doppel- zu Einzelstrang als auch die Länge der Akzeptorstamm-T-Domäne relevant. Hierbei unterscheiden sich AaRP / HARP von dem PRORP3 aus *A. thaliana*, das dazu parallel getestet wurde. Bei PRORP konnten bei den um ein bzw. zwei Basenpaar(e) verlängerten Substraten neben der Fehlsplaltung an c<sub>-1</sub>

bzw.  $c_{-2}$  noch eine schwache Spaltung an der kanonischen Spaltstelle  $c_0$  im Doppelstrang-Bereich detektiert werden.

Da bei Vorliegen eines Längenmess-Mechanismus Interaktionen zwischen dem Ellbogen des L-förmigen tRNA-Substrats und dem Enzym stattfinden müssen, sollte mit einer weiteren Substratvariante untersucht werden, ob die Länge der T-Schleife die Positionierung der Spaltstelle beim *T. indicus* HARP ebenfalls beeinflusst. Hierzu wurde bei Substrat  $T_{4loop}$  die T-Schleifenlänge von konservierten sieben Nukleotiden auf vier Nukleotide verkürzt. Die Spaltung dieses Substrats erfolgte an Position  $c_{-1}$ , also um ein Nukleotid in 5'-Richtung verschoben. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass es bei der Positionierung der Spaltstelle zu Interaktionen zwischen Nukleotiden der T-Schleife und dem Enzym kommt, die bei Substrat  $T_{4loop}$  verändert bzw. gestört sind. Zusammengefasst sind beim direkten Vergleich von *T. indicus* HARP mit AaRP hinsichtlich der Spaltstellenselektion kaum Unterschiede festzustellen. Auch für das *M. thermautotrophicus* HARP erfolgte die Spaltstellenselektion der Substrate mit variiertes T-Domäne in ähnlicher Weise, allerdings wurden grundsätzlich mehr Fehlsplaltungen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Folglich sind bei der Substratbindung und -prozessierung des *T. indicus* HARP-Enzyms sowohl Ähnlichkeiten als auch Unterschiede zum klassischen bakteriellen RNA-basierten RNase P-Enzym zu erkennen. Die für das bakterielle RNP-Enzym beschriebenen essentiellen Interaktionen mit Positionen nahe der Spaltstelle konnten bei dem bakteriellen HARP-Enzym nicht beobachtet werden. Weder die Interaktionen zum 3'-CCA-Ende noch zu Nukleotiden in der 5'-Flanke waren nachweisbar. Eine Ausnahme hierzu stellt das HARP-Enzym aus *A. aeolicus* (AaRP) dar, welches offensichtlich analog zum bakteriellen Ribonukleoprotein auch Interaktionen mit Nukleotiden in der 5'-Flanke eingeht (Wäber, 2019). Zusammenfassend scheint die Enzym-Substrat-Bindung bei den HARPs hauptsächlich über die koaxial gestapelte Akzeptorstamm-T-Domäne zu erfolgen. Die Substraterkennung des AaRPs zeichnet sich basierend auf den enzymkinetischen Analysen gegenüber den beiden anderen untersuchten HARPs durch eine Interaktion mit Nukleotiden der 5'-Flanke und eine Sequenz-abhängige Interaktion mit der T-Schleife des prä-tRNA Substrats aus. Dies könnte die hohe RNase P-Aktivität des AaRPs unter den bisher getesteten HARPs erklären und darauf hindeuten, wie das Enzym für die RNase P-Prozessierung im Laufe der Evolution optimiert wurde. Schließlich besitzen das Archaeon *M. thermautotrophicus* und das Bakterium *T. indicus* im Gegensatz zu *A. aeolicus* die für die RNA- und Protein-Untereinheiten der Ribonukleoproteine kodierenden Gene, die *in vitro* aktiv sind (Andrews *et al.*, 2001; Hall & Brown, 2002; Nickel *et al.*, 2017).

Bei der enzymkinetischen Analyse vom *T. indicus* HARP war auffällig, dass die ermittelten Parameter  $K_{1/2}$  und  $v_{max}$  teilweise stark schwankten, sodass die Bestimmung eindeutiger Effekte schwierig war. Zwei Ursachen sind als Auslöser für diese Schwankungen denkbar. Erstens erfolgte die Prä-Inkubation der Substrate in Wasser und nicht in Reaktionspuffer, der

unter anderem monovalente Kationen und  $Mg^{2+}$ -Ionen enthält.  $Mg^{2+}$ -Ionen sind für die korrekte Faltung insbesondere für die Ausbildung von Tertiärinteraktionen von RNA-Substraten essentiell (Misra & Draper, 2002; Stein & Crothers, 2002; Draper *et al.*, 2005). Folglich könnte die Faltung der einzelnen RNA-Substrate eventuell erst nach Zugabe zum  $Mg^{2+}$ -enthaltenden Enzym-Mix bei Reaktionsstart erfolgt sein. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Faltung der verschiedenen Substrate unterschiedlich schnell erfolgt, können die enzymkinetischen Parameter zusätzlich durch unterschiedliche Faltungs-Kinetiken beeinflusst worden sein. Um den Einfluss der RNA-Faltung auf die enzymkinetischen Parameter einschätzen zu können, wurden die Experimente für das Standardsubstrat, das Aa<sub>b9</sub>T-, das Aa<sub>b9</sub>T<sub>mut</sub>-Substrat und das Substrat mit einer 2-nt 5'-Flanke wiederholt. Dabei zeigte sich, dass die relativen Unterschiede zwischen den einzelnen Substraten vergleichbar sind und somit auch die vorerst getroffenen Interpretationen der Ergebnisse weiterhin gültig sind.

Eine weitere Eigenschaft der HARP-Enzyme ist die Bildung von großen Homo-Oligomer-Komplexen (Nickel *et al.*, 2017; Feyh *et al.*, 2021; Teramoto *et al.*, 2021). Ein unterschiedlicher Oligomerisierungsgrad könnte ebenfalls Schwankungen bei den enzymkinetischen Messungen verursacht haben. Da derzeit noch unklar ist, wie der Oligomerisierungsgrad mit der Proteinkonzentration und der enzymatischen Aktivität korreliert, sind solche Effekte schwer kalkulierbar. Unter *single-turnover* Bedingungen werden nur Spuren an Substrat eingesetzt, während die Enzymkonzentrationen im Überschuss variiert werden. Bei den gezeigten Ergebnissen wurden im Reaktionsansatz Enzymkonzentrationen von 10 - 200 nM verwendet. Durch Erhöhung der Enzymkonzentration kann sich der Oligomerisierungszustand eines Proteins grundsätzlich verändern. So konnte beispielsweise für das Lipopolysaccharid-Transportprotein LptA Gram-negativer Bakterien gezeigt werden, dass mit steigender Proteinkonzentration auch größere Homooligomere gebildet werden (Merten *et al.*, 2012). Während das Protein bei einer Konzentration von  $\sim 1 \mu M$  vorwiegend als Dimer vorliegt, wurden bei Konzentrationen ab  $\sim 65 \mu M$  Komplexe bestehend aus 20 Monomeren beobachtet (Merten *et al.*, 2012). Ferner ist nicht auszuschließen, dass bei höheren Enzymkonzentrationen keine geordnete Oligomerisierung mehr stattfindet, sondern es vielmehr zu einer Aggregation bzw. Verklumpung des Proteins kommt. Dies könnte mit einem Aktivitätsverlust einhergehen. Zusammenfassend könnte sich durch die Variation der Enzymkonzentration der Oligomerisierungsgrad des Proteins und somit auch die Enzymaktivität ändern. Dies könnte erklären, warum teilweise das Bestimmen einer Regressionsgrade nach modifiziertem *Michaelis-Menten*-Model Probleme bereitete oder auch warum  $K_{1/2}$  und  $v_{max}$  wie beispielsweise bei den Substraten mit 7- bzw. 4-nt 5'-Flanke parallel anstiegen. Kinetiken unter *single-turnover* Bedingungen bieten gegenüber *multiple-turnover* Bedingungen, bei denen die Substratkonzentration im Überschuss bei konstanter Enzymkonzentration variiert wird, den Vorteil, dass die Produktfreisetzung kaum mit in die

Ratenkonstante einget. Folglich setzt sich die Ratenkonstante primär aus Substratbindung und -umsetzung zusammen, was die entscheidenden Parameter für Analysen zur Substraterkennung sind.

#### 4.2.2 Strukturelle Analysen

Neben den Analysen zur Substraterkennung wurde versucht, weitere Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen dem *T. indicus* HARP und der *A. aeolicus* RNase P herauszuarbeiten. Wie das *Alignment* in Abb. 85 zeigt, weisen die Proteine eine hohe Sequenzhomologie auf (43 % Sequenzidentität; Larkin *et al.*, 2007). Die vier Aspartat-Aminosäuren, die im *A. aeolicus* Protein für die Funktion essentiell sind und die damit vermutlich das katalytische Zentrum bilden (Nickel *et al.*, 2017), sind auch im *T. indicus* HARP vorhanden. Bemerkenswerterweise sind diese Aspartate innerhalb der HARPs hoch konserviert und sogar in HARPs, für die bisher keine RNase P-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Wäber, 2019), vorzufinden. Des Weiteren scheint auch derjenige Bereich, der reich an basischen Aminosäuren ist und der vermutlich für die tRNA-Bindung verantwortlich ist (Feyh *et al.*, 2021), in allen HARPs vertreten zu sein (Abb. 85, in magenta hervorgehoben). Immerhin sind zwei der fünf basischen Aminosäuren hoch konserviert. Gemäß dem tRNA-Bindungs-Modell vom *A. aeolicus* Protein sind vor allem die Aminosäuren K119 und R123 (*A. aeolicus* Nummerierung) in die Bindung der T-Schleife der tRNA involviert (Feyh *et al.*, 2021). An diesen Positionen befinden sich im *T. indicus* Protein, dem *Alignment* zufolge, keine basischen Aminosäuren. Neben diesem Bereich ist eventuell auch die Helix 3 in die tRNA-Bindung durch Interaktionen des AaRPs mit der D-Schleife der tRNA eingebunden (Feyh *et al.*, 2021). Aromatische sowie basische Aminosäuren dieser Helix, die grundsätzlich in der Lage sind, Interaktionen mit RNAs einzugehen, sind weniger konserviert.

Darüber hinaus konnte für das *H. halophila* HARP anhand der Kryo-EM-Struktur gezeigt werden, dass die Dimerisierung des als Dodekamer vorliegenden Proteins über die sogenannte SH-Domäne erfolgt (Abb. 85, orange markiert; Feyh *et al.*, 2021). Die Dimerisierung wird im *H. halophila* Protein neben zahlreichen hydrophoben Wechselwirkungen auch über eine Salzbrücke zwischen E91 des einen Monomers und R141 (*H. halophila* Nummerierung) des zweiten Monomers vermittelt (Feyh *et al.*, 2021). Diese beiden zur Ausbildung der Salzbrücke erforderlichen Aminosäuren sind bei den HARPs weniger konserviert. Für das *T. indicus* HARP befindet sich an diesen Positionen jedoch sowohl eine saure (Aspartat) als auch eine basische Aminosäure (Lysin). Außerdem sind Regionen der SH-Domäne, wie die hydrophoben Aminosäuren, innerhalb der HARPs konserviert, sodass für alle gezeigten HARPs eine Dimerisierung denkbar ist. Die Interaktionen für die Oligomerisierung des *H. halophila* HARPs umfassen die  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5-Schleife des einen Dimers und die C-terminale  $\alpha$ 7- $\alpha$ 8-Schleife sowie Helix 8 des benachbarten Dimers

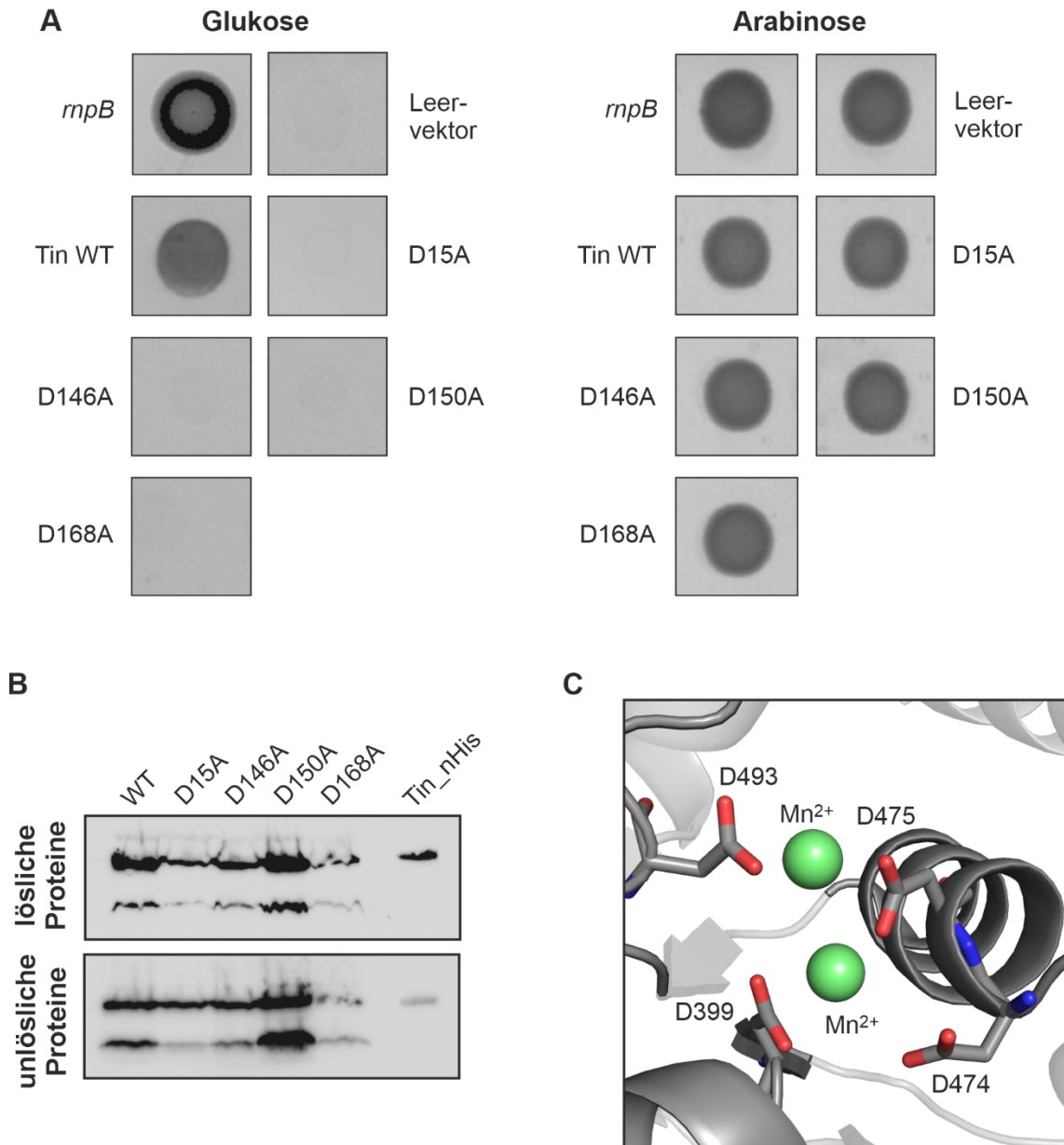


*Clustal Omega Alignment* der Proteinsequenzen ausgewählter HARPs (Madeira *et al.*, 2019). Die  $\alpha$ -Helices (grau hinterlegt und oberhalb mit A1-A8 beschriftet), sowie die beiden Domänen (Metallonuklease-Domäne blau und SH-Domäne orange, oberhalb der Sequenzen markiert) und Bereiche der Oligomerisierung (grün) wurden von der *H. halophila* Kryo-EM-Struktur abgeleitet (Feyh *et al.*, 2021). Folgende Aminosäuren wurden farblich hervorgehoben: Aspartate, die das katalytische Zentrum bilden: rot; basische Aminosäuren, die vermutlich in die Bindung der T-Schleife der tRNA involviert sind: magenta; Aminosäuren, die eine Salzbrücke für die Dimerisierung ausbilden: orange; Aminosäuren, die Wasserstoffbrückenbindungen im Rahmen der Oligomerisierung eingehen: grün. Hha, *Halorhodospira halophila*; Aae, *Aquifex aeolicus*; Tin, *Thermodesulfatator indicus*; Hvo, *Haloferax volcanii*; Mth, *Methanothermobacter thermautotrophicus*; Mma, *Methanosarcina mazei*; Min, *Methylacidiphilum infernorum*; Alkalilimnicola ehrlichii; Tni, *Thioalkalivibrio nitratireducens*; Pfu, *Pyrococcus furiosus*. Organismen mit HARP-Enzymen, für die eine *in vitro* RNase P-Aktivität gezeigt werden konnte (Nickel *et al.*, 2017; Schwarz *et al.*, 2019; Feyh *et al.*, 2021), sind durch einen Unterstrich gekennzeichnet, wobei bakterielle Enzyme in schwarzer und archaeale Enzyme in hellblauer Schrift dargestellt sind.

Im Folgenden wurde daher zum einen experimentell untersucht, ob tatsächlich die vier vorhergesagten Aspartat-Aminosäuren für die Funktion des *T. indicus* HARP essentiell sind. Zum anderen sollte der Oligomerisierungsgrad des Proteins bestimmt werden.

### Komplementationsanalysen zu Proteinmutanten

Um zu überprüfen, ob die vier konservierten Aspartat-Aminosäuren D15, D146, D150 und D168 (*T. indicus* Nummerierung) tatsächlich für die RNase P-Funktion essentiell sind, wurden diese vier Positionen jeweils zu Alaninen mutiert. Die resultierenden vier Einzelmutanten (D15A, D146A, D150A, D168A) wurden in dem *E. coli* BW-Stamm (Wegscheid & Hartmann, 2006), bei dem das für die bakterielle P RNA kodierende Gen (*mpB*) unter Kontrolle eines Arabinose-Promotors steht, untersucht. In Abwesenheit von Arabinose kommt es zur Depletion der bakteriellen RNase P, was für die Zellen letal ist. Für das *T. indicus* Wildtyp-HARP konnte bereits gezeigt werden, dass es die bakterielle RNase P unter nicht permissiven Bedingungen (Glukose als Kohlenstoffquelle) komplementieren kann (Nickel *et al.*, 2017). Dies wurde auch für die Proteinmutanten untersucht. Dafür wurden die für die Mutanten kodierenden Expressionsvektoren durch Transformation in den *E. coli* BW-Stamm eingebracht und anschließend das Zellwachstum in Anwesenheit von Arabinose bzw. Glukose über einen Zeitraum von 120 Stunden dokumentiert. Wie Abb. 86A zu entnehmen ist, wurde für keine der untersuchten Mutanten Zellwachstum beobachtet, wenn Glukose als Kohlenstoffquelle zur Verfügung stand. Die Mutanten sind demnach also im Gegensatz zum Wildtyp-HARP nicht in der Lage, die bakterielle RNase P zu komplementieren. Da auch zumindest ein Anteil der mutierten Proteine genau wie das des Wildtyps als lösliches Protein innerhalb der Zelle vorlag (Abb. 86B), scheinen diese Mutanten tatsächlich inaktiv zu sein. Wie erwartet, sind die Aminosäuren D15, D146, D150 und D168 wie beim *A. aeolicus* Protein damit auch beim *T. indicus* HARP für die RNase P-Funktion unabdingbar und bilden vermutlich das katalytische Zentrum, indem sie ähnlich zum PRORP-Enzym die für die Katalyse essentiellen Metallionen koordinieren (Abb. 86C).



**Abb. 86: Komplementationsanalysen von Proteinmutanten**

(A) Ergebnisse der Komplementationsanalysen. Durch Transformation wurden die Expressionsplasmide, die für das *T. indicus* HARP sowie dessen Varianten D15A, D146A, D150A und D168A kodieren, in *E. coli* BW-Zellen eingebracht. Alle Plasmide kodieren außerdem für einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, der zur späteren Detektion der Proteine mittels Western Blot dient. Als Positivkontrolle wurde ein Plasmid mit *E. coli mpB*-Gen gewählt, während der Leervektor pDG148(+) die Negativkontrolle darstellt. Das Zellwachstum wurde über 5 Tage beobachtet. Gezeigt sind die Ergebnisse des letzten Beobachtungszeitpunkts. Tin, *T. indicus* HARP; WT, Wildtyp. (B) Western Blot der Löslichkeitskontrolle. Um zu überprüfen, ob die Proteine als lösliche Proteine innerhalb der Zelle vorlagen, wurden die Zellen der Arabinose-Platten im Anschluss an die Komplementationsexperimente lysiert und für 30 Minuten bei 16200 x g und 4 °C zentrifugiert. Dadurch wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen abgetrennt. Zum Konzentrieren der löslichen Proteine im Überstand wurde eine Fällung mit Trichloressigsäure durchgeführt und anschließend das TCA-Pellet in 90 µL TuS-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4; 100 mM NaCl; 8 M Harnstoff) resuspendiert. Das Pellet aus dem ersten Zentrifugationsschritt, das unlösliche Proteine sowie nicht aufgeschlossene Zellen enthält, wurde ebenfalls in 90 µL TuS-Puffer aufgenommen. Je 15 µL der Proben wurden auf das SDS-Gel aufgetragen. Als Kontrolle diente das rekombinante Protein mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag (2 µg). Die Entwicklung des Western Blots erfolgte mit einem Antikörper gegen den His<sub>6</sub>-Tag. Gezeigt sind die Blots nach einer Belichtungszeit von 17,4 Sekunden. (C) Aktives Zentrum von *A. thaliana* PRORP1 (PDB: 4G24, Howard *et al.*, 2012). Die Sekundärstrukturen der Metallonuklease-Domäne sind grau eingefärbt. Bei den vier Aspartat-Aminosäuren wurde für die einzelnen Atome folgender Farbcode gewählt: Stickstoff: blau, Sauerstoff: rot. Die Manganionen des aktiven Zentrums sind grün gefärbt.

### Untersuchungen zum Oligomerisierungsgrad

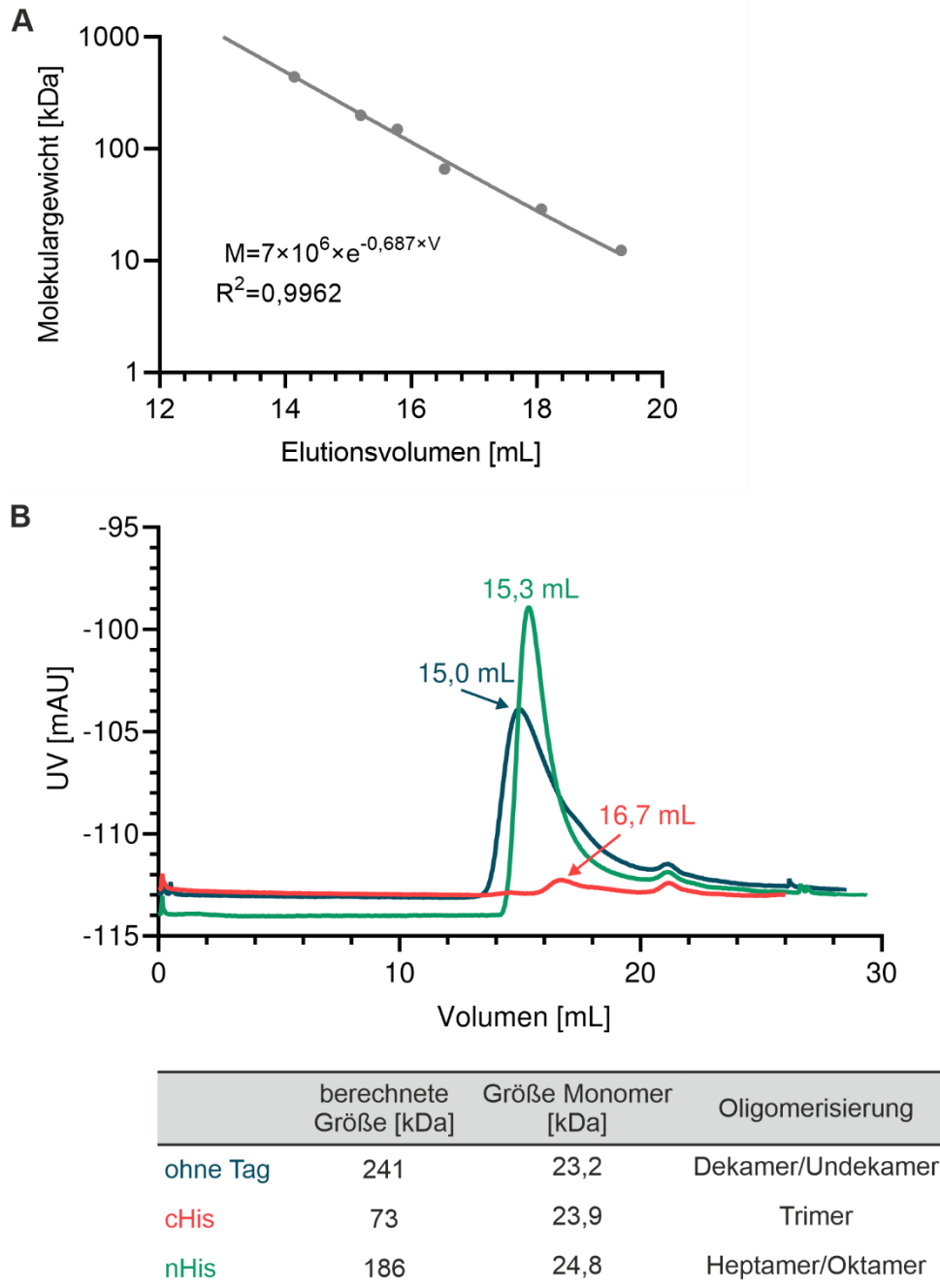
Sowohl das AaRP als auch das *H. halophila* HARP bilden ein 277 kDa- bzw. 295 kDa-großes Homooligomer (Feyh *et al.*, 2021). Ob das *T. indicus* HARP ebenfalls zu solch großen Komplexen oligomerisiert, wurde mittels analytischer Gelfiltration überprüft. Für das *H. halophila* HARP wurden an der Oligomerisierungs-Oberfläche Interaktionen zwischen R179 und D59 (*H. halophila* Nummerierung) gezeigt. Dem Sequenz-Alignment (Abb. 85) zufolge befinden sich an diesen Positionen im *T. indicus* HARP ein Glutamat und ein Prolin, sodass eine vergleichbare Interaktion unwahrscheinlich ist. Des Weiteren interagiert D154 im *H. halophila* HARP mit R72 und R75 (*H. halophila* Nummerierung). Diese Interaktionen könnten im *T. indicus* HARP durchaus vorhanden sein, da sich an den vergleichbaren Positionen ebenfalls ein Aspartat und basische Aminosäuren befinden.

Für die analytische Gelfiltration wurde zunächst eine Standardkurve mit folgenden Proteinen aufgenommen: Apoferritin (443 kDa),  $\beta$ -Amylase (200 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), bovines Serumalbumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom C (12,4 kDa). Anschließend wurde das Molekulargewicht gegen das Elutionsvolumen aufgetragen, um eine exponentielle Ausgleichsgerade zu erhalten (Abb. 87A). Anhand dieser wurde im Folgenden die Größe des *T. indicus* HARPs basierend auf dem ermittelten Elutionsvolumen berechnet. Für das *T. indicus* HARP mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag ergab die analytische Gelfiltration ein Elutionsvolumen von 16,7 mL (Abb. 87B). Dies entspricht einer Größe von ~73 kDa, was bei einem Molekulargewicht des Monomers von 23,9 kDa einem Trimer gleichkommt. Allerdings konnte aufgrund von Präzipitationsproblemen nur eine sehr geringe Menge an Protein analysiert werden, was an dem äußerst kleinen Peak (Abb. 87B) deutlich wird. Bei Dialyse des Proteins in einen Puffer mit lediglich 10 % Glycerin anstelle von 50 % wie im Lagerungspuffer wurde eine Trübung der Proteinprobe beobachtet.

Da für die Oligomerisierung unter anderem C-terminale Bereiche entscheidend sind (Feyh *et al.*, 2021), ist grundsätzlich denkbar, dass der C-terminale His<sub>6</sub>-Tag Einfluss auf die Oligomerisierung hat. Um dies zu untersuchen, wurde das *T. indicus* HARP ebenfalls mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag sowie eine Variante ohne Tag einer analytischen Gelfiltration unterzogen. Das Protein mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag wurde in gleicher Weise wie das Protein mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag mittels Ni-NTA-Säule gereinigt. Für das Protein ohne Tag wurde der N-terminale His<sub>6</sub>-Tag mit Thrombin abgespalten. Anschließend wurden das Thrombin und der His<sub>6</sub>-Tag mittels Ionenaustauschchromatographie abgetrennt. Das *T. indicus* HARP ohne Tag sowie mit N-terminalem Affinitäts-Tag eluierten während der analytischen Gelfiltration bei einem Volumen von 15,0 mL (ohne Tag) bzw. 15,3 mL (mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag) und sind somit größer als die Variante mit C-terminalem Tag (Abb. 87B). Das *T. indicus* HARP ohne



*Tag* scheint demzufolge als Dekamer bzw. Undekamer vorzuliegen, während sich anhand der Standardkurve für das Protein mit *N*-terminalem *Tag* ein Heptamer bzw. Oktamer ergibt.

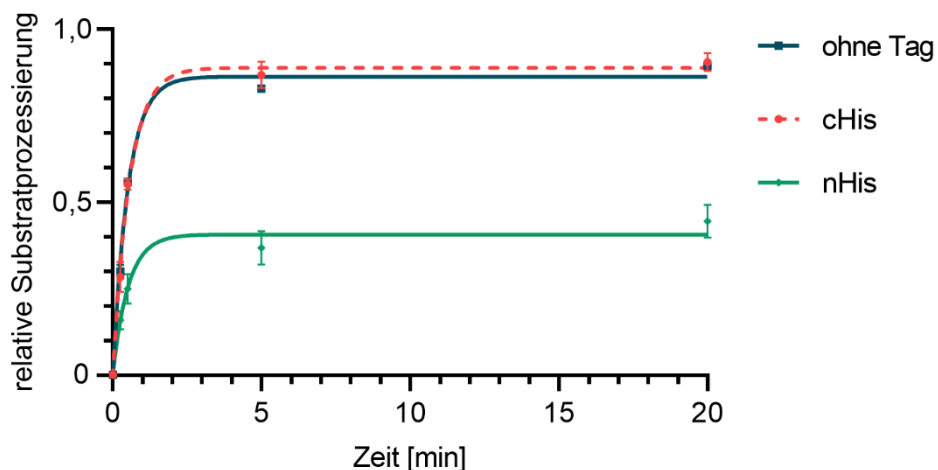


**Abb. 87: Analytische Gelfiltration**

(A) Aufgenommene Standardkurve zur Bestimmung des Oligomerisierungszustands. Zur Ermittlung der Standardkurve wurden die Elutionsvolumina folgender Proteine bekannter Größe ermittelt: Apoferritin (443 kDa),  $\beta$ -Amylase (200 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), bovines Serumalbumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom C (12,4 kDa). Durch Auftragen des Molekulargewichts der Proteine (logarithmische Skala) gegen das Elutionsvolumen konnte die in der Abbildung angegebene exponentielle Ausgleichsgerade ermittelt werden. M, Molekulargewicht; V, Elutionsvolumen. (B) Chromatogramm der drei zu untersuchenden Proteine: *T. indicus* HARP ohne *Tag* (ohne *Tag*, grün), *T. indicus* HARP mit C-terminalem His<sub>6</sub>-*Tag* (*cHis*, rot) und *T. indicus* HARP mit N-terminalem His<sub>6</sub>-*Tag* (*nHis*, blau). Es wurde eine Superose 6-Säule, 10/300 GL mit einem Säulenvolumen von 24 mL verwendet. Die Chromatographie der zu analysierenden Proteine erfolgte direkt im Anschluss an die Aufnahme der Standardkurve. Die drei Proteine lagen dabei in folgendem Puffer vor: 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1 mM EDTA und 10 % Glycerin. In dem Chromatogramm ist das Elutionsvolumen des korrespondierenden Peaks angegeben. Der Tabelle ist die anhand der Standardkurve berechnete Protein-Größe, die Größe eines Monomers und der daraus resultierende Oligomerisierungsgrad zu entnehmen.

Aufgrund der bereits erwähnten Präzipitationsproblematik lässt sich jedoch keine eindeutige Aussage hinsichtlich des Vergleichs von Protein mit C-terminalem *Tag* und Protein ohne *Tag* treffen. Um eine größere Menge an stabilem Protein mit C-terminalem *Tag* analysieren zu können und folglich Präzipitationsprobleme als Ursache für die geringere Größe ausschließen zu können, wurden verschiedene Puffer getestet. Diese Bestrebungen blieben jedoch erfolglos.

Durch Deletionen am C-Terminus des AaRP-Proteins konnte die Oligomerisierung weitestgehend unterbunden werden, was mit einem Aktivitätsverlust einherging (Feyh *et al.*, 2021). Wenn das *T. indicus* HARP mit C-terminalem *Tag* tatsächlich nur als Trimer vorliegt, wäre folglich eine verminderte Aktivität im Vergleich zum Protein ohne *Tag* zu erwarten gewesen. Um dies zu überprüfen, wurden die drei Proteinvarianten (ohne *Tag*, mit C-terminalem oder N-terminalem His<sub>6</sub>-*Tag*) enzymkinetisch bei einer Konzentration von 50 nM getestet. Wie in Abb. 88 zu sehen ist, sind das Protein ohne *Tag* und jenes mit C-terminalem His<sub>6</sub>-*Tag* bezüglich ihrer RNase P-Aktivität miteinander vergleichbar. Das *T. indicus* HARP mit N-terminalem His<sub>6</sub>-*Tag* hingegen zeigte, wie bereits eingangs erwähnt, eine verminderte RNase P-Aktivität, da lediglich etwa 50 % des Substrats prozessiert wurden.

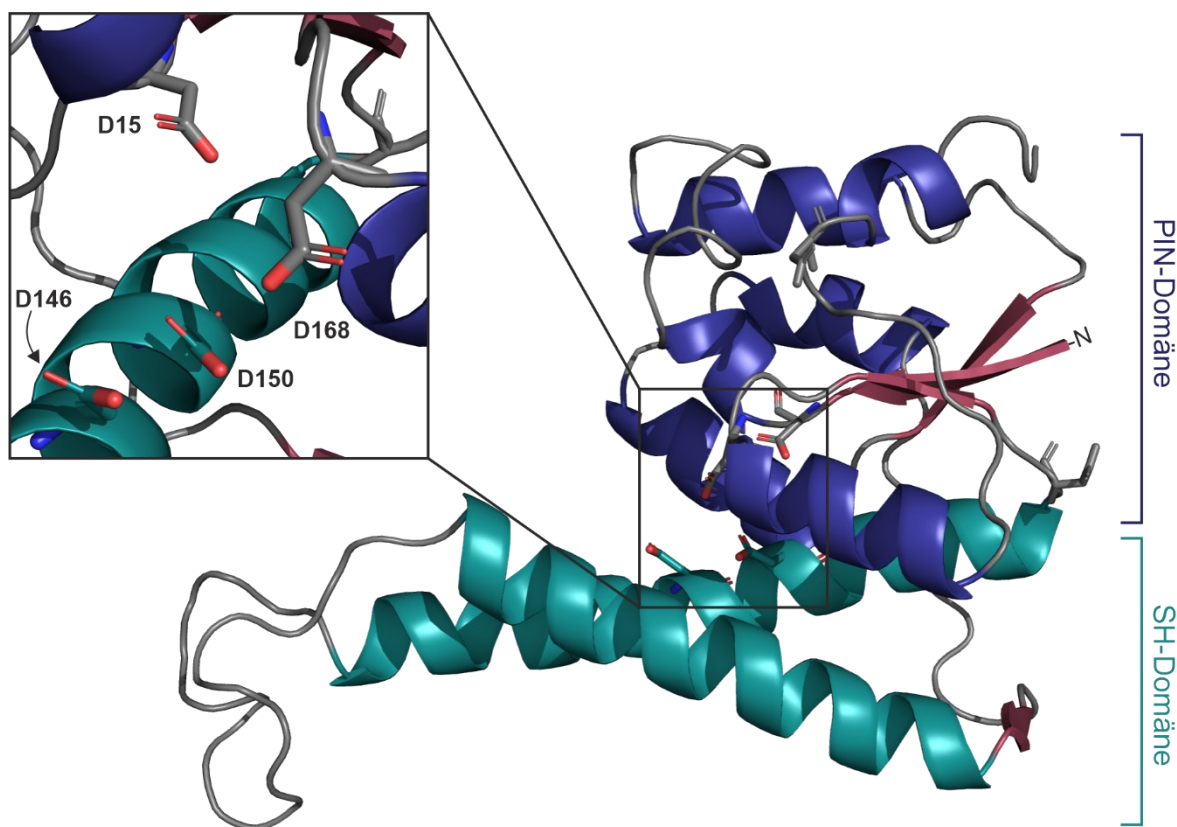


**Abb. 88: Einfluss des His<sub>6</sub>-Tags auf die Aktivität**

RNase P-Aktivität des *T. indicus* HARPs ohne *Tag* (ohne *Tag*, blau), des *T. indicus* HARPs mit C-terminalem His<sub>6</sub>-*Tag* (cHis, rot) und des *T. indicus* HARPs mit N-terminalem His<sub>6</sub>-*Tag* (nHis, grün). Die Experimente wurden mit 50 nM Enzym und Spuren von 5'-[<sup>32</sup>P]-markierter prä-tRNA<sup>Gly</sup> in F-Puffer durchgeführt. Die Ergebnisse beruhen auf drei biologischen Replikaten und sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt. Die Ausgleichsgeraden wurden anhand der Mittelwerte mit Hilfe folgender Gleichung ermittelt:  $A_t = A * (1 - e^{-k_{obs} * t})$ , wobei  $A$  der Anteil an prozessiertem Substrat und  $t$  die Zeit ist.

## Diskussion

Für die RNase P-Funktion des *T. indicus* HARPs scheinen den Ergebnissen der Komplementationsanalysen zufolge die Aminosäuren D15, D146, D150 und D168 von essentieller Bedeutung zu sein, sodass davon auszugehen ist, dass diese das aktive Zentrum des Proteins bilden. Über diese Aspartat-Seitenketten könnten demnach die für die Katalyse wichtigen Metallionen koordiniert werden und die Katalyse so nach einem Mechanismus ähnlich zu dem des PRORP-Enzyms verlaufen (Howard *et al.*, 2015; Walczyk, Gößringer, *et al.*, 2016). Anhand des erstellten Homologiemodells basierend auf der Struktur des *H. halophila* HARPs (Waterhouse *et al.*, 2018) wird eine mögliche Positionierung genannter Aminosäuren deutlich (Abb. 89). Zwei der Aspartate (D146 und D150) gehören vermutlich zur  $\alpha$ -Helix 6, die im *H. halophila* Protein Teil der für die Dimerisierung wichtigen SH-Domäne ist (Feyh *et al.*, 2021). Die  $\alpha$ -Helix 5 und 6 der SH-Domäne (Abb. 89, türkis eingefärbt) scheinen im *T. indicus* HARP sehr ähnlich zum *H. halophila* HARP aufgebaut zu sein und somit ist auch beim *T. indicus* HARP von einer Dimerisierung vermittelt durch die SH-Domäne auszugehen. Die Dimerisierung könnte sich somit auch positiv auf die Stabilität des aktiven Zentrums auswirken.



**Abb. 89: *T. indicus* Homologiemodell**

Das mit SWISS-MODEL basierend auf der *H. halophila* HARP-Struktur (PDB:7OG5; Feyh *et al.*, 2021) erstellte Modell für das *T. indicus* HARP (Waterhouse *et al.*, 2018). Die Schleifenregionen des einzelnen Monomers sind grau,  $\beta$ -Faltblätter rötlich,  $\alpha$ -Helices der SH-Domäne türkis und  $\alpha$ -Helices der PIN-Domäne blau eingefärbt. Im Detail (oben links) ist das vermutlich katalytische Zentrum mit den vier für die Funktion essentiellen Aspartat-Aminosäuren gezeigt. Bei den vier Aspartaten wurde für die einzelnen Atome folgender Farbcode verwendet: Stickstoff: blau, Sauerstoff: rot.

Die Einbindung der Aminosäure D15, welche sich Nahe dem *N*-Terminus des Proteins befindet, in das katalytische Zentrum könnte zudem erklären, warum das *T. indicus* HARP mit *N*-terminalem His<sub>6</sub>-Tag weniger aktiv ist als die Variante ohne Tag oder mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag. Der *N*-terminale Affinitäts-Tag könnte dahingehend Einfluss auf die Struktur am *N*-Terminus des Proteins nehmen, dass die Aminosäure D15 für die Ausbildung des aktiven Zentrums nicht mehr korrekt positioniert ist. Für zukünftige Untersuchungen mit den HARPs sollte folglich von Proteinen mit *N*-terminalem Affinitäts-Tag wenn möglich abgesehen werden. Auch für andere Proteine dieser Klasse könnte ein *N*-terminaler Affinitäts-Tag Einfluss auf die Architektur des katalytischen Zentrums nehmen, was mit einer verminderten RNase P-Aktivität einhergehen würde.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das *T. indicus* HARP wie auch das *A. aeolicus* und das *H. halophila* HARP Homooligomere bildet. Dem tRNA-Bindungsmodell für das AaRP zufolge stellt ein Tetramer die kleinste funktionale Einheit für die Bindung und Prozessierung einer prä-tRNA dar (Feyh *et al.*, 2021; Teramoto *et al.*, 2021). Da für das *T. indicus* HARP mit C-terminalem Polyhistidin-Tag eine zum Protein ohne Tag vergleichbare RNase P-Aktivität festgestellt wurde, gilt es als wahrscheinlich, dass dieses Protein zumindest als Tetramer vorliegt. Ob dieses Protein zu noch größeren Komplexen oligomerisiert, kann aufgrund der beschriebenen Präzipitationsprobleme nicht in Gänze ausgeschlossen werden. Für das *T. indicus* HARP ohne Tag wurde eine Größe von ~240 kDa mittels analytischer Gelfiltration bestimmt, welche vergleichbar zu der mittels MP (*mass photometry*) bestimmten Größe des *A. aeolicus* (277 kDa) und des *H. halophila* (296 kDa) Proteins ist (Feyh *et al.*, 2021). Gemäß den Ergebnissen der analytischen Gelfiltration bildet es jedoch kein Dodekamer, sondern eher ein Dekamer oder Undekamer aus. Allerdings konnte sowohl für das AaRP als auch das *Hydrogenobacter thermophilus* HARP gezeigt werden, dass diese genau wie das *H. halophila* HARP als Dodekamer vorliegen (Feyh *et al.*, 2021; Teramoto *et al.*, 2021). Somit scheint dies für die Klasse der HARPs charakteristisch zu sein. Die Diskrepanz könnte womöglich auf eine Ungenauigkeit bei der analytischen Gelfiltration zurückzuführen sein. Eventuell wurden Laufpuffer, Probenkonzentration oder Flussrate für eine exakte Bestimmung nicht optimal gewählt (Ó'Fágáin *et al.*, 2011). Für die Größe eines Dodekamers (~278 kDa) hätte das Elutionsvolumen anstelle von 15,00 mL vielmehr bei 14,75 mL liegen müssen. Das berechnete und das tatsächlich bestimmte Elutionsvolumen unterscheiden sich demnach lediglich um 0,25 mL voneinander. Abschließend gilt es als wahrscheinlich, dass das *T. indicus* HARP ebenfalls als Dodekamer vorliegt und nicht als Dekamer bzw. Undekamer, wie es die analytische Gelfiltration ergab.

Für die Oligomerisierung des als Dodekamer vorliegenden *H. halophila* HARPs tritt der C-terminale Bereich (die  $\alpha$ 7- $\alpha$ 8-Schleife und Helix 8) des einen Dimers mit der  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5-Schleife bzw. Helix 4 des anderen Dimers in Wechselwirkung (Abb. 90; Feyh *et al.*, 2021). Dabei

interagiert Aspartat 154 mit Arginin 72 und 75 der  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5-Schleife (Abb. 90B). Anhand des für das *T. indicus* HARP erstellten Homologie-Modells wird deutlich, dass eine vergleichbare Interaktion auch im *T. indicus* HARP möglich ist (Abb. 90B). Als zweite wichtige Interaktion für die Oligomerisierung im *H. halophila* Protein ist jene zwischen dem Arginin an Position 179 (Helix 8) und dem Aspartat an Position 59 (Helix 4) zu nennen (Feyh *et al.*, 2021). An den entsprechenden Positionen befinden sich im *T. indicus* HARP allerdings ein Glutamat und ein Prolin (Abb. 90B). Eine vergleichbare Interaktion im *T. indicus* HARP ist somit folglich kaum möglich. Zudem scheinen auch keine anderen Aminosäuren in Helix 8 und 4 so positioniert zu sein, dass Wasserstoffbrückenbindungen wie beim *H. halophila* Protein ausgebildet werden könnten. Ähnlich verhält es sich beim *A. aeolicus* Protein. Während das Aspartat an Position 154 mit dem Arginin an Position 75 interagiert, scheint keine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der C-terminalen Helix und Helix 4 vorhanden zu sein (Abb. 90B). Die Interaktionen zwischen der C-terminalen Helix und Helix 4 beruhen daher vermutlich eher auf schwachen, hydrophoben Wechselwirkungen oder der Formkomplementarität (Abb. 90B unten). Letztlich scheinen für die Oligomerisierung der HARPs weniger die Wasserstoffbrückenbindungen essentiell zu sein, sondern es eher auf die in Abb. 90 (unten) gezeigte Formkomplementarität anzukommen. Anhand von *mass photometry*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass das *H. halophila* HARP als homogenes Dodekamer vorliegt (Feyh *et al.*, 2021). Für das *A. aeolicus* Protein hingegen wurden auch Oligomere geringerer Größe detektiert (Feyh *et al.*, 2021). Diese beobachtete Polydispersität des AaRPs könnte eventuell darauf zurückzuführen sein, dass die Dodekamere aufgrund der fehlenden Wasserstoffbrückenbindung weniger stabil sind. Wie sich das *T. indicus* HARP verhält, ob es tatsächlich als homogenes Dodekamer vorliegt oder auch kleinere Oligomere bildet, müsste mittels *mass photometry* noch untersucht werden.

Die kürzlich publizierte Kryo-EM-Struktur des AaRPs weist große Übereinstimmungen mit der Struktur des *H. halophila* HARPs hinsichtlich Oligomerisierung, Dimerisierung und aktivem Zentrum auf (Teramoto *et al.*, 2021). Lediglich für die tRNA-Bindung wird anhand eines Bindungsmodells diskutiert, dass neben den Argininen an Position 125 und 129 auch die Arginine an den Positionen 94, 96, 102 und 133 sowie Lysin an Position 99 und eventuell Tyrosin an Position 95 an der Interaktion mit der Ellbogen-Region der tRNA (Teramoto *et al.*, 2021) anstelle von K119 und K127 sowie R123 (Feyh *et al.*, 2021) beteiligt sind. Im Gegensatz zu *A. aeolicus*, bei dem AaRP die einzige RNase P ist, ist bei dem Bakterium *T. indicus* neben dem HARP auch die RNA-basierte Form der RNase P vorhanden (Nickel *et al.*, 2017). Demzufolge müsste das AaRP deutlich besser an die prä-tRNA-Prozessierung angepasst sein. Anstelle der Oligomerisierung könnten dafür womöglich vielmehr entsprechende Unterschiede *in puncto* Substraterkennung als Erklärung herangezogen werden. So zeigte

das AaRP im Gegensatz zum *T. indicus* HARP eine Interaktion mit der 5'-Flanke der prä-tRNA und eine stärkere Interaktion mit der T-Schleife (Wäber, 2019).

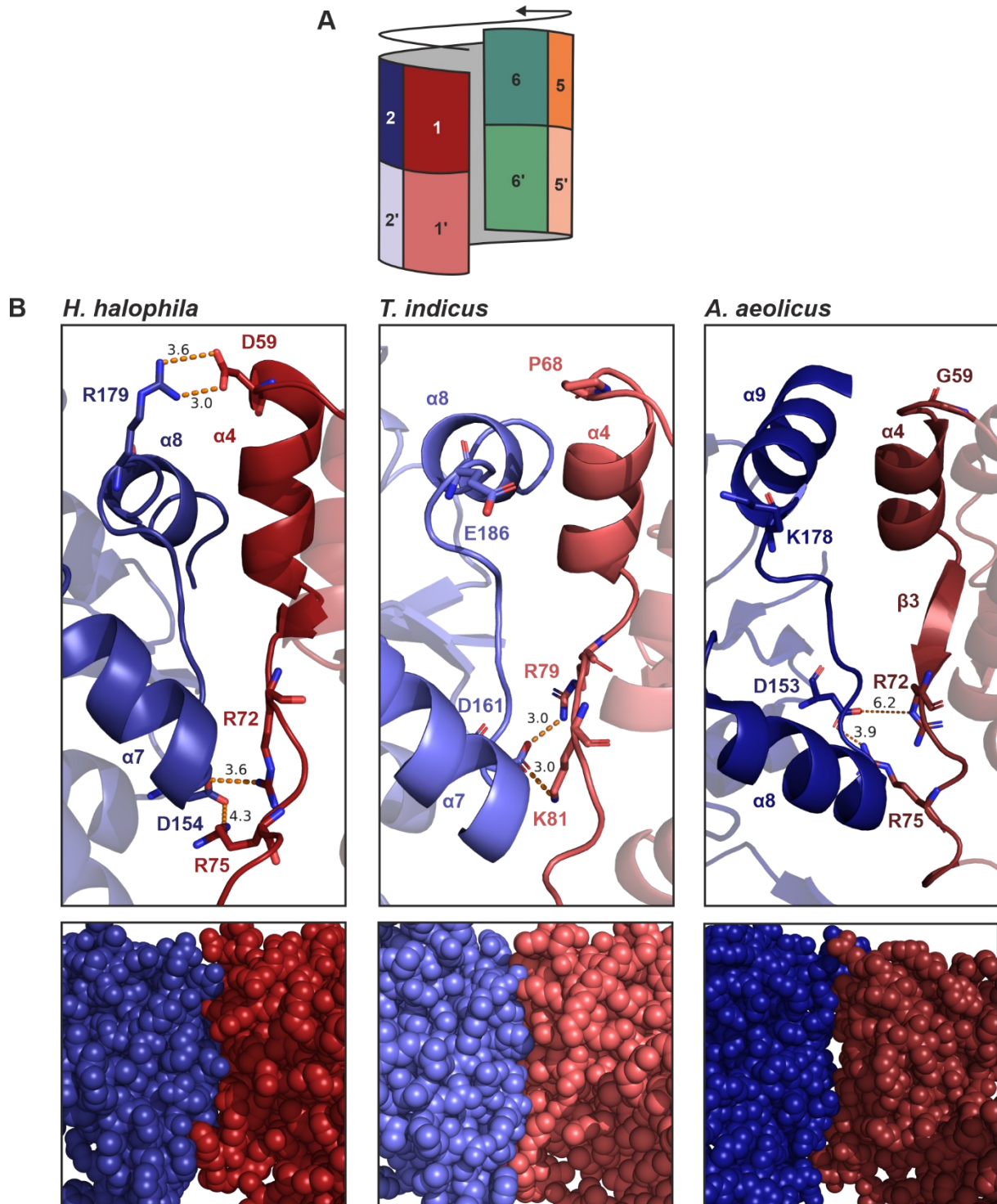


Abb. 90: Oligomerisierung der HARPs

(A) Schematische Darstellung eines Dodekamers basierend auf der *H. halophila* HARP-Struktur (Feyh *et al.*, 2021). Monomer 1 und 1' bilden dabei eine Dimer-Einheit. (B) Detaillierte Ansicht der Interaktionsflächen zwischen zwei Monomeren von interagierenden Dimeren. Monomer 1 (rot) und Monomer 2 (blau) entsprechen den beiden Einheiten mit identischen Farben wie in (A), die in weißer Schrift hervorgehoben wurden. Links ist die Interaktion des *H. halophila* HARPs gezeigt (modifiziert nach Feyh *et al.*, 2021; PDB: 7OG5). In der Mitte ist die analoge Interaktion im Homologiemodell des *T. indicus* HARPs zu sehen (Waterhouse *et al.*, 2018). Auf der rechten Seite ist jene Interaktion des *A. aeolicus* Proteins dargestellt (PDB: 7F3E, Teramoto *et al.*, 2021). Die einzelnen Atome der für die Interaktionen essentiellen Aminosäuren wurden wie folgt eingefärbt: Sauerstoff, rot; Stickstoff, blau. Die Distanzen potentieller Interaktionen sind in Ångström angegeben. Darunter sind die entsprechenden Interaktionsflächen in der raumfüllenden Darstellung gezeigt.



### 4.2.3 Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projekts wurden Untersuchungen zum *Thermodesulfatator indicus* HARP durchgeführt. Hierbei sollte durch Variationen der prä-tRNA<sup>Gly</sup> analysiert werden, welche Bereiche der prä-tRNA für die Substraterkennung relevant sind. Die Auswahl der Variationen orientierte sich dabei an den Ergebnissen der Studien zur Substraterkennung des bakteriellen Ribonukleoproteins sowie des eukaryontischen PRORP-Enzyms. Da das bakterielle RNA-basierte Enzym sowohl Interaktionen mit der 5'-Flanke als auch mit dem 3'-CCA-Ende eingeht (Kirsebom & Svärd, 1994; Kurz *et al.*, 1998; Niranjanakumari, Stams, *et al.*, 1998; Rueda *et al.*, 2005; Wegscheid & Hartmann, 2006, 2007; Koutmou *et al.*, 2010; Reiter *et al.*, 2010), sollte geklärt werden, inwieweit dies auch auf das *T. indicus* HARP zutrifft. Des Weiteren wurden sowohl für das bakterielle Ribonukleoprotein als auch für PRORP Interaktionen mit der D- und T-Schleife nachgewiesen (Loria & Pan, 1997; Loria *et al.*, 1998; Reiter *et al.*, 2010; Brillante *et al.*, 2016; Teramoto *et al.*, 2020), sodass auch diese Regionen mit Hinblick auf die Substraterkennung untersucht werden sollten.

Um zu überprüfen, ob das *T. indicus* HARP Interaktionen mit der 5'-Flanke eingeht, wurde diese ausgehend vom prä-tRNA<sup>Gly</sup>-Substrat schrittweise von 14 Nukleotiden auf 7, 4, 2 Nukleotide und schließlich 1 Nukleotid verkürzt. Bezüglich der Untersuchungen zu Interaktionen mit dem 3'-Ende wurden Substratvarianten der prä-tRNA<sup>Gly</sup> getestet, die ein matures 3'-CCA-Ende, ein deletiertes 3'-CCA-Ende oder ein 3'-CCA-Ende mit einer 40-nt Extension besaßen. Zur Bestimmung der maximalen Ratenkonstante und des  $K_{1/2}$ -Werts (entspricht der Enzymkonzentration bei halbmaximaler Ratenkonstante) wurden alle Substratvarianten enzymkinetisch unter *single-turnover* Bedingungen untersucht und mit dem prä-tRNA<sup>Gly</sup>-Referenzsubstrat verglichen. Innerhalb beider Substratklassen wurde keine signifikante Veränderung der Prozessierungseffizienz festgestellt, sodass Interaktionen zwischen dem *T. indicus* HARP und der 5'-Flanke oder dem 3'-CCA-Ende unwahrscheinlich sind.

Weiter sollte durch die Testung von Substratvarianten mit deletiertem D- oder Anticodon-Arm ermittelt werden, ob diese Strukturdomänen für die Substratbindung an HARP essentiell sind. Da sich die enzymkinetischen Parameter beider Substrate kaum von denen des Referenzsubstrats unterscheiden, sind diese Elemente bei der Substratbindung oder Katalyse nicht essentiell. Bei einem ebenfalls analysierten Minimalsubstrat waren die Substratelemente auf lediglich den koaxial gestapelten Akzeptor- / T-Stamm mit 5'-Flanke und 3-nt Extension am 3'-CCA-Ende reduziert (Substrat AaT). Durch eine zusätzliche Insertion einer 9-Nukleotid-Schleife in dem Übergang zwischen Akzeptorstamm und T-Stamm sollte bei einem weiteren Minimalsubstrat (Substrat Aa<sub>b9</sub>T) die strukturelle Flexibilität erhöht werden. Beide Minimalsubstrate wurden nahezu gleich effizient vom *T. indicus* HARP gespalten und die enzymkinetischen Parameter waren mit denen des Referenzsubstrats prä-tRNA<sup>Gly</sup>

vergleichbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass in dem Minimalsubstrat AaT offensichtlich alle für das *T. indicus* HARP essentiellen Substratdeterminanten enthalten sind. Für eine detailliertere Analyse der T-Arm-Interaktion wurden die Nukleotidbasen in der T-Schleife mutiert (Substrat Aa<sub>b9</sub>T<sub>mut</sub>). Mit diesem Substrat wurde die Frage adressiert, ob es zu Basen-spezifischen Interaktionen zwischen T-Schleife und dem HARP kommt. Die katalytische Effizienz war dabei um einen Faktor von ~4 im Vergleich zum Aa<sub>b9</sub>T-Substrat vermindert, sodass eine Interaktion mit der T-Schleife möglich scheint.

Bemerkenswert ist, dass alle oben beschriebenen Substrate - inklusive der Minimalsubstrate - an der kanonischen Spaltstelle prozessiert wurden. Für das PRORP-Enzym konnte zudem gezeigt werden, dass der Abstand zwischen der T-Schleife und dem aktiven Zentrum des Enzyms für eine korrekte Prozessierung essentiell ist (Brillante *et al.*, 2016). Anhand von Spaltstellenanalysen von Minimalsubstraten mit verlängertem oder verkürztem T-Stamm sollte überdies untersucht werden, ob eine Verlängerung bzw. Verkürzung des T-Stamms auch beim *T. indicus* HARP die Spaltstellenselektion beeinflusst. Vergleichbar zum PRORP wurde auch für das HARP ein sogenannter Längenmess-Mechanismus von der Gesamtlänge des Akzeptorstamms und der T-Domäne beobachtet, der beim *T. indicus* HARP jedoch deutlich flexibler ist. Da die HARPs scheinbar nicht in der Lage sind, Substrate in Doppelstrang-Regionen zu spalten, wurde für die Substrate mit verlängertem T-Stamm die Spaltstelle an das Ende der Akzeptorstamm-Helix verschoben. Des Weiteren wurde eine Minimalsubstrat-Variante untersucht, bei der die 7-nt lange T-Schleife durch einen *Tetra*loop ersetzt war. Dieses Substrat wurde vergleichbar zu dem Substrat gespalten, bei dem der T-Stamm um ein Basenpaar verkürzt war. Folglich sind für die Positionierung der Substrate im aktiven Zentrum Interaktionen mit Nukleotiden in der T-Schleife, die zum Längenmessmechanismus beitragen, wichtig.

Neben den Untersuchungen zur Substraterkennung und Spaltstellenselektion sollte die Oligomerisierung des *T. indicus* HARPs untersucht werden. Für das AaRP und das *H. halophila* HARP konnte bereits gezeigt werden, dass diese ein Dodekamer ausbilden (Feyh *et al.*, 2021; Teramoto *et al.*, 2021). Das *T. indicus* HARP scheint ebenfalls Oligomere zu bilden. Allerdings wurde mittels analytischer Gelfiltration die Größe eines Dekamers oder Undekamers ermittelt und nicht die eines Dodekamers. Nichtsdestotrotz gilt die Bildung eines Dodekamers als sehr wahrscheinlich, da dies für die Proteinklasse der HARPs charakteristisch zu sein scheint (Feyh *et al.*, 2021; Teramoto *et al.*, 2021).

Außerdem wurde der Einfluss des Polyhistidin-Tags auf die Oligomerisierung sowie die RNase P-Aktivität untersucht. Das *T. indicus* HARP mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag zeigte eine vergleichbare RNase P-Aktivität zum Protein ohne Affinitäts-Tag. Zum Oligomerisierungsgrad dieser Proteinvariante sind keine eindeutigen Aussagen möglich, da aufgrund von Präzipitationsproblemen lediglich eine sehr geringe Menge an Protein analysiert werden



konnte. Der *N*-terminale His<sub>6</sub>-Tag hatte kaum Einfluss auf den Oligomerisierungszustand des Proteins, da diese Variante gemäß analytischer Gelfiltration eine ähnliche Größe wie das Protein ohne Tag besitzt. Indessen wurde die RNase P-Aktivität durch den *N*-terminalen His<sub>6</sub>-Tag deutlich vermindert. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass das Aspartat an Position 15 der Aminosäuresequenz nahe des *N*-Terminus des Proteins Teil des katalytischen Zentrums ist. So konnte anhand von Komplementationsexperimenten gezeigt werden, dass die Aspartat-Aminosäuren an den Positionen 15, 146, 150 und 168 des *T. indicus* HARPs für die Aktivität essentiell sind und diese vermutlich die Metallionen des katalytischen Zentrums koordinieren.

#### 4.2.4 Ausblick

Für eine weitergehende Charakterisierung des *T. indicus* HARPs bzw. der HARPs im Allgemeinen könnte hinsichtlich der Substratinteraktionen in Nachfolgestudien eine Kombination von Proteinmutanten und Substratvarianten untersucht werden. Basierend auf den in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnissen zur Substraterkennung und der AaRP-tRNA-Bindungsmodelle (Feyh *et al.*, 2021; Teramoto *et al.*, 2021) könnten zielgerichtet Experimente konzipiert werden, um zu bestimmen, welche Proteinregionen oder gar welche einzelnen Aminosäuren mit welchen Nukleotiden der prä-tRNA interagieren. Die Voraussetzung dafür wäre allerdings ein etablierter Bindungsassay wie beispielsweise ein EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) oder ein Assay, der auf Fluoreszenzpolarisation beruht (Howard *et al.*, 2012, 2015; Mao *et al.*, 2016; Klemm *et al.*, 2017).

Diese biochemischen Analysen würden grundsätzlich zum Verständnis der Substratinteraktionen beitragen, welche bisher noch nicht in Gänze geklärt sind, und könnten eventuelle Unterschiede zwischen dem AaRP und *T. indicus* HARP weiter herausstellen. Während bereits einzelne Aminosäuren, die vermutlich mit der T-Schleife interagieren, identifiziert werden konnten (Feyh *et al.*, 2021; Teramoto *et al.*, 2021), ist bisher jedoch noch völlig unklar, welche Aminosäuren mit der 5'-Flanke im AaRP in Wechselwirkung treten. Da diese Interaktionen anhand der vorliegenden Ergebnisse AaRP-spezifisch sind, könnte dies ein Grund für die gegenüber anderen HARPs höhere RNase P-Aktivität des AaRPs sein. Um diesen Sachverhalt letztlich zu klären, könnten entsprechende Aminosäuren der 5'-Flanken-Interaktion des AaRPs in verschiedene HARP-Sequenzen eingefügt werden, was mit einer erhöhten RNase P-Aktivität der HARPs einhergehen sollte.

Optimalerweise könnten diese biochemischen Analysen durch eine Struktur eines HARPs mit gebundener (prä-)tRNA komplettiert werden, um so wie für das bakterielle Ribonukleoprotein (Reiter *et al.*, 2010) oder PRORP (Teramoto *et al.*, 2020) ein genaues Bild der Enzym-Substrat-Interaktionen zu erhalten. Da sich die Auswahl des HARPs sowie des Substrats für das Lösen einer Kristall- oder Kryo-EM-Struktur jedoch durchaus schwierig gestalten kann,

könnten alternativ die Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS) oder Massenspektrometrie in Kombination mit N-Hydroxysuccinimido-Biotin Modifikationen - ähnlich zu den Studien mit dem PRORP-Enzym (Chen *et al.*, 2016) - weitere Erkenntnisse liefern. Beide Methoden haben gemeinsam, dass durch die Substratbindung entsprechende in die Substratinteraktionen involvierte Aminosäuren vor Modifikationen wie dem Deuterium-Austausch bzw. der Biotinylierung geschützt werden und so Rückschlüsse auf Protein-RNA-Interaktionen gezogen werden können (Kvaratskhelia & Grice, 2008; Masson *et al.*, 2019).

Die für die Katalyse essentiellen Metallionen scheinen über vier Aspartat-Aminosäuren koordiniert zu werden. Zur Untersuchung des genauen Katalysemechanismus könnten weiterhin nun Nukleotidmodifikationen an der Spaltstelle analog zu den Studien mit den Ribonukleoproteinen und PRORP eingefügt werden (Warnecke *et al.*, 1996, 1999; Pfeiffer *et al.*, 2000; Persson *et al.*, 2003; Cuzic-Feltens *et al.*, 2009; Pavlova *et al.*, 2012; Walczyk, Gößringer, *et al.*, 2016). Beispielsweise könnten hier  $R_p$ - oder  $S_p$ -Phosphorothioat-Modifikationen Aufschluss darüber geben, über welches Sauerstoffatom die Metallionenkoordination für die Stabilisierung des zwischenzeitlich gebildeten Übergangszustands erfolgt. Ebenso könnte anhand von 2'-Desoxy-, 2'-Fluor-, 2'-Amino- und 2'-O-Methyl-Substitutionen an Position -1 der prä-tRNA geklärt werden, inwiefern die 2'-OH-Gruppe durch etwaige Interaktionen an der Katalyse beteiligt ist.

Weiterhin wurde die Frage des Substratspektrums *bis dato* noch nicht adressiert. Das bakterielle Ribonukleoprotein prozessiert beispielsweise auch Vorläufer der 4.5S RNA und der tmRNA, die einen koaxial gestapelten Akzeptor- und T-Stamm von tRNAs nachahmen (Bothwell *et al.*, 1976; Peck-Miller & Altman, 1991; Komine *et al.*, 1994). Ob diese Substrate auch von den HARPs prozessiert werden, könnte sowohl *in vitro* enzymkinetisch als auch *in vivo* über RNA-Sequenzierung mit anschließenden Northern Blot-Analysen eines HARP-komplementierten *E. coli* BW-Stamms erfolgen (Gößringer *et al.*, 2017). Des Weiteren könnte eine *in vitro*-Testung von doppelsträngigen bzw. einzelsträngigen DNA- und RNA-Modell-Substraten hinsichtlich Bindung und Prozessierung durchgeführt werden, um das Verständnis der Substraterkennung und essentieller Substrateigenschaften zu vertiefen. Von besonderem Interesse könnte dabei sein, inwiefern sich die Substratspektren von der bakteriellen RNA-basierten RNase P und HARP überschneiden. Etwaige Unterschiede könnten erklären, warum im Bakterium *T. indicus* sowohl das Ribonukleoprotein als auch das HARP vorhanden sind. Da für die Archaeen *Haloferax volcanii* und *Methanosarcina mazei* relativ unproblematisch Stämme mit HARP-Gen-Deletionen erstellt werden konnten, ist davon auszugehen, dass die Prozessierung von prä-tRNAs vermutlich nicht die Hauptfunktion dieser HARPs darstellt (Schwarz *et al.*, 2019). Für das rekombinante *T. indicus* HARP konnte hingegen gezeigt werden, dass es eine relativ hohe RNase P-Aktivität aufweist und das RNA-basierte Enzym nur eine vergleichsweise niedrige *in vitro*-Aktivität besitzt (Nickel *et al.*, 2017). Folglich könnte

es sich bei dem Bakterium *T. indicus* eventuell um einen evolutionären Übergangszustand von RNA-basiertem zu Protein-basiertem Enzym handeln und dieses damit innerhalb der HARPs von besonderer Bedeutung sein.

## 5 ANHANG

### 5.1 Referenzverzeichnis

Abdelkader, K., Gerstmans, H., Saafan, A., Dishisha, T. & Briers, Y. (2019) The Preclinical and Clinical Progress of Bacteriophages and Their Lytic Enzymes: The Parts are Easier than the Whole, *Viruses*, 11(2), p. 96.

Agoni, C., Olotu, F. A., Ramharack, P. & Soliman, M. E. (2020) Druggability and drug-likeness concepts in drug design: are biomodelling and predictive tools having their say?, *J. Mol. Model.*, 26(6), p. 120.

Aldrich, C., Bertozzi, C., Georg, G. I., Kiessling, L., Lindsley, C., Liotta, D., Merz, K. M., Schepartz, A. & Wang, S. (2017) The Ecstasy and Agony of Assay Interference Compounds, *J. Med. Chem.*, 60(6), pp. 2165–2168.

Altman, S., Wesolowski, D., Guerrier-Takada, C. & Li, Y. (2005) RNase P cleaves transient structures in some riboswitches, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(32), pp. 11284–11289.

Andrews, A. J., Hall, T. A. & Brown, J. W. (2001) Characterization of RNase P holoenzymes from *Methanococcus jannaschii* and *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Biol. Chem.*, 382(8), pp. 1171–1177.

Aravind, L., Tatusov, R. L., Wolf, Y. I., Walker, D. R. & Koonin, E. V (1998) Evidence for massive gene exchange between archaeal and bacterial hyperthermophiles, *Trends Genet.*, 14(11), pp. 442–444.

Baell, J. B. (2010) Observations on screening-based research and some concerning trends in the literature, *Future Med. Chem.*, 2(10), pp. 1529–1546.

Baell, J. B. & Holloway, G. A. (2010) New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays, *J. Med. Chem.*, 53(7), pp. 2719–2740.

Baell, J. B. & Nissink, J. W. M. (2018) Seven Year Itch: Pan-Assay Interference Compounds (PAINS) in 2017 - Utility and Limitations, *ACS Chem. Biol.*, 13(1), pp. 36–44.

Basarab, G. S. *et al.* (2015) Responding to the challenge of untreatable gonorrhea: ETX0914, a first-in-class agent with a distinct mechanism-of-action against bacterial Type II topoisomerases, *Sci. Rep.*, 5(1), pp. 7936–1080.

Biswas, R., Ledman, D. W., Fox, R. O., Altman, S. & Gopalan, V. (2000) Mapping RNA-protein interactions in ribonuclease P from *Escherichia coli* using disulfide-linked EDTA-Fe, *J. Mol. Biol.*, 296(1), pp. 19–31.

Blanchard, C., Brooks, L., Beckley, A., Colquhoun, J., Dewhurst, S. & Dunman, P. M. (2016) Neomycin sulfate improves the antimicrobial activity of mupirocin-based antibacterial ointments, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60(2), pp. 862–872.

Bodoor, K., Boyapati, V., Gopu, V., Boisdore, M., Allam, K., Miller, J., Treleaven, W. D., Weldeghiorghis, T. & Aboul-ela, F. (2009) Design and implementation of an ribonucleic acid (RNA) directed fragment library, *J. Med. Chem.*, 52(12), pp. 3753–3761.

Bothwell, A. L. M., Garber, R. L. & Altman, S. (1976) Nucleotide sequence and in vitro processing of a precursor molecule to *Escherichia coli* 4.5 S RNA, *J. Biol. Chem.*, 251(23), pp. 7709–7716.

Brillante, N., Gößringer, M., Lindenhofer, D., Toth, U., Rossmann, W. & Hartmann, R. K. (2016) Substrate recognition and cleavage-site selection by a single-subunit protein-only RNase P, *Nucleic Acids Res.*, 44(5), pp. 2323–2336.

- Brives, C. & Pourraz, J. (2020) Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures, *Palgrave Commun.*, 6(1), pp. 1–11.
- Brown, P. *et al.* (2019) Design of Next Generation Polymyxins with Lower Toxicity: The Discovery of SPR206, *ACS Infect. Dis.*, 5(10), pp. 1645–1656.
- Busch, S., Kirsebom, L. A., Notbohm, H. & Hartmann, R. K. (2000) Differential role of the intermolecular base-pairs G292-C75 and G293-C74 in the reaction catalyzed by Escherichia coli RNase P RNA, *J. Mol. Biol.*, 299(4), pp. 941–951.
- Carrara, G., Calandra, P., Fruscoloni, P. & Tocchini-Valentini, G. P. (1995) Two helices plus a linker: A small model substrate for eukaryotic RNase P, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92(7), pp. 2627–2631.
- Cassano, A. G., Anderson, V. E. & Harris, M. E. (2004) Analysis of solvent nucleophile isotope effects: Evidence for concerted mechanisms and nucleophilic activation by metal coordination in nonenzymatic and ribozyme-catalyzed phosphodiester hydrolysis, *Biochemistry*, 43(32), pp. 10547–10559.
- Chen, J. L. & Pace, N. R. (1997) Identification of the universally conserved core of ribonuclease P RNA., *RNA*, 3(6), pp. 557–560.
- Chen, T. H., Tanimoto, A., Shkriabai, N., Kvaratskhelia, M., Wysocki, V. & Gopalan, V. (2016) Use of chemical modification and mass spectrometry to identify substrate-contacting sites in proteinaceous RNase P, a tRNA processing enzyme, *Nucleic Acids Res.*, 44(11), pp. 5344–5355.
- Chen, Y., Li, X. & Gegenheimer, P. (1997) Ribonuclease P Catalysis Requires Mg<sup>2+</sup> Coordinated to the pro-RP Oxygen of the Scissile Bond, *Biochemistry*, 36(9), pp. 2425–2438.
- Childs, J. L., Poole, A. W. & Turner, D. H. (2003) Inhibition of Escherichia coli RNase P by oligonucleotide directed misfolding of RNA, *RNA*, 9(12), pp. 1437–1445.
- Chojnacki, M., Cao, X., Flaherty, D. P., Dunman, P. M. & Jischke, M. (2021) Optimization of 2-Acylaminocycloalkylthiophene Derivatives for Activity against Staphylococcus aureus RnpA, *Antibiotics*, 10(4), p. 369.
- Christian, E. L., Kaye, N. M. & Harris, M. E. (2000) Helix P4 is a divalent metal ion binding site in the conserved core of the ribonuclease P ribozyme, *RNA*, 6(4), pp. 511–519.
- Coan, K. E. D., Maltby, D. A., Burlingame, A. L. & Shoichet, B. K. (2009) Promiscuous aggregate-based inhibitors promote enzyme unfolding, *J. Med. Chem.*, 52(7), pp. 2067–2075.
- Coan, K. E. D. & Shoichet, B. K. (2008) Stoichiometry and physical chemistry of promiscuous aggregate-based inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.*, 130(29), pp. 9606–9612.
- Coleman, J. E. (1992) Structure and mechanism of alkaline phosphatase, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 21, pp. 441–483.
- Colquhoun, J. M., Ha, L., Beckley, A., Meyers, B., Flaherty, D. P. & Dunman, P. M. (2019) Identification of small molecule inhibitors of Staphylococcus aureus RnpA, *Antibiotics*, 8(2), p. 48.
- Crary, S. M., Kurz, J. C. & Fierke, C. A. (2002) Specific phosphorothioate substitutions probe the active site of Bacillus subtilis ribonuclease P, *RNA*, 8(7), pp. 933–947.
- Crary, S. M., Niranjanakumari, S. & Fierke, C. A. (1998) The protein component of Bacillus subtilis ribonuclease P increases catalytic efficiency by enhancing interactions with the 5' leader sequence of pre-tRNA(Asp), *Biochemistry*, 37(26), pp. 9409–9416.
- da Cunha, B. R., Fonseca, L. P. & Calado, C. R. C. (2019) Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go?, *Antibiotics*, 8(2), p. 45.

- Cuzic-Feltens, S., Weber, M. H. W. & Hartmann, R. K. (2009) Investigation of catalysis by bacterial RNase P via LNA and other modifications at the scissile phosphodiester, *Nucleic Acids Res.*, 37(22), pp. 7638–7653.
- Daniels, C. J., Lai, L. B., Chen, T. H. & Gopalan, V. (2019) Both kinds of RNase P in all domains of life: Surprises Galore, *RNA*, 25(3), pp. 286–291.
- Darr, S. C., Zito, K., Smith, D. & Pace, N. R. (1992) Contributions of Phylogenetically Variable Structural Elements to the Function of the Ribozyme Ribonuclease, *Biochemistry*, 31(2), pp. 328–333.
- Draper, D. E., Grilley, D. & Soto, A. M. (2005) Ions and RNA Folding, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 34, pp. 221–243.
- Dunman, P. M., Olson, P. D. & Childers, W. (2015) Small molecule RNase inhibitors and methods of use. United States Patent, US 9,089,545 B2.
- Dunman, P. M., Olson, P. D. & Childers, W. (2016) Small molecule RNase Inhibitors and Methods of use. US: United States Patent, US 9,157,230 B2.
- Dunman, P. M., Olson, P. D. & Childers, W. (2017) Use Of The Rnase Inhibitor Rnpa-3000 For Treating Staphylococcus Infections. US: European Patent EP 3243513A1.
- Eder, P. S., Kekuda, R., Stolc, V. & Altman, S. (1997) Characterization of two scleroderma autoimmune antigens that copurify with human ribonuclease P, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94(4), pp. 1101–1106.
- Egner, U. & Hillig, R. C. (2008) Expert Opinion on Drug Discovery A structural biology view of target drugability A structural biology view of target drugability, *Expert Opin. Drug Discov*, 3(4), pp. 391–401.
- Ehlert, F. G. R. (2016) Design, Synthese und Evaluation von Inhibitoren der bakteriellen RNase P und der Dengue-Virus-Protease, *Dissertation Philipps-Universität Marburg*.
- Ehlert, F. G. R., Linde, K. & Diederich, W. E. (2017) What Are We Missing? The Detergent Triton X-100 Added to Avoid Compound Aggregation Can Affect Assay Results in an Unpredictable Manner, *ChemMedChem*, 12(17), pp. 1419–1423.
- Eidem, T. M., Lounsbury, N., Emery, J. F., Bulger, J., Smith, A., Abou-Gharbia, M., Childers, W. & Dunman, P. M. (2015) Small-molecule inhibitors of Staphylococcus aureus RnpA-mediated RNA turnover and tRNA processing, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 59(4), pp. 2016–2028.
- Esakova, O., Perederina, A., Quan, C., Schmitt, M. E. & Kiasilnikov, A. S. (2008) Footprinting analysis demonstrates extensive similarity between eukaryotic RNase P and RNase MRP holoenzymes, *RNA*, 14(8), pp. 1558–1567.
- Eubank, T. D., Biswas, R., Jovanovic, M., Litovchick, A., Lapidot, A. & Gopalan, V. (2002) Inhibition of bacterial RNase P by aminoglycoside-arginine conjugates, *FEBS Lett.*, 511(1–3), pp. 107–112.
- Falagas, M. E., Skolidis, T., Vardakas, K. Z., Voulgaris, G. L., Papanikolaou, G. & Legakis, N. (2018) Activity of TP-6076 against carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates collected from inpatients in Greek hospitals, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 52(2), pp. 269–271.
- Feng, B. Y., Shelat, A., Doman, T. N., Guy, R. K. & Shoichet, B. K. (2005) High-throughput assays for promiscuous inhibitors, *Nat. Chem. Biol.*, 1(3), pp. 146–148.
- Feng, B. Y. & Shoichet, B. K. (2006) A detergent-based assay for the detection of promiscuous inhibitors, *Nat. Protoc.*, 1(2), pp. 550–553.

- Ferrie, J. E. (2014) Arsenic, antibiotics and interventions, *Int. J. Epidemiol.*, 43(4), pp. 977–982.
- Feyh, R., Waeber, N. B., Prinz, S., Giammarinaro, P. I., Bange, G., Hochberg, G., Hartmann, R. K. & Altegoer, F. (2021) Structure and mechanistic features of the prokaryotic minimal RNase P, *Elife*, 10.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M. & Hultgren, S. J. (2015) Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options, *Nat. Rev. Microbiol.*, 13(5), p. 269.
- Frank, D. N., Adamidi, C., Ehringer, M. A., Pitulle, C. & Pace, N. R. (2000) Phylogenetic-comparative analysis of the eukaryal ribonuclease P RNA, *RNA*, 6(12), pp. 1895–1904.
- French, S., Farha, M., Ellis, M. J., Sameer, Z., Côté, J. P., Cotroneo, N., Lister, T., Rubio, A. & Brown, E. D. (2020) Potentiation of Antibiotics against Gram-Negative Bacteria by Polymyxin B Analogue SPR741 from Unique Perturbation of the Outer Membrane, *ACS Infect. Dis.*, 6(6), pp. 1405–1412.
- Gagliardi, M. & Ashizawa, A. T. (2021) The challenges and strategies of antisense oligonucleotide drug delivery, *Biomedicines*, 9(4).
- Gami, A. A., Shukor, M. Y., Khalil, K. A., Dahalan, F. A., Khalid, A. & Ahmad, S. A. (2014) Phenol and its toxicity, *J. Environ. Microbiol. Toxicol.*, 2(1), pp. 11–24.
- Gao, H., Sun, X. & Rao, Y. (2020) PROTAC Technology: Opportunities and Challenges, *ACS Med. Chem. Lett.*, 11(3), pp. 237–240.
- Garner, A. L. (2019) RNA-targeted drug discovery: Moving beyond promiscuous small-molecule scaffolds, *Future Med. Chem.*, 11(19), pp. 2487–2490.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in *Proteomics Protoc. Handb.* Humana Press, pp. 571–607.
- Gaulton, A. *et al.* (2012) ChEMBL: A large-scale bioactivity database for drug discovery, *Nucleic Acids Res.*, 40(D1), pp. D1100–D1107.
- Ghidini, A., Cléry, A., Halloy, F., Allain, F. H. T. & Hall, J. (2021) RNA-PROTACs: Degraders of RNA-Binding Proteins, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 60(6), pp. 3163–3169.
- Giannetti, A. M., Koch, B. D. & Browner, M. F. (2008) Surface plasmon resonance based assay for the detection and characterization of promiscuous inhibitors, *J. Med. Chem.*, 51(3), pp. 574–580.
- Giegé, P. (2013) Pentatricopeptide repeat proteins: A set of modular RNA specific binders massively used for organelle gene expression, *RNA Biol.*, 10(9), pp. 1417–1418.
- Giegé, R., Jühling, F., Pütz, J., Stadler, P., Sauter, C. & Florentz, C. (2012) Structure of transfer RNAs: similarity and variability, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, 3(1), pp. 37–61.
- Gobert, A., Gutmann, B., Taschner, A., Gößringer, M., Holzmann, J., Hartmann, R. K., Rossmann, W. & Giegé, P. (2010) A single Arabidopsis organellar protein has RNase P activity, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17(6), pp. 740–744.
- Gobert, A., Pinker, F., Fuchsbaauer, O., Gutmann, B., Boutin, R., Roblin, P., Sauter, C. & Giegé, P. (2013) Structural insights into protein-only RNase P complexed with tRNA, *Nat. Commun.*, 4, pp. 1–8.
- Gobert, A., Bruggeman, M. & Giegé, P. (2019) Involvement of PIN-like domain nucleases in tRNA processing and translation regulation, *IUBMB Life*, 71(8), pp. 1117–1125.

- Gößringer, M., Lechner, M., Brillante, N., Weber, C., Rossmann, W. & Hartmann, R. K. (2017) Protein-only RNase P function in *Escherichia coli*: Viability, processing defects and differences between PRORP isoenzymes, *Nucleic Acids Res.*, 45(12), pp. 7441–7454.
- Gößringer, M., Far, R. K. K. & Hartmann, R. K. (2006) Analysis of RNase P protein (rnpA) expression in *Bacillus subtilis* utilizing strains with suppressible rnpA expression, *J. Bacteriol.*, 188(19), pp. 6816–6823.
- Gößringer, M. & Hartmann, R. K. (2007) Function of heterologous and truncated RNase P proteins in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.*, 66(3), pp. 801–813.
- Gößringer, M., Schencking, I. & Hartmann, R. K. (2021) RNase P ribozymes, in Müller, S., Masquida, B., and Winkler, W. (eds) *Ribozymes*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 227–279.
- Grossman, T. H. *et al.* (2017) Fluorocycline TP-271 Is Potent against Complicated Community-Acquired Bacterial Pneumonia Pathogens, *mSphere*, 2(1), pp. e00004-17.
- Gruegelsiepe, H., Willkomm, D. K., Goudinakis, O. & Hartmann, R. K. (2003) Antisense inhibition of *Escherichia coli* RNase P RNA: Mechanistic aspects, *ChemBioChem*, 4(10), pp. 1049–1056.
- Gruegelsiepe, H., Brandt, O. & Hartmann, R. K. (2006) Antisense inhibition of RNase P: Mechanistic aspects and application to live bacteria, *J. Biol. Chem.*, 281(41), pp. 30613–30620.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. & Altman, S. (1983) The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme, *Cell*, 35(3), pp. 849–857.
- Guerrier-Takada, C., Haydock, K., Allen, L. & Altman, S. (1986) Metal Ion Requirements and Other Aspects of the Reaction Catalyzed by M1 RNA, the RNA Subunit of Ribonuclease P from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, 25(7), pp. 1509–1515.
- Guo, X., Campbell, F. E., Sun, L., Christian, E. L., Anderson, V. E. & Harris, M. E. (2006) RNA-dependent Folding and Stabilization of C5 Protein During Assembly of the *E. coli* RNase P Holoenzyme, *J. Mol. Biol.*, 360(1), pp. 190–203.
- Guthrie, J. P. (1978) Hydrolysis of esters of oxy acids: pKa values for strong acids; Brønsted relationship for attack of water at methyl; free energies of hydrolysis of esters of oxy acids; and a linear relationship between free energy of hydrolysis and pKa holding over a range, *Can. J. Chem.*, 56(17), pp. 2342–2354.
- Gutmann, B., Gobert, A. & Giegé, P. (2012) PRORP proteins support RNase P activity in both organelles and the nucleus in *Arabidopsis*, *Genes Dev.*, 26(10), pp. 1022–1027.
- Haas, E. S., Brown, J. W., Pitulle, C. & Pace, N. R. (1994) Further perspective on the catalytic core and secondary structure of ribonuclease P RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91(7), pp. 2527–2531.
- Haas, E. S. & Brown, J. W. (1998) Evolutionary variation in bacterial RNase P RNAs, *Nucleic Acids Res.*, 26(18), pp. 4093–4099.
- Hall, T. A. & Brown, J. W. (2002) Archaeal RNase P has multiple protein subunits homologous to eukaryotic nuclear RNase P proteins, *RNA*, 8(3), pp. 296–306.
- Han, H., Mildvan, A. S. & Rifkind, J. M. (1991) Role of Divalent Cations in the 3',5'-Exonuclease Reaction of DNA Polymerase I, *Biochemistry*, 30(46), pp. 11104–11108.
- Hansch, C., McKarns, S. C., Smith, C. J. & Doolittle, D. J. (2000) Comparative QSAR evidence for a free-radical mechanism of phenol-induced toxicity, *Chem. Biol. Interact.*, 127(1), pp. 61–72.



- Hansen, A., Pfeiffer, T., Zuleeg, T., Limmer, S., Ciesiolka, J., Feltens, R. & Hartmann, R. K. (2001) Exploring the minimal substrate requirements for trans-cleavage by RNase P holoenzymes from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.*, 41(1), pp. 131–143.
- Hardt, W. D., Schlegl, J., Erdmann, V. A. & Hartmann, R. K. (1993) Role of the D Arm and the Anticodon Arm in tRNA Recognition by Eubacterial and Eukaryotic RNase P Enzymes, *Biochemistry*, 32(48), pp. 13046–13053.
- Hardt, W. D., Warnecke, J. M., Erdmann, V. A. & Hartmann, R. K. (1995) Rp-phosphorothioate modifications in RNase P RNA that interfere with tRNA binding., *EMBO J.*, 14(12), pp. 2935–2944.
- Harris, J. K., Haas, E. S., Williams, D., Frank, D. N. & Brown, J. W. (2001) New insight into RNase P RNA structure from comparative analysis of the archaeal RNA, *RNA*, 7(2), pp. 220–232.
- Harris, M. E. & Pace, N. R. (1995) Identification of phosphates involved in catalysis by the ribozyme RNase P RNA, *RNA*, 1(2), pp. 210–218.
- Hartmann, E. & Hartmann, R. K. (2003) The enigma of ribonuclease P evolution, *Trends Genet.*, 19(10), pp. 561–569.
- Hartmann, R. K., Heinrich, J., Schlegl, J. & Schuster, H. (1995) Precursor of C4 antisense RNA of bacteriophages P1 and P7 is a substrate for RNase P of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92(13), pp. 5822–5826.
- Hartmann, R. K., Gößringer, M., Späth, B., Fischer, S. & Marchfelder, A. (2009) The Making of tRNAs and More - RNase P and tRNase Z, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 85, pp. 319–368.
- He, X.-Y., Merz, G., Mehta, P., Schulz, H. & Yang, S.-Y. (1999) Human Brain Short Chain L-3-Hydroxyacyl Coenzyme A Dehydrogenase Is a Single-domain Multifunctional Enzyme, *J. Biol. Chem.*, 274(21), pp. 15014–15019.
- Henkels, C. H., Kurz, J. C., Fierke, C. A. & Oas, T. G. (2001) Linked folding and anion binding of the *Bacillus subtilis* ribonuclease P protein, *Biochemistry*, 40(9), pp. 2777–2789.
- Hernandez-Cid, A., Aguirre-Sampieri, S., Diaz-Vilchis, A. & Torres-Larios, A. (2012) Ribonucleases P/MRP and the Expanding Ribonucleoprotein World, *IUBMB Life*, 64(6), pp. 521–528.
- Holbrook, S. R., Sussman, J. L., Warrant, R. W. & Kim, S. H. (1978) Crystal structure of yeast phenylalanine transfer RNA: II. Structural features and functional implications, *J. Mol. Biol.*, 123(4), pp. 631–660.
- Holzmann, J., Frank, P., Löffler, E., Bennett, K. L., Gerner, C. & Rossmann, W. (2008) RNase P without RNA: Identification and Functional Reconstitution of the Human Mitochondrial tRNA Processing Enzyme, *Cell*, 135(3), pp. 462–474.
- Hopper, A. K. (2013) Transfer RNA post-transcriptional processing, turnover, and subcellular dynamics in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 194(1), pp. 43–67.
- Howard, M. J., Lim, W. H., Fierke, C. A. & Koutmos, M. (2012) Mitochondrial ribonuclease P structure provides insight into the evolution of catalytic strategies for precursor-tRNA 5' processing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(40), pp. 16149–16154.
- Howard, M. J., Klemm, B. P. & Fierke, C. A. (2015) Mechanistic studies reveal similar catalytic strategies for phosphodiester bond hydrolysis by protein-only and RNA-dependent ribonuclease P, *J. Biol. Chem.*, 290(21), pp. 13454–13464.
- Hussein, H. A., Borrel, A., Geneix, C., Petitjean, M., Regad, L. & Camproux, A. C. (2015) PockDrug-Server: A new web server for predicting pocket druggability on holo and apo proteins, *Nucleic Acids Res.*, 43(W1), pp. W436–W442.

- Hutchings, M., Truman, A. & Wilkinson, B. (2019) Antibiotics: past, present and future, *Curr. Opin. Microbiol.*, 51, pp. 72–80.
- Ingólfsson, H. I. *et al.* (2014) Phytochemicals perturb membranes and promiscuously alter protein function, *ACS Chem. Biol.*, 9(8), pp. 1788–1798.
- Irwin, J. J., Duan, D., Torosyan, H., Doak, A. K., Ziebart, K. T., Sterling, T., Tumanian, G. & Shoichet, B. K. (2015) An Aggregation Advisor for Ligand Discovery, *J. Med. Chem.*, 58(17), pp. 7076–7087.
- Ito, A., Nishikawa, T., Matsumoto, S., Yoshizawa, H., Sato, T., Nakamura, R., Tsuji, M. & Yamano, Y. (2016) Siderophore cephalosporin cefiderocol utilizes ferric iron transporter systems for antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60(12), pp. 7396–7401.
- Izert, M. A., Klimecka, M. M. & Górna, M. W. (2021) Applications of Bacterial Degrons and Degradors — Toward Targeted Protein Degradation in Bacteria, *Front. Mol. Biosci.*, 8, p. 348.
- Jackman, J. E., Montange, R. K., Malik, H. S. & Phizicky, E. M. (2003) Identification of the yeast gene encoding the tRNA m1G methyltransferase responsible for modification at position 9, *RNA*, 9(5), pp. 574–585.
- Jarrous, N. (2002) Human ribonuclease P: Subunits, function, and intranuclear localization, *RNA*, 8(1), pp. 1–7.
- Jarrous, N. & Altman, S. (2001) Human ribonuclease P, *Methods Enzymol.*, 342, pp. 93–100.
- Jarrous, N. & Gopalan, V. (2010) Archaeal/Eukaryal RNase P: Subunits, functions and RNA diversification, *Nucleic Acids Res.*, 38(22), pp. 7885–7894.
- Kapoor, G., Saigal, S. & Elongavan, A. (2017) Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians, *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.*, 33(3), pp. 300–305.
- Karasik, A., Shanmuganathan, A., Howard, M. J., Fierke, C. A. & Koutmos, M. (2016) Nuclear Protein-Only Ribonuclease P2 Structure and Biochemical Characterization Provide Insight into the Conserved Properties of tRNA 5' End Processing Enzymes, *J. Mol. Biol.*, 428(1), pp. 26–40.
- Kaul, M. *et al.* (2015) TXA709, an FtsZ-Targeting Benzamide Prodrug with Improved Pharmacokinetics and Enhanced In Vivo Efficacy against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 59(8), pp. 4845–55.
- Kawamoto, S. A., Sudhakar, C. G., Hatfield, C. L., Sun, J., Behrman, E. J. & Gopalan, V. (2008) Studies on the mechanism of inhibition of bacterial ribonuclease P by aminoglycoside derivatives, *Nucleic Acids Res.*, 36(2), pp. 697–704.
- Kazantsev, A. V., Krivenko, A. A., Harrington, D. J., Carter, R. J., Holbrook, S. R., Adams, P. D. & Pace, N. R. (2003) High-resolution structure of RNase P protein from *Thermotoga maritima*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(13), pp. 7497–7502.
- Kazantsev, A. V., Krivenko, A. A., Harrington, D. J., Holbrook, S. R., Adams, P. D. & Pace, N. R. (2005) Crystal structure of a bacterial ribonuclease P RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102(38), pp. 13392–13397.
- Kikovska, E., Svärd, S. G. & Kirsebom, L. A. (2007) Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(7), pp. 2062–2067.
- Kirsebom, L. A. & Svärd, S. G. (1994) Base pairing between *Escherichia coli* RNase P RNA and its substrate., *EMBO J.*, 13(20), pp. 4870–4876.

- Klemm, B. P., Wu, N., Chen, Y., Liu, X., Kaitany, K. J., Howard, M. J. & Fierke, C. A. (2016) The diversity of ribonuclease P: Protein and RNA catalysts with analogous biological functions, *Biomolecules*, 6(2), p. 27.
- Klemm, B. P. *et al.* (2017) Molecular recognition of pre-tRNA by Arabidopsis protein-only Ribonuclease P, *RNA*, 23(12), pp. 1860–1873.
- Kobayashi, K. *et al.* (2003) Essential *Bacillus subtilis* genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100(8), pp. 4678–4683.
- Komine, Y., Kitabatake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. & Inokuchi, H. (1994) A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91(20), pp. 9223–9227.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S. & Aravind, L. (2001) Horizontal gene transfer in prokaryotes: quantification and classification, *Annu. Rev. Microbiol.*, 55, pp. 709–742.
- Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L. & Turner, P. E. (2019) Phage Therapy: A Renewed Approach to Combat Antibiotic-Resistant Bacteria, *Cell Host Microbe*, 25(2), pp. 219–232.
- Koutmou, K. S., Zahler, N. H., Kurz, J. C., Campbell, F. E., Harris, M. E. & Fierke, C. A. (2010) Protein-Precursor tRNA Contact Leads to Sequence-Specific Recognition of 5' Leaders by Bacterial Ribonuclease P, *J. Mol. Biol.*, 396(1), pp. 195–208.
- Kurz, J. C. & Fierke, C. A. (2002) The affinity of magnesium binding sites in the *Bacillus subtilis* RNase P-Pre-tRNA complex is enhanced by the protein subunit, *Biochemistry*, 41(30), pp. 9545–9558.
- Kurz, J. C., Niranjanakumari, S. & Fierke, C. A. (1998) Protein Component of *Bacillus subtilis* RNase P Specifically Enhances the Affinity for Precursor-tRNA<sup>Asp</sup>, *Biochemistry*, 37(8), pp. 2393–400.
- Kvaratskhelia, M. & Grice, S. F. J. Le (2008) Structural Analysis of Protein-RNA Interactions with Mass Spectrometry, *Methods Mol. Biol.*, 488, p. 213.
- Lahiri, S. D., Kutschke, A., McCormack, K. & Alm, R. A. (2015) Insights into the mechanism of inhibition of novel bacteria topoisomerase inhibitors from characterization of resistant mutants of *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 59(9), pp. 5278–5287.
- Lai, L. B., Chan, P. P., Cozen, A. E., Bernick, D. L., Brown, J. W., Gopalan, V. & Lowe, T. M. (2010) Discovery of a minimal form of RNase P in *Pyrobaculum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(52), pp. 22493–22498.
- Lamut, A., Peterlin Mašič, L., Kikelj, D. & Tomašič, T. (2019) Efflux pump inhibitors of clinically relevant multidrug resistant bacteria, *Med. Res. Rev.*, 39(6), pp. 2460–2504.
- Lan, P. *et al.* (2018) Structural insight into precursor tRNA processing by yeast ribonuclease P, *Science*, 362(6415), p. eaat6678.
- Larkin, M. A. *et al.* (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinformatics*, 23(21), pp. 2947–2948.
- Lechner, M., Rossmannith, W., Hartmann, R. K., Thölken, C., Gutmann, B., Giegé, P. & Gobert, A. (2015) Distribution of ribonucleoprotein and protein-only RNase P in Eukarya, *Mol. Biol. Evol.*, 32(12), pp. 3186–3193.
- Lewis, K. (2020) The Science of Antibiotic Discovery, *Cell*, 181(1), pp. 29–45.
- Li, F., Liu, X., Zhou, W., Yang, X. & Shen, Y. (2015) Auto-inhibitory mechanism of the human mitochondrial RNase P protein complex, *Sci. Rep.*, 5(1), pp. 1–7.
- Ligon, B. L. (2004) Penicillin: Its Discovery and Early Development, *Semin. Pediatr. Infect. Dis.*, 15(1), pp. 52–57.

- Liu, X., Chen, Y. & Fierke, C. A. (2014) A real-time fluorescence polarization activity assay to screen for inhibitors of bacterial ribonuclease P, *Nucleic Acids Res.*, 42(20), p. e159.
- Lombo, T. B. & Kaberdin, V. R. (2008) RNA processing in *Aquifex aeolicus* involves RNase E/G and an RNase P-like activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 366(2), pp. 457–463.
- Lopez Sanchez, M. I. G., Mercer, T. R., Davies, S. M. K., Shearwood, A. M. J., Nygård, K. K. A., Richman, T. R., Mattick, J. S., Rackham, O. & Filipovska, A. (2011) RNA processing in human mitochondria, *Cell Cycle*, 10(17), pp. 2904–2916.
- Loria, A., Niranjanakumari, S., Fierke, C. A. & Pan, T. (1998) Recognition of a Pre-tRNA Substrate by the *Bacillus subtilis* RNase P Holoenzyme, *Biochemistry*, 37(44), pp. 15466–15473.
- Loria, A. & Pan, T. (1996) Domain structure of the ribozyme from eubacterial ribonuclease P, *RNA*, 2(6), pp. 551–63.
- Loria, A. & Pan, T. (1997) Recognition of the T Stem-Loop of a Pre-tRNA Substrate by the Ribozyme from *Bacillus subtilis* Ribonuclease P, *Biochemistry*, 36(21), pp. 6317–6325.
- Lounsbury, N. (2016) Design, Synthesis and SAR of the first inhibitors of Methicillin-resistant *S. aureus* RnpA as novel antimicrobial agents, *Dissertation Temple University, Philadelphia, USA*.
- Lounsbury, N., Eidem, T., Colquhoun, J., Mateo, G., Abou-Gharbia, M., Dunman, P. M. & Childers, W. E. (2018) Novel inhibitors of *Staphylococcus aureus* RnpA that synergize with mupirocin, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 28(6), pp. 1127–1131.
- Luo, M. J., Mao, L. F. & Schulz, H. (1995) Short-chain 3-Hydroxy-2-methylacyl-CoA dehydrogenase from rat liver: Purification and characterization of a novel enzyme of isoleucine metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.*, 321(1), pp. 214–220.
- Madeira, F. *et al.* (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019, *Nucleic Acids Res.*, 47(W1), pp. W636–W641.
- Madrigal-Carrillo, E. A., Díaz-Tufinio, C. A., Santamaría-Suárez, H. A., Arciniega, M. & Torres-Larios, A. (2019) A screening platform to monitor RNA processing and protein-RNA interactions in ribonuclease P uncovers a small molecule inhibitor, *Nucleic Acids Res.*, 47(12), pp. 6425–6438.
- Mans, R. M. W., Guerrier-Takada, C., Altman, S. & Pieij, C. W. A. (1990) Interaction of RNase P from *Escherichia coli* with pseudoknotted structures in viral RNAs, *Nucleic Acids Res.*, 18(12), p. 3479.
- Mao, G., Chen, T.-H., Srivastava, A. S., Kosek, D., Biswas, P. K., Gopalan, V. & Kirsebom, L. A. (2016) Cleavage of Model Substrates by *Arabidopsis thaliana* PRORP1 Reveals New Insights into Its Substrate Requirements, *PLoS One*, 11(8), p. e0160246.
- Marszalkowski, M., Willkomm, D. K. & Hartmann, R. K. (2008) 5'-End maturation of tRNA in *Aquifex aeolicus*, *Biol. Chem.*, 389(4), pp. 395–403.
- Martin-Loeches, I., Dale, G. E. & Torres, A. (2018) Murepavadin: a new antibiotic class in the pipeline, *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, 16(4), pp. 259–268.
- Massire, C., Jaeger, L. & Westhof, E. (1998) Derivation of the three-dimensional architecture of bacterial ribonuclease P RNAs from comparative sequence analysis, *J. Mol. Biol.*, 279(4), pp. 773–793.
- Masson, G. R. *et al.* (2019) Recommendations for performing, interpreting and reporting hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) experiments, *Nat. Methods*, 16(7), pp. 595–602.

- Matelska, D., Steczkiewicz, K. & Ginalski, K. (2017) Comprehensive classification of the PIN domain-like superfamily, *Nucleic Acids Res.*, 45(12), pp. 6995–7020.
- McClain, W. H., Guerrier-Takada, C. & Altman, S. (1987) Model substrates for an RNA enzyme, *Science*, 238(4826), pp. 527–530.
- McGovern, S. L., Caselli, E., Grigorieff, N. & Shoichet, B. K. (2002) A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening, *J. Med. Chem.*, 45(8), pp. 1712–1722.
- McGovern, S. L., Helfand, B. T., Feng, B. & Shoichet, B. K. (2003) A specific mechanism of nonspecific inhibition, *J. Med. Chem.*, 46(20), pp. 4265–4272.
- McGovern, S. L. & Shoichet, B. K. (2003) Kinase inhibitors: Not just for kinases anymore, *J. Med. Chem.*, 46(8), pp. 1478–1483.
- Merten, J. A., Schultz, K. M. & Klug, C. S. (2012) Concentration-dependent oligomerization and oligomeric arrangement of LptA, *Protein Sci.*, 21(2), p. 211.
- Mikkelsen, N. E., Brännvall, M., Virtanen, A. & Kirsebom, L. A. (1999) Inhibition of RNase P RNA cleavage by aminoglycosides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(11), pp. 6155–6160.
- Misra, V. K. & Draper, D. E. (2002) The linkage between magnesium binding and RNA folding, *J. Mol. Biol.*, 317(4), pp. 507–521.
- Misuri, L., Cappiello, M., Balestri, F., Moschini, R., Barracco, V., Mura, U. & Del-Corso, A. (2017) The use of dimethylsulfoxide as a solvent in enzyme inhibition studies: the case of aldose reductase, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 32(1), pp. 1152–1158.
- Mullard, A. (2021) Targeted protein degraders crowd into the clinic, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 20(4), pp. 247–250.
- Natesh, R., Schwager, S. L. U., Sturrock, E. D. & Acharya, K. R. (2003) Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex, *Nature*, 421(6922), pp. 551–554.
- Nickel, A. I., Wäber, N. B., Gößringer, M., Lechner, M., Linne, U., Toth, U., Rossmann, W. & Hartmann, R. K. (2017) Minimal and RNA-free RNase P in *Aquifex aeolicus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 114(42), pp. 11121–11126.
- Niland, C. N., Zhao, J., Lin, H. C., Anderson, D. R., Jankowsky, E. & Harris, M. E. (2016) Determination of the Specificity Landscape for Ribonuclease P Processing of Precursor tRNA 5' Leader Sequences, *ACS Chem. Biol.*, 11(8), pp. 2285–2292.
- Niland, C. N., Anderson, D. R., Jankowsky, E. & Harris, M. E. (2017) The contribution of the C5 protein subunit of *Escherichia coli* ribonuclease P to specificity for precursor tRNA is modulated by proximal 5' leader sequences, *RNA*, 23(10), pp. 1502–1511.
- Niranjanakumari, S., Stams, T., Crary, S. M., Christianson, D. W. & Fierke, C. A. (1998) Protein component of the ribozyme ribonuclease P alters substrate recognition by directly contacting precursor tRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95(26), pp. 15212–15217.
- Niranjanakumari, S., Kurz, J. C. & Fierke, C. A. (1998) Expression, purification and characterization of the recombinant ribonuclease P protein component from *Bacillus subtilis*, *Nucleic Acids Res.*, 26(13), pp. 3090–3096.
- Ó'Fágáin, C., Cummins, P. M. & O'Connor, B. F. (2011) Gel-Filtration Chromatography, in Walls, D. and Loughran, S. T. (eds) *Protein Chromatogr. Methods Protoc.* Totowa, NJ: Humana Press, pp. 25–33.

- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L. & Walker, M. J. (2020) Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens, *Clin. Microbiol. Rev.*, 33(3), pp. e00181-19.
- Olson, P. D. *et al.* (2011) Small molecule inhibitors of staphylococcus aureus RnpA alter cellular mRNA turnover, exhibit antimicrobial activity, and attenuate pathogenesis, *PLoS Pathog.*, 7(2), p. e1001287.
- Ovung, A. & Bhattacharyya, J. (2021) Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions, *Biophys. Rev.*, 13(2), pp. 259–272.
- Owen, S. C., Doak, A. K., Wassam, P., Shoichet, M. S. & Shoichet, B. K. (2012) Colloidal aggregation affects the efficacy of anticancer drugs in cell culture, *ACS Chem. Biol.*, 7(8), pp. 1429–1435.
- Pan, T. (1995) Higher Order Folding and Domain Analysis of the Ribozyme from *Bacillus subtilis* Ribonuclease P, *Biochemistry*, 34(3), pp. 902–909.
- Pan, T., Loria, A. & Zhong, K. (1995) Probing of tertiary interactions in RNA: 2'-hydroxyl-base contacts between the RNase P RNA and pre-tRNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92(26), pp. 12510–12514.
- Pannucci, J. A., Haas, E. S., Hall, T. A., Harris, J. K. & Brown, J. W. (1999) RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96(14), pp. 7803–7808.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A. & Bonomo, R. A. (2011) Carbapenems: Past, present, and future, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 55(11), pp. 4943–4960.
- Paul, R., Lazarev, D. & Altman, S. (2001) Characterization of RNase P from *Thermotoga maritima*, *Nucleic Acids Res.*, 29(4), pp. 880–885.
- Pavlova, L. V., Gößringer, M., Weber, C., Buzet, A., Rossmann, W. & Hartmann, R. K. (2012) tRNA Processing by Protein-Only versus RNA-Based RNase P: Kinetic Analysis Reveals Mechanistic Differences, *ChemBioChem*, 13(15), pp. 2270–2276.
- Peck-Miller, K. A. & Altman, S. (1991) Kinetics of the processing of the precursor to 4.5 S RNA, a naturally occurring substrate for RNase P from *Escherichia coli*, *J. Mol. Biol.*, 221(1), pp. 1–5.
- Perederina, A., Esakova, O., Koc, H., Schmitt, M. E. & Krasilnikov, A. S. (2007) Specific binding of a Pop6/Pop7 heterodimer to the P3 stem of the yeast RNase MRP and RNase P RNAs, *RNA*, 13(10), pp. 1648–1655.
- Perederina, A., Esakova, O., Quan, C., Khanova, E. & Krasilnikov, A. S. (2010) Eukaryotic ribonucleases P/MRP: The crystal structure of the P3 domain, *EMBO J.*, 29(4), pp. 761–769.
- Persson, T., Cuzic, S. & Hartmann, R. K. (2003) Catalysis by RNase P RNA: unique features and unprecedented active site plasticity, *J. Biol. Chem.*, 278(44), pp. 43394–43401.
- Pfeiffer, T., Tekos, A., Warnecke, J. M., Drainas, D., Engelke, D. R., Séraphin, B. & Hartmann, R. K. (2000) Effects of phosphorothioate modifications on precursor tRNA processing by eukaryotic RNase P enzymes, *J. Mol. Biol.*, 298(4), pp. 559–565.
- Pinker, F., Schelcher, C., Fernandez-Millan, P., Gobert, A., Birck, C., Thureau, A., Roblin, P., Giegé, P. & Sauter, X. C. (2017) Biophysical analysis of Arabidopsis protein-only RNase P alone and in complex with tRNA provides a refined model of tRNA binding, *J. Biol. Chem.*, 292(34), pp. 13904–13913.
- Radoux, C. J., Olsson, T. S. G., Pitt, W. R., Groom, C. R. & Blundell, T. L. (2016) Identifying Interactions that Determine Fragment Binding at Protein Hotspots, *J. Med. Chem.*, 59(9), pp. 4314–4325.

- Reich, C., Gardiner, K. J., Olsen, G. J., Pace, B., Marsh, T. L. & Pace, N. R. (1986) The RNA component of the *Bacillus subtilis* RNase P. Sequence, activity, and partial secondary structure, *J. Biol. Chem.*, 261(17), pp. 7888–7893.
- Reich, C., Olsen, G. J., Pace, B. & Pace, N. R. (1988) Role of the protein moiety of ribonuclease P, a ribonucleoprotein enzyme, *Science*, 239(4836), pp. 178–181.
- Reinhard, L., Sridhara, S. & Hällberg, B. M. (2015) Structure of the nuclease subunit of human mitochondrial RNase P, *Nucleic Acids Res.*, 43(11), pp. 5664–5672.
- Reiter, N. J., Osterman, A., Torres-Larios, A., Swinger, K. K., Pan, T. & Mondragón, A. (2010) Structure of a bacterial ribonuclease P holoenzyme in complex with tRNA, *Nature*, 468(7325), pp. 784–791.
- Roberts, T. C., Langer, R. & Wood, M. J. A. (2020) Advances in oligonucleotide drug delivery, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 19(10), pp. 673–694.
- Roland, S., Ferone, R., Harvey, R. J., Styles, V. L. & Morrison, R. W. (1979) The characteristics and significance of sulfonamides as substrates for *Escherichia coli* dihydropteroate synthase, *J. Biol. Chem.*, 254(20), pp. 10337–10345.
- Rueda, D., Hsieh, J., Day-Storms, J. J., Fierke, C. A. & Walter, N. G. (2005) The 5' leader of precursor tRNA<sup>Asp</sup> bound to the *Bacillus subtilis* RNase P holoenzyme has an extended conformation, *Biochemistry*, 44(49), pp. 16130–16139.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanderson, B. J. S. & Shield, A. J. (1996) Mutagenic damage to mammalian cells by therapeutic alkylating agents, *Mutat. Res.*, 355, pp. 41–57.
- Sassano, M. F., Doak, A. K., Roth, B. L. & Shoichet, B. K. (2013) Colloidal aggregation causes inhibition of G protein-coupled receptors, *J. Med. Chem.*, 56(6), pp. 2406–2414.
- Sato, T., Sato, Takafumi & Yamawaki, K. (2019) Clinical Infectious Diseases Cefiderocol: Discovery, Chemistry, and In Vivo Profiles of a Novel Siderophore Cephalosporin, *Clin. Infect. Dis.*, 69(S7), pp. 538–581.
- Schedl, P., Primakoff, P. & Robertsm, J. (1975) Processing of *E. coli* tRNA precursors., *Brookhaven Symp. Biol.*, 26, pp. 53–76.
- Schencking, I., Rossmann, W. & Hartmann, R. K. (2020) Diversity and Evolution of RNase P, in Pontarotti, P. (ed.) *Evolutionary Biology - A Transdisciplinary Approach*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, pp. 255–299.
- Schwarz, T. S., Wäber, N. B., Feyh, R., Weidenbach, K., Schmitz, R. A., Marchfelder, A. & Hartmann, R. K. (2019) Homologs of *aquifex aeolicus* protein-only RNase P are not the major RNase P activities in the archaea *haloferax volcanii* and *methanosarcina mazei*, *IUBMB Life*, 71(8), pp. 1109–1116.
- Sekiguchi, M. & Iida, S. (1967) Mutants of *Escherichia coli* permeable to actinomycin., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 58(6), pp. 2315–2320.
- Sharkady, S. M. & Nolan, J. M. (2001) Bacterial ribonuclease P holoenzyme crosslinking analysis reveals protein interaction sites on the RNA subunit, *Nucleic Acids Res.*, 29(18), pp. 3848–3856.
- Shen, X. & Corey, D. R. (2018) Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs, *Nucleic Acids Res.*, 46(4), pp. 1584–1600.

- Siew, D., Zahler, N. H., Cassano, A. G., Strobel, S. A. & Harris, M. E. (1999) Identification of Adenosine Functional Groups Involved in Substrate Binding by the Ribonuclease P Ribozyme, *Biochemistry*, 38(6), pp. 1873–1883.
- Sinapah, S., Wu, S., Chen, Y., Pettersson, B. M. F., Gopalan, V. & Kirsebom, L. A. (2011) Cleavage of model substrates by archaeal RNase P: Role of protein cofactors in cleavage-site selection, *Nucleic Acids Res.*, 39(3), pp. 1105–1116.
- Small, I. D. & Peeters, N. (2000) The PPR motif - A TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins, *Trends Biochem. Sci.*, 25(2), pp. 45–47.
- Smith, D., Burgin, A. B., Haas, E. S. & Pace, N. R. (1992) Influence of Metal Ions on the Ribonuclease P Reaction, *J. Biol. Chem.*, 267(4), pp. 2429–2436.
- Smith, D. & Pace, N. R. (1993) Multiple Magnesium Ions in the Ribonuclease P Reaction Mechanism, *Biochemistry*, 32(20), pp. 5273–5281.
- Spitzfaden, C., Nicholson, N., Jones, J. J., Guth, S., Lehr, R., Prescott, C. D., Hegg, L. A. & Eggleston, D. S. (2000) The structure of ribonuclease P protein from *Staphylococcus aureus* reveals a unique binding site for single-stranded RNA, *J. Mol. Biol.*, 295(1), pp. 105–115.
- Stams, T., Niranjanakumari, S., Fierke, C. A. & Christianson, D. W. (1998) Ribonuclease P protein structure: Evolutionary origins in the translational apparatus, *Science*, 280(5364), pp. 752–755.
- Stein, A. & Crothers, D. M. (2002) Conformational changes of transfer RNA. The role of magnesium(II), *Biochemistry*, 15(1), pp. 160–168.
- Steitz, T. A. & Steitz, J. A. (1993) A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90(14), pp. 6498–6502.
- Stragier, P., Bonamy, C. & Karmazyn-Campelli, C. (1988) Processing of a sporulation sigma factor in *Bacillus subtilis*: How morphological structure could control gene expression, *Cell*, 52(5), pp. 697–704.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. & Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol.*, 185, pp. 60–89.
- Studier, F. W. (1991) Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system, *J. Mol. Biol.*, 219(1), pp. 37–44.
- Suigo, L., Chojnacki, M., Zanotto, C., Sebastián-Pérez, V., Morghen, C. D. G., Casiraghi, A., Dunman, P. M., Valoti, E. & Straniero, V. (2021) *Staphylococcus aureus* RnpA inhibitors: Computational-guided design, synthesis and initial biological evaluation, *Antibiotics*, 10(4).
- Sun, L. & Harris, M. E. (2007) Evidence that binding of C5 protein to P RNA enhances ribozyme catalysis by influencing active site metal ion affinity, *RNA*, 13(9), pp. 1505–1515.
- Suskiewicz, M. J. *et al.* (2019) Structure of McsB, a protein kinase for regulated arginine phosphorylation, *Nat. Chem. Biol.*, 15(5), pp. 510–518.
- Svärd, S. G., Kagardt, U. & Kirsebom, L. A. (1996) Phylogenetic comparative mutational analysis of the base-pairing between RNase P RNA and its substrate, *RNA*, 2(5), pp. 463–472.
- Swanson, R. V. (2001) Genome of *Aquifex aeolicus*, *Methods Enzymol.*, 330, pp. 158–169.
- Tacconelli, E. *et al.* (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis, *Lancet Infect. Dis.*, 18(3), pp. 318–327.



- Taschner, A., Weber, C., Buzet, A., Hartmann Roland K., R. K., Hartig, A. & Rossmannith, W. (2012) Nuclear RNase P of *Trypanosoma brucei*: A Single Protein in Place of the Multicomponent RNA-Protein Complex, *Cell Rep.*, 2(1), pp. 19–25.
- Teramoto, T., Kaitany, K. J., Kakuta, Y., Kimura, M., Fierke, C. A. & Hall, T. M. T. (2020) Pentatricopeptide repeats of protein-only RNase P use a distinct mode to recognize conserved bases and structural elements of pre-tRNA, *Nucleic Acids Res.*, 48(21), pp. 11815–11826.
- Teramoto, T., Koyasu, T., Adachi, N., Kawasaki, M., Moriya, T., Numata, T., Senda, T. & Kakuta, Y. (2021) Minimal protein-only RNase P structure reveals insights into tRNA precursor recognition and catalysis, *J. Biol. Chem.*, 297(3), p. 101028.
- The Pew Charitable Trusts (2021) *Tracking the Global Pipeline of Antibiotics in Development*. Available at: <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/issue-briefs/2020/04/tracking-the-global-pipeline-of-antibiotics-in-development> (Accessed: 20 August 2021).
- Theuretzbacher, U. *et al.* (2019) Analysis of the clinical antibacterial and antituberculosis pipeline, *Lancet Infect. Dis.*, 19(2), pp. e40–e50.
- Theuretzbacher, U., Bush, K., Harbarth, S., Paul, M., Rex, J. H., Tacconelli, E. & Thwaites, G. E. (2020) Critical analysis of antibacterial agents in clinical development, *Nat. Rev. Microbiol.*, 18(5), pp. 286–298.
- Theuretzbacher, U., Outterson, K., Engel, A. & Karlén, A. (2020) The global preclinical antibacterial pipeline, *Nat. Rev. Microbiol.*, 18(5), pp. 275–285.
- Theuretzbacher, U. & Piddock, L. J. V (2019) Review Non-traditional Antibacterial Therapeutic Options and Challenges, *Cell Host Microbe*, 26(1), pp. 61–72.
- Tjernberg, A., Markova, N., Griffiths, W. J. & Hallén, D. (2006) DMSO-related effects in protein characterization, *J. Biomol. Screen.*, 11(2), pp. 131–137.
- Torres-Larios, A., Swinger, K. K., Krasilnikov, A. S., Pan, T. & Mondragón, A. (2005) Crystal structure of the RNA component of bacterial ribonuclease P, *Nature*, 437(7058), pp. 584–587.
- U.S. National Library of Medicine *ClinicalTrials.gov*. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=POL7080> (Accessed: 12 August 2021).
- Ursu, A., Childs-Disney, J. L., Andrews, R. J., O’Leary, C. A., Meyer, S. M., Angelbello, A. J., Moss, W. N. & Disney, M. D. (2020) Design of small molecules targeting RNA structure from sequence, *Chem. Soc. Rev.*, 49(20), pp. 7252–7270.
- Viviani, L. G., Piccirillo, E., Cheffer, A., de Rezende, L., Ulrich, H., Carmona-Ribeiro, A. M. & Amaral, A. T. (2018) Be Aware of Aggregators in the Search for Potential Human ecto-5’-Nucleotidase Inhibitors, *Molecules*, 23(8), p. 1876.
- Wäber, N. B. (2019) Struktur- und Funktionsanalyse der Protein-basierten RNase P des hyperthermophilen Bakteriums *Aquifex aeolicus* und homologer Enzyme, *Dissertation Philipps-Universität Marburg*.
- Wainwright, M. & Kristiansen, J. E. (2011) On the 75th anniversary of Prontosil, *Dye. Pigment.*, 88(3), pp. 231–234.
- Walczyk, D., Gößringer, M., Rossmannith, W., Zatsepin, T. S., Oretskaya, T. S. & Hartmann, R. K. (2016) Analysis of the Cleavage Mechanism by Protein-Only RNase P Using Precursor tRNA Substrates with Modifications at the Cleavage Site, *J. Mol. Biol.*, 428(24), pp. 4917–4928.
- Walczyk, D. (2016) Inhibition der bakteriellen RNA-basierten Ribonuklease P und Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Protein-basierten Ribonuklease P aus *Arabidopsis thaliana*, *Dissertation Philipps-Universität Marburg*.

- Walczyk, D., Willkomm, D. K. & Hartmann, R. K. (2016) Bacterial type B RNase P: Functional characterization of the L5.1-L15.1 tertiary contact and antisense inhibition, *RNA*, 22(11), pp. 1699–1709.
- Walker, S. C. & Engelke, D. R. (2006) Ribonuclease P: The evolution of an ancient RNA enzyme, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 41(2), pp. 77–102.
- Wan, F., Wang, Q., Tan, J., Tan, M., Chen, J., Shi, S., Lan, P., Wu, J. & Lei, M. (2019) Cryo-electron microscopy structure of an archaeal ribonuclease P holoenzyme, *Nat. Commun.*, 10(1), pp. 1–13.
- Warnecke, J. M., Fürste, J. P., Hardt, W. D., Erdmann, V. A. & Hartmann, R. K. (1996) Ribonuclease P (RNase P) RNA is converted to a Cd<sup>2+</sup>-ribozyme by a single Rp-phosphorothioate modification in the precursor tRNA at the RNase P cleavage site, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93(17), pp. 8924–8928.
- Warnecke, J. M., Held, R., Busch, S. & Hartmann, R. K. (1999) Role of metal ions in the hydrolysis reaction catalyzed by RNase P RNA from *Bacillus subtilis*, *J. Mol. Biol.*, 290(2), pp. 433–445.
- Warner, K. D., Hajdin, C. E. & Weeks, K. M. (2018) Principles for targeting RNA with drug-like small molecules, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 17(8), pp. 547–558.
- Waterhouse, A. *et al.* (2018) SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes, *Nucleic Acids Res.*, 46(W1), pp. W296–W303.
- Weber, C., Hartig, A., Hartmann, R. K. & Rossmannith, W. (2014) Playing RNase P Evolution: Swapping the RNA Catalyst for a Protein Reveals Functional Uniformity of Highly Divergent Enzyme Forms, *PLoS Genet.*, 10(8), p. e1004506.
- Wegscheid, B., Condon, C. & Hartmann, R. K. (2006) Type A and B RNase P RNAs are interchangeable in vivo despite substantial biophysical differences, *EMBO Rep.*, 7(4), pp. 411–417.
- Wegscheid, B. & Hartmann, R. K. (2006) The precursor tRNA 3'-CCA interaction with *Escherichia coli* RNase P RNA is essential for catalysis by RNase P in vivo, *RNA*, 12(12), pp. 2135–2148.
- Wegscheid, B. & Hartmann, R. K. (2007) In vivo and in vitro investigation of bacterial type B RNase P interaction with tRNA 3'-CCA, *Nucleic Acids Res.*, 35(6), pp. 2060–2073.
- Wellner, K., Betat, H. & Mörl, M. (2018) A tRNA's fate is decided at its 3' end: Collaborative actions of CCA-adding enzyme and RNases involved in tRNA processing and degradation, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.*, 1861(4), pp. 433–441.
- Willkomm, D. K., Gruegelsiepe, H., Goudinakis, O., Kretschmer-Kazemi Far, R., Bald, R., Erdmann, V. A. & Hartmann, R. K. (2003) Evaluation of bacterial RNase P RNA as a drug target, *ChemBioChem*, 4(10), pp. 1041–1048.
- Willkomm, D. K., Pfeffer, K., Reuter, K., Klebe, G. & Hartmann, R. K. (2016) RNase P as a Drug Target, in Liu, F. and Altman, S. (eds) *Ribonuclease P*. New York: Springer, pp. 235–256.
- Willkomm, D. K., Feltens, R. & Hartmann, R. K. (2002) tRNA maturation in *Aquifex aeolicus*, *Biochimie*, 84(8), pp. 713–722.
- Wittke, F., Vincent, C., Chen, J., Heller, B., Kabler, H., Scott Overcash, J., Leylavergne, F. & Dieppois, G. (2020) Afabycin, a first-in-class antistaphylococcal antibiotic, in the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections: clinical noninferiority to vancomycin/linezolid, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 64(10), pp. e00250-20.

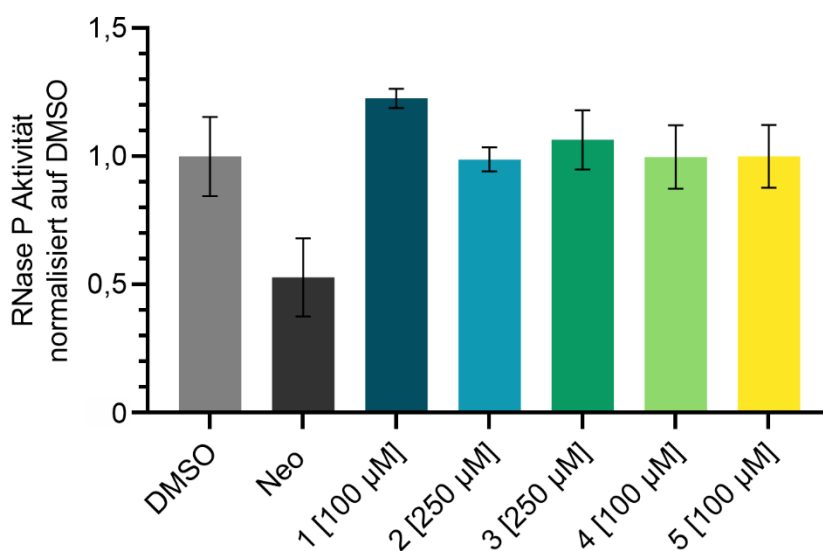
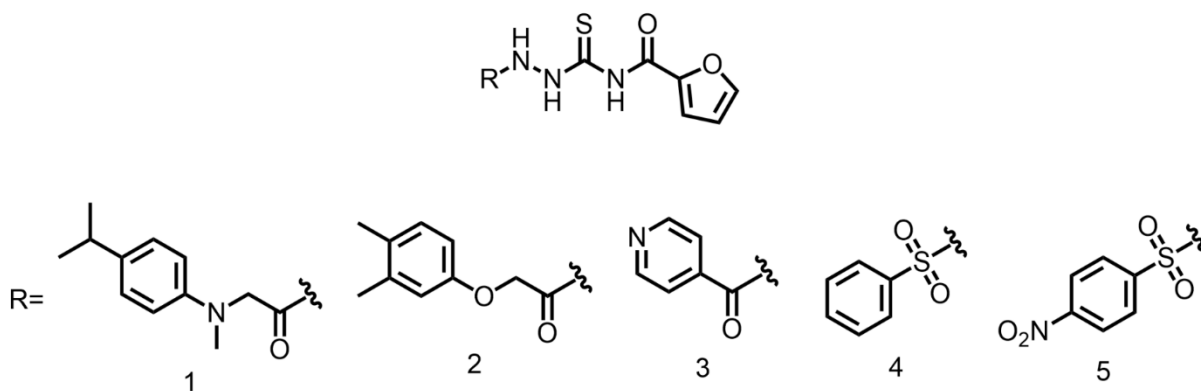
- Woods, D. D. (1940) The relation of p-Aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphanilamide, *Br. J. Exp. Pathol.*, 21(2), p. 74.
- Wright, G. D. (2007) The antibiotic resistome: The nexus of chemical and genetic diversity, *Nat. Rev. Microbiol.*, 5(3), pp. 175–186.
- Wu, J. *et al.* (2018) Cryo-EM Structure of the Human Ribonuclease P Holoenzyme, *Cell*, 175(5), pp. 1393-1404.e11.
- Wu, S., Kikovska, E., Lindell, M. & Kirsebom, L. A. (2012) Cleavage mediated by the catalytic domain of bacterial RNase P RNA, *J. Mol. Biol.*, 422(2), pp. 204–214.
- Wu, S., Chen, Y., Mao, G., Trobro, S., Kwiatkowski, M. & Kirsebom, L. A. (2014) Transition-state stabilization in Escherichia coli ribonuclease P RNA-mediated cleavage of model substrates, *Nucleic Acids Res.*, 42(1), pp. 631–642.
- Wu, S., Mao, G. & Kirsebom, L. A. (2016) Inhibition of bacterial RNase P RNA by phenothiazine derivatives, *Biomolecules*, 6(3), p. 38.
- Yagi, Y., Hayashi, S., Kobayashi, K., Hirayama, T. & Nakamura, T. (2013) Elucidation of the RNA Recognition Code for Pentatricopeptide Repeat Proteins Involved in Organelle RNA Editing in Plants, *PLoS One*, 8(3), p. 21112521.
- Yan, S. Du *et al.* (1997) An intracellular protein that binds amyloid- $\beta$  peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease, *Nature*, 389(6652), pp. 689–695.
- Yang, J. J., Ursu, O., Lipinski, C. A., Sklar, L. A., Oprea, T. I. & Bologa, C. G. (2016) Badapple: Promiscuity patterns from noisy evidence, *J. Cheminform.*, 8(1), pp. 1–14.
- Yuan, Y. & Altman, S. (1995) Substrate recognition by human RNase P: identification of small, model substrates for the enzyme., *EMBO J.*, 14(1), pp. 159–168.
- Zahler, N. H., Christian, E. L. & Harris, M. E. (2003) Recognition of the 5' leader of pre-tRNA substrates by the active site of ribonuclease P, *RNA*, 9(6), pp. 734–745.
- Zaman, S. Bin, Hussain, M. A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K. T. & Hossain, N. (2017) A Review on Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing, *Cureus*, 9(6), p. e1403.
- Zeng, D., Abzhanova, A., Brown, B. P. & Reiter, N. J. (2021) Dissecting Monomer-Dimer Equilibrium of an RNase P Protein Provides Insight Into the Synergistic Flexibility of 5' Leader Pre-tRNA Recognition, *Front. Mol. Biosci.*, 8, p. 846.

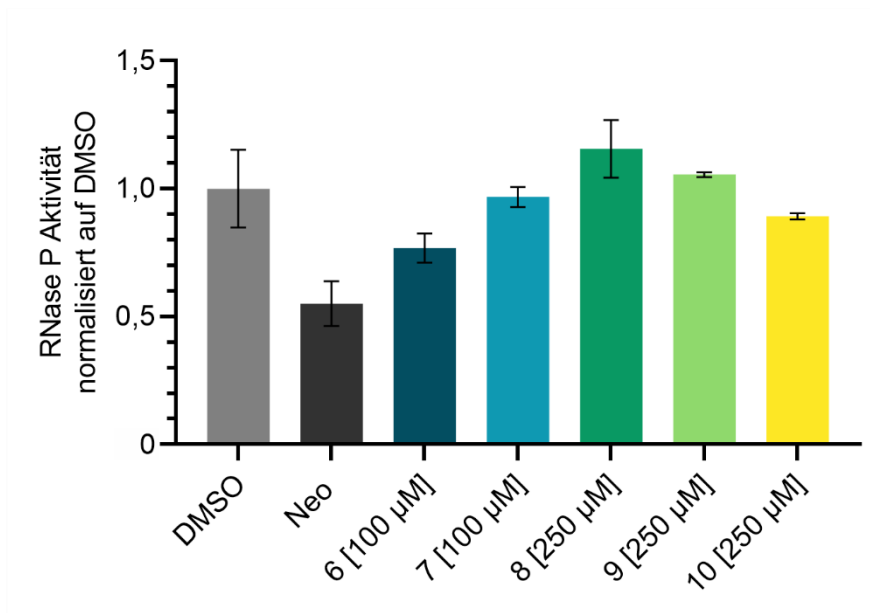
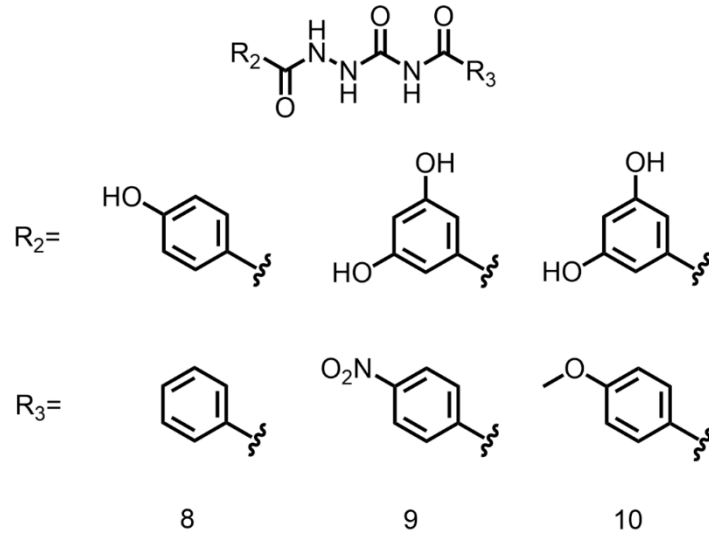
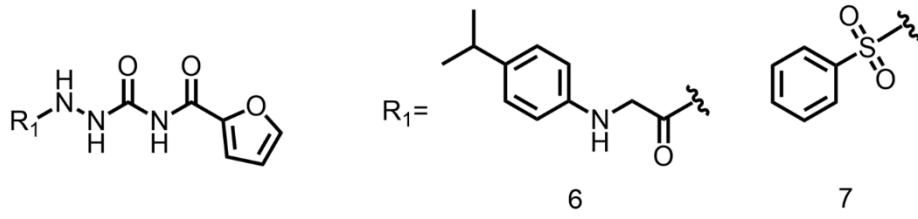
## 5.2 Ergebnisse der Inhibitoren-Testungen

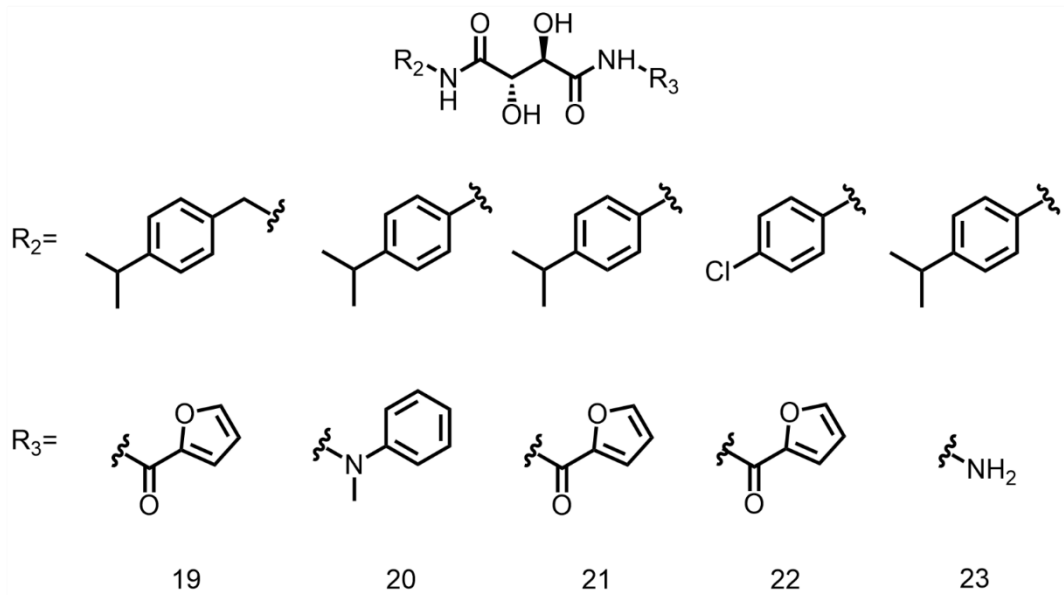
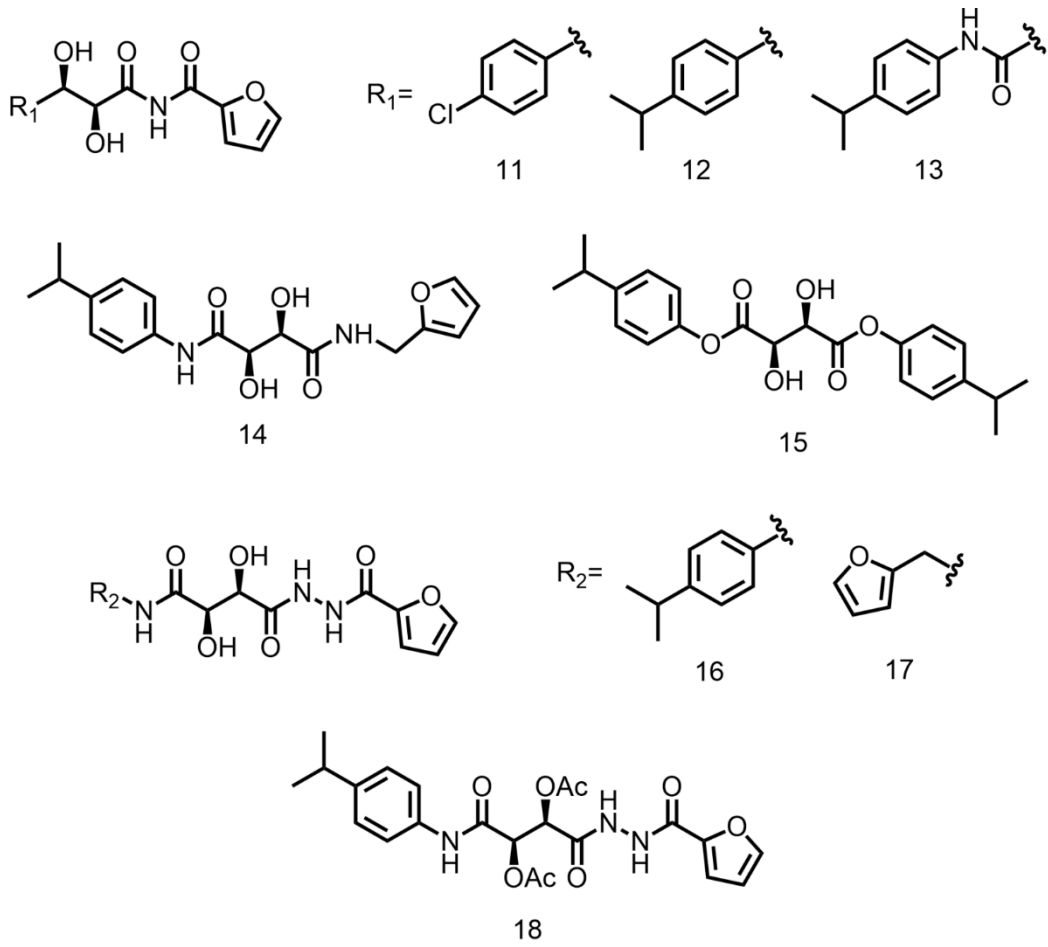
### 5.2.1 Ergebnisse der Enzymkinetik

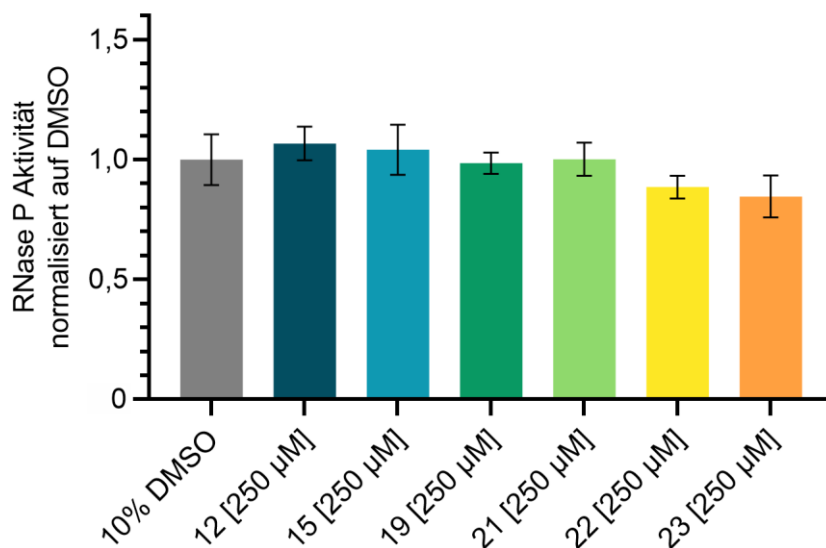
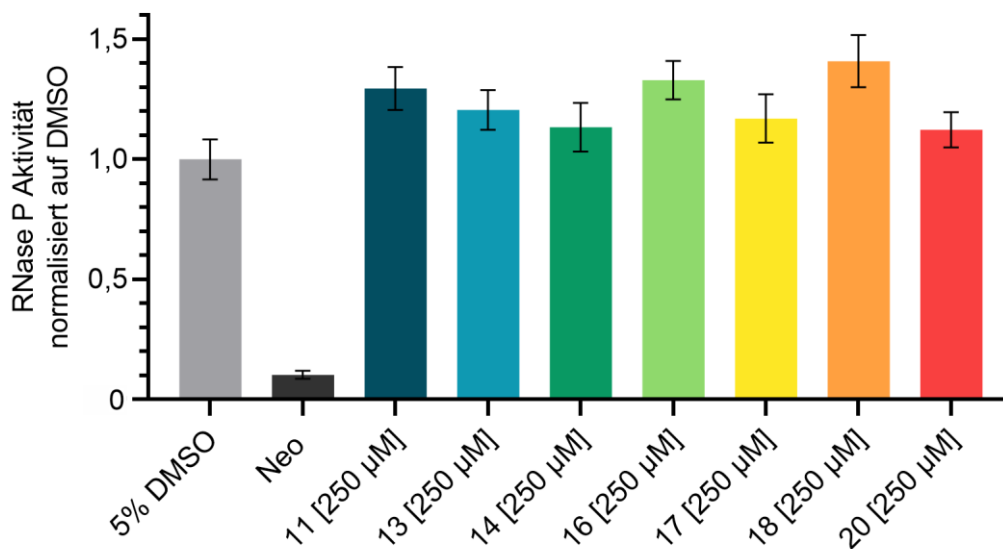
Für die Enzymkinetik-Experimente wurden 50 nM *T. maritima* Holoenzym (stöchiometrisches Verhältnis P Protein und P RNA) und 500 nM prä-tRNA-Substrat verwendet. Die kinetischen Reaktionen wurden in KN-Puffer mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> bei 50 °C durchgeführt. Sofern nicht anders erwähnt, fanden die Reaktionen in 10 % DMSO statt und 100 µM Neomycin (Neo) wurde als Positivkontrolle verwendet. Es wurde eine Minute nach Reaktionsstart eine Probe gezogen. Der Anteil an prozessiertem Substrat dieser Probe wurde auf die entsprechende Lösungsmittel-Kontrolle normalisiert.

#### 5.2.1.1 RNPA2000-Derivate



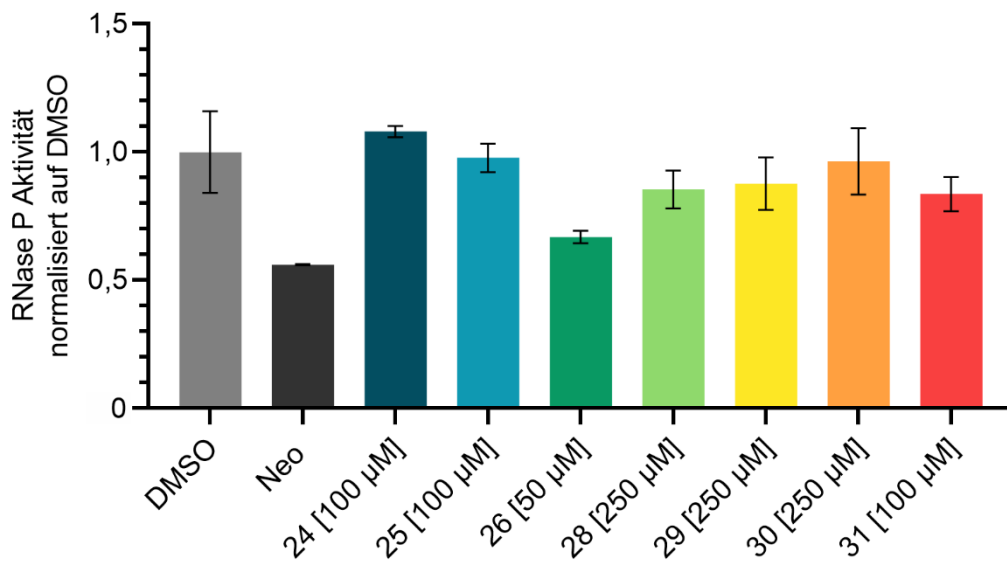
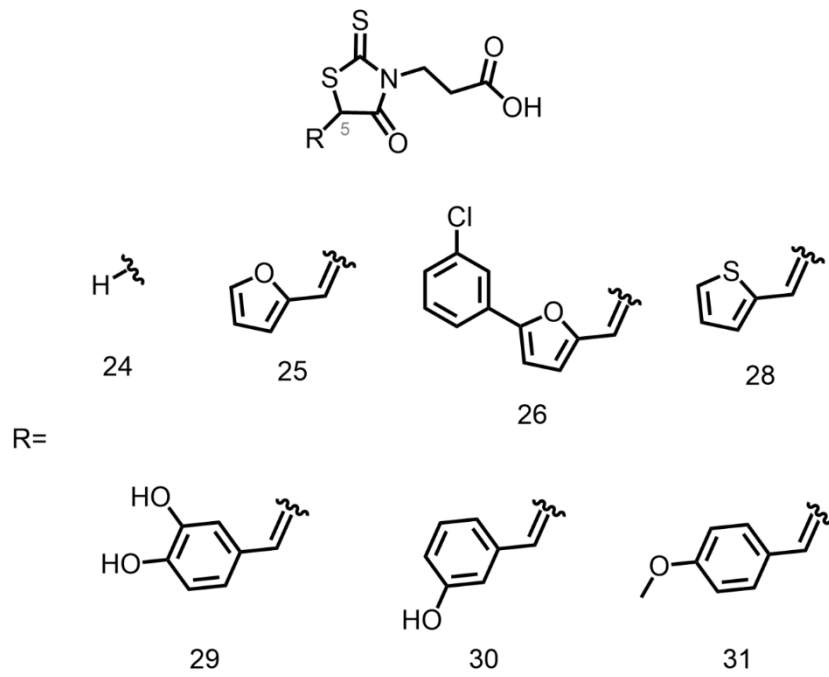






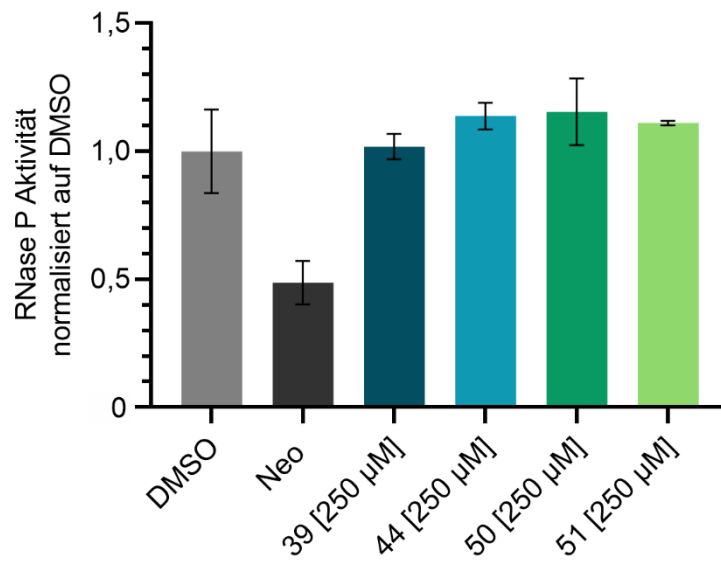
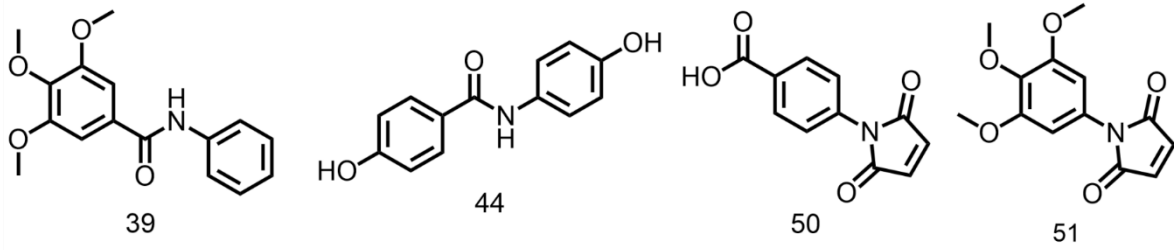
Die Testungen der hier abgebildeten vicinalen Dirole waren die ersten dieser Arbeit, sodass ein Teil der Verbindungen (Verbindungen 11, 13, 14, 16-18 und 20) in 5 % DMSO getestet und 250 µM Neomycin als Kontrolle eingesetzt wurden. Der DMSO-Gehalt und die Konzentration an Neomycin wurden dann im weiteren Verlauf der Testungen angepasst.

5.2.1.2 RNPA3000-Derivate

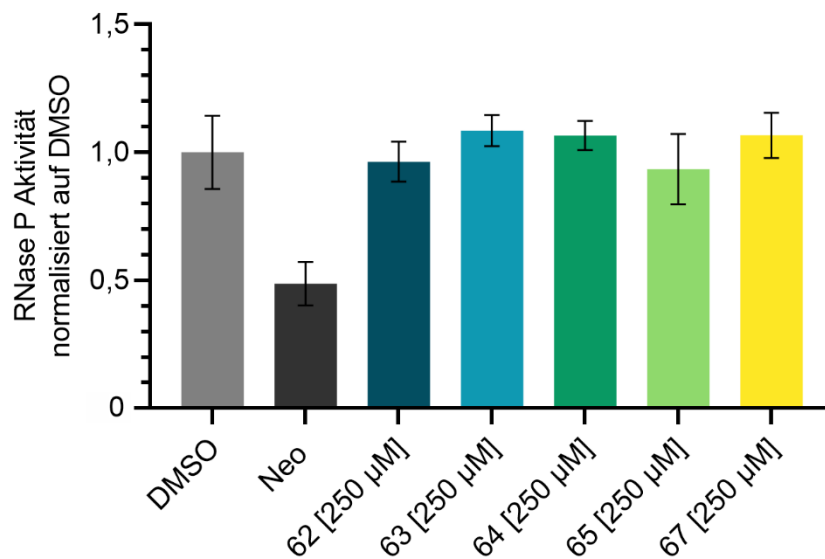
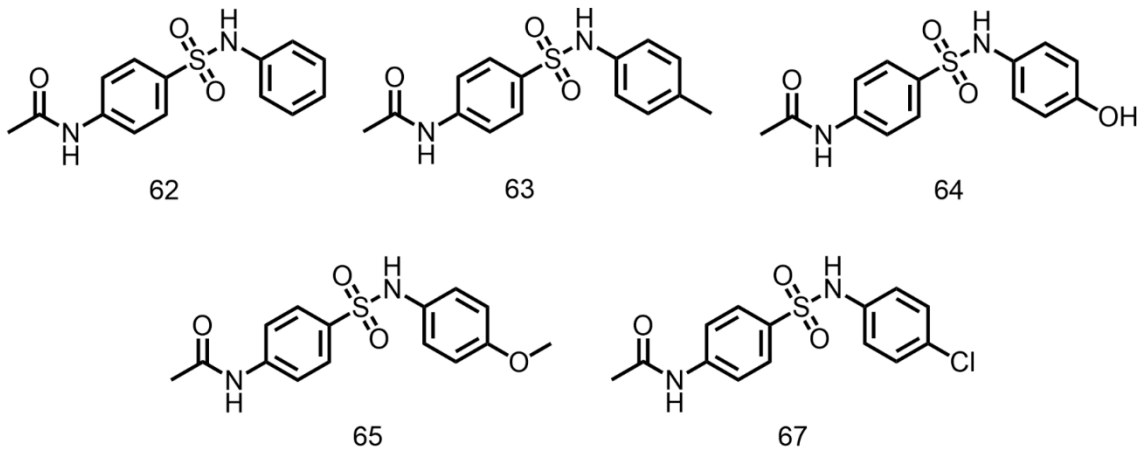




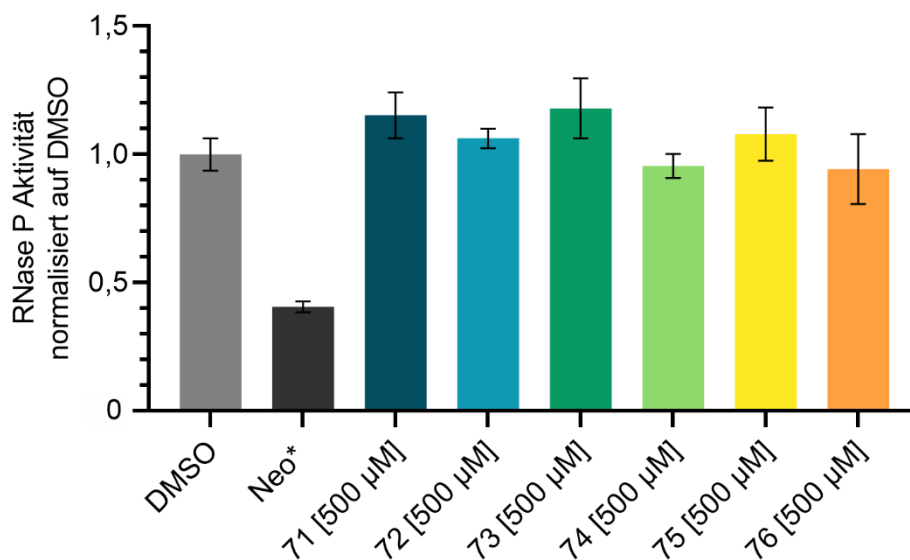
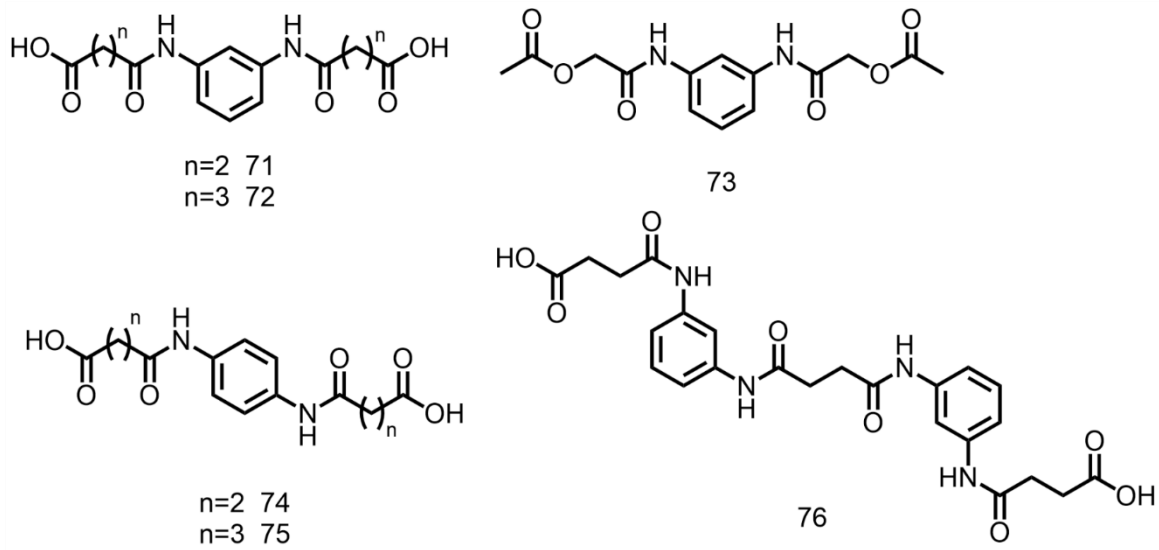
### 5.2.1.3 Ir6Ac-Derivate



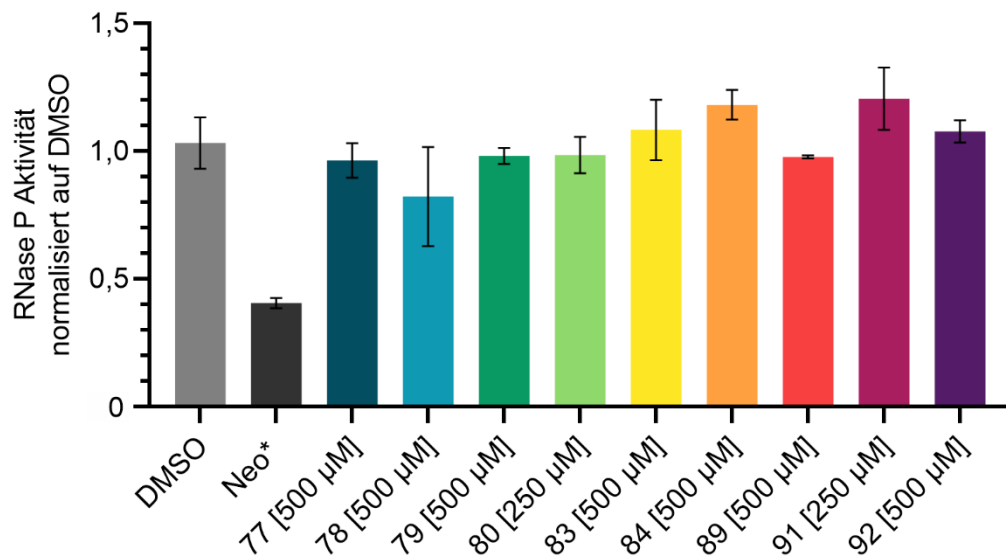
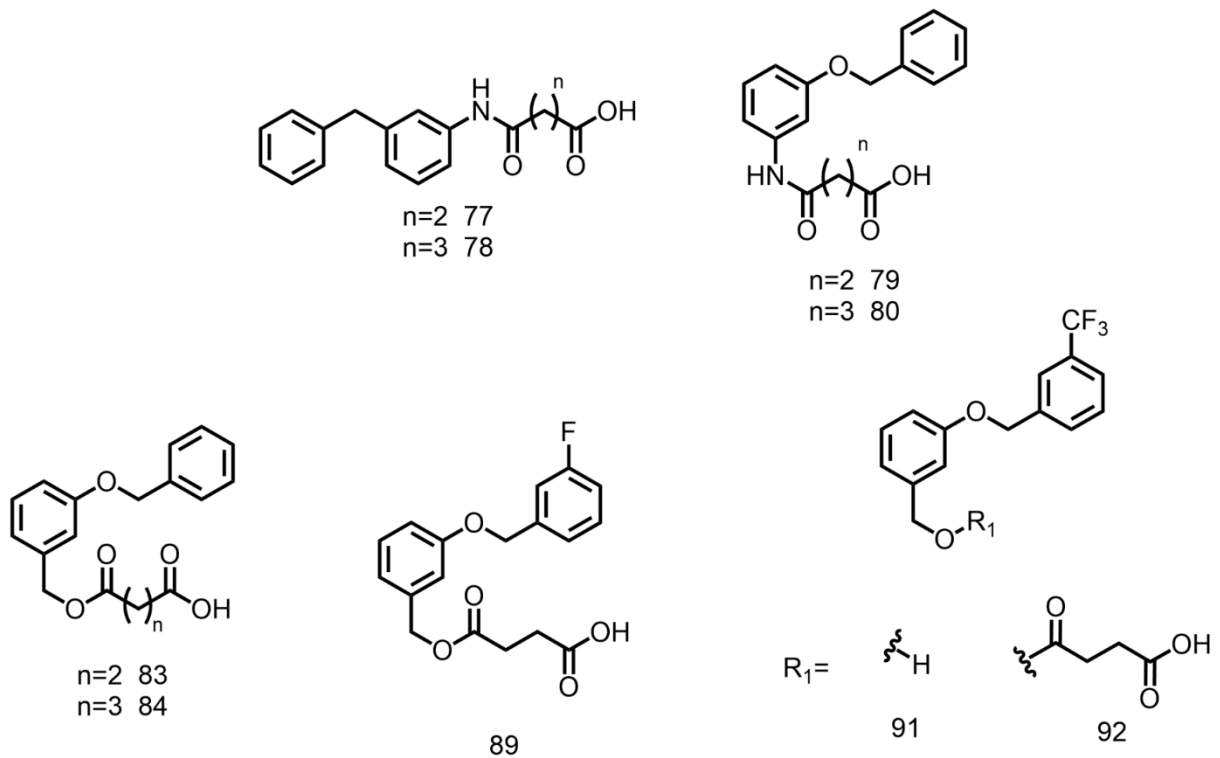
5.2.1.4 Sulfonamid-Derivate



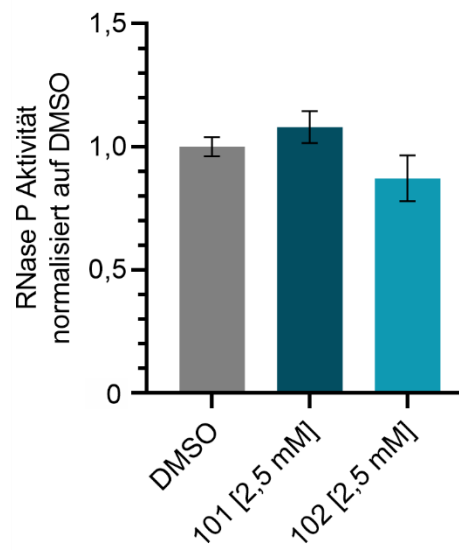
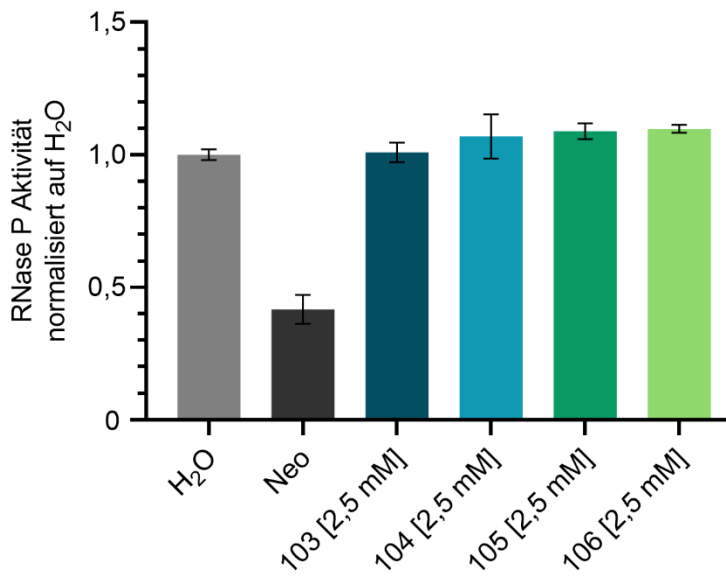
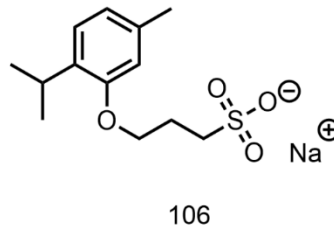
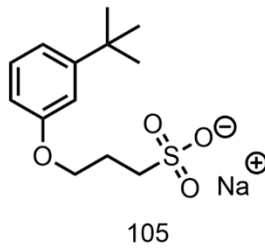
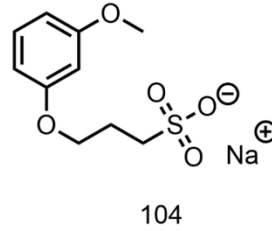
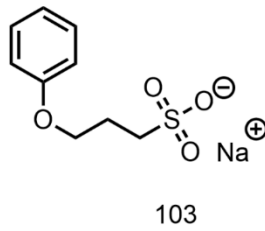
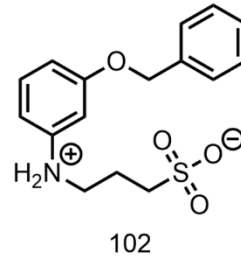
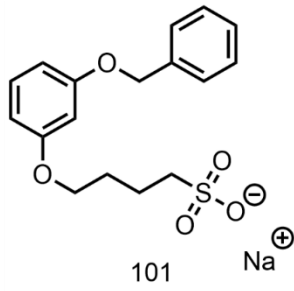
5.2.1.5 Struktur-basierter Ansatz



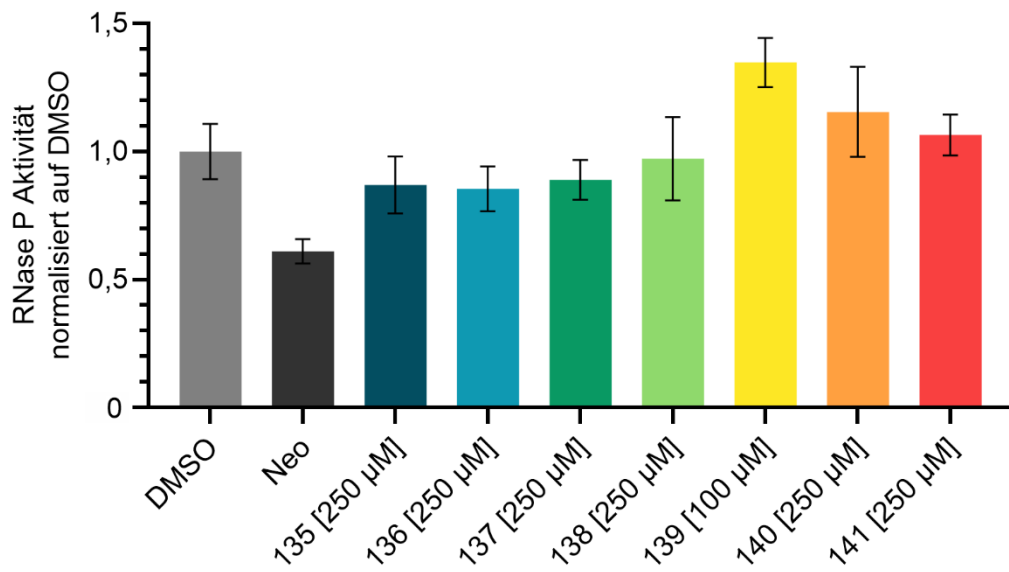
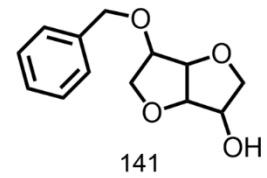
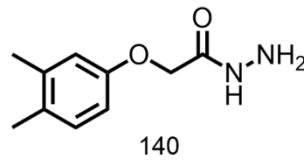
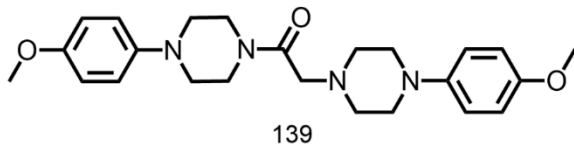
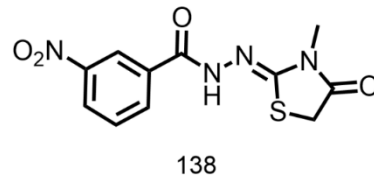
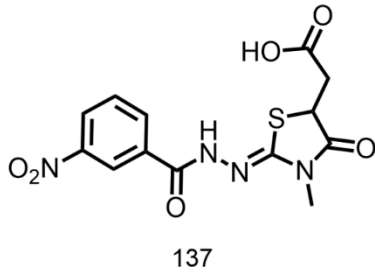
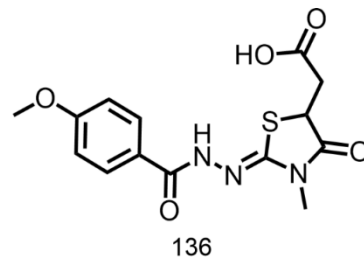
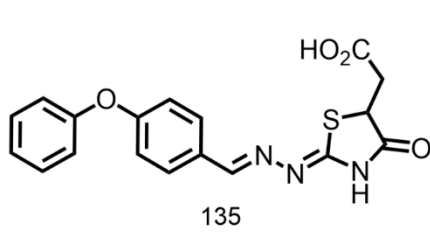
Die Neomycin-Kontrolle (100 µM) wurde auf die Wasser- und nicht die DMSO-Kontrolle normalisiert und ist deswegen mit „\*“ gekennzeichnet.



Die Neomycin-Kontrolle (100 µM) wurde auf die Wasser-Kontrolle normalisiert und ist deswegen mit „\*“ gekennzeichnet.



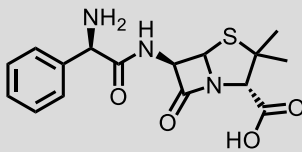
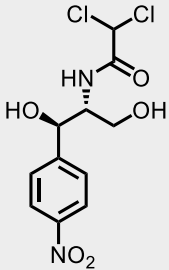
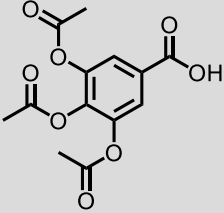
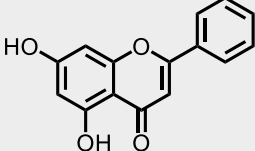
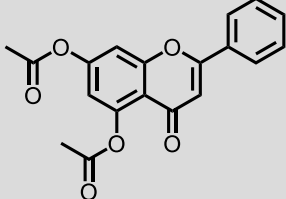
5.2.1.6 Weitere Verbindungen



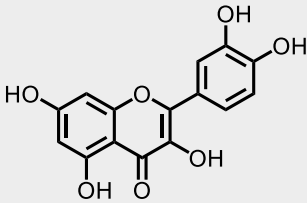
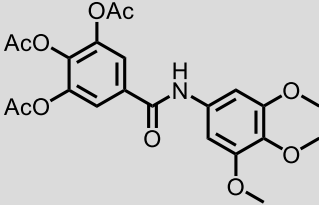
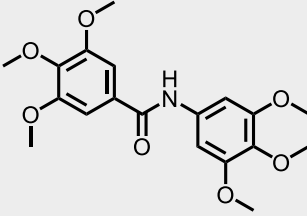
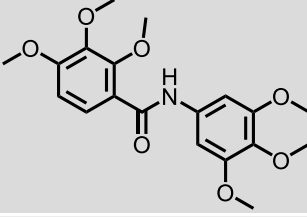
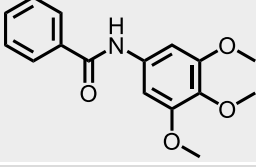
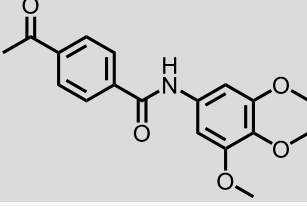
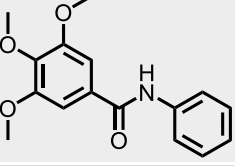
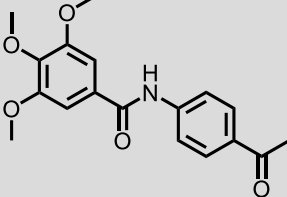
### 5.2.2 Ergebnisse des Hemmhoftests

Für den Hemmhoftest wurde der *E. coli* AS19-Stamm mit Lipopolysaccharid-Defekt verwendet. In jedes Viertel einer Agarplatte wurde ein Filter mit einem Durchmesser von 6 mm platziert. Je 10 µL der Stammlösung, der Positivkontrolle oder des Lösungsmittels wurden auf diesen Filter pipettiert. Die Konzentration (c) der verwendeten Stammlösung einer zu testenden Verbindung (Nummer mit „#“ gekennzeichnet) ist der Spalte „c [mM]“ zu entnehmen. Die Inkubation der Platten erfolgte über 15-16 Stunden bei 37 °C. Der Durchmesser des entstandenen Hemmhofs wurde mit Lineal gemessen. Waren die Effekte lediglich sehr schwach ausgeprägt, so war das Messen des Durchmessers d nur schwer möglich. Diesem Problem wurde damit begegnet, dass in der Spalte „d Hemmhof“ für den beobachteten Effekt ein „w“ für *weak* (schwach) vermerkt wurde. Wurde für alle drei biologischen Replikate ein Effekt beobachtet, so ist dies in der Tabelle grün hinterlegt. Traten die Effekte hingegen lediglich bei zwei Replikaten auf, wurde dies mit einem orangenen Farbton kenntlich gemacht.

#### 5.2.2.1 Ir6Ac-Derivate

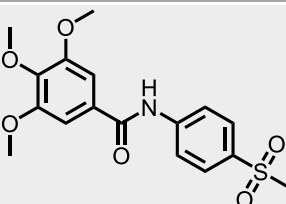
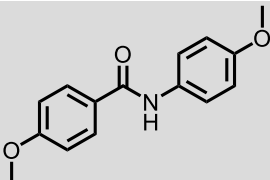
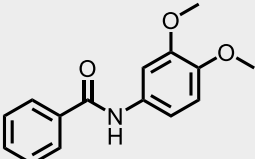
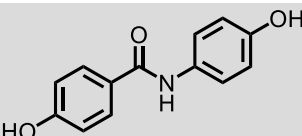
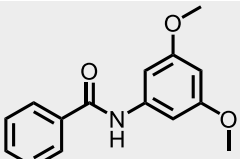
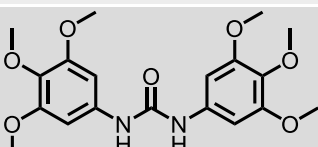
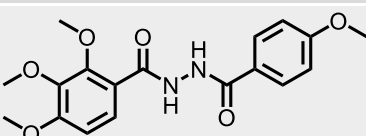
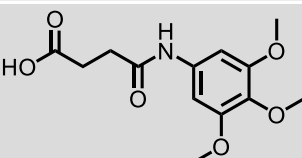
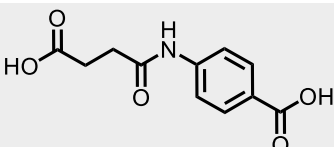
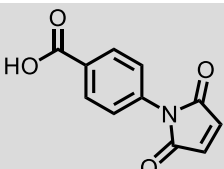
#	Struktur	c [mM]	d Hemmhof [mm]		
Ampicillin		2,86	21 26 25 18 17	20 23 25 19 16	19 21 17 20 16,5
Chloramphenicol		9,29	34	32	34
32		50	-	-	-
Chrysin		50	-	-	-
33		25	-	-	-

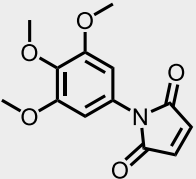
Anhang - Ergebnisse der Inhibitoren-Testungen

#	Struktur	c [mM]	d Hemmhof [mm]		
Quercetin		50	w	w	-
34		50	-	-	-
35		50	-	-	-
36		50	-	-	w
37		50	-	-	-
38		50	-	-	-
39		50	w	w	w
40		50	-	-	-

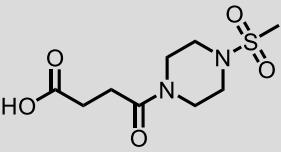
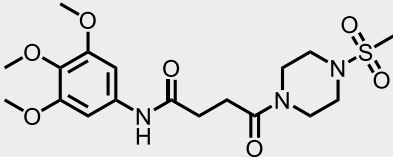
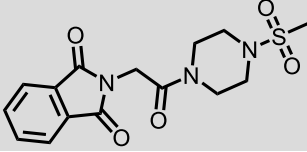
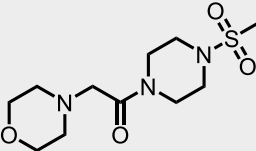
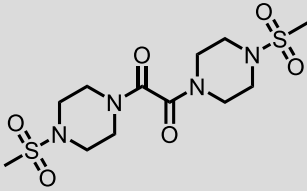
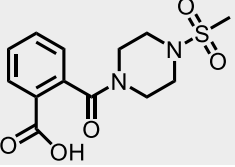
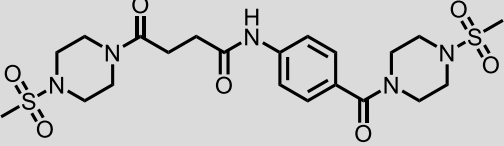
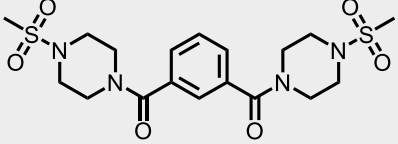


Anhang - Ergebnisse der Inhibitoren-Testungen

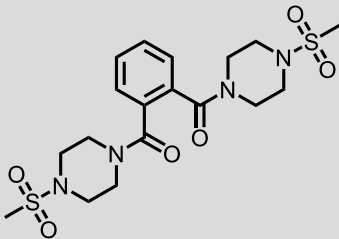
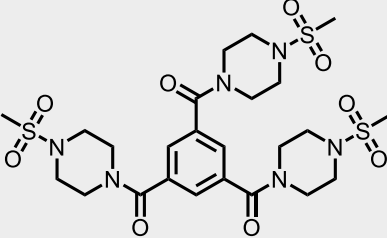
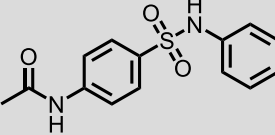
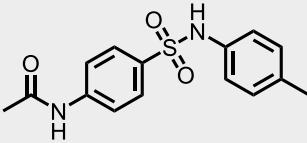
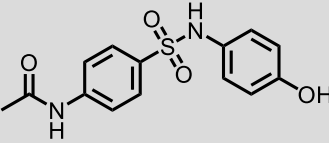
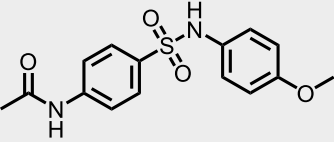
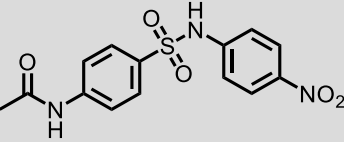
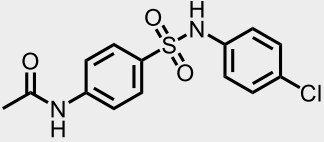
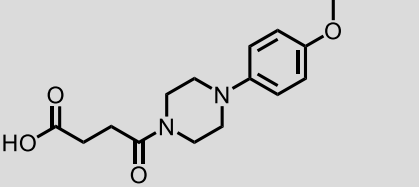
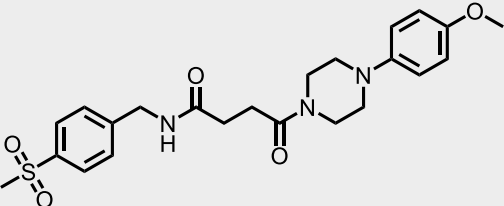
#	Struktur	c [mM]	d Hemmhof [mm]		
41		50	-	-	-
42		50	-	-	-
43		50	-	-	-
44		50	10	w	w
45		50	w	-	-
46		50	-	-	-
47		50	-	-	-
48		50	-	-	-
49		50	-	-	-
50		50	9	10	10

#	Struktur	c [mM]	d Hemmhof [mm]		
51		25	10	9	9

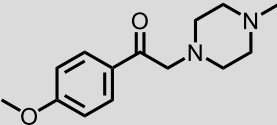
### 5.2.2.2 Piperazin- und Sulfonamid-Derivate

#	Struktur	c [mM]	d Hemmhof [mm]		
52		50	-	-	-
53		50	-	-	-
54		50	-	-	-
55		50	-	-	-
56		16,7	-	-	-
57		50	-	-	-
58		50	-	-	-
59		25	-	-	-

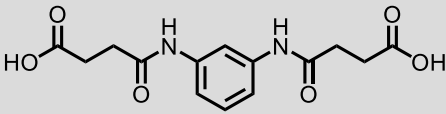
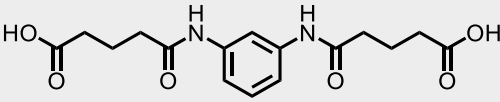
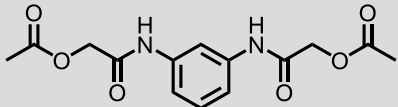
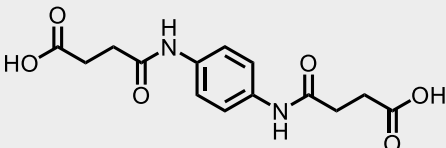
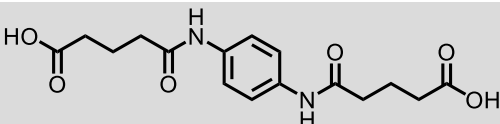
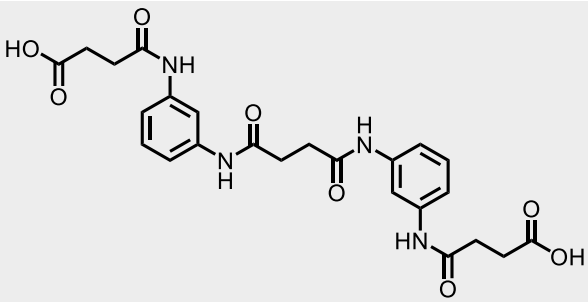
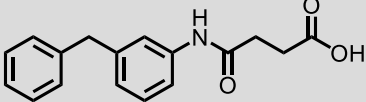
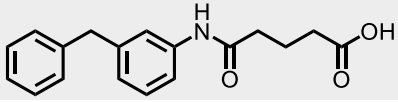
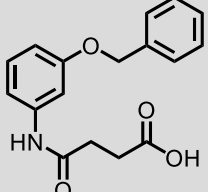
Anhang - Ergebnisse der Inhibitoren-Testungen

#	Struktur	c [mM]	d Hemmhof [mm]		
60		50	-	-	-
61		25	-	-	-
62		50	w	w	w
63		50	-	w	w
64		50	w	9	11
65		50	13	11	w
66		50	-	-	-
67		50	17	17	18
68		50	-	-	-
69		25	-	-	-

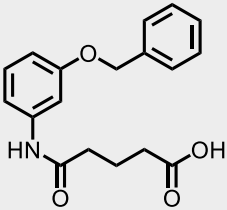
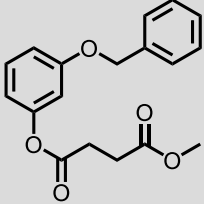
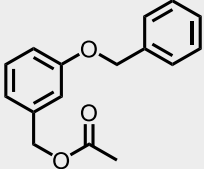
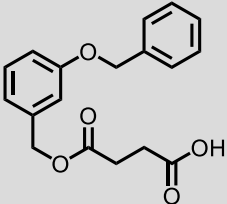
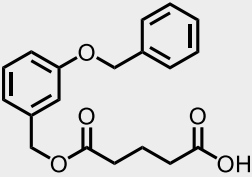
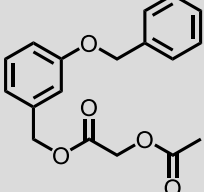
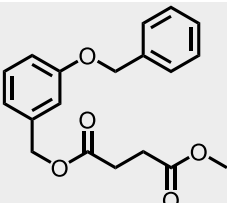
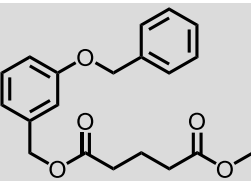
Anhang - Ergebnisse der Inhibitoren-Testungen

#	Struktur	c [mM]	d Hemmhof [mm]		
70		50	-	-	-

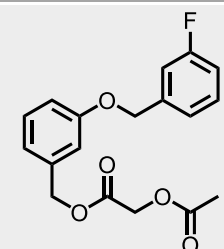
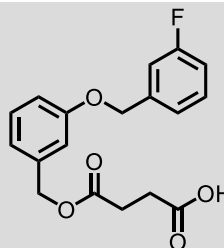
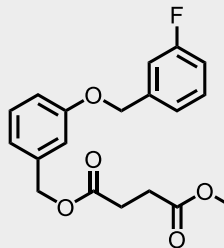
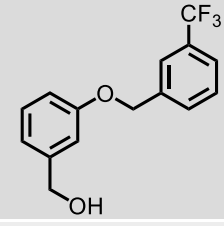
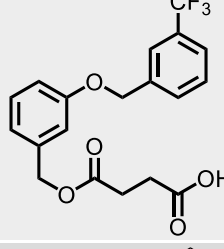
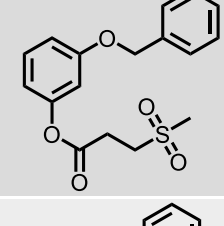
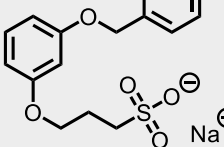
5.2.2.3 Struktur-basierter Ansatz

#	Struktur	c [mM]	d Hemmhof [mm]		
71		50	-	-	-
72		50	-	-	-
73		50	-	-	-
74		50	-	-	-
75		50	-	-	-
76		50	-	-	-
77		50	w	w	w
78		50	-	w	w
79		50	-	w	w

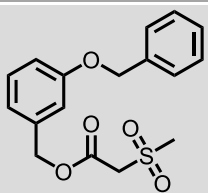
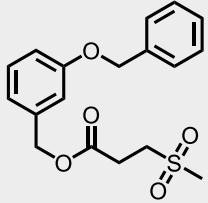
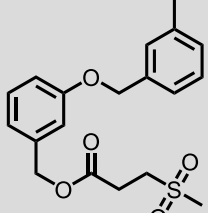
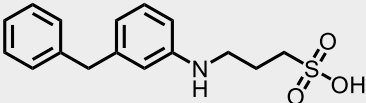
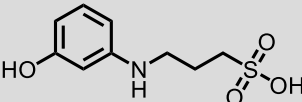
Anhang - Ergebnisse der Inhibitoren-Testungen

#	Struktur	c [mM]	d Hemmhof [mm]		
80		50	-	w	w
81		50	-	-	-
82		50	-	-	w
83		50	w	11	9
84		50	w	9	w
85		50	w	-	-
86		50	-	-	-
87		50	-	-	-

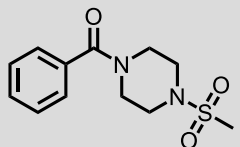
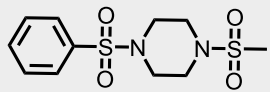
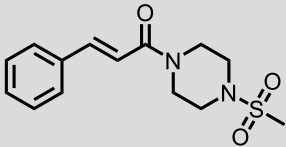
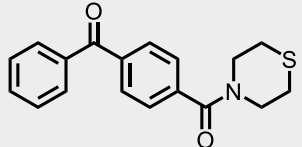
Anhang - Ergebnisse der Inhibitoren-Testungen

#	Struktur	c [mM]	d Hemmhof [mm]		
88		50	-	-	-
89		50	w	13	12
90		50	-	-	-
91		50	11	14	14
92		50	11	13	11
93		50	-	-	-
94		25	-	-	-

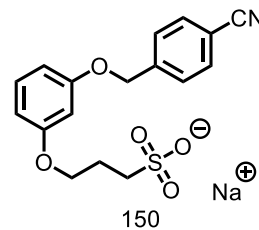
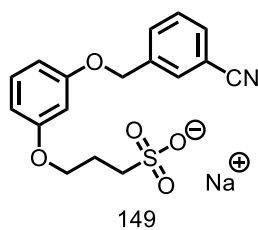
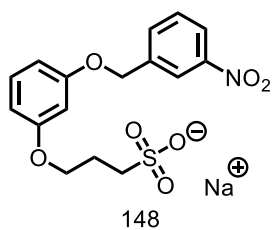
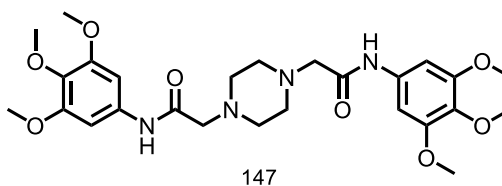
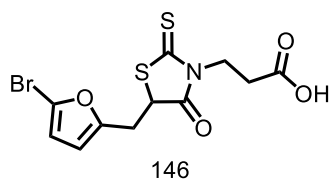
Anhang - Ergebnisse der Inhibitoren-Testungen

#	Struktur	c [mM]	d Hemmhof [mm]		
95		50	-	-	-
96		50	-	w	-
97		50	-	-	-
98		50	-	-	-
99		50	-	-	-

5.2.2.4 Weitere Verbindungen

#	Struktur	c [mM]	d Hemmhof [mm]		
142		50	-	-	-
143		50	-	-	-
144		50	-	-	-
145		16,7	-	-	-

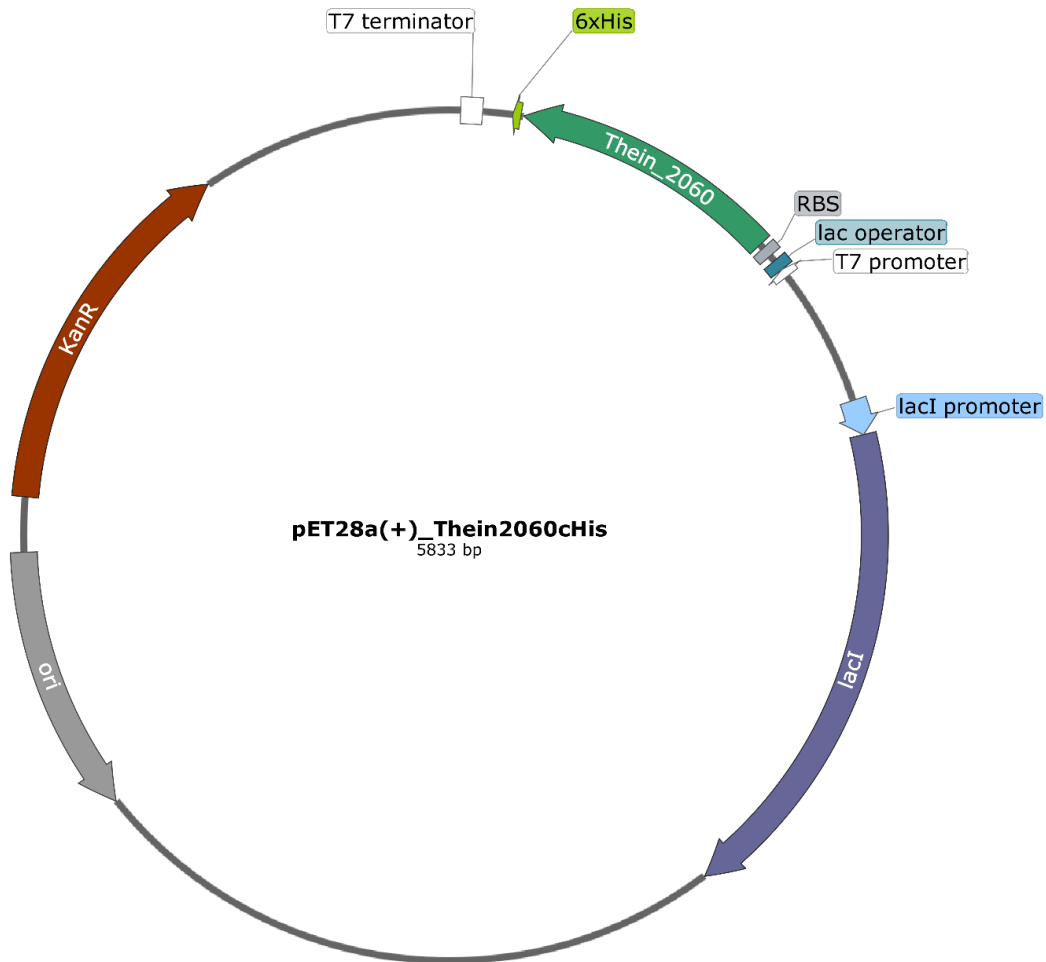
### 5.2.3 Nicht lösliche Verbindungen





## 5.3 Plasmidkarten

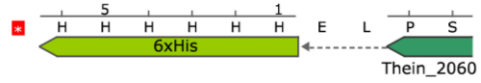
### 5.3.1 Plasmide zur rekombinanten Proteinexpression pET28a(+) mit Sequenz für das *T. indicus* HARP



# Anhang - Plasmidkarten

## Proteinsequenz mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag

GCAGCAGCCAAC TCAGCTTCCTTT CGGGCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGC TCGAGAGGACT  
 CGTCGTCGGTTGAGTCGAAGGAAAGCCCGAAACAATCGTCGGCCTAGAGTCACCACCACCACCACCAGAGCTCTCTCTGA



GTAAATAAGGCCTTCTATGGTATCTCTTATTTCTTCTGGTGGTATCCACCTTATACCCATTTTATCTGCTAGGTTAAGAA  
 CATTATTCCGGAAGATACCATAGAGAATAAAGAAGACCACCATAGGTGGAATATGGGTAAAATAGACGATCCAATTCTT

Y I L G E I T D R I E E P P I W R I G M K D A L N L I  
 Thein\_2060

TACCGCATCAGCAGAAAGTAATAACCCATCAAGTTCAAGAGCTAAAAGAATTAATTCATGTCTTCTTTGGAATCAACA  
 ATGGCGCTAGTCGTCCTTTCAATTATTGGGTAGTTC AAGTTCGATTTTCTTAATTAAGATACAGAAGAAACCTTAGTTGT

G R D A S L L L G D L E L A L L I L E I D E K S D V  
 Thein\_2060

ATACCTTCTCGTAAGGCCTCGCGGTATTTACGCTGAGGGCATTTAATTTTCGTCAGGACTTTTGTGCGCAGAGGCCCT  
 TATGGAAGAGCATTCCGGAGCGCCATAAATGCAGACTCCCGTAAATTATAAAGCAGTCTGAAAACACGCGTCTCCGGGA

I G E R L A E R Y K R R L A N L I E D P S K H A S A R  
 Thein\_2060

TACTGCCTCTTCAGCCACCTTAAACCTTTATTAATACGCTGCCTAATATCATCTATTAGTTCGTAAAGTAAAAAGCAG  
 ATGACGGAGAAGTCGGTGGGAATTTGGAATAATTATGCGACGGATTATAGTAGATAATCAAGCATTTCATTTTTTCGTC

V A E E A V R L G K N I R Q R I D D I L E Y L L F A P  
 Thein\_2060

GTATCTGAATTCATATTTTTTAGGTGATTTAAC TCGAAATACTGC TCTAGCTTTAGGGGGAATTTTTGGGTTTTTGAGC  
 CATAGACTTAAAGTATAAAAAATCCACTAAATTGAGCTTTATGACGAGATCGAAATCCCCCTTAAAAACCCAAAACTCG

I Q I E Y K K P S K V R F V A R A K P P I K P N K L  
 Thein\_2060

ATTTTTTTTAGTTCATCGTAAACCGAAGAAGGCATATAAACTTTGACATTGGGAGCTTTGGCCACTAATTTCAAAAAATT  
 TAAAAAAATCAAGTAGCATTGGCTTCTCCGTATATTTGAAACTGTAACCCTCGAAACCGGTGATTAAGATTTTTTAA

M K K L E D Y V S S P M Y V K V N P A K A V L E L F N  
 Thein\_2060

GGCGAAAGCCTCATTGGGAGAATTCCGAATTCGCGATAAACATCAGGATTGGTAAAAACACTGGTGT CAGGAATTAATC  
 CCGCTTTCGGAGTAACCCTCTTAAAGGCTTAAAGCGCTATTTGTAGTCCTAACCATTTTGTGACCACAGTCTTAATTAG

A F A E N P S N G F E R Y V D P N T F V S T D P I L R  
 Thein\_2060

TTTCTCTTTCAACTTCTAATTCAAAAGCCATCCATGGTATATCTCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGG  
 AAAGAGAAAGTTGAAGATTAAGTTTTCGGTAGGTACCATATAGAGGAAGAATTTCAATTTGTTTTAATAAAGATCTCCCC

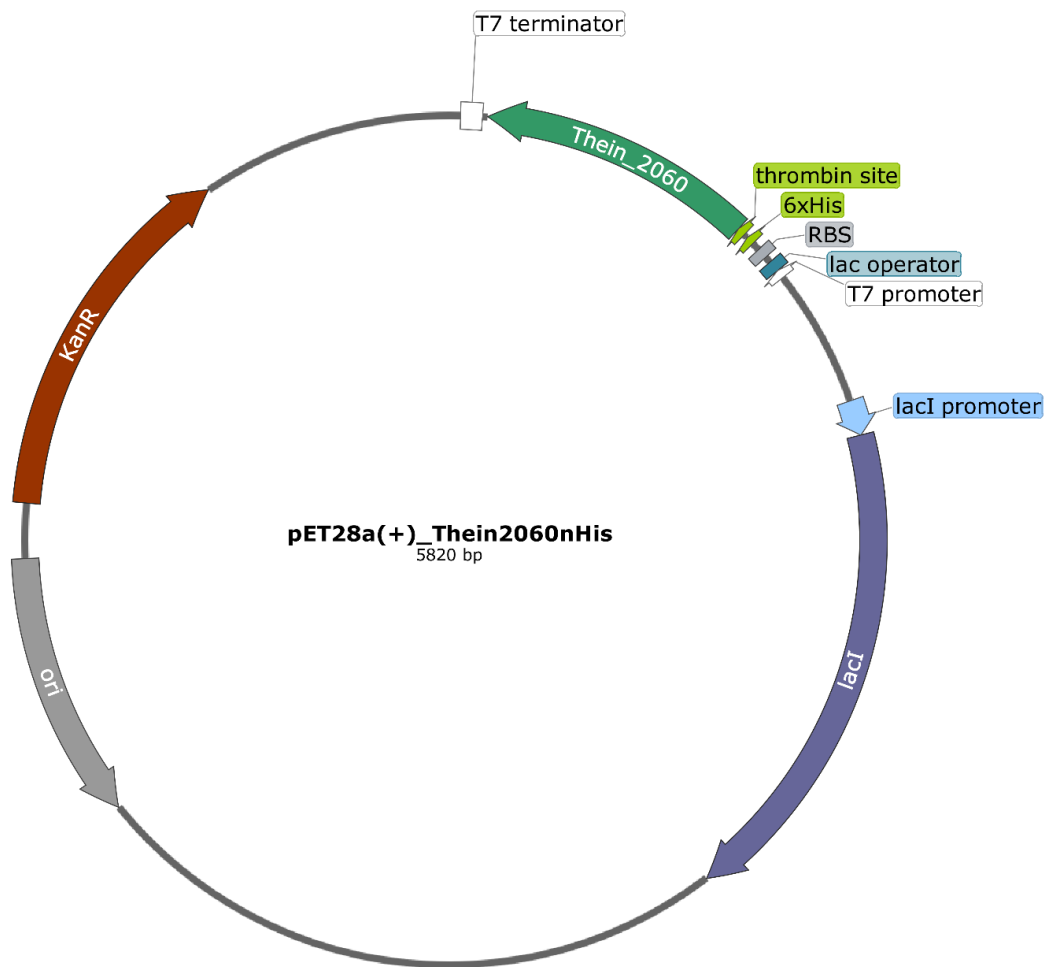
E R E V E L E F A M  
 Thein\_2060



AATTGTTATCCGCTCACAAATCCCCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGCGGGATCGAGATCTCGATCCTCTACGCCGGAC  
 TTAACAATAGGCGAGTGTTAAGGGGATATCACTCAGCATAATTAAGCGCCCTAGCTCTAGAGCTAGGAGATGCGGCCGTG



**pET28a(+)** mit Sequenz für das *T. indicus* HARP



# Anhang - Plasmidkarten

## Proteinsequenz mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag

TCAGCTTAAGGACTGTAATAAGGCCTTCTATGGTATCTCTTATTTCTTCTGGTGGTATCCACCTTATACCCATTTTATC  
 AGTCGAATTCCTGACATTTATCCGGAAGATACCATAGAGAATAAAGAAGACCACCATAGGTGGAATATGGGTAAATAG

200 195 190 185 180  
 P S Y I L G E I T D R I E E P P I W R I G M K D  
 Thein\_2060

TGCTAGGTTAAGAATACCGCGATCAGCAGAAAAGTAATAACCCATCAAGTTCAAGAGCTAAAAGAATTAATTCTATGTCTT  
 ACGATCCAATTCTTATGGCGCTAGTCGTCTTTCATTATTGGGTAGTTCAAGTTCCTCGATTTTCTTAATTAAGATACAGAA

175 170 165 160 155  
 A L N L I G R D A S L L L G D L E L A L L I L E I D E  
 Thein\_2060

CTTTGGAATCAACAATACCTTCTCGTAAGGCCTCGCGGTATTTACGTCTGAGGGCATTTAATATTTTCGTCAGGACTTTTG  
 GAAACCTTAGTTGTTATGGAAGAGCATTCCGGAGCGCCATAAATGCAGACTCCCGTAAATTATAAAGCAGTCTGAAAAC

150 145 140 135 130  
 K S D V I G E R L A E R Y K R R L A N L I E D P S K  
 Thein\_2060

TGCGCAGAGGCCCTTACTGCCTCTTCAGCCACCTTAAACCTTTATTAATACGCTGCCTAATATCATCTATTAGTTCGTA  
 ACGCGTCTCCGGGAATGACGGAGAAGTCGGTGGGAATTTGGAAAATAATTATGCGACGGATTATAGTAGATAATCAAGCAT

125 120 115 110 105 100  
 H A S A R V A E E A V R L L G K N I R Q R I D D I L E Y  
 Thein\_2060

AAGTAAAAAGCAGGTATCTGAATTTTCATATTTTTAGGTGATTTAACTCGAAATACTGCTCTAGCTTTAGGGGAATTT  
 TTCATTTTTTCGTCCATAGACTTAAAGTATAAAAAATCCACTAAATTGAGCTTTATGACGAGATCGAAATCCCCCTTAAA

95 90 85 80 75  
 L L F A P I Q I E Y K K P S K V R F V A R A K P P I K  
 Thein\_2060

TTGGGTTTTTGAGCATTTTTTTTAGTTCATCGTAAACCGAAGAAGGCATATAAACTTTGACATTGGGAGCTTTGGCCACT  
 AACCCAAAAACTCGTAAAAAAAATCAAGTAGCATTTGGCTTCTCCGTATATTTGAAACTGTAACCCTCGAAACCGGTGA

70 65 60 55 50  
 P N K L M K K L E D Y V S S P M Y V K V N P A K A V  
 Thein\_2060

AATTCAAAAAATTGGCGAAAGCCTCATTGGGAGAATTTCCGAATTCGCGATAAACATCAGGATTGGTAAAAACACTGGT  
 TTAAGATTTTTAAACCGCTTTCGGAGTAACCCCTTAAAGGCTTAAGCGCTATTTGTAGTCTTAACCATTTTTGTGACCA

45 40 35 30 25 20  
 L E L F N A F A E N P S N G F E R Y V D P N T F V S T  
 Thein\_2060

GTCAGGAATTAATCTTTCTTTCAACTTCTAATTCAAAGCGCTAGCCATATGGCTGCCGCGCGCACCCAGGCCGCTGC  
 CAGTCCTTAATTAGAAAGAGAAAGTTGAAGATTAAGTTTTCGCGATCGGTATACCGACGGCGCGCGTGGTCCGGCGACG

15 10 5 1 5 1  
 D P I L R E R E V E L E F A S A M H S G R P V L G S S  
 Thein\_2060 thrombin site

TGTGATGATGATGATGATGGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTAATTTCTAGAGGGGAATT  
 AACTACTACTACTACTACCGACGACGGGTACCATATAGAGGAAGAATTTCAATTTGTTTTAATAAAGATCTCCCCTTAA

5 1  
 H H H H H H  
 6xHis RBS lac operator

GTTATCCGCTCACAATTCCTTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCGCGGGATCGAGATCTCGATCCTCTACGCCGGACGCAT  
 CAATAGGCGAGTGTAAAGGGGATATCACTCAGCATAATTAAGCGCCCTAGCTCTAGAGCTAGGAGATGCGGCCGTCGTA

lac operator T7 promoter

**pET28a(+)** mit Sequenz für das *S. aureus* RnpA

Plasmidkarte siehe 3.2.3.9, Seite 55

Proteinsequenz des *S. aureus* RnpA mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag

ATCCGGATATAGTTCTCCTTTTCAGCAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTGC  
 TAGGCCTATATCAAGGAGGAAAGTCGTTTTTTGGGGAGTTCTGGGCAAAATCTCCGGGGTTCCCAATACGATCAATAACG

T7 terminator

TCAGCTTACTTAATCTTTTTATTA AAAACTTTGGCAATTTAAGTACGTGCTCAAGACTATTCTGTATTTGTAAAGTCGT  
 AGTCGAATGAATTAGAAAAATAATTTTGA AACCGTTAAAATTCATGCACGAGTTCTGATAAGACATAAACATTTTCAGCA

K I K K N F V K A I K L V H E L S N Q I Q L T T  
 S. aureus rnpA

CATATCTTTAGCTGGCTGTCTTGCTATTACAATAATATCTTTGGCCAATATATGCGACTTATGTACTTTGAAATTTTCAC  
 GTATAGAAATCGACCGACAGAACGATAATGTTATTATAGAAACCGGTTATATACGCTGAATACATGAACTTTAAAAGTG

M D K A P Q R A I V I I D K A L I H S K H V K F N E R  
 S. aureus rnpA

GTATTGCTCTTTAATCTTGTCTTAACTGCATTACCTAGTTTTTTAGAAACACTAATACCTAAGCGAAAATGGTCT  
 CATAACGAGAAAATTAGAACAAGAATTGTGACGTAATGGATCAAAAAATCTTTGTGATTATGGATTTCGCTTTTACCAGA

I A R K I K N R L V A N G L K K S V S I G L R F H D  
 S. aureus rnpA

ATTTCTTTATTATTACAAGTGATACAACAAATTGTCTGTTGGCTACAGAATGACCTTTTTTATATATTCTCTGAAAATC  
 TAAAGAAATAATAATGTTCCACATATGTTGTTAACAGACAACCGATGCTTACTGGAAAAAATATAAAGAGACTTTTAG

I E K N N C T Y V V F Q R N A V S H G K K Y I R Q F D  
 S. aureus rnpA

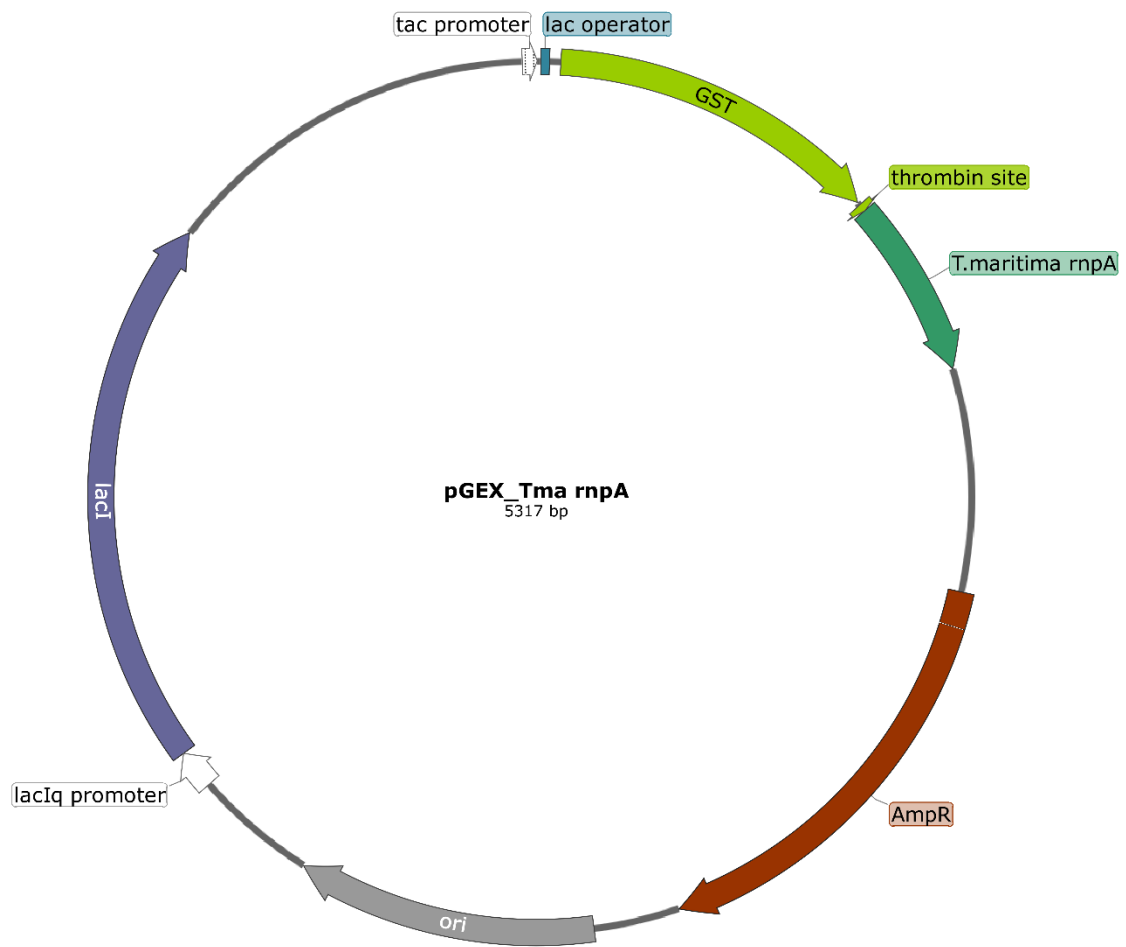
TGCATTCTTTTAATTCGGTAAGCTTTTTCCAATAACATATGGCTGCCGCGCGCACACCAGGCCGCTGCTGTGATGATGAT  
 ACGTAAGAAAAATTAAGCCATTTCGAAAAGGTTATTGTATACCGACGGCGCGCCGTGGTCCGGCGACGACACTACTACTA

A N K K I R Y A K E L L H S G R P V L G S S H H H H  
 S. aureus rnpA thrombin site 6xHis

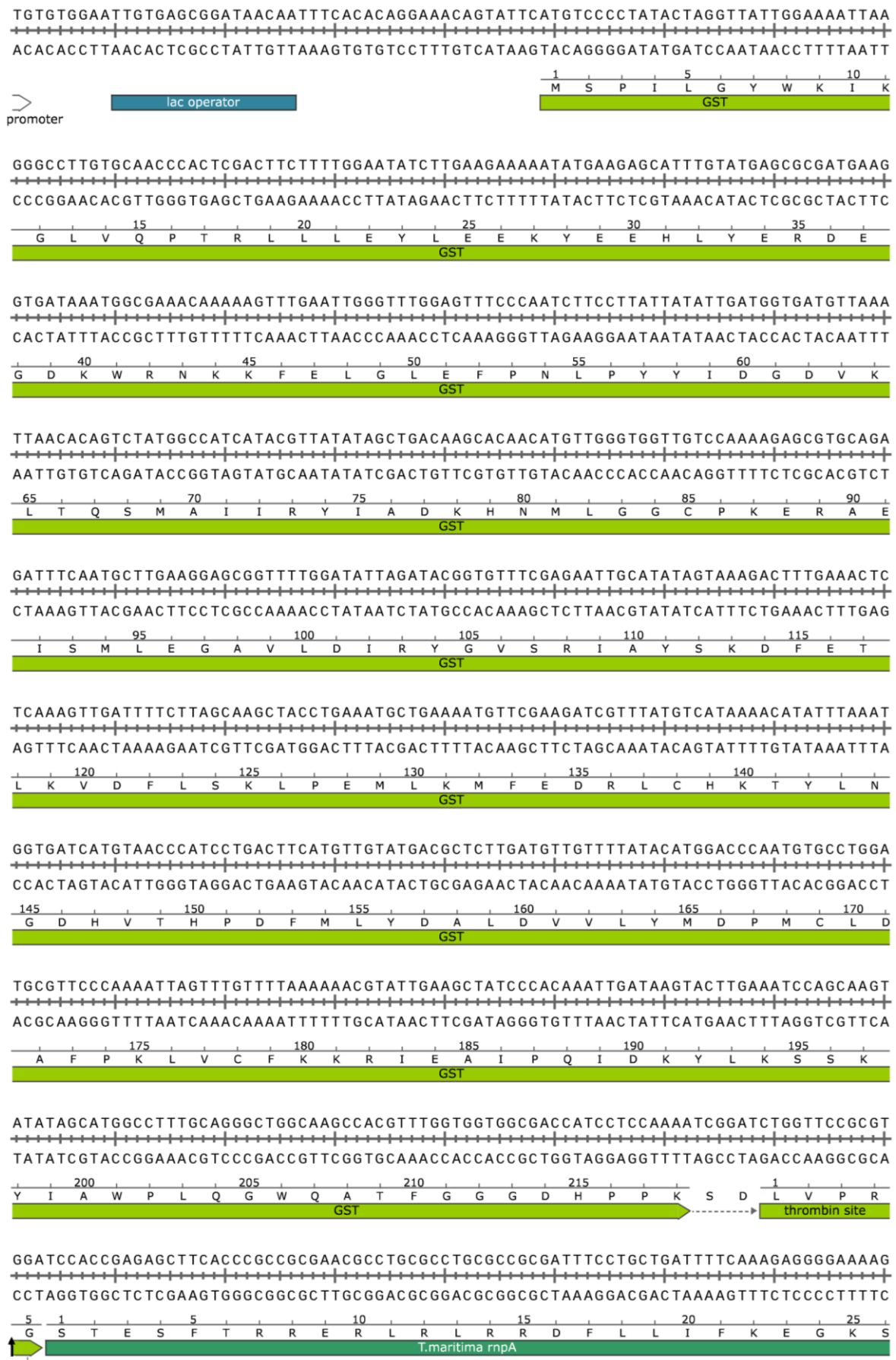
GATGATGGCTGCTGCCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTTCTAGAGGGGAATTGTTATCCGCTCA  
 CTA CTACC GAC GAC GGGT ACC ATATAGAGGAAGAATTTCAATTTGTTTTAATAAAGATCTCCCTTAAACAATAGGCGAGT

H H 1  
 6xHis RBS lac operator

pGEX-4T-1 mit Sequenz für das *T. maritima* RnpA



Proteinsequenz des *T. maritima* RnpA mit N-terminalem GST-Tag



## Anhang - Plasmidkarten

TCTTCAAACGAGTACTTTGTGGTTCTTTTCAGGAAAAACGGGCTTGATTATTCCAGACTGGGAATAGTTGTGAAAAGAA  
AGAAGTTTTGCTCATGAAACACCAAGAAAAGTCCTTTTTGCCCGAACTAATAAGGTCTGACCCCTTATCAACACTTTTCTT  
L Q N E Y F V V L F R K N G L D Y S R L G I V V K R  
T.maritima rnpA

AGTTCGAAAGGCGACCAGAAGAAACAACTGAAAAGATGGGTGAGGGAGATATTCAGAAGGAACAAAGGCCTAATTCCA  
TCAAGCCTTTCGCTGGTCTTCTTTGTTGACTTTTCTACCCACTCCCTCTATAAGTCTTCTTGTTCGCGATTAAGGT  
K F G K A T R R N K L K R W V R E I F R R N K G V I P  
T.maritima rnpA

AAGGGTTTTGACATAGTAGTGATTCCCAGAAAGAACTGTCAGAAGAATTCGAACGAGTGGATTTCTGGACAGTACGTGA  
TTCCCAAACGTATCATCACTAAGGGTCTTTCTTTGACAGTCTTCTTAAGCTTGCTCACCTAAAGACTGTCATGCACT  
K G F D I V V I P R K K L S E E F E R V D F W T V R E  
T.maritima rnpA

AAAGCTTTTGAATCTGCTGAAACGCATTGAAGGATGAGAATTCGCCGGTTCGACTCGAGCGGCCGCATCGTGACTGACTGA  
TTTCGAAAACCTAGACGACTTTGCGTAACTTCC TACTCTTAAGGGCCAGCTGAGCTCGCCGGCGTAGCACTGACTGACT  
K L L N L L K R I E G  
T.maritima rnpA



### 5.3.2 Plasmide für Komplementationsexperimente

#### pDG148(+) mit Sequenz für das *T. indicus* HARP

Plasmidkarte siehe 3.2.3.9, Seite 59

Proteinsequenz des *T. indicus* HARP mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag



# Anhang - Plasmidkarten





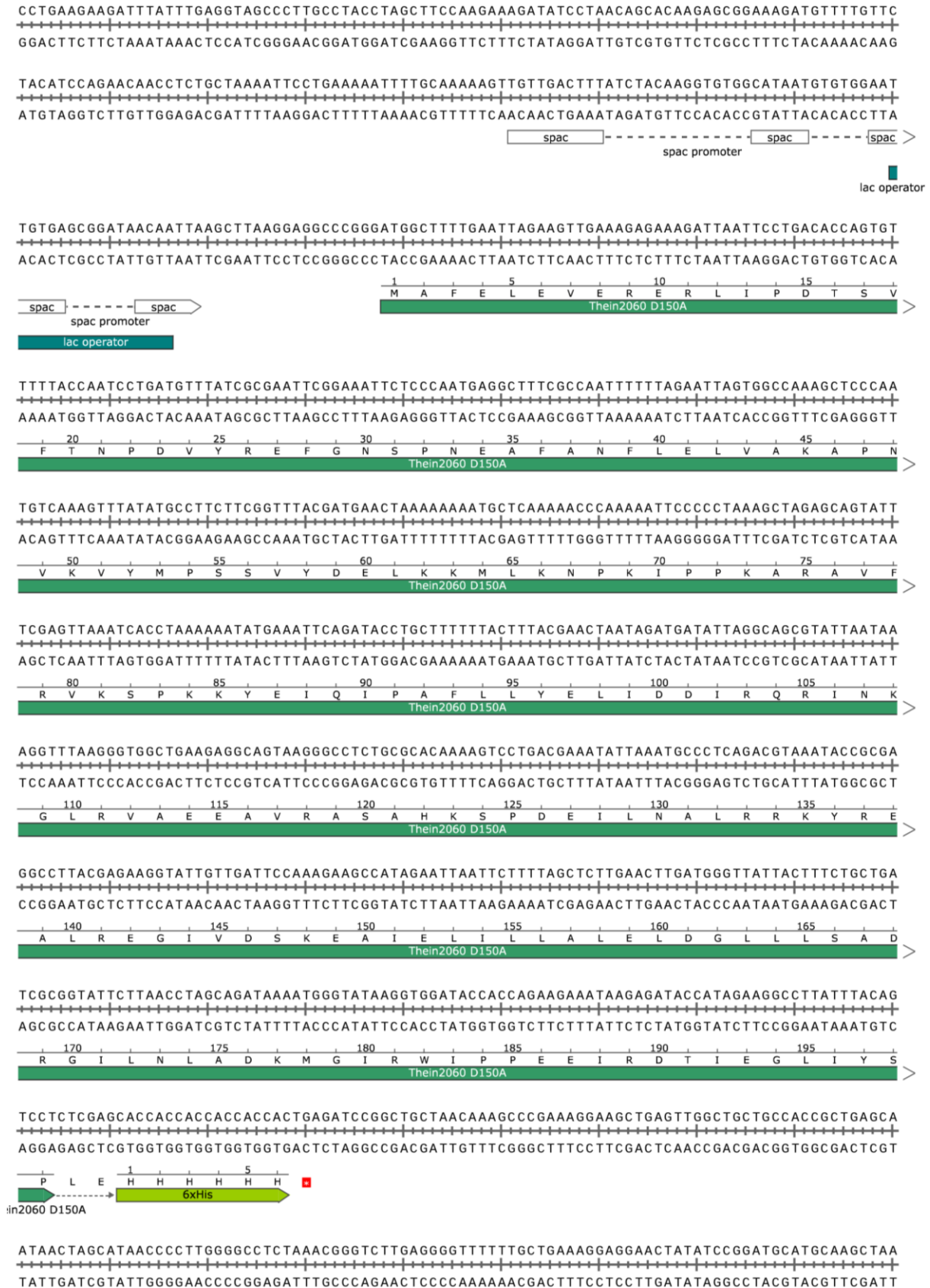
**pdG148(+)** mit Sequenz für die *T. indicus* HARP-Mutante D146A

Proteinsequenz der *T. indicus* HARP-Mutante D146A



**pDG148(+)** mit Sequenz für die *T. indicus* HARP-Mutante D150A

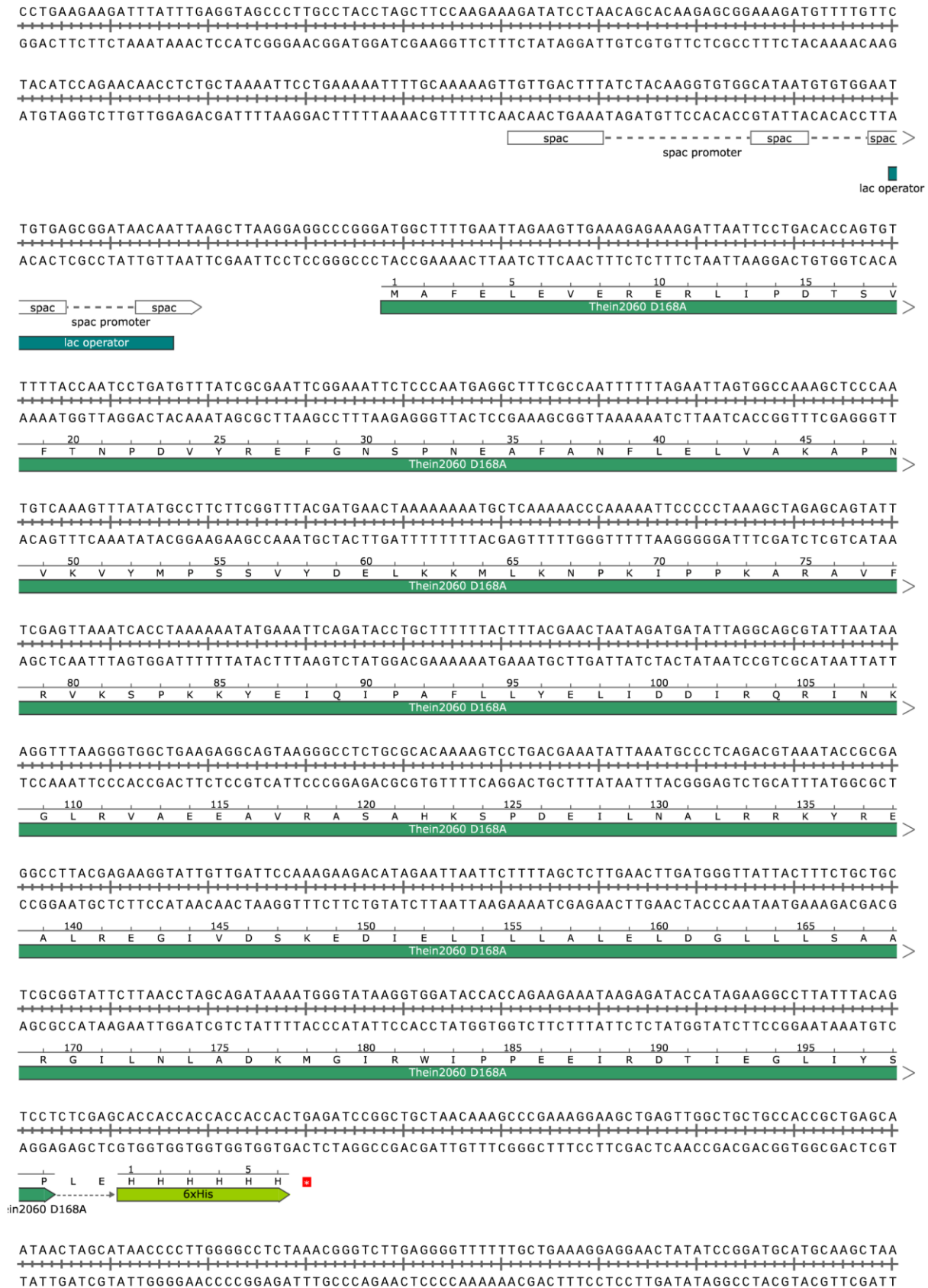
Proteinsequenz der *T. indicus* HARP-Mutante D150A





**pdG148(+)** mit Sequenz für die *T. indicus* HARP-Mutante D168A

Proteinsequenz der *T. indicus* HARP-Mutante D168A

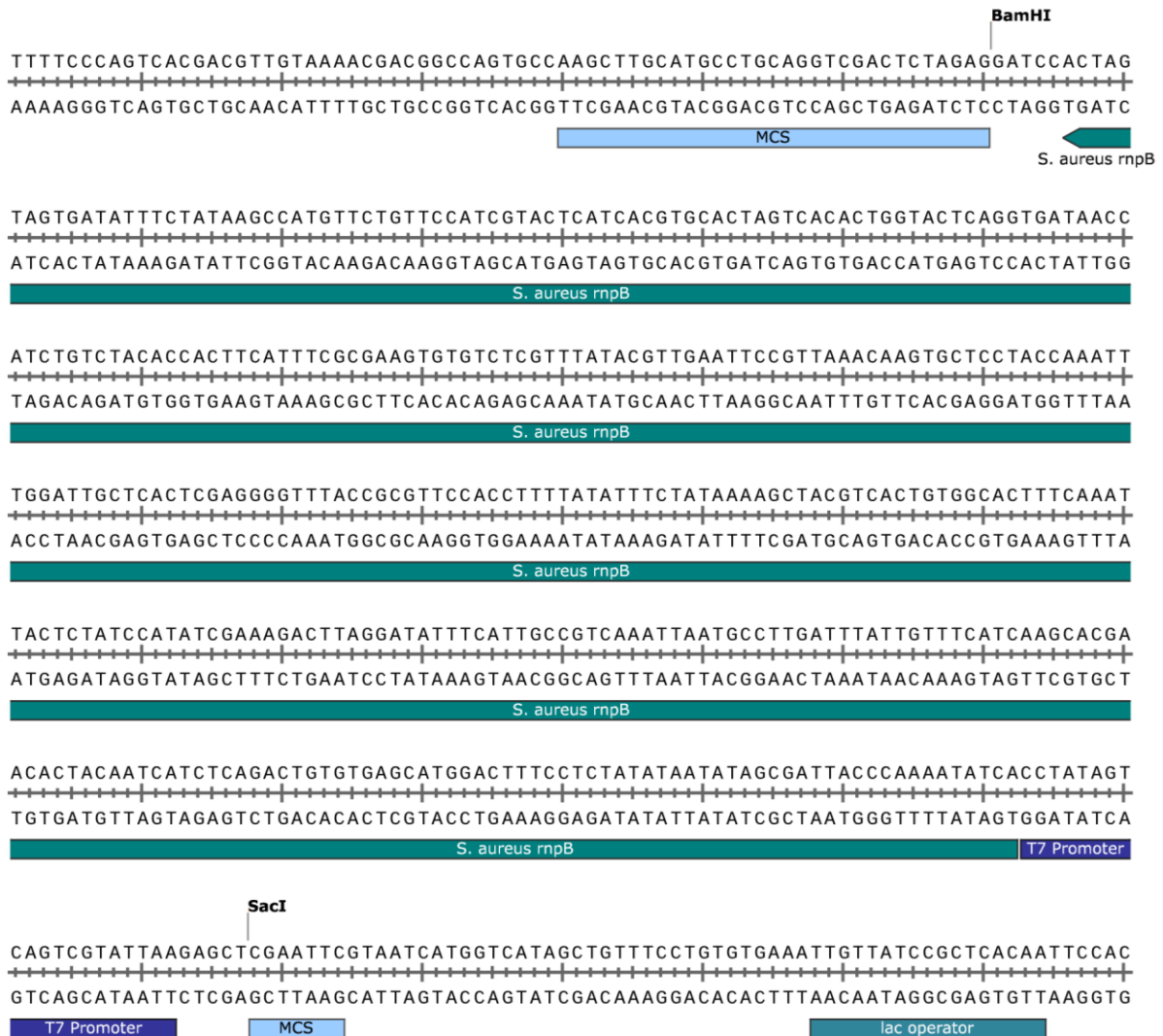


### 5.3.3 Plasmide für *in vitro*-Transkriptionen

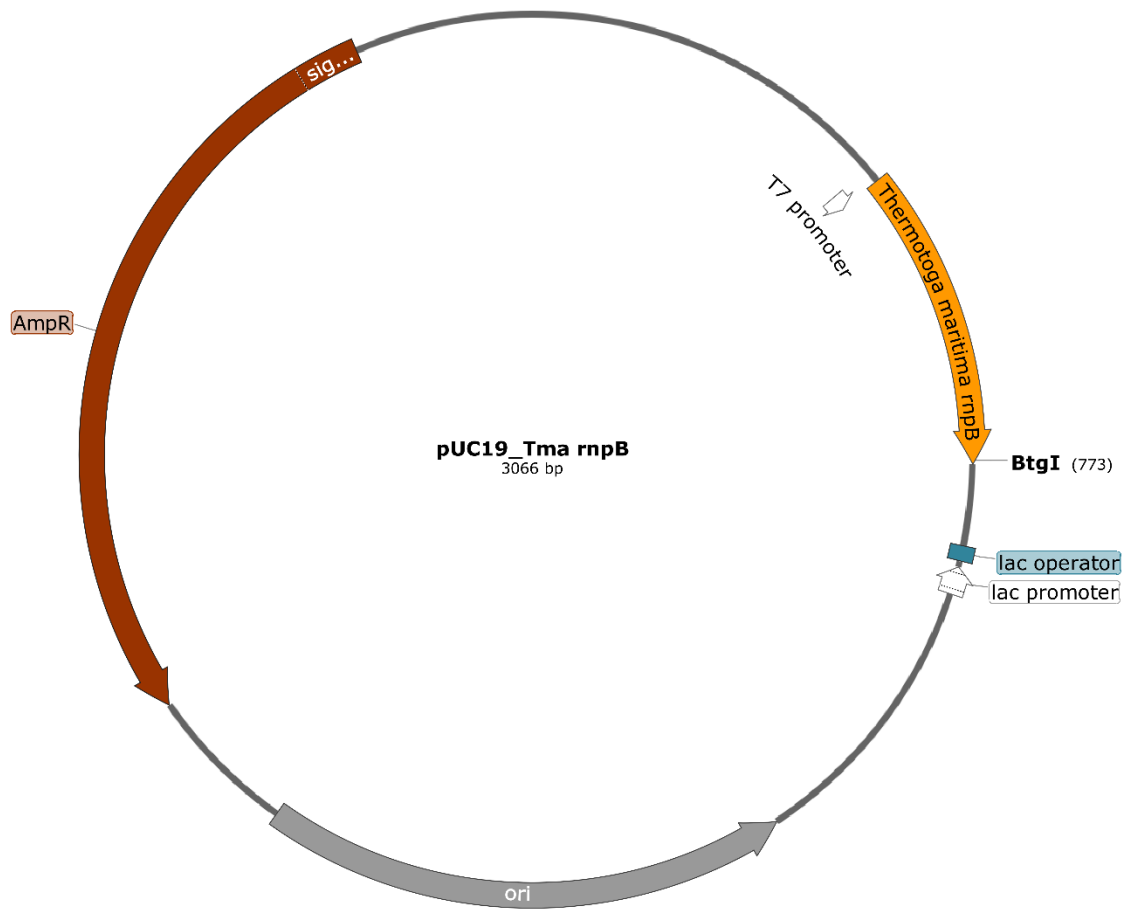
#### pUC18 mit Sequenz für die *S. aureus* P RNA

Plasmidkarte siehe 3.2.3.9, Seite 54

Sequenz der *S. aureus* P RNA



pUC19 mit Sequenz für die *T. maritima* P RNA





Sequenz der *T. maritima* P RNA

CGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTAATACGACTCACTATAGGAGAGGAGCAGGCGGTTCGCGGGGGCGCACACCTGCCTTC  
 GCTCGAGCCATGGGCCCTAGGATTATGCTGAGTGATATCCTCTCCTCGTCCGCCAGCGCCCCGCGTGTGGACGCGAAG



CCGAGGAAAGTCCGGACTCTGGAGCGGGGTGCCGGTAACGCCCGGGAGGGGTGACCCTCGGACAGGGCCATAGAGAAGA  
 GGCTCCTTTCAGGCCCTGAGACCTCGCCCCACGGCCATTGCGGGCCCTCCCACTGGGAGCCTGTCCCGGTATCTCTTCT



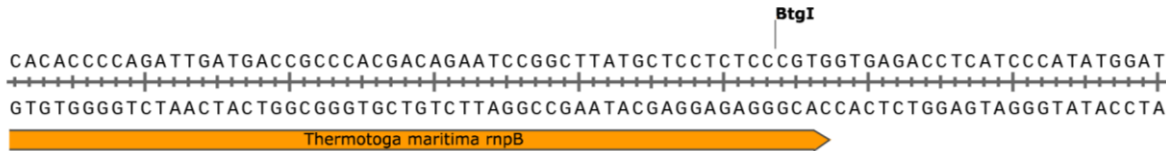
AGACCGCCCGTTGAGGGCAAGGGTGGAAACGGTGGGGTAAGAGCCACCAGCGTCGGGGCAACCCGGCGGCTTGGCAACCC  
 TCTGGCGGGCAACTCCCGTTCCACCTTGCCACCCATTCTCGGGTGGTCGCAGCCCCGTTGGGCCGCCGAACCGTTGGG



CCACCTGGAGCAAGGCCAAGCAGGGGGTTGGGTATATCCCCCTATTCCCCGGGTTGGCCGCTTGAGGTGTGCGGTAACG  
 GGTGGACCTCGTTCGGTTCGTCCCCCAACCCATATAGGGGGATAAGGGGGCCCAACCGGCGAACTCCACACGCCATTGC



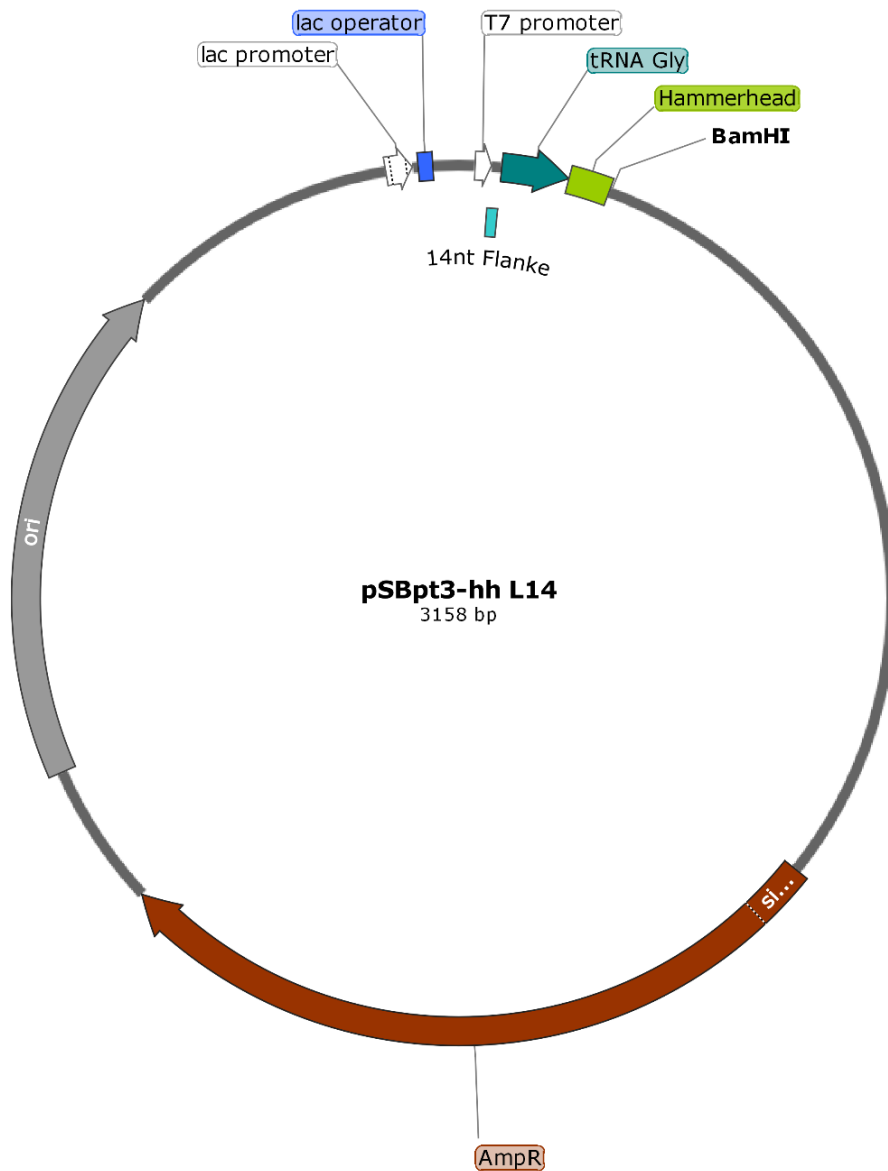
CACACCCAGATTGATGACCGCCACGACAGAATCCGGCTTATGCTCCTCTCCCGTGGTGAGACCTCATCCCATATGGAT  
 GTGTGGGGTCTAACTACTGGCGGGTGTGCTTAGGCCGAATACGAGGAGAGGGCACCACCTCTGGAGTAGGGTATACCTA



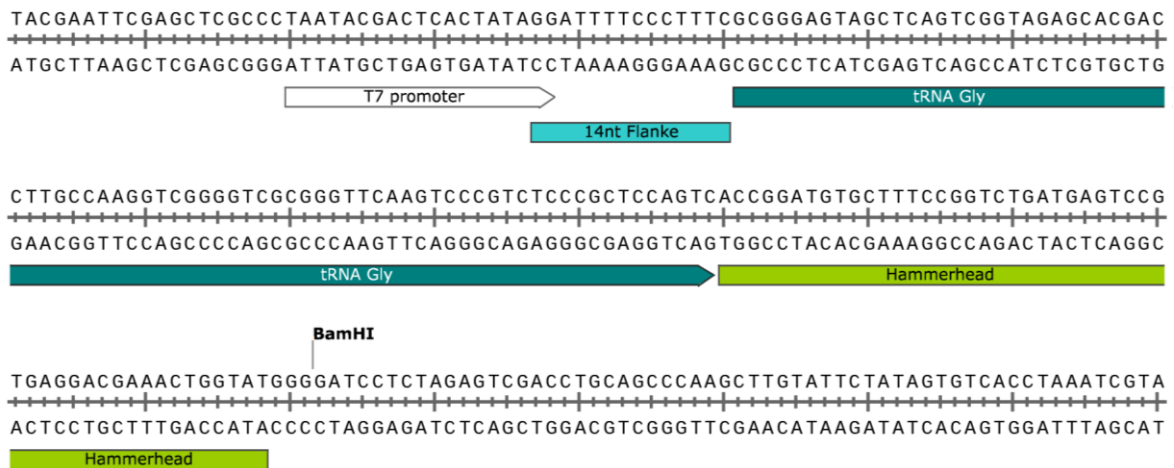
CCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT  
 GGAGATCTCAGCTGGACGTCCGTACGTTGCAACCGCATTAGTACCAGTATCGACAAAGGACACACTTTAACAAATAGGCGA



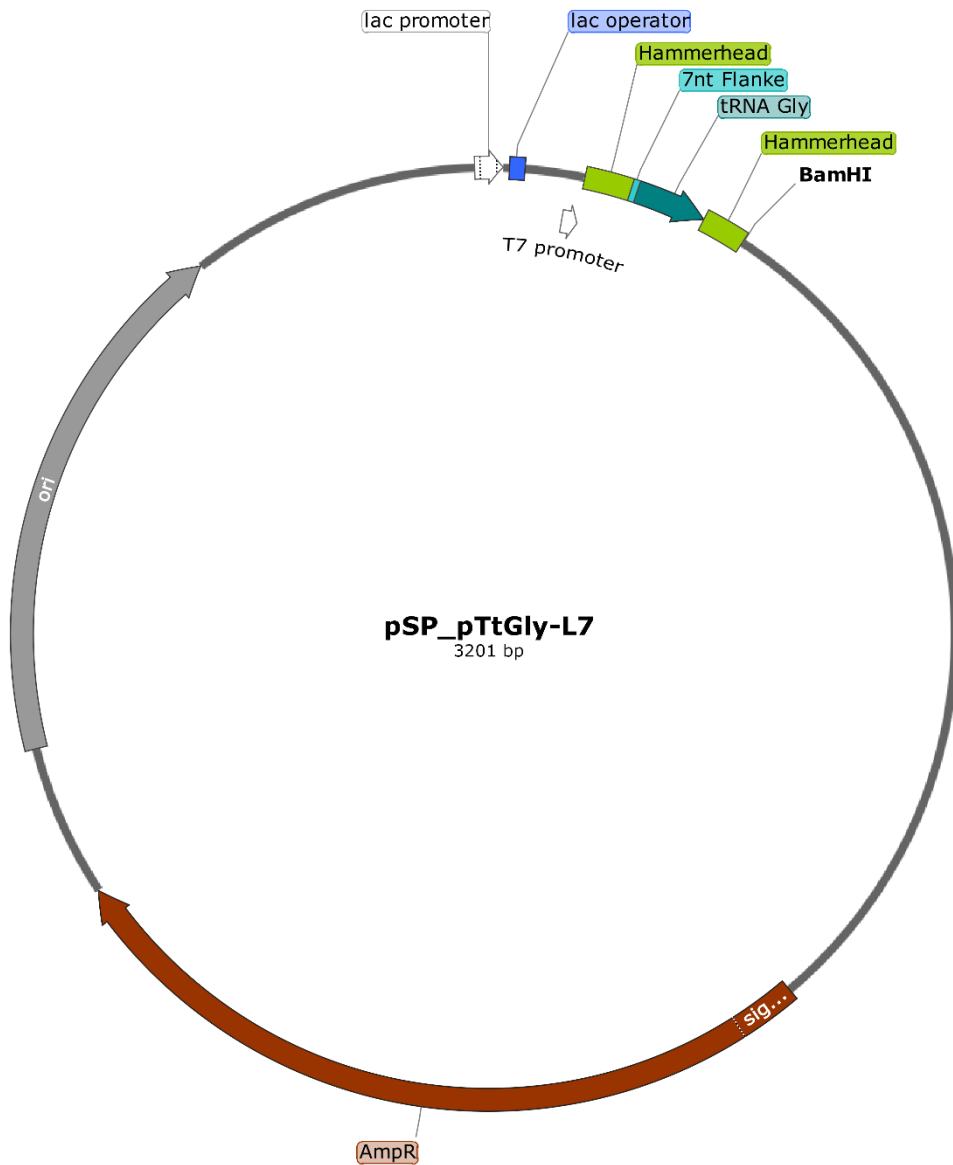
**pSBpt3-hh-Plasmid mit Sequenz für die *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup>**



**Sequenz der *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup>**



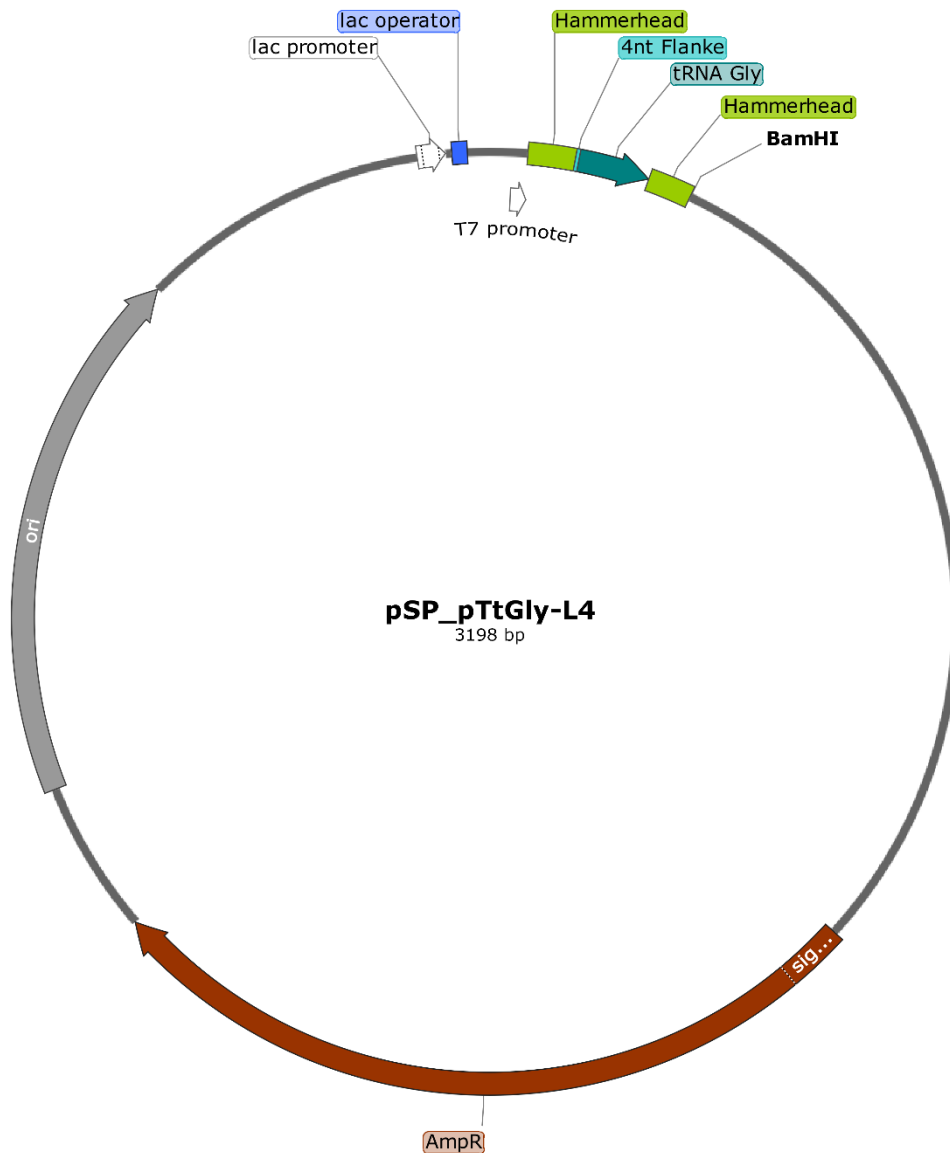
**pSP64-Plasmid mit Sequenz für die *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> mit 7-nt 5'-Flanke**



**Sequenz der *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> mit 7-nt 5'-Flanke**



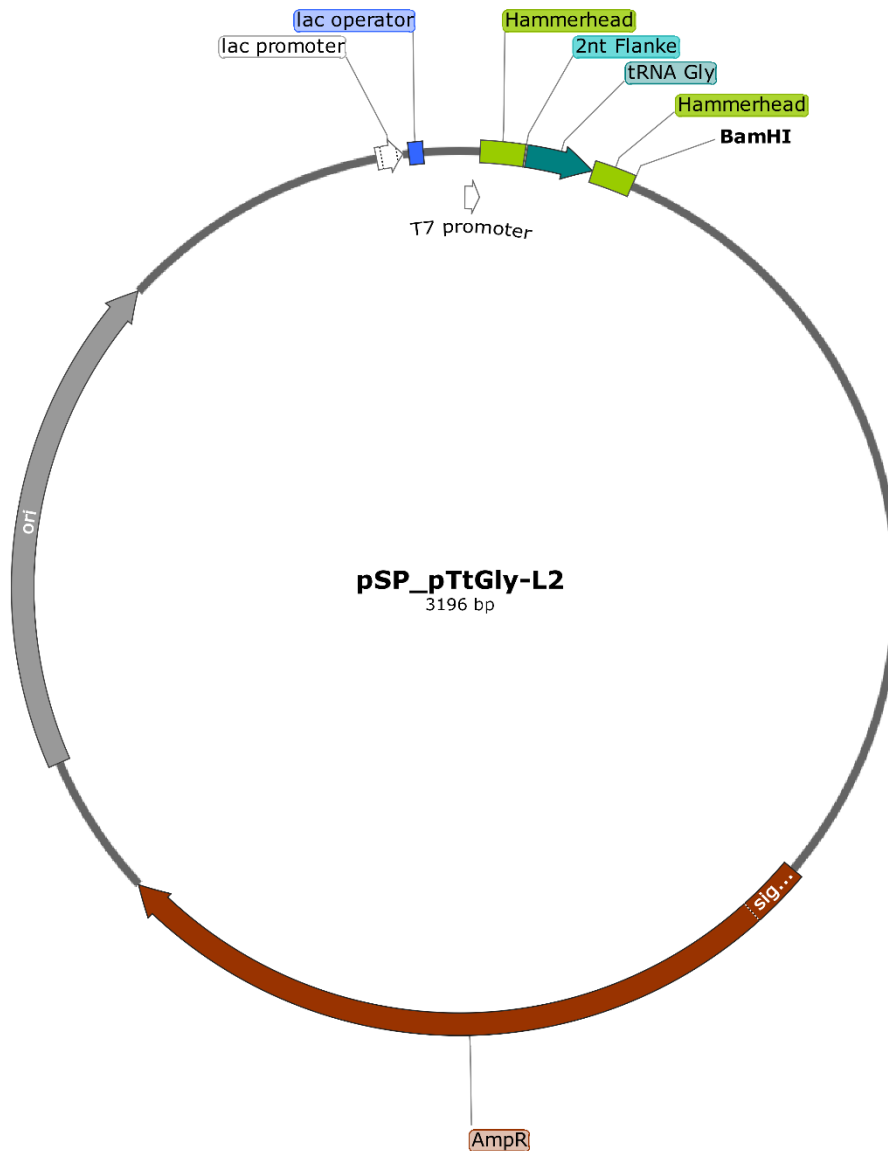
**pSP64-Plasmid mit Sequenz für die *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> mit 4-nt 5'-Flanke**



**Sequenz der *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> mit 4-nt 5'-Flanke**



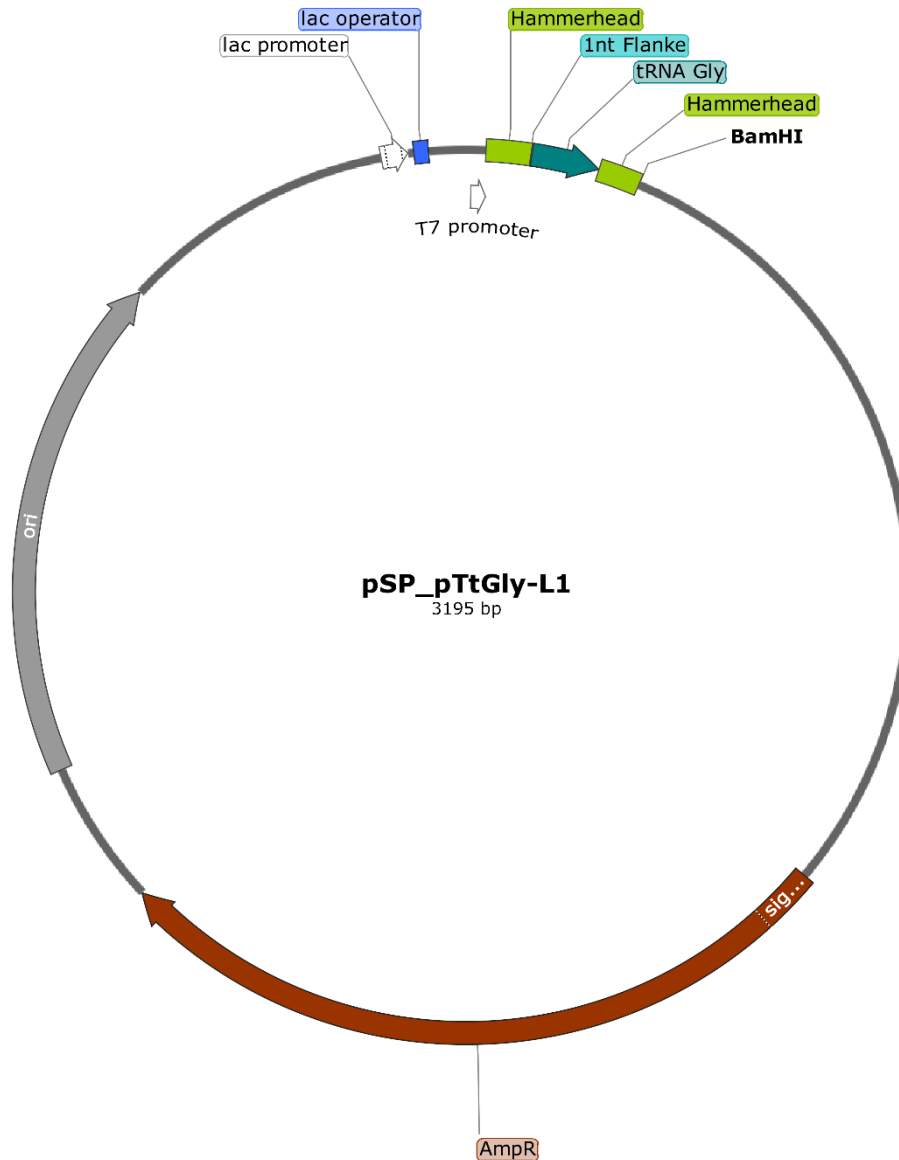
**pSP64-Plasmid mit Sequenz für die *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> mit 2-nt 5'-Flanke**



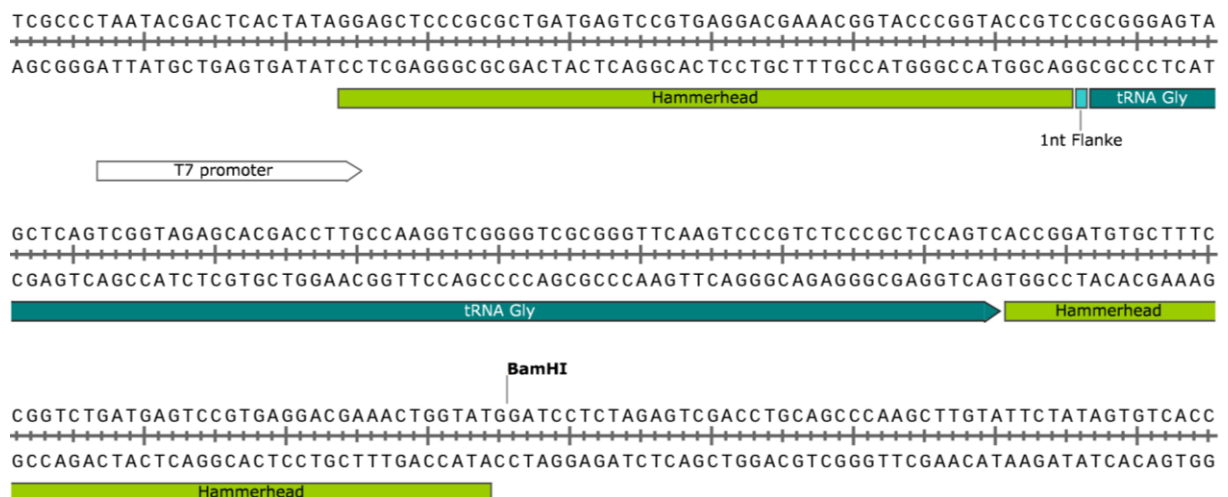
**Sequenz der *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> mit 2-nt 5'-Flanke**



**pSP64-Plasmid mit Sequenz für die *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> mit 1-nt 5'-Flanke**



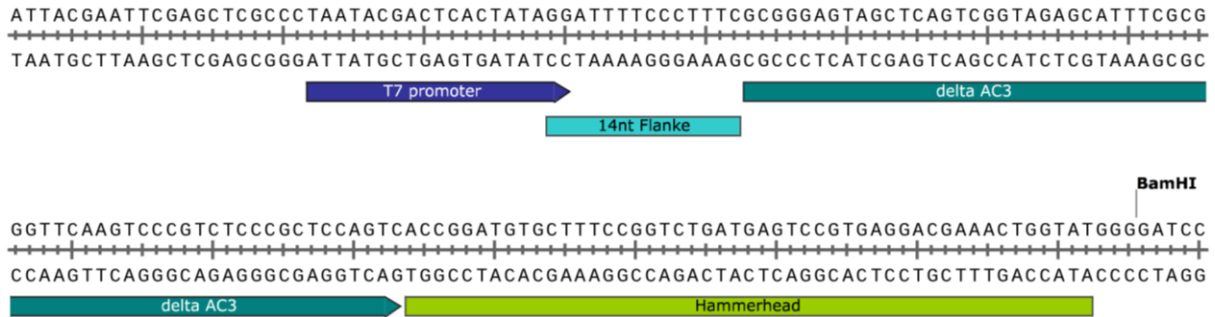
**Sequenz der *Thermus thermophilus* prä-tRNA<sup>Gly</sup> mit 1-nt 5'-Flanke**



**pSP64-Plasmid mit Sequenz für das  $\Delta$ Ac3 prä-tRNA-Substrat**

Plasmidkarte siehe 3.2.3.9, Seite 57

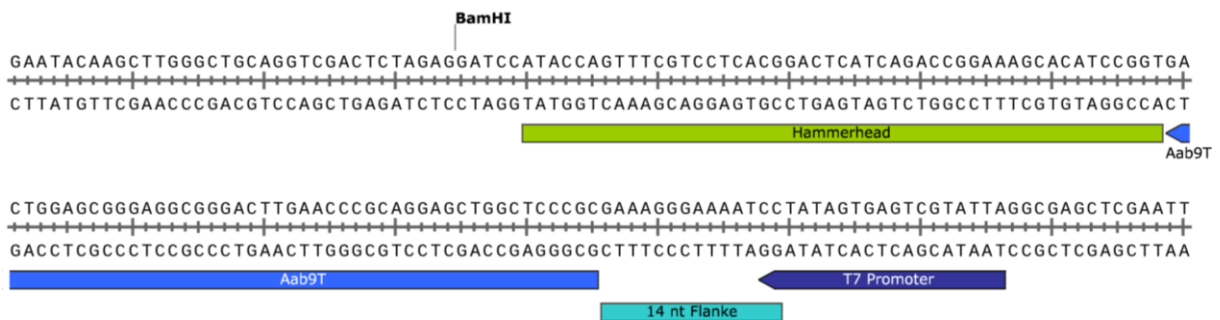
Sequenz des  $\Delta$ Ac3-Substrats



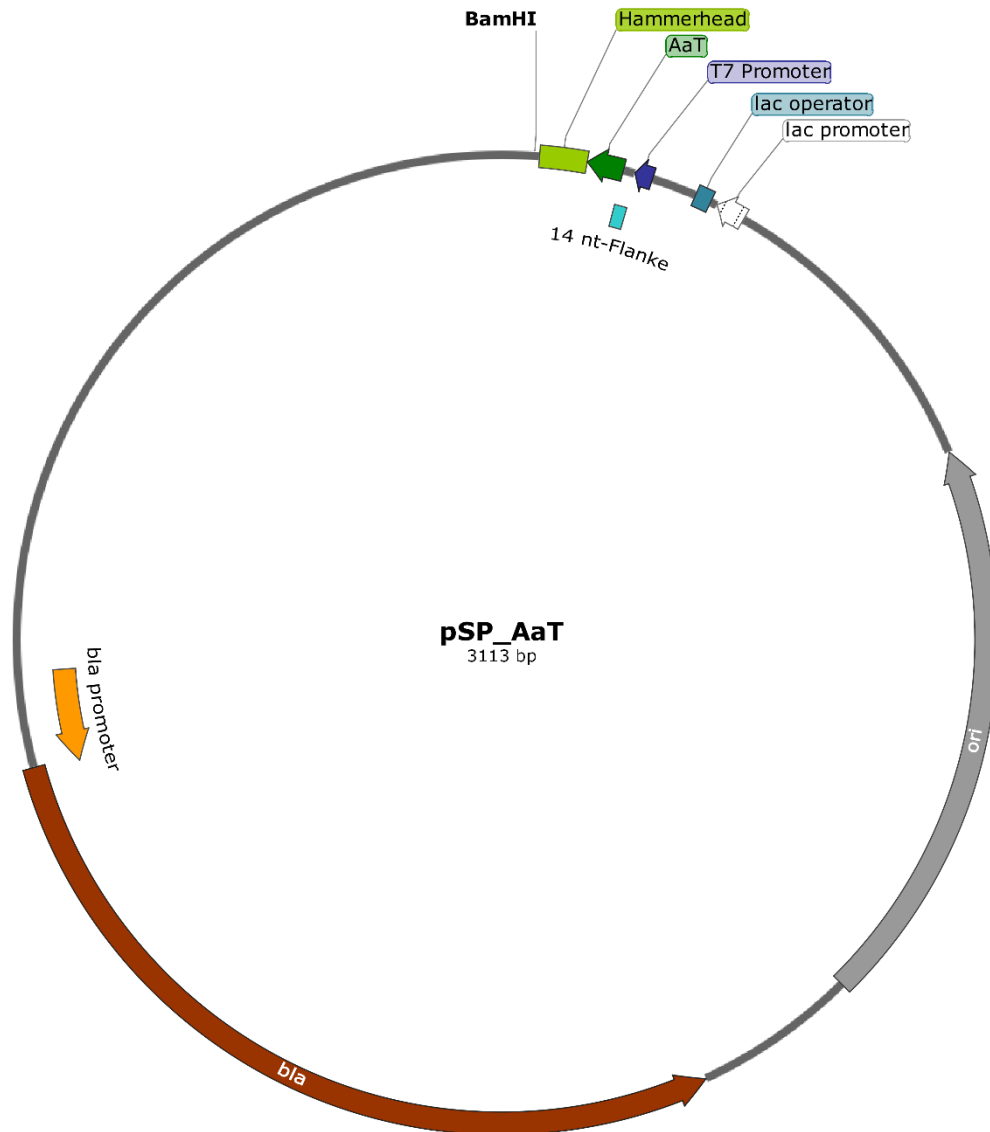
**pSP64-Plasmid mit Sequenz für das Aa<sub>b9</sub>T prä-tRNA-Substrat**

Plasmidkarte siehe 3.2.3.9, Seite 58

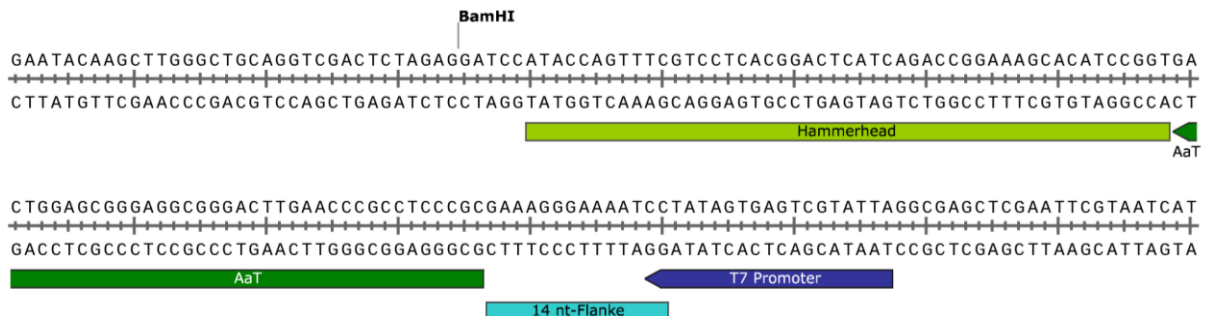
Sequenz des Aa<sub>b9</sub>T-Substrats



**pSP64-Plasmid mit Sequenz für das AaT prä-tRNA-Substrat**

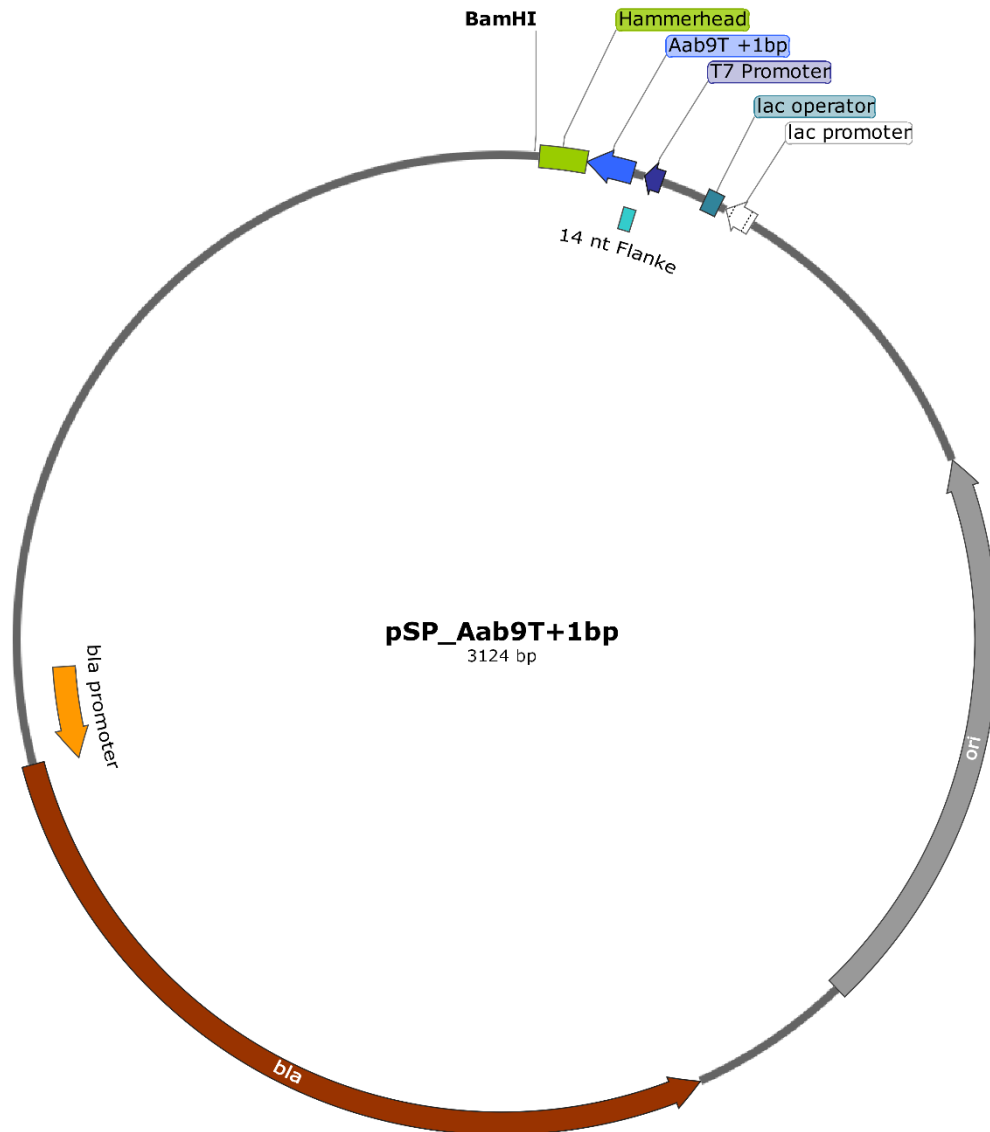


**Sequenz des AaT-Substrats**

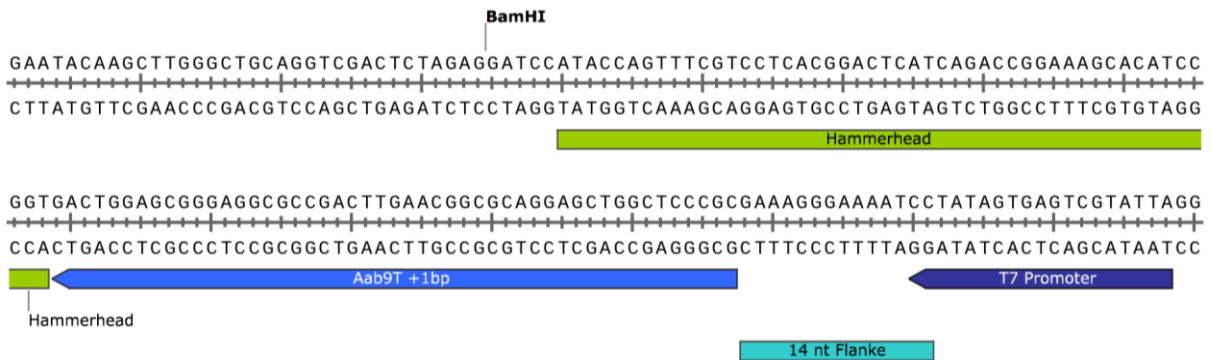




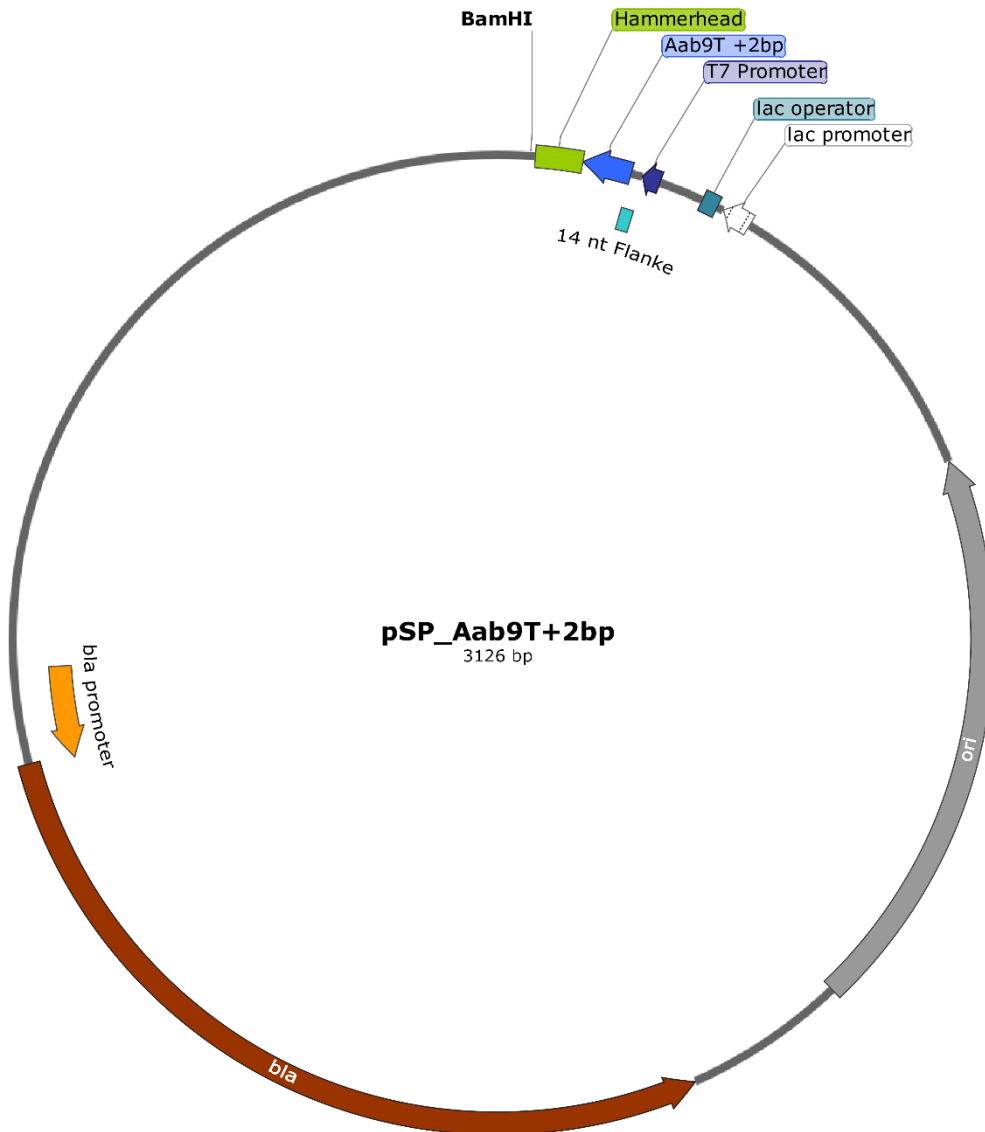
**pSP64-Plasmid mit Sequenz für das Aa<sub>b9</sub>T+1bp prä-tRNA-Substrat**



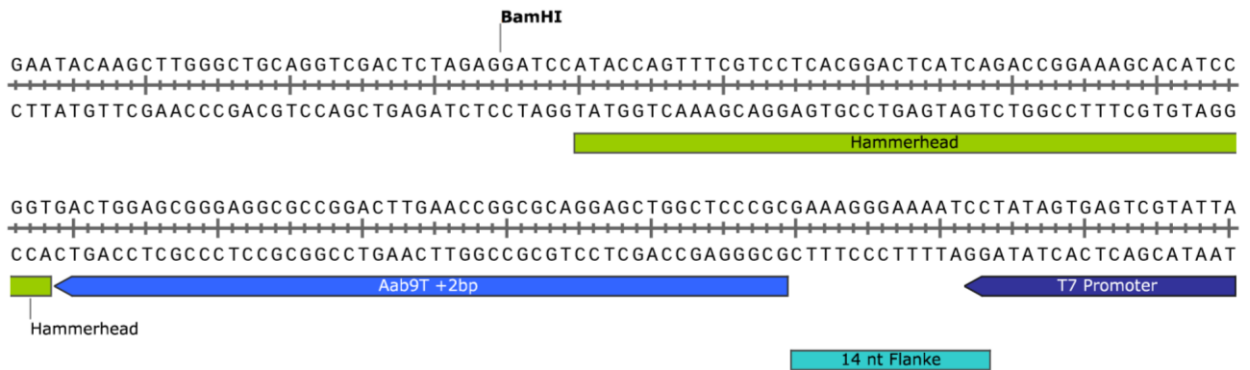
**Sequenz des Aa<sub>b9</sub>T+1bp-Substrats**



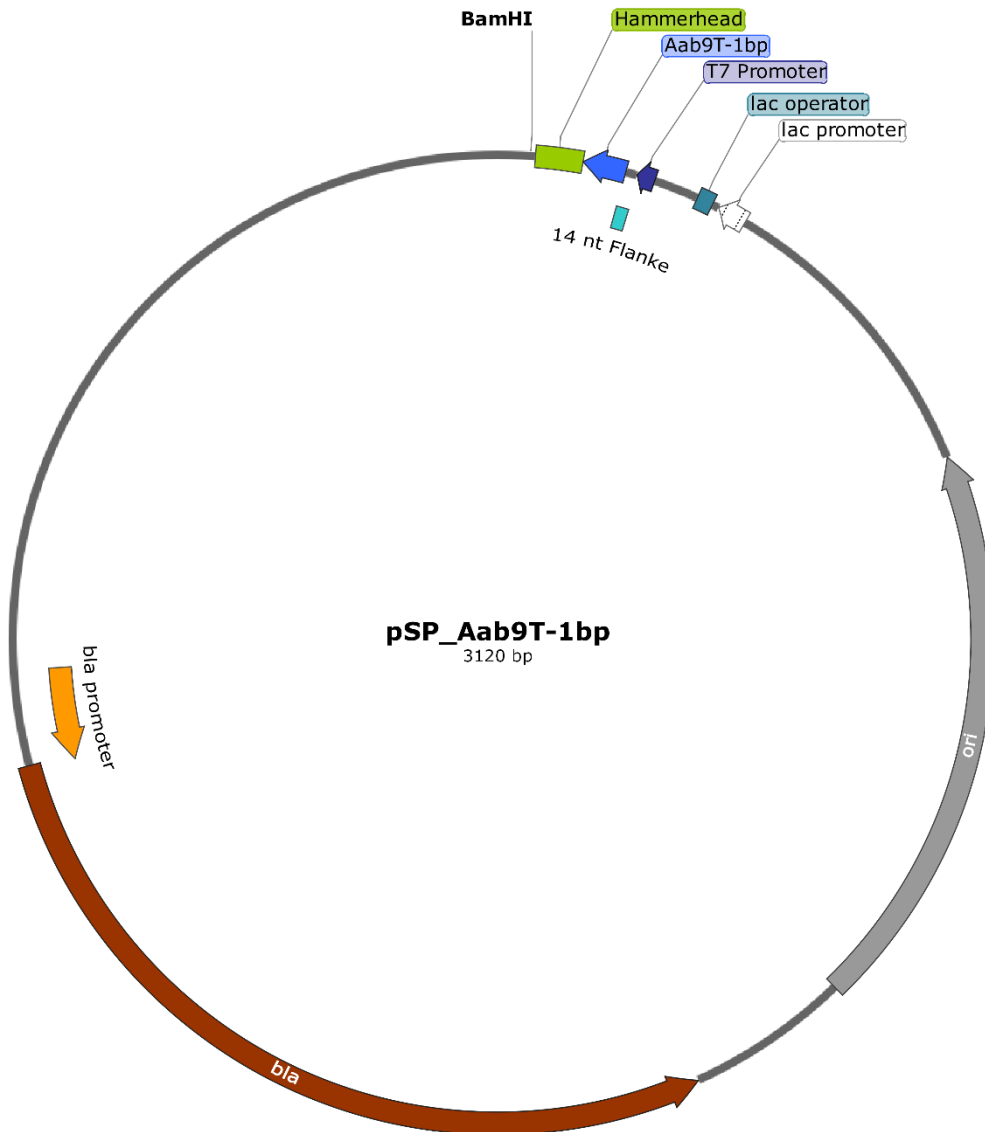
**pSP64-Plasmid mit Sequenz für das Aa<sub>b9</sub>T+2bp prä-tRNA-Substrat**



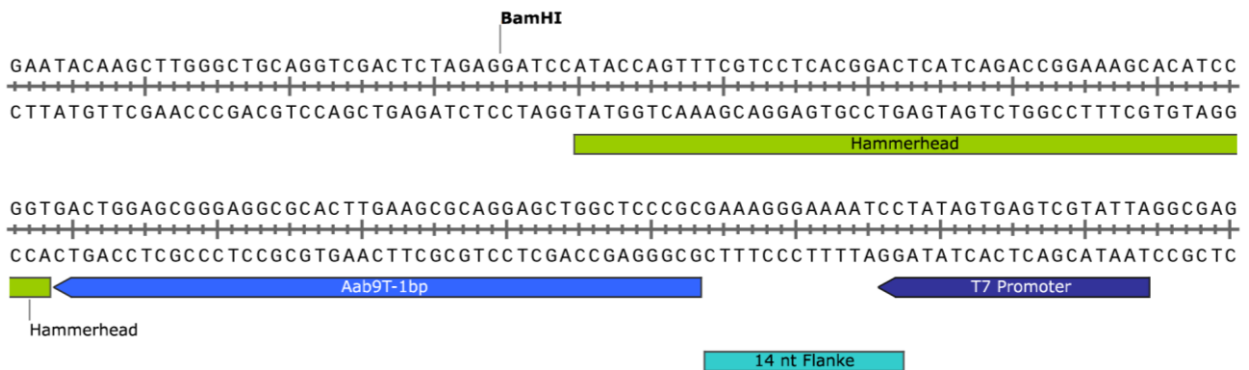
**Sequenz des Aa<sub>b9</sub>T+2bp-Substrats**



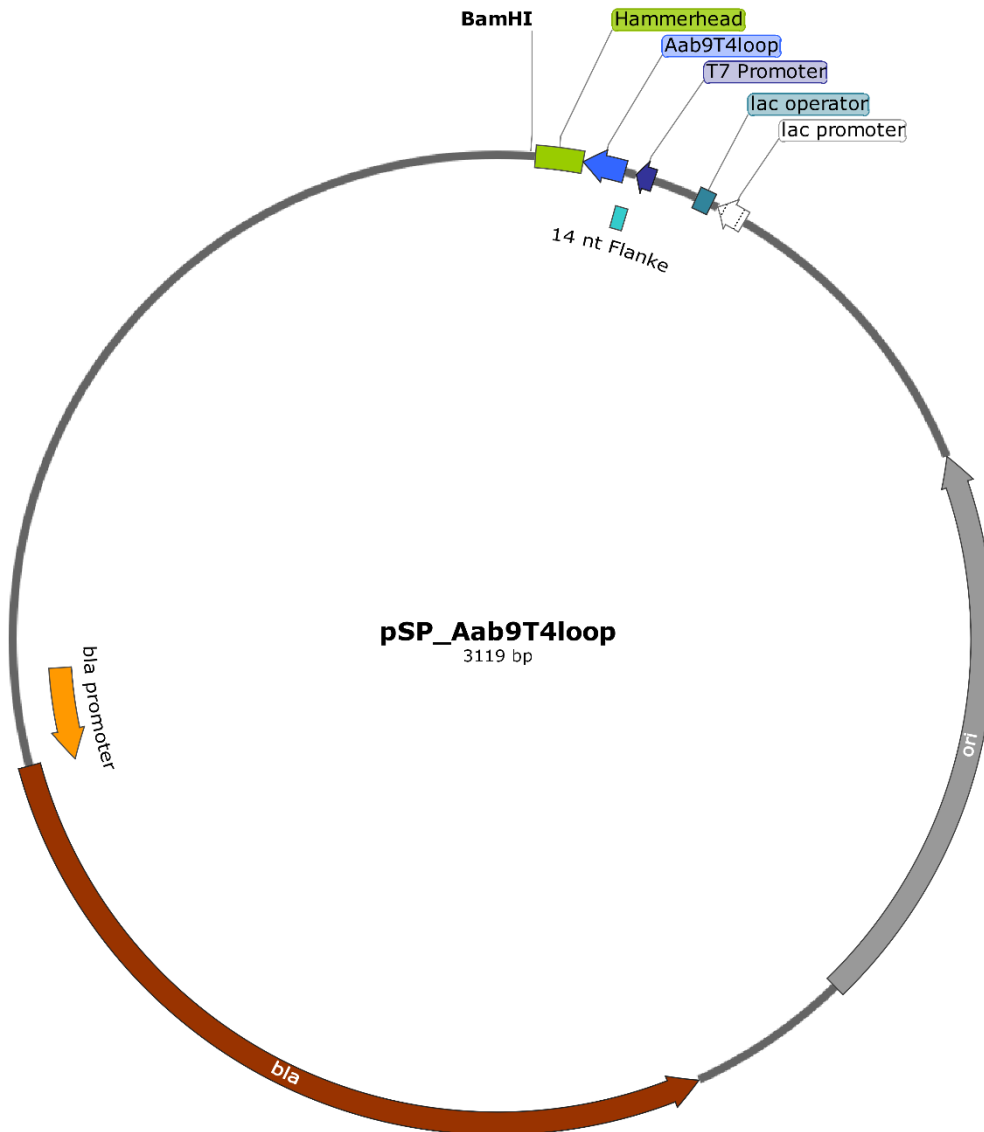
**pSP64-Plasmid mit Sequenz für das Aa<sub>b9</sub>T-1bp prä-tRNA-Substrat**



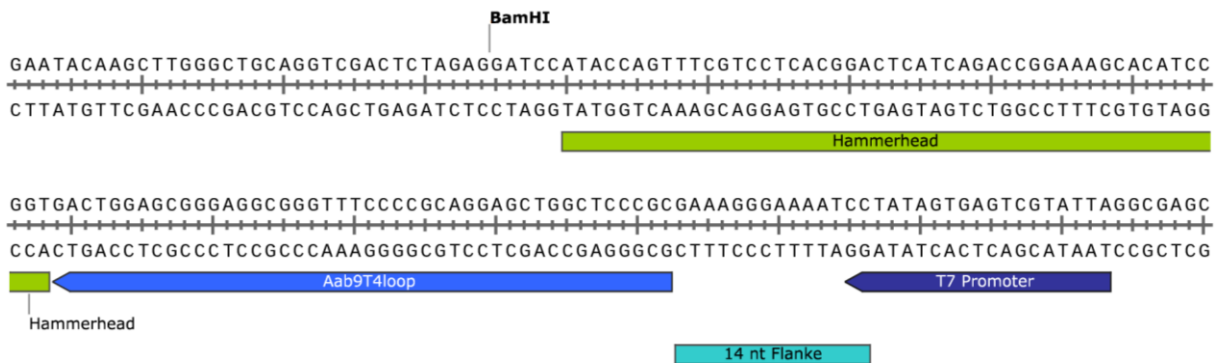
**Sequenz des Aa<sub>b9</sub>T-1bp-Substrats**



**pSP64-Plasmid mit Sequenz für das Aa<sub>b9</sub>T4loop prä-tRNA-Substrat**



**Sequenz des Aa<sub>b9</sub>T4loop-Substrats**



## 5.4 Publikationen

2021:

**Schencking, I.**, Schäfer, E. M., William Scanlan, J. H., Wenzel, B. M., Emmerich, R. E., Steinmetzer, T., Diederich, W. E., Schlitzer, M. & Hartmann, R. K. (2021) RNase P inhibitors identified as aggregators, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 65(8).

Gößringer, M., **Schencking, I.** & Hartmann, R. K. (2021) RNase P ribozymes, in Müller, S., Masquida, B., and Winkler, W. (eds) *Ribozymes*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 227–279.

2020:

**Schencking, I.**, Rossmannith, W. & Hartmann, R. K. (2020) Diversity and Evolution of RNase P, in Pontarotti, P. (ed.) *Evolutionary Biology - A Transdisciplinary Approach*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, pp. 255–299.

## 5.5 Konferenzbeiträge

- 03/2019      **Vortrag;** „Non-coding RNAs“ Meeting 2019, Hirschegg. *“Inhibitors of bacterial RNase P”*
- 09/2018      **Poster** mit Kurzvortrag; 27th tRNA Conference 2018, Straßburg, Frankreich. *“Substrate recognition by the novel single-subunit protein-only RNase P”*
- 03/2018      **Vortrag;** „Non-coding RNAs“ Meeting 2018, Hirschegg. *“Bacterial RNase P - from holoenzyme to protein-only enzyme”*
- 03/2017      **Vortrag;** „Non-coding RNAs“ Meeting 2017, Hirschegg. *“Substrate recognition by HARP proteins”*

## **5.6 Lebenslauf**

Diese Seite enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

## 5.7 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Bakterielle Ribonuklease P-Enzyme  
- Evaluierung als *Drug Target* und Analysen zur Substraterkennung“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den.....

.....  
(Isabell Schencking)



## **5.8 Danksagung**

Diese Seite enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.