

**Biochemische und kristallographische Charakterisierung
der eukaryotischen tRNA-Guanin-Transglykosylase
(TGT)**

Dissertation

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

dem

Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Maurice Sebastiani,
Apotheker
aus **Lich**

Marburg 2023

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 2018 bis Juli 2021 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klebe unter der Aufsicht von Prof. Dr. Klaus Reuter.

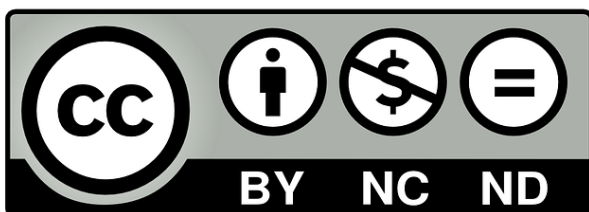
Abgabedatum: 31.05.2023

Erstgutachter: Prof. Dr. Klaus Reuter

Zweitgutachter: Prof. Dr. Julia Weigand

Tag der mündlichen Prüfung: 09.08.2023

Hochschulkennziffer: 1180



Veröffentlichung

Aus der vorliegenden Arbeit ist folgende Publikation hervorgegangen.

M. Sebastiani, C. Behrens, S. Dörr, H. Gerber, O. Hernandez-Alba, R. Benazza, S. Cianfèrani, G. Klebe, A. Heine, K. Reuter, Structural and biochemical investigation of the heterodimeric murine tRNA-guanine transglycosylase *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17*, 2229–2247.

Im Rahmen von weiteren Projekten zur Untersuchung der bakteriellen TGT führte ich enzymkinetische Messungen für die folgenden wissenschaftlichen Beiträge durch:

E. Hassaan, C. Hohn, F. R. Ehrmann, F. W. Goetzke, L. Movsisyan, T. Hübner-Wulsdorf, M. Sebastiani, A. Härtsch, K. Reuter, F. Diederich, G. Klebe, Fragment Screening Hit Draws Attention to a Novel Transient Pocket Adjacent to the Recognition Site of the tRNA-Modifying Enzyme TGT, *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 6802–6820.

A. Nguyen, D. Nguyen, T. X. Phong Nguyen, M. Sebastiani, S. Dörr, O. Hernandez-Alba, F. Debaene, S. Cianfèrani, A. Heine, G. Klebe, K. Reuter, The Importance of Charge in Perturbing the Aromatic Glue Stabilizing the Protein–Protein Interface of Homodimeric tRNA-Guanine Transglycosylase, *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 3021–3029.

1. Inhalt

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	IV
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Die <i>Wobble</i> -Position und Queuosin als modifizierte Base.....	1
1.2. Biosynthese von Queuin.....	3
1.3. Die eukaryotische TGT.....	5
1.4. Die Rolle von Q-modifizierten tRNAs bei der Translation.....	7
1.5. Weitere Rollen von Queuin und der eukaryotischen TGT.....	11
1.5.1. Der Einfluss von Substraten der eukaryotischen TGT auf Multiple Sklerose.....	11
1.5.2. Die Notwendigkeit von Queuin in Eukaryoten bei der Oxidation von Phenylalanin zu Tyrosin.....	12
1.5.3. Die Bedeutung der QTRT1-Aktivität für das Wachstum und die Migration von MCF-7-Brustkrebszellen und davon abgeleiteten Tumoren.....	13
1.5.4. Der Einfluss von Queuin auf Resistenz gegen oxidativen Stress und die Pathogenität von <i>Entamoeba histolytica</i>	13
2. ZIELSETZUNG.....	15
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	17
3.1. Etablierung eines Expressions- und Reinigungsprotokolls.....	17
3.1.1. Konstruktion eines rekombinanten Expressionssystems für die Koexpression der beiden TGT-Untereinheiten aus der Maus.....	17
3.1.2. Überexpression des TGT Heterodimers in Bakterienzellen.....	21
3.1.3. Reinigung des Heterodimers der Maus-TGT.....	27
3.1.4. Versuche zur Entfernung der Nukleinsäureverunreinigung.....	31
3.1.5. Entfernung der Nukleinsäure mittels Anionenaustausch-chromatographie.....	32
3.1.6. Entfernung der Nukleinsäure mittels Lithiumchlorid.....	34
3.1.7. Entfernung der Nukleinsäure mittels Phenyl-Sepharose™.....	36
3.1.8. Untersuchung der Stabilität des TGT-Heterodimers mittels <i>Thermal Shift Assay</i>	38
3.2. Kristallisationsversuche mit dem Heterodimer der Maus-TGT.....	45
3.3. Untersuchung der Kristallstrukturen der eukaryotischen TGT.....	58
3.3.1. Einleitende Bemerkung.....	58
3.3.2. Strukturlösung der Datensätze.....	58

3.3.3.	Strukturlösung mit molekularem Ersatz (<i>Molecular Replacement</i>)	58
3.3.4.	SAD-Experiment anhand der TEW-Strukturen	59
3.3.5.	Strukturanalyse des QTRT1/QTRT2-Heterodimers	61
3.3.6.	Das aktive Zentrum der Maus-TGT	66
3.4.	Polyoxometallate in den Strukturen des Maus-TGT Heterodimers	74
3.5.	Enzymkinetische Charakterisierung der eukaryotischen TGT	84
3.5.1.	Etablierung der Versuchsbedingungen	84
3.5.2.	Enzymkinetische Charakterisierung des TGT-Heterodimers	85
3.5.3.	Reaktionsmechanismus der eukaryotischen TGT	91
3.5.4.	Untersuchung der Dimerstabilität anhand von Mutanten der QTRT2	96
3.5.5.	Charakterisierung von Inhibitoren der eukaryotischen TGT	101
3.6.	Herstellung und Reinigung des kovalenten tRNA ^{Tyr} -TGT-Komplexes	106
4.	ZUSAMMENFASSUNG	113
5.	MATERIAL UND METHODEN	117
5.1.	Lösungsmittel und Reagenzien	117
5.2.	Geräte	118
5.3.	Plasmide	120
5.4.	Bakterienstämme	120
5.5.	Puffer	121
5.6.	Medien	122
5.7.	Experimente mit Plasmid-DNA	123
5.7.1.	Präparation der Plasmid-DNA	123
5.7.2.	Amplifikation der Gene mittels PCR	123
5.7.3.	Agarose-Gelelektrophorese und Isolation der DNA-Fragmente aus dem Gel ...	125
5.7.4.	Restriktion von Vektor-DNA	125
5.7.5.	Ligation	126
5.7.6.	Transformation von <i>E. coli</i> nach dem Hitzeschock-Protokoll	126
5.7.7.	Transformation von <i>V. natriegens</i> nach dem Hitzeschock-Protokoll	127
5.8.	Mutation mittels Quick Change Lightning	127
5.9.	Rekombinante Produktion des QTRT1/QTRT2-Heterodimers	129
5.10.	Säulenchromatographische Reinigung des QTRT1/QTRT2-Heterodimers	129
5.11.	Rekombinante Produktion der QTRT1 und der QTRT2-Varianten	130

5.12.	Säulenchromatographische Reinigung der QTRT1 und der QTRT2-Varianten .	131
5.13.	<i>Thermal Shift Assay</i>	132
5.14.	Kristallisationsexperimente mit dem QTRT1/QTRT2 Heterodimer	133
5.14.1.	Allgemeine Präparation der Kristallisationstropfen.....	133
5.14.2.	Ko-Kristallisation mit dem QTRT1/QTRT2-Heterodimer	133
5.14.3.	<i>Soaking</i> -Versuche mit dem QTRT1/QTRT2-Heterodimer.....	134
5.15.	Datensammlung, Prozessierung und Verfeinerung.....	135
5.16.	Enzymkinetische Messungen.....	136
5.16.1.	Herstellung der linearisierten Templat-DNA.....	136
5.16.2.	T7 <i>in vitro</i> Transkription.....	137
5.16.3.	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	137
5.16.4.	Allgemeine Durchführung des Radioaktivassays	138
5.16.5.	Bestimmung der kinetischen Parameter.....	139
5.16.6.	Berechnung der K_i -Werte bei Inhibitoren der Maus-TGT	140
5.17.	Herstellung und Reinigung Tritium-markierter tRNA ^{Tyr}	141
5.17.1.	Herstellung und Reinigung kovalenter TGT-tRNA-Komplexe.....	142
6.	LITERATURVERZEICHNIS	143
	ANHANG	155
	DANKSAGUNG	170
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	172

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
AU	<i>absorbance units</i> , engl. Absorptions-Einheiten
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Enzym
eq	<i>equivalent</i> , engl. Äquivalent
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	<i>et alii</i> , lat. und andere
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
I	Inhibitor
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
K_i	Inhibitionskonstante, Hemmkonstante
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
MS	Massenspektrometrie
NTP	Nukleosidtriphosphat
PEG	Polyethylenglycol
PDB	Protein Data Bank
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Substrat
SEC	<i>Size-exclusion chromatography</i> , engl. Größenausschluss-Chromatographie
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , engl. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TCA	<i>trichloroacetic acid</i> , engl. Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett

1. Einleitung

1.1. Die Wobble-Position und Queuosin als modifizierte Base

Die erste der drei Basen innerhalb des Anticodons einer tRNA (Position 34, Abbildung 1A) wird auch als *Wobble*-Base bezeichnet. Bereits F. Crick postulierte, dass die zweite und dritte Base des Anticodons jeweils eine Basenpaarung eingehen, die strikt den Regeln einer Watson-Crick-Basenpaarung folgt. Die erste Base, welche sich an der *Wobble*-Position befindetet, sei im Gegensatz zu den anderen beiden Basen flexibler im Hinblick auf die Basenpaarungsspezifität. Diese *Wobble*-Hypothese stellte laut Crick die Voraussetzung für den degenerierten genetischen Code dar. Darunter versteht man die Tatsache, dass die möglichen 64 Codon-Triplets lediglich für 20 proteinogene Aminosäuren kodieren. Infolgedessen kann eine bestimmte tRNA mehrere synonyme Codons lesen, sodass weniger als 64 Anticodons notwendig sind. Die Art und Anzahl der dadurch eingesparten tRNAs variiert allerdings je nach Organismus und zu dekodierender Aminosäure.^[1]

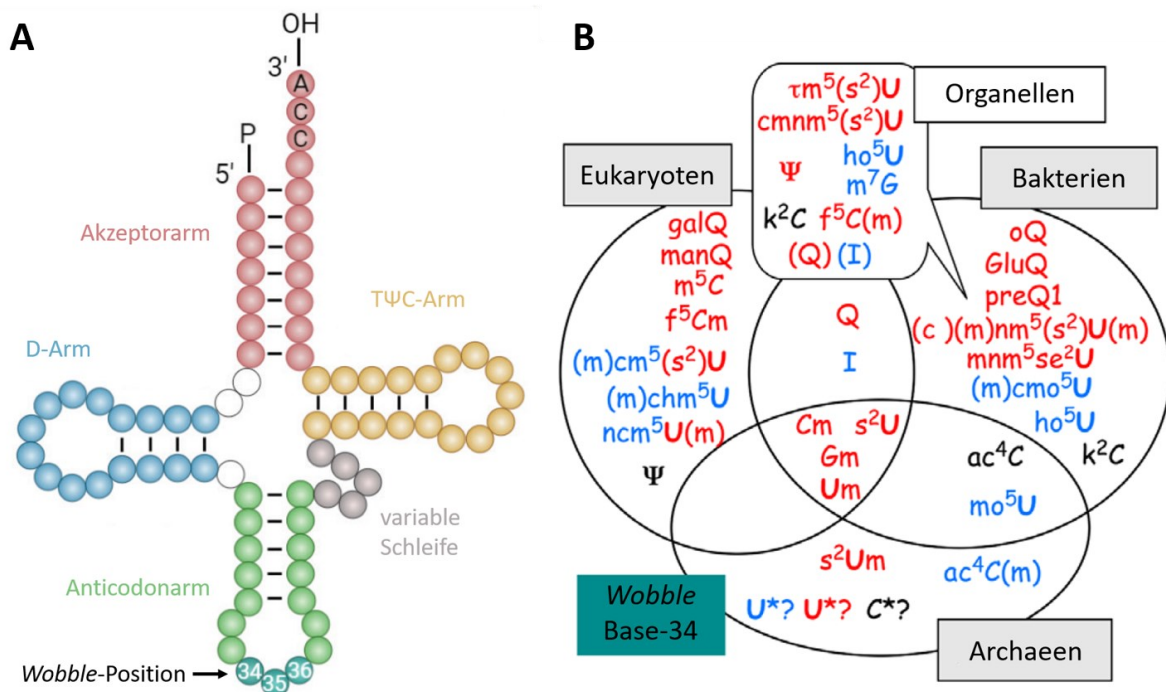


Abbildung 1: A: Schematische Darstellung der allgemeinen Struktur einer tRNA. Die Basen des Anticodons sind mit Nummern versehen und die *Wobble*-Position ist gekennzeichnet. Die Abbildung wurde aus der Arbeit von Aviclar-Kucukgoze übernommen^[2] B: Darstellung der von Grosjean et al. übernommenen Daten. Das „?“ signalisiert, dass die Struktur noch nicht vollständig aufgeklärt ist.^[3]

Die nicht-kanonische Base Inosin (I), welche als erste Modifikation an der *Wobble*-Position entdeckt wurde, schien die von Crick aufgestellte These zu bestätigen, da sie eine Basenpaarung mit Adenosin (A), Cytosin (C) und Uridin (U) eingehen kann.^[1]

Neben Inosin wurden bis heute knapp 100 Modifikationen der tRNA identifiziert, von denen etwa 30% auf die *Wobble*-Position beschränkt sind.^[4,5] Die *Wobble*-Modifikationen sind maßgeblich an der Translationseffizienz beteiligt. Diesen Einfluss üben sie in erster Linie über eine Veränderung der Bindungspräferenz aus.^[5-7]

Die beobachteten Modifikationen können aus einfachen Methylierungen kanonischer Basen, aber auch aus komplexeren Hypermodifikationen mit zusätzlichen Aminosäuren, Zuckern oder aromatischen Systemen bestehen. Zur Veranschaulichung der Vielfältigkeit dieser Modifikation wurden die Daten von Grosjean *et al.* abgebildet (Abbildung 1B). Das Diagramm zeigt außerdem, dass die *Wobble*-Modifikation in verschiedenen Bereichen des Lebens ganz unterschiedlich ausgebildet sind.^[3]

Die modifizierte Base Queuin ist in dieser Arbeit von zentraler Bedeutung. Daher soll zunächst die Entdeckungsgeschichte dieser Base skizziert werden, bevor die Rolle der tRNA-Guanin-Transglykosylase (kurz: TGT) als zentrales Thema dieser Dissertation in die Biosynthese von Queuin eingeordnet wird.

Ende der 1960er Jahre entdeckten Raj-Bhandary^[8] *et al.*, Goodman^[9,10] *et al.* und Doctor^[11] *et al.*, dass tRNA^{Tyr} aus *E. coli* an Position 34 ein modifiziertes Guanodin enthält, welches in der Folge als Queuosin (kurz Q) bezeichnet wird. In Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), welche als eukaryotischer Modellorganismus gilt, wurde an analoger Position allerdings ein herkömmliches Guanodin festgestellt.^[11] Harada & Nishimura isolierten 1972 18 spezifische tRNAs aus *E. coli*, um in weiteren tRNAs das Vorkommen eines modifizierten Guanodins zu untersuchen. Dazu verdauten sie die tRNAs jeweils mit RNase T₂ und trennten das erhaltene Nucleosid-3'-phosphat-Gemisch mittels zweidimensionaler Dünnschicht-Chromatographie auf.^[12] Sie entdeckten das Q-Nucleotid auch in tRNA^{His}, tRNA^{Asp} und tRNA^{Asn}. In allen vier tRNAs besetzt Queuosin die *Wobble*-Position.^[12] Außerdem besitzen alle vier tRNAs die Anticodon-Sequenz Q₃₄U₃₅N₃₆, wobei Q₃₄ im Primärskript zunächst als G vorliegt und N für eines der vier kanonischen RNA-Nucleoside steht. In allen vier Fällen befindet sich ein Uracil an Position 33, welches in tRNAs generell nahezu invariant ist. Dies ist im Hinblick auf die Substraterkennung der TGT von großer Bedeutung. In der mRNA erkennen tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asp} und tRNA^{Asn} sowohl das Codon NAC als auch NAU.^[12] Im Jahr 1972 veröffentlichten Singer & Smith die vollständige Sequenz von tRNA^{His} aus *Salmonella typhimurium*, welches

ebenfalls an Position 34 ein Q enthält.^[13] White *et al.* berichteten, dass auch in *Drosophila melanogaster* die vier genannten tRNAs mit Q modifiziert sind.^[14] Im Jahr 1975 klärten Kasai *et al.* mittels Massenspektrometrie und NMR sowie unter Zuhilfenahme des UV-Absorptionsspektrums und der chemischen Eigenschaften des Q-Nukleosids seine grundsätzliche Struktur auf (Abbildung 2).^[15] Dabei zeigte sich, dass Q über ein Guaningrundgerüst verfügt, welches an der fünfgliedrigen Untereinheit modifiziert ist. 1976 wurde dann von Ohgi *et al.* mittels NMR-Spektroskopie auch die korrekte Stereochemie sämtlicher Substituenten des Cyclopentenrings aufgeklärt.^[16] Yokoyama *et al.* veröffentlichten 1979 schließlich die Kristallstruktur von Queuosin-5'-monophosphat (pQ), welches aus einem Nuklease P1-Verdau von *E. coli* tRNA isoliert worden war.^[17]

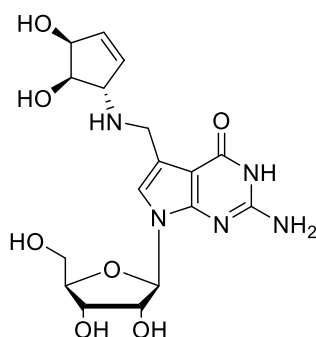


Abbildung 2: Strukturformel des Nukleosids Queuosin (Q).

1.2. Biosynthese von Queuin

Obwohl Eukaryoten tRNAs aufweisen, die mit Queuin modifiziert sind, können sie dieses nicht über einen eigenen Biosyntheseweg herstellen. Stattdessen müssen Eukaryoten die Base Queuin aus externen Quellen durch die Nahrung gewinnen.^[18] Im Gegensatz zu Eukaryoten sind die meisten Bakterien, mit Ausnahme von Myko-, Corvido- und Bifidobakterien sowie Streptomyceten in der Lage, Queuosin selbst zu synthetisieren.^[19]

Die Biosynthese (Abbildung 3) geht von Guanosin-5-triphosphat (GTP) aus, welches durch die GTP-Cyclohydrolase I umgesetzt wird. Letztere katalysiert in Bakterien nicht nur den ersten Schritt der Q-Biosynthese, sondern auch der Tetrahydrofolat-Biosynthese. Das Enzym ist auch für die Biosynthese von Archaeosin, einem 7-Deazaguanosin-Derivat in Archaeen, erforderlich.^[20]

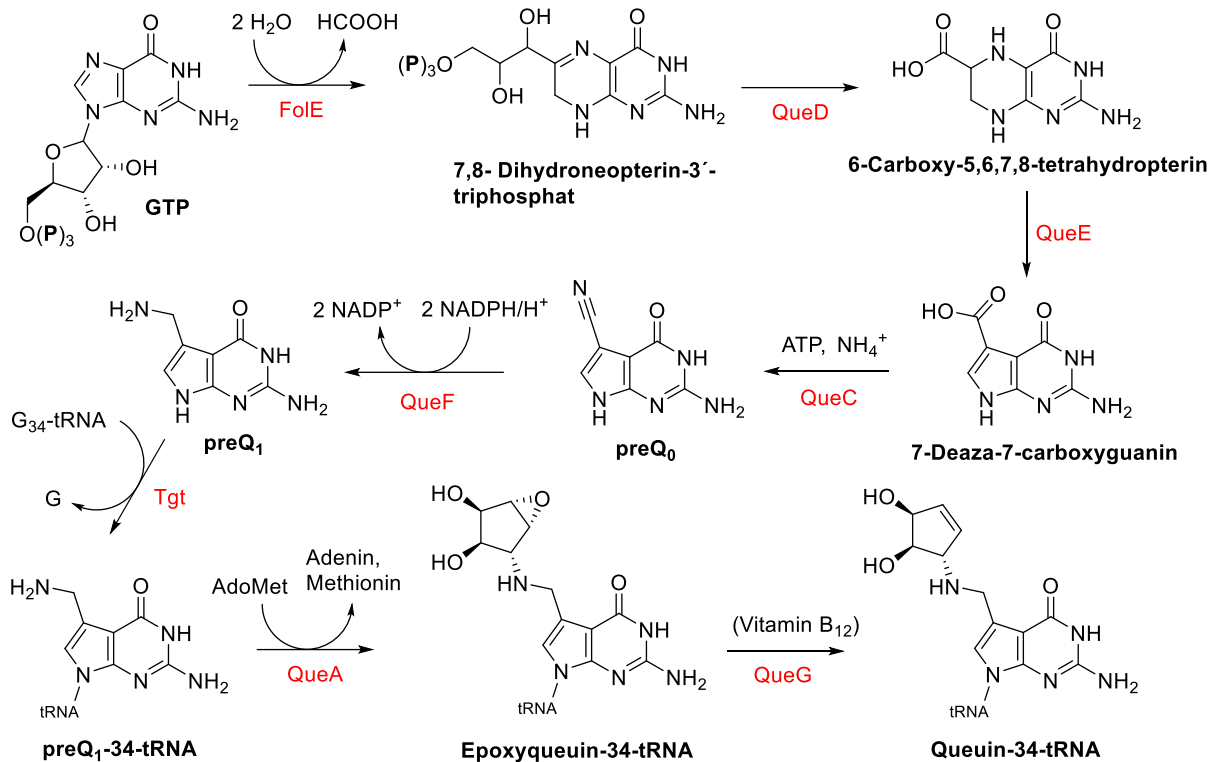


Abbildung 3: Biosynthese der modifizierten Queuin-Base. Das Schema basiert auf der Publikation von Biela *et al.*^[21] Die folgenden Abkürzungen wurden für Substrate und Koenzyme verwendet: GTP = Guanotin-5'-triphosphat, AdoMet = S-Adenosylmethionin, Vitamin B₁₂, preQ₀ = 7-Cyano-7-deazaguanin, preQ₁ = 7-Aminomethyl-7-deazaguanin, FolE = GTP-Cyclohydrolase I, QueD = 6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin-Synthase, QueE = 7-Carboxy-7-deazaguanin-Synthase, QueC = preQ₀-Synthetase, QueF = preQ₀-Reduktase, TGT = tRNA-Guanin-Transglycosylase, QueA = S-Adenosylmethionin-tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase, QueG = Epoxiqueuosin-Reduktase, P = Phosphat-Rest.

Die Zwischenstufe 7,8-Dihydroneopterin-3'-triphosphat wird durch die 6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin-Synthase (QueD) weiter umgesetzt. Das QueD-Protein lässt sich anhand der Aminosäuresequenz gemeinsam mit der GTP-Cyclohydrolase I (FolE) und der NADPH-abhängigen preQ₀-Reduktase (QueF) in die Superfamilie der T-fold Proteine einordnen.^[19] Die 7-Carboxy-7-deazaguanin-Synthase (QueE) wandelt das Tetrahydropterin-Grundgerüst in ein 7-Deazaguanin-Grundgerüst um.^[22] QueE gehört zu den S-Adenosylmethionin-abhängigen [4Fe-4S]-Cluster-Proteinen.^[22] Die Carboxylgruppe wird zunächst durch die preQ₀-Synthetase (QueC) zu einer Nitrilgruppe funktionalisiert.^[22] Das so gebildete preQ₀ wird anschließend NADPH/H⁺-abhängig durch die 7-Nitril-7-deazaguanin-Reduktase (QueF) zu preQ₁ umgesetzt.^[23] Die tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT) katalysiert schließlich den Basenaustausch von G₃₄ durch die Queuin-Vorstufe preQ₁.^[24,25] Die TGT erkennt dabei tRNAs

mit der Sequenz $U_{33}G_{34}U_{35}N_{36}$ (N kann jede der vier Basen sein), weshalb nur tRNAs für Tyrosin, Asparagin, Aspartat und Histidin umgesetzt werden.^[24]

Die bakterielle TGT liegt als Homodimer vor. Die Kristallstruktur des Enzyms *aus Zymomonas mobilis* zeigt, dass das Monomer das Faltungsmuster eines $(\beta\alpha)_8$ -Fasses aufweist, welches jedoch über Extensionen und Insertionen verfügt, darunter eine Zn^{2+} bindende Subdomäne.^[26] Der Reaktionsmechanismus des irreversiblen Austauschs von G_{34} der $tRNA^{Asn, Asp, His, Tyr}$ durch die $preQ_1$ -Base entspricht einem sogenannten *ping-pong* Mechanismus.^[21,27] Die Reaktion beginnt mit der Ausbildung des kovalenten TGT·tRNA-Komplexes durch den nukleophilen Angriff der Carboxylgruppe des Asp280 an das C1 der Ribose₃₄ und führt zur Spaltung der glykosidischen Bindung zwischen Guanin und dem Zucker. Nachdem das zuvor protonierte Guanin aus der Bindetasche freigesetzt worden ist und die $preQ_1$ -Base darin gebunden hat, greift letztere über ihr N9-Atom am Ribose₃₄-C1'-Atom an und bildet das Produkt.^[26] Der Reaktionsmechanismus der bakteriellen TGT ist identisch mit dem der eukaryotischen TGT, welcher in Kapitel 3.5.3 gezeigt ist.

Nach dem Basenaustausch durch die TGT wird das in die tRNA eingebaute $preQ_1$ weiter zu Queuin weiter modifiziert. Dabei wird eine Ribosylgruppe durch die S-Adenosylmethionin-tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase (QueA) an die exozyklische Aminofunktion gebunden.^[28] Im letzten Schritt der Biosynthese wird das zuvor erhaltene Epoxid in einer von Vitamin B₁₂ abhängigen Reaktion durch die Epoxiqueuosin-Reduktase (QueG) in das finale Queuin überführt.^[29]

1.3. Die eukaryotische TGT

Im Gegensatz zur bakteriellen TGT bildet die eukaryotische TGT ein Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten QTRT1 und QTRT2. Dieses Heterodimer ähnelt in seiner Tertiärstruktur vermutlich dem Homodimer der bakteriellen TGT. Anhand der Primärsequenz der QTRT1 lässt sich ableiten, dass diese Untereinheit mit hoher Wahrscheinlichkeit analog zur bakteriellen TGT ebenfalls eine modifizierte $(\beta\alpha)_8$ -Fass-Struktur sowie eine Zn^{2+} -bindende Subdomäne aufweist. Dabei verfügt nur die QTRT1 über alle Aminosäuren, die nach aktuellem Wissensstand für die Bindung und Katalyse des Substrats notwendig sind.^[30,31] Die QTRT2 trägt hingegen zur hohen Affinität und korrekten Bindung der tRNA bei.^[31,32] Die Sequenzidentität der QTRT2 zur QTRT1 beträgt moderate 23%. Während die QTRT2 in

Abwesenheit von QTRT1 ein Homodimer bildet, liegt die QTRT1 in Abwesenheit von QTRT2 als Monomer vor. In Anwesenheit beider Untereinheiten ist das Heterodimer die bevorzugte Spezies.^[33]

Eukaryoten besitzen abgesehen von der TGT keine Enzyme, die spezifisch an der Queuosin-Biosynthese beteiligt sind. Sie können Queuosin daher nicht *de novo* herstellen. Stattdessen müssen Tiere und Menschen Queuin aus der Nahrung oder aus dem Mikrobiom des Verdauungstraktes aufnehmen.^[21] Es ist demnach nachvollziehbar, dass die eukaryotische TGT die Queuin-Base im Vergleich zur preQ₁-Base als Substrat bevorzugt in die Position 34 der tRNA^{Tyr,Asp,Asn,His} einbaut, da ansonsten Intermediate entstünden, die von Eukaryoten nicht weiter umgesetzt werden könnten.^[31]

Zu Beginn der dieser Dissertation zugrundeliegenden Forschungsarbeit war die Struktur der QTRT2, die in Abwesenheit von QTRT1 ein Homodimer bildet, bereits bekannt. Behrens *et al.* war es gelungen, die Struktur des QTRT2-Homodimers mit einer Auflösung von 2,18 Å bei einem *R*-Wert von 16,7 % röntgenkristallographisch zu lösen. Die Phasierung erfolgte anhand des gebundenen Zink-Ions. Die Symmetrie der Kristalle entsprach dabei der Raumgruppe P2₁2₁2. Die Autoren konnten bestätigen, dass das QTRT2-Homodimer eine große Ähnlichkeit mit dem bakteriellen TGT-Homodimer aufweist. So bildet die QTRT2 analog zur bakteriellen TGT eine ($\beta\alpha$)₈-Fass-Struktur. Dennoch sind die Aminosäuren, welche bei der bakteriellen TGT für die Bindung der Substrate verantwortlich sind, in der eukaryotischen QTRT2 so verändert, dass weder die Bindung einer Nukleinbase noch die Bindung der *Anticodon*-Schleife der tRNA möglich sind. Dies unterstreicht die Rolle der QTRT2 als nicht-katalytische Untereinheit der TGT.^[33]

Auch die Quartärstruktur des QTRT2-Homodimers ist dem Homodimer der bakteriellen TGT sehr ähnlich. Die Kontaktfläche der beiden Peptidketten der QTRT2 ist mit einer Größe von 1682 Å² praktisch identisch zu der der bakteriellen TGT. Analog zu den Resten von Tyr330, His333 und Phe92' der *Z. mobilis* TGT befinden sich in der Dimerkontaktfläche des QTRT2-Homodimers die Seitenketten von Tyr363, His366 und Phe84'. Anstelle des Trp326 befindet sich in der QTRT2 an analoger Position das His359. So lässt sich die Affinität der einzelnen Monomere zueinander größtenteils auf die Wechselwirkung von aromatischen Resten zurückführen. Aufgrund der C2-Symmetrieachse des QTRT2 Homodimers besteht die gesamte Dimerfläche aus zwei identischen Bereichen.^[33]

Anhand von Punktmutations-Studien konnte gezeigt werden, dass in der bakteriellen TGT durch den Austausch von Val233 durch Glycin eine erhöhte Affinität zu Queuin erzeugt wird.

So entsteht eine größere Bindetasche, die durch den Dihydroxycyclopentenyl-Rest von Queuin besetzt werden kann. Außerdem scheint der Austausch von Cys158 durch Valin den Einbau von preQ₁, welches von Eukaryoten nicht weiter zu Queuin synthetisiert werden kann, in die tRNA von Eukaryoten zu hemmen. Die bakterielle TGT ist zudem ein Zielmolekül der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung. Forschungsergebnisse von Durand *et al.* haben gezeigt, dass die TGT maßgeblich zur Virulenz von Shigellen im Rahmen der Shigellose beiträgt. Im Rahmen der akademischen Forschung konnten so einige potente Inhibitoren identifiziert werden. Dabei wurden sowohl klassische kompetitive Inhibitoren entwickelt, die im aktiven Zentrum die Bindung der natürlichen Substrate hemmen, als auch Verbindungen, welche die Ausbildung eines aktiven Homodimers durch Störung der Protein-Protein-Wechselwirkung unterdrücken.^[27,34–38]

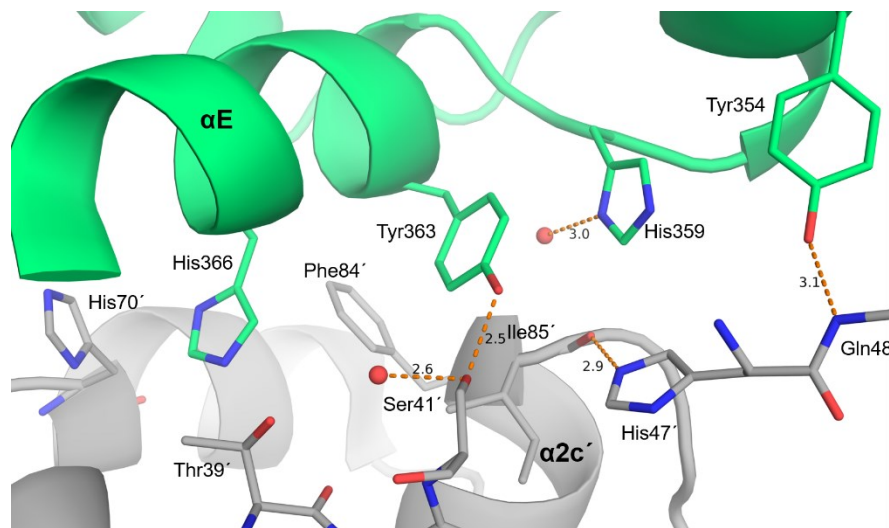


Abbildung 4: Dimerinterface des Homodimers der nicht-katalytischen Untereinheit QTRT2. Die beiden QTRT2-Moleküle sind in Cartoon (grün und grau) dargestellt, während wichtige Aminosäuren oder deren Seitenketten als Stäbchen dargestellt sind. O: rot, N: blau. Gestrichelte Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar. Die Zahlen neben den gestrichelten Linien entsprechen dem jeweiligen Abstand der Wasserstoffbrückenpartner in Ångström (Å)^[33]

1.4. Die Rolle von Q-modifizierten tRNAs bei der Translation

Neben der einfachen Q-Modifikation gibt es auch einige weitere Q-Derivate, die beispielsweise durch Zucker erweitert sind. Bereits seit Jahrzehnten untersuchen Forscher die genaue Funktion dieser Q-Familie. So konnten bereits einige Funktionen aufgeklärt und teilweise empirisch belegt werden.^[39–41] Wie eingangs beschrieben, kann im Falle von tRNA^{Tyr}, tRNA^{His}, tRNA^{Asp} und tRNA^{Asn} das Anticodon GUN sowohl an die Codons NAC als auch NAG binden. Posttranskriptionale Modifikationen an Position 34 der Anticodonsequenz, wie die Q-

Modifikation, können daher auf verschiedene Arten einen Einfluss ausüben.^[3,4,42] Ein Auszug über bereits bekannte Funktionen von Queuin wird im Folgenden vorgestellt.

Die Q-Modifikation hat einen Einfluss auf die *amber*-Suppressoreigenschaften von tRNA^{Tyr} beim Durchlesen des entsprechenden Stopp-Codons. Die Translation der Tabak-Mosaik-Virus-RNA in Tabak-Protoplasten liefert ein 17,5 kDa-Protein, ein 126 kDa-Protein und ein 183 kDa-Protein, wobei letzteres aus dem Durchlesen des UAG-Stopp-Codons, auch *amber*-Stopp-Codons genannt, des 126 kDa-Proteingens resultiert. Beier et al. (1984) zeigten in einem *in vitro*-System überzeugend, dass tRNA^{Tyr}(GΨA) aus Tabak oder Weizen ein relativ effizientes Überlesen des Stopp-Codons ermöglicht, während tRNA^{Tyr}(QΨA) diese Suppressor-Aktivität nicht besitzt. Vorher war bereits von Johnson & Abelson (1983) gezeigt worden, dass für die Suppressor-Aktivität der tRNA^{Tyr} die Anwesenheit der Ψ-Modifikation (Ψ = Pseudouridin) an Position 35 des Anticodons erforderlich ist. Dies zeigt die Auswirkung von Queuin auf die alternative Translation von Proteinen.^[41,43]

Meier *et al.* konnten zeigen, dass tRNA^{His}-G₃₄ das His-Codon CAC aufgrund der Watson-Crick Basenpaarung im Vergleich zum His-Codon CAU deutlich bevorzugt. Die tRNA^{His}-Q₃₄ dagegen zeigt keine signifikante Präferenz für eines der beiden Codons.^[44] Im Rahmen ähnlicher Studien untersuchten Kulkarni *et al.* die Rolle von Q bei der Translation in *Trypanosoma brucei*. Die Autoren nutzten ein zweifaches Luciferase-Reporter-System, bei welchem die *Renilla*-Fliegen-Luciferase über einen Linker mit der Glühwürmchen-Luciferase fusioniert war. Da diese Enzyme unterschiedliche Substrate nutzen, ist es möglich, die unterschiedliche Expression der beiden Enzyme mit Hilfe eines Lumineszenz-Assays gleichzeitig zu quantifizieren. Dafür erzeugten sie zwei Konstrukte, in denen die *Renilla*-Fliegen-Luciferase jeweils unverändert blieb. Dagegen waren im Glühwürmchen-Luciferase-Genabschnitt alle Codons, die von potentiell Q enthaltenden tRNAs erkannt werden, jeweils vollständig zu NAC oder zu NAU umgewandelt. Im Wildtyp-Gen der Glühwürmchen-Luciferase sind beide Arten von Codons zu etwa gleichen Anteilen enthalten.^[45] Dieses Konstrukt wurde anschließend in An- und Abwesenheit von Queuin in *Trypanosoma brucei*-Zellen exprimiert. Anhand der beiden Fluoreszenzsignale konnte der Einfluss auf die Translation bestimmt werden. Während für die Translation des NAC-Konstrukts keine signifikante Abhängigkeit von Queuin festgestellt werden konnte, zeigte das NAU-Konstrukt in Abwesenheit von Queuin eine signifikante Abnahme der Glühwürmchen-Luciferase-Fluoreszenz. Dies verdeutlicht, dass mit U endende Codons, welche von tRNA^{Asp}, tRNA^{Asn}, tRNA^{His} und tRNA^{Tyr} erkannt werden, in Abwesenheit von Q weniger effizient translatiert werden als in dessen Anwesenheit.^[45]

Das mitochondriale Genom des Parasiten, *Trypanosoma brucei*, enthält kein einziges tRNA-Gen. Das heißt, dass sämtliche tRNAs aus dem Zytoplasma in das Mitochondrium importiert werden müssen. In Anwesenheit der Q-Modifikation werden tRNAs drei- bis viermal effizienter importiert als ohne die Q-Modifikation. Folglich ist die Modifikationsrate der tRNA^{Asp}, tRNA^{Asn}, tRNA^{His} und tRNA^{Tyr} in den Mitochondrien im Vergleich zum Cytosol größer.^[45] Eine Hemmung der QTRT1 führt zu einer um 45 % reduzierten Aktivität des Atmungskettenkomplex IV in den Mitochondrien, da einige Gene, die Proteine dieses Komplexes kodieren, einen besonders hohen Anteil an NAU-Codons beinhalten.^[45] Eine Hemmung der parasitären QTRT1 stellt dennoch keine geeignete Therapiestrategie dar, da der Parasit im Menschen Energie hauptsächlich durch anaerobe Stoffwechselwege bereitstellt.

Zaborske *et al.* zeigten anhand eines kinetischen Modells, dass tRNA-Q₃₄ eine höhere Affinität zum Ribosom hat als tRNA-G₃₄. So kann auch tRNA^{Asn}-Q₃₄ (Anticodon: QUU) beide Asn-Codons schneller als G₃₄-haltige tRNA^{Asn} translatieren. Bei der Dekodierung des AAU-Codons am Ribosom stellt GUU-tRNA^{Asn} also nur einen schwachen Kompetitor von QUU-tRNA^{Asn} dar. Eine tRNA, welche das AAU-Codon fälschlicherweise erkennt, ist die IGU-tRNA^{Thr} (I = Inosin). Sie stellt jedoch einen noch deutlich schwächeren Kompetitor der QUU-tRNA^{Asn} dar als GUU-tRNA^{Asn}, sodass bei ausreichender Modifikation der tRNA mit Q kaum Falscheinbau von Threonin erfolgt.^[46] Dieses Beispiel verdeutlicht, dass die Q-Modifikation zu einer geringeren Fehlerrate bei der Translation beitragen kann.

Tuorto *et al.* zeigten mit Hilfe der *Ribosome Profiling*-Methode, dass das Fehlen der Q-Modifikation in HeLa-Zellen zu einer reduzierten Translationsgeschwindigkeit führt. Diese Methode ermöglicht es, mRNA-Bereiche zu identifizieren, an denen gerade Translation stattfindet. Darüber hinaus macht sie die Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese an der sequenzierten mRNA sichtbar und zeigt an welchen Codons des Transkriptoms die Translation verlangsamt stattfindet oder pausiert.^[47] Erwartungsgemäß ist die Translationsgeschwindigkeit an potentiell Q-tRNA-dekodierten Codons, welche mit U enden (= *Wobble*-Position), stärker reduziert als an solchen, die mit C enden. Im Falle von Asp-Codons zeigt sich allerdings ein anderes Bild. Hier führt das Fehlen der Q-Modifikation zu einer deutlicheren Verlangsamung der Translationsgeschwindigkeit des GAC-Codons im Vergleich zum GAU-Codon. Eine Erklärung für diese Ausnahme könnte die weitgehend fehlende m⁵C38-Modifikation Q-freier tRNA^{Asp} sein, welche offensichtlich besonders für die schnelle Translation des GAC-Codons erforderlich ist. In Abwesenheit von Queuin ist in HeLa-Zellen die Dnmt2-vermittelte m⁵C38-Modifikation von tRNA^{Asp} deutlich reduziert, wie es vorher in *Schizosaccharomyces pombe* und *Dictyostelium discoideum* beobachtet worden war. Das Enzym Dnmt2 überträgt

eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf Position 5 von Cytosin³⁸ in der Anticodonschleife von tRNA^{Asp}.^[48] Die Q-Modifikation der tRNA^{Asp} ist dabei die Voraussetzung für die effiziente Dnmt2-vermittelte Methylierung. Müller *et al.* haben gezeigt, dass TGT-defiziente *Schizosaccharomyces pombe* Zellen neben einer fehlenden Q-Modifikation auch eine sehr geringe m⁵C38-Modifikation von tRNA^{Asp} aufweisen.^[49] Die Autoren konnten den gleichen Effekt auch in humanen *colorectalen* Karzinomzellen nachweisen. Anhand dieses Beispiels zeigt sich, dass die Q-Modifikation wiederum einen Einfluss auf weitere Modifikationen haben kann, beispielsweise, indem die Affinität der tRNA zum modifizierenden Enzym beeinflusst wird.

Anhand der SILAC-Methode (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) konnten Tuorto *et al.* zeigen, dass jene Codons, die bei fehlender Q-Modifikation verzögert translatiert werden, in herabregulierten Genen angereichert sind. Ein starker Mangel an Queuin führt außerdem zu einer Hochregulierung von Genen, welche an der eIF2-Signalgebung beteiligt sind. Diese Signalkaskade bewirkt unter Stressbedingungen eine reduzierte Translation und Zellproliferation und wird daher auch *integrated stress response* genannt.^[47] In HeLa-Zellen, die in Abwesenheit von Queuin gewachsen sind, ist außerdem eine deutliche Dilatation des Endoplasmatischen Retikulums (ER) sowie eine unregelmäßige Vakuolisierung zu beobachten, die auf einen ausgeprägten ER-Stress hindeutet. Daneben zeigen die Zellen ohne Q-Modifikation ein erhöhtes Vorkommen von Proteinaggregation, die auf eine verstärkte Fehlfaltung von Proteinen zurückzuführen ist.^[47]

Keimfreie Mäuse, welche 60 Tage lang mit synthetischer Q-freier Nahrung gefüttert wurden, zeigen besonders in hoch-proliferativem Gewebe einen starken Rückgang der Q-Modifikation, welcher wiederum mit einem deutlich reduzierten Anteil von m⁵C38-tRNA^{Asp} einhergeht.^[47] Suzuki *et al.* bestätigten die von Tuorto beschriebenen Effekte auf die Translationsgeschwindigkeit, die gesteigerte Stressreaktion des ER sowie den Anstieg von Proteinfehlfaltung anhand von *QTRT2-Knockout* HEK293T-Zellen.^[50]

1.5. Weitere Rollen von Queuin und der eukaryotischen TGT

1.5.1. Der Einfluss von Substraten der eukaryotischen TGT auf Multiple Sklerose

Die chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose (MS) geht mit einer raschen Ausbreitung autoreaktiver T-Zellen einher, welche das Zentralnervensystem infiltrieren, um dort die Myelinscheiden von Axonen zu zerstören. Varghese *et al.* zeigten bei Wildtyp-T-Zellen aus Mäusen, dass 6-Thioguanin einen potenten anti-proliferativen Effekt hat. Dieser Effekt bleibt bei TGT-defizienten T-Zellen gänzlich aus. Um auszuschließen, dass eine Abhängigkeit dieser Wirkung von dem Enzym HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) besteht, welches die Rückgewinnung von Purin-Derivaten über den Salvage-Biosyntheseweg einleitet, wurden analoge Versuche ebenfalls mit HGPRT-defizienten Zellen durchgeführt. Dabei wurde eindeutig gezeigt, dass die anti-proliferative Wirkung von 6-Thioguanin unabhängig von der HGPRT ist.^[51]

Nachdem Mäuse die klinische Stufe 2 der EAE (= Experimentelle Autoimmun-Encephalomyelitis, ein Maus-Modell für MS) erreicht hatten (schlaffe Schwanzhaltung und wackliger Gang), wurde ihnen intraperitoneal 6-Thioguanin verabreicht. Dies brachte den Krankheitsverlauf nicht nur zum Stillstand, sondern kehrte ihn vollständig um, sodass die behandelten Mäuse zwölf Tage nach Therapiebeginn nicht mehr von unbehandelten Kontrolltieren zu unterscheiden waren.^[51] QTRT1-defiziente Mäuse, bei denen EAE induziert wurde, zeigten unter Gabe der gleichen Dosis 6-Thioguanin keinen therapeutischen Effekt. Demnach scheint die Wirkung von 6-Thioguanin von einem intakten TGT-Enzym abhängig zu sein. Die Autoren konnten zeigen, dass die therapeutische Wirkung von 6-Thioguanin auf der Unterdrückung der Aktivierung von Gewebsmakrophagen sowie der Infiltration von T-Zellen beruht. 6-Thioguanin zeigt allerdings in Anwesenheit eines intakten HGPRT-Enzyms eine zytotoxische Wirkung. Daher kann es therapeutisch nicht bei MS angewendet werden. Aus diesem Grund suchten Varghese *et al.* nach einer Verbindung, welche von der TGT als Substrat umgesetzt, aber durch das HGPRT-Enzym nicht erkannt wird. Sie entwickelten das preQ₁-Derivat N -((2-Amino-4-oxo-4,7-dihydro-3H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-5-yl)methyl)-3-phenylpropan (NPPDAG, Abbildung 5), welches von der TGT irreversibel in die tRNA eingebaut wird. Auch NPPDAG hat eine TGT-abhängige antiproliferative Wirkung auf T-Zellen. Behandelte Mäuse zeigen bereits nach fünf Tagen bei einer täglichen NPPDAG-Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht ein vollständiges Verschwinden sämtlicher Symptome. EAE geht mit einer deutlichen Hochregulierung der Transkription von oxidativem-Stress-assoziierten

Genen (*iNOS*, *Nox2*) und Apoptosegenen (*Casp1*, *Casp3*, *FasL*) sowie mit der Herabregulierung der Transkription von Markergenen für die neuronale Entwicklung (*BDNF*, *NT-3*) und Myelinierung (*Plp1*, *Mbp*) einher. Die Behandlung erkrankter Mäuse mit NPPDAG führt dazu, dass die Expressionsrate all dieser Markergene auf ein normales Maß reduziert wird.^[51]

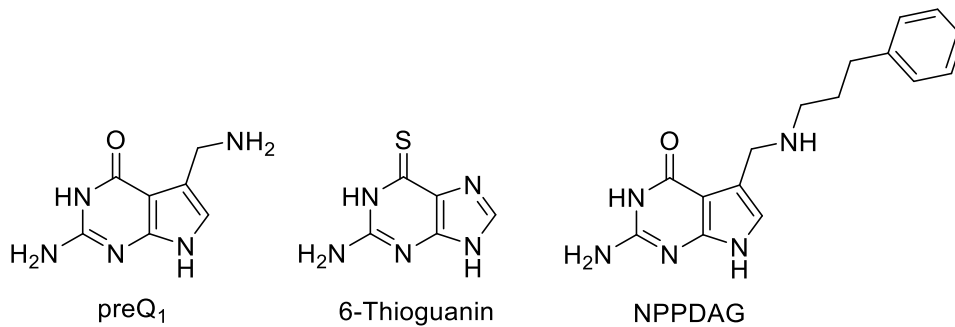


Abbildung 5: Strukturformeln der TGT-Substrate preQ₁, 6-Thioguanin und NPPDAG.

1.5.2. Die Notwendigkeit von Queuin in Eukaryoten bei der Oxidation von Phenylalanin zu Tyrosin

Wird keimfreien Mäusen eine Q-freie Diät verabreicht, die jedoch die bekannten Vitamine, essentielle Spurenelemente, Glukose und eine Lipidquelle enthält, sind diese bei nahezu unverändertem Phänotyp lebensfähig. In Abwesenheit der Aminosäure Tyrosin bei sonst gleicher Nahrung sind die Mäuse nicht überlebensfähig. Herkömmliche, nicht-keimfreie Mäuse zeigen bei der gleichen Diät dagegen keinerlei Symptome. Dies beruht auf der Tatsache, dass die Tiere die Aminosäure Phenylalanin durch eine Hydroxylierung des Phenylrings in Position 4 in Tyrosin umwandeln können. Für diese Reaktion ist die Tetrahydrobiopterin-abhängige Monooxygenase Phenylalaninhydroxylase verantwortlich.^[52] TGT-defiziente Mäuse weisen eine reduzierte Plasmakonzentration von Tetrahydrobiopterin auf. Stattdessen ist die Konzentration von oxidierten Abbauprodukten in diesen Mäusen erhöht. Ein langfristiger Mangel an Tetrahydrobiopterin könnte sich negativ auf die Produktion von Serotonin und Dopamin auswirken, da Tetrahydrobiopterin zur Biosynthese von beiden Gewebshormonen gebraucht wird, deren Fehlen zu Parkinson-ähnlichen Symptomen führen kann.^[53]

1.5.3. Die Bedeutung der QTRT1-Aktivität für das Wachstum und die Migration von MCF-7-Brustkrebszellen und davon abgeleiteten Tumoren

Zhang, J. *et al.* (2020) entwickelten eine stabile *QTRT1-knockout* Variante in MCF-7-Zellen, einer Zelllinie des Brustadenokarzinoms. Sie konnten zeigen, dass dies eine Reduktion der Q-Modifikationsrate von nahezu 100 % auf 25 % zur Folge hatte. Die Autoren konnten dabei nicht zweifelsfrei erklären, warum die Q-Modifikation nicht gänzlich unterbunden war. Die Zellproliferation der *QTRT1-knockout*-MCF-7-Zellen war signifikant verlangsamt, was sich auch in der reduzierten Produktion der Zellproliferationsmarker PCNA und Ki67 widerspiegelte. Modifizierte Zellen wiesen außerdem ein reduziertes Migrationsverhalten auf, was wiederum mit einer erhöhten Produktion der Zelladhäsionsproteine β -Catenin und E-Cadherin einhergeht. Das Ausschalten des *QTRT1*-Gens bewirkt eine deutlich verminderte Produktion des Proteins Claudin-5, welches ein wichtiger Bestandteil von *tight junctions* ist. Claudin-5 tritt insbesondere bei Brustkrebs-Patientinnen, bei denen ein erhöhtes Risiko für Metastasen und einer wiederkehrenden Erkrankung vorliegt, in hohen Mengen auf.^[54]

Die Autoren transplantierten sowohl MCF-7-Wildtyp-Zellen als auch MCF-7-*QTRT1-knockout*-Zellen in Nacktmäuse. Tiere, denen die modifizierten Zellen transplantiert wurden, zeigten dabei deutlich weniger Tumore, die auch in ihrer Größe deutlich reduziert waren. Dabei konnte auch der bereits in den *in vitro* Experimenten beobachtete Unterschied hinsichtlich der Marker bestätigt werden. Tumore aus *QTRT1-knockout*-Zellen enthalten erhöhte Mengen an β -Catenin und E-Cadherin, während die Konzentration von Claudin-5 und PCNA jeweils deutlich reduziert ist. Zusammenfassend deutet die Studie darauf hin, dass das Ausschalten des *QTRT1*-Gens das Wachstum bestimmter Brustkrebs-Tumore hemmt.^[54]

1.5.4. Der Einfluss von Queuin auf Resistenz gegen oxidativen Stress und die Pathogenität von *Entamoeba histolytica*

Nagaraja *et al.* untersuchten den Einfluss von Queuin auf *Entamoeba histolytica*, den Verursacher der Amöbenruhr. Dazu ließen sie Trophozoiten, Protisten in der vegetativen Lebensphase, in An- und Abwesenheit von Queuin wachsen. Die Autoren beobachteten einen circa fünffachen Anstieg der Q-Modifikation in Anwesenheit von Queuin, was analog zu bereits beschriebenen Studien mit einer verstärkten Dnmt2-vermittelten m⁵C38-Modifikation von tRNA^{Asp} einhergeht.^[49,55]

Um den Einfluss der Q-Modifikation auf die Resistenz gegen oxidativen Stress zu untersuchen, ermittelten die Autoren die LD₅₀-Werte von H₂O₂ in Zellen, die in An- und Abwesenheit von Queuin kultiviert wurden. In Anwesenheit von Queuin zeigten die Zellen eine signifikant höhere Resistenz gegenüber oxidativem Stress.

Auch der Einfluss auf die Virulenz des Parasiten wurde untersucht, indem die Autoren die Fähigkeit von Parasitenzellen bestimmten, eine Einzellschicht aus HeLa-Zellen zu zerstören. Dazu verwendeten sie Trophozoiten, welche in An- und Abwesenheit von Queuin gewachsen waren. Es zeigte sich, dass die cytopathogene Aktivität von Trophozoiten in Anwesenheit von Queuin signifikant reduziert ist. Analoge Ergebnisse konnten mit Zellen ermittelt werden, deren *QRT1*-Gen durch RNAi ausgeschaltet war. Zur Bestätigung dieses Befunds in einem *in vivo* Modell infizierten die Autoren den Blinddarm von Mäusen mit Kontroll-Trophozoiten und solchen, die in Anwesenheit von Queuin kultiviert wurden. Nach sieben Tagen konnten signifikant weniger Parasitenzellen nachgewiesen werden, welche zuvor in Anwesenheit von Queuin gewachsen waren. Demnach haben Trophozoiten von *Entamoeba histolytica* in Anwesenheit von Queuin eine erhöhte Stressresistenz, gleichzeitig jedoch auch eine verringerte Pathogenität. Die Autoren zeigten, dass die Anwesenheit von Queuin zu einem stark veränderten Transkriptom führt, welche die Herabregulierung von 664 sowie die Hochregulierung von 548 Genen beinhaltet.^[55]

2. Zielsetzung

Die Motivation zu dieser Arbeit leitet sich aus dem dargelegten Kenntnisstand ab. Ein besseres biochemisches und strukturelles Verständnis der eukaryotischen TGT kann zum einen zur effizienteren Vermeidung von Nebenwirkungen einer potentiellen Shigellose-Therapie genutzt werden. Zum anderen zeigen insbesondere die Arbeiten von Varghese *et al.*, dass die TGT beispielsweise zur Therapie der Multiplen Sklerose funktionalisiert werden kann.^[51]

Zu Beginn dieser Arbeit war die Struktur der katalytischen sowie der nicht-katalytischen Untereinheit der eukaryotischen TGT bereits bekannt.^[33] Allerdings ist insbesondere die bereits bekannte Kristallbedingung der katalytischen Untereinheit nur sehr schwierig zu reproduzieren. Nicht zuletzt daher war es Ziel der vorliegenden Arbeit, eine reproduzier- und optimierbare Bedingung zur Kristallisation des nativen TGT-Heterodimers zu entwickeln. Dazu sollten zunächst Expressionsstudien unter Verwendung verschiedener Expressionssysteme, darunter kommerzielle Varianten von *Vibrio natriegens*, durchgeführt werden. Bei der Entwicklung der Präparationsmethode des Zielproteins ausgehend vom Rohextrakt sollte insbesondere auf die Erhaltung des ausgeglichenen stöchiometrischen Verhältnisses der beiden Untereinheiten zueinander Wert gelegt werden. Nach der erfolgreichen Etablierung einer Präparationsmethode und der Entdeckung initialer Kristallisationsbedingungen sollten letztere hinsichtlich des Streuvermögens und der Reproduzierbarkeit der Kristalle optimiert werden. Zudem sollte eine Methode entwickelt werden, um die systematische Erzeugung von Protein-Ligand-Kristallen zu ermöglichen. Im Rahmen der kristallographischen Studie des Heterodimers sollte insbesondere die Quartärstruktur des Enzyms, die Kontaktfläche zwischen den Untereinheiten sowie die Bindung bereits bekannter Substrate im aktiven Zentrum aufgeklärt werden.

Neben den kristallographischen Studien sollten auch enzymkinetische Versuche durchgeführt werden. Dabei lag der Fokus auf der Charakterisierung bereits bekannter Substrate und Inhibitoren. Die verwendeten Inhibitoren wurden im Rahmen der Kooperation der Arbeitskreise von G. Klebe und F. Diederich zur Hemmung der bakteriellen TGT, einem wichtigen Pathogenitätsfaktor der Shigellen^[56], entwickelt. Eine selektive Hemmung der bakteriellen TGT ist dabei zur Vermeidung von Nebenwirkungen essentiell^[53].

Schließlich sollten die QTRT2-Mutanten S41A, Y354F sowie eine Variante mit beiden Mutationen erstellt werden. Die Reste von Ser41 und Tyr354 sind an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken im *Interface* des QTRT2-Homodimers sowie des QTRT1/2-Heterodimers

beteiligt. Durch enzymkinetische Studien und native Massenspektrometrie sollte die Funktion dieser Reste im Hinblick auf die enzymatische Aktivität des Enzyms sowie die Dimerstabilität untersucht werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Etablierung eines Expressions- und Reinigungsprotokolls

3.1.1. Konstruktion eines rekombinanten Expressionssystems für die Koexpression der beiden TGT-Untereinheiten aus der Maus

Als Grundlage für diese Arbeit wurden die Varianten der beiden TGT-Untereinheiten aus der Arbeit von Inna Biela aus dem Jahr 2013 verwendet.^[57] Die Gene der katalytischen und nicht-katalytischen Untereinheit (UniProtKB-Datenbankeinträge^[58] Q9JMA2 und B8ZXI1) sind hier jeweils in den Expressionsvektor pASK-IBA13plus (IBA, Göttingen, Deutschland, Abbildung 6) eingebracht. Das Zielgen ist in diesem Expressionsvektor am 5'-Ende an eine Sequenz fusioniert, die für eine Thrombin-Erkennungssequenz und ein *N*-terminales *Strep-Tag II*[®] kodiert. Die Gene waren jeweils über zwei *BsaI*-Erkennungssequenzen in den Zielvektor kloniert worden.

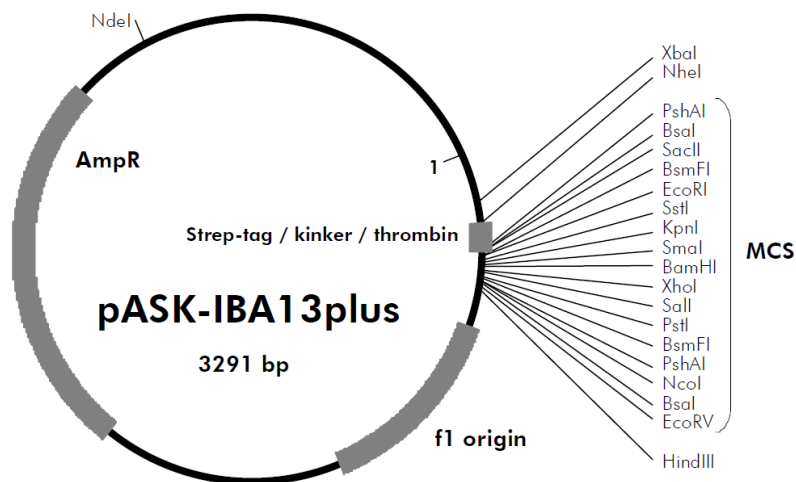


Abbildung 6: Schematische Darstellung des pASK-IBA13plus Vektors, der in der Arbeit von I. Biela^[57] als Expressionsvektor genutzt wurde.

In den vorherigen Arbeiten wurde der Ansatz verfolgt, das funktionelle Heterodimer zu kristallisieren, nachdem die beiden Untereinheiten im gleichen Stoffmengenverhältnis gemischt wurden. Diese Versuche waren allerdings bisher erfolglos geblieben. Garcia *et al.* (2010)^[31] hatten gezeigt, dass die humane TGT eine höhere enzymatische Aktivität besitzt, wenn beide Untereinheiten gemeinsam exprimiert und gereinigt werden. Für eine erfolgreiche Kristallisation ist ein hohes Maß an Homogenität bezogen auf die korrekte Faltung des Proteins und der daraus resultierenden Aktivität wichtig. Deshalb wurde in dieser Arbeit zunächst die

gemeinsame Expression und Reinigung der Maus-TGT-Untereinheiten etabliert. Als Grundlage wurden die folgenden, bereits genannten Konstrukte verwendet.

m*QTRT1*-Gen in pASK-IBA13plus_mTGT

Thrombin

```

      L V P R G S M A A V M L T *
5' - ... CTGGTTCGCGTGGCTCCATGGCAGCAGTT ... ATGCTGACCTAAGATATCTAA ... 3'
3' - ... GACCAAGGCGCACCGAGGTACCGTCGTCAA ... TACGACTGGATTCTATAGATT ... 5'
  
```

m*QTRT2*-Gen in pASK-IBA13plus_mQv1

Thrombin

```

      L V P R G S R D R M M K L Q M F G L *
5' - ... CTGGTTCGCGTGGCTCCCGAGACCGCATGATGAAACTG ... CAGATGTTTGGTCTCTGATATCTAA ... 3'
3' - ... GACCAAGGCGCACCGAGGCTCTGGCGTACTACTTTGAC ... GTCTACAAACCAGAGACTATAGATT ... 5'
  
```

Abbildung 7: Sequenz des *QTRT1*-Gens (oben) und des *QTRT2*-Gens (unten) vor der Klonierung. Die Gene lagen in dem Expressionsvektor pASK-IBA13plus vor. Der farbliche Übergang markiert die Stellen, die durch Klonierung mit *BsaI* entstanden sind.^[57]

Der bisher verwendete Vektor besitzt nur eine multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site* = MCS) und ist daher für die gleichzeitige Expression von zwei Genen nicht geeignet. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Vektor pETDuet1 von der Firma Novagen verwendet. Dieser Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen sowie das *lacI*-Gen, welches für den *lac*-Repressor kodiert. Vor allem verfügt er über zwei MCS, in die insgesamt zwei Zielgene eingefügt werden können. Die beiden Gene werden dann gemeinsam von einem T7-Promoter aus transkribiert, welcher unter der Kontrolle des *lac*-Operators steht. Die Induktion der Zielgene erfolgt durch die Zugabe von IPTG, welches an den *lac*-Repressor bindet und ihn dadurch inaktiviert. Das für die Transkription erforderliche Gen für die T7-RNA-Polymerase muss im Chromosom des Bakterienstamms enthalten sein, der für die Expression eingesetzt wird.

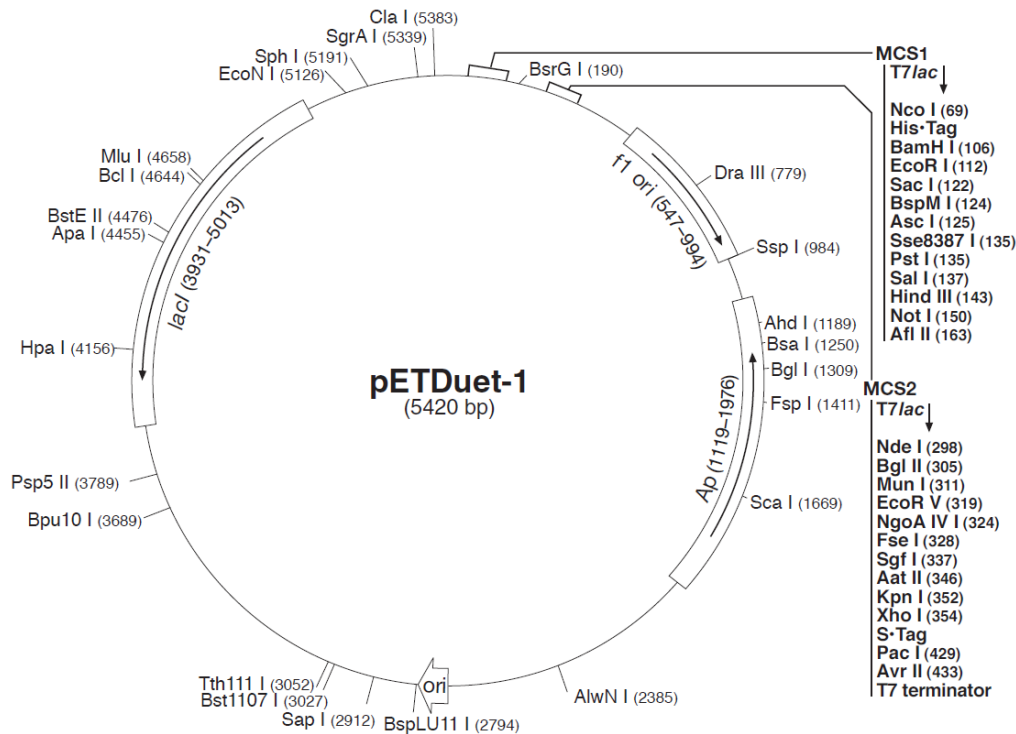


Abbildung 8: Schematische Darstellung des pETDuet-1 Vektors, der für die Koexpression des *QTRT1*- und des *QTRT2*-Gens verwendet wurde.

Da die Reinigung der beiden Untereinheiten mittels *Strep*-Tactin[®]-Matrix bereits etabliert worden war, sollte diese Variante der Affinitätschromatographie auch bei dem neu zu erzeugenden Konstrukt angewendet werden. Außerdem wurde die bisherige Thrombin-Schnittstelle durch eine PreScission[™]-Schnittstelle ausgetauscht. Das bisher zur Abspaltung des *Strep-Tag* II verwendete *Thrombin Cleavage Capture Kit* der Firma Novagen ist kostspieliger als die PreScission[™]-Protease und war darüber hinaus in der Vergangenheit nicht immer verfügbar. Die für die Schnittstelle und das *Strep-Tag* II kodierende DNA-Sequenz wurde durch eine mehrstufige PCR an das 5'-Ende des *QTRT2*-Gens angehängt. Um die Effizienz der Expression zu erhöhen, wurde dabei das ursprüngliche ATG-Startcodon des *QTRT2*-Gens entfernt. Außerdem wurden für die Insertion in die MCS2 des Expressionsvektors am 5'-Ende des resultierenden Leserahmens eine *Nde*I-Erkennungssequenz und am 3'-Ende eine *Pac*I-Erkennungssequenz eingefügt (Abbildung 9).

mQTRT2-Gen in der MCS2 von pETDuet-1

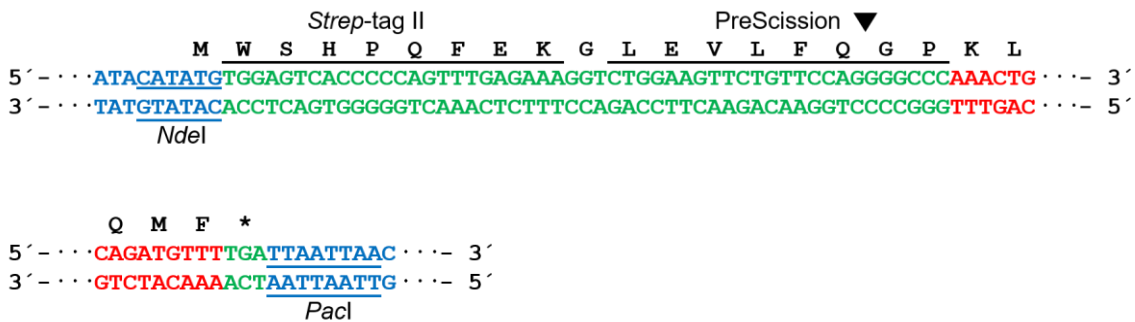


Abbildung 9: Sequenz nach erfolgreicher Klonierung des *QTRT2*-Gens in die MCS2 des Expressionsvektors pETDuet-1. **Rot:** Sequenz des *QTRT2*-Gens, das für die nicht-katalytische Untereinheit der Maus-TGT kodiert. **Grün:** Durch mehrstufige PCR eingeführte Sequenz. **Blau:** MCS2 des Vektors.

Es ist bekannt, dass die nicht-katalytische und die katalytische Untereinheit der Maus-TGT eine sehr hohe Affinität zueinander haben,^[33] sodass eine Reinigung des kompletten Heterodimers auch möglich sein sollte, wenn nur die nicht-katalytische Untereinheit mit einem *Strep-Tag II* ausgestattet ist. Daher wurde bei der Klonierung des *QTRT1*-Gens in das pET-Duet-1-Konstrukt an dessen 5'-Ende nur die Sequenz für die PreScission-Schnittstelle eingeführt. Für die Insertion in die MCS1 des Expressionsvektors wurden am 5'-Ende des so entstandenen Leserahmens eine *BamHI*-Erkennungssequenz und am 3'-Ende eine *HindIII*-Erkennungssequenz angebracht. Die im Vektor enthaltene Sequenz für das *HIS₆-Tag* am 5'-Ende der MCS1 des Expressionsvektors blieb bei der Klonierung erhalten und befindet sich im Leserahmen mit dem *QTRT1*-Gen. Das *Tag* sollte bei der Reinigung jedoch nicht zum Einsatz kommen. Nach erfolgter Aufreinigung des rekombinanten Heterodimers wird es zusammen mit dem *Strep-Tag II* der *QTRT2*-Untereinheit durch Behandlung mit der PreScission-Protease abgespalten.

Eine Sekundärstrukturvorhersage mittels PSIPRED^[59] hatte gezeigt, dass die ersten zehn *N*-terminalen Aminosäuren der *QTRT1*-Untereinheit mit hoher Wahrscheinlichkeit einen flexiblen Bereich des Proteins darstellen. Sie sind in orthologen Proteinen nicht konserviert und üben dementsprechend mit hoher Wahrscheinlichkeit keinerlei Funktion aus. Da das Entfernen flexibler Bereiche eines Proteins die Chance auf erfolgreiche Kristallisation erhöhen kann, wurde die entsprechende Sequenz des *QTRT1*-Gens aus dem oben beschriebenen Konstrukt durch Mutagenese nachträglich deletiert. Die rekombinante Maus-TGT, welche durch das schließlich entstandene Expressionsplasmid pETDuet-1-mTGT erzeugt wird, enthält folglich

nach vollständiger Aufreinigung eine QTRT1-Untereinheit, welche *N*-terminal um zehn Aminosäuren verkürzt ist, jedoch die zwei zusätzlichen Aminosäuren Glycin und Prolin enthält. Letztere stellen einen Überrest der PreScission-Schnittstelle nach Verdau mit eben dieser Protease dar. Danach schließt sich unmittelbar die Aminosäure Glutamat als ursprünglich elfte Aminosäure der QTRT1-Untereinheit an (Abbildung 10).

Die mittels pETDuet-1-mTGT produzierte QTRT2-Untereinheit enthält nach vollständiger Reinigung am *N*-Terminus ebenfalls die der PreScission-Protease-Schnittstelle entstammenden zwei zusätzlichen Aminosäuren Glycin und Prolin. Daran schließt sich die Aminosäure Lysin an, welche ursprünglich die zweite Aminosäure dieses Proteins darstellt (Abbildung 9).

mQTRT1-Gen in der MCS1 von pETDuet-1

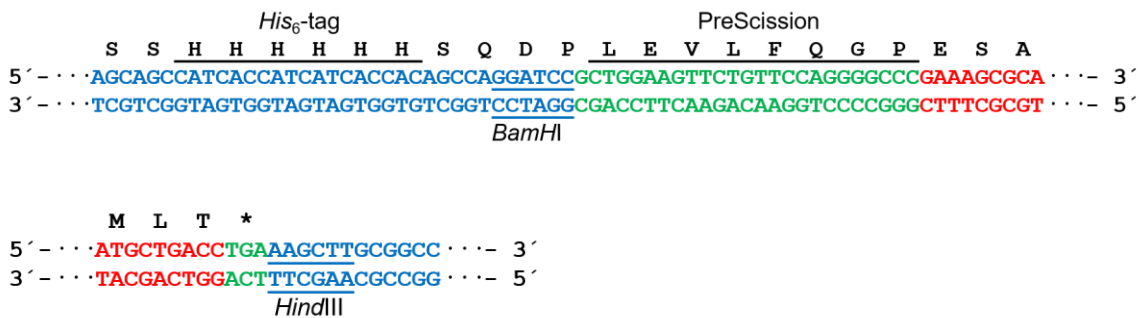


Abbildung 10: Sequenz nach erfolgreicher Klonierung des *QTRT1*-Gens in die MCS1 des Expressionsvektors pETDuet-1. **Rot:** Trunkierte Sequenz des *QTRT1*-Gens, das für die katalytische Untereinheit der Maus-TGT kodiert. **Grün:** Durch mehrstufige PCR eingeführte Sequenz. **Blau:** MCS1 des Vektors.

3.1.2. Überexpression des TGT Heterodimers in Bakterienzellen

Nach erfolgreicher Herstellung des Expressionsvektors musste ein geeignetes Protokoll zur rekombinanten Produktion des TGT-Heterodimers etabliert werden. Als Ausgangspunkt für diese Aufgabe wurde der bereits für die separate Produktion der beiden TGT Untereinheiten verwendete *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL der Firma Agilent Technologies verwendet. Der erste Ansatz zur rekombinanten Herstellung des Maus-TGT-Heterodimers wurde anhand der Vorschrift von Biela^[33] durchgeführt. Hier wurde eine Expressionstemperatur von 15 °C bei einer Expressionszeit von 24 h eingestellt, da bei höheren

Temperaturen das Zielprotein in Einschlusskörpern vorlag und nicht mehr in Lösung gebracht werden konnte. Die Zellen waren vorher bei 37 °C in 2 L des 2 x YT Mediums, in dem eine finale Ampicillin-Konzentration von 100 µM vorlag, bis zu einer OD₆₀₀ von circa 0,6 vermehrt worden. Die Expression wurde danach durch die Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Zellen wurden schließlich durch Zentrifugation geerntet und bei -80 °C eingefroren. Aufgrund der Erfahrungen mit den einzelnen Untereinheiten des Proteins war nicht von einer sehr starken Überexpression der Gene auszugehen. Außerdem produzieren *E. coli*-Zellen natürlicherweise große Mengen des Elongations-Faktors Tu, welcher ein ähnliches Molekulargewicht (43,3 kDa) aufweist wie QTRT1 (46,5 kDa) und QTRT2 (48,6 kDa).^[60] Dies erschwert bei der SDS-PAGE von Rohextrakten die Detektion einer erfolgreichen Überproduktion der beiden Zielproteine (Abbildung 11, Spalte 1 und 2).

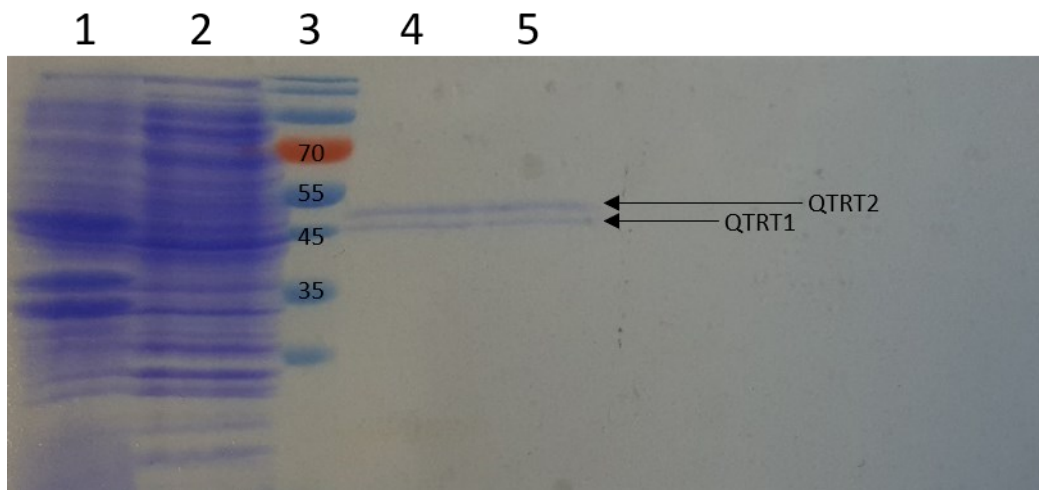


Abbildung 11: SDS-PAGE des Expressionsversuchs der Maus-TGT mit dem *E. coli*-Stamm BL21 CodonPlus(DE3)-RIPL. Spalte 1: Aufgeschlossene Zellen, Spalte 2: Überstand nach Zentrifugation des Zellaufschlusses, Spalte 3: Marker (Größenangaben in kDa), Spalte 4 und 5: Proteininhaltige Fraktionen nach Affinitätschromatographie mit einer *Strep-Tactin*[®]-Säule.

Um den Erfolg der Überexpression zu bestimmen, musste das heterodimere Zielprotein mittels Affinitätschromatographie aus dem Rohextrakt extrahiert werden. Hierzu wurde das Zell-Pellet in Lysepuffer resuspendiert und die erhaltene Zellsuspension mittels Ultraschalls aufgeschlossen. Das Abtrennen der unlöslichen Bestandteile erfolgte anschließend per Zentrifugation. Der Überstand wurde abdekantiert und auf eine mit Lysepuffer konditionierte *Strep-Tactin*[®]-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit Lysepuffer gewaschen und das Zielprotein anschließend mit Biotin-haltigem Elutionspuffer eluiert. Vor der Elution wurde die

Säule an eine ÄKTA-FPLC-Anlage angeschlossen, um die proteinhaltigen Fraktionen zu identifizieren. Das entsprechende Chromatogramm ist in Abbildung 12 gezeigt.

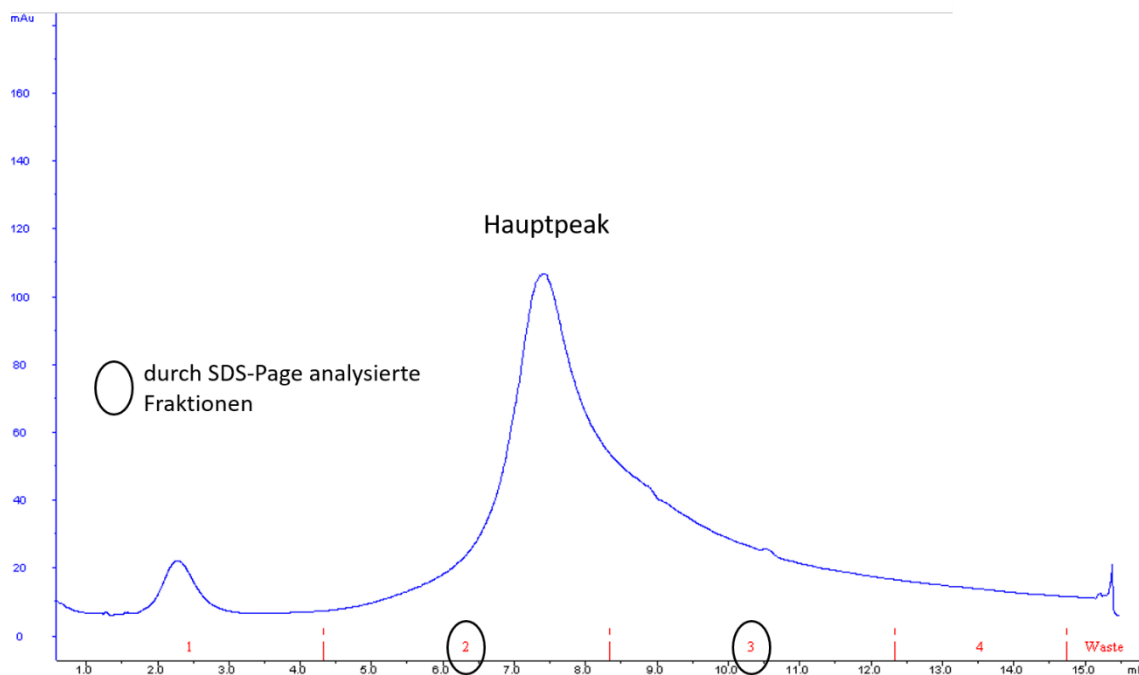


Abbildung 12: Chromatogramm der Affinitätschromatographie mittels *Strep-Tactin*[®]-Säule. Das Chromatogramm zeigt die Elution mit Biotin-haltigem Puffer. Die Säule wurde erst nach Waschen mit Lysepuffer an die FPLC-Anlage angeschlossen.

Im SDS-PAGE-Gel der proteinhaltigen Fraktionen sind deutlich zwei Banden zu erkennen, die den beiden Untereinheiten des TGT Heterodimers entsprechen (theoretische Masse des Konstrukts der katalytischen QTRT1-Untereinheit: 46458 Da; Konstrukt der nicht-katalytischen QTRT2-Untereinheit: 48613 Da, Abbildung 11, Spalte 4 und 5). Das Vorliegen der beiden Untereinheiten in dem Eluat der *Strep-Tactin*[®]-Säule beweist, dass der konstruierte Expressionsvektor grundsätzlich für die gemeinsame Expression der beiden Untereinheiten geeignet ist. Es wurde außerdem gezeigt, dass die nicht-kovalenten Wechselwirkungen der beiden Proteine stark genug sind, um eine gemeinsame Reinigung zu ermöglichen, da nur die QTRT2 über ein *Strep-Tag II* verfügt.

Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt und die Probe wurde auf ein Volumen von etwa 1,5 mL konzentriert. Die Proteinausbeute nach der Affinitätschromatographie betrug ca. 1 mg pro Liter Bakterienkultur.

Weil das Zielprotein für umfangreiche Kristallisationsversuche verwendet werden sollte, ist dies deutlich zu gering, insbesondere da während der vollständigen Reinigung mit weiteren

Ausbeuteverlusten zu rechnen ist. Daher wurde versucht, die Effizienz der Expression zu verbessern. Hierzu wurden verschiedene Nährmedien, Expressionszeiten, Expressionstemperaturen und IPTG-Konzentrationen getestet. Außerdem wurde eine weitere *E. coli* Variante verwendet. Die Versuche wurden wie oben beschrieben ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Ergebnisse der Expressionsversuche mit dem QTRT1/2 Heterodimer. Die Expression wurde jeweils mit 2 L Kultur in einem 5 L Schikanekolben durchgeführt. Die Ausbeute bezieht sich jeweils auf einen Liter der Bakterienkultur. Nähere Angaben zu den Medien und Bakterienstämmen befinden sich in Kapitel 5.

Bakterienstamm	Medium	[IPTG]	T [°C]	t [h]	Ausbeute nach <i>Strep-Tactin</i> [®] -Säule
Codon +	2xTY	1,0 mM	15	24	< 1 mg/L
Codon +	LB	1,0 mM	15	24	keine
Codon +	LB	0,5 mM	15	24	keine
BL21 Gold	LB	1,0 mM	15	24	< 1 mg/L
BL21 Gold	2xTY	1,0 mM	15	48	1 mg/L
BL21 Gold	Enh. 2YT	1,0 mM	15	24	1.5 mg/L
BL21 Gold	2xTY	1,0 mM	37	3	< 1 mg/L
BL21 Gold	2xTY	1,0 mM	37	8	1 mg/L

Im Rahmen dieser Expressionsversuche konnte jedoch keine signifikante Steigerung der Ausbeute erzielt werden. Daher wurde für weitere Versuche der neuartige Expressionsstamm Vmax[™] der Firma Synthetic Genomics verwendet. Der auf Grundlage des Bakteriums *Vibrio natriegens* entwickelte Stamm zeichnet sich durch seine schnelle Teilungsrate von 14 min und vergleichsweise hohen Proteinausbeuten aus. Außerdem neigen diese Bakterien laut Angaben des Herstellers in geringem Maße zur Bildung von Einschlusskörpern.^[61] Die Zellen verfügen analog zu den verwendeten *E. coli* Stämmen in ihrem Genom über eine IPTG-induzierbare T7-RNA-Polymerase Kasette.

Zunächst musste der Expressionsvektor in die chemisch kompetenten Zellen eingebracht werden. Die genauen Schritte der Transformation sind in Kapitel 5.7.7 beschrieben. Dabei galt es zu beachten, dass die Vmax[™] Zellen im Vergleich zu den bisher verwendeten *E. coli*-Varianten eine höhere Ampicillin-Sensitivität aufweisen. Trotz der Verwendung von Agarplatten mit angepasster Antibiotikum-Konzentration war die Transformationseffizienz der

Bakterien gering. Die Transformation des Zielvektors musste bis zu dreimal wiederholt werden, um mindestens eine Bakterienkolonie zu erhalten. Die weitere Handhabung der *V. natriegens*-Zellen gestaltete sich dagegen problemlos.

Die Expression wurde in dem für diese Zellen empfohlenen und besonders nährstoffhaltigen Wachstumsmedium durchgeführt (siehe Kapitel 5.9). Zu Beginn wurden zwei unterschiedliche Bedingungen parallel getestet. Nachdem der komplette Ansatz bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von 1,0 vermehrt worden war, wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG die Expression induziert. Diese erfolgte dann bei einer Hälfte des Ansatzes für 24 h bei 15 °C, bei der anderen Hälfte für 6 h bei 37 °C. Die geernteten Zellen wurden im Anschluss wie in den Kapiteln 5.9 und 5.10 beschrieben aufgeschlossen und gereinigt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Das Chromatogramm zeigte dabei jeweils nur einen dominanten Hauptpeak und keine Nebenpeaks.

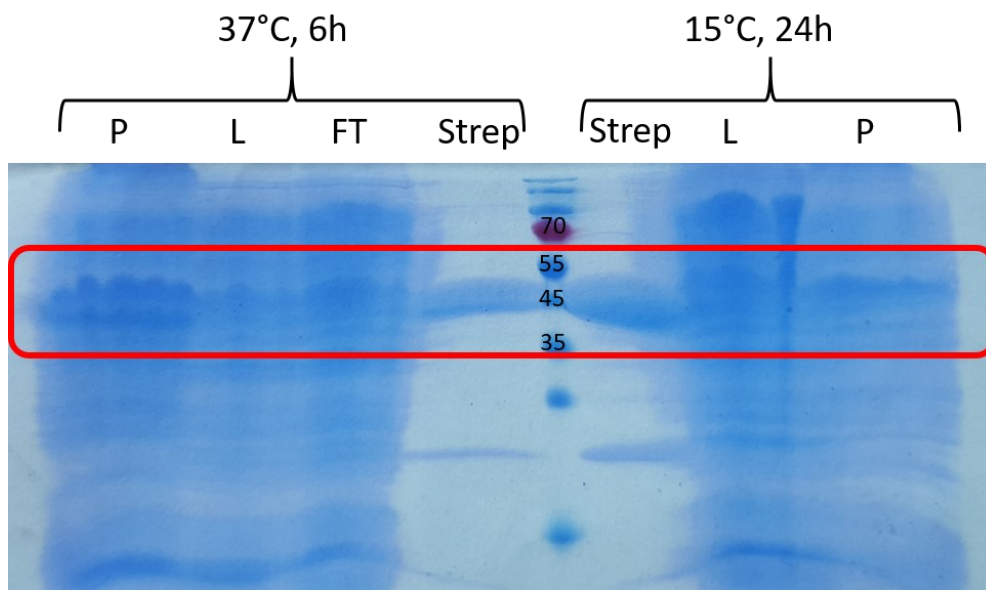


Abbildung 13: SDS-PAGE der QTRT1/2-Koexpression durch *V. natriegens* (Vmax) bei 15 °C und 37 °C. P: Pellet der geernteten Zellen. L: Löslicher Überstand nach dem Zellaufschluss und anschließender Zentrifugation. Strep: Vereinigte proteinhaltige Fraktionen der Affinitätschromatographie mit einer *Strep-Tactin*[®]-Säule. FT: *flow through*; Während des Auftragens der Probe auf die *Strep-Tactin*[®]-Matrix entstandener Durchfluss. Marker: Größenangaben in kDa. Der Größenbereich des QTRT1/2 Heterodimers ist durch einen roten Rahmen hervorgehoben.

Es ist bei beiden Ansätzen bereits im Gesamtzellaufschluss eine deutlich sichtbare Überexpression zu erkennen. Der Ansatz, bei welchem die Expression bei 37 °C stattgefunden hat, zeigt besonders ausgeprägte Banden der beiden TGT Untereinheiten im Pellet. Allerdings sind diese Banden im löslichen Überstand der aufgeschlossenen Zellen deutlich weniger vorhanden, was darauf hindeutet, dass die Zielproteine in Einschlusskörpern vorliegen. Dieser Effekt tritt bei der Expression bei 15 °C nicht auf, woran deutlich wird, dass eine Absenkung der Expressionstemperatur zur Vermeidung von Einschlusskörpern führt. Selbiges wird bei der Expression des *QTRT1*-Gens in *E. coli* beobachtet^[57].

Auf eine genaue Konzentrationsbestimmung wurde aufgrund der vorhandenen Verunreinigungen in diesem Fall verzichtet. Allerdings kann allein mit Hilfe des SDS-PAGE-Gels beurteilt werden, dass die Effizienz der Expression der Zielgene im Vergleich zu den Versuchen mit *E. coli* um ein Vielfaches höher ist. Um die Bildung von Einschlusskörpern zu vermeiden, wurde die Expression in allen weiteren Versuchen bei 15 °C für 24 h durchgeführt.

3.1.3. Reinigung des Heterodimers der Maus-TGT

Die Reinigung der Maus-TGT begann, wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erläutert, mit dem Aufschluss der Zellen und der anschließenden Affinitätschromatographie über eine *Strep-Tactin*[®]-Matrix. Nach diesem Schritt sollte die Abspaltung des *Strep-Tag* II an der QTRT2 sowie des *His₆-Tags* an der QTRT1 erfolgen, indem die Proteinprobe mit PreScission-Protease inkubiert wurde. Letztere lag in Aliquots zu jeweils 1 mg vor. Zunächst musste eine Arbeitsvorschrift etabliert werden, die eine vollständige Abspaltung der *Tags* gewährleistet, wobei gleichzeitig die Dauer der Inkubation begrenzt ist. Hierzu wurde zunächst ein Aliquot der PreScission-Protease zu der Proteinprobe gegeben und bei 4 °C inkubiert, nach 24 h wurde dann ein weiteres Aliquot hinzugefügt. Der Fortschritt der Reaktion wurde mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 14). Die Proben wurden direkt nach der Zugabe des ersten Aliquots sowie nach einem und nach zwei Tagen entnommen.

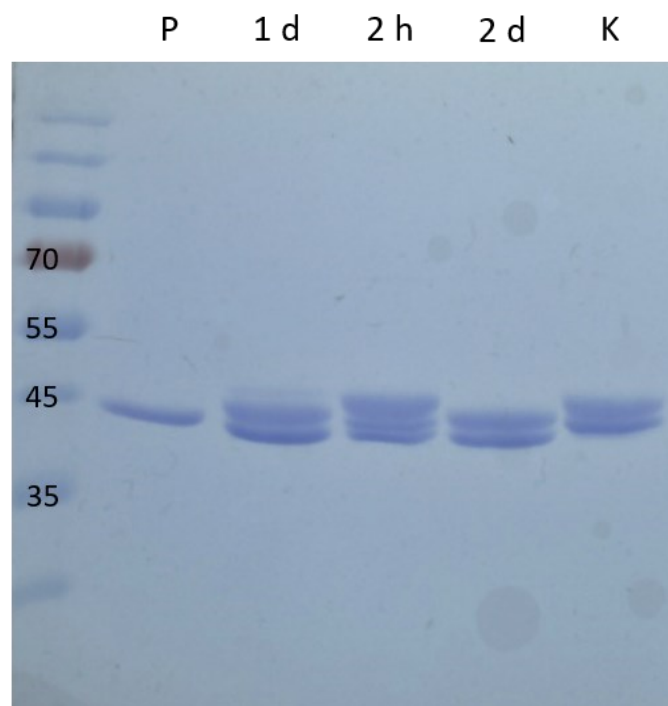


Abbildung 14: SDS-PAGE der Inkubation des TGT-Heterodimers mit PreScission-Protease bei 4 °C. P: Bande der reinen PreScission-Protease. Reaktionsansatz nach 1 d: einem Tag, 2 h: zwei Stunden und 2 d: zwei Tagen. K: Kontrollprobe des Heterodimers vor Zugabe der PreScission-Protease.

Der erwartete Massenunterschied liegt im Falle der katalytischen QTRT1 bei ca. 2,3 kDa (mit *Tag*: 45718 Da, ohne *Tag*: 43376 Da), während der Massenunterschied bei der nicht-katalytischen QTRT2 bei ca. 2,0 kDa liegen sollte (mit *Tag*: 48269 Da, ohne *Tag*: 46311 Da). Es ist deutlich zu erkennen, dass bereits nach zwei Stunden ein geringer Teil des Proteins

umgesetzt wurde. Besonders die untere der beiden Banden, welche der im Vergleich zur QTRT2 leichteren QTRT1 entspricht, spaltet sich in zwei kleinere Banden auf. Dies lässt vermuten, dass die Erkennungssequenz der PreScission Protease bei der QTRT2 weniger gut zugänglich ist. Auch nach 24 h war die Reaktion noch nicht vollständig abgeschlossen, da noch ein leichter Schatten der QTRT2 Bande zu erkennen war. Erst nach zwei Tagen konnte mit der weiteren Reinigung des Heterodimers fortgeföhren werden.

Die verwendete Protease ist mit einem GST-*Tag* ausgestattet. Aus diesem Grund wurde eine GSTrap™ FF Säule der Firma GE Healthcare verwendet, um die PreScission-Protease aus der Proteinlösung zu entfernen. Nach der Konditionierung der Säule mit Lysepuffer wurde die Proteinlösung langsam aufgetragen. Das Zielprotein sollte sich dabei im Durchfluss befinden. Dieser wurde anschließend ein weiteres Mal über die Säule gepumpt, um eine möglichst quantitative Bindung der PreScission-Protease an die Säulenmatrix zu gewährleisten. Abschließend wurde die Säule mit Lysepuffer nachgespült, um sämtliches Zielprotein von der stationären Phase zu entfernen.

Der proteinhaltige Durchfluss wurde auf ein Volumen von ca. 8 mL konzentriert. Anschließend wurde die Probe auf eine mit Austauschpuffer (15 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT) konditionierte Größenausschluss-Chromatographiesäule (HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade) aufgetragen und eluiert (Abbildung 15).

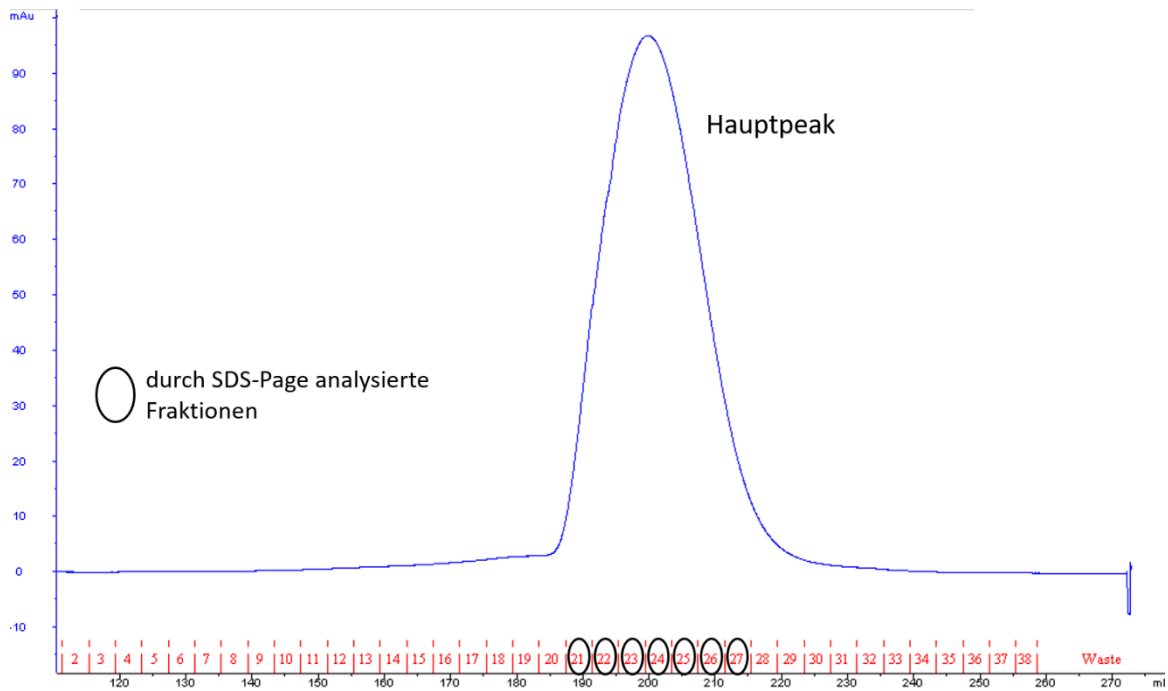


Abbildung 15: Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie mittels Superdex200™-Säule. Das Chromatogramm zeigt die Elution des Zielproteins mittels Austauschpuffer und weist dabei einen einzigen Peak auf.

Durch die Verwendung des Austauschpuffers in Kombination mit dem großen Säulenvolumen der Superdex™ 200 (320 mL Bettvolumen) konnte gleichzeitig eine Überführung des Zielproteins in den späteren Aufbewahrungspuffer erzielt werden. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden per SDS-PAGE analysiert (Abbildung 16).

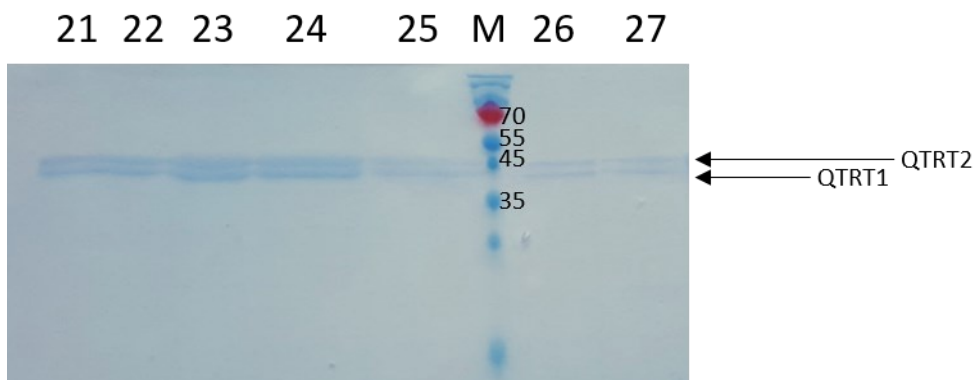


Abbildung 16: SDS-PAGE der proteinhaltigen Fraktionen nach der Größenausschlusschromatographie. Die Banden entsprechen den Zielproteinen QTRT1 und QTRT2. M: Marker [kDa].

Anhand des SDS-PAGE-Gels konnte keine sichtbare Verunreinigung mehr beobachtet werden. Zur Bestätigung der Identität und Reinheit wurde eine Probe der gereinigten Charge mittels ESI-MS (Elektrospray-Ionisation gekoppelt mit Massenspektrometrie) analysiert. Dabei wurde für die katalytische Untereinheit QTRT1 ohne das bereits abgespaltene *Strep-Tag*[®] II ein Molekulargewicht von 43375 Da ermittelt (Abbildung 17). Die Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert von 43377 Da ist sehr gut, da eine Abweichung von lediglich zwei Da im Rahmen der Messgenauigkeit liegt. Die ermittelte Masse der nicht-katalytischen QTRT2 entspricht mit 46310 Da ebenfalls sehr genau der theoretischen Masse von 46311 Da. Neben den beiden Hauptpeaks zeigt das Massenspektrum auch jeweils die halben Massen der beiden Untereinheiten.

Neben den Peaks, die klar den gesuchten Spezies zuzuordnen sind, zeigt das Spektrum auch einige kleinere Nebenpeaks. Dabei kann es sich sowohl um Verunreinigungen als auch um Artefakte handeln, die durch die Dekonvolution der Rohdaten entstehen. Auf dem entsprechenden SDS-PAGE-Gel sind allerdings keine Verunreinigungen zu erkennen.

Die beiden Hauptpeaks haben nicht die gleiche Signalstärke, was auf eine unterschiedliche Ionisierbarkeit der beiden Spezies zurückgeführt werden könnte. Auf dem SDS-PAGE-Gel ist diesbezüglich kein Unterschied zu erkennen.

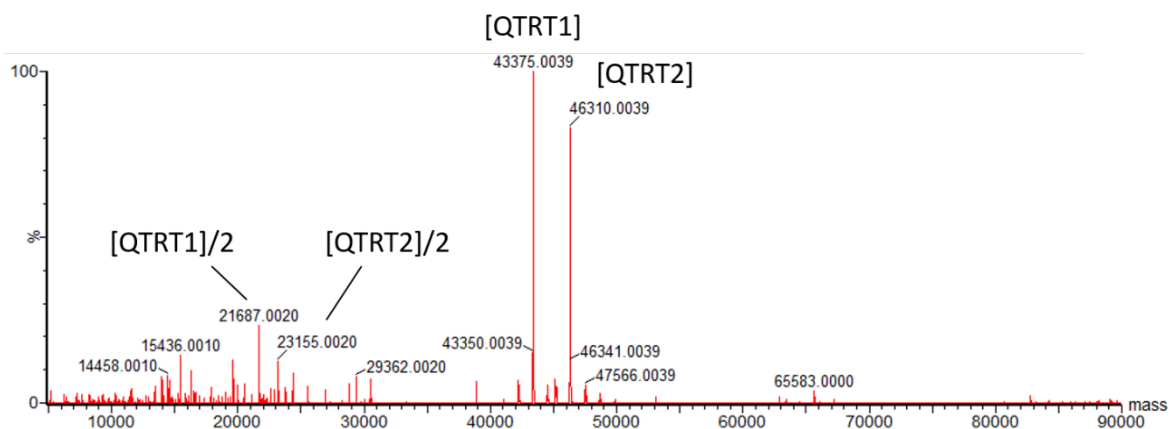


Abbildung 17: ESI-Massenspektrum (dekonvolviert) des TGT-Heterodimers nach Abspaltung der beiden *Tags*.

3.1.4. Versuche zur Entfernung der Nukleinsäureverunreinigung

Nach der abschließenden photometrischen Untersuchung der Probe wurde ein Absorptionsverhältnis bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) von 1,42 festgestellt. Proteinbestandteile und Nukleinsäuren weisen bei unterschiedlicher Wellenlänge ihr spezifisches Absorptionsmaximum auf. Daher kann das Absorptionsverhältnis (A_{260}/A_{280}) verwendet werden, um den Gehalt an Nukleinsäuren abzuschätzen.^[62] Der ermittelte Wert deutet klar auf die Anwesenheit von Nukleinsäuren in Form von DNA oder RNA hin. Eine Proteinprobe ohne Nukleinsäureverunreinigung weist ein Absorptionsverhältnis (A_{260}/A_{280}) von 0,57 auf.^[62] Dies hätte für die spätere Verwendung der Proteinchargen zwei bedeutende Nachteile. Zum einen könnte die Verunreinigung die Bindung von tRNA stören, wodurch eine genaue enzymkinetische Charakterisierung unmöglich ist. Außerdem behindern solche Verunreinigungen eine erfolgreiche Kristallisation. Daher wurden verschiedene Methoden untersucht, um diese Verunreinigungen zu entfernen.

Zunächst wurde die Probe mit Polyethylenimin (PEI, Abbildung 18) in Konzentrationen von 0,01 % bis 3 % versetzt. Diese Verbindung ist aufgrund zahlreicher Aminogruppen stark positiv geladen, was zu einer ionischen Wechselwirkung mit dem Zucker-Phosphatrückgrat der Nukleinsäure und zur Fällung des resultierenden Komplexes führen soll.

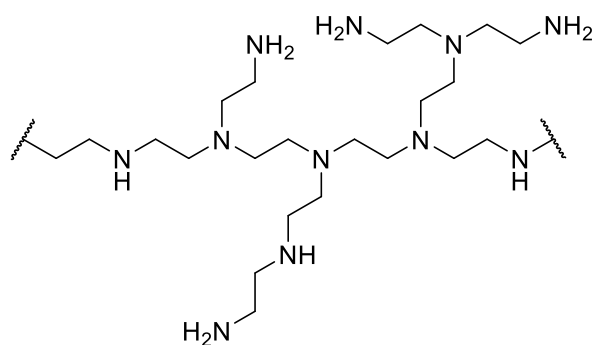


Abbildung 18: Ausschnitt der Molekülstruktur von Polyethylenimin (PEI), das zur Entfernung von Nukleinsäuren eingesetzt wurde.

Die Versuche mit PEI führten allerdings nicht zum Erfolg, da entweder die Nukleinsäure nicht aus der Lösung extrahiert werden konnte oder es bei höheren PEI-Konzentrationen zu einer Denaturierung des Zielproteins kam.

3.1.5. Entfernung der Nukleinsäure mittels Anionenaustauschchromatographie

Als nächstes wurde die Methode der Anionenaustauschchromatographie verwendet, um die Nukleinsäuren aus der Probe zu entfernen. Bei dieser Methode wird versucht analog zur Verwendung von PEI die negative Ladung des Zucker-Phosphatrückgrats der Nukleinsäure zu adressieren. Theoretisch sollten Nukleinsäuren deutlich stärker an die positiv geladene Säulenmatrix binden und so von den beiden Untereinheiten des Zielproteins separiert werden können.

Hierzu wurden die vereinigten proteinhaltigen Fraktionen nach der Affinitätschromatographie mittels der *Strep*-Tactin[®]-Säule (siehe Kapitel 5.10) verwendet. Das Protein musste zunächst in einen salzarmen Puffer überführt werden, um eine quantitative Bindung an die positiv geladene Säulenmatrix zu erzielen. Dann wurde die Probe auf ca. 5 mL konzentriert und anschließend mit DEAE-Bindepuffer (15 mM Tris pH 7.5, 25 mM NaCl) bis zu einem Volumen von 20 mL aufgefüllt. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt. Die umgepufferte Probe wurde bei niedriger Flussrate auf eine HiTrap[™] DEAE Sepharose Fast Flow-Säule aufgetragen, woraufhin der Anteil des DEAE-Elutionspuffers (15 mM Tris pH 7.5, 1 M NaCl) im Fließmittel innerhalb von 90 mL von 0 auf 100 % gesteigert wurde (Abbildung 19). Die Fließgeschwindigkeit betrug 2,0 mL/min. Sowohl während des Entstehens des ersten als auch des zweiten Peaks wurde die Konzentration des DEAE-Elutionspuffers jeweils konstant gehalten, um eine Überlagerung der verschiedenen Peaks und so ein Vermischen der entsprechenden Komponenten zu verhindern.

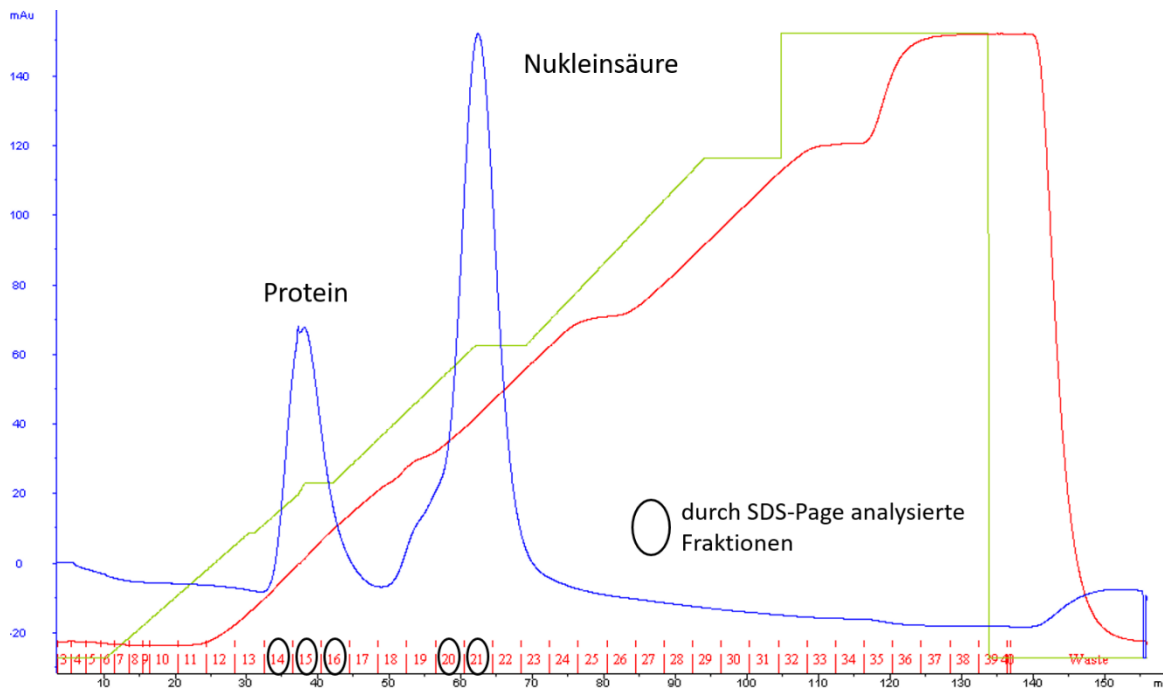


Abbildung 19: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie mittels HiTrap™ DEAE Sepharose Fast Flow Säule. Das Chromatogramm zeigt die Elution mittels DEAE-Elutionspuffer und weist dabei zwei dominante Peaks auf.

Erwartungsgemäß eluierten insgesamt zwei dominante Spezies, welche theoretisch der Nukleinsäureverunreinigung und dem TGT-Heterodimer zuzuordnen sind. Dabei sollte der später eluierende Hauptpeak der Nukleinsäure entsprechen, da diese eine deutlich stärkere ionische Wechselwirkung mit der Säulenmatrix eingehen sollte.

Die beiden Peaks wurden anschließend durch SDS-PAGE analysiert (Abbildung 20). Dabei fiel auf, dass die beiden Untereinheiten der TGT während der Chromatographie getrennt wurden. Im Vergleich zur Fraktion 14, in der beide Untereinheiten in einem nahezu ausgeglichenen Verhältnis vorliegen, zeigt Fraktion 16 einen deutlichen Überschuss der leichteren, katalytischen Untereinheit. Zudem beinhalten die Fraktionen 20 und 21, die idealerweise nur Nukleinsäure enthalten sollten, in geringen Mengen Zielprotein.

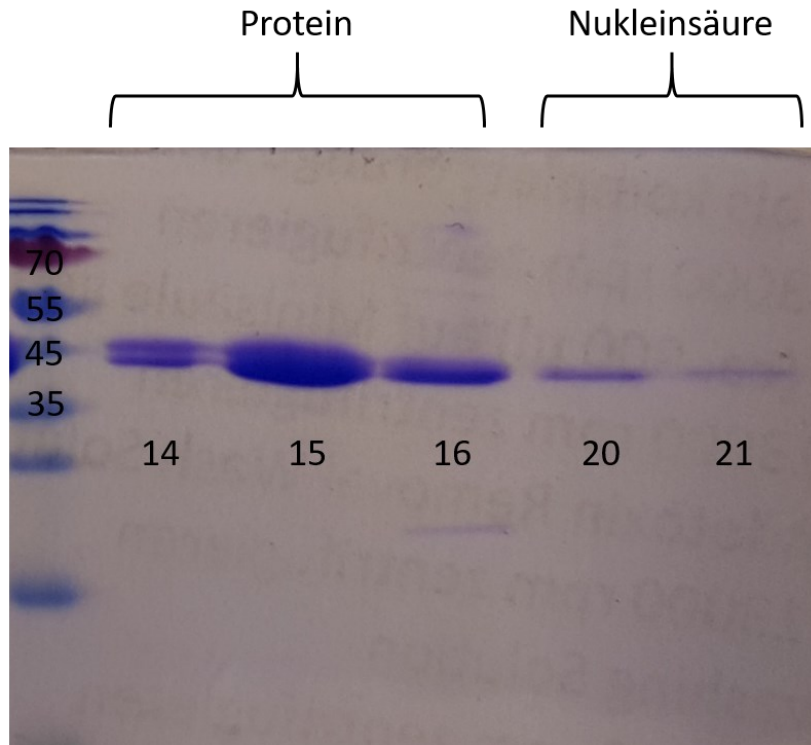


Abbildung 20: SDS-PAGE der proteinhaltigen Fraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie. Die Banden entsprechen den Zielproteinen QTRT1 und QTRT2.

Die Fraktionen 14 bis 16 des ersten Peaks wurden vereinigt und photometrisch analysiert. Dabei wurde ein Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} von 0,82 ermittelt. Dieser Wert lässt darauf schließen, dass die Nukleinsäureverunreinigung nicht vollständig von dem Zielprotein separiert werden konnte. Aufgrund dieser Beobachtung und der Tatsache, dass sie zu einer Trennung der beiden Untereinheiten führte, wurde diese Methode verworfen.

3.1.6. Entfernung der Nukleinsäure mittels Lithiumchlorid

Aufgrund der unzureichenden Effektivität der Anionenaustauschchromatographie wurde ein weiterer Reinigungsschritt während der Affinitätschromatographie eingeführt. Hierbei wurde die Säule nach dem Entfernen der groben unspezifischen Verunreinigungen mittels Lysepuffer zusätzlich mit Lithiumchlorid-haltigem Puffer (100 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 750 mM LiCl) gewaschen (Abbildung 21). Lithiumionen interagieren besonders stark mit RNA-Molekülen, weshalb Lithiumchlorid zur Fällung von RNA eingesetzt wird. Der Vorteil dieser Methode ist, dass es in der Regel nicht zu einer Denaturierung des Proteins kommt.^[63] DNA-Fragmente sollten ebenfalls mit dieser Methode entfernt werden können, da

die hohe Salzkonzentration auch die ionischen Wechselwirkungen der DNA und des Proteins stört.

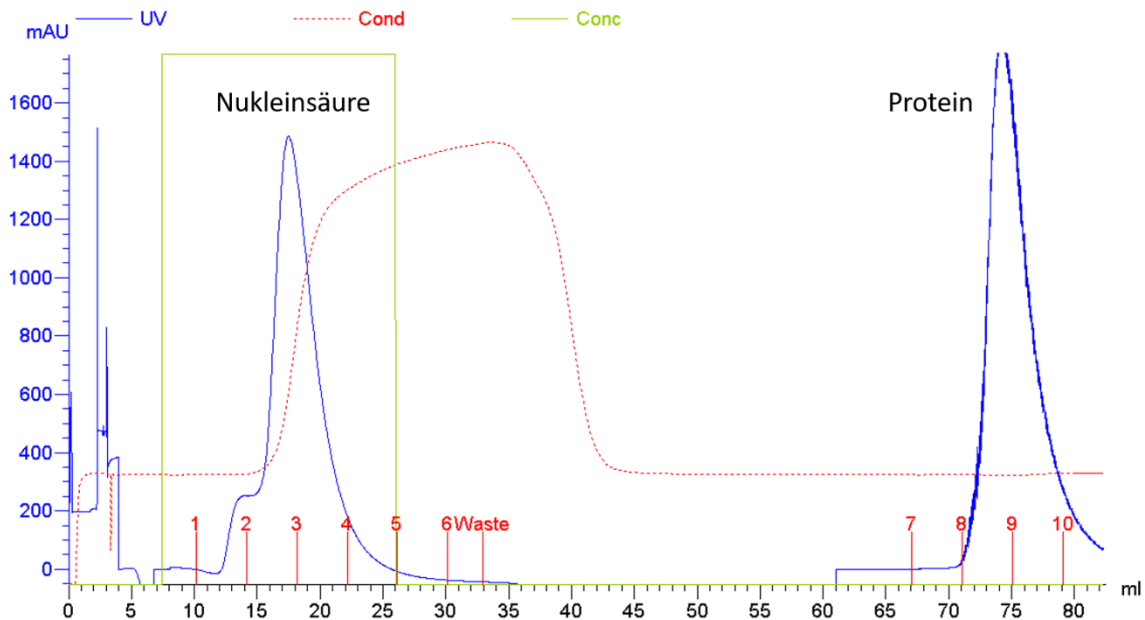


Abbildung 21: Chromatogramm der Affinitätschromatographie mittels Strep-Tactin®-Säule. Das Chromatogramm zeigt das Waschen der Matrix mit Lithiumchlorid-haltigem (750 mM) Puffer. Nach dem Waschen und der anschließenden Konditionierung mit Lysepuffer erfolgte die Elution mit Biotin-haltigem Puffer. Die Säule wurde erst nach dem Waschen mit Lysepuffer an die FPLC-Anlage angeschlossen.

Die Lithiumchlorid-Konzentration wurde ohne Gradienten direkt von 0 auf 750 mM erhöht, wodurch es zur Elution der Nukleinsäuren kam. Nachdem der erste Peak vollständig auf die Basislinie zurückgekehrt war, wurde die Säule erneut mit Lysepuffer gewaschen, um überschüssige Lithiumionen zu entfernen. Anschließend erfolgte die Elution des Zielproteins mit Biotin-haltigem Puffer.

Die gesammelten Fraktionen wurden photometrisch und mittels SDS-PAGE-Gel analysiert. Anhand des Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} von 0,89 lässt sich wiederum ableiten, dass auch mit diesem Verfahren die Nukleinsäureverunreinigung nicht vollständig entfernt wurde. Da zumindest ein Teil der Verunreinigung entfernt wurde und das Verfahren nur einen geringen Mehraufwand darstellt, wurde es während des weiteren Vorgehens im Rahmen der Affinitätschromatographie beibehalten.

3.1.7. Entfernung der Nukleinsäure mittels Phenyl-Sepharose™

Bei den bisherigen chromatographischen Experimenten wurde versucht, eine möglichst starke Bindung des Zucker-Phosphatrückgrats der Nukleinsäure-Verunreinigungen mit der Agarosematrix bzw. dem Fällungsreagenz zu erreichen. Einen komplementären Ansatz stellt die Verwendung einer Phenyl-Sepharose™-Matrix dar. Hierbei kommt es zur Ausbildung hydrophober Wechselwirkungen der Säulenmatrix mit den Probenbestandteilen. Aufgrund der hohen Anzahl an Ladungsträgern und polaren Gruppen der Nukleinsäure sollte diese in deutlich geringerem Maße an die Oberfläche der Säulenmatrix binden.

Dazu wurde die Probe in einen Puffer mit hohem Salzgehalt (15 mM Tris pH 7.5, 1.5 M NaCl) umgepuffert. Die hohe Polarität des Puffers verstärkt die Wechselwirkung der Probe mit der hydrophoben Säulenmatrix. Anschließend wurde die auf 8 mL eingengte Probe mit Hilfe einer FPLC-Anlage auf eine mit Phenyl-Sepharose™-Bindpuffer konditionierte HiPrep™-Säule (Phenyl High Performance 16/10, GE Healthcare) bei geringer Flussrate aufgetragen.

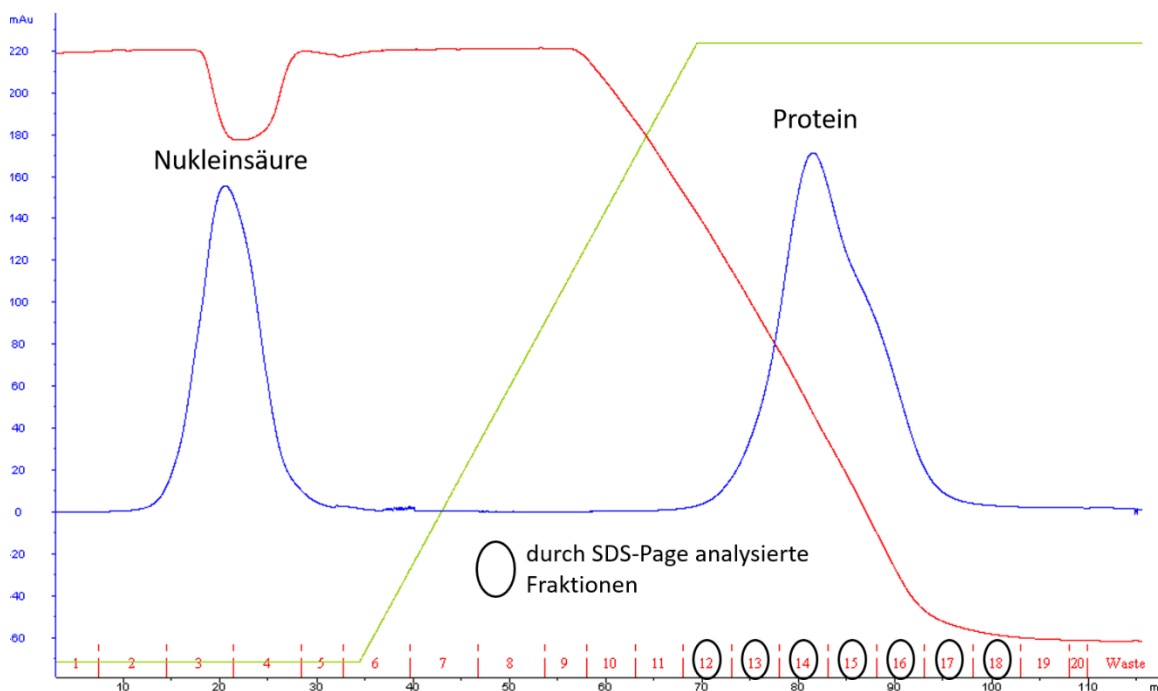


Abbildung 22: Chromatogramm der hydrophoben Interaktionschromatographie mittels Phenyl-Sepharose™-Säule. Das Chromatogramm weist einen Peak zum Zeitpunkt der Beladung bei hoher Salzkonzentration und die Bildung eines zweiten Peaks bei kontinuierlich sinkender Salzkonzentration auf. Die grüne Linie zeigt den Anteil des salzarmen Elutionspuffers an, die rote Linie dagegen die Leitfähigkeit des Puffergemischs nach dem Durchlaufen der Säule.

Bereits während des Beladungsprozesses konnte im Chromatogramm ein Peak beobachtet werden, der als Nukleinsäurefraktion angenommen wurde (Abbildung 22). Erst nachdem die Absorption wieder die ursprüngliche Basislinie erreicht hatte, wurde der Salzgehalt des Laufmittels graduell verringert, um die verbliebenen Probenbestandteile zu eluieren. Dazu wurde der Anteil des Phenyl-Sepharose™-Elutionspuffers (15 mM Tris pH 7.5, 25 mM NaCl) innerhalb von 5 Säulenvolumen von 0 auf 100 % gesteigert. Erst nachdem die Leitfähigkeit (rote Linie im Chromatogramm) um etwa 40 % gesunken war, wurde im Chromatogramm ein zweiter Peak beobachtet. Die einzelnen Fraktionen wurden photometrisch und mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 23).

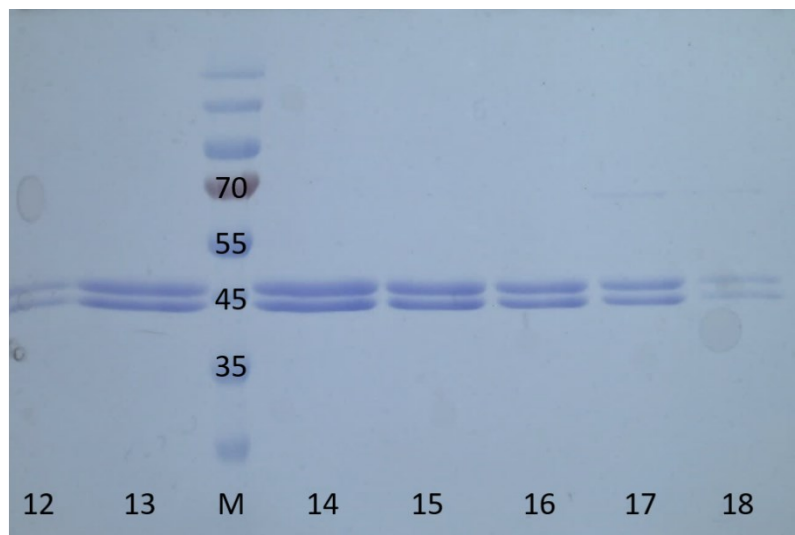


Abbildung 23: SDS-PAGE der proteinhaltigen Fraktionen nach der hydrophoben Interaktionschromatographie. Das Gel zeigt nur die Fraktionen des zweiten Peaks, da die Fraktionen des ersten Peaks kein Protein erhielten. Die Banden entsprechen Molekülmassen der Zielproteine QTRT1 und QTRT2. Die Größenangaben des Markers sind in kDa angegeben.

Neben den erwünschten Banden der beiden Untereinheiten weisen lediglich die Fraktionen 17 und 18 geringfügige Verunreinigungen auf, weshalb sie verworfen wurden. Die verbleibenden Fraktionen wurden vereinigt und es wurde ein Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} von 0,57 ermittelt. Dieser Wert entspricht einer Proteinpräparation ohne Nukleinsäureverunreinigung.^[62] Außerdem kommt es während der Chromatographie nicht zu einer Trennung von katalytischer und nicht-katalytischer Untereinheit und somit bleibt das Verhältnis dieser beiden Proteine ausgeglichen. Abschließend kann festgestellt werden, dass mit Hilfe der hydrophoben Interaktionschromatographie die Nukleinsäureverunreinigung effizient entfernt werden konnte.

Aus diesem Grund wurde diese Methode bei allen weiteren Präparationen der eukaryotischen TGT angewandt.

3.1.8. Untersuchung der Stabilität des TGT-Heterodimers mittels *Thermal Shift Assay*

Nach der erfolgreichen Etablierung des Expressions- und Reinigungsprotokolls wurde der Einfluss verschiedener Pufferzusammensetzungen und Additive auf die Stabilität des TGT-Heterodimers untersucht. Diese Art der Pufferoptimierung empfiehlt sich insbesondere vor den nachfolgenden Kristallisationsversuchen. Die Ergebnisse aus der Arbeit von Inna Biela stellen hierbei den Ausgangspunkt der Optimierung dar.^[57] Als optimale Bedingung war sowohl für die katalytische als auch für die nicht-katalytische Untereinheit der eukaryotischen TGT eine Pufferzusammensetzung bestehend aus 50 mM HEPES pH 7.5, 1 M NaCl und 2 mM DTT beschrieben worden.^[57] Da in der vorangegangenen Arbeit die Stabilität der beiden Untereinheiten separat voneinander untersucht worden war, konnte davon ausgegangen werden, dass vor allem die zur Stabilisierung notwendige Natriumchlorid-Konzentration für das native Heterodimer deutlich abweicht. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen des pH-Werts und der Salzkonzentration zuerst mittels *Thermal Shift Assay* untersucht. Mit Hilfe dieser Methode kann die Stabilität von Proteinen anhand ihrer Schmelztemperatur (T_m) ermittelt werden. Dabei wird die Temperatur der Probe in Anwesenheit eines Fluoreszenzfarbstoffes, beispielsweise SYPRO-Orange, konstant erhöht. Durch die Denaturierung des Proteins werden hydrophobe Aminosäuren, welche bei korrekt gefalteten Proteinen zum Großteil im Protein-Inneren liegen, zum Lösungsmittel exponiert. Dadurch kann sich der hydrophobe Farbstoff anlagern, was zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignals führt.^[64] Die Schmelztemperatur entspricht dem steilsten Anstieg des Fluoreszenzsignals einer Probe. Die genaue Zusammensetzung und die Einstellung des verwendeten Geräts werden in Kapitel 5.13 näher beschrieben.

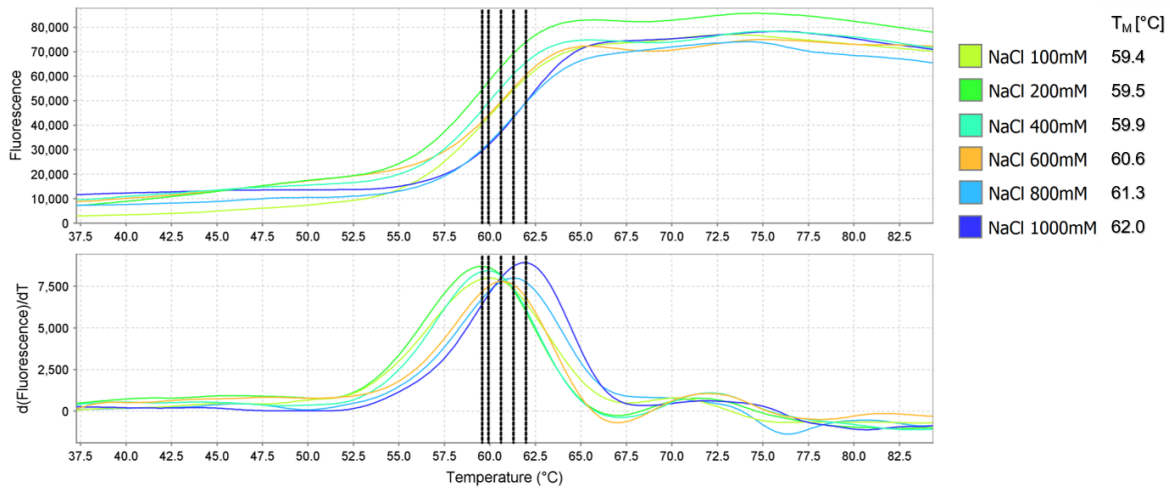


Abbildung 24: *Thermal Shift Assay* mit dem Heterodimer der eukaryotischen TGT. Die obere Grafik stellt die ermittelten Schmelzkurven dar. Die untere Grafik zeigt die jeweiligen Ableitungen der oberen Graphen, welche eine bessere Ablesbarkeit der Schmelztemperatur ermöglichen. Die ermittelten Schmelztemperaturen sind in der Tabelle rechts aufgeführt.

Analog zu den Ergebnissen, die mit den beiden einzeln vorliegenden Untereinheiten erzielt wurden, führt eine Erhöhung der Natriumchlorid-Konzentration ebenfalls zu einer Erhöhung der ermittelten Schmelztemperatur (Abbildung 24). Allerdings beträgt hier die Differenz der Schmelztemperatur bei einem Anstieg der Natriumchlorid-Konzentration von 100 mM auf 1 M nur 2,6 °C. Die separat analysierten Untereinheiten zeigten bei gleichem Anstieg der Salzkonzentration eine Differenz der Schmelztemperatur von ca. 8 °C.^[57] Diese Beobachtung zeigt, dass das Heterodimer ebenfalls durch eine hohe Salzkonzentration stabilisiert werden kann, allerdings ist dieser Effekt im Vergleich zu den einzelnen Untereinheiten deutlich geringer ausgeprägt. Ein Vergleich der Schmelztemperatur der katalytischen QTRT1 mit der des Heterodimers bei einer Natriumchlorid-Konzentration von 150 mM zeigt eine Differenz von circa 10,5 °C (QTRT1: 49,0 °C, QTRT1/QTRT2: 59,5 °C).^[57] Das Heterodimer als native Form der eukaryotischen TGT ist demnach erwartungsgemäß deutlich stabiler als die einzelnen Untereinheiten. Für die weiteren Experimente wurde die Salzkonzentration von ursprünglich 1 M auf 150 mM gesenkt. Bei einer Salzkonzentration von 1 M kommt es zu einer Volumenzunahme des Kristallisationstropfens im Rahmen von Kristallisationsexperimenten durch den hohen osmotischen Druck. Dieser Nachteil überwiegt gegenüber dem geringen Gewinn an Stabilität durch eine höhere Salzkonzentration.

Darüber hinaus wurde der optimale pH-Bereich des Heterodimers ermittelt. Ausgehend vom ursprünglichen Puffer (50 mM HEPES pH 7,5, 1 M NaCl, 2 mM DTT) wurden verschiedene Alternativen untersucht (Abbildung 25).

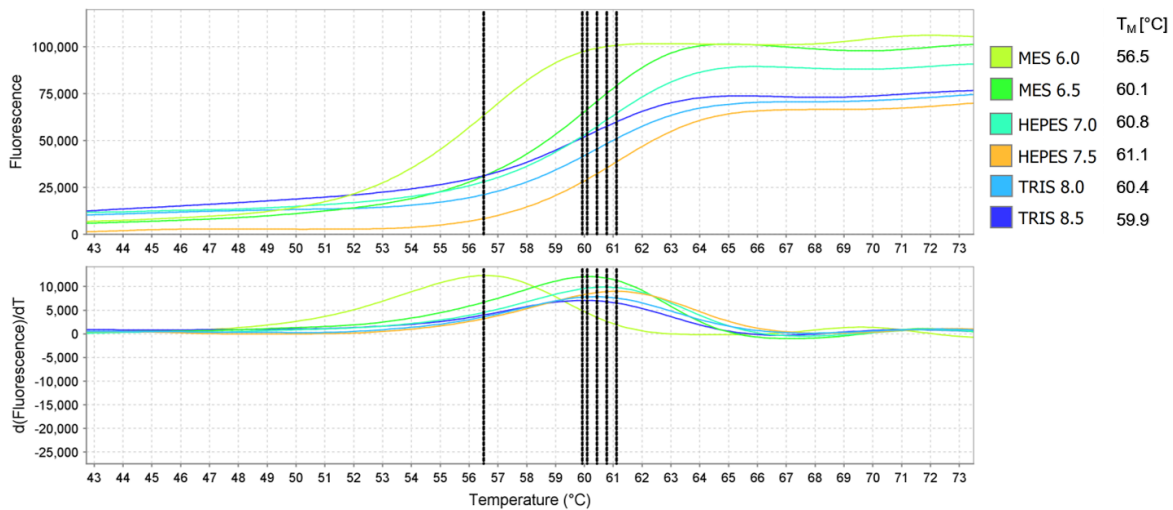


Abbildung 25: *Thermal Shift Assay* mit dem Heterodimer der eukaryotischen TGT. Die obere Grafik zeigt die ermittelten Schmelzkurven. Die untere Grafik zeigt die jeweiligen Ableitungen der oberen Graphen, welche eine bessere Ablesbarkeit der Schmelztemperatur ermöglichen. Die ermittelten Schmelztemperaturen sind der Tabelle rechts aufgeführt.

Die ermittelten Ergebnisse bestätigten den ursprünglichen pH-Wert als optimal, weshalb hier keine weiteren Änderungen vorgenommen wurden.

Neben dem pH-Wert und der Salzkonzentration wurde auch die Auswirkung verschiedener Additive auf die Stabilität des Heterodimers untersucht. Hierzu wurde der *Additiv-Screen* der Firma Hampton Research verwendet. Die Messungen wurden jeweils dreimal durchgeführt und die Werte gemittelt. Die Ausgangslösung enthielt das Protein in einer Konzentration von 10 μM in 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl und 2 mM DTT. Die Ausgangsschmelztemperatur (T_m) betrug zunächst 59,5 $^{\circ}\text{C}$.

Tabelle 2: Stabilitätsstudie des Maus-TGT-Heterodimers anhand des *Additiv-Screens* der Firma Hampton Research. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich jeweils auf die finale Probenlösung. **Grün:** Erhöhung der Schmelztemperatur T_m , **Rot:** Verringerung der Schmelztemperatur T_m , k. E.: Keinen Effekt, n. m.: Nicht messbar durch Denaturierung oder Störung der Messung durch das Additiv.

	Additive	Konzentration	T_m -Veränderung
Multivalente Ionen	BaCl ₂	10 mM	k. E.
	CdCl ₂	10 mM	- 15 $^{\circ}\text{C}$
	CaCl ₂	10 mM	k. E.
	CoCl ₂	10 mM	n. m.
	CuCl ₂	10 mM	n. m.
	MgCl ₂	10 mM	k. E.
	MnCl ₂	10 mM	- 3 $^{\circ}\text{C}$
	SrCl ₂	10 mM	k. E.

	Additive	Konzentration	T_m-Veränderung
	YCl ₃	10 mM	- 7 °C
	ZnCl ₂	10 mM	- 10 °C
	FeCl ₃	10 mM	n. m.
	NiCl ₂	10 mM	n. m.
	CrCl ₃	10 mM	n. m.
	Pr(CH ₃ COO) ₃	10 mM	k. E.
Salze	(NH ₄)SO ₄	100 mM	+ 3 °C
	KCl	100 mM	+ 2 °C
	LiCl	100 mM	k. E.
	NaCl	200 mM	+ 1,5 °C
	NaF	50 mM	+ 1,5 °C
	NaI	100 mM	- 3 °C
	NaSCN	200 mM	- 2 °C
	KNaC ₄ H ₄ O ₆	100 mM	+ 3 °C
	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	100 mM	+ 4 °C
	CsCl	100 mM	+ 1,5 °C
	CH ₂ (COONa) ₂	100 mM	+ 3 °C
Aminosäuren	L-Prolin	10 mM	k. E.
Dissoziierende Mittel	Phenol	10 mM	k. E.
	Dimethylsulfoxid	3,0 % w/v	k. E.
	NaBr	10 mM	+ 1,5 °C
Linker	6-Aminohexansäure	3,0 % w/v	+ 1,5 °C
	1,5-Diaminopentan- dihydrochlorid	3,0 % w/v	k. E.
	1,6-Diaminohexan	3,0 % w/v	- 7 °C
	1,8-Diaminooctan	3,0 % w/v	n. m.
	Glycin	100 mM	+ 1,5 °C
	Glycyl-Glycyl-Glycin	30 mM	k. E.
	Taurin	10 mM	+ 1,5 °C
	Betain	10 mM	- 14 °C
Polyamine	Spermidin	10 mM	k. E.
	Spermin	10 mM	k. E.
	Hexaammincobalt(III)-chlorid	10 mM	+ 1,5 °C
	Sarkosin	10 mM	+ 1,5 °C
Chaotrope Stoffe	Trimethylamin	10 mM	+ 1,5 °C
	Guanidin	100 mM	k. E.
	Harnstoff	10 mM	k. E.
Cofaktoren	Nicotinsäureamid-Adenin- Dinukleotid	10 mM	- 16 °C
	Adenosintriphosphat	10 mM	- 14 °C
Reduzierungsmittel	TCEP	10 mM	k. E.
	L-Glutathion, reduziert L-Glutathion, oxidiert	1 mM	+ 2 °C
Chelatbildner	Ethylendiamintetraessigsäure	10 mM	- 3 °C
Polymere	Polyvinylpyrrolidon K15	0,5 % w/v	k. E.
	Dextransulfat	3,0 % w/v	+ 2 °C
	Pentaerythritolethoxylat (3/4)	4,0 % w/v	k. E.
	Polyethylenglycol 3.350	1,0 % w/v	+ 2 °C
Kohlenhydrate	D-Glucose	3,0 % w/v	+ 2 °C
	Saccharose	3,0 % w/v	+ 2 °C
	Xylitol	3,0 % w/v	+ 2 °C
	D-Sorbitol	3,0 % w/v	+ 2 °C
	Myo-Inositol	1,2 % w/v	+ 2 °C

	Additive	Konzentration	T_m-Veränderung
	D-Trehalose	3,0 % w/v	+ 2 °C
	D-Galactose	3,0 % w/v	+ 2 °C
	Polyole	Ethylenglycol	3,0 % w/v
Nicht-Detergenzien	Glycerol	3,0 % w/v	+ 2 °C
	NDSB-195	300 mM	+ 2 °C
	NDSB-201	200 mM	- 14 °C
	NDSB-211	200 mM	k. E.
	NDSB-221	200 mM	k. E.
Amphiphile	NDSB-256	100 mM	- 3 °C
	1,2,3-Heptantriol	0,05 % w/v	k. E.
Detergenzien	Benzamidin	2,0 % w/v	- 8 °C
	Dodecyldimethylaminoxid	0,5 % w/v	n. m.
	Octylglucosid	0,5 % w/v	- 10 °C
Osmolyt	Dodecyl- β -D-maltosid	0,5 % w/v	n. m.
	Trimethylamin- <i>N</i> -oxid	3,0 % w/v	+ 3 °C
Organische Stoffe, nicht flüchtig	1,6-Hexandiol	3,0 % w/v	- 10 °C
	(+/-)-2-Methyl-2,4-pentandiol	3,0 % w/v	- 6 °C
	Polyethylenglycol 400	5,0 % w/v	- 2 °C
	Jeffamine [®] M-600 [®] pH 7.0	5,0 % w/v	- 10 °C
	2,5-Hexandiol	4,0 % w/v	- 6 °C
	(\pm)-1,3-Butandiol	4,0 % w/v	- 2 °C
	Polypropylenglycol P400	4,0 % w/v	- 8 °C
Organische Stoffe, flüchtig	1,4-Dioxan	3,0 % w/v	- 4 °C
	Ethanol	3,0 % w/v	- 3 °C
	2-Propanol	3,0 % w/v	- 3 °C
	Methanol	3,0 % w/v	- 2 °C
	1,2-Butandiol	1,0 % w/v	k. E.
	<i>tert</i> -Butanol	4,0 % w/v	- 6 °C
	1,3-Propandiol	4,0 % w/v	- 2 °C
	Acetonitril	4,0 % w/v	- 2 °C
	Formamid	4,0 % w/v	- 3 °C
	1-Propanol	4,0 % w/v	- 8 °C
	Ethylacetat	0,5 % w/v	k. E.
	Aceton	4,0 % w/v	k. E.
	Dichlormethan	0,025 % w/v	+ 1,5 °C
	1-Butanol	0,7 % w/v	- 2 °C
	2,2,2-Trifluorethanol	4,0 % w/v	- 10 °C
	1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-propanol	4,0 % w/v	n. m.

Die Stabilitätsstudie zeigt, dass die Schmelztemperatur und die damit verbundene Stabilität des Proteins insbesondere bei zunehmender Ionenstärke ansteigen. Dieser Effekt ist im Vergleich zu den Experimenten mit verschiedener Natriumchlorid-Konzentration in gleichem Maße ausgeprägt. Auch die Zugabe verschiedener Zucker führt zu einer Verschiebung der Schmelztemperatur von bis zu +2 °C. Organische Lösungsmittel dagegen zeigen größtenteils einen negativen Effekt auf die Schmelztemperatur. Da keines der untersuchten Additive zu einer drastischen Erhöhung der Stabilität führte, wurde der ursprüngliche Puffer beibehalten.

Es bleibt allerdings festzuhalten, dass insbesondere mehrfach negativ geladene Spezies wie Citrat, Tartrat oder Malonat das Heterodimer stabilisieren.

In vorangegangenen Arbeiten^[57] wurden bereits Kristallisationsversuche mit dem Heterodimer der eukaryotischen TGT durchgeführt, die allerdings erfolglos blieben. Um die Chancen einer erfolgreichen Kristallisation zu erhöhen, wurde in dieser Arbeit das Anderson-Evans-Polyoxowolframat ($[\text{TeW}_6\text{O}_{24}] \times 22 \text{ H}_2\text{O}$, TEW) der Firma Jena Bioscience als Additiv verwendet. Dieses ist in einem breiten pH-Bereich sowohl gut löslich^[65] als auch stabil, was für die spätere Verwendung in verschiedenen Kristallisationsscreens von großer Bedeutung ist.^[66,67] Außerdem können die Wolframatome genutzt werden, um das Phasenproblem durch anomale Streuung zu lösen.^[65,68] Durch die Verteilung der negativen Ladung auf einen großen Bereich kann das Additiv mit mehreren exponierten Aminosäuren gleichzeitig interagieren, was die Wahrscheinlichkeit und Stärke von Additiv-Protein Kontakten erhöht.^[65]

Um zu bestätigen, dass ein stabilisierender Effekt auch durch das mehrfach negativ geladene TEW vermittelt werden kann, wurde ein entsprechendes *Thermal Shift Assay* Experiment durchgeführt. Die Konzentration des Additivs wurde mit 1 mM analog zu der für die Kristallisation empfohlenen Konzentration gewählt (Abbildung 26).^[65]

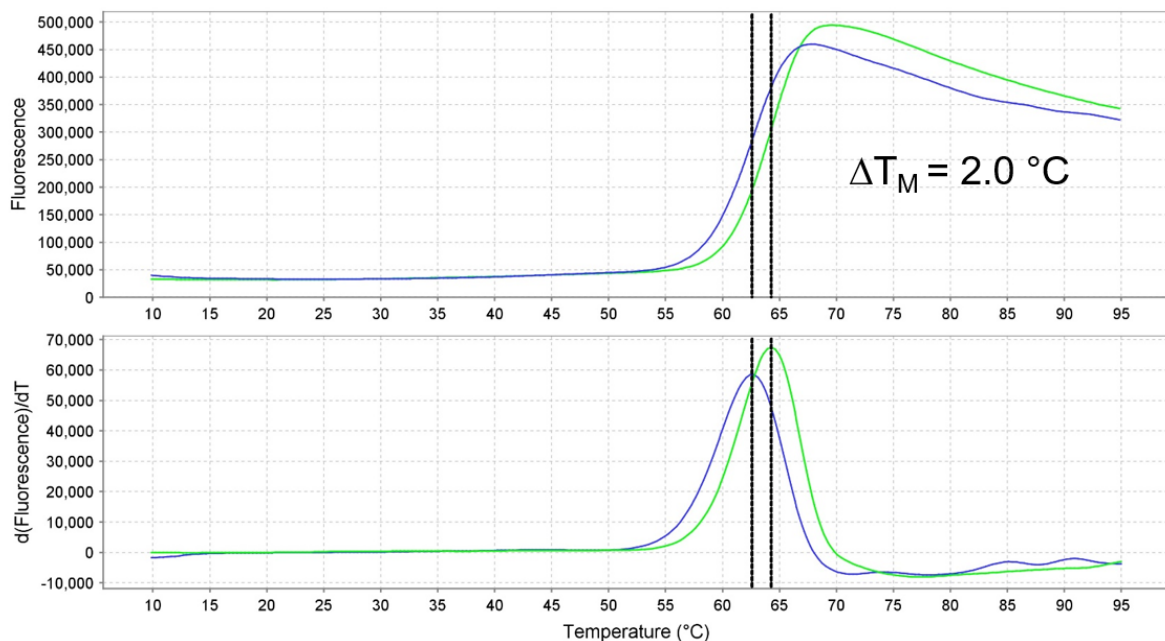


Abbildung 26: *Thermal Shift Assay* Experiment anhand des Heterodimers der eukaryotischen TGT. Die obere Grafik zeigt die ermittelten Schmelzkurven. Die untere Grafik zeigt die jeweiligen Ableitungen der oberen Graphen, welche eine bessere Ablesbarkeit der Schmelztemperatur ermöglichen. **Blau:** QTRT1/2-Kontrolle. **Grün:** QTRT1/2 mit 1 mM TEW.

Obwohl die verwendete TEW-Konzentration mit 1 mM um den Faktor 100 niedriger gewählt wurde als die Additive Citrat, Sulfat und Tartrat konnte eine signifikante Erhöhung der Schmelztemperatur um 2 °C beobachtet werden. Diese Stabilisierung kann dazu führen, dass das Protein im Rahmen der Kristallisationsscreens in höherer Konzentration eingesetzt werden kann. Außerdem könnte das Protein für Kristallisationspuffer zugänglich sein, in denen es ohne TEW denaturieren würde. Diese Hypothesen wurden durch entsprechende Kristallisationsversuche überprüft (siehe Kapitel 3.2).

3.2. Kristallisationsversuche mit dem Heterodimer der Maus-TGT

Um eine geeignete Proteinkonzentration für die künftigen Kristallisationsscreens zu ermitteln, wurden zunächst einige Platten mit den Screens JBScreen Wizard der Firma Jena Bioscience und Crystal Screen™ der Firma Hampton Research mit jeweils unterschiedlichen Proteinkonzentrationen und der Methode der Dampfdiffusion (sitzender Tropfen) angesetzt. Bei einer TGT-Konzentration von 7 mg/mL führte die Hälfte der Bedingungen zu einer Bildung von Präzipitat, während die andere Hälfte als klare Tropfen verblieb. Für weitere initiale Kristallisationsscreens wurde diese Konzentration verwendet, um eine gesteigerte Ausbeute an möglichen Initialbedingungen zu erzielen.

Als Puffer wurde der durch TSA-Versuche als am meisten stabilisierende gegenüber der eukaryotischen TGT ermittelte Puffer mit reduziertem Natriumchlorid-Gehalt verwendet (15 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT). Lediglich die HEPES-Konzentration wurde von 50 mM auf 15 mM angepasst. Die verwendeten Kristallisationsscreens beinhalteten teilweise Bedingungen, deren pH-Wert deutlich von 7,5 abweicht. Durch die reduzierte HEPES-Konzentration wird die Pufferkapazität ebenfalls reduziert. So ist es möglich, dass der in den jeweiligen Bedingungen angestrebte pH-Wert besser realisiert werden kann.

Die nachfolgenden Kristallisationsscreens wurden mit dem Pipettierroboter Cartesian Microsys™ SQ 4000 durch das Servicelabor MarXtal der Synmicro in Marburg durchgeführt. Es wurden zu jeder Bedingung zwei Tropfen bestehend aus 0,30 µL Proteinprobe und 0,30 µL Kristallbedingung und einem Reservoirvolumen von 80 µL pipettiert. Die Verwendung von zwei Tropfen ermöglichte die gleichzeitige Verwendung des Additivs TEW.

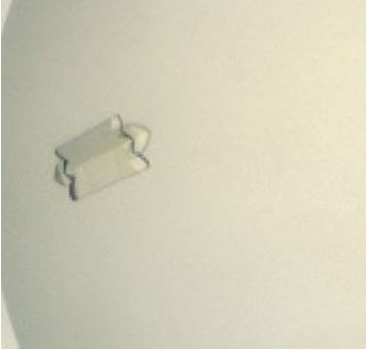
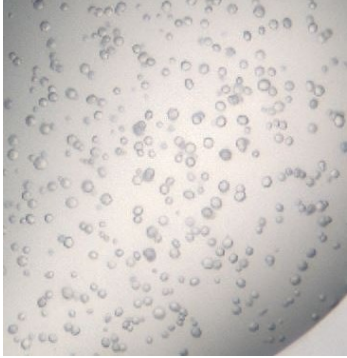
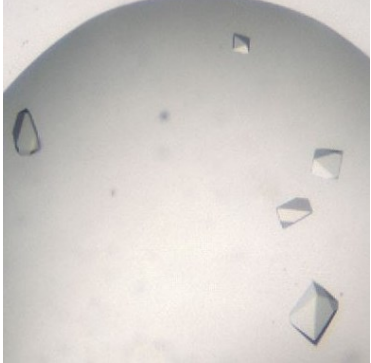
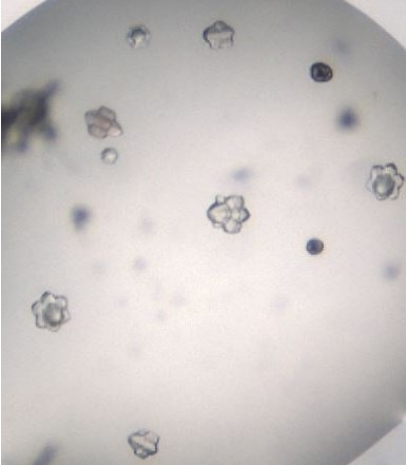
Tabelle 3: Durch das Servicelabor MarXtal der Synmicro in Marburg durchgeführte Screens. Die Kristallisationsplatten wurden mit Hilfe eines Pipettierroboters angesetzt. Es wurden kommerziell erhältliche Screens der Firmen Molecular Dimensions*, Jena Bioscience† und Qiagen# verwendet.


Kristallscreen	Temperatur	Additiv	Bemerkung
JCSG Core I Suite#	18 °C	mit und ohne TEW	
JCSG Core II Suite#			Eigene Initialbedingungen
JCSG Core III Suite#			Viele Tropfen mit Präzipitat
JCSG Core IV Suite#			Viele Tropfen mit Präzipitat
Cryos Suite#			
JB Penta Suite†			Bildung von Kristallkeimen durch Pentaerythritolethoxylat

Kristallscreen	Temperatur	Additiv	Bemerkung
JCSG plus*	4 °C	mit und ohne TEW	
Mem Gold Suite*			
Midas plus Suite*			
Morpheus Suite*			
PACT Suite*			
PGA Suite*			
Pro Plex Suite*			
JCSG Core I Suite*			
JCSG Core II Suite*			
JCSG Core III Suite*			Viele Tropfen mit Präzipitat
JCSG Core IV Suite*			Viele Tropfen mit Präzipitat
Cryos Suite [#]			
JB Penta Suite [†]			Bildung von Kristallkeimen durch Pentaerythritolethoxylat
JCSG plus*			
Mem Gold Suite*			
Midas plus Suite*			
Morpheus Suite*			
PACT Suite*			
PGA Suite*			
Pro Plex Suite*			

Die angesetzten Kristallplatten wurden in immer größer werdenden Abständen optisch kontrolliert. Der Beobachtungszeitraum umfasste regulär vier Wochen. Ausgehend von den in Tabelle 3 aufgeführten *Screens* konnten insgesamt fünf Initialbedingungen gefunden werden.

Tabelle 4: Im Rahmen von MarXtal-Screens gefundene Initialbedingungen, welche nach der Methode der Dampfdiffusion (sitzender Tropfen) angesetzt wurden. Die angegebenen Zusammensetzungen der Kristallisationslösungen entsprechen den Originalbedingungen der Hersteller.

Kristall(e)	Bedingung	<i>inhouse</i> Reproduktion
	<p><u>JBPenta H5:</u> 100 mM MES pH 6,5 200 mM (NH₄)₂SO₄ 35 % w/v Pentaerythritolethoxylat (15/4 EO/OH) 4 °C Mit 1 mM TEW</p>	<p>Nur mit alternativer Morphologie</p>
	<p><u>JCSG Core II E1:</u> 100 mM Natriumkaliumphosphat pH 6,2 200 mM NaCl 20 % w/v PEG 1000 18 °C Mit 1 mM TEW</p>	<p>Möglich</p>
	<p><u>JCSG Core II E4:</u> 100 mM MES pH 6,0 1 M LiCl 10 % w/v PEG 6000 18 °C Mit 1 mM TEW</p>	<p>Möglich</p>
	<p><u>Midas plus E6:</u> 100 mM MES pH 6,0 200 mM Kaliumacetat 15 % w/v Pentaerythritolethoxylat (15/4 EO/OH) 18 °C Mit 1 mM TEW</p>	<p>Möglich</p>

Kristall(e)	Bedingung	<i>inhouse</i> Reproduktion
	<p><u>JBPenta C7:</u> 100 mM HEPES pH 7,5 25 % w/v Pentaerythritolpropoxylat (17/8 PO/OH) 18 °C Ohne TEW</p>	Möglich

JBPenta H5

Der Kristall der Bedingung JBPenta H5 konnte mit Hilfe eines *Loops* aus dem Kristallisationstropfen isoliert werden. Die Behandlung des Kristalls mit einem Kryoprotektorhaltigem Puffer war aufgrund der hohen Konzentration von Pentaerythritolethoxylat (15/4 EO/OH, 35 % w/v) nicht notwendig. Durch das hauseigene Röntgendiffraktometer, welches mit einem Mar345-Detektor ausgestattet ist, konnten Reflexe bis zu einer Auflösung von ca. 3 Å beobachtet werden. Das Beugungsmuster erlaubte dabei die Identifizierung der hexagonalen Symmetrie sowie die Zellkonstanten ($a = b = 199,5 \text{ \AA}$, $c = 89,4 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$). Zudem wurde an der *Beamline* 14.1 des Synchrotrons BESSY II (Helmholtz-Zentrum, Berlin) ein Datensatz mit einer Auflösung von 2,6 Å aufgenommen.

Insgesamt konnten alle in Tabelle 4 aufgeführten Bedingungen durch einen zweidimensionalen *Screen*, bei dem jeweils der pH-Wert sowie die Konzentration des verwendeten Präzipitans variiert wurden, reproduziert werden.

Die dabei reproduzierten Kristalle wurden fast alle in der jeweils ursprünglichen Morphologie erhalten. Lediglich die reproduzierten Kristalle aus der Bedingung JBPenta H5 wiesen eine abweichende Morphologie auf.

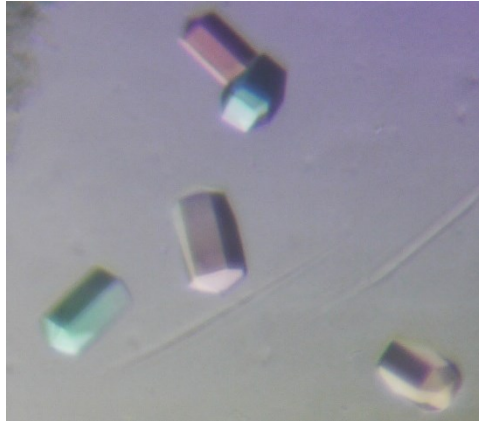


Abbildung 27: Kristalle des TGT-Heterodimers bei folgender Zusammensetzung der Kristallisationslösung: 100 mM MES pH 6,4, 250 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 36 % w/v Pentaerythritolethoxylat (15/4 EO/OH), 1 mM TEW.

Obwohl die Kristalle keine optischen Unregelmäßigkeiten und im Vergleich zu der ursprünglichen Morphologie glattere, definierte Kanten aufwiesen, konnte *inhouse* nur eine Diffraction bis $4,0 \text{ \AA}$ beobachtet werden.

Um die Streufähigkeit der Kristalle aus der JBPenta H5 Bedingung zu verbessern, wurden folgende Methoden angewandt.

pH- und Komponentenscreen

Der pH-Wert des eingesetzten MES-Puffers wurde zwischen 6,0 und 6,75 variiert. Dabei wurden Kristalle im Bereich von pH 6,25 bis 6,50 erhalten. Die Ammoniumsulfat-Konzentration wurde in einem Bereich zwischen 100 mM und 500 mM getestet. Außerdem wurde ein Präzipitanscreen zwischen 20 und 40 % w/v Pentaerythritolethoxylat (15/4 EO/OH) durchgeführt. Die Komponenten wurden sowohl einzeln variiert als auch in zweidimensionalen Screens getestet. Es konnten zwar Kristalle in unterschiedlicher Größe und geringfügig abgewandelter Morphologie erhalten werden, allerdings konnte keine signifikante Verbesserung der Streufähigkeit erzielt werden.

Tropfengröße und -zusammensetzung

Neben der Zusammensetzung der Kristallisationslösung wurde auch die Größe des pipettierten Tropfens variiert. Durch die Verwendung größerer Tropfen konnten allerdings keine größeren Kristalle erhalten werden. Zudem wurde das Mischverhältnis von Proteinlösung und Kristallisationslösung bei der Erstellung der Tropfen von 20/80 bis 80/20 variiert. Es wurde sowohl die Methode des sitzenden als auch die des hängenden Tropfens verwendet.

Seeding

Durch *Seeding* wurde zum einen versucht die Qualität der Kristalle zu verbessern und zum anderen sollten so Kristalle in Tropfen erzeugt werden, bei denen eine spontane Kristallkeimbildung ausblieb. Es kamen dabei sowohl *Macroseeding* als auch *Microseeding* zum Einsatz. Durch *Macroseeding* wurden kleine Kristalle in einen neuen Kristallisationstropfen überführt. Mittels *Microseeding* wurden größere Kristalle zerstoßen und die Kristallsplitter mit Hilfe eines Pferdehaars in einen neuen Kristallisationstropfen überführt. *Microseeding* wurde insbesondere im Rahmen des iterativen *Seeding* eingesetzt. Dabei wurden Kristalle mit gleichmäßiger Morphologie zerkleinert und zum *Seeden* von Kristallen der nächsten Generation verwendet. Durch das gezielte Auswählen von Kristallen sollte so eine kontinuierliche Verbesserung der Morphologie erzielt werden. Auf diese Weise konnte allerdings keine Verbesserung der Morphologie oder der Streufähigkeit der Kristalle erreicht werden.

Liganden

Durch die Bindung eines Substrats kann es zu einer reduzierten Flexibilität des Enzyms oder einer Konformationsänderung kommen, die die Kristallisation und damit die Streufähigkeit beeinflussen können. Hierfür wurden die Liganden der eukaryotischen TGT Guanin, preQ₁ und Queuin in verschiedenen Konzentrationen den Kristallisationstropfen hinzugegeben. Auch auf diese Weise konnte allerdings keine Verbesserung der Streufähigkeit erreicht werden.^[69] Teilweise wurde die Kristallbildung sogar negativ beeinflusst.

Hampton Additivscreen

Um den Einfluss von Additiven auf die Kristallisation zu untersuchen, wurde der *Additivscreen* der Firma Hampton Research eingesetzt. Die insgesamt 96 Additive wurden in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration eingesetzt. Dabei kamen die Methoden des hängenden und die des sitzenden Tropfens zum Einsatz. Außerdem wurden die Kristallisationstropfen jeweils mit und ohne *Microseeding* angesetzt. Durch einige Additive konnte eine geringfügige Veränderung der Morphologie herbeigeführt werden. Andere Additive führten zur Denaturierung des Proteins. Insgesamt konnte keine neue Bedingung gefunden werden, welche die Streufähigkeit der Kristalle signifikant verbessert. Da durch keine der genannten Methoden eine deutliche Verbesserung der Streufähigkeit erzielt werden konnte, wurde die Bedingung JBPenta H5 nicht weiterverfolgt.

JCSG Core II E4

Parallel zur Bedingung JBPenta H5 wurden auch Optimierungsversuche der Bedingung JCSG Core II E4 durchgeführt. Diese zeigten bereits nach der Reproduzierung *inhouse* eine vielversprechende Morphologie. Die Kristalle wiesen glatte definierte Kanten auf und hatten keinerlei Einschlüsse.

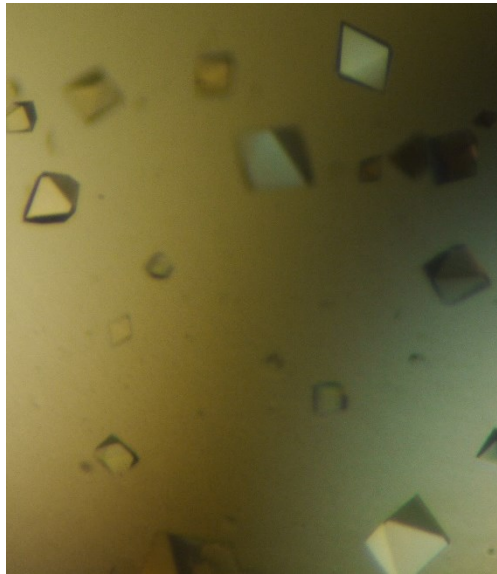


Abbildung 28: Kristalle des TGT-Heterodimers bei folgender Zusammensetzung der Kristallisationslösung: 100 mM MES pH 6,6, 600 mM LiCl, 10 % w/v PEG 6000, 1 mM TEW.

Die Optimierungsmethoden entsprachen dabei exakt denen der Bedingung JBPenta H5. Die Morphologie der Kristalle blieb bei allen Optimierungsversuchen nahezu identisch. Auch die Streufähigkeit verblieb auf einem geringen Niveau. Unter Verwendung verschiedener Kryoprotektantien konnte an der *Beamline* 14.1 des Synchrotrons BESSY II (Helmholtz-Zentrum, Berlin) lediglich eine Diffraktion bis 3,5 Å beobachtet werden, so dass auch diese Bedingung verworfen wurde.

Midas plus E6

Die Bedingung Midas plus E6 führt bei der *inhouse* Reproduktion zu Kristallen, die morphologisch mit denen der JBPenta H5 Bedingung identisch sind. Dieser Befund konnte aufgrund der Ähnlichkeit der beiden Kristallisationslösungen erwartet werden. Eine aufwändige Optimierung der Bedingung wurde daher nicht durchgeführt.

JBPenta C7

Die Bedingung JBPenta C7 lieferte auch nach der *inhouse* Reproduktion sehr flache rautenförmige Kristalle. Bemerkenswert ist, dass diese Bedingung zunächst die einzige war, anhand derer Kristalle ohne das Additiv TEW erhalten wurden. Aus diesem Grund bestand ein großes Interesse an der Optimierung. Aufgrund der extrem flachen Form konnten die Kristalle nur sehr schwer mit einer Nylonschleife aufgenommen werden. Auch wenn dies ohne Beschädigung der Kristalle gelang, konnte keine Diffraktion am hauseigenen Röntgendiffraktometer festgestellt werden. Die Versuche zur Optimierung der Bedingung verliefen dabei völlig analog zu denen der Bedingung JBPenta H5. Es konnte aber keine Bedingung gefunden werden, die zu einer dreidimensionalen Morphologie führt. Daher wurde auch diese Bedingung aufgegeben.

JCSG Core II E1

Als letzte der oben aufgeführten Initialbedingungen wurde die Bedingung JCSG Core II E1 reproduziert. Hier konnten bereits nach dem ersten Reproduktionsscreen Kristalle erhalten werden, die *inhouse* bis 3,5 Å streuten, obwohl diese eine sehr unregelmäßige Morphologie aufwiesen.



Abbildung 29: Kristalle des TGT-Heterodimers bei folgender Zusammensetzung der Kristallisationslösung: 100 mM Natriumkaliumphosphat pH 6,8, 200 mM NaCl, 14 % w/v PEG 1000, 1 mM TEW.

Die Optimierung der Bedingung wurde auch hier wieder analog zu der beschriebenen Methode für die JBPenta H5 Bedingung durchgeführt. Der größte Einfluss konnte dabei durch Veränderung der Natriumchlorid-Konzentration der Kristallisationslösung festgestellt werden.

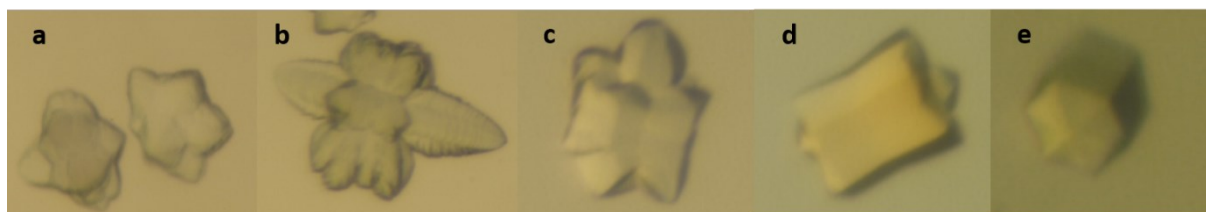


Abbildung 30: Kristalle des TGT-Heterodimers bei folgender Zusammensetzung der Kristallisationslösung: 100 mM Natriumkaliumphosphat pH 6,8, verschiedene NaCl-Konzentration, 18 % w/v PEG 1000. **a** = 0 mM NaCl, **b** = 100 mM NaCl, **c** = 200 mM NaCl, **d** = 400 mM NaCl, **e** = 500 mM NaCl.

Je höher diese Konzentration gewählt wird, desto glatter sind die Kanten der Kristalle (siehe Abbildung 30). Es wurde erwartet, dass die Kristalle bei hoher Natriumchlorid-Konzentration aufgrund der regelmäßigen hexagonalen Erscheinung ein Diffraktionsmuster mit höherer Auflösung liefern. Allerdings war das Gegenteil der Fall. Die höchste Auflösung mit 3,0 Å wurde *inhouse* bei Kristallen mit 100 mM NaCl (**b** in Abbildung 30) gemessen, während die Kristalle mit 500 mM NaCl (**e** in Abbildung 30) lediglich bis zu einer Auflösung von 6 Å streuten. Für dieses überraschende Ergebnis konnte keine plausible Erklärung gefunden werden. An der *Beamline* 14.1 des BESSY II in Berlin wurde ein Datensatz mit einer Auflösung von 2,6 Å aufgenommen. Die korrespondierende Struktur stellt die bisher beste Lösung in Anwesenheit von TEW dar.

Ko-Kristallisation mit bekannten Substraten

Neben der Apo-Struktur sollten auch Strukturen mit bekannten Substraten bzw. Inhibitoren gelöst werden. Außerdem kann die Streufähigkeit der Kristalle durch die Bindung eines Liganden erhöht werden. Aus diesem Grund wurden der Kristallisationslösung der Bedingung JCSG Core II E1 die Substrate Queuin, preQ₁ und Guanin jeweils in verschiedenen Konzentrationen beigefügt, um die jeweiligen Komplex-Strukturen zu erhalten. Dabei konnten die Substrate Queuin und preQ₁ aufgrund der guten Löslichkeit in Wasser in Konzentrationen bis 10 mM eingesetzt werden. Guanin dagegen konnte in einer 0,001 N HCl-Lösung lediglich

in einer Konzentration von 100 μM gelöst werden. Daher wurde Guanin in DMSO gelöst, wobei eine Lösung mit einer Konzentration von 10 mM erhalten werden konnte. Es wurden zunächst Kristallisationstropfen mit unterschiedlicher DMSO-Konzentration erstellt, um die höchstmögliche DMSO-Konzentration zu ermitteln, bei der es noch zur Kristallbildung kommt. Bei einer Kristallisationslösung mit mehr als 3 % DMSO konnte keine Kristallisation mehr beobachtet werden, was die maximale Guanin-Konzentration auf 0,3 mM limitierte. Die höchstmögliche Guanin-Konzentration hatte keinen Einfluss auf Größe und Morphologie der Kristalle, während bei der Konzentration von 5 mM bei preQ₁ und 1 mM bei Queuin die Kristallisation vollständig ausblieb. Obwohl Datensätze mit allen drei Substraten aufgenommen wurden, konnte nur im Falle von Queuin die entsprechende Elektronendichte nachgewiesen werden.

JCSG Core II E9

In der Zwischenzeit wurden die oben aufgeführten *Screens* durch MarXtal wiederholt, um weitere Initialbedingungen zu erhalten. Auch hier konnten während des standardmäßigen vierwöchigen Beobachtungszeitraums keine neuen Bedingungen beobachtet werden. Allerdings wurden nach vier Monaten weitere Aufnahmen sämtlicher Tropfen erstellt, auf welchen stabförmige Kristalle in dem Tropfen der Bedingung JCSG Core II E9 zu sehen waren.



Abbildung 31: Kristalle des TGT-Heterodimers bei folgender Zusammensetzung der Kristallisationslösung: 100 mM Natriumcitrat pH 5,6, 500 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 M Li_2SO_4 .

Aufgrund der hohen Konzentration von Ammoniumsulfat und Lithiumsulfat wurde zunächst vermutet, dass es sich hierbei um Salzkristalle handelt. Im Rahmen der *inhouse* Reproduktion

der Bedingung wurden Kristalle bereits nach drei Tagen erhalten. Ihr Beugungsmuster zeigte klar, dass es sich um Proteinkristalle handelte. Anhand der Testbilder, welche *inhouse* bis zu einer Auflösung von 2,5 Å streuten, wurden die Dimensionen der Einheitszelle bestimmt ($a = b = 100,6 \text{ \AA}$, $c = 202,2 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$).

Die Optimierung der Bedingung wurde analog zu der Bedingung JBPenta H5 durchgeführt. Die besten Kristalle wurden schließlich bei 18 °C durch eine Kristallisationslösung bestehend aus 100 mM Natriumcitrat pH 5,9, 1 M Lithiumsulfat und 700 mM Ammoniumsulfat erhalten. Die Kristalle weisen glatte, definierte Kanten auf und deuten auf eine tetragonale Symmetrie hin.

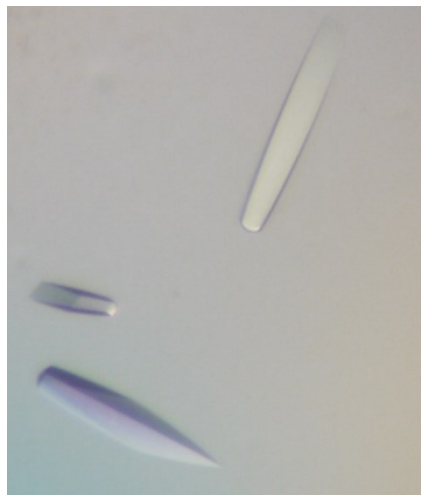


Abbildung 32: Kristalle des TGT-Heterodimers bei folgender Zusammensetzung der Kristallisationslösung: 100 mM Natriumcitrat pH 5,9, 700 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 M Li_2SO_4 .

Optimierung der Kryo-Bedingung

Neben der Zusammensetzung der Kristallisationslösung wurde der Einfluss verschiedener Kryoprotektantien auf das Diffraktionsmuster der Kristalle untersucht. Es wurden die Protektantien Glycerol, Propylenglykol, MPD, PEG 200, PEG 400 und PEG 600 in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Das beste Ergebnis wurde dabei mit 25 % w/v PEG 200 erzielt.

Von einem so erzeugten und behandelten Kristall wurde an der *Beamline* 14.1 des BESSY II in Berlin ein Datensatz mit einer Auflösung von 1,65 Å aufgenommen (siehe Kapitel 5.15). Die Struktur weist im aktiven Zentrum ein gebundenes Citrat-Molekül auf.

Vermeidung des Citrat-Puffers

Es wurden Versuche unternommen, den zuvor eingesetzten Citrat-Puffer zu ersetzen, um die Bildung von Komplex-Strukturen mit bekannten Bindern nicht zu stören. Anstelle des Citrat-Puffers wurden sowohl MES- als auch Phosphat-Puffer eingesetzt. In beiden Fällen wurden trotz Variierung der übrigen Pufferbestandteile keine Kristalle erhalten. Daher ist Citrat vermutlich essentiell für die Kristallbildung.

Ko-Kristallisation mit bekannten Substraten

Im Falle von Queuin wurde bereits ab einer Konzentration von 0,1 mM keine Kristallisation mehr beobachtet. Vermutlich verdrängt das Queuin-Molekül das im aktiven Zentrum gebundene Citrat, was zu einer geringfügigen Konformationsänderung führt. Die Substratkonzentration, bei der keine Kristallisation mehr stattfand, lag im Falle von preQ₁ mit 1 mM deutlich höher, was vermutlich an der geringeren Affinität im Vergleich zu Queuin liegt. Insgesamt muss davon ausgegangen werden, dass die Verwendung eines Citrat-Puffers für die Ausbildung des Kristallgitters im Rahmen dieser Bedingung essentiell ist. Diese Beobachtung deckt sich mit dem stabilisierenden Effekt mehrfach negativ geladener Spezies im Zuge der TSA-Experimente. Ko-Kristallisationsversuche mit Liganden, die im aktiven Zentrum binden, sind demnach höchstwahrscheinlich nicht erfolgreich.

Etablierung eines *Soaking*-Protokolls

Neben der Ko-Kristallisation ist das *Soaking* eine der am häufigsten verwendeten Methoden zur Erzeugung von Protein-Ligand-Komplexen. Beim *Soaking* werden Ligand-freie Kristalle in einen Tropfen überführt, der eine hohe Konzentration des Liganden enthält, für den die Bindungspose aufgeklärt werden soll. Zunächst wurde die maximale DMSO-Konzentration ermittelt, die im Rahmen des *Soakings* eingesetzt werden kann. Dafür wurden Kristalle mit Kristallisationslösungen mit unterschiedlicher DMSO-Konzentration exponiert. Bei mehr als 8 % DMSO ist ein deutlicher Abfall des Streuvermögens zu beobachten. Bevor die Kristalle allerdings mit der Ligand-haltigen Lösung versetzt werden können, musste das gebundene Citrat-Molekül aus der Bindetasche entfernt werden. Hierzu wurden die Kristalle in eine Kristallisationslösung überführt, bei der das Citrat durch MES ersetzt wurde, und für wenige Minuten inkubiert. Es wurde ein Datensatz (PDB Code 7OV9) eines so behandelten Kristalls aufgenommen, welcher an der Stelle, an der zuvor das Citrat-Molekül gebunden hatte, keinerlei

Dichte mehr aufwies. So konnte gezeigt werden, dass das Citrat-Molekül vollständig aus dem aktiven Zentrum gewaschen werden konnte und es so nicht zu einer Überlagerung von zwei Liganden in der späteren Elektronendichtekarte kommen kann. Anschließend wurden die Kristalle in einen Tropfen bestehend aus der Kristallisationslösung, der 8 % einer DMSO-Lösung mit jeweils sättigender Ligand-Konzentration hinzugefügt wurden, überführt. Die Kristalle wurden für unterschiedlich lange Zeit der jeweiligen *Soaking*-Lösung ausgesetzt. Während die Kristalle in der Ligand-freien *Soaking*-Lösung auch nach einer Einwirkzeit von fünf Stunden noch nahezu unverändert streuten, konnte bei Kristallen, die in preQ₁-haltiger Lösung inkubiert wurden, bereits nach einer Stunde keine Diffraktion mehr festgestellt werden. Queuin und Guanin hatten dagegen keinen negativen Einfluss auf das Streuvermögen der Kristalle. Es wurden *Soaking*-Experimente mit den Verbindungen Guanin, Queuin, preQ₁, preQ₀, *ent*-Queuin, Hypoxanthin, 6-Thioguanin, 8-Azaguanin, NPPDAG, H₂-Queuin, **I8** und **I9** (siehe Tabelle 7 und Abbildung 48) durchgeführt. Insgesamt wurde nur für Queuin ein Datensatz mit ausreichender Elektronendichte erhalten. Für die anderen Substrate und Inhibitoren konnten keine Komplex-Strukturen erhalten werden. Mögliche Ursachen sind zum einen die vergleichsweise niedrige Affinität in Kombination mit der geringen Löslichkeit der Verbindungen und zum anderen könnte zur Bindung der Liganden eine Konformationsänderung nötig sein, die sich in der Kristallpackung nicht realisieren lässt. Letzteres könnte auch eine Erklärung sein, warum die Kristalle während des *Soaking*-Experiments in Anwesenheit von z.B. preQ₁ einen schnelleren Qualitätsverlust aufweisen.

3.3. Untersuchung der Kristallstrukturen der eukaryotischen TGT

3.3.1. Einleitende Bemerkung

Dieses Kapitel basiert auf dem Manuskript „Structural and Biochemical Investigation of the Heterodimeric Murine tRNA-Guanine Transglycosylase“, welches für eine Veröffentlichung in der wissenschaftlichen Fachzeitschrift ACS Chemical Biology diente.^[70] Mein Anteil an dieser Arbeit waren alle nachfolgend beschriebenen Ergebnisse mit Ausnahme der Massenspektrometrie, welche zur Untersuchung der QTRT2-Varianten durchgeführt wurden. Die massenspektrometrischen Studien wurden durch Rania Benazza und Oscar Hernandez-Alba im Arbeitskreis von Sarah Cianfèrani an der Universität Straßburg durchgeführt.

3.3.2. Strukturlösung der Datensätze

Im Falle der TEW-haltigen Kristalle wurde durch Prozessierung und Skalierung der Daten gezeigt, dass diese dem hexagonalen primitiven Bravaisgitter mit der Symmetrie $P622$ angehören ($a = b = 199,5 \text{ \AA}$, $c = 90,6 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$). Anhand der Dimensionen der Einheitszelle lässt sich ein Matthews-Koeffizient von $2,88 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ berechnen. Dies entspricht je einem Molekül der QTRT1 sowie der QTRT2 bei einem Wasseranteil von 57,3 %. Bei einem Volumen der Einheitszelle von $3.122.803,3 \text{ \AA}^3$ wurde für das Vorhandensein von zwei Untereinheiten eine Wahrscheinlichkeit von 68 % berechnet, während für das Vorhandensein von drei Untereinheiten bei einem Wasseranteil von 36,2 % lediglich eine Wahrscheinlichkeit von 30 % berechnet wurde.

3.3.3. Strukturlösung mit molekularem Ersatz (*Molecular Replacement*)

Da die Strukturen der beiden separaten Untereinheiten bereits bekannt waren, wurde zunächst versucht, die Struktur des vermeintlichen Heterodimers mit der Methode des molekularen Ersatzes (*Molecular Replacement*) zu bestimmen. Hier ist exemplarisch die Bestimmung der Struktur 7OWZ dargestellt, welche neben dem Heterodimer das Additiv TEW sowie das Substrat Queuin im Komplex enthielt. Als Modell dienten die Strukturen der beiden Untereinheiten, QTRT1 (PDB-Code 6H62) und QTRT2^[33] (PDB-Code 6FV5), welche von Christina Behrens im Rahmen ihrer Doktorarbeit bestimmt worden waren. Pro Struktur wurde

jeweils eine Proteinkette verwendet. Die jeweils zweite Proteinkette pro asymmetrischer Einheit sowie enthaltene Wassermoleküle wurden nicht berücksichtigt.

Mit Hilfe des Programms PHASER^[71] wurde nach jeweils einem Molekül der beiden Untereinheiten gesucht, da laut Matthews-Koeffizient das Vorhandensein eines Heterodimers am wahrscheinlichsten ist. Die Rotationsfunktion wurde mit einem RFZ-Wert von 13,7 ermittelt. Für alle sechs möglichen hexagonalen Raumgruppen wurde nach Translationsfunktionen gesucht. Die beste Lösung mit einem TFZ-Wert von 43,1 wurde für die Raumgruppe $P 6_2 2 2$ gefunden. Diese Z-Werte beschreiben das Signal-Rausch-Verhältnis der Lösung, die durch Translation oder Rotation des Modells erzielt wird. Laut den Autoren des Programms gilt eine Lösung als definitiv richtig, wenn der jeweilige Z-Wert über 8 liegt, was hier der Fall ist. Nach der initialen Verfeinerung der Struktur unter der Berücksichtigung der Auflösungsschalen bis 4 Å wurde ein R-Wert von 44,0 % ermittelt. Hier gilt ein R-Wert unter 50 % als fundierter Hinweis für eine richtige Bestimmung. Um sicherzustellen, dass es sich bei der Struktur tatsächlich um das gewünschte Heterodimer handelt und nicht um ein Homodimer der QTRT1 oder QTRT2, wurde mit dem Programm PHASER auch nach diesen Homodimeren gesucht. Außerdem wurde nach Strukturen bestehend aus drei Untereinheiten gesucht. Dabei wurden alle vier Kombinationen berücksichtigt, die es theoretisch mit den beiden Untereinheiten, QTRT1 und QTRT2 geben kann. Allerdings konnte keine weitere Lösung als das Heterodimer gefunden werden. So konnte diese Struktur als abschließend bestimmt angesehen werden. Die Struktur wurde dennoch auf Modell-Bias überprüft, indem sämtliche aromatischen Aminosäuren innerhalb der Suchmodelle in Alanine überführt wurden. Anschließend wurde der Molekulare Ersatz mittels Phaser bei sonst gleichen Einstellungen wiederholt. Hier konnte ganz klar gezeigt werden, dass an diesen Positionen F_O-F_C Dichte von den entsprechenden aromatischen Seitenketten zu sehen war.

Die Strukturbestimmung der Datensätze der tetragonalen Kristalle, welche anhand der TEW-freien Bedingung erhalten wurden, erfolgte ebenso durch die Methode des molekularen Ersatzes anhand der verfeinerten TEW-haltigen Struktur. Diese Strukturösungen ergaben ebenfalls jeweils nur eine mögliche Lösung bei vergleichbaren Qualitätsparametern.

3.3.4. SAD-Experiment anhand der TEW-Strukturen

Zusätzlich wurde versucht die Datensätze, die in Anwesenheit des Polyoxometallats TEW erhalten wurden, durch die SAD-Methode (*single-wavelength anomalous diffraction*) zu

phasieren. Durch das Friedelsche Gesetz ist definiert, dass Reflektionen, die durch Inversion durch den Ursprung des reziproken Raums erhalten werden, die gleiche Strukturfaktoramplitude bei genau gegenläufiger Phase aufweisen. Im Falle von anomalen Streuern wie Wolfram, welche in dem TEW enthalten sind, gilt diese Regel nicht. Insbesondere bei Strahlung, deren Wellenlänge nahe am Absorptionsmaximum des jeweiligen anomalen Streuers liegt, ist dieser Effekt besonders ausgeprägt. Aus der Differenz beider Strukturfaktoramplituden kann eine anomale Patterson Karte berechnet werden.^[72] Diese dient zur Lokalisierung der anomalen Strahler sowie zur anschließenden Phasierung des Datensatzes und Berechnung der Elektronendichtekarte. Voraussetzung für eine erfolgreiche Strukturlösung ist, dass die anomalen Streuer an definierten Stellen gebunden sind.^[73]

Im Falle der oben beschriebenen TEW-Datensätze konnte mit Hilfe der Programme SHELXC/D/E^[74,75] der Suite HKL2Map^[73] keine interpretierbare Elektronendichte erzeugt werden.^[73] Im vorliegenden Fall war das Signal-Rausch-Verhältnis der anomalen Signale zu gering. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, dass die Datensätze nicht bei der optimalen Wellenlänge aufgenommen worden waren. Die verwendete Wellenlänge von 0.9184 Å liegt zu weit von der nächstgelegenen Absorptionskante (1.025 Å) bzw. der höchsten Absorptionskante (1.215 Å) entfernt. Auf eine erneute Datensammlung bei veränderter Wellenlänge wurde verzichtet, da die Struktur bereits durch die Methode des molekularen Ersatzes eindeutig bestimmt worden war.^[76]

3.3.5. Strukturanalyse des QTRT1/QTRT2-Heterodimers

Die Anordnung der Untereinheiten im QTRT1/QTRT2-Heterodimer ähnelt wie erwartet stark dem Homodimer der bakteriellen TGT (Abbildung 33). Bemerkenswerterweise sind innerhalb des Heterodimers die α -Helices 2a und 2b von QTRT1, die Kontakte zu den α -Helices C und E von QTRT2 bilden, nahezu deckungsgleich mit den α -Helices 2a und 2b der bakteriellen TGT. Im Vergleich dazu bilden die korrespondierenden Reste in der Kristallstruktur der separaten humanen QTRT1, welche in der Arbeitsgruppe von Prof. Ficner (Universität Göttingen) bestimmt worden war,^[32] eine durchgehende Schleife, während in der Struktur der Maus-QTRT1, welche von Christina Behrens aus unserer Arbeitsgruppe bestimmt worden war,^[33] dieses Segment kollabiert und in der Elektronendichtekarte nicht sichtbar ist.

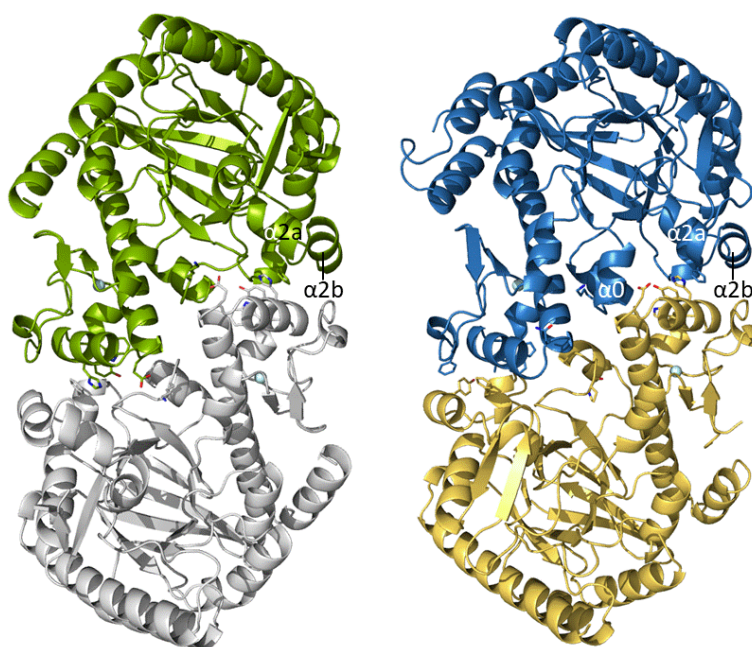


Abbildung 33: Cartoon-Darstellung des *Z. mobilis* TGT Homodimers (links) und des Maus-TGT Heterodimers (rechts). Die Untereinheiten der *Z. mobilis* TGT sind in grau und grün dargestellt. Die QTRT1-Untereinheit der Maus-TGT ist in blau dargestellt, während die QTRT2-Untereinheit in gelb gezeigt ist. Die Zn^{2+} -Ionen sind als hellblaue Kugeln abgebildet. Ausgewählte Seitenketten, die an der Ausbildung der Dimerkontaktfäche beteiligt sind, sind als Stäbchen abgebildet.

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass vier aromatische Aminosäuren innerhalb der Dimerkontaktfäche für die Dimerstabilität der bakteriellen TGT essentiell sind.^[77,78] Im Falle der *Z. mobilis* TGT sind das die Aminosäuren Trp326, Tyr330, His333 und Phe92' (siehe Abbildung 34; A und B). Dabei bilden die Seitenketten von Trp326, Tyr330, His333 als Donatoren Wasserstoffbrücken mit den Carbonylsauerstoffatomen von Met93', Ala49' und Ala48' aus. Darüber hinaus trägt ein nahe gelegenes und hoch konserviertes

Lysin/Glutamat-Paar, das beide Untereinheiten überspannt (in *Z. mobilis* TGT Lys52 und Glu339'; siehe Abbildung 35), wesentlich zur Stabilität des Homodimers bei.

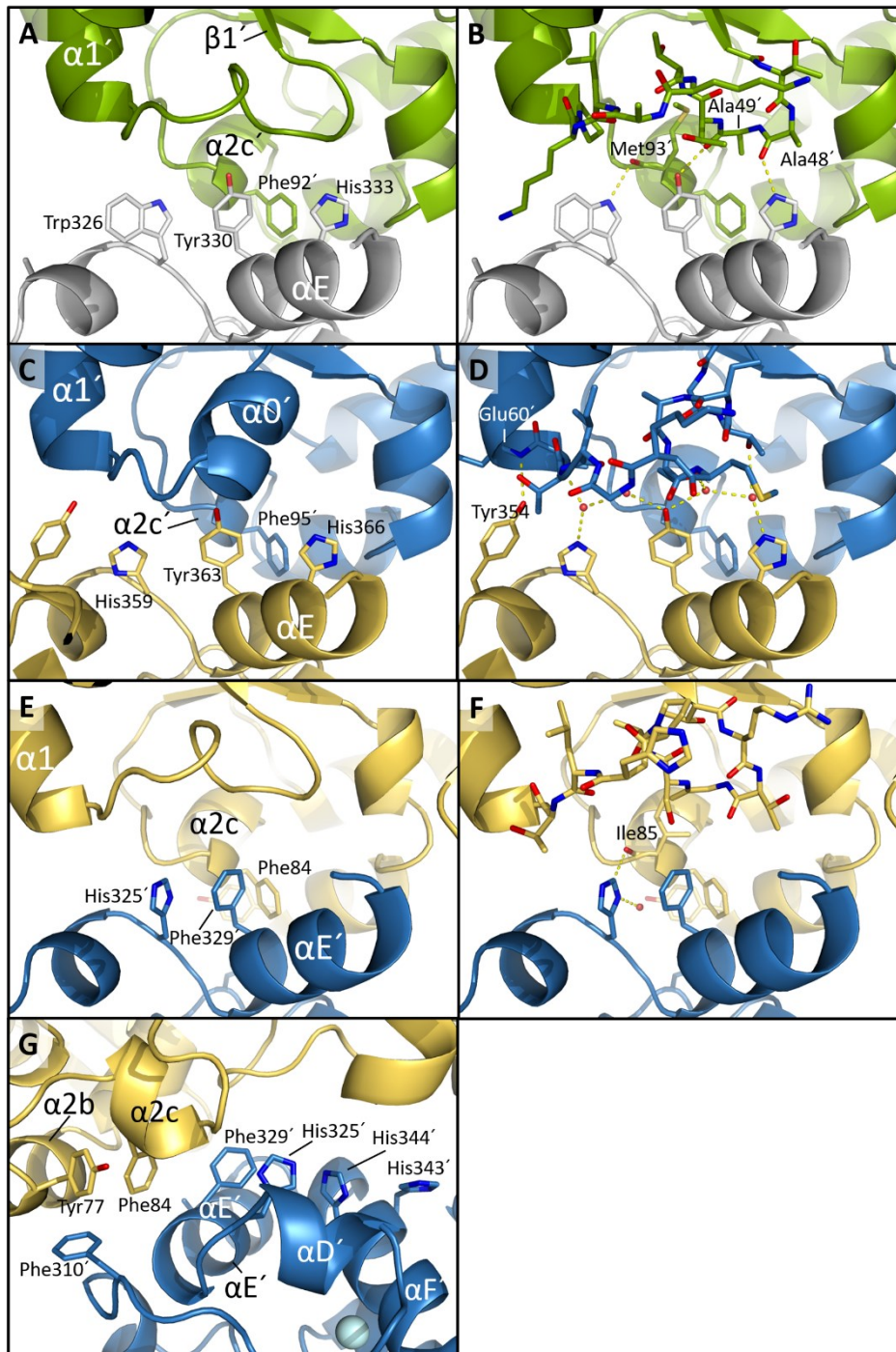


Abbildung 34: Cartoon- Darstellung des aromatischen Clusters innerhalb der Dimerkontakfläche der bakteriellen TGT (PDB-Code 1P0D) und Maus-TGT. Besonders relevante Reste sind als Stäbchen hervorgehoben. Zur besseren Übersicht sind im jeweils ersten Bild nur Reste einer Untereinheit als Stäbchen gezeigt. Die H-Brücken sind durch gepunktete Linien dargestellt. Wassermoleküle sind durch rote Kugeln dargestellt. **A und B:** Aromatisches Cluster der bakteriellen TGT, wobei eine Untereinheit grün und die andere grau gefärbt ist. Die Reste und Sekundärstrukturelemente der grün gefärbten Untereinheit sind durch ein ' gekennzeichnet. **C und D:** Aromatisches Cluster im Hotspot A der eukaryotischen TGT (QTRT1 in blau und QTRT2 in gelb). Die Reste und Sekundärstrukturelemente

von QTRT1 sind durch ein ' gekennzeichnet. **E** und **F**: Aromatisches Cluster im Hotspot B der eukaryotischen TGT (QTRT1 in blau und QTRT2 in gelb). Die Reste und Sekundärstrukturelemente von QTRT1 sind durch ein ' dargestellt. **G**: Anderer Blickwinkel auf Hotspot B, der die π - π -Wechselwirkungen der aromatischen Reste verdeutlicht. Die hellblaue Kugel entspricht einem Zn^{2+} -Ion.

Die meisten Kristallstrukturen von *Z. mobilis* TGT mit einer intakten Dimer-Grenzfläche zeigen die genannte Salzbrücke zwischen Lys52 und Glu339'. In manchen *Z. mobilis* TGT-Strukturen wird diese ionische Interaktion jedoch durch eine alternative Konformation der Lys52-Seitenkette verhindert (Abbildung 35; B). Da die Strukturen der bakteriellen TGT über eine zweizählige Rotationssymmetrie verfügen, sind sowohl die vier aromatischen Seitenketten als auch das Lysin/Glutamat-Paar zweimal in der Dimerkontaktfläche des Enzyms vorhanden.

Die eukaryotische TGT, die aus zwei unterschiedlichen Untereinheiten aufgebaut ist, verfügt im Gegensatz dazu nicht über eine Rotationssymmetrie. Deshalb teilt sich die Kontaktfläche hier in zwei unterschiedliche Teile ein, die im Folgenden als „Hotspot A“ und „Hotspot B“ bezeichnet werden. Hotspot A enthält ein zur *Z. mobilis* TGT korrespondierendes Lysin/Glutamat-Paar (Lys55 von QTRT1 und Glu372 von QTRT2) sowie ein aromatisches Cluster, das dem der bakteriellen TGT stark ähnelt. Hier ersetzen His359, Tyr363 und His366 aus QTRT2 die Aminosäuren Trp326, Tyr330 und His333 der *Z. mobilis* TGT, während Phe95 aus QTRT1 dem Phe92' der *Z. mobilis* TGT entspricht (Abbildung 34; C). Dieses aromatische Cluster wird durch Tyr354 der QTRT2-Untereinheit erweitert, das über seine phenolische Hydroxylgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Hauptkettenamid von Glu60 der QTRT1 bildet (Abbildung 34; D).

Während sich in der *Z. mobilis* TGT für Tyr354 kein Pendant finden lässt, weist die TGT aus *Thermotoga maritima*, die einzig weitere bakterielle TGT mit bekannter Struktur (PDB-Eintrag: 2ASH), Tyr302 an entsprechender Position auf. Dieses bildet eine mit Tyr354 der QTRT2 vergleichbare Wasserstoffbrückenbindung. Die Aminosäuren His359, Tyr363 und His366 von QTRT2 sind nicht in der Lage, Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hauptketten-Carbonylgruppen von Met96, Ala52 und Gln51 von QTRT1 zu bilden, die in der *Z. mobilis* Struktur den Aminosäuren Met93, Ala49 und Ala48 entsprechen. Vielmehr werden diese Kontakte durch mehrere Wasser-vermittelte polare Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten ersetzt (Abbildung 34; D).

Im Heterodimer der Maus-TGT bilden die Aminosäuren Gly49 bis Lys55 der QTRT1 eine in keiner anderen TGT vorkommende α -Helix aus, nämlich α -Helix 0. Die Bildung dieser Helix lässt eine Salzbrücke zwischen Lys55 von QTRT1 und Glu372 der QTRT2 im Hotspot A nicht zu (Abbildung 35; C). Über die Carbonylsauerstoffatome der Hauptkette von Thr53 und Met54

bildet die α -Helix 0 Wasserstoffbrückenbindungen zu den Hauptkettenamiden von Leu374 und Leu373 der QTRT2. Die letztgenannten Reste bilden den *N*-Terminus der α -Helix F dieser Untereinheit (Abbildung 35; C). Die Orientierung von Lys55 ist in ähnlicher Form auch in der Kristallstruktur der separaten Maus-QTRT1 zu beobachten, in der die entsprechende Seitenkette von Lys55 gut in der Elektronendichtekarte definiert ist. Dort bildet die Ammoniumgruppe eine H-Bindung (2,8 Å) zu einem nahe gelegenen Wassermolekül.^[70] In der *Z. mobilis* TGT bilden die zur α -Helix 0 analogen Aminosäuren einen Teil der $\beta 1\alpha 1$ -Schleife (siehe Abbildung 35; A). Das darin enthaltene Lys52 (äquivalent zu Lys55 in QTRT1) der *Z. mobilis* TGT trägt nicht nur zur Dimerstabilität bei, sondern ist auch an der tRNA-Bindung beteiligt. Die von Xie *et al.* bestimmte Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit einem RNA-Molekül zeigt eine Kation- π -Wechselwirkung, die durch das Ammonium der Seitenkette von Lys52 und der Uracil³⁵-Base des tRNA-Substrats gebildet wird.^[27] In der von der Arbeitsgruppe Ficner (Universität Göttingen) veröffentlichten Struktur der humanen TGT im Komplex mit eben diesem RNA-Molekül bilden die Reste 49 bis 55 der QTRT1 ebenfalls keine α -Helixstruktur aus.^[79] Stattdessen sind sie wie in der *Z. mobilis* TGT Teil einer im Vergleich zur bakteriellen TGT sehr ähnlichen $\beta 1\alpha 1$ -Schleife. Dies ermöglicht die oben erwähnten Untereinheiten-überspannenden H-Brücken von His359, Tyr363 und His366 der QTRT2 zu den Hauptketten-Carbonylgruppen von Met96, Ala52 und Gln51 der QTRT1, die sich in der Kristallstruktur der TGT aus der Maus nicht ausbilden können. Darüber hinaus nimmt Lys55 der QTRT1 im Komplex mit einem RNA-Molekül eine ähnliche Konformation an wie Lys52 der *Z. mobilis* TGT und bildet eine Kation- π -Wechselwirkung mit Uracil³⁵. Es ist anzunehmen, dass die Bindung des tRNA-Substrats auch in der Maus-TGT zu einer signifikanten Konformationsänderung in dieser Region führt.

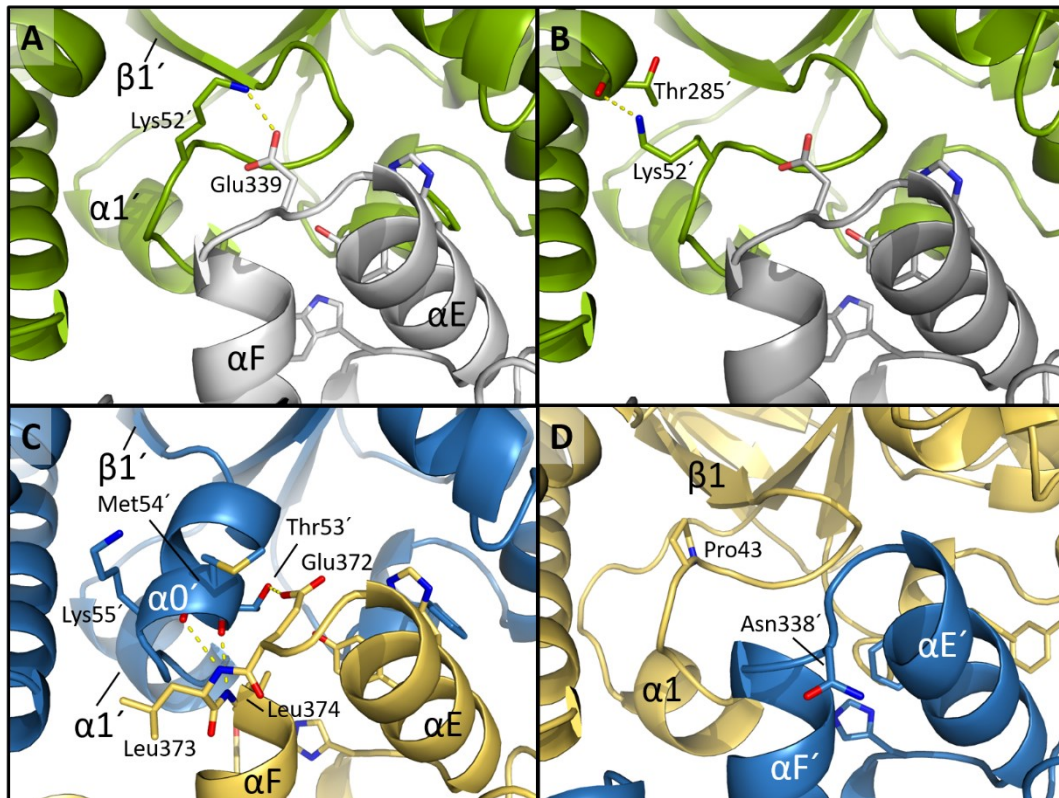


Abbildung 35: Untereinheiten, die das Lysin/Glutamat-Paar in TGT-Enzymen bilden. Die Farbkodierung und Beschriftung entsprechen denjenigen in der vorhergehenden Abbildung. **A:** In etwa zwei Dritteln der Kristallstrukturen der *Z. mobilis* TGT mit intakter Dimerkontaktstelle bilden Lys52' und Glu339 eine Salzbrücke (PDB-Code 2Z7K). Zusätzlich zu den Seitenketten von Lys52' und Glu339 sind die Seitenketten des aromatischen Clusters als Stäbchen dargestellt, wobei die letzteren nicht beschriftet sind. **B:** In etwa einem Drittel der TGT-Kristallstrukturen von *Z. mobilis* mit ungestörter Dimerkontaktstelle liegt die Seitenkette von Lys52' in einer alternativen Konformation vor, die zu einer ladungsunterstützten H-Brücke an den Carbonylsauerstoff der Hauptkette von Thr285' führt, die als Stäbchen dargestellt ist (PDB-Eintrag 1PUD). **C:** Im Hotspot A der Maus-TGT lässt die Bildung der α -Helix 0 in QTRT1 eine Salzbrücke zwischen Lys55 von QTRT1 und Glu372 der QTRT2 nicht zu. **D:** Im Hotspot B ist das Lysin/Glutamat-Paar durch ein Prolin (Pro43 von QTRT2) und durch ein Asparagin (Asn338 von QTRT1) ersetzt, was die Bildung einer Salzbrücke von vornherein ausschließt.

Hotspot B in der Kristallstruktur der Maus-TGT enthält kein Lysin/Glutamat-Paar analog zu Lys52 und Glu339' der *Z. mobilis* TGT. Die entsprechenden Positionen werden von Pro43 der QTRT2 und Asn338 der QTRT1 besetzt, die keine ionische Wechselwirkung eingehen können (Abbildung 35; D). Darüber hinaus fehlt im aromatischen Cluster von Hotspot B ein aromatischer Rest, der His333 der *Z. mobilis* TGT entspricht (Abbildung 34; E und F). Stattdessen wird diese Position von Ala332 der QTRT1 eingenommen. Im Gegensatz dazu gibt es analoge Reste zu Trp326, Tyr330 und Phe92' der *Z. mobilis* TGT, nämlich His325 und Phe329 der QTRT1 sowie Phe84 der QTRT2. Die $\beta 1\alpha 1$ -Schleife der QTRT2 nimmt einen

Verlauf, der dem der $\beta 1\alpha 1$ -Schleife in den Kristallstrukturen der bakteriellen TGT mit intakter Dimerkontaktfläche sehr ähnlich ist. Dennoch können keine H-Brücken zwischen den Carbonylsauerstoffatomen der Hauptkette innerhalb dieser Schleife und den aromatischen Resten des Clusters gebildet werden. Wie bereits erwähnt, gibt es weder ein Gegenstück zu His333 der *Z. mobilis* TGT noch weist die Seitenkette von Phe329 aus QTRT1 eine H-Brückendonorfunktion auf. His325 der QTRT1 ist jedoch in der Lage, eine H-Brücke mit dem Carbonylsauerstoff der Hauptkette von Ile85 der QTRT2 zu bilden, welche analog zu der H-Brücke zwischen Trp326 und Met93' in der *Z. mobilis* TGT ist. Das Fehlen eines His333-Restes im Hotspot B wird am entgegengesetzten Ende des Clusters durch zwei zusätzliche aromatische Reste, nämlich Tyr77 der QTRT2 und Phe310 der QTRT1, kompensiert. Der Phenylrest von Tyr77 der QTRT2 bildet sowohl mit der Phenylgruppe von Phe84 aus derselben Untereinheit als auch mit der Phenylgruppe von Phe310 der QTRT1 π - π -Wechselwirkungen (*edge-to-face*) aus (Abbildung 34; G). Darüber hinaus steuert die α -Helix F der QTRT1 mit His343 und His344 zwei weitere aromatische Reste zu dem Cluster bei. Das Imidazol von His344 bildet dabei das Bindeglied zwischen His325 und His343, indem es π - π -Wechselwirkungen (*edge-to-face*) mit den Imidazolresten beider Aminosäuren ausbildet.

Die Seitenkette von His325 liegt in zwei unterschiedlichen Konformationen vor. Dabei ist die Seitenkette so orientiert, dass sie entweder eine H-Brücke zu einem nahegelegenen Wassermolekül oder mit dem Carbonyl-Sauerstoffatom der Hauptkette von Ile85 ausbilden kann (Abbildung 34; F).

3.3.6. Das aktive Zentrum der Maus-TGT

In der Kristallstruktur (PDB-Code: 7B2I) der Maus-TGT, die in Abwesenheit von TEW erhalten wurde, ist die Guanin³⁴/Queuin-Bindetasche der QTRT1 durch ein Citratmolekül besetzt, das während der Kristallisation als Pufferkomponente diente. Das gebundene Citrat bildet zahlreiche polare Wechselwirkungen mit Resten, die bekanntermaßen an der Substratbindung beteiligt sind.^[79] Eine der Carboxylgruppen bildet H-Brücken mit dem Seitenketten-Amid von Gln202 sowie mit der Seitenketten-Carboxylgruppe von Asp159 (Abbildung 36; A). Die letztgenannte Wechselwirkung deutet darauf hin, dass diese Carboxylgruppe des gebundenen Citrats protoniert vorliegt. Die Carboxylgruppe des Citratmoleküls imitiert dabei Teile des Grundgerüsts einer Substratbase. Die Hydroxylgruppe des Citrats bildet H-Brücken zum Hauptkettenamid von Gly229 und zu einem gut definierten Wassermolekül, während die an dasselbe Kohlenstoffatom gebundene Carboxylgruppe

lösungsmittel exponiert und an keinen offensichtlichen Wechselwirkungen beteiligt ist. Obwohl die dritte Carboxylgruppe des gebundenen Citrats in der Elektronendichtekarte schlecht definiert ist (Abbildung 37, A), bildet sie eindeutig H-Brücken mit der Hydroxylgruppe der Seitenkette und dem Amid der Hauptkette von Ser231. Bemerkenswerterweise erfordert die letztgenannte Wechselwirkung, dass das Amid der Leu230/Ser231-Peptidbindung in Richtung der Substratbindungstasche orientiert ist, während der zugehörige Carbonylsauerstoff dem Proteininneren zugewandt ist, wo er eine H-Brücke mit der protonierten Seitenketten-Carboxylgruppe von Glu234 bildet (Abbildung 36; A). Nicht nur in den QTRT1-Untereinheiten der eukaryotischen TGTs, sondern auch in bakteriellen TGTs ist Glu234 streng konserviert, da es eine indirekte, aber wesentliche Rolle bei der Bindung verschiedener Substratbasen spielt. Aus Untersuchungen an der bakteriellen TGT ist bekannt, dass die beobachtete Konformation der Leu230/Ser231-Peptidbindung, die durch das protonierte Glu234 stabilisiert wird, für das Binden von Guanin³⁴ in der Substratbindetasche erforderlich ist.^[80]

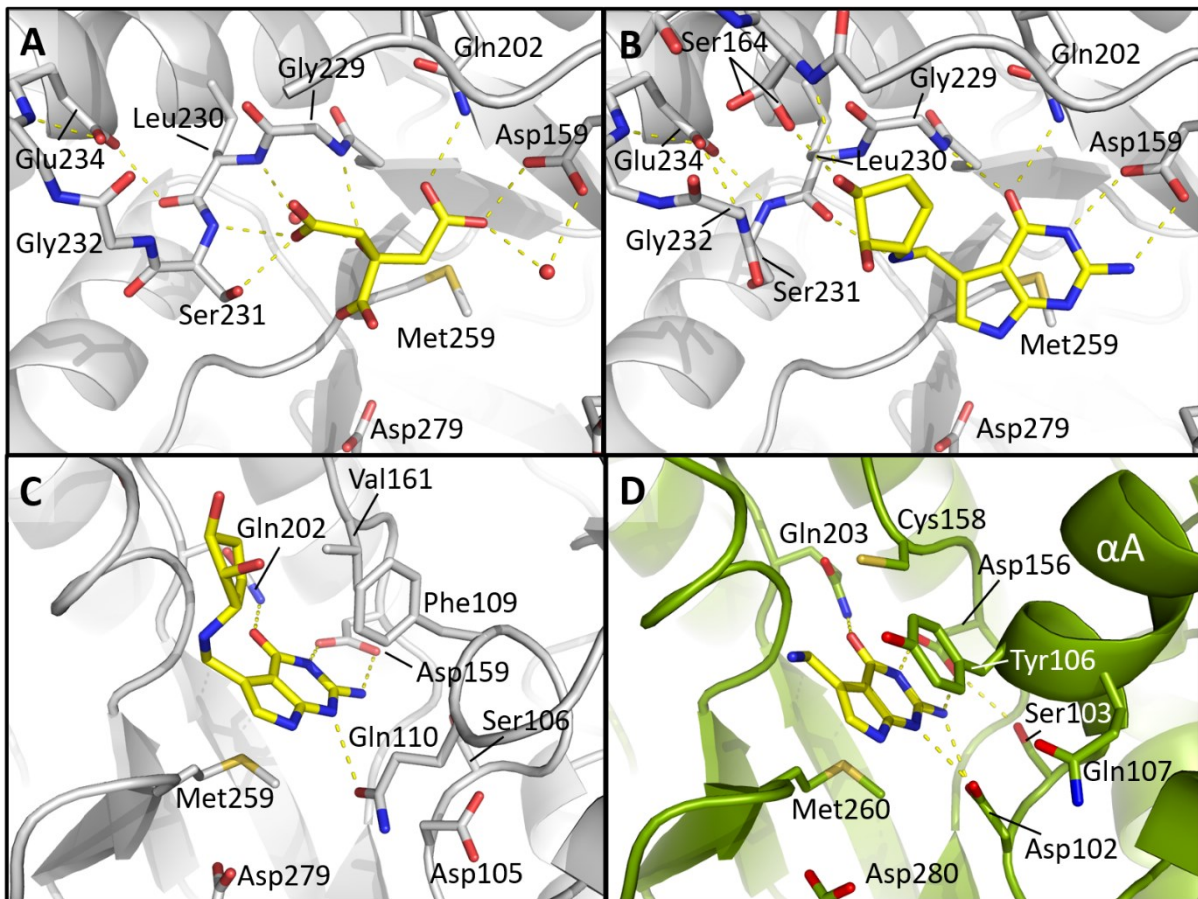


Abbildung 36: Die Substratbasen-Bindetasche der Maus-QTRT1 (grau) im Vergleich zur Bindetasche der *Z. mobilis* TGT (grün). H-Brücken sind durch gepunktete Linien dargestellt. **A:** Die Guanin/Queuin-Bindungstasche der Maus-QTRT1 im Komplex mit Citrat (dargestellt als Stäbchen; Kohlenstoffatome gelb). Zwei Wassermoleküle, die H-Brücken zum gebundenen Citrat bilden, sind als rote Kugeln dargestellt. Die Schleife $\beta 6\alpha 6$ sowie die Seitenketten der Reste, die bekanntermaßen an der Bindung von Substratbasen oder der Katalyse beteiligt sind, sind als Stäbchen dargestellt. Der Rest des Proteins innerhalb dieses Ausschnitts ist in der Cartoon-Darstellung gezeigt. **B:** Die gleiche Ansicht der Guanin-Queuin-Bindetasche in der Maus-QTRT1 wie in (A), jedoch mit gebundenem Queuin. **C:** Eine andere Ansicht der Guanin/Queuin-Bindetasche der Maus-QTRT1 im Komplex mit Queuin. **D:** Die Guanin/preQ₁-Bindetasche der *Z. mobilis* TGT mit gebundener preQ₁-Base, dargestellt aus einer Perspektive, die der in (C) entspricht.

Um die Bindungseigenschaften von Queuin im aktiven Zentrum der eukaryotischen TGT zu charakterisieren, musste eine Komplexstruktur mit der Substratbase erzeugt werden. Die Methode der Ko-Kristallisation ist anhand der Citrat-haltigen Bedingung nicht geeignet. Die Anwesenheit von Queuin in der Kristallisationslösung verhindert die Bildung von Kristallen. Auch bei Verwendung von MES anstelle von Citrat bleibt die Bildung von Kristallen aus. Offensichtlich ist die Bindung von Citrat im aktiven Zentrum der QTRT1 Voraussetzung für die Kristallbildung bei dieser Bedingung (100 mM Natriumcitrat pH 5,9, 700 mM (NH₄)₂SO₄, 1 M Li₂SO₄). Daher musste zunächst wie in Kapitel 3.2 beschrieben eine geeignete Methode

etabliert werden. Dabei werden Kristalle in der regulären Citrat-haltigen Kristallisationslösung gebildet und anschließend in eine Lösung überführt, die MES anstelle von Citrat enthält. Die Überprüfung auf Eignung dieser Methode wurde bereits in Kapitel 3.2 beschrieben. Anschließend konnte das Substrat Queuin erfolgreich durch Soaking in den Kristall eingeführt werden. Diese Methode beeinträchtigt das Streuvermögen der Kristalle geringfügig. Es konnte eine Komplexstruktur mit einer Auflösung von 2,1 Å gelöst werden. Die Elektronendichte von Queuin (Abbildung 37, B) ist dabei ausreichend, um die Position und Konformation des Substrats eindeutig zu definieren.

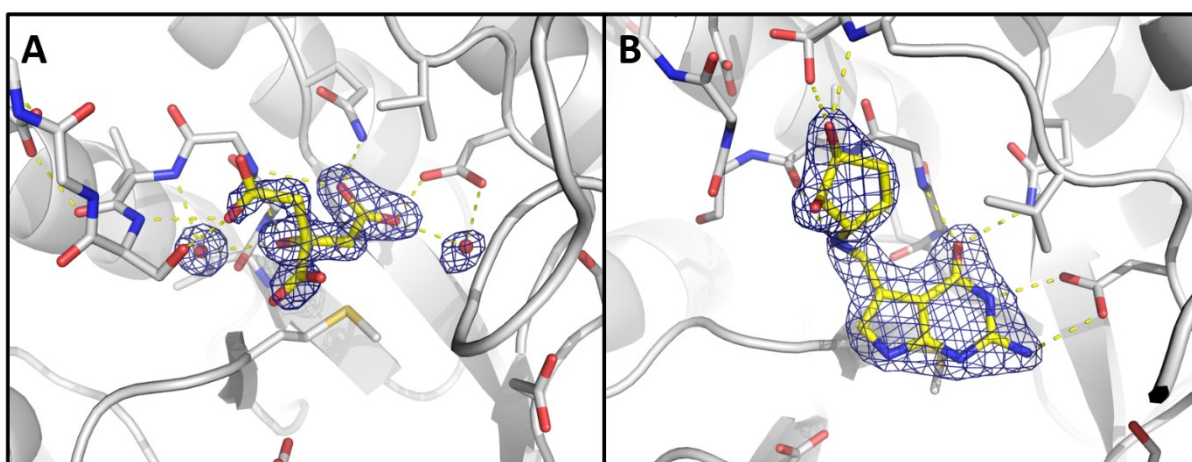


Abbildung 37: A: Die Guanin³⁴/Queuin-Bindestasche der Maus-QTRT1 im Komplex mit Citrat (in Stäbchendarstellung; Kohlenstoffatome gelb). H-Brücken sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Die $\beta 6\alpha 6$ -Schleife sowie die Seitenketten der Reste, von denen bekannt ist, dass sie an der Bindung von Substratbasen oder an der Katalyse beteiligt sind, sind in Strichdarstellung gezeigt. Zwei Wassermoleküle, die H-Brücken mit dem gebundenen Citrat bilden, sind als rote Kugeln dargestellt. Der Rest des Proteins in diesem Ausschnitt ist in der Cartoon-Darstellung abgebildet. B: Die Guanin³⁴/Queuin-Bindestasche der Maus-QTRT1 im Komplex mit Queuin. Die dargestellten 2Fo-Fc-Elektronendichten sind jeweils bei 1,5 σ konturiert.

Erwartungsgemäß ist die Bindungspose des 7-Deazaguanin-Grundgerüsts von Queuin an das aktive Zentrum der Maus-TGT der Bindung von preQ₁ an die bakterielle TGT sehr ähnlich.

Die 1-NH-Gruppe sowie die 2-Aminogruppe bilden Wasserstoffbrücken mit den Carboxylgruppen der Seitenketten von Asp159. Die Carbonylgruppe an Position 6 bildet zudem Wasserstoffbrücken zu der Seitenkette von Gln202 und der Hauptkette von Gly229 (Abbildung 36, B und C). Das aromatische Gerüst befindet sich zwischen den Seitenketten von Met259 und Phe109. Met259 entspricht dabei Met260 in der *Z. mobilis* TGT (Abbildung 36, D).

Das C α -Atom von Phe109 zeigt im Vergleich mit dem äquivalenten Tyr106 in der *Z. mobilis* TGT einen um 2,3 Å größeren Abstand zur Substratbase. Dies führt zur Rotation der Seitenkette von Phe109 und zur Ausbildung einer *edge-to-face* π - π - anstelle einer *face-to-face*- Interaktion mit dem 7-Deazagaunin-Grundgerüst. Die Verschiebung von Phe109 ist das Resultat der Konformation der Aminosäuren 108 bis 114. In der vorliegenden Struktur des Maus-TGT-Heterodimers formen diese Reste eine Schleifenstruktur, während die analogen Aminosäuren in der humanen sowie Maus-QTRT1-Struktur eine α -Helix (α -Helix A) bilden.

In der Kristallstruktur der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit preQ₁, die durch Kristallisation bei pH 5,5 erhalten wurde, formt die Seitenkette von Asp102 eine Salzbrücke zu dem vermutlich protonierten N3 sowie zur 2-Aminogruppe der Substratbase (siehe Abbildung 36, D).^[81] Die Kristallstruktur der Maus-TGT in Komplex mit Queuin weist keine äquivalente Salzbrücke auf, da sich die Seitenkette von Gln110 zwischen die Substratbase und Asp105 schiebt (siehe Abbildung 36, C). Die Platzierung von Gln110 resultiert aus der bereits erwähnten Schleifenstruktur der Aminosäuren 108 und 114. Diese Schleife würde einen sterischen Konflikt mit dem Uridin-35-Nukleotid eines potentiell gebundenen tRNA-Moleküls hervorrufen. Es handelt sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein kristallographisches Artefakt oder es kommt vor der tRNA-Bindung zur Bildung einer α -Helix A.

In der vorliegenden Struktur der Maus-TGT ist die Seitenkette von Asp105 in die entgegengesetzte Richtung des Substrats orientiert und bildet eine Wasserstoffbrücke mit der Hauptkette von Thr74. In der Apo-Struktur der *Z. mobilis* TGT lässt sich eine äquivalente Orientierung des korrespondierenden Asp102 beobachten.

Der Austausch von Citrat durch Queuin verursacht die Drehung der Leu230/Ser231-Peptidbindung. In Anwesenheit von Queuin ist der Carbonylsauerstoff in Richtung der Bindetasche orientiert und bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem sekundären Amin der Substratbase (siehe Abbildung 36, B). Die gedrehte Leu230/Ser231-Konformation wird zusätzlich durch eine Wasserstoffbrücke mit der Seitenkette von Glu234 stabilisiert. Diese Wechselwirkung geht vermutlich mit der Deprotonierung der Seitenkette von Glu234 einher.

Ein ähnliches Phänomen lässt sich bei der *Z. mobilis* TGT beobachten. Die Bindung von preQ₁ führt hier zur Deprotonierung von Glu235, welches dadurch eine Wasserstoffbrücke mit dem Amid der Leu231/Ala232-Peptidbindung eingeht. Auch hier kommt es zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonylsauerstoff und der Substratbase.

Die Apo-TGT der Maus, deren Struktur durch Transfer eines initial unter der Citrat-Bedingung gewachsenen Kristalls in einen MES-Puffer bei pH 5,9 erhalten wurde, weist beide Konformationen der Leu230/Ser231-Peptidbindung in einem 1:1-Verhältnis auf. Dementsprechend liegt Glu234 in gleichem Verhältnis vermutlich sowohl protoniert als auch deprotoniert vor.

Der Dihydroxycyclopenten-Rest von Queuin ist zwischen den Schleifen $\beta 4\alpha 4$ und $\beta 6\alpha 6$ der QTRT1 eingebettet (Abbildung 36, C). Die Hauptkette der Schleife $\beta 6\alpha 6$ in der QTRT1-Struktur im Komplex mit Queuin lässt sich nahezu perfekt mit der gleichen Schleife in der Kristallstruktur der preQ₁-gebundenen *Z. mobilis* TGT (Abbildung 36, D) überlagern. Zusätzlich zu den erwähnten Resten Leu230, Ser231 und Glu234 enthält die QTRT1-Struktur der Maus den Rest Gly232, der in den QTRT1-Untereinheiten konserviert ist, aber in weit mehr als 90 % der bakteriellen TGT-Enzyme, welche die preQ₁-Base als physiologisches Substrat aufweisen, durch ein Valin ersetzt ist. Es ist offensichtlich, dass die Seitenkette eines Valins an dieser Stelle einen sterischen Konflikt mit dem Dihydroxycyclopenten-Rest von Queuin verursachen würde.

Um sich bestmöglich an die gebundene Substratbase Queuin anzupassen, nimmt die Schleife $\beta 4\alpha 4$ teilweise einen deutlich anderen Verlauf als die entsprechende Schleife im bakteriellen Enzym. Während Asp159 der QTRT1 und das äquivalente Asp156 der *Z. mobilis* TGT nahezu deckungsgleich sind, zeigen sowohl His160 als auch Val161 der QTRT1 im Vergleich zu den entsprechenden Resten der *Z. mobilis* TGT, nämlich Glu157 und Cys158, eine Verschiebung um ca. 2 Å entgegen der Substratbase. Dadurch kann die Isopropyl-Seitenkette von Val161, die in der QTRT1 konserviert ist, sowohl mit dem aromatischen Gerüst als auch mit dem fünfgliedrigen Ring von Queuin Van-der-Waals-Kontakte bilden (Abbildung 36, C). In ca. 90% der bakteriellen TGT-Enzyme ist Val161 durch Cystein ersetzt. Tatsächlich gibt es experimentelle Hinweise darauf, dass die Mutation von Val161 zu Cystein nicht nur zu einer reduzierten Affinität der QTRT1 zu Queuin führt, sondern insbesondere zu einer stark erhöhten Affinität zur preQ₁-Base.^[18,21] Die Erkennung der preQ₁-Base durch QTRT1 ist jedoch zu vermeiden, da ihr Einbau in die tRNA irreversibel ist und Eukaryoten nicht über die für ihre Umwandlung in Queuosin erforderlichen Enzyme verfügen.

Das C α -Atom von Ser164 ist im Vergleich zu dem des entsprechenden Tyr161 der *Z. mobilis* TGT um mehr als 2,5 Å in Richtung der Bindungstasche verschoben. Dies ermöglicht die Bildung einer H-Brücke zwischen dem Hauptkettenamid von Ser164 und der 4-Hydroxylgruppe des Dihydroxycyclopentenyl-Restes von Queuosin. Eine weitere H-Brücke

wird zwischen der 4-Hydroxylgruppe des Dihydroxycyclopentenyl-Restes und der Hydroxylgruppe der Seitenkette von Ser164 gebildet. Sie scheint jedoch nicht sehr stabil zu sein, da in der Kristallstruktur eine zweite, alternative Konformation für die Hydroxylgruppe von Ser164 zu beobachten ist, die diese Wechselwirkung nicht zulässt. Bemerkenswert ist, dass sowohl Ser164 als auch der nachfolgende Rest Thr165, die in der Elektronendichtekarte der QTRT1-Struktur im Komplex mit Queuin gut definiert sind, im Strukturmodell der QTRT1 im Komplex mit Citrat sowie der Apo-TGT nicht eingebaut werden konnten. Dort gibt es jeweils keine eindeutige Elektronendichte, die diesen Resten zugeordnet werden kann. Die 5-Hydroxylgruppe des Dihydroxycyclopentenyl-Restes ist in der Struktur lösungsmittlexponiert und an keinen spezifischen Wechselwirkungen beteiligt.

Auch unter Verwendung des Additivs TEW konnten Kristalle der Maus-TGT im Komplex mit Queuin hergestellt werden. Mithilfe der TEW-haltigen Bedingung war es möglich, die Komplexstruktur (PDB-Code: 7OWZ) mit Queuin durch Ko-Kristallisation zu erhalten. Die entsprechende Struktur wurde mit einer moderaten Auflösung von 2,60 Å bei einem R-Wert von 21,1 % sowie einem freien R-Wert von 23,8 % bestimmt. Im Vergleich zu der bereits beschriebenen Struktur, welche durch *Soaking* erhalten wurde, lassen sich praktisch keine Unterschiede bezüglich der Konformation des Queuins sowie der umgebenden Bindetasche beobachten (siehe Abbildung 38).

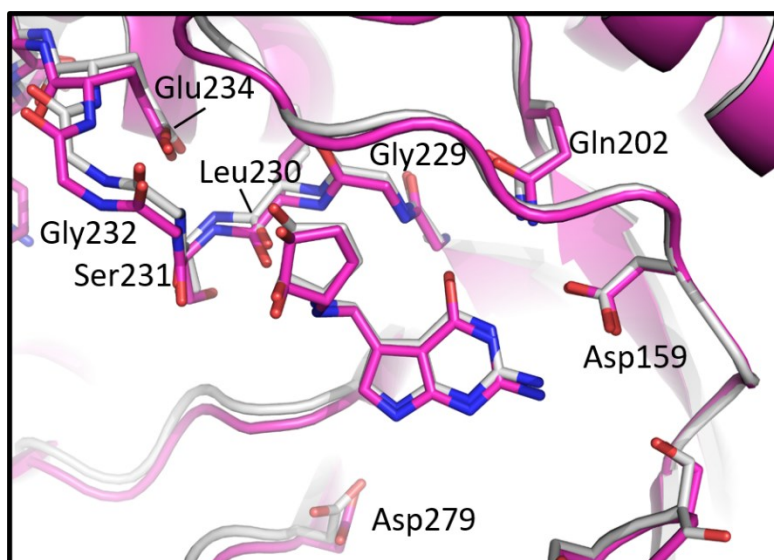


Abbildung 38: Überlagerung zweier Komplexstrukturen mit Queuin in Ab- und Anwesenheit von TEW. Die Struktur mit tetragonaler Symmetrie ohne TEW wurde durch die *Wash-out/Soaking*-Methode hergestellt (Grau, PDB-Code: 7OVO). Die Struktur mit hexagonaler Symmetrie in Anwesenheit von TEW wurde durch die Methode der Ko-Kristallisation (magenta, PDB-Code: 7OWZ) erhalten. Es lassen sich unter Berücksichtigung der Auflösung von 2,1 Å bzw. 2,6 Å keine signifikanten Unterschiede erkennen.

Somit konnte die Bindungspose von Queuin durch zwei unterschiedliche Bedingungen bestätigt werden. Dies stellt ein starkes Indiz dar, dass die gezeigte Struktur die nativen Bedingungen repräsentiert. Aufgrund der geringen Qualität der Elektronendichtekarte der TEW-haltigen Struktur können die Interaktionen zwischen Ser164 der QTRT1 und der 4-Hydroxylgruppe von Queuin nicht eindeutig charakterisiert werden. Bemerkenswert ist allerdings, dass für Ser164 sowie die angrenzenden Thr165 und Val166 ausreichend Elektronendichte vorhanden war, um die Reste eindeutig zu positionieren, während diese in der Apo-Struktur nicht definierbar waren.

Die diskutierten Kristallstrukturen liefern keine offensichtliche Erklärung für die Bedeutung der Doppelbindung innerhalb des Dihydroxycyclopentenyl-Rests von Queuin.

In der von Sievers et al. veröffentlichten und bereits erwähnten Kristallstruktur der humanen TGT im Komplex mit einem RNA-Substrat ist die α -Helix A, die in den Kristallstrukturen der Maus-TGT eine Schleifen-Konformation annimmt, deutlich in Richtung der Substratbasen-Bindungstasche verschoben.^[79] Die Überlagerung der Kristallstruktur der Maus-TGT im Komplex mit Queuin und der Kristallstruktur der menschlichen TGT im Komplex mit einem RNA-Molekül deutet darauf hin, dass das Queuin-Substrat in Gegenwart der tRNA tief in einer Tasche vergraben ist, welche die Substratbase eng umschließt. In dieser Konformation der α -Helix A geht die Seitenkette von Val112, die in den QTRT1-Untereinheiten konserviert ist, offensichtlich Van-der-Waals-Wechselwirkungen mit dem Dihydroxycyclopentenyl-Rest von Queuin ein. Infolgedessen scheint die Substratbase abgesehen von den Hydroxylgruppen des Dihydroxycyclopentenyl-Restes fast vollständig vom umgebenden Lösungsmittel abgeschirmt zu sein. Bemerkenswert ist, dass Val112 in der katalytischen Untereinheit der eukaryotischen TGT keine Rolle zu spielen scheint. In allen bakteriellen TGTs mit bekannter Sequenz ist es durch einen sperrigeren Rest ersetzt, die vermutlich ungünstige Wechselwirkungen mit dem Substituenten eines potenziell gebundenen Queuin-Moleküls erzeugen. Val112 könnte also ein bisher unbemerktes Spezifitätsmerkmal des Nukleobasensubstrats sein.

3.4. Polyoxometallate in den Strukturen des Maus-TGT Heterodimers

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Kristallbedingungen identifiziert, die das Anderson-Evans Polyoxometallat (im Folgenden „TEW“ genannt) der Firma Jena Bioscience enthielten. Lediglich zwei unterschiedliche Kristallbedingungen führten zu Datensätzen mit einer Auflösung von mindestens 3 Å. Anhand der Bedingung JBPenta H5 (100 mM MES pH 6,4, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 35 % w/v Pentaerythritolethoxylat (15/4 EO/OH)) wurde der streufähigste Kristall im Rahmen des MarXtal-Screens gewonnen. Diese Bedingung konnte *inhouse* nicht in vergleichbarer oder besserer Qualität reproduziert werden (siehe Kapitel 3.2). Stattdessen war es möglich, die Bedingung JCSG Core II E1 (100 mM Natriumkaliumphosphat pH 6,8, 200 mM NaCl, 14 % w/v PEG 1000, 1 mM TEW) reproduzierbar zu etablieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde je ein Datensatz dieser beiden Bedingungen näher untersucht.

Das Additiv TEW ist ein Polyoxowolframatom ([TeW₆O₂₄]⁶⁻) und wurde ausführlich von Rompel *et al.* beschrieben.^[66,67]

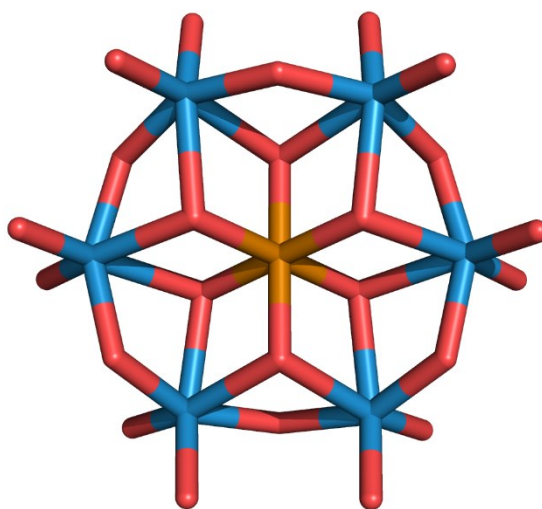


Abbildung 39: Stäbchendarstellung des Polyoxometallats TEW^[65] [TeW₆O₂₄]⁶⁻. Te: ocker, W: blau, O: rot.

Das zentrale Telluratom bildet dabei eine oktaedrische Geometrie mit den sechs benachbarten Sauerstoffatomen. Die sechs Wolframatomgruppen sind mit jeweils sechs Sauerstoffatomen verbunden und liegen ebenfalls in einer nahezu oktaedrischen Geometrie vor. Diese WO₆-Oktaeder sind so um das zentrale Telluratom angeordnet, dass eine flache Gesamtstruktur

entsteht.^[65] Insgesamt wurden vier Bindestellen der Polyoxometallate innerhalb der asymmetrischen Einheit beobachtet (**PDB 7OVS**), die hier einzeln vorgestellt werden.

Die erste Bindestelle befindet sich auf einer Drehachse zwischen zwei Molekülen der nicht-katalytischen Untereinheit QTRT2.

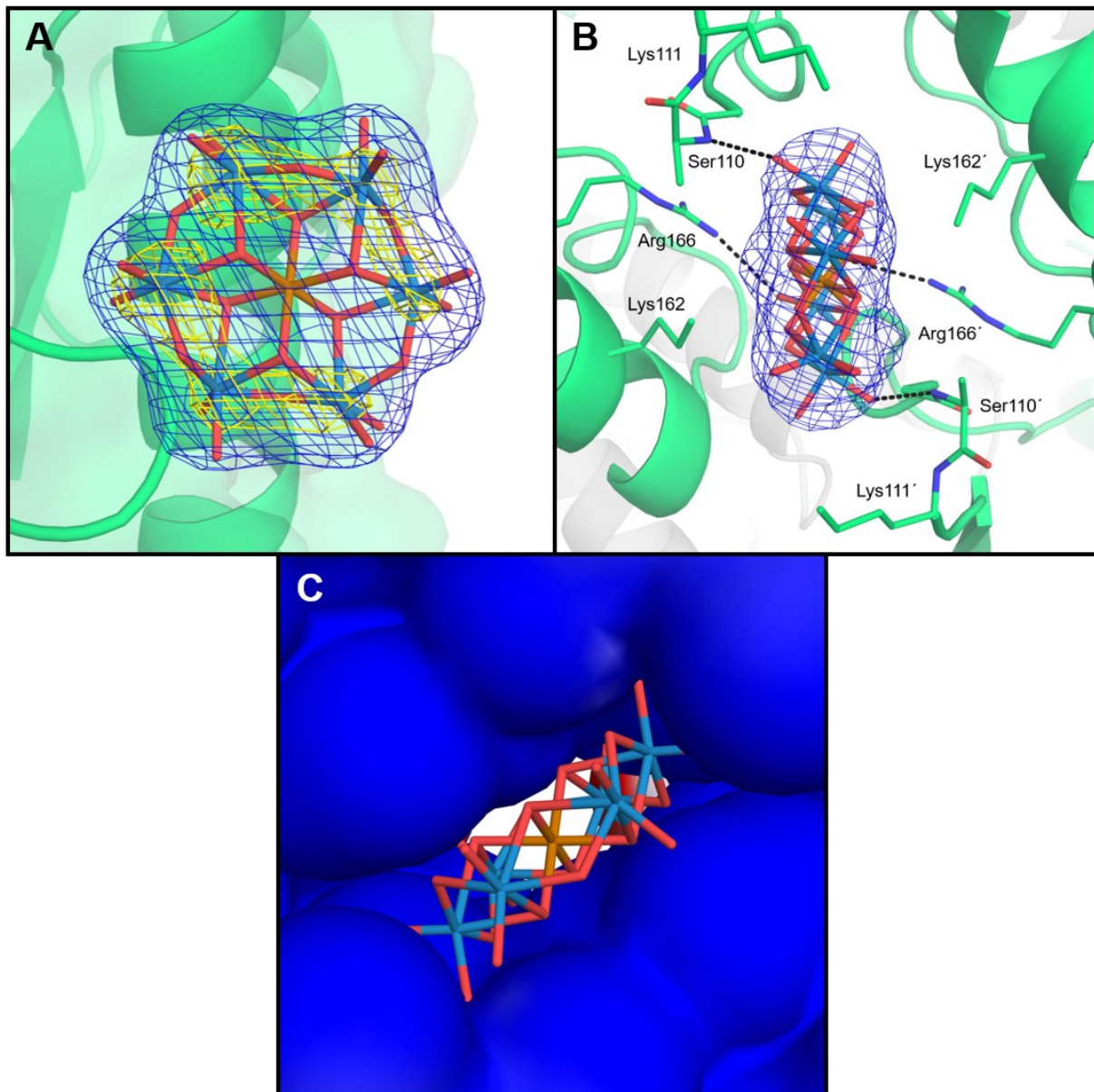


Abbildung 40: Stäbchendarstellung des Polyoxometallats TEW $[\text{TeW}_6\text{O}_{24}]^{6-}$ (Nr. 1), Te: ocker, W: türkis, O: rot. Cartoon-Darstellung der QTRT2 (grün) und Stäbchendarstellung der relevanten Aminosäuren (grün), O: rot, N: blau. **A:** Darstellung der Fo-Fc (3 σ , blau) und der anomalen Fo-Fc (8 σ , gelb) Elektronendichte vor dem Einbau. **B:** Darstellung der Interaktionen (Wasserstoffbrücken als schwarze gestrichelte Linien) zwischen Additiv und Protein. **C:** Mit Hilfe der Software APBS^[82] wurde das elektrostatische Oberflächenpotential des Proteins berechnet (positiv: blau, negativ: rot).

Sowohl die Differenzelektronendichte als auch die anomale Dichte weisen eine sechsfache Symmetrie auf, die sehr gut mit der Struktur des TEW-Moleküls übereinstimmt. Die Wolframatome liegen außerdem ziemlich genau in der Mitte der jeweiligen anomalen Dichte. Für das zentrale Telluratome konnte keine anomale Dichte beobachtet werden, was mit einem im Vergleich zu Wolfram geringen f'' -Wert von 2,82 e (12,52 e für Wolfram) bei der für die Messung verwendeten Wellenlänge von 0,918400 Å zu erklären ist.

Die sechs negativen Ladungen sind über die zwölf exozyklischen Sauerstoffe delokalisiert. Aufgrund der hohen negativen Gesamtladung bindet das Additiv erwartungsgemäß an einen Bereich, der eine hohe Dichte an basischen Aminosäuren aufweist. In diesem Fall liegt das TEW an einer besonderen Position, da direkt durch das Molekül eine Drehachse verläuft. So überlappt das TEW mit seinem eigenen Symmetrieäquivalent. Auch die umgebenden Aminosäuren entsprechen dem QTRT2-Molekül sowie dessen Symmetrieäquivalent.

Die exozyklischen Sauerstoffe des TEW-Moleküls bilden Wasserstoffbrücken mit den Seitenkettenstickstoffatomen der beiden Arg166 (3,2 Å) und den Amidstickstoffatomen der beiden Ser110 (3,0 Å). Die endständigen Stickstoffe von Lys111 und Lys162 konnten während des Verfeinerungsprozesses aufgrund zu geringer Elektronendichte nicht eingebaut werden, allerdings ist davon auszugehen, dass sie ebenfalls mit dem TEW-Molekül interagieren und Wasserstoffbrücken ausbilden. In diesem Fall würden sechs positiv geladene Reste mit dem Additiv wechselwirken, was die hohe Besetzung des TEW-Moleküls von nahezu 100 % (50 % pro asymmetrischer Einheit) erklärt.

Mit Hilfe des Programms APBS^[82] wurde das elektrostatische Potential der Oberfläche der Bindestelle berechnet (C in Abbildung 40). Anhand dieser Darstellung kann einerseits das hohe positive Potential, welches durch die basischen Aminosäuren an dieser Stelle verursacht wird, und andererseits die relativ große Kontaktfläche zwischen Additiv und Proteinoberfläche erkannt werden. Beide Aspekte unterstreichen ebenfalls, warum die Besetzung des Additivs hier so hoch ist.

Das zweite TEW-Molekül bindet ebenfalls an einer Kontaktstelle mehrerer asymmetrischer Einheiten. Die Differenzelektronendichte sowie die anomale Dichte stimmen sehr gut mit der Struktur des Additivs überein. Die Wolframatom besetzen wie im Fall des ersten TEW-Moleküls die lokalen Maxima der anomalen Dichte (Abbildung 41, A).

An der Bindung sind zwei Moleküle der QTRT2 sowie ein Molekül der QTRT1 beteiligt. Insbesondere Arg121 der QTRT2 interagiert sehr stark mit dem TEW. Über zwei Stickstoffatome der Seitenkette werden insgesamt drei Wasserstoffbrücken (2,9 Å, 3,0 Å, 3,1 Å) mit Sauerstoffen des Additivs ausgebildet. Außerdem bildet das TEW-Molekül Wasserstoffbrücken zu den Hauptkettenstickstoffatomen von Arg121 (2,4 Å) und Ile157 (3,5 Å) des benachbarten Symmetrieäquivalents der QTRT2 aus. Interaktionen können wie am Beispiel des Tyr107 (2,4 Å) gezeigt auch mit nicht-basischen Aminosäure-Seitenketten ausgebildet werden. Das QTRT1 Molekül koordiniert über das Lys241 (2,9 Å) an das Additiv.

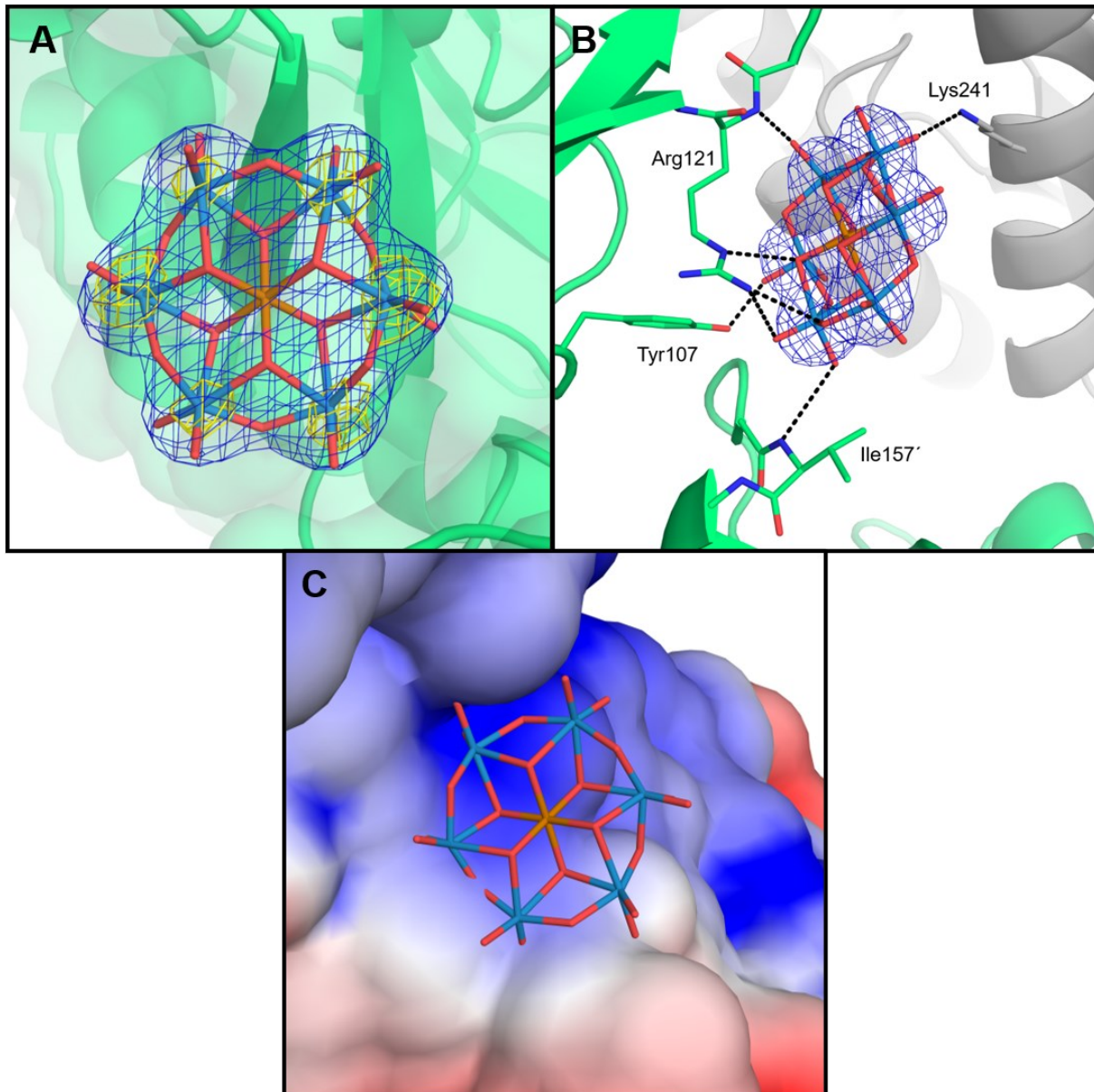


Abbildung 41: Stäbchendarstellung des Polyoxometallats TEW $[\text{TeW}_6\text{O}_{24}]^{6-}$ (Nr. 2), Te: ocker, W: türkis, O: rot. Cartoon-Darstellung der QTRT1 (grau), QTRT2 (grün) und Stäbchendarstellung der relevanten Aminosäuren, O: rot, N: blau. **A:** Darstellung der Fo-Fc (3 σ , blau) und der anomalen Fo-Fc (5 σ , gelb) Elektronendichte vor dem Einbau. **B:** Darstellung der Interaktionen (Wasserstoffbrücken als schwarze gestrichelte Linien) zwischen Additiv und Protein. **C:** Mit Hilfe der Software APBS^[82] wurde das elektrostatische Oberflächenpotential des Proteins berechnet (positiv: blau, negativ: rot).

Ein Vergleich des elektrostatischen Oberflächenpotentials der Bindestellen des zweiten und des ersten TEW-Moleküls zeigt, dass einerseits die Oberfläche des Proteins im Falle des zweiten TEW-Moleküls weniger stark positiv polarisiert ist und zum anderen ist die Kontaktfläche deutlich kleiner. Diese Aspekte erklären auch die im Vergleich zu TEW1 geringere Besetzung von TEW2 von 42 %.

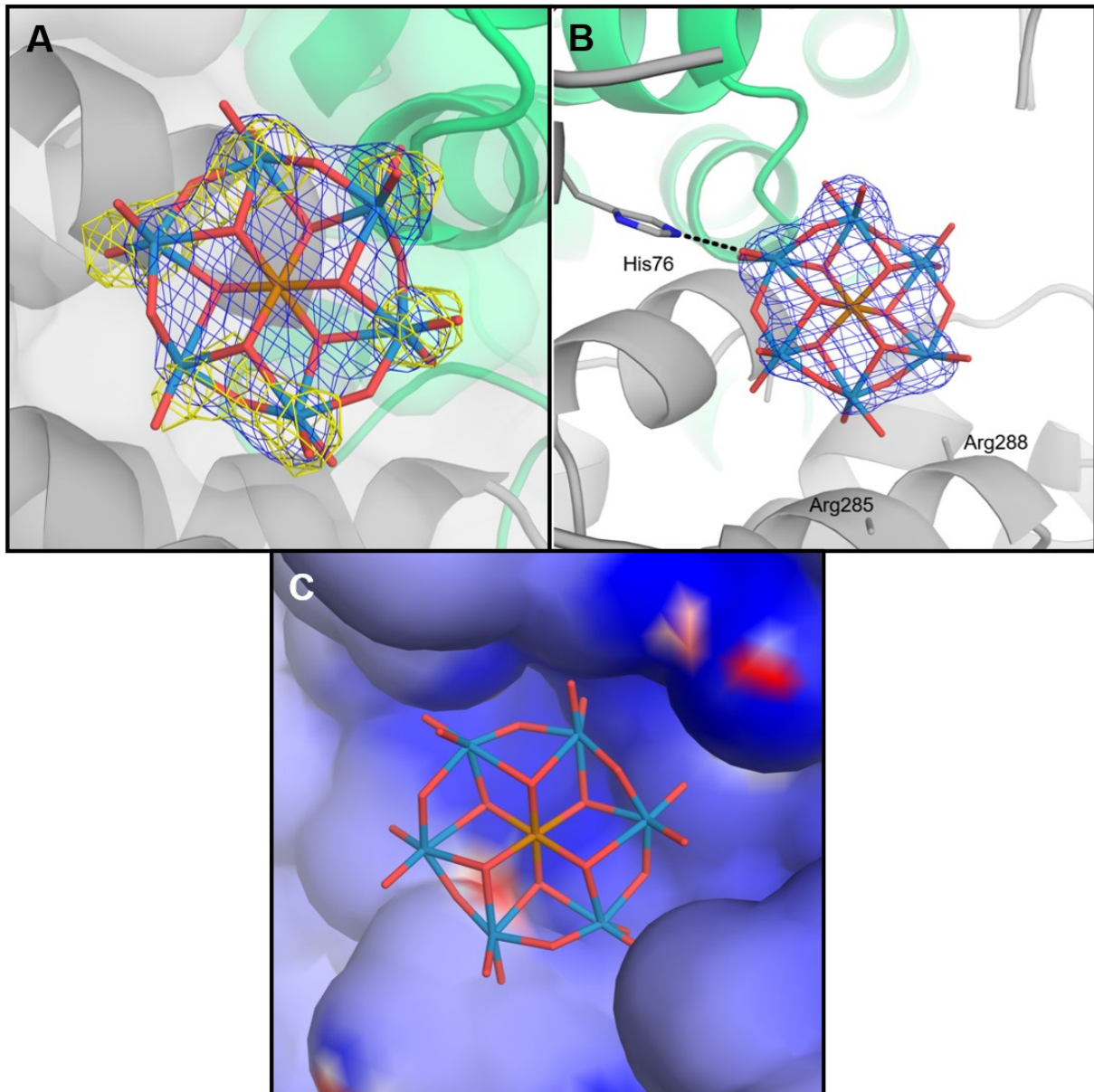


Abbildung 42: Stäbchendarstellung des Polyoxometallats TEW [TeW₆O₂₄]⁶⁻ (Nr. 3), Te: ocker, W: türkis, O: rot. Cartoon-Darstellung der QTRT1 (grau), QTRT2 (grün) und Stäbchendarstellung der relevanten Aminosäuren, O: rot, N: blau. **A:** Darstellung der Fo-Fc (3 σ , blau) und der anomalen Fo-Fc (3 σ , gelb) Elektronendichte vor dem Einbau. **B:** Darstellung der Interaktionen (Wasserstoffbrücken als schwarze gestrichelte Linien) zwischen Additiv und Protein. **C:** Mit Hilfe der Software APBS^[82] wurde das elektrostatische Oberflächenpotential des Proteins berechnet (positiv: blau, negativ: rot).

Die Dichte des dritten TEW-Moleküls ist in deutlich geringerem Maße ausgeprägt, allerdings lässt sich auch hier die sechsfache Symmetrie erkennen, die für das TEW typisch ist. TEW3 bindet im Vergleich zu den anderen TEW-Molekülen nicht an mehrere asymmetrische Einheiten und vermittelt daher keinen Protein-Protein-Kontakt. In der untersuchten Struktur wird lediglich eine Wasserstoffbrücke zum His76 der QTRT1 (2,5 Å) beobachtet. Die Seitenketten von Arg285 und Arg288 konnten nicht eingebaut werden, allerdings ist davon auszugehen, dass es zu einer Interaktion der beiden Arginine mit dem TEW3 kommt. Insgesamt

befinden sich nur wenige Reste in der Nähe des TEW3. Darüber hinaus ist die Kontaktfläche mit dem Protein sehr gering (Abbildung 42C). Daher ergibt sich eine geringe Besetzung von 24 % für TEW3.

Neben den drei beschriebenen TEW-Molekülen wurde noch eine weitere Struktur in der Elektronendichtekarte des untersuchten Datensatzes (**PDB 7OVS**) gefunden (Abbildung 43, B). Die betreffende Stelle befindet sich zwischen zwei Symmetrieäquivalenten der QTRT1. Betrachtet man die Anordnung der lokalen Maxima der anomalen Elektronendichte, fällt auf, dass diese eine fünffache Symmetrie aufweisen. Diese Anordnung der mutmaßlichen Wolframatomte lässt sich nicht mit der Struktur von TEW vereinbaren.

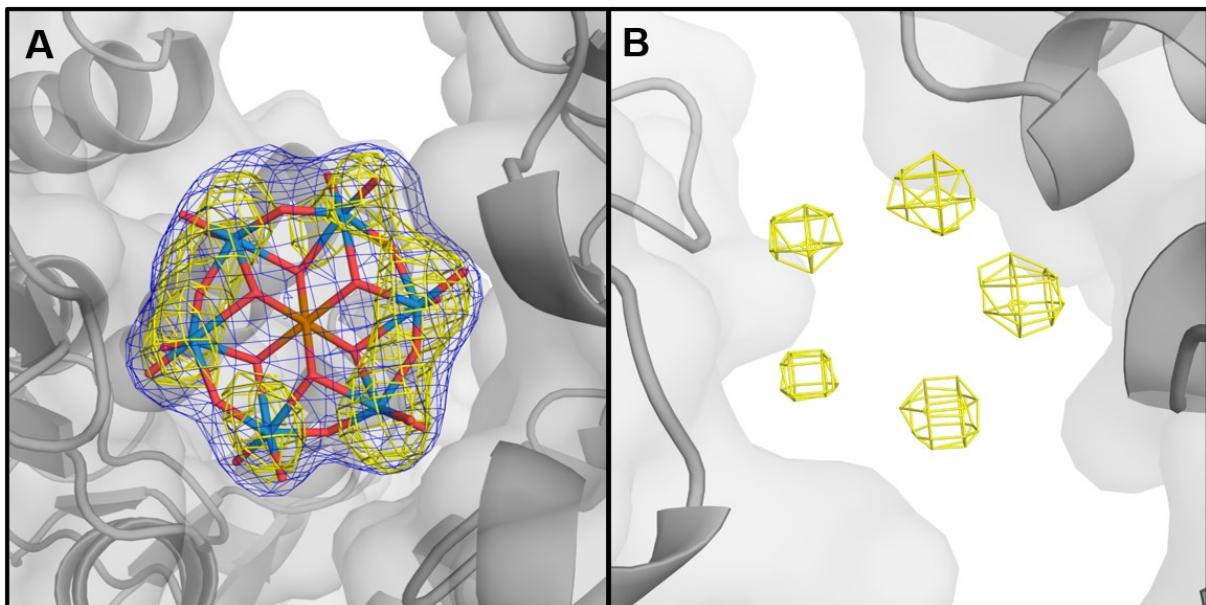


Abbildung 43: Stäbchendarstellung des Polyoxometallat TEW $[\text{TeW}_6\text{O}_{24}]^{6-}$, Te: ocker, W: türkis, O: rot. Cartoon-Darstellung der QTRT1 (grau). A: Darstellung der Fo-Fc (3 σ , blau) und der anomalen Fo-Fc (8 σ , gelb) Elektronendichte vor dem Einbau in Struktur mit der Kristallbedingung JBPenta H5. B: Darstellung der anomalen Fo-Fc (5 σ , gelb) Elektronendichte in Struktur mit der Kristallbedingung JCSG Core II E1.

Nach dem initialen MarXtal-Screen konnte wie in Kapitel 3.2 beschrieben ein Datensatz eines Kristalls mit der Kristallbedingung JBPenta H5 (100 mM MES pH 6,5, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 35 % w/v Pentaerythritolethoxylat (15/4 EO/OH), 1 mM TEW, 4 °C) erhalten werden. In dieser Struktur lässt sich an der gleichen Stelle allerdings eine für TEW typische Dichte mit sechsfacher Symmetrie beobachten (Abbildung 43, A). In der untersuchten Struktur (Abbildung 43, B) mit der Kristallbedingung JCSG Core II E1 (100 mM Natriumkaliumphosphat pH 6,8,

200 mM NaCl, 14 % w/v PEG 1000, 1 mM TEW) muss es sich also um eine alternative Spezies handeln. Bei der anschließenden Literaturrecherche wurden insbesondere Unterschiede der Zusammensetzung der beiden Kristallisationslösungen berücksichtigt. In einer Arbeit von Lin *et al.* wurde ein Polyoxowolframats beschrieben, welches die Suchanforderungen optimal erfüllt.^[83]

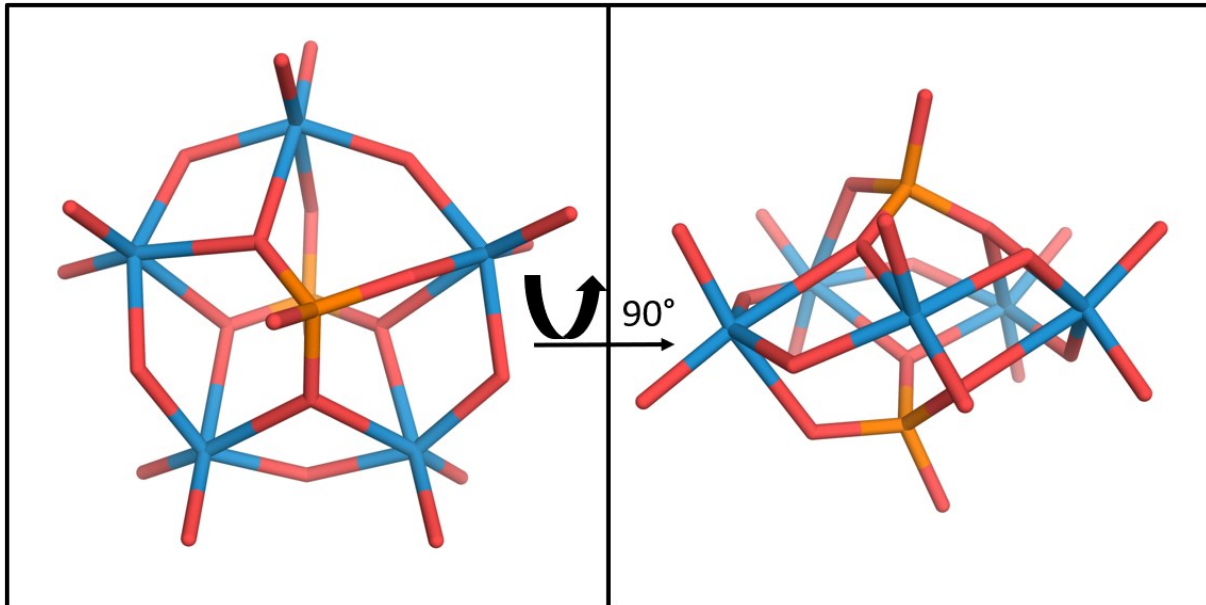


Abbildung 44: Stäbchendarstellung des Polyoxowolframats (POW) $[P_2W_5O_{23}]^{6-}$, P: ocker, W: türkis, O: rot. Die Abbildung auf der rechten Seite zeigt das POW-Molekül um 90° gedreht.^[83]

Im Vergleich zu dem Anderson-Evans-Typ Polyoxometallat TEW weist das Polyoxowolframats (POW) eine Struktur nach Strandberg auf. Dabei liegen die fünf Wolframatomatome näherungsweise in einer Ebene, während die beiden Phosphatgruppen ober- bzw. unterhalb der Ringebene angeordnet sind. Insbesondere die Anwesenheit der beiden Phosphatgruppen ist eine sinnvolle Erklärung, warum diese Struktur nur in der Kristallbedingung mit Phosphat zu beobachten ist.

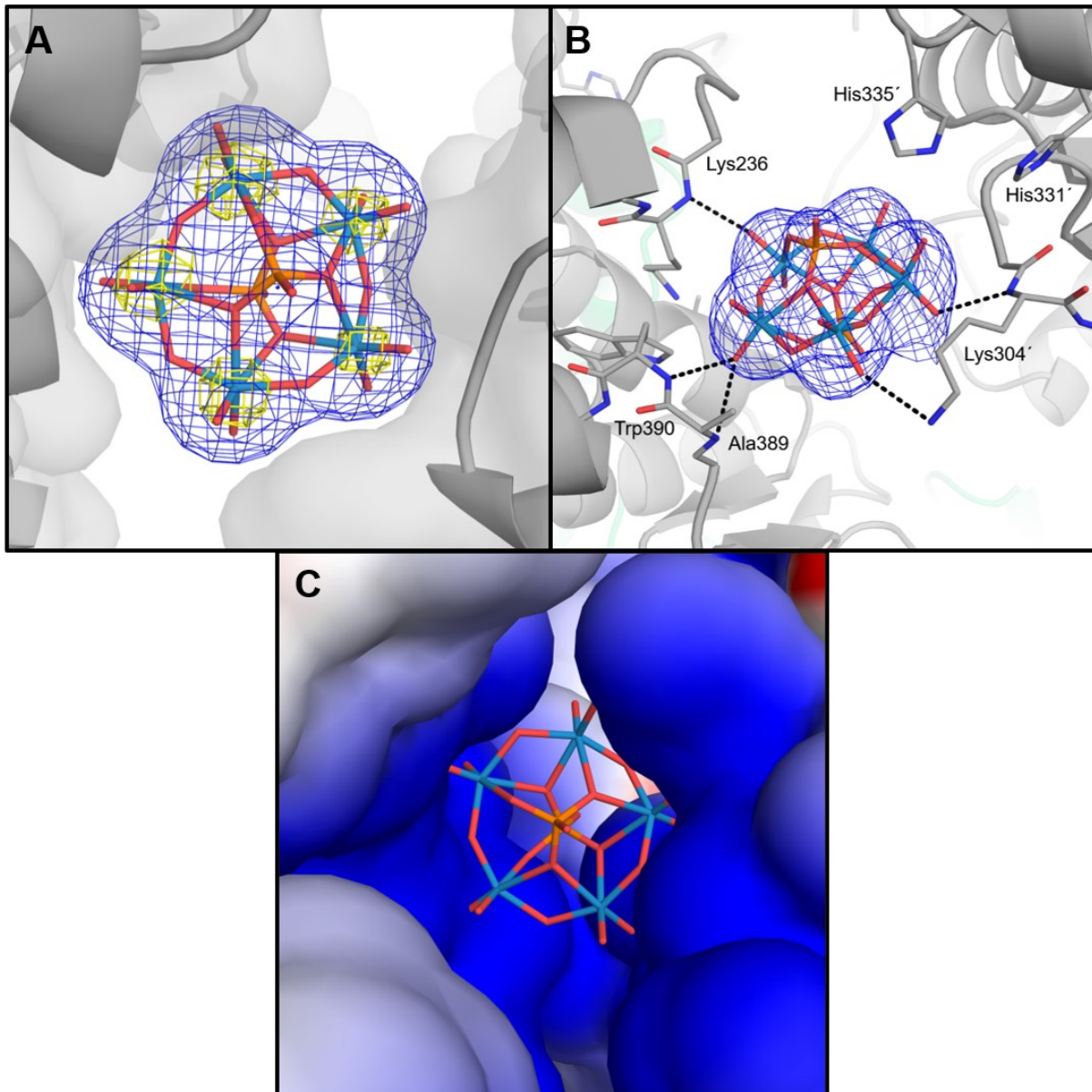


Abbildung 45: Stäbchendarstellung des Polyoxowolframats (POW) $[P_2W_5O_{23}]^{6-}$, P: ocker, W: türkis, O: rot. Cartoon-Darstellung der QTRT1 (grau) und Stäbchendarstellung der relevanten Aminosäuren (grau), O: rot, N: blau. **A:** Darstellung der Fo-Fc (3 σ , blau) und der anomalen Fo-Fc (8 σ , gelb) Elektronendichte vor dem Einbau. **B:** Darstellung der Interaktionen (Wasserstoffbrücken als schwarze gestrichelte Linien) zwischen Additiv und Protein. **C:** Mit Hilfe der Software APBS^[82] wurde das elektrostatische Oberflächenpotential des Proteins berechnet (positiv: blau, negativ: rot).

Die postulierte Struktur des POW lässt sich perfekt in die Differenzelektronendichte einpassen. Auch die Wolframatombelegungen besetzen zentral die lokalen Maxima der anomalen Dichtekarte. Zudem lässt sich für die beiden Phosphatgruppen eindeutig oberhalb und unterhalb der Ringebene zugehörige Elektronendichte feststellen. In der angenommenen Struktur ist kein zentrales Telluratom mehr vorhanden. Dies kann allerdings anhand der anomalen Dichte nicht

bewiesen werden, da das Telluratom aufgrund des niedrigen f'' -Werts bei der verwendeten Wellenlänge auch im Falle der drei TEW-Moleküle nicht nachgewiesen werden konnte.

Das POW bildet über seine exozyklischen Sauerstoffatome Wasserstoffbrückenbindungen mit amidischen Stickstoffatomen der Hauptkette von Lys236 (2,7 Å), Ala389 (3,2 Å) und Trp390 (2,9 Å) der einen asymmetrischen Einheit und Lys304 (2,8 Å) der anderen asymmetrischen Einheit aus. Eine Wasserstoffbrücke besteht auch zu der Seitenkette von Lys304 (3,1 Å). Zudem befinden sich noch die basischen Seitenketten von Lys236, His331 und His335 in unmittelbarer Nähe zu dem POW-Molekül und begünstigen so die Bindung der mehrfach negativ geladenen Spezies.

Um das Vorhandensein des POW-Moleküls in Anwesenheit von Phosphatsalzen nachzuweisen, wurden massenspektrometrische Versuche unternommen. Allerdings konnte im Rahmen dieser Versuche die entsprechende Molekülmasse nicht gefunden werden. Außerdem stellt sich die Frage, warum die POW-Spezies nur an einer Stelle in der asymmetrischen Einheit auftritt. Es besteht vermutlich ein Gleichgewicht der Anderson-Evans-Form mit sechsfacher Symmetrie und der Strandberg-Form mit fünf Wolframatomen. Aufgrund des geringen Abstands der beiden QTRT1-Moleküle zueinander ist die POW-Spezies als kleinere der beiden Formen sterisch begünstigt. Berücksichtigt man die Darstellung des elektrostatischen Oberflächenpotentials (Abbildung 45, C) wird deutlich, wie schmal der Spalt zwischen den beiden QTRT1-Molekülen ist, was die sterische Begünstigung des POW gegenüber TEW unterstreicht. Damit ist auch erklärt, warum die POW-Spezies nicht im Rahmen von massenspektrometrischen Methoden nachgewiesen werden kann, da diese nur *in situ* in der entsprechenden Proteinumgebung gebildet wird.

3.5. Enzymkinetische Charakterisierung der eukaryotischen TGT

3.5.1. Etablierung der Versuchsbedingungen

Grundsätzlich ist zur Bestimmung kinetischer Parameter der bakteriellen und eukaryotischen TGT in der Arbeitsgruppe ein Radioaktivassay etabliert und ausführlich beschrieben.^[84,85] Im Rahmen des Assays wird Tritium-markiertes Guanin ([8-³H]-Guanin) in Position 34 der tRNA eingebaut, wobei nicht-markiertes Guanin in einer reversiblen Reaktion ausgebaut wird. Zur Bestimmung der Einbaurrate wird zu definierten Entnahmezeitpunkten eine Probe des Reaktionsansatzes entnommen, auf ein Filterpapier pipettiert und die enthaltene tRNA durch TCA darauf ausgefällt. Anschließend wird das überschüssige radioaktive Guanin mittels TCA-Lösung und Ethanol entfernt. Nach Trocknung des Filterpapiers erfolgt die Auswertung mittels Scintillationszählers. Bei dem Versuch, die in Kapitel 5.16.4 beschriebene Methode zu reproduzieren, konnten allerdings keine linearen Zeit-Umsatz-Geraden erzielt werden. Die ermittelte Radioaktivität der Proben variierte anscheinend willkürlich. Sogar bei einer Blindprobe, welche kein aktives Enzym enthielt, wurden vergleichsweise hohe Werte für die Radioaktivität gemessen. Das bedeutet, dass das Tritium-markierte Guanin, welches nicht in die tRNA eingebaut wurde, nicht vollständig aus dem Filterpapier gewaschen werden konnte.

Zunächst wurden unterschiedliche Glasfaserfilter von verschiedenen Herstellern verwendet. Diese Maßnahme führte allerdings nicht zu einer Eliminierung des Fehlerbildes. Als nächstes wurde die Waschmethode angepasst. Anstatt die Filterpapiere in einer Teflon-Halterung zu waschen, welche unter Rühren in ein Becherglas gestellt wurde, wurden die Filter auf eine Glasfritte mit passendem Durchmesser gelegt und bei angelegtem Unterdruck mit der TCA-Lösung und Ethanol gespült. Aber auch diese Maßnahme konnte das Fehlerbild nur geringfügig verbessern.

Zu Beginn wurde die tRNA ausgehend von der linearisierten DNA mit Hilfe des T7 RiboMAX™ *Express Large Scale RNA Production System* der Firma Promega nach dem Protokoll von Curnow *et al.* hergestellt.^[86] Alternativ hierzu wurde die tRNA nach der Methode von R. Hartmann *et al.* hergestellt (siehe Kapitel 5.16.2).^[87] Der wesentliche Unterschied dieser Varianten ist die Verwendung der denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Diese Variante stellt sicher, dass keine Verunreinigungen zurückbleiben, die das Abwaschen des Guanins von den Glasfaserfiltern stören und ist zudem kostengünstiger.

Außerdem wurde eine andere Charge des Tritium-markierten Guanins verwendet. Anstelle von Hartmann Analytic wurde die Verbindung direkt über American Radiolabeled Chemicals (ARC) bestellt.

Nach diesen Anpassungen konnte der Assay störungsfrei durchgeführt und präzise Zeitumsatzkurven ermittelt werden. Die allgemeine Durchführung ist in Kapitel 5.16.4 beschrieben.

3.5.2. Enzymkinetische Charakterisierung des TGT-Heterodimers

Da das TGT-Heterodimer im Rahmen dieser Arbeit durch Koexpression des *QTRT1*- und des *QTRT2*-Gens erzeugt wurde und nicht wie in vorangegangenen Arbeiten aus den separat gereinigten Untereinheiten erhalten wurde, schien eine erneute Ermittlung der kinetischen Parameter angebracht. Dazu wurden Michaelis-Menten-Diagramme aus den entsprechenden Zeitumsatzkurven erzeugt, indem die durch Doppelbestimmung erhaltenen Initialgeschwindigkeiten gegen die Substratkonzentration aufgetragen wurden. Die resultierenden Werte für K_m und k_{cat} sind in Tabelle 5. aufgeführt.

Tabelle 5: K_m - und k_{cat} -Werte aller Substrate, die im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert wurden. *: Indirekte Bestimmung der K_m -Werte durch die Hemmung des Einbaus von $[8-^3\text{H}]$ -Guanin. Die Berechnung der K_m -Werte erfolgt analog zu der Berechnung der K_i -Werte bei kompetitiven Inhibitoren. #: Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit durch den Ausbau von $[8-^3\text{H}]$ -Guanin aus markierter tRNA.

	tRNA ^{Tyr}	Guanin	Queuin	preQ ₁	preQ ₀	ent-Queuin
K_m [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	0,44 ± 0,08	0,40 ± 0,03	0,33 ± 0,02*	17 ± 1*	0,14 ± 0,07*	> 100*
k_{cat} ($\times 10^{-3}$) [s^{-1}]	6,5 ± 0,3	6,0 ± 0,1	12,1 ± 1,0 [#]	7.8 ± 0,4 [#]	4,9 ± 0,5 [#]	< 0,2

	Hypoxanthin	NPPDAG	H ₂ -Queuin	6-Thioguanin	8-Azaguanin
K_m [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	> 100*	10 ± 0,3*	8,6 ± 0,4*	8,0 ± 0,3*	0,99 ± 0,04*
k_{cat} ($\times 10^{-3}$) [s^{-1}]	< 0,2	3,7 ± 0,3 [#]	4,2 ± 0,5 [#]	< 0,2	6,3 ± 0,6 [#]

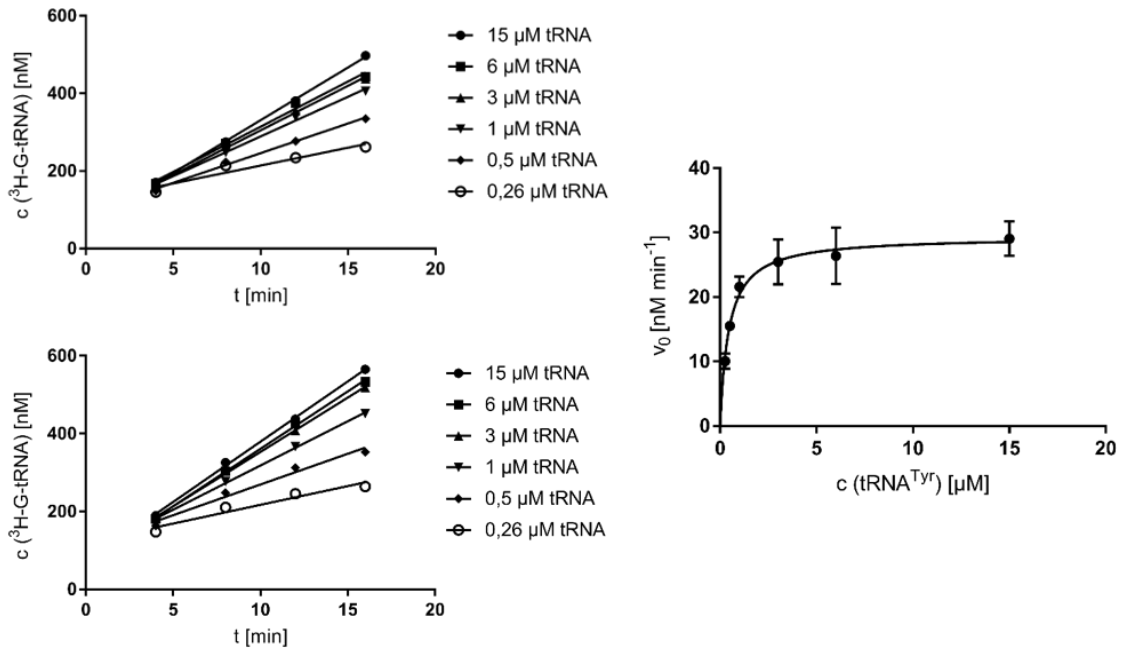


Abbildung 46: Enzymkinetische Bestimmung der tRNA^{Tyr}-Affinität. Links: Zeitumsatzkurven des QTRT1/2-Heterodimers bei unterschiedlicher tRNA^{Tyr}-Konzentration. Es wurde der zeitabhängige Einbau von [8-³H]-Guanin gemessen. Rechts: Aus den ermittelten Initialgeschwindigkeiten wurde ein Michaelis-Menten-Diagramm erstellt, welches zur Bestimmung von $v_{\max}(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$ und $K_m(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$ genutzt wurde.

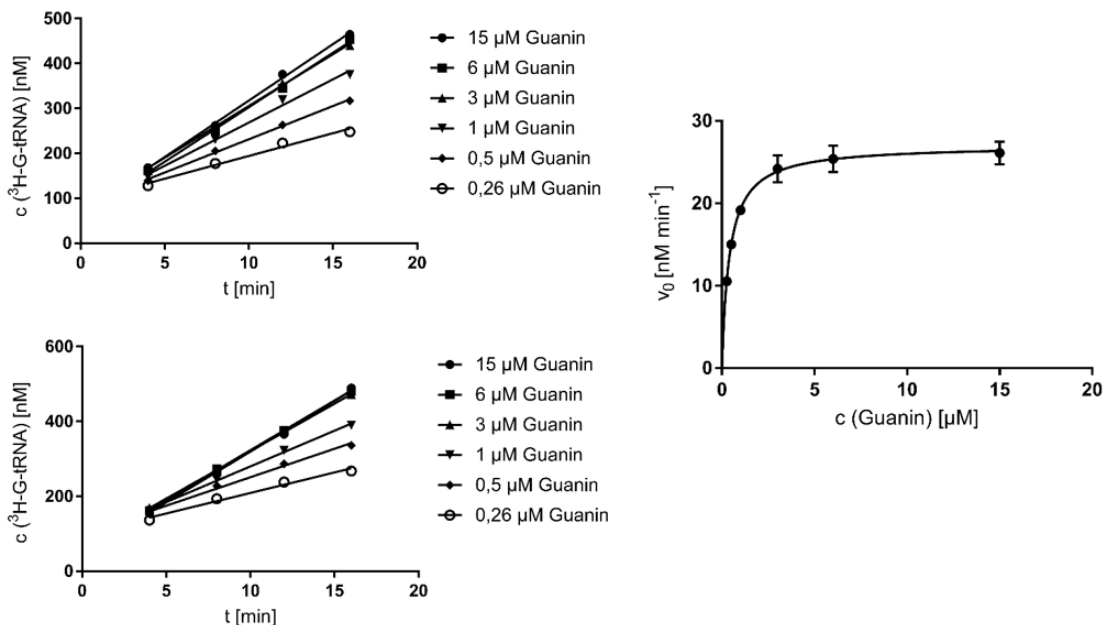


Abbildung 47: Enzymkinetische Bestimmung der Guanin-Affinität. Links: Zeitumsatzkurven des QTRT1/2-Heterodimers bei unterschiedlicher Guanin-Konzentration. Es wurde der zeitabhängige Einbau von [8-³H]-Guanin gemessen. Rechts: Aus den ermittelten Initialgeschwindigkeiten wurde ein Michaelis-Menten-Diagramm erstellt, welches zur Bestimmung von $v_{\max}(\text{Guanin})$ und $K_m(\text{Guanin})$ genutzt wurde.

Zunächst wurden die k_{cat} -Werte des koexprimierten TGT-Heterodimers und des aus beiden Untereinheiten erzeugten Dimers verglichen. Dazu wurden die experimentellen Daten aus der Arbeit von I. Biela herangezogen.^[57] Der k_{cat} -Wert des koexprimierten Heterodimers von Guanin ist um etwa 40 % erhöht (k_{cat} -Werte im Rahmen dieser Arbeit, siehe Tabelle 5). Interessanterweise konnte für die Umsatzgeschwindigkeit des koexprimierten Heterodimers von tRNA^{Tyr} keine erhöhten Werte festgestellt werden. Die Referenzwerte für k_{cat} (tRNA^{Tyr}) und k_{cat} (Guanin) innerhalb der Arbeit von I. Biela unterscheiden sich allerdings signifikant.^[57] Dies ist aufgrund der Reaktionsabfolge (siehe Kapitel 3.5.3) in dieser Form nicht zu erwarten. Analog zu der Arbeit von Garcia *et al.*^[31] konnte durch die gemeinsame Expression und Reinigung der Untereinheiten vermutlich ein erhöhter Anteil des aktiven Enzyms erhalten werden. Dies lässt sich allerdings aufgrund der erhöhten Messungengenauigkeit der Referenzwerte nicht mit Bestimmtheit sagen. Die Identifizierung von mehreren Initialbedingungen im Rahmen der Kristallisationsversuche (siehe Kapitel 3.2) deutet zumindest zusätzlich auf ein homogenes Faltungsprofil des Enzyms hin.

Die ermittelten K_{m} -Werte für Guanin und der tRNA^{Tyr} sind signifikant niedriger als die von I. Biela ermittelten Werte.^[57] Ein möglicher Grund ist, dass in dieser Arbeit mit 75 nM statt 150 nM eine niedrigere Enzymkonzentration gewählt wurde. Damit ist gewährleistet, dass die jeweils niedrigste Substratkonzentration etwa 3,5-mal höher ist als die Enzymkonzentration. Ein deutlicher Substratüberschuss ist notwendig, da sonst die Konzentration des Substrats in Lösung durch die Bindung an das Enzym zu stark sinkt.

Darüber hinaus sollten im Rahmen dieser Arbeit noch einige weitere Substrate (siehe Abbildung 48) kinetisch charakterisiert werden, für die allerdings größtenteils keine Tritium-markierten Derivate kommerziell erhältlich waren. Aus diesem Grund musste eine alternative Methode gefunden werden, um die maximale Reaktionsgeschwindigkeit sowie die Affinität dieser Substrate zur Maus-TGT zu bestimmen.

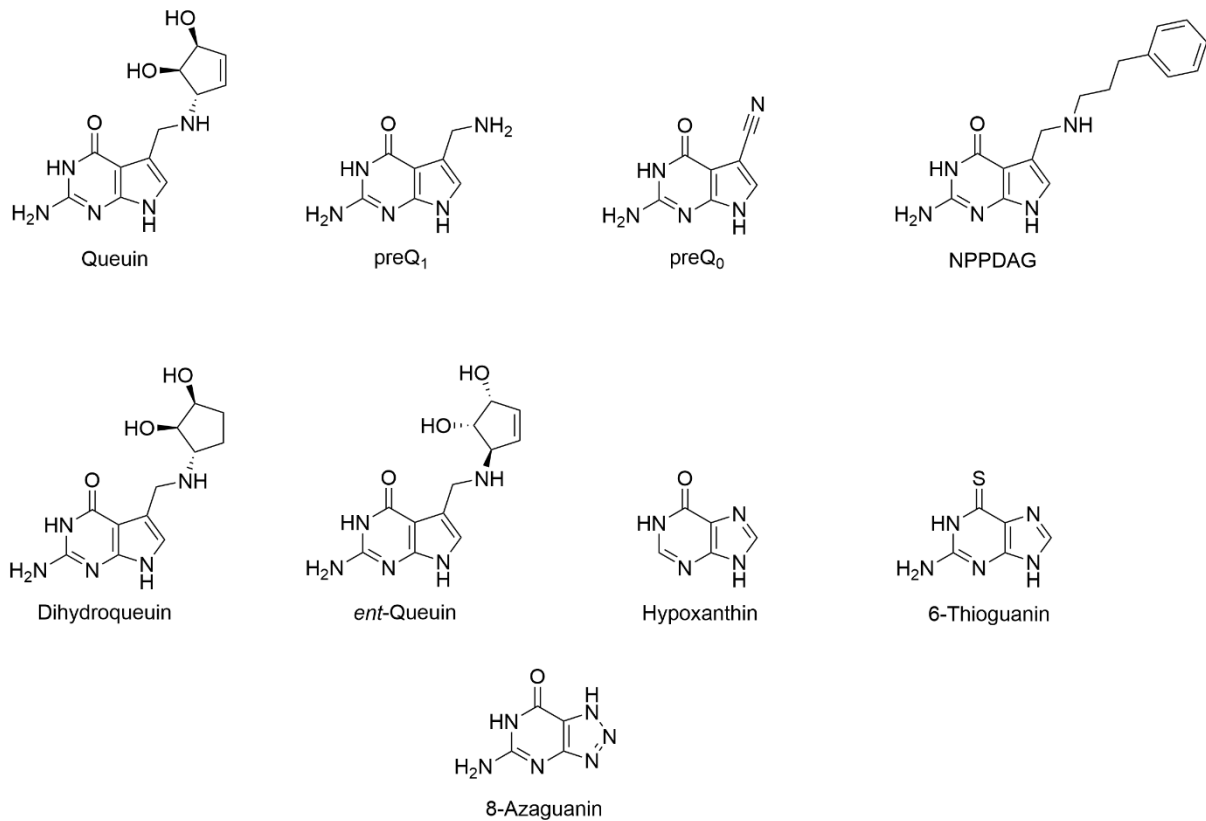


Abbildung 48: Strukturformeln der Substrate, die neben Guanin und tRNA^{Tyr} im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert wurden.

Daher wurde zur Bestimmung der k_{cat} -Werte der *washout*-Assay^[24] verwendet, welcher in dieser Form zuerst von Hoops *et al.* beschrieben wurde. Bei dieser Methode kann die Reaktionsgeschwindigkeit durch den Austausch von [³H]-Guanin an der Position 34 der tRNA^{Tyr} (Herstellung in Kapitel 5.16 beschrieben) durch das entsprechende nicht radioaktiv markierte Substrat gemessen werden. Dazu wird zunächst radioaktiv markiertes Guanin an Position 34 eingebracht und anschließend durch Inkubation mit Substraten wieder entfernt. Zur Überprüfung der Genauigkeit dieser Methode wurde die Maximalgeschwindigkeit anhand von nicht radioaktiv markiertem Guanin gemessen. Die dabei ermittelte Maximalgeschwindigkeit ist bei einem k_{cat} -Wert von $6,3 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ mit der zuvor beschriebenen Methode praktisch identisch, wodurch die Aussagekraft dieser Methode sichergestellt war.

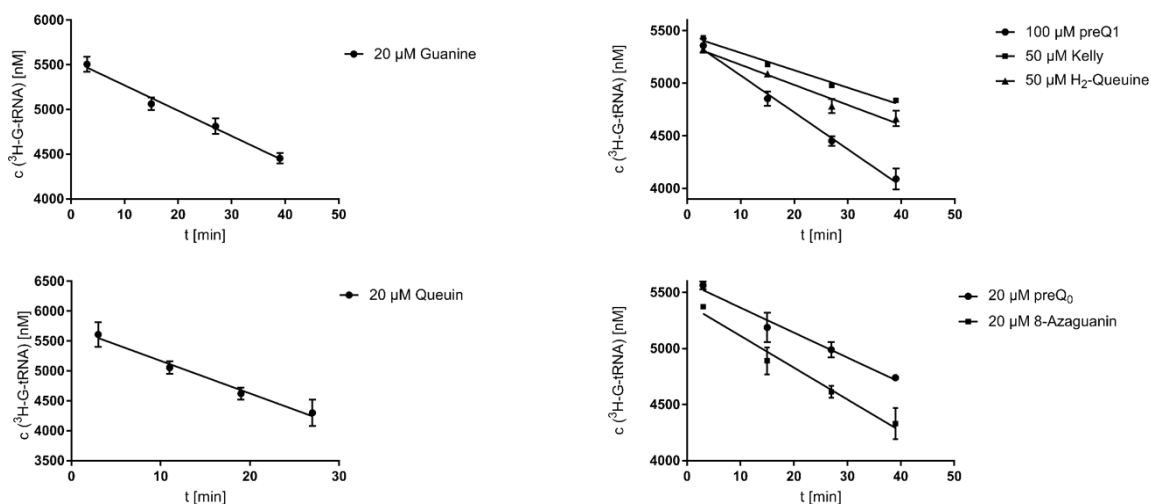


Abbildung 49: Gemittelte Zeitumsatzkurven verschiedener Substrate im Rahmen des *washout*-Assays. Aus der Änderung des $[8\text{-}^3\text{H}]$ -Guanin-Anteils in der tRNA^{Tyr} wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit berechnet. Das Substrat „Kelly“ entspricht dabei der Verbindung NPPDAG aus der Arbeit von Kelly *et al.*^[51]

Um die Affinität dieser Substrate zu bestimmen, wurde der Einbau von $[8\text{-}^3\text{H}]$ -Guanin in die tRNA^{Tyr} bei unterschiedlichen Substrat-Konzentrationen gemessen. Die verwendeten Substrate konkurrieren mit Guanin um die Bindung an das aktive Zentrum des $\text{TGT}\cdot\text{tRNA}^{\text{Tyr}}$ -Intermediats. Zwar kommt es im Vergleich zu klassischen kompetitiven Inhibitoren zu einem Umsatz und damit zum Verbrauch der jeweiligen Substrate, allerdings bleibt die Substratkonzentration durch die geringe Wechselzahl in Verbindung mit der zur Ermittlung der Initialgeschwindigkeit geringen Reaktionszeit nahezu konstant. Die Berechnung der K_m -Werte erfolgte dabei analog zu der Berechnung der K_i -Werte der in Kapitel 3.5.5 beschriebenen Inhibitoren. Die Diagramme zur Bestimmung des K_m -Werts für preQ₁ sind beispielhaft in Abbildung 50 dargestellt. Auch hier wurde die Eignung der Methode überprüft, indem der K_i -Wert für nicht-radioaktiv markiertes Guanin mit $0,68\ \mu\text{M}$ ermittelt wurde. Innerhalb der Fehlertoleranz unterscheidet er sich nicht signifikant von dem K_m -Wert für Guanin von $0,40\ \mu\text{M}$, der nach der Michaelis-Menten Methode ermittelt wurde.

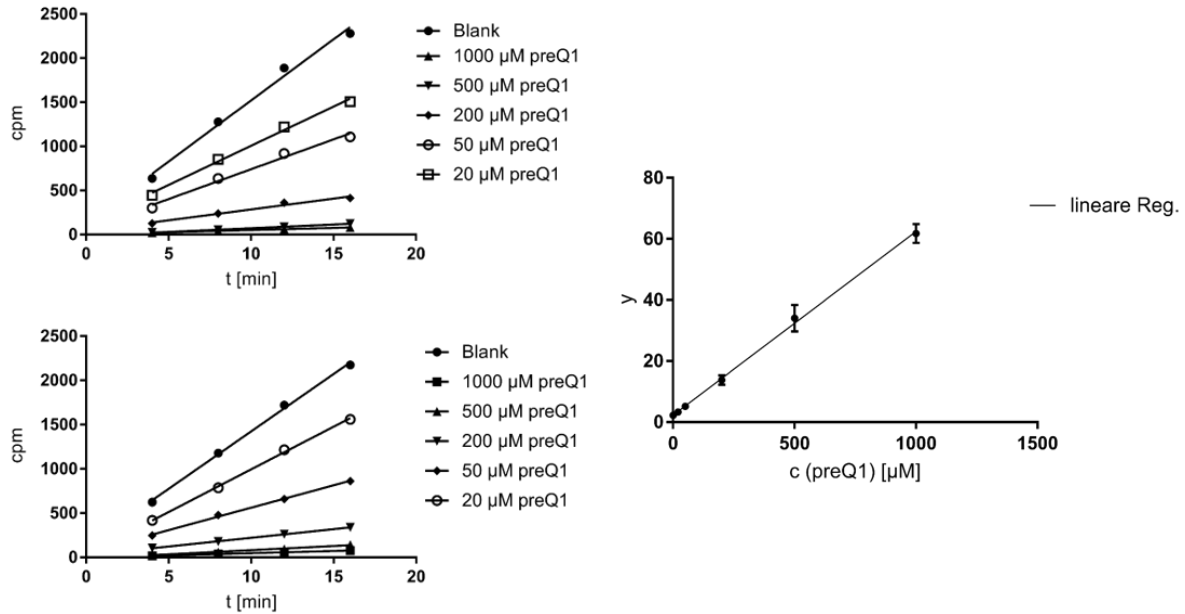


Abbildung 50: Enzymkinetische Bestimmung der preQ₁-Affinität. Links: Zeitumsatzkurven des QTRT1/2-Heterodimers bei unterschiedlicher preQ₁-Konzentration und gleichbleibender Guanin-Konzentration. Es wurde der zeitabhängige Einbau von $[8-^3\text{H}]$ -Guanin gemessen. Rechts: Sekundärdiagramm zur Bestimmung des K_i -Werts. Die Ordinate entspricht dabei den jeweiligen Werten, die anhand der Formel 3 (siehe Kapitel 5.16.6) berechnet wurden. Der K_i -Wert entspricht dabei dem Kehrwert der Steigung der Geraden.

Der ermittelte K_m -Wert für Queuin ist analog zu den Arbeiten von Chen *et al.*^[18] und Inna Biela^[57] niedriger als der von Guanin. Die Umsatzrate von Queuin ist dabei etwa doppelt so hoch wie die von Guanin, was ähnlich auch von Chen *et al.* gemessen wurde. Diese Beobachtung erscheint nachvollziehbar, da Queuin bekanntermaßen das natürliche Substrat der eukaryotischen TGT ist.^[69] Es wurden außerdem zwei Queuin-Derivate, *ent*-Queuin und Dihydroqueuin, untersucht. Für das Enantiomer des Queuins konnte im Rahmen der Messgenauigkeit keine Aktivität festgestellt werden. Durch die Hydrierung des Cyclopentenrings wird die Affinität des Dihydroqueuins um mehr als eine Größenordnung vermindert. Die Umsatzrate von Queuin ist im Vergleich zu dieser Variante um das Dreifache höher.

Die K_m -Werte von preQ₁ gegenüber der eukaryotischen TGT werden in der Literatur je nach Spezies sehr unterschiedlich angegeben. So beträgt dieser bei der humanen TGT 132 μM , während die Werte mit 2,1 μM bei dem Enzym aus Rattenleberzellen und 5,1 μM bei der Maus-TGT deutlich niedriger liegen.^[18,57,69] Im Rahmen dieser Arbeit wurde der K_m -Wert von preQ₁ gegenüber der Maus-TGT mit 17 μM bestimmt. Damit ist die beobachtete Affinität von Queuin in dieser Arbeit um etwa zwei Größenordnungen größer als die von preQ₁.

Die Substrate preQ₀ und 8-Azaguanin zeigen analog zu der Arbeit von Shindo-Okada^[69] *et al.* eine mit Queuin vergleichbar hohe Umsatzrate. Bei der Base preQ₀ konnte sogar eine im Vergleich zu Queuin signifikant höhere Affinität beobachtet werden.

Für Hypoxanthin konnte im Rahmen der Messgenauigkeit keine Aktivität nachgewiesen werden. Auch in der eben erwähnten Studie konnte gegenüber Queuin nur ein um den Faktor 30 verminderter k_{cat} -Wert ermittelt werden.^[69]

Im Gegensatz zu Shindo-Okada^[69] *et al.* konnte für 6-Thioguanin praktisch keine Aktivität festgestellt werden. Die Gründe dafür sind völlig unklar, auch wenn *E. coli* tRNA^{Tyr} anstelle der Gesamt-tRNA aus Hefe sowie die Maus-TGT anstatt des Enzyms aus Rattenlebern eingesetzt worden waren.

Varghese^[51] *et al.* berichteten in ihrer Arbeit von 2017, dass das preQ₁-Derivat NPPDAG eine TGT-abhängige antiproliferative Wirkung auf T-Zellen hat, weshalb es als potentieller Wirkstoffkandidat zur Behandlung von Multipler Sklerose gilt. Daher wurde diese Verbindung im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls charakterisiert. Sowohl die Affinität als auch die Umsatzrate von NPPDAG sind mit denen von preQ₁ vergleichbar (Tabelle 5).

3.5.3. Reaktionsmechanismus der eukaryotischen TGT

Im Jahr 2020 publizierten Alqasem *et al.* anhand experimenteller Daten, dass die Reaktion der eukaryotischen TGT nach einem *bi-bi*-Mechanismus abläuft. Dabei soll zunächst Queuin in das aktive Zentrum binden, gefolgt von der tRNA. Nach dem Basenaustausch soll das aus der tRNA entfernte Guanin vor dem tRNA-Q₃₄ Produkt aus dem aktiven Zentrum heraus diffundieren. Anhand der Kristallstruktur der eukaryotischen TGT, die in dieser Arbeit beschrieben wurde, und auch anhand der Struktur der humanen TGT in Komplex mit einem RNA-Fragment^[79] lässt sich eindeutig nachvollziehen, dass die Bindung der tRNA in ein bereits durch Queuin besetztes aktives Zentrum nicht möglich ist. Der Grund dafür ist, dass Queuin und das Guanin₃₄ der tRNA in die gleiche Bindetasche des aktiven Zentrums binden. Queuin würde die Bindung der tRNA somit blockieren. Deshalb ist ein *bi-bi*-Mechanismus, wie er durch Alqasem *et al.* beschrieben wurde, ausgeschlossen. Stattdessen muss zunächst durch die Bildung eines kovalenten TGT-tRNA-Komplexes das Guanin freigesetzt werden, um genug Platz für die anschließende

Bindung des Queuin zu schaffen. Folglich muss es sich um einen *ping-pong*-Mechanismus handeln.

Der Reaktionsmechanismus der eukaryotischen TGT kann durch die Kombination der kristallographischen Daten dieser Arbeit und den bisherigen Erkenntnissen bezüglich der bakteriellen TGT^[21] abgeleitet werden. Wie bereits beschrieben beginnt die Reaktionssequenz mit dem nukleophilen Angriff der Carboxylgruppe des Asp279 an das C1-Atom des Guanosin-Zuckers. Unter Ausbildung des kovalenten TGT-tRNA-Komplexes wird die glykosidische Bindung gespalten. Das so erhaltene Intermediat wurde im Rahmen von mehreren Arbeiten zweifellos nachgewiesen.^[27,79] Als Resultat der SN2-Reaktion entsteht eine negative Ladung, welche über das π -System auf das N7- und das N9-Atom des Guanins delokalisiert ist. Durch die räumliche Nähe der negativ geladenen Seitenkette von Asp105 überwiegt der negative Ladungscharakter an N7. Das macht es dem Stickstoff möglich, ein Proton von einem nahe gelegenen Wassermolekül zu akzeptieren. Das so entstandene Hydroxidion wird durch die Hauptkettenamide von Leu230 und Ser231 stabilisiert. Ein entsprechendes Wassermolekül ist an der äquivalenten Stelle im bakteriellen Enzym im Komplex mit Guanin deutlich zu erkennen.^[79]

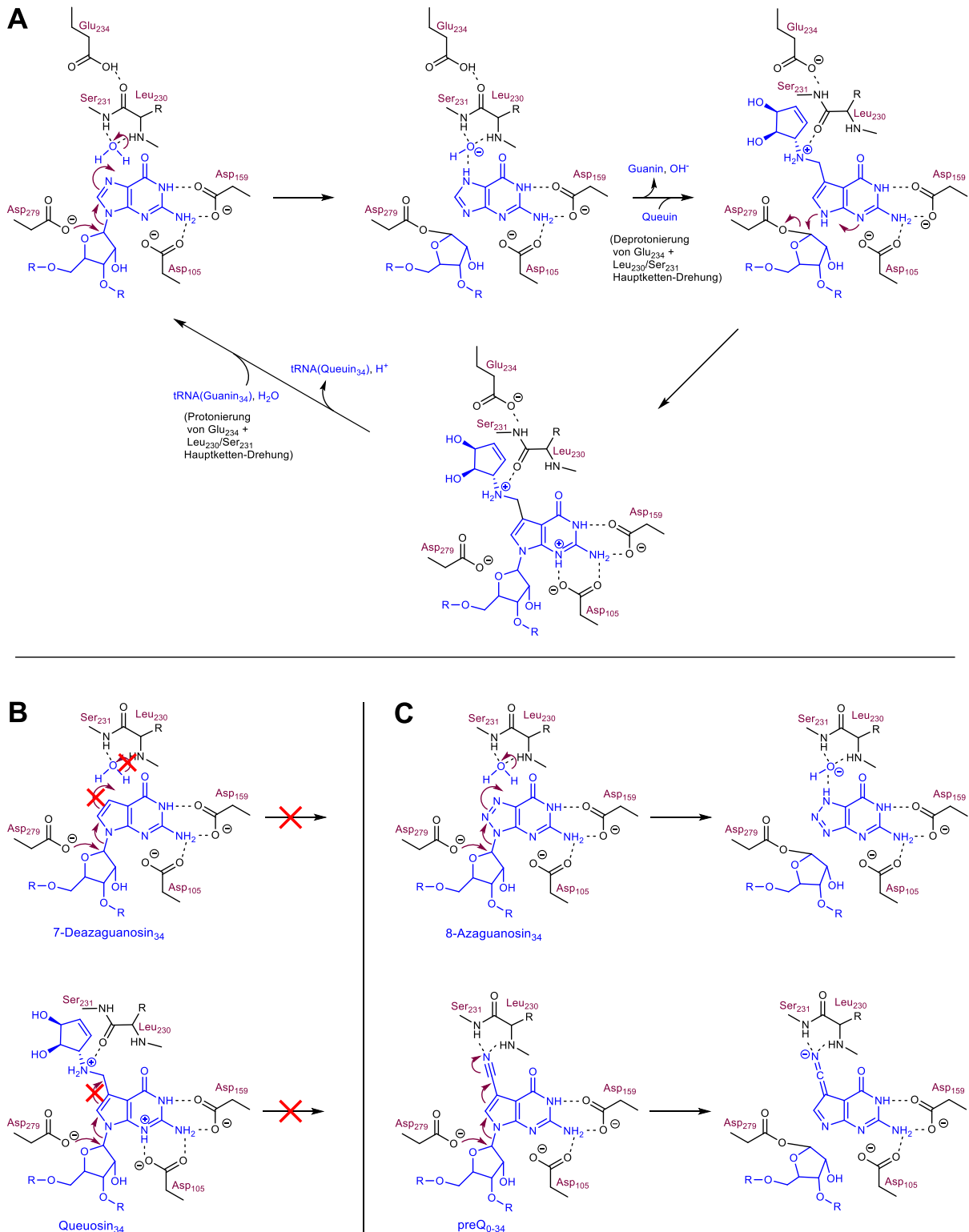


Abbildung 51: A: Postulierter *ping-pong* Mechanismus des Guanin/Queuin-Austauschs durch die eukaryotische TGT. B: Die Umsetzung von 7-Deaza- sowie 7-Aminomethylverbindungen ist nicht möglich, da die negative Ladung an C7, welche durch die Spaltung der glykosidischen Bindung entstehen würde, nicht stabilisiert werden kann. C: Umsetzung von tRNA-8-Azaguanosin₃₄ und tRNA-preQ₀₋₃₄ unter Ausbildung des kovalenten tRNA-TGT-Komplexes.

Das freigesetzte Guanin-Tautomer sowie das Hydroxidion werden anschließend durch Queuin verdrängt. Dies geht mit der Deprotonierung der Glu234-Seitenkette sowie einer Drehung der

Hauptkette von Leu230-Ser231 einher. Die so entstandene Konformation ermöglicht die Bindung zwischen dem Amidsauerstoff von Leu230 und dem sekundären Ammonium der Queuin-Base. Der nukleophile Angriff des N9-Atoms von Queuin auf das C1-Atom der Ribose₃₄ wird durch die räumliche Nähe der negativ geladenen Seitenkette von Asp105 ermöglicht, indem das Carboxylat von Asp105 die Übertragung eines Protons von N9 auf N3 stabilisiert. Durch die Bildung der glykosidischen Bindung des Queuins wird das Asp279 freigesetzt. Als letzten Schritt der Reaktionssequenz wird das Proton der Guanidiniumfunktion, welche durch die negativen Reste von Asp105 und Asp159 stabilisiert wird, an ein umgebendes Wassermolekül abgegeben, nachdem das tRNA-Queuin₃₄-Produkt aus dem aktiven Zentrum heraus diffundiert ist.

Der Einbau von Queuin in die tRNA unter Substitution von Guanin ist irreversibel.^[88] Daher liegt die Vermutung nahe, dass ein Mechanismus analog zur Umsetzung eines tRNA-Guanin₃₄ Substrat nicht möglich ist. Der Grund dafür scheint offensichtlich. Die zwischenzeitlich entstehende negative Ladung kann bei einem tRNA-Guanin₃₄-Substrat über das π -System des Guanin-Grundgerüsts delokalisiert werden. So kann die negative Ladung am N7-Atom durch die Hauptkettenamide von Leu230 und Ser231 stabilisiert werden. Im Falle von Queuin ist dies nicht möglich, da sich an der entsprechenden Stelle in Queuin ein C-Atom befindet, welches die negative Ladung nicht stabilisieren kann. So würde ein viel negativerer Ladungscharakter am N9-Atom entstehen, welche zusätzlich durch die räumliche Nähe zu der negativ geladenen Seitenkette von Asp105 energetisch benachteiligt wäre. Speziell im Fall eines gebundenen Queuins kommt noch dazu, dass durch die bereits angesprochene Drehung der Peptidbindung von Leu230/Ser231 der Amidsauerstoff in die entgegengesetzte Richtung des aktiven Zentrums zeigt. Anhand dieser Argumentation lässt sich auch die Irreversibilität des Einbaus weiterer 7-Aminomethyl-7-deazaguanin-Derivate wie preQ₁^[25], Dihydroqueuin^[88] und NPPDAG^[89] erklären. Auch für das Guanin-Derivat 7-Deazaguanin wurde ein irreversibler Einbau in die tRNA beobachtet.^[88] Auch diese Beobachtung lässt sich analog erklären. Obwohl die Hauptkette von Leu230 und Ser231 aufgrund der fehlenden Substituenten an C7 ein Hydroxidion stabilisieren könnte, kommt es nicht zur Protonierung des C7-Atoms, da dies die Aromatizität des 7-Deazapuringerüsts aufheben würde, was energetisch sehr ungünstig ist.

Der Einbau von 8-Azaguanin sowie der preQ₀-Base dagegen ist vollständig reversibel.^[25,88,89] Der Ausbau von 8-Azaguanin verläuft dabei völlig analog zu Guanin. Im Falle der preQ₀-Base an Position 34 der tRNA kann dagegen kein Wassermolekül an der Peptidbindung von Leu230/Ser231 binden, da die Nitrilfunktion der preQ₀-Base diese Stelle besetzt. Allerdings kann die negative Ladung, die ursprünglich am N9-Atom der Base generiert wird, auf das

Stickstoffatom der Nitrilfunktion über Mesomerie übertragen werden, wo sie analog zum Wassermolekül bei Guanin stabilisiert wird. Bei der Freisetzung der preQ₀-Base aus dem aktiven Zentrum wird der Stickstoff der Nitrilfunktion protoniert. Abschließend kommt es zur Tautomerisierung der Base.

3.5.4. Untersuchung der Dimerstabilität anhand von Mutanten der QTRT2

In vorangegangenen Arbeiten^[33] wurde das *Dimerinterface* der QTRT2 untersucht und Unterschiede zur *Z. mobilis* TGT dargestellt. Die aromatischen Seitenketten von Tyr363, His366 und Phe84' stabilisieren das QTRT2-Homodimer analog zu Tyr330, His333 und Phe92 der *Z. mobilis* TGT. Die Rolle der Aminosäuren His359, Tyr363 und His366 für die Dimerstabilität der bakteriellen TGT ist eingehend untersucht worden.^[77,78,90] Es gibt jedoch keine Hinweise auf die Bedeutung des QTRT2-Rests Tyr354 für die Dimerstabilität, da ein entsprechender aromatischer Rest in der *Z. mobilis* TGT nicht existiert. Die Kristallstruktur der QTRT2, die 2018 veröffentlicht wurde, zeigt, dass dieser Rest nicht nur für die Stabilität des TGT-Heterodimers, sondern auch für die Stabilität des QTRT2-Homodimers von Bedeutung zu sein scheint.^[33] Hier bildet er eine H-Brücke zum Amid der Hauptkette von Gln48', welche die Untereinheiten miteinander verbindet. Darüber hinaus scheint das QTRT2-Homodimer durch eine H-Brücke zwischen der Seitenkettenhydroxylgruppe von Ser41 und der phenolischen Hydroxylgruppe von Tyr363 stabilisiert zu werden (Abbildung 4).^[33] Um die Bedeutung der Seitenkettenhydroxylgruppen von Ser41 und Tyr354 sowohl für die Hetero- als auch für die Homodimerstabilität zu untersuchen, wurden mutierte Varianten der QTRT2 erstellt. Bei diesen Varianten sind die Aminosäuren Ser41 und Tyr354 zu Alanin bzw. Phenylalanin verändert.

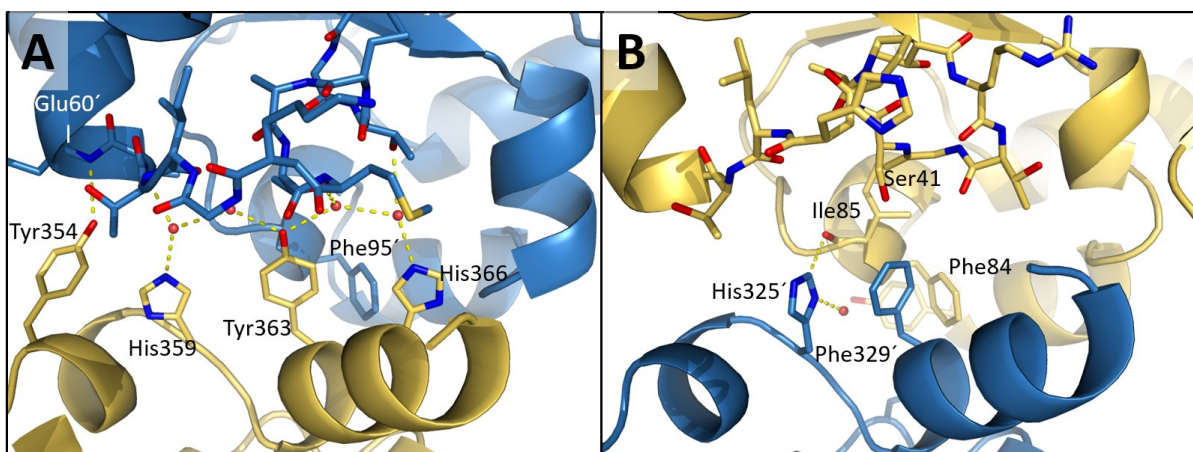


Abbildung 52: *Dimerinterface* des QTRT1/QTRT2-Heterodimers. **A:** Hotspot A. **B:** Hotspot B. Die beiden Moleküle, QTRT1 (blau) und QTRT2 (gelb), sind jeweils in Cartoon dargestellt, während wichtige Aminosäuren oder deren Seitenketten als Stäbchen dargestellt sind. O: rot, N: blau. Gestrichelte Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen.

Als Grundlage diente das Konstrukt von I. Biela, in dem das *QTRT2*-Gen in den pASK-IBA13plus-Expressionsvektor eingefügt ist.^[57] Nach Präparation des Plasmids erfolgte die Mutagenese mit dem *QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis* Kit der Firma Agilent Technologies anhand des bereitgestellten Protokolls (siehe Kapitel 5.8). Der Erfolg der Mutagenese wurde per Sequenzierung überprüft, bevor das Plasmid in *E. coli* BL21CodonPlus(DE3)-RIPL Zellen transformiert wurde. Die Expression erfolgte nach dem Protokoll von I. Biela.^[57] Nach der Anzucht der Zellen wurde die Überexpression mit Anhydrotetracyclin bei 15 °C über 24 h induziert. Nach der Zellernte und anschließender Resuspendierung der Zellen in Lysepuffer wurden die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das exakte Protokoll der dreistufigen Reinigung, die aus Affinitätschromatographie, Größenausschlusschromatographie und Entfernung des *Tags* besteht, ist in Kapitel 5.12 beschrieben. Nach der Präparation der mutierten *QTRT2*-Varianten erfolgte eine weitere Überprüfung der Identität der Proteine mittels denaturierender Massenspektrometrie.

Anschließend wurden die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Dimerstabilität anhand separat hergestellter und gereinigter *QTRT1*- und *QTRT2*-Untereinheiten untersucht. Dazu wurde die Methode der nativen Massenspektrometrie, gekoppelt mit einer Größenausschlusschromatographie (SEC-nMC) verwendet. Die massenspektrometrischen Experimente wurden von O. Hernandez-Alba und R. Benazza in der Arbeitsgruppe von S. Cianfèrani am Institut du Médicament in Straßburg durchgeführt.

Wie bereits erwähnt liegt die *QTRT2* in Abwesenheit von *QTRT1* hauptsächlich als Homodimer vor, während *QTRT1* in Abwesenheit von *QTRT2* fast ausschließlich als Monomer vorliegt. Da Proteine mit einem größeren hydrodynamischen Volumen schneller von der SEC-Säule eluieren, weisen homodimeres *QTRT2* und mutierte Varianten der *QTRT2* niedrigere Retentionszeiten (3,05 min) im Vergleich zu monomerem *QTRT1* (3,48 min) auf (Abbildung 53A).

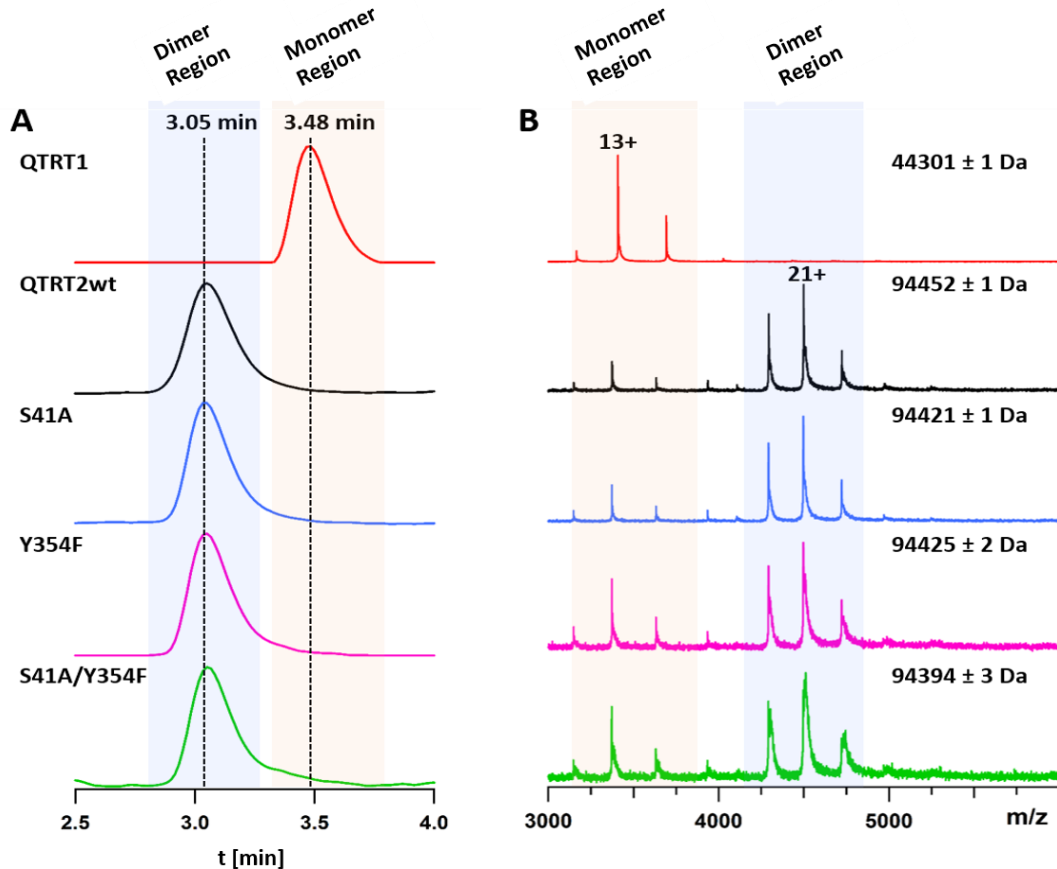


Abbildung 53: Diagramme und Spektren der SEC-nMS Experimente mit QTRT1, QTRT2 und verschiedenen Mutanten der QTRT2. A: Diagramme der SEC. B: nMS Signale entsprechend der chromatographischen Signale jeder Spezies.

Im Vergleich zu den Chromatogrammen weisen die Massenspektren einen Monomeranteil der jeweiligen QTRT2-Spezies in unterschiedlicher Ausprägung auf. Während der monomere Anteil von QTRT2(Ser41Ala) im Vergleich zum Wildtyp QTRT2 nur geringfügig erhöht ist, ist er in den Massenspektren von QTRT2(Tyr354Phe) und QTRT2(Ser41Ala/Tyr354Phe) stark erhöht. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die H-Brücken zwischen der phenolischen Hydroxylgruppe von Tyr354 und dem Hauptkettenamid von Gln48' für die Integrität des QTRT2-Homodimers eine ausgeprägte stabilisierende Wirkung haben. Das Wegfallen dieser nicht-kovalenten Wechselwirkung beeinträchtigt die Stabilität der Homodimer-Grenzfläche und begünstigt somit die Dissoziation des Dimers, wenn die Proteine in die Gasphase überführt werden (Abbildung 53B).

Analoge Versuche wurden anhand von äquimolaren Mischungen der QTRT1 mit den verschiedenen QTRT2-Varianten durchgeführt. Im Falle von QTRT2(Tyr354Phe) und QTRT2(Ser41Ala/Tyr354Phe) wird die Bildung von QTRT1/QTRT2-Heterodimeren im

Vergleich zu Wildtyp QTRT2 und QTRT2(Ser41Ala) begünstigt (Anhang 9). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Tyr354Phe-Mutation die Bildung des QTRT1/QTRT2-Heterodimers begünstigt. Aufgrund des Verlusts der H-Brücke zwischen der phenolischen Hydroxylgruppe von Tyr354 in QTRT2 und dem Hauptkettenamid von Glu60 in QTRT1 in der Kontaktstelle des QTRT1/QTRT2-Heterodimers (Abbildung 52) erscheint diese Beobachtung zunächst unerwartet. Aufgrund der 2-fachen Rotationssymmetrie ist jedoch die H-Brücke, die von der phenolischen Hydroxylgruppe von Tyr354 und dem Hauptkettenamid von Gln48' gebildet wird, an der Kontaktstelle des QTRT2-Homodimers zweimal vorhanden. Daher ist die Auswirkung der Tyr354Phe-Mutation auf die Dimerstabilität des QTRT2-Homodimer vermutlich deutlicher ausgeprägt als im QTRT1/QTRT2-Heterodimer. Infolgedessen verschiebt sich das Gleichgewicht vom stark destabilisierten QTRT2-Homodimer zum weniger stark destabilisierten QTRT1/QTRT2-Heterodimer.

Es ist denkbar, dass das Gleichgewicht zwischen den Quaternär-Strukturen der Untereinheiten der eukaryotischen TGT eine regulatorische Bedeutung hat. So könnten Modulationen in der lebenden Zelle einen Einfluss auf das Gleichgewicht der Untereinheiten haben. Auch wenn es derzeit keinen konkreten Hinweis auf eine solche Funktion gibt, stellt dies eine Fragestellung für künftige Forschungsarbeiten dar.

Um herauszufinden, ob die untersuchten QTRT2-Mutationen einen Einfluss auf die enzymatische Aktivität der Maus-TGT haben, wurden sowohl k_{cat} - als auch $K_m(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$ -Werte der Maus-TGT-Varianten bestimmt, die aus separat hergestelltem QTRT1 und (mutiertem) QTRT2 rekonstruiert worden waren. Die kinetischen Messungen wurden anhand des gleichen *Assays* durchgeführt, wie er auch in Kapitel 5.16.4 beschrieben wurde. $K_m(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$ erwies sich für alle untersuchten TGT-Varianten als praktisch identisch. Damit ist ausgeschlossen, dass die eingeführten Mutationen die tRNA-Bindung beeinflussen (Tabelle 6). Dagegen wurden für die TGT-Enzyme, die eine mutierte Variante von QTRT2 enthalten, im Vergleich zur Wildtyp-TGT leicht reduzierte Umsatzzahlen (k_{cat}) gemessen.

Während für das Heterodimer, welches die QTRT2(Tyr354Phe) enthält, nur eine geringfügige Verringerung des k_{cat} -Werts beobachtet wurde, zeigte das Heterodimer, das die QTRT2(Ser41Ala) enthält, eine signifikante Reduktion der Umsatzrate. Folgerichtig wurde die niedrigste Umsatzrate für das Heterodimer mit doppelt mutiertem QTRT2(Ser41Ala/Tyr354Phe) bestimmt. Ein ähnliches Phänomen wurde wiederholt bei der bakteriellen TGT beobachtet.^[77,78,90] In den meisten Fällen führt die Mutation eines an der Bildung der Dimerkontaktstelle beteiligten Rests zu einer geringfügigen, aber signifikanten

Verringerung von k_{cat} . Höchstwahrscheinlich sind hierfür Auswirkungen auf das nahe gelegene katalytische Zentrum verantwortlich.







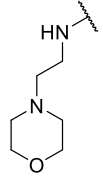


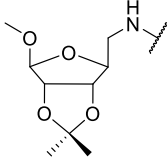


Tabelle 6: Kinetische Parameter der Maus-TGT mit mutierten Varianten der QTRT2.

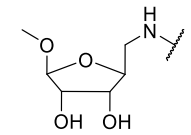


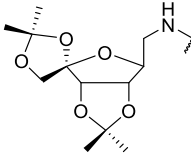


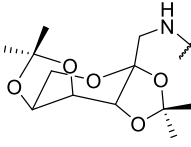



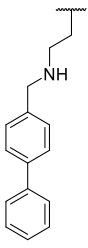


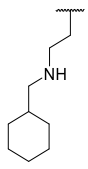


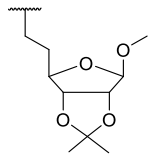


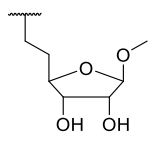


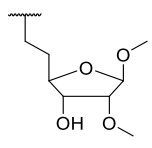


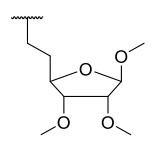


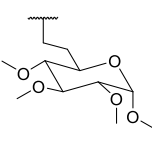

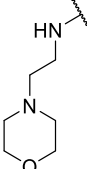
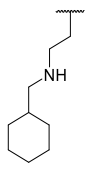

	$K_m(\text{tRNA}^{\text{Tyr}})$ [$\mu\text{mol L}^{-1}$]	k_{cat} ($\times 10^{-3}$) [s^{-1}]
QTRT1/QTRT2 (Wildtyp)	0.59 ± 0.08	4.9 ± 0.2
QTRT1/QTRT2(Ser41Ala)	0.45 ± 0.05	1.9 ± 0.1
QTRT1/QTRT2(Tyr354Phe)	0.37 ± 0.04	3.0 ± 0.1
QTRT1/QTRT2(Ser41Ala/Tyr354Phe)	0.47 ± 0.04	1.3 ± 0.1

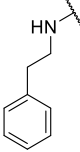
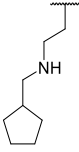

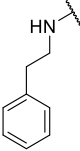
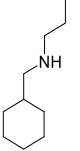

3.5.5. Charakterisierung von Inhibitoren der eukaryotischen TGT

In vorangegangenen Arbeiten wurden zahlreiche potentielle Inhibitoren der bakteriellen TGT enzymkinetisch charakterisiert. Die Motivation dieser aufwändigen Experimente war die Entwicklung einer neuen Wirkstoffklasse, die zur Behandlung der Bakterienruhr, eine durch *Shigellen*-Bakterien ausgelöste Infektionskrankheit, eingesetzt werden kann. Um mögliche Nebenwirkungen dieser potentiellen Wirkstoffe zu vermeiden, muss sich die Inhibition auf die bakterielle TGT beschränken und sollte das entsprechende Enzym der Wirtszellen nicht inhibieren. Inhibitoren mit einem *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst (siehe Tabelle 7) haben sich als äußerst wirksam gegenüber der bakteriellen TGT erwiesen. Daher wurden diese im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Selektivität überprüft.

Tabelle 7: K_i -Werte und Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Inhibitoren.

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	K_i (μM)	
				bak. TGT	euk. TGT
I1				58 ± 36 nM ^[34]	ca. 100 μM
I2				40 ± 4,2 μM ^[91]	> 100 μM
I3				6 ± 6 nM ^[34]	> 100 μM
I4				14 ± 7 nM ^[92]	> 100 μM

I5				$1,1 \pm 0,1 \mu\text{M}^{[92]}$	$> 100 \mu\text{M}$
I6				$32 \pm 13 \text{ nM}^{[92]}$	$> 100 \mu\text{M}$
I7				$321 \pm 193 \text{ nM}^{[92]}$	$> 100 \mu\text{M}$
I8				$24 \pm 14 \text{ nM}^{[93]}$	$7,9 \pm 0,9 \mu\text{M}$
I9				$4 \pm 2 \text{ nM}^{[36]}$	$6,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$
I10				$544 \pm 174 \text{ nM}^{[94]}$	$> 100 \mu\text{M}$
I11				$217 \pm 81 \text{ nM}^{[94]}$	$> 100 \mu\text{M}$
I12				$286 \pm 16 \text{ nM}^{[95]}$	$> 100 \mu\text{M}$
I13				$243 \pm 14 \text{ nM}^{[94]}$	$> 100 \mu\text{M}$
I14				$237 \pm 41 \text{ nM}^{[94]}$	$> 100 \mu\text{M}$
I15				$800 \pm 300 \text{ nM}^{[93]}$	$> 100 \mu\text{M}$

I16				$0,8 \pm$ $0,3 \text{ nM}^{[35,93]}$	$> 100 \mu\text{M}$
I17				$15,1 \pm$ $5,3 \text{ nM}^{[35,93]}$	$> 100 \mu\text{M}$

Gegenüber *lin*-Benzoguanin besitzen alle Verbindungen an Position 2 eine Aminogruppe, welche durch Ausbildung einer Wasserstoffbrücke mit Ala232 der *Z. mobilis* TGT eine deutliche Verbesserung der Bindungsaffinität bewirkt.^[34] Über Substituenten an Position 2 konnte die Ribose³³-Bindetasche adressiert werden, während Substituenten an Position 4 die Ribose³⁴/Phosphat³⁵-Bindetasche besetzen. In dieser Arbeit wurden daher Inhibitoren untersucht, die entweder eine dieser beiden Substitutionen aufweisen oder an beiden Positionen substituiert waren. Die Reste an Position 4 von **I8**, **I9**, **I15**, **I16** und **I17** binden über ihren Ringsubstituenten in die von Val45 und Leu68 ausgekleidete Ribose³⁴-Subtasche der *Z. mobilis* TGT.^[35,93] Die Aminoethylgruppe dieser Reste bildet mit dem Carboxylat von Asp280 eine Wasserstoffbrücke aus, was einen positiven Effekt auf die Affinität der Verbindungen hat.^[36] Inhibitor **I9** weist beispielweise mit 4 nM eine um mehr als eine Größenordnung größere Affinität als **I1** auf, welcher an Position 4 nicht substituiert ist.

Da Verbindungen mit unpolaren Ringsubstituenten in Position 4 schlecht wasserlöslich sind, wurden weitere Inhibitoren entwickelt, die an Position 4 mit hochpolaren Furanosidresten substituiert sind. Die Hydroxylgruppen dieser Verbindungen sollten dabei die Wassermoleküle ersetzen, welche im Apoenzym die Carboxylatgruppen der Asp102- und Asp280-Seitenketten solvatisieren.^[94,95] Die Bindungsaffinitäten der Inhibitoren **I10**, **I11**, **I12**, **I13** und **I14** liegen im niedrigen dreistelligen nanomolaren Bereich.^[94,95] An Position 2 wurden ebenfalls sowohl hydrophobe Ringsubstituenten als auch polare 5-Aminoribofuranosidreste verwendet.^[34] Im Falle der Furanosidreste wurden teilweise Acetonid-Schutzgruppen verwendet, um die raumfüllenden Eigenschaften zu verbessern sowie die Lipophilie zu modulieren.^[92]

Zur Berechnung der Inhibitorkonstanten wurde eine kompetitive Hemmung gegenüber der tRNA^{Tyr} zugrunde gelegt, da aufgrund der Größe der substituierten Inhibitoren, eine gleichzeitige Bindung der tRNA^{Tyr} und der jeweiligen Inhibitoren an das aktive Zentrum der TGT aus sterischen Gründen nicht möglich ist. Durch die Bindung der Inhibitoren wird

demnach die Bildung des TGT-tRNA-Komplexes verhindert.^[85] Die Berechnung der Hemmkonstanten ist in Kapitel 5.16.6 beschrieben.

Bereits die Verbindung **II**, welche im Vergleich zu *lin*-Benzoguanin lediglich in Position 2 eine Aminomethylgruppe besitzt, weist mit einem K_i -Wert von ca. 100 μM gegenüber der eukaryotischen TGT eine um den Faktor 2000 niedrigere Affinität im Vergleich zu der bakteriellen TGT auf. Da im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der insgesamt niedrigen Affinitäten keine Komplexstrukturen mit den Inhibitoren erhalten werden konnten, wurde die Struktur des eukaryotischen Enzyms mit Komplexstrukturen der bakteriellen TGT überlagert. So war es möglich, potentielle Ursachen für die unterschiedliche Affinität der Verbindungen gegenüber den beiden Enzymen zu diskutieren. In der Apostruktur (PBD-Code 7OV9) der eukaryotischen TGT ist die Hauptkette von Leu230 (QTRT1) so orientiert, dass der Carbonylsauerstoff in die entgegengesetzte Richtung des aktiven Zentrums zeigt. Betrachtet man die Wechselwirkungen des bakteriellen Enzyms mit dem Grundgerüst der beiden gezeigten Inhibitoren, fällt auf, dass die Hauptkette des Leu231 gedreht ist, sodass der Carbonylsauerstoff eine Wasserstoffbrücke mit dem Guanidin-Stickstoff an Position 1 des Inhibitors ausbilden kann. Daher wurde zum Vergleich die Queuin-Komplexstruktur der eukaryotischen TGT verwendet (PBD-Code 7OVO), da in diesem Fall Leu230 ebenfalls gedreht vorliegt (siehe Kapitel 3.3.6) und dies auch in Anwesenheit eines Inhibitors möglich sein sollte.

Die Seitenkette von Asp105 des eukaryotischen Enzyms zeigt in die vom Inhibitor abgewandte Richtung, wodurch im Vergleich zu Asp102 der bakteriellen TGT keine Wasserstoffbrücken mit der Guanidingruppe des *lin*-Benzoguanin-Grundgerüsts ausgebildet werden können. Allerdings ist durch die Orientierung von Asp105 auch keine Wechselwirkung mit dem gebundenen Queuin möglich. Dennoch besitzt Queuin mit einem K_m -Wert von 0,33 $\mu\text{mol/L}$ eine vergleichsweise hohe Affinität zur eukaryotischen TGT. Daher kann die unterschiedliche Orientierung der beiden Aspartatreste nicht als alleiniger Grund für die deutlich verminderte Affinität von **II** gegenüber der eukaryotischen TGT betrachtet werden.

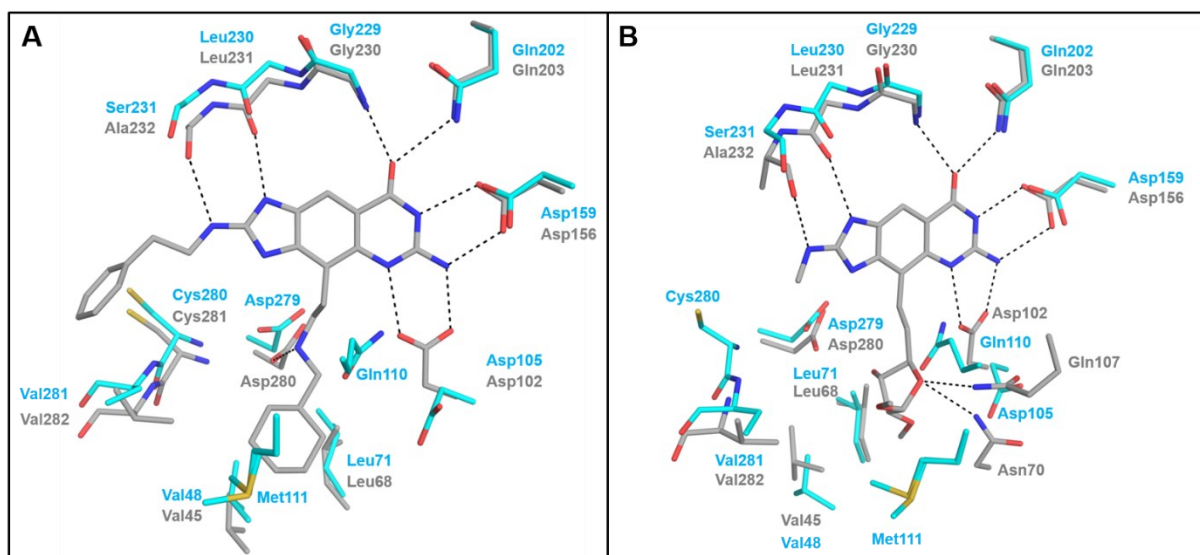


Abbildung 54: Überlagerung der aktiven Zentren der bakteriellen (grau) und eukaryotischen (türkis) TGT. Stäbchendarstellung der relevanten Aminosäuren, O: rot, N: blau. A: Komplexstruktur der bak. TGT mit **I17** (PDB-Code: 4GIY)^[93] und der euk. TGT im Komplex mit Queuin (PDB-Code: 7OVO, Queuin ist nicht dargestellt). B: Komplexstruktur der bak. TGT mit **I12** (PDB-Code: 4LBU)^[95] und der euk. TGT im Komplex mit Queuin (PDB-Code: 7OVO, Queuin ist nicht dargestellt).

Sowohl der Furanosidrest an **I4** als auch der Morpholinsubstituent an **I3** können die Affinität gegenüber der bakteriellen TGT durch Modifikation an Position 2 erhöhen. Im Falle der eukaryotischen TGT führen allerdings sämtliche Substitutionen mit großvolumigen Resten an Position 2 zu einer Verminderung der Affinität. Eine genaue Bestimmung der Hemmkonstanten wurde nicht vorgenommen, da bereits Vorversuche gezeigt haben, dass die jeweiligen K_i -Werte weit über 100 μM liegen. Beim Vergleich der Primärstruktur der beiden Enzyme fällt auf, dass sich im Falle der Uridin³³-Bindetasche der eukaryotischen TGT das Tyr282 an der Stelle des Leu283 der bakteriellen TGT befindet. Obwohl Tyr282 nicht eingebaut werden konnte, ist davon auszugehen, dass dieses im Vergleich zur bakteriellen TGT deutlich mehr Raum einnimmt. Diese sterischen Effekte sind vermutlich der Grund für die deutlich verminderte Affinität der Inhibitoren **I3** bis **I7** im Vergleich zu **I1** und insbesondere der Inhibitoren **I15** bis **I17** im Vergleich zu **I9**.

Besonders potente Inhibitoren gegenüber der bakteriellen TGT haben an Position 4 eine Aminoethylgruppe, welche wiederum mit hydrophoben Ringsubstituenten versehen sind. In diesem Fall trägt eine Wasserstoffbrücke zwischen der Aminoethylgruppe und dem Asp280 zur Bindungsaffinität bei. Das Asp279 der eukaryotischen TGT befindet sich an der nahezu gleichen Stelle und könnte höchstwahrscheinlich ebenfalls eine Wasserstoffbrücke zu der Aminoethylgruppe ausbilden. Die hydrophoben Aminosäuren, Val48 und Leu71, bilden hier

ebenfalls eine lipophile Subtasche aus, die durch den hydrophoben Ringsubstituenten besetzt werden kann. Die ermittelten K_i -Werte der Inhibitoren **I8** und **I9** bestätigen diese Vermutung. Diese inhibieren die eukaryotische TGT etwa 10- bis 20-fach stärker als die nicht-substituierte Verbindung **I1**.

Furanosidreste in Position 4 führen analog zu der bakteriellen TGT auch im Falle der eukaryotischen TGT zu einer Verschlechterung der Affinität. Ein möglicher Grund ist das fehlende sekundäre Amin, sodass keine Wasserstoffbrücke mit dem Asp279 ausgebildet werden kann. Außerdem könnte sich das Verdrängen der Wassermoleküle, welche die Seitenketten der beiden Aspartate 102/280 bzw. 105/279 solvatisieren, energetisch nachteilig auswirken.

Die Inhibitoren **I15** bis **I17**, die sowohl an Position 2 als auch an Position 4 großvolumige Substituenten aufweisen, zeigen einen K_i -Wert deutlich über 100 μM . Somit ist ihre Affinität geringer als die des nicht-substituierten Inhibitors **I1**. Das zeigt wie stark die negativen Effekte durch die Substitution an Position 2 ausfallen, da sie nicht durch die positiven Effekte der Aminoethyl-Substituenten an Position 4 kompensiert werden können. **I9** und **I17** weisen an Position 4 den gleichen Substituenten auf, welcher im Falle von **I9** zu einer Steigerung der Affinität um den Faktor 20 führt. Daher muss die Einführung des Phenethylaminrestes in Position 2 eine Verminderung der Affinität um mindestens diesen Faktor bewirken.

Es lässt sich zusammenfassen, dass bereits das Grundgerüst der Inhibitorklasse gegenüber der eukaryotischen TGT um den Faktor 2000 weniger affin ist. Somit ist ohne große Substituenten an Position 2 und 4 eine hohe Selektivität gegenüber den eukaryotischen Enzymen vorhanden. Durch großvolumige Substituenten an Position 2 kann die Selektivität noch weiter erhöht werden. Substituenten an Position 4 haben dagegen keinen großen Einfluss auf die Selektivität. Mögliche Ursachen für diese Beobachtungen wurden diskutiert, müssten allerdings durch Komplexstrukturen bestätigt werden, was im Rahmen dieser Arbeit nicht gelang.

3.6. Herstellung und Reinigung des kovalenten tRNA^{Tyr} -TGT-Komplexes

Zur vollständigen Strukturaufklärung der eukaryotischen TGT gehört die Untersuchung des kovalenten tRNA^{Tyr} -TGT-Komplexes, der als Intermediat während der Enzymreaktion entsteht. Bei Inkubation des Enzyms in Anwesenheit von tRNA stellt sich gemäß dem

Reaktionsschema in Abbildung 55 ein Gleichgewicht zwischen dem freien Enzym und dem tRNA-Enzym-Intermediat ein, wobei dieses deutlich auf der Seite der Edukte liegt. Um das Gleichgewicht auf die Seite des kovalenten Komplexes zu verschieben, muss dieser stabilisiert werden. Meyer *et al.* haben in ihrer Arbeit die unterschiedlichen Hemmeigenschaften von verschiedenen Inhibitoren beschrieben.^[96] Demnach inhibieren Verbindungen mit großvolumigen Substituenten, welche die Ribose³³- und Ribose³⁴-Bindetasche besetzten, das Enzym kompetitiv gegenüber der tRNA. So wird verhindert, dass sich das Intermediat der Reaktion überhaupt ausbilden kann. Dem gegenüber stehen Inhibitoren ohne diese Substituenten, die an das Intermediat binden und dieses stabilisieren, indem die Bindung von Guanin oder Queuin und damit die weitere Umsetzung verhindert wird. Man spricht in diesem Fall von einer unkompetitiven Hemmung der Enzymreaktion. 9-Deazaguanin, welches in dieser Arbeit eingesetzt wurde, zählt zu der Klasse der unkompetitiven Inhibitoren.^[96] Zur Stabilisierung des Intermediats ist es außerdem notwendig, das frei gewordene Guanin aus der Lösung zu entfernen.

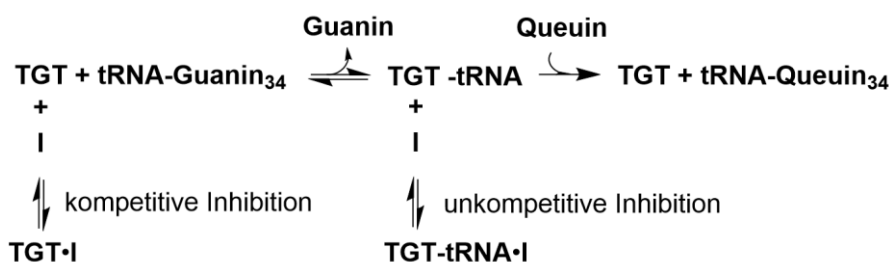


Abbildung 55: Schema der durch die TGT katalysierten Reaktion. Die unterschiedlichen Inhibitor-Komplexe werden durch den Einsatz von kompetitiven oder unkompetitiven Inhibitoren erhalten.^[96]

Als Vorlage diente die Arbeit von Xie *et al.*, in der neben der erfolgreichen Bildung und Reinigung des Intermediats auch dessen kristallographische Untersuchung beschrieben worden waren.^[27] Um die Chance auf eine erfolgreiche Kristallisation zu erhöhen, verwendeten die Autoren anstelle der kompletten tRNA nur die Haarnadelschleife (*anticodon stem loop*) als kleinstmögliche Struktur, die vom dem Enzym umgesetzt werden kann.^[26,97] Die aus lediglich 20 Basen bestehende Sequenz ist deutlich weniger flexibel als die komplette tRNA und kann zudem synthetisch hergestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl diese verkürzte Sequenz (5' AGC ACG GCU GUA AAC CGU GC 3', hergestellt durch Horizon Discovery LTD) als auch die Vollängen-tRNA verwendet. Letztere wurde vor dem Hintergrund verwendet, dass ein solches Intermediat mit dem Heterodimer der eukaryotischen TGT eine

Masse von mehr als 100 kDa besitzt und damit der aktuellen Untergrenze für Untersuchungen mittels Cryo-EM entspricht. Diese Methode der Strukturaufklärung hat den Vorteil, dass die unter Umständen sehr zeitaufwändige Suche nach einer geeigneten Kristallisationsbedingung entfällt.

Zur Reproduktion der publizierten Bedingung wurden das Heterodimer der euk. TGT in Anwesenheit von 9-Deazaguanin mit der Vollängen-tRNA für 1,5 h inkubiert.

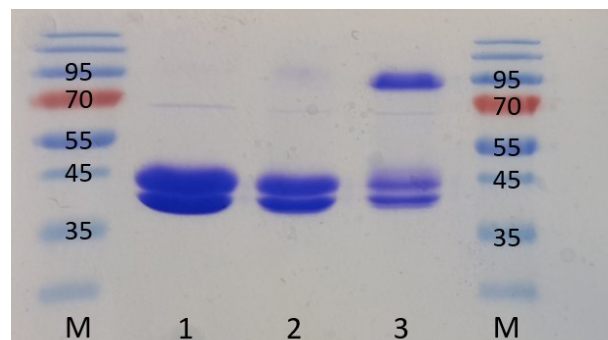


Abbildung 56: SDS-PAGE der proteinhaltigen Fraktionen nach der Inkubation. 1: 10 μM QTRT1/2. 2: 10 μM QTRT1/2, 20 μM tRNA. 3: 10 μM QTRT1/2, 20 μM tRNA^{Tyr}, 50 μM 9-Deazaguanin. Die Größenangaben des Markers verstehen sich in kDa.

Das Gel zeigt die erfolgreiche Bildung des tRNA-Enzym-Intermediats. Analog zu der Arbeit von Xie *et al.* lässt sich dieses nur in Anwesenheit von 9-Deazaguanin beobachten. Das vorhandene Enzym konnte dabei trotz des Einsatzes von Inhibitor und tRNA im Überschuss scheinbar nicht vollständig in den kovalenten Komplex überführt werden. Denkbar ist allerdings, dass es unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE zu einem Zerfall des Intermediats gekommen sein kann, obwohl dieses zur Denaturierung für eine Stunde bei Raumtemperatur und nicht bei den Standardbedingungen von 95 °C inkubiert wurde. Der neu entstandenen Spezies lässt sich aufgrund der Laufhöhe eine Größe von ca. 95 kDa zuordnen. Aufgrund der denaturierenden Bedingungen wurde erwartet, dass sämtliche Spezies, die nicht kovalent miteinander verbunden sind, separate Banden ergeben. Im Falle des Intermediates bestehend aus QTRT1 und der tRNA^{Tyr} entspricht dies einer Masse von ca. 70 kDa ($M(\text{tRNA}^{\text{Tyr}}) = 27352 \text{ Da}$). Es gilt außerdem zu beachten, dass sich die Laufeigenschaften der tRNA von denen einer Proteinprobe unterscheiden können. So ist es durchaus möglich, dass die neu entstandene Bande einem Komplex bestehend aus der tRNA^{Tyr} und dem Heterodimer zuzuordnen ist, obwohl dies einer Masse von ca. 115 kDa entspricht. Für diese Möglichkeit

spricht, dass die Intensität der QTRT2-Bande im gleichen Maße wie die der QTRT1-Bande verringert ist.

Nach der Reproduktion wurden weitere Versuche zur Optimierung der Reaktionsbedingungen unternommen. Dabei wurden verschiedene Stoffmengenverhältnisse untersucht.

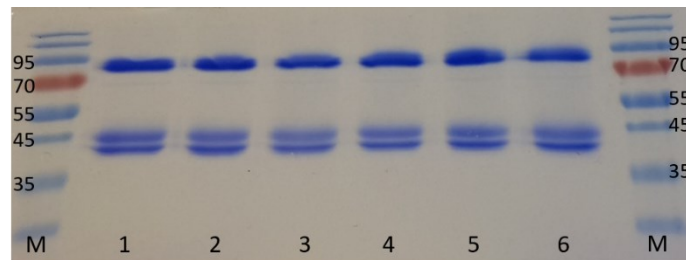


Abbildung 57: SDS-PAGE der proteinhaltigen Fraktionen nach der Inkubation. Bei allen Proben betrug die Heterodimer-Konzentration $10 \mu\text{M}$. 1: $20 \mu\text{M}$ tRNA^{Tyr} , $50 \mu\text{M}$ 9-Deazaguanin. 2: $40 \mu\text{M}$ tRNA^{Tyr} , $50 \mu\text{M}$ 9-Deazaguanin. 3: $60 \mu\text{M}$ tRNA^{Tyr} , $50 \mu\text{M}$ 9-Deazaguanin. 4: $20 \mu\text{M}$ tRNA^{Tyr} , $100 \mu\text{M}$ 9-Deazaguanin. 5: $20 \mu\text{M}$ tRNA^{Tyr} , $200 \mu\text{M}$ 9-Deazaguanin. 6: $60 \mu\text{M}$ tRNA^{Tyr} , $200 \mu\text{M}$ 9-Deazaguanin. Die Größenangaben des Makers verstehen sich in kDa.

Weder durch eine Erhöhung der tRNA-Konzentration noch der 9-Deazaguanin-Konzentration konnte der Anteil des Intermediats gesteigert werden. Daher wurde die ursprüngliche Bedingung beibehalten.

Die Bildung des Intermediats mit der Haarnadelschleife (im Folgenden als tRNA^{Xie} bezeichnet) lässt sich völlig analog zu der Volllängen-tRNA darstellen. Das Herstellungsprotokoll ist in Kapitel 5.17.1 beschrieben. Um den Anteil des nicht umgesetzten Heterodimers abzutrennen, wurde die Methode der Anionenaustausch-Chromatographie verwendet.

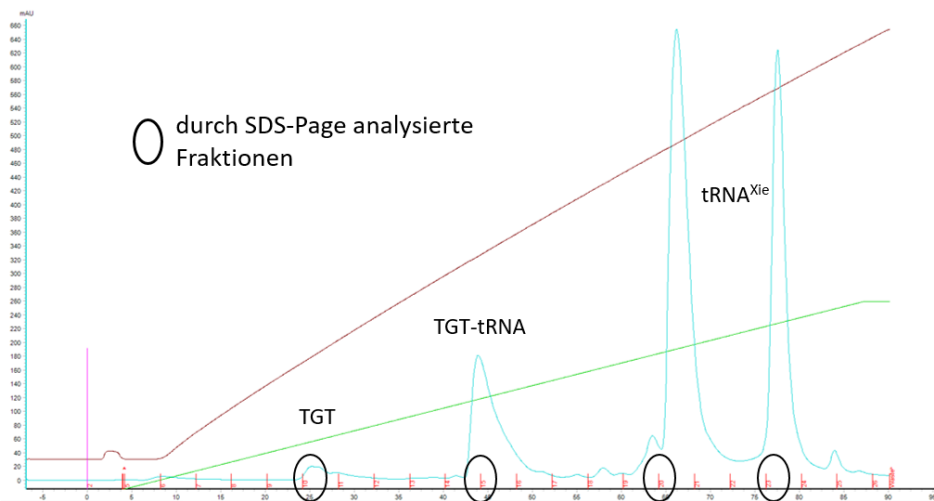


Abbildung 58: Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie mittels MonoQ™ 4.6/100 PE-Säule. Das Chromatogramm zeigt die Elution mittels MonoQ-Elutionspuffer und weist dabei zwei dominante Peaks auf. Die grüne Linie zeigt den Anteil des Elutionspuffers an, während die braune Linie die Leitfähigkeit angibt.

Erwartungsgemäß sollte die nicht umgesetzte TGT gefolgt vom Intermediat und schließlich der überschüssigen $tRNA^{Xie}$ eluieren, da negativ geladene Spezies durch das positiv geladene Säulenmaterial stärker zurückgehalten werden. Tatsächlich entspricht das erhaltene Chromatogramm dieser Erwartung mit dem einzigen Unterschied, dass zwei Peaks beobachtet wurden, welche die überschüssige $tRNA^{Xie}$ enthielten. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass die $tRNA^{Xie}$ in zwei verschiedenen Konformationen vorliegt. Um auszuschließen, dass die verwendete tRNA-Charge Verunreinigungen enthielt, wurde ein Qualitätsreport des Herstellers (Horizon Discovery LTD) angefordert. Das bereitgestellte Massenspektrum zeigte allerdings einen einzigen Peak, der mit der berechneten Masse der gewünschten Spezies genau übereinstimmt.

Die gesammelten Fraktionen wurden anschließend per SDS-PAGE analysiert. Trotz der starken Verdünnung sind die einzelnen Banden noch zu erkennen. Die Fraktionen 15 und 16, die das zu reinigende $TGT-tRNA^{Xie}$ Intermediat enthielten, wurden aufkonzentriert und nochmals analysiert. Neben den gewünschten Banden bei ca. 95 kDa lassen sich noch weitere Banden im Bereich von 45 kDa erkennen, die den Edukten QTRT1 und QTRT2 zuzuordnen sind. Mögliche Gründe sind entweder eine unvollständige Trennung der beiden Spezies oder ein Zerfall des Intermediats. Bei letzterem stellt sich die Frage, ob die Probe unmittelbar nach der Elution oder erst durch die Vorbereitung für das SDS-PAGE Experiment zerfallen ist.

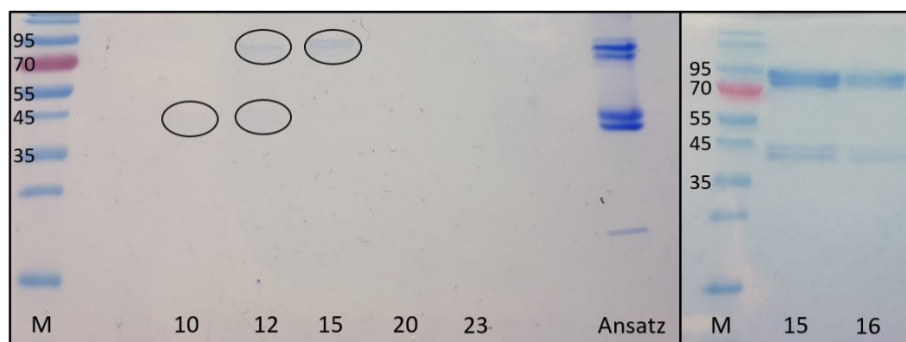


Abbildung 59: SDS-PAGE der proteinhaltigen Fraktionen nach der Anionenaustauschchromatographie. Links: Analyse der eluierten Fraktionen. Die Banden sind aufgrund der Verdünnung nur schwer zu erkennen. Rechts: Fraktionen 15 und 16 nach Aufkonzentrieren der Proben. Die Größenangaben des Makers verstehen sich in kDa.

Um diese Frage zu beantworten, wurden die Fraktionen 15 und 16 mittels Massenspektrometrie analysiert.

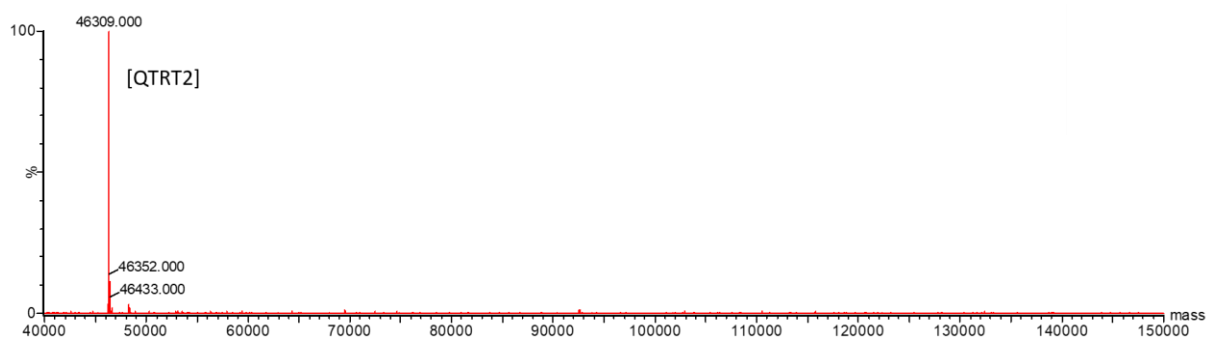


Abbildung 60: ESI-Massenspektrum der Fraktion 15 nach der Anionenaustauschchromatographie. Die gefundene Masse entspricht der nicht-katalytischen Untereinheit QTRT2.

Das Massenspektrum weist lediglich einen Peak auf, welcher der nicht-katalytischen Untereinheit der TGT entspricht. Aufgrund der Vielzahl an Banden auf dem SDS-PAGE-Gel erscheint dieser Befund zunächst überraschend. Unter der Berücksichtigung der Orientierung des elektrischen Felds innerhalb des Massenspektrometers, welches nur positiv geladene Proben in Richtung des Detektors beschleunigt, lässt sich das Spektrum erklären.

Durch das Phosphat-Ribose-Rückgrat verfügt die tRNA über eine starke negative Gesamtladung, die nicht durch die positiven Ladungen der kovalent gebundenen Proteinbestandteile kompensiert werden können. Da die tRNA mit Asp279 der QTRT1 kovalent verbunden ist, lässt sich die katalytische Untereinheit nicht detektieren. Die

Ergebnisse der SDS-PAGE legen die Vermutung nahe, dass neben dem Intermediat auch noch Teile der QTRT1 in der Lösung vorliegen, die nicht mit tRNA verknüpft sind. Dies wurde durch das Massenspektrum allerdings nicht bestätigt. Man kann demnach davon ausgehen, dass das Intermediat während der Probenvorbereitung für die SDS-PAGE Analyse teilweise zerfallen ist. Die beschriebenen Ergebnisse sind für die Vollängen-tRNA und die tRNA^{Xie} vollkommen identisch, weshalb nur eine Variante dargestellt wurde. Die Proteinkonzentration des Produkts wurde näherungsweise durch UV-Absorption bestimmt. Dadurch berechnete sich eine Gesamtausbeute von 20 % bezogen auf das Heterodimer. Eine Untersuchung der Produkte mittels Cryo-EM war aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich. Allerdings stellt die beschriebene Präparationsmethode eine vielversprechende Ausgangssituation für EM-Versuche dar.

4. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ausgehend von den bereits bekannten Präparationsbedingungen der beiden separaten Untereinheiten der Maus-TGT ein Expressions- sowie ein Reinigungsprotokoll für die gemeinsame Präparation des funktionalen TGT-Heterodimers der Maus etabliert werden. Dazu wurde zunächst ein Expressionsvektor auf der Basis eines pETDuet-Vektors konstruiert. Da sich mehrere *E. coli*-Stämme als ungeeignet erwiesen, wurde schließlich eine Expressionsvorschrift unter Verwendung eines *V. natriegens*-Stamms entwickelt. Die Entfernung von Nukleinsäure-Verunreinigungen unter Erhalt des auf nicht-kovalenten Wechselwirkungen basierenden Protein-Protein-Kontakts des Heterodimers stellte dabei die größte Herausforderung dar. Dieses Problem konnte schließlich mit einer Kombination einem zusätzlichen Waschschrift mit einem Lithiumchlorid-haltigen Puffer im Rahmen der Affinitätschromatographie sowie einer Phenyl-SepharoseTM-Matrix gelöst werden.

In Zusammenarbeit mit dem MarXtal-Labor des Fachbereichs Chemie der Universität Marburg konnten mehrere initiale Kristallbedingungen identifiziert werden, die teilweise das Polyoxometallat TEW beinhalten. Sämtliche initiale Bedingungen wurden *inhouse* reproduziert und im Falle einer erfolgreichen Reproduktion einer Optimierungsstudie unterzogen. Die Struktur des QTRT1/2-Heterodimers konnte schließlich in Ab- und Anwesenheit des Additivs TEW *de novo* gelöst werden. In beiden Fällen lässt sich wie auch in der Kristallstruktur der QTRT1-Untereinheit die α -Helix 0 beobachten. Das deutet darauf hin, dass es sich bei dem Strukturelement nicht um ein kristallographisches Artefakt handelt, sondern in Abwesenheit von tRNA auch unter physiologischen Bedingungen ausgebildet wird.

Anhand der TEW-Bedingung konnte auch eine Struktur in Komplex mit Queuin durch Ko-Kristallisation erhalten werden. Da die Citrat-haltige Bedingung ohne TEW aufgrund eines im aktiven Zentrum gebundenen Citrat-Moleküls ohne Weiteres nicht für das *Soaking* geeignet ist, wurde eine Methode entwickelt, um das aktive Zentrum im ersten Schritt freizulegen und einen Liganden im zweiten Schritt durch *Soaking* in das aktive Zentrum einzubringen. So konnte die Bindungspose von Queuin in der Bindetasche der QTRT1 durch den Vergleich zweier unterschiedlicher Methoden, Ko-Kristallisation und *Soaking*, bestätigt werden.

In der Kristallstruktur der Maus-TGT im Komplex mit Queuin ließen sich Van-der-Waals Kontakte zwischen Val161 der QTRT1 und dem 7-Deazapuringerüst sowie dem Dihydroxycyclopenten-Rest von Queuin beobachten. Val161 ist in den meisten bakteriellen

TGTs durch Cystein ausgetauscht. Zudem wird durch das Fehlen einer Seitenkette bei Gly232 genug Platz für den großvolumigen Dihydroxycyclopenten-Rest in der Bindetasche der QTRT1 geschaffen. In mehr als 90 % der bakteriellen TGTs ist dieses Glycin durch Valin ausgetauscht. Dadurch tragen beide Aminosäuren zur Substratspezifität der eukaryotischen TGT bei.

Die enzymkinetischen sowie massenspektrometrischen Untersuchungen haben gezeigt, dass die Mutation von Tyr 354 der QTRT2 zu Phenylalanin zu einer signifikanten Destabilisierung des QTRT2-Homodimers führt. Dies führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zum funktionellen Heterodimer. Vermutlich hat die Mutation auch eine Auswirkung auf das funktionelle Heterodimer, allerdings in geringerem Ausmaß. Die Mutation von Ser 41 sowie Tyr 354 der QTRT2 führt zudem zu einer geringeren Umsatzrate des Heterodimers.

Anhand der enzymkinetischen Studien wurde gezeigt, dass durch die Adressierung der Ribose³³-Bindetasche durch großvolumige Reste eine Selektivität zwischen der bakteriellen und eukaryotischen TGT erzielt werden kann. Inhibitoren mit *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst, welche an Position 2 substituiert waren, zeigten nämlich kaum eine Hemmung der eukaryotischen TGT, während sie die bakterielle TGT teils im einstelligen nanomolaren Bereich hemmen. Neben ausgewählten Inhibitoren wurden auch einige bekannte Substrate der eukaryotischen TGT enzymkinetisch charakterisiert. Abschließend konnte ein Reaktionsmechanismus postuliert werden, welcher den irreversiblen Einbau von Queuin, preQ₁ und 7-Deazaguanin erklärt. Ein irreversibler Einbau findet immer dann statt, wenn die durch den nukleophilen Angriff der Seitenkette des Asp279 auf das C1-Atoms des Ribosezuckers entstehende negative Ladung nicht durch das Substrat in Position 34 stabilisiert werden kann.

Summary

In this work, based on the already known preparation conditions of the two separate subunits of the mouse TGT, an expression and a purification protocol for the combined preparation of the functional mouse TGT heterodimer could be established. For this purpose, an expression vector was first constructed based on a pETDuet vector. Since several *E. coli* strains proved unsuitable, an expression vector was finally developed using a *V. natriegens* strain. The removal of nucleic acid impurities while preserving the protein-protein contact of the heterodimer, which is based on non-covalent interactions, presented the greatest challenge. This problem was finally solved with a combination of using lithium chloride during affinity chromatography as well as a Phenyl-Sepharose™ matrix.

In collaboration with the MarXtal laboratory of the Department of Chemistry at the University of Marburg, several initial crystal conditions were identified, some of which included the polyoxometalate TEW. All initial conditions were reproduced in-house and, in case of successful reproduction, were subjected to an optimisation study. The structure of the QTRT1/2 heterodimer could finally be solved *de novo* in the presence and absence of the additive TEW. In both cases, as in the crystal structure of the QTRT1 subunit, the α helix 0 can be observed. This indicates that the structural element is not a crystallographic artefact, but is also formed under physiological conditions in the absence of tRNA.

Using the TEW condition, a structure in complex with queuine could also be obtained by co-crystallisation. Since the citrate-containing condition without TEW is readily unsuitable for soaking due to a citrate molecule bound in the active site, a method was developed to expose the active site in the first step and introduce a ligand into the active site by soaking in the second step. Thus, the binding pose of queuine in the binding pocket of QTRT1 was confirmed by comparing two different methods, co-crystallisation and soaking.

In the crystal structure of mouse TGT in complex with Queuin, Van-der-Waals contacts could be observed between Val161 of QTRT1 and the 7-deazapurine scaffold as well as the dihydroxycyclopentene residue of Queuin. Val161 is replaced by cysteine in most bacterial TGTs. Moreover, the absence of a side chain at Gly232 creates enough space for the large-volume dihydroxycyclopentene residue in the binding pocket of QTRT1. In more than 90 % of bacterial TGTs, this glycine is exchanged by valine. Thus, both amino acids contribute to the substrate specificity of the eukaryotic TGT.

The enzyme kinetic as well as mass spectrometric studies have shown that the mutation of Tyr 354 of QTRT2 to phenylalanine leads to a significant destabilisation of the QTRT2 homodimer. This leads to a shift of the equilibrium towards the functional heterodimer. Presumably, the mutation also has an effect on the functional heterodimer, but to a lesser extent. The mutation of Ser 41 as well as Tyr 354 of QTRT2 also leads to a lower turnover rate of the heterodimer.

Based on the enzyme kinetic studies, it was shown that selectivity between bacterial and eukaryotic TGT can be achieved by addressing the ribose33 binding pocket with large-volume residues. In fact, inhibitors with *lin*-benzoguanine backbone substituted at position 2 showed hardly any inhibition of the eukaryotic TGT, whereas they inhibited the bacterial TGT partly in the single-digit nanomolar range. In addition to selected inhibitors, some known substrates of the eukaryotic TGT were also characterised enzyme-kinetically. Finally, a reaction mechanism could be postulated which explains the irreversible incorporation of queuine, preQ1 and 7-deazaguanine. Irreversible incorporation always occurs when the negative charge generated by the nucleophilic attack of the side chain of Asp279 on the C1 atom of the ribose sugar cannot be stabilised by the substrate in position 34.

5. Material und Methoden

5.1. Lösungsmittel und Reagenzien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Name und Hersteller der eingesetzten Lösungsmittel und Reagenzien.

Name	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/0,8%)	Roth
Agarose	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Ampicillin (Natrium-Salz)	Roth
<i>Biotinylated thrombin</i>	Novagen
Bromphenolblau	Merck
Chloramphenicol	Roth
Chloroform:Isoamylalkohol 24:1	Roth
<i>c0mplete™, EDTA free, Protease inhibitor cocktail tablets</i>	Roche
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth
<i>d</i> -Desthiobiotin	IBA
Dimethylsulfoxid (DMSO) p.a.	Roth
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth
Ethanol 96% p.a.	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Glycerol	Acros Organics
[8- ³ H]-Guanin	American Radiolabeled Chemicals (ARC)
Guanin-HCL	Sigma Aldrich
Hefeextrakt	Roth
2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoic acid (HABA)	Fluka
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
6x <i>Mass Ruler Loading Dye</i> (R0621)	Fermentas
β -Mercaptoethanol	Merck
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Roth

Methanol p.a.	Fluka
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat	Roth
Natriumhydroxid	Grüssing
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese
PageRuler™ Prestaint Protein Ladder (SM0671/2)	Fermentas
Pepton aus Casein	Roth
Phenol:Chloroform:isoamylalkohol 25:24:1	Sigma Aldrich
Polyethylenglycol MW 1000 (PEG1000)	Roth
Polyethylenglycol MW 6000 (PEG6000)	Roth
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamide:N,N- Methylenbisacrylamide 37.5:1)	Roth
Rotiphorese® 10x SDS-PAGE	Roth
Rotiszint®eco plus	Roth
Salzsäure	Grüssing
SYBR® Safe DNA Gel Färbelösung	Invitrogen
Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth
Tween20	Sigma Aldrich

5.2. Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Geräte des Arbeitskreises von Herrn Prof. G. Klebe und des Instituts für Pharmazeutische Chemie in Marburg.

Gerät	Hersteller
ÄKTA FPLC	GE Healthcare / Amersham Pharmacia Bioscience
Autoklav (Typ FVA2)	Fedegari

Dialysemembran Zellu Trans 4000 – 6000 MWCO	Roth
Electrophorese Zell OWL EASyCAST™ B1A	ThermoFisher Scientific
EmulsiFlex-C5™	AVESTIN
Feinwaage CP2 P	Sartorius
Feinwaage Type 404/13	Sauer
Nalgene™ Rapid-Flow™ Porengröße 0.2 µM	ThermoFisher Scientific
FiveEasy pH-Meter	Mettler Toledo
Hera Safe Sterilbank	ThermoFisher Scientific
HiTrap™ DEAE Sepharose Fast Flow	Cytiva
Mikroskop Typ SZ 60	Olympus
Mini-Zentrifuge IKA® mini G	IKA
Nanodrop 2000c Spectrophotometer	ThermoFisher Scientific
NAP™-25 Sephadex Säulen	GE Healthcare
Pipetten	Eppendorf
QuantStudio 3 Real Time PCR-Gerät	ThermoFisher Scientific
Schüttelinkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific
Schüttelinkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific
Schüttelinkubator Innova 43	New Brunswick Scientific
Speed-Vak Vakuumpumpe DNA mini	Jouan Nordic
<i>Strep</i> -Tactin® Superflow Sepharose Säule	IBA
Scintillationszähler Tri-Carb® 2810 TR	Perkin Elmer
Thermomixer comfort 1.5 mL	Eppendorf
Ultraschall Bad Elmasonic S10/(H)	Elma
VIVASPIN 20® 30.000 MWCO PES	Sartorius
VIVASPIN 2® 30.000 MWCO PES	Sartorius
Vortexer VF1 / VF2	Janke & Kunkel
Waage Typ 572/45	Kern
Zentrifuge Avanti J-10/ J-25	Beckman Coulter
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3	Heraeus

5.3. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
ptRNA2	Amp ^r ; E. coli <i>tRNA^{Tyr}</i> als <i>Bst</i> NI-Fragment, T7-Promotor in pTZ18U	[Curnow et al., 1993] ^[86]
pASK- IBA13plus_mTGT	Amp ^r , ColE1-origin, fl origin, Tet- Repressor, enthält <i>mQTRT1</i> als 1246 bp <i>Bsa</i> I / <i>Bsa</i> I Fragment in pASK-IBA13plus	Genart
pASK- IBA13plus_mQv1	Amp ^r , ColE1-origin, fl origin, T7- Promotor, enthält <i>mQTRTD1v1</i> als 1284 bp <i>Bsa</i> I / <i>Bsa</i> I Fragment in pASK-IBA13plus	Genart
pETDuet-1	Amp ^r , T7-Promotor, pBR322 ColE1, <i>lac</i> I; designet zur Koexpression von zwei Zielgenen	Novagen

5.4. Bakterienstämme

Stamm	Beschreibung	Hersteller
XL2-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^qZAM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Agilent Technologies
BL21 CodonPlus(DE3)- RIPL	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r ⁻ <i>BM⁻B</i>) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU proL</i> Cam ^r] [<i>argU ileY</i> <i>leuW</i> Strep/Spec ^r]	Agilent Technologies
BL21 (DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r ⁻ <i>BM⁻B</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^r)	Agilent Technologies
BL21 Gold (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r ⁻ <i>BM⁻B</i>) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal λ</i> (DE3) <i>endA Hte</i>	Agilent Technologies
Vmax Express cells	Extrazelluläre Nuklease <i>knockout</i> , zusätzliche IPTG-induzierbare T7 RNA Polymerase-Kassette	Synthetic Genomics

5.5. Puffer

Die Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser angesetzt. Außerdem wurden Puffer, die an der Äkta und für die Kristallisation verwendet wurden, sterilfiltriert.

Tabelle 10: Puffer und Lösungen, die im Rahmen der Chromatographie, *Thermal Shift Assay* Experimente und zur Präparation der tRNA verwendet wurden.

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
20 % PAA Stammlösung	8 M Urea, 20 % PAA (50 %, 48:2), 1x TBE ad 1 L ddH ₂ O
1x TBE	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0
2x Denaturierender Probenpuffer (DPP)	0,02 % (w/v) Bromphenolblau, 0,02 % (w/v) Xylencyanol, 2,6 M Harnstoff, 66 % (v/v) Formamid in 2x TBE Puffer
Assaypuffer	100 mM HEPES pH 7,3 20 mM MgCl ₂ 0,085% Tween20
Lysepuffer	100 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Elutionspuffer I	100 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM Biotin
Lithiumpuffer	100 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 750 mM LiCl
DEAE-Bindepuffer bzw.	15 mM Tris pH 7,5
Phenyl-Sepharose-Elutionspuffer	25 mM NaCl
DEAE-Elutionspuffer bzw.	15 mM Tris pH 7,5
Phenyl-Sepharose-Bindepuffer	1,5 M NaCl
Lagerpuffer	15 mM HEPES pH 7,5

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
	150 mM NaCl
	2 mM DTT

5.6. Medien

Tabelle 11: Zur Kultivierung der bakteriellen Zellen eingesetzte Medien.

Medium	Zusammensetzung
LB-Medium	1,0 % (w/v) Pepton aus Casein 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl pH 7,0, autoklaviert
LB-Agar	1,0 % (w/v) Pepton aus Casein 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl 1,5 % (w/v) Agar-Agar pH 7,0, autoklaviert
<i>Enhanced 2xYT Medium</i>	3,2 % (w/v) Pepton aus Casein 2,0 % (w/v) Hefeextrakt 1,7 % (w/v) NaCl 2,0 % (w/v) Glukose 17,6 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4, autoklaviert
2xYT Medium	1,8 % (w/v) Pepton aus Casein 1,0 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl pH 7,0, autoklaviert

5.7. Experimente mit Plasmid-DNA

5.7.1. Präparation der Plasmid-DNA

Zunächst wurde LB-Medium mit XL2-Blue Zellen unter der Sterilbank angeimpft. Es wurden jeweils 100 µL Ampicillin hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Mit Hilfe des PureYield™ Plasmid Miniprep Kit der Firma Promega wurde das entsprechende Plasmid gemäß des Herstellerprotokolls präpariert.

5.7.2. Amplifikation der Gene mittels PCR

Mit Hilfe des Phusion® High-Fidelity PCR Kit der Firma ThermoFisher Scientific wurden die entsprechenden Gene unter Verwendung der in Tabelle 12 aufgeführten Primer amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics hergestellt.

Tabelle 12: Im Rahmen der PCR eingesetzte Oligonukleotide.

Name	Sequenz von 5' zu 3'	Bemerkung
DUET1_mTGT_F1a	GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC GCA GCA GTT GGT AGT CCG G (40)	erste Stufe der PCR
DUET1_mTGT_F1b	GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC GAA AGC GCA CCG CG (35)	erste Stufe der PCR und Erstellung einer trunkierten Variante
DUET1_mTGT_F2	CT TAG GAT CCG CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CC (34)	zweite Stufe der PCR
DUET1_mTGT_R	GCT AAG CTT TCA GGT CAG CAT AAT ACC AAC GCT TG (35)	Einführung Restriktionsschnittstelle, nichtkodierender Strang
DUET_mQv1_F1	GTT CTG TTC CAG GGG CCC AAA CTG AGC CTG ATT AAA GTT G (40)	erste Stufe der PCR
DUET_mQv1_F2	CAG TTT GAG AAA GGT CTG GAA GTT CTG TTC CAG GGG CCC (39)	zweite Stufe der PCR
DUET_mQv1_F3	GTT CAT ATG TGG AGT CAC CCC CAG TTT GAG AAA GGT CTG GAA G (43)	dritte Stufe der PCR

Name	Sequenz von 5' zu 3'	Bemerkung
DUET_mQv1_R	GA ATT AAT TAA TCA AAA CAT CTG ACG ACA AAT CAG TTC (38)	Einführung Restriktionsschnittstelle, nichtkodierender Strang

Der Reaktionsansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen.

Tabelle 13: Reaktionsansatz der PCR zur Amplifikation der Gene.

	Volumen [μ l]	Endkonzentration
H ₂ O	ad 50 μ L	
5x Puffer	10	1x
dNTPs (10 mM)	1,0	200 μ M
Primer 1 (100 ng/ μ L)	1,5	3 ng/ μ L
Primer 2 (100 ng/ μ L)	1,5	3 ng/ μ L
DNA (100-200 ng/ μ l)	1,0	2-4 ng/ μ L
Polymerase (Phusion 2U/ μ l)	1,0	2 U
Endvolumen 50 μ l		

Der Ansatz wurde in ein 100 μ L PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Reaktion wurde in einem programmierten Thermocycler nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Tabelle 14: Programmiertes Protokoll der PCR

Schritt	T [$^{\circ}$ C]	Dauer	
Initiale Denaturierung	95	2 min	
Denaturierung	95	30 s	30 x
Primer-Anlagerung	55	30 s	
Elongation	72	2 min	
Finale Elongation	72	10 min	
-Ende-	4	∞	

5.7.3. Agarose-Gelelektrophorese und Isolation der DNA-Fragmente aus dem Gel

Zur Trennung der DNA-Fragmente wurde ein 1%iges Agarosegel (0,5 g Agarose in 49,5 mL TAE-Puffer) verwendet.^[98] Zur Detektion der Banden wurde SYBR™ Green der Firma Invitrogen hinzugefügt. Es wurden jeweils 20 µL der DNA-Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Als Maker wurde FastRuler DNA Ladder der Firma ThermoFisher Scientific in einer geeigneten Größe verwendet. Die Auftrennung der Proben wurde standardmäßig bei 90 V und ca. 450 mA für 30 bis 45 min durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Trennung der Banden wurden diese mit Hilfe von blauem Licht sichtbar gemacht und mit einem Skalpell herausgeschnitten. Zur Isolation der DNA-Fragmente aus dem Gel und anschließender Reinigung wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen verwendet. Die notwendigen Schritte wurden gemäß dem beiliegenden Protokoll durchgeführt.

5.7.4. Restriktion von Vektor-DNA

Um die Genkonstrukte in den gewünschten Vektor einzubringen, wurden sowohl das jeweilige Konstrukt als auch der Zielvektor mittels Restriktionsenzymen verdaut. Dazu wurde der folgende Ansatz standardmäßig verwendet. Nach Inkubation der Proben bei 37 °C für eine Stunde wurde der Ansatz wie unter Kapitel 5.7.3 gereinigt.

Tabelle 15: Reaktionsansatz der DNA-Proben. Die eingesetzten Restriktionsenzyme waren *High Fidelity* (HF) Varianten der Firma New England BioLabs.

	Volumen [µl]	Endkonzentration
H ₂ O	19	
rCutSmart™ Puffer (10x)	4,0	1x
DNA (100 ng/µL)	15	37,5 ng/µL
Restriktionsenzym 1 (20 U/µL)	1,0	0,5 U/µL
Restriktionsenzym 2 (20 U/µL)	1,0	0,5 U/µL
Endvolumen 40 µl		

5.7.5. Ligation

Um die verdauten DNA-Fragmente bestehend aus Zielvektor und Genkonstrukt zusammenzufügen, wurde ein Ansatz, der wie folgt zusammengesetzt war, für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 16: Reaktionsansatz zur Ligation.

	Volumen [μ l]	Endkonzentration
H ₂ O	5,0	
T4 Ligase Puffer (10x)	2,0	1x
Vektor-DNA (50 ng/ μ L)	10	25 ng/ μ L
Genkonstrukt (50 ng/ μ L)	2,0	5 ng/ μ L
T4-Ligase (5 U/ μ L)	1,0	0,25 U/ μ L
Endvolumen 20 μ l		

5.7.6. Transformation von *E. coli* nach dem Hitzeschock-Protokoll

Zu einem 45 μ L Aliquot aus kompetenten Zellen wurden 6 μ L eines Ligationsansatzes hinzugefügt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 30 Sekunden bei 42 °C durch Hitzeschock behandelt. Danach wurde der Ansatz für 10 min wieder auf Eis gegeben. Nachdem 650 μ L LB-Medium zu dem Ansatz gegeben wurde, wurde die Probe für eine Stunde bei 37 °C und 350 rpm im Thermomixer (Eppendorf) geschüttelt. Um ein kleineres Volumen auf die Platten ausbringen zu können, wurde der Ansatz bei 13000 rpm zentrifugiert. Danach wurden 600 μ L des Überstands verworfen und der Rest resuspendiert. Das resuspendierte Zellpellet wurde auf eine Agar-Platte mit einer Ampicillin-Konzentration von 100 μ M ausplattiert, welche dann bei 37 °C über Nacht inkubiert wurde.

5.7.7. Transformation von *V. natriegens* nach dem Hitzeschock-Protokoll

Ein Aliquot der Zellen wurde für 10 Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 2 µL der Plasmid-Lösung mit einer Konzentration von 25-50 ng/µL zu der Zellsuspension gegeben. Es folgte eine Inkubation auf Eis für eine Stunde. Während der Inkubation wurde 1 mL des mitgelieferten *Cell Recovery* Mediums in einem 14 mL-Falcon-Gefäß auf 37 °C erwärmt. Nach der Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen für 2 Minuten wieder auf Eis gelagert. Danach wurden die Zellen, die immer noch auf Eis lagerten, in das *Cell Recovery* Medium überführt. Um sämtliche Zellen in das Falcon-Gefäß zu überführen, wurden die verbleibenden Zelle mit 700 µL des Mediums aufgenommen. Das Falcon-Gefäß wurde für 2 Stunden in einem Schüttelinkubator bei 37 °C und 60 rpm inkubiert. Abschließend wurde der gesamte Ansatz auf zwei Agar-Platten mit einer Ampicillin-Konzentration von 12,5 µg/mL ausplattiert. Die Agar-Platten wurden dann über Nacht bei 35 °C inkubiert.

5.8. Mutation mittels Quick Change Lightning

Mit Hilfe des QuikChange Lightning Kit der Firma Agilent wurde das entsprechende Gen der nicht-katalytischen Untereinheit der Maus-TGT unter Verwendung der in Tabelle 17 aufgeführten Primer mutiert. Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics hergestellt.

Tabelle 17: Im Rahmen der Mutagenese eingesetzte Oligonukleotide. Die Basentriplets, die der Punktmutation zuzuordnen sind, sind fett gedruckt.

Name	Sequenz von 5' zu 3'	Bemerkung
QTRT2_Ser41Ala_F	CGT ACC GGT GCC GCA CCG CAT C (22)	Mutation von Serin41 zu Alanin
QTRT2_Ser41Ala_R	G ATG CGG TGC GGC ACC GGT ACG (22)	Mutation von Serin41 zu Alanin, nichtcodierender Strang
QTRT2_Tyr354Phe_F	GGT TGT AGC TGT TTT TGT TGC AAA AAT C (28)	Mutation von Tyrosin354 zu Phenylalanin
QTRT2_Tyr354Phe_R	G ATT TTT GCA ACA AAA ACA GCT ACA ACC (28)	Mutation von Tyrosin354 zu Phenylalanin, nichtcodierender Strang

Der Reaktionsansatz setzte sich dabei wie folgt zusammen.

Tabelle 18: Reaktionsansatz der PCR zur Amplifikation der Gene.

	Volumen [μ l]	Endkonzentration
H ₂ O	ad 50 μ L	
10x Puffer	5	1x
dNTPs (10 mM)	1,0	200 μ M
QuikSolution Reagenz	1,5	unbekannt
Primer 1 (100 ng/ μ L)	1,25	2,5 ng/ μ L
Primer 2 (100 ng/ μ L)	1,25	2,5 ng/ μ L
DNA (100-200 ng/ μ l)	1,0	2-4 ng/ μ L
QuikChange Lightning Enzym	1,0	unbekannt
Endvolumen 50 μ l		

Der Ansatz wurde in ein 100 μ L-PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Die Reaktion wurde in einem programmierten Thermocycler nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Tabelle 19: Programmiertes Protokoll der Mutagenese-PCR

Schritt	T [$^{\circ}$ C]	Dauer	
Initiale Denaturierung	95	2 min	
Denaturierung	95	20 s	18 x
Primer-Anlagerung	60	30 s	
Elongation	68	2 min	
Finale Elongation	68	2 min	
-Ende-	4	∞	

Nach dem PCR-Programm wurde der Ansatz in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 1,5 μ L des Restriktionsenzym *DpnI* hinzugefügt, um die Templat-DNA zu verdauen. Dies geschah durch Inkubation des Ansatzes für 1 h bei 37 $^{\circ}$ C. Danach erfolgte die Transformation in *E. coli*. (XL2 Blue). Von der ausplattierten und inkubierten Agar-Platte nach der Transformation wurden Einzelkolonien entnommen, die jeweils in ein neues Medium überführt wurden. Anhand dieser Proben wurden die jeweiligen Plasmide wie unter Kapitel 5.7.1 beschrieben gereinigt und durch die Firma Eurofins Genomics sequenziert.

5.9. Rekombinante Produktion des QTRT1/QTRT2-Heterodimers

Als Vorkultur wurden 100 mL *enh.* 2xYT Medium in einem 500 mL Erlenmeyerkolben und als Hauptkultur jeweils 2 L in einem 5 L Kolben verwendet. Die Kolben wurden vor dem Gebrauch autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde jeweils eine frisch hergestellte Ampicillin-Lösung (25 mg/mL) im Verhältnis 1:1000 hinzugefügt. Die Vorkultur wurde unter einer Sterilbank mit dem *V. natriegens* Stamm beimpft, der mit dem gewünschten Plasmid transformiert worden war. Die Vorkultur wurde bei 37 °C über Nacht bei 100 rpm geschüttelt. Nach dem Heranziehen der Zellen wurden 20 mL der Vorkultur zu der Hauptkultur gegeben. Unter regelmäßiger Kontrolle der optischen Dichte durch UV-Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde die Hauptkultur bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Sobald eine OD₆₀₀ von 1,0 erreicht wurde, wurden 2 mL einer 1 M IPTG-Lösung hinzugefügt, was die Expression des Zielgens induzierte. Gleichzeitig wurde die Temperatur von 37 °C auf 15 °C herabgesetzt, was das Wachstum der Zellen verlangsamen und die Bildung von Einschlusskörpern reduzieren sollte. Nach insgesamt 24 h bei 15 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation (Beckman Coulter, JA-10) bei 10000 rpm und 4 °C für 10 min geerntet. Das so erhaltene Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

5.10. Säulenchromatographische Reinigung des QTRT1/QTRT2-Heterodimers

Das zuvor aufgetaute Zellpellet wurde in etwa 100 mL Lysepuffer resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden durch Ultraschall (Sonifier 250, viermal 3 min, Einstellung: duty cycle 80 %, output control 3) lysiert. Während des Zellaufschlusses wurden die Zellen mit Eis gekühlt. Dabei wurde die Zellsuspension auf Eis gehalten. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden mittels Zentrifugation (Beckman Coulter, JA-25) bei 20000 rpm und 4 °C für 60 min abgetrennt. Der klare Überstand wurde dekantiert und unmittelbar danach weiterverarbeitet. Der Überstand wurde mit einer Flussrate von 1,0 mL/min auf eine mit Lysepuffer konditionierte *Strep-Tactin*TMXT SuperflowTM High Capacity Säule der Firma IBA Lifesciences aufgetragen. Nach dem Auftragen der Probe wurde die Säule zur weiteren Reinigung unter Fluss an eine FPLC-Anlage angeschlossen. Bei einer Flussrate von 1,5 mL/min wurde die Säule bis zum Erreichen der Basislinie mit Lysepuffer gespült. Zur Reduktion der unspezifisch gebundenen Nukleinsäure wurde die Säule danach mit Lithiumpuffer gespült bis die Basislinie wieder erreicht war. Es folgte das Spülen mit Lysepuffer bis die Leitfähigkeit wieder auf das

Ausgangsniveau abgesunken war. Anschließend wurde das Protein mit Elutionspuffer I bei einer Flussrate von 2,0 mL/min eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese identifiziert und vereinigt.

Um das *Strep-Tag* II an der QTRT2 sowie das *His₆-Tag* an der QTRT1 abzuspalten, wurde der Ansatz mit PreScission-Protease inkubiert. Die PreScission-Protease lag in Aliquots zu jeweils 1 mg vor. Unmittelbar nach der *Strep-Tactin*TMXT Säule wurde ein Aliquot hinzugefügt und die Probe bei 4 °C inkubiert. Nach 24 h wurde ein weiteres Aliquot zu dem Ansatz gegeben. Nach insgesamt 48 h wurde die Probe mit einer Flussrate von 1 mL/min auf eine mit Lysepuffer konditionierte GStapTM FF Säule der Firma GE Healthcare aufgetragen. Dabei befand sich das gewünschte Protein im Durchfluss. Um sämtliche PreScission-Protease aus der Proteinprobe zu entfernen, wurde der Durchfluss ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen und mit Lysepuffer nachgespült. Der proteinhaltige Durchfluss wurde mittels eines Vivaspin[®] Zentrifugalkonzentrators (Sartorius, MWCO 30.000) mit Phenyl-Sepharose-Bindepuffer umgepuffert und dann auf ein Volumen von ca. 8 mL konzentriert.

Die Proteinprobe wurde bei einer Flussrate von 1,5 mL/min auf eine mit Phenyl-Sepharose-Bindepuffer konditionierte HiPrepTM-Säule (Phenyl High Performance 16/10, GE Healthcare) aufgetragen. Nach dem Auftragen wurde der Anteil an Phenyl-Sepharose-Elutionspuffer innerhalb von 35 mL von 0 auf 100 % erhöht. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese identifiziert und vereinigt. Die sauberen proteinhaltigen Fraktionen wurden mit Hilfe eines Vivaspin[®] Zentrifugalkonzentrators (Sartorius, MWCO 30.000) mit Lagerpuffer umgepuffert und dann auf eine Konzentration von 8,0 mg/mL eingestellt. Das erhaltene Konzentrat wurde zu jeweils 100 µL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.11. Rekombinante Produktion der QTRT1 und der QTRT2-Varianten

Als Vorkultur wurden 100 mL 2xYT Medium in einem 500 mL Erlenmeyerkolben und als Hauptkultur jeweils 2 L in einem 5 L Kolben verwendet. Die Kolben wurden vor dem Gebrauch autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde jeweils eine frisch hergestellte Ampicillin-Lösung (100 mg/mL) im Verhältnis 1:1000 hinzugefügt. Die Vorkultur wurde unter einer Sterilbank mit dem *E. coli* XL2Blue Stamm beimpft, der mit dem gewünschten Plasmid transformiert war. Die Vorkultur wurde bei 37 °C über Nacht bei 100 rpm geschüttelt. Nach dem Heranziehen der Zellen wurden 20 mL der Vorkultur zu der Hauptkultur gegeben. Unter

regelmäßiger Kontrolle der optischen Dichte durch UV-Vis-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde die Hauptkultur bei 37 °C und 100 rpm inkubiert. Sobald eine OD_{600} von 0,6 erreicht war, wurden 200 µL einer 200 µM Anhydrotetracyclin-Lösung hinzugefügt, was die Expression des Zielgens induzierte. Gleichzeitig wurde die Temperatur von 37 °C auf 15 °C herabgesetzt, was das Wachstum der Zellen verlangsamen und die Bildung von Einschlusskörpern reduzieren sollte. Nach insgesamt 26 h bei 15 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation (Beckman Coulter, JA-10) bei 10000 rpm und 4 °C für 10 min geerntet. Das so erhaltene Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

5.12. Säulenchromatographische Reinigung der QTRT1 und der QTRT2-Varianten

Die Affinitätschromatographie wurde analog zu dem QTRT1/QTRT2-Heterodimer durchgeführt, allerdings war der zusätzliche Reinigungsschritt mit Lithiumpuffer nicht notwendig. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden mithilfe eines Vivaspin® Zentrifugalkonzentrators (Sartorius, MWCO 30.000) auf ein Volumen von ca. 8 mL konzentriert. Die Proteinlösung wurde anschließend auf eine mit Lagerpuffer konditionierte HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 prep grade Säule mit einer Flussrate von 2,0 mL/min aufgetragen. Die Elution erfolgte isokratisch ebenfalls mit Lagerpuffer bei einer Flussrate von 2,0 mL/min. Die Fraktionen mit sauberem Protein wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese identifiziert, vereinigt und wie bereits beschrieben auf das gewünschte Volumen eingengt. Zur Entfernung des *Strep-Tag II*® wurde das *Thrombin Cleavage Capture Kit* der Firma Novagen nach dem beigefügten Protokoll verwendet. Dazu wurde die Proteinprobe mit dem *Thrombin-Cleavage-Puffer* (10x) und biotinyliertem Thrombin versetzt. Die verwendete Menge Thrombin entsprach stets 0,75 U/mg Protein. Der Ansatz wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Um das abgeschnittene *Tag* und das biotinylierte Thrombin zu entfernen, wurden 32 µL einer 50 % Streptavidinsuspension pro 1 U Thrombin zu der Lösung gegeben. Das Reaktionsgefäß wurde während der Inkubationszeit von 30 min regelmäßig invertiert. Die Suspension wurde auf eine Filtersäule in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und zentrifugiert. So wurde das Streptavidin entfernt. Die Proteinlösung wurden mit Hilfe eines Vivaspin® Zentrifugalkonzentrators (Sartorius, MWCO 30.000) mit Lagerpuffer umgepuffert und dann auf eine Konzentration von 8,0 mg/mL eingestellt.

5.13. *Thermal Shift Assay*

Zur Ermittlung von geeigneten Pufferbedingungen und Kristallisationsadditiven wurde das *Thermal Shift Assay* (TSA) eingesetzt. Dieses wurde an einem QuantStudio 3 der Firma ThermoFisher Scientific durchgeführt. Für die Messung wurde eine Proteinlösung mit einer Konzentration von 8 mg/mL verwendet. Die einzelnen Proben wurden direkt in einem *Well* einer 0,8 mL 96-*Well*-PCR-Platte zusammen pipettiert. Dabei wurden 16 μ L des jeweils verwendeten Puffers, standardmäßig Lagerpuffer, vorgelegt und mit jeweils 2 μ L der Proteinlösung und der zehnfachen Lösung des jeweils zu untersuchenden Additivs ergänzt. Dem verwendeten Puffer wurde zuvor das 5000x SYPRO-Orange Konzentrat der Firma Invitrogen im Verhältnis 1:500 zugesetzt. Zur Ermittlung der Schmelzkurve wurde die 96-*Well*-Platte auf 10 °C gekühlt und anschließend auf 90 °C mit einer Steigerungsrate von 0,05 °C/s erhitzt. Die ermittelte Schmelztemperatur entsprach dabei dem Wendepunkt der Auftragung von Fluoreszenz gegen die Temperatur. Es fand stets eine dreifache Bestimmung der Messwerte statt.

5.14. Kristallisationsexperimente mit dem QTRT1/QTRT2 Heterodimer

5.14.1. Allgemeine Präparation der Kristallisationstropfen

Vor der Präparation der Kristalltropfen wurden die verwendeten Proben des QTRT1/QTRT2 Heterodimers (7.5 mg/mL, 15 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT) mindestens 60 min bei 16000 x g zentrifugiert und vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um eine monodisperse Lösung zu erhalten. Die Tropfen wurden nach der Methode des sitzenden Tropfens und Dampfdiffusion angesetzt. Es wurden 2 µL der Proteinlösung jeweils auf die Stempel der Kristallplatte aufgetragen. In den Fällen, in denen das Additiv TEW verwendet wurde, wurde dieses vorher in einer Konzentration von 1 mM in die Proteinlösung gegeben. Anschließend wurden 2 µL der jeweiligen Kristallisationslösung hinzugefügt. Das Volumen des Reservoirs betrug stets 500 µL. Die Kristallplatten wurden bei 18 °C inkubiert. Bereits nach einigen Tagen konnte Kristallwachstum beobachtet werden, das meist nach zehn Tagen abgeschlossen war. Für die Datensammlung wurden die Kristalle mit Hilfe einer Nylonschleife in einen Kryopuffer überführt, der aus dem jeweiligen Kristallisationspuffer und 25 % w/v Glycerol oder 25 % w/v PEG 200 bestand. Nachdem die Kristalle im Kryopuffer circa zwei Minuten inkubiert worden waren, wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Datensammlung in flüssigem Stickstoff gelagert.

5.14.2. Ko-Kristallisation mit dem QTRT1/QTRT2-Heterodimer

Anhand der TEW-haltigen Bedingung JCSG Core II E1 (100 mM Natriumkaliumphosphat pH 6.8, 200 mM NaCl, 14 % w/v PEG 1000) wurden Ko-Kristallisationsversuche mit verschiedenen Liganden durchgeführt. Abweichend zur allgemeinen Vorschrift wurde lediglich jeweils ein bestimmter Ligand in unterschiedlicher Konzentration der Kristallisationslösung hinzugefügt. Im Falle der erfolgreich erhaltenen Komplexstruktur mit Queuin (PDB-Code: 7OWZ) betrug die Queuin-Konzentration in der Kristallisationslösung 0,5 mM. Hier bestand der verwendete Kryopuffer aus dem Kristallisationspuffer mit 25 % w/v Glycerol. Zusätzlich wurde dem Kryopuffer jeweils der Ligand in der gleichen Konzentration bezogen auf die Kristallisationslösung hinzugefügt.

5.14.3. *Soaking*-Versuche mit dem QTRT1/QTRT2-Heterodimer

Anhand der Bedingung JCSG Core II E9 (100 mM Natriumcitrat pH 5.9, 700 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 M Li_2SO_4) wurden *Soaking*-Versuche durchgeführt. Dazu wurden die Kristallplatten analog zu der allgemeinen Vorschrift angesetzt. Da nach der Kristallisation mit Citrat-haltigen Puffern die Substratbindetasche der QTRT1 mit einem Citrat-Molekül besetzt ist, muss dieses zunächst entfernt werden, um eine Überlagerung von Strukturen in der resultierenden Elektronendichtekarte zu vermeiden. Dazu wurden die Kristalle zunächst in einen weiteren Puffer überführt, dessen Zusammensetzung der des Kristallisationspuffers entsprach mit dem einzigen Unterschied, dass Citrat vollständig durch MES ersetzt war. Nach einer Inkubation von zwei Minuten war das zuvor gebundene Citrat-Molekül bereits weitgehend aus dem Kristall entfernt, was anhand der Apo-Struktur (PDB-Code: 7OV9) gezeigt wurde. Von den zu untersuchenden Liganden wurden Lösungen in DMSO mit einer Konzentration von 100 mM oder, wenn das aufgrund der Löslichkeit nicht möglich war, gesättigte Lösungen erstellt. Anschließend wurden 92 Teile des MES-Puffers mit 8 Teilen der jeweiligen DMSO-Lösung vermischt und der Kristall darin überführt. Bei jedem Liganden wurden Kristalle mit unterschiedlicher Inkubationszeit auf ihr Diffraktionsvermögen untersucht. Im Falle der Komplexstruktur mit Queuin (PDB-Code: 7OVO) betrug die Substrat-Konzentration im finalen Tropfen 8 mM und die Einwirkzeit zehn Minuten. Der Kryopuffer enthielt neben 25 % w/v PEG 200 8 % w/v der jeweiligen DMSO-Lösung der Liganden. Die Kristalle wurden für eine Minute in dem Kryopuffer inkubiert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert.

5.15. Datensammlung, Prozessierung und Verfeinerung

Die Datensätze wurden bei 100 K an der *Beamline* 14.1 des Synchrotrons BESSY II (Helmholtz Zentrum, Berlin) gesammelt. Die Prozessierung und Skalierung der Datensätze wurden mit dem Programm *XDSAPP*^[99] durchgeführt. Mit dem Programm CCP4 *Phaser*^[71] wurde die Methode des molekularen Ersatzes unter der Verwendung der PDB-Strukturen QTRT1 (6H62) und QTRT2^[33] (6FV5) durchgeführt. Zu Beginn der Verfeinerung erfolgte ein *Simulated Annealing* (Cartesian) der Struktur mit dem Programm *Phenix*.^[100,101] Anschließend wurden die Strukturen in iterativen Zyklen mit dem Programm *Phenix*^[100] verfeinert und das jeweils erhaltene Modell mit *Coot*^[102] bearbeitet. Es wurden in jedem Fall über fünf Zyklen die XYZ-Koordinaten (reziproker Raum) und die Besetzung der Atome verfeinert (bei Besetzung \neq 100 %). Anschließend erfolgte eine TLS-Verfeinerung mit jeweils fünf Gruppen pro Proteinmolekül. Die Verfeinerung der *B*-Werte erfolgte bei Strukturen, die das Polyoxometallat TEW beinhalteten, in Gruppen, während bei den übrigen Strukturen die individuellen *B*-Werte isotrop und individuell verfeinert wurden. Die Verfeinerungszyklen dienten der Verbesserung des Modells, was in der Regel mit einer Reduktion des *R*-Wertes einhergeht. Wassermoleküle und Liganden wurden nur eingebaut, wenn die zugehörige F_O-F_C Differenzelektronendichte bei $3,0 \sigma$ eindeutig zu erkennen war. Aminosäuren, Liganden, Wassermoleküle oder einzelne Atome, die nicht eindeutig in der $2F_O-F_C$ Elektronendichte zu erkennen waren, wurden nicht in das jeweilige Modell eingebaut. Wasserstoffatome wurden bei keiner Struktur eingebaut, da dies jeweils zu keiner Verbesserung des *R*-Werts geführt hat. Die kristallographischen Informationsdateien (cif-Dateien) der organischen Liganden (außer Queuin) wurden mit Hilfe von *Mogul*^[103,104] auf dem Grade Web Server^[105] erstellt. Für die anorganischen Polyoxometallate konnten die cif-Dateien mit Hilfe des Moduls *eLBOW* von *Phenix*^[100,106] unter Verwendung der Koordinatendateien^[65,83] ohne weitere Optimierung erzeugt werden. Die Struktur von Queuin wurde mit Hilfe des Programms *MOE*^[107] unter Verwendung des Kraftfelds *mmff94x* generiert. Liganden und alternative Konformationen wurden nur eingebaut, wenn die jeweilige Besetzung mindestens 20 % betrug. Wassermoleküle wurden hingegen entweder zu 100 % besetzt eingebaut oder zu 50 %, sofern das entsprechende Wassermolekül mit einer alternativen Konformation einer Seitenkette korrespondierte. Zur Validierung der Strukturen wurden die Bindungswinkel der Hauptketten (Ramachandran-Diagramm) mit dem Programm *PROCHECK*^[108] und die mittleren *B*-Faktoren mit *Moleman*^[109] berechnet. Die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Darstellungen wurden mit dem Programm *Pymol*^[110] erzeugt.

5.16. Enzymkinetische Messungen

5.16.1. Herstellung der linearisierten Templat-DNA

Die *E. coli* tRNA^{Tyr} wurde via *in vitro* Transkription nach einer modifizierten Methode nach Curnow *et al.* hergestellt.^[86]

Das Plasmid ptRNA2 codiert die *E. coli* tRNA^{Tyr}. Es wurden 2 L LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt und anschließend mit ptRNA2 haltigen XL2-blue Zellen angeimpft und bei 37 °C für 19 Stunden inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (Beckman Coulter, JA-10) bei 10000 rpm und 4 °C. Aus den geernteten Zellen wurde das Plasmid mit Hilfe des Plasmid MidiPrep KitTM der Firma Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die erhaltene Plasmidlösung wurde auf eine Konzentration von 125 µg/mL eingestellt. Für den Restriktionsverdau wurden 100 µL 10x FastDigestTM Puffer und 100 µL FastDigestTM Mval der Firma ThermoFisher zu 800 µL der Plasmidlösung hinzugegeben. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. Nach dem Verdau wurde das gleiche Volumen einer Mischung aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 hinzugegeben, um das Produkt zu isolieren. Das DNA-Fragment wurde in die wässrige Phase ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde verworfen. Anschließend wurde die wässrige Phase mit dem gleichen Volumen aus Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1 versetzt. Das DNA-Fragment wurde dabei wieder in die wässrige Phase ausgeschüttelt und die organische Phase wurde verworfen. Die wässrige Phase wurde schließlich auf eine mit ddH₂O (steril) äquilibrierte NAPTM25 Säule aufgetragen und mit 4,0 mL ddH₂O (steril) eluiert. Das Eluat wurde unter Vakuum trockenrotiert und anschließend rückgelöst. Dabei wurde eine Konzentration von 1 µg/µL eingestellt.

5.16.2. T7 *in vitro* Transkription

Für die Transkription der DNA zur gewünschten RNA wird folgender Ansatz aus Tabelle 20 (1 mL) bei 37 °C für 4 h inkubiert.^[87]

Tabelle 20: Ansatz der T7 *in vitro* Transkription. Aufgelistet sind die Endkonzentrationen des präparativen Ansatzes.

Reaktionsansatz	
MgCl ₂	20 mM
HEPES, pH 7,5	80 mM
Spermidin	1 mM
DTT	5 mM
Pyrophosphatase	0,05 U
Je NTP	3,75 mM
DMSO	5 %
T7 RNA Polymerase	50 U
Templat DNA, linear	30 µg

Nach 2 h wurde erneut die gleiche Menge T7 RNA Polymerase hinzugegeben. Der Ansatz wurde nach der Inkubation analog zur DNA mit Phenol-Chloroform gereinigt. Allerdings wurde an dieser Stelle saures Phenol verwendet. Das so gereinigte Produkt wurde mit Ethanol gefällt und anschließend in ddH₂O (steril) rückgelöst.

5.16.3. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Das rückgelöste Rohprodukt wurde mit dem gleichen Volumen 2x DPP versetzt. Zur Herstellung des Polyacrylamid-Gels (PAA) wurde die 20 % PAA Stammlösung mit 1x TBE Puffer auf 8 % verdünnt. Die Polymerisationsreaktion von PAA wurde durch die Zugabe von 1/1000 V TEMED und 1/100 V APS gestartet. Die in 1x DPP gelösten Proben wurden in die Probenaschen des PAA-Gels pipettiert und das Gel in 1x TBE Puffer gefahren. Die angelegte Stromstärke wurde zwischen 10 und 30 mA eingestellt. Das Gel wurde nach ausreichender Migration des gewählten Farbstoffs gestoppt und mittels UV *shattering* bei 580 nm untersucht. Die gewünschte Bande wurde markiert und anschließend mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden mit 1 M NaOAc versetzt und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Am

nächsten Tag wurden die Gelstücke durch Filtration entfernt und die gefilterte Lösung mit dem 2,5-fachen Volumen an Ethanol p.a. versetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei -80 °C gelagert und anschließend mit 20000 rpm bei 4 °C für 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das erhaltene Pellet getrocknet. Die tRNA wurde rückgelöst und die Konzentration wurde auf 200 µM eingestellt.

GGU GGG GUU CCC GAG CGG CCA AAG GGA GCA GAC UGU AAA UCU GCC GUC
AUC GAC UUC GAA GGU UCG AAU CCU UCC CCC ACC ACC A

Molekulargewicht: 27351,5 Da

ϵ (260 nm) = 33,3 mL/mg·cm (Wasser)

5.16.4. Allgemeine Durchführung des Radioaktivassays

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Methode zur Bestimmung der kinetischen Parameter orientiert sich an bereits veröffentlichten Arbeiten.^[85,96]

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden 76 µL des Reaktionsansatzes bei 37 °C inkubiert. Zunächst wurden 38 µL einer Lösung bestehend aus 7,5%igem [8-³H]-Guanin (American Radiolabeled Chemicals), *E. coli* tRNA^{Tyr} und einem optionalen Inhibitor in Assaypuffer pipettiert. Die Konzentrationen der einzelnen Komponenten variierten je nach Zielsetzung des Experiments. Die verwendeten Inhibitoren wurden in 50% DMSO gelöst, so dass die finale Lösung 5% DMSO beinhaltet. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Enzyms (TGT in 38 µL Assaypuffer) gestartet. Die Lösungen wurden vorher für 10 min auf 37 °C erwärmt. Es wurde im Intervall von 4 min jeweils ein Volumen von 15 µL entnommen und auf ein Filterpapier (Glasfaserfilter GMC, Sartorius) pipettiert und dieses wurde direkt in eine 10%ige TCA-Lösung bei 0 °C getaucht, um die Reaktion zu beenden und die tRNA auf den Filtern auszufällen. Die Filter wurden einmal für 10 min in 10%iger TCA-Lösung, zweimal für 10 min in 5%iger TCA-Lösung und abschließend für 20 min in Ethanol 96% p.a. gewaschen. Die Filter wurden in Szintillationsröhrchen überführt und bei 60 °C für 40 min getrocknet. Die Filter wurden anschließend mit 4 mL Scintillationscocktail für lipophile Proben (Rotiszint[®] eco plus, Roth) versetzt. Die Radioaktivität der in die tRNA eingebauten Tritiumatome wurden mit Hilfe des Scintillationszählers Tri-Carb[®] 2810 TR (Perkin Elmer) quantifiziert.

5.16.5. Bestimmung der kinetischen Parameter

Die kinetischen Parameter der Substrate wurden separat und jeweils in Doppelbestimmung bei einer Enzymkonzentration von 75 nM gemessen. Bei der Bestimmung von Hemmkonstanten wurde eine Enzymkonzentration von 37,5 nM eingesetzt. Zur Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter für tRNA^{Tyr} erfolgte die Messung bei einer konstanten Konzentration an 7,5%igem [8-³H]-Guanin von 10 μM und variabler tRNA^{Tyr}-Konzentration (0,26 - 15 μM). Zur Bestimmung der Guanin-Parameter wurde analog eine konstante tRNA^{Tyr}-Konzentration von 6 μM und eine variable [8-³H]-Guanin-Konzentration (7,5% radioaktiv markiert) verwendet. Die Rohdaten der Messungen werden zunächst in *counts per minute* (cpm) erhalten. Um die entsprechende Stoffmengenkonzentration zu ermitteln, wurde eine Kalibriergerade mit [8-³H]-Guanin erstellt. Die Bestimmung der Initialgeschwindigkeit erfolgte durch lineare Progression mit Hilfe des Programms Prism (GraphPad). Die Initialgeschwindigkeiten wurden gegen die Substratkonzentration aufgetragen. Anhand der so erhaltenen Michaelis-Menten-Diagramme wurde die Maximalgeschwindigkeit v_{\max} und der jeweilige K_m -Wert ermittelt.

Zur Ermittlung der Hemmkonstanten wurde die finale Enzymkonzentration auf 37,5 nM gesenkt, um niedrigere Inhibitorkonzentrationen messen zu können. Die Konzentration der 7,5%igen [8-³H]-Guanin-Mischung betrug stets 0,5 μM und die tRNA^{Tyr}-Konzentration 1,5 μM. Es wurden 8 μL einer 10fachen Inhibitorlösung in 50 %DMSO mit 12 μL Assaypuffer und 20 μL Enzymlösung vermischt. Zum Start der Reaktion wurden 38 μL dieser Lösung zu der [8-³H]-Guanin/tRNA^{Tyr}-Lösung pipettiert.

Im Falle des *washout*-Assays^[24] wurde eine sättigende Konzentration Tritium-markierter tRNA^{Tyr} (6,0 μM) sowie das jeweilige Substrat in einer Konzentration, die mindestens dem Fünffachen des zuvor bestimmten K_i -Werts entsprach, eingesetzt. Die Tritium-markierte tRNA^{Tyr} wurde dabei in einem Verhältnis 1:10 der nicht-markierten tRNA^{Tyr} zugesetzt, weil die Ausbeute der Tritium-Markierung mäßig und die Signalintensität der Verdünnung immer noch sehr hoch ist. Die Reaktionszeit betrug in der Regel 39 Minuten, konnte aber je nach Substrat angepasst werden, um einen signifikanten Umsatz beobachten zu können. Die erhaltenen Umsatzkurven entsprachen dabei der Maximalgeschwindigkeit der Enzymreaktion mit dem jeweiligen Substrat.

5.16.6. Berechnung der K_i -Werte bei Inhibitoren der Maus-TGT

Analog zu der oben beschriebenen Methode wurde die Anfangsgeschwindigkeit (v_i) in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration bestimmt. Die Anfangsgeschwindigkeit (v_i) in Anwesenheit eines Inhibitors wird gemäß der Methode nach Dixon durch die folgende Formel beschrieben.^[111]

$$v_i = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

Formel 1: Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit in Anwesenheit eines Inhibitors gemäß Dixon.^[111]

Da die maximale Initialgeschwindigkeit ohne Inhibitor von Messung zu Messung geringfügig variiert, wurde bei jeder Messung eine Messreihe zur Bestimmung der maximalen Anfangsgeschwindigkeit durchgeführt. Dabei gilt folgender Zusammenhang.

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Formel 2: Berechnung der Initialgeschwindigkeit (v_0) ohne Inhibitor nach Dixon.^[111]

Durch Kombination der Formeln 1 und 2 erhält man Formel 3, welche zur Berechnung der Inhibitorkonstanten genutzt wurde. Die Gleichung beschreibt einen linearen Zusammenhang in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration. Die Steigung entspricht dem Kehrwert der Inhibitorkonstanten. Der Wert für die Ordinate (zur vereinfachten Darstellung wird der gesamte Term in GraphPad als „y“ bezeichnet) wurde für jede Messreihe berechnet. Mit Hilfe des Programms GraphPad Prism wurde die Inhibitorkonstante bestimmt.

$$v_i = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \cup \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \rightarrow \frac{v_0}{v_i} \cdot \frac{K_m + [S]}{K_m} = \frac{1}{K_i} \cdot [I] + \left(\frac{[S]}{K_m} + 1\right)$$

v_0	Initialgeschwindigkeit ohne Inhibitor
v_i	Initialgeschwindigkeit mit Inhibitor
K_m	Michaelis-Menten Konstante des Substrats
K_i	Inhibitorkonstante
$[S]$	Substratkonzentration
$[I]$	Inhibitorkonzentration

Formel 3: Kombination aus Formel 1 und 2 zur Berechnung der Inhibitorkonstanten K_i .

Im Falle von Inhibitoren, die aufgrund ihrer Struktur kompetitiv gegenüber der tRNA^{Tyr} binden, wurden für $[S]$ und K_m die Werte der tRNA^{Tyr} eingesetzt. Bei Inhibitoren, die mit Guanin um die Bindung an das aktive Zentrum konkurrieren, wurden dementsprechend die Werte für Guanin eingesetzt.

5.17. Herstellung und Reinigung Tritium-markierter tRNA^{Tyr}

Um die tRNA^{Tyr} für das *washout*-Assay radioaktiv zu markieren, wurden 500 μ L eines Ansatzes bestehend aus 10 μ M tRNA^{Tyr}, 1,5 μ M [8-³H]-Guanin und 700 nM QTRT1/2 für 5 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Reaktion wurde das gleiche Volumen eines 1:1 Gemisches aus Chloroform und saurem Phenol (pH 4,5) hinzugefügt. Die Tritium-markierte tRNA^{Tyr} wurde in die wässrige Phase ausgeschüttelt. Zur vollständigen Trennung der Phasen wurde der Ansatz für 5 min bei 16000 xg zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 0,1 Volumenanteil einer 3 M Natriumacetat-Lösung sowie 2 Volumenanteile 96 %iger Ethanol. Die Lösung wurde über Nacht bei -20 °C gelagert und am nächsten Tag für 20 min bei 16000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das erhaltene Pellet mit eisgekühltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach der Trocknung wurde das Pellet in RNase-freiem Wasser rückgelöst. Es folgte eine photometrische Bestimmung der Konzentration analog zu der bereits beschriebenen Methode. Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurde die Radioaktivität der in die tRNA eingebauten [8-³H]-Guaninmoleküle mit Hilfe des Scintillationszählers Tri-Carb[®] 2810 TR (Perkin Elmer) quantifiziert. Durch den Vergleich der ermittelten Stoffmenge durch den Scintillationszähler und der photometrisch ermittelten tRNA^{Tyr}-Konzentration wurde die Markierungseffizienz

berechnet. Um zu überprüfen, dass die Radioaktivität ausschließlich auf die markierte tRNA^{Tyr} und nicht auf Rückstände der nicht eingebauten [8-³H]-Guaninmoleküle zurückzuführen ist, wurde eine Probe der markierten tRNA^{Tyr} auf ein Filterpapier gegeben und analog zu der allgemeinen Durchführung des Radioaktivassays gewaschen. Im Vergleich zu der Probe, die nicht gewaschen, sondern direkt vermessen wurde, konnte kein Unterschied der Radioaktivität beobachtet werden.

5.17.1. Herstellung und Reinigung kovalenter TGT-tRNA-Komplexe

Zur Herstellung kovalenter Komplexe mit Vollängen-tRNA wurde das Heterodimer der eukaryotischen TGT (10 µM), tRNA^{Tyr} (20 µM) und 9-Deazaguanin in *Trapping*-Puffer (10 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA) bei 37 °C für 1,5 h inkubiert. Der Ansatz wurde in einen salzarmen Puffer (15 mM Tris pH 7.5, 25 mM NaCl) überführt. Dem Puffer wurde zusätzlich 50 µM 9-Deazaguanin zugesetzt, um das Intermediat zu stabilisieren. Die umgepufferte Probe wurde bei niedriger Flussrate auf eine MonoQTM 4.6/100 PE-Säule aufgetragen. Nach dem Auftragen der Probe wurde der Anteil des Elutionspuffers (15 mM Tris, 1.5 M NaCl, pH 7.5) im Fließmittel innerhalb von 80 mL von 0 auf 40 % gesteigert. Jeder Fraktion wurde unmittelbar nach der Elution wiederum 50 µM 9-Deazaguanin zugesetzt. Die Proteinlösung wurden mit Hilfe eines Vivaspin[®] Zentrifugalkonzentrators (Sartorius, MWCO 30.000) in salzarmen Puffer (15 mM Tris pH 7.5, 25 mM NaCl) überführt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Methode nach Bradford verwendet.

Die Herstellung kovalenter Komplexe mit der verkürzten RNA-Sequenz (5' AGC ACG GCU GUA AAC CGU GC 3', hergestellt durch Horizon Discovery LTD) wurde analog durchgeführt. Die Konzentration des Oligomers wurde dabei variiert.

6. Literaturverzeichnis

- [1] F. H. C. Crick, Codon—anticodon pairing: The wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* **1966**, *19*, 548–555.
- [2] I. Avcilar-Kucukgoze, A. Kashina, Hijacking tRNAs From Translation: Regulatory Functions of tRNAs in Mammalian Cell Physiology. *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 1–17.
- [3] H. Grosjean, V. de Crécy-Lagard, C. Marck, Deciphering synonymous codons in the three domains of life: Co-evolution with specific tRNA modification enzymes. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 252–264.
- [4] P. F. Agris, E. R. Eruysal, A. Narendran, V. Y. P. Väre, S. Vangaveti, S. V Ranganathan, Celebrating wobble decoding: Half a century and still much is new. *RNA Biol.* **2018**, *15*, 537–553.
- [5] T. Suzuki, Biosynthesis and function of tRNA wobble modifications BT - Fine-Tuning of RNA Functions by Modification and Editing. in (Ed.: H. Grosjean), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2005**, pp. 23–69.
- [6] K. B. Gromadski, T. Daviter, M. V Rodnina, A Uniform Response to Mismatches in Codon-Anticodon Complexes Ensures Ribosomal Fidelity. *Mol. Cell* **2006**, *21*, 369–377.
- [7] J. M. Ogle, D. E. Brodersen, W. M. J. Clemons, M. J. Tarry, A. P. Carter, V. Ramakrishnan, Recognition of cognate transfer RNA by the 30S ribosomal subunit. *Science* **2001**, *292*, 897–902.
- [8] U. L. RajBhandary, H. P. Ghosh, D. Davies, Studies on Polynucleotides: XCI. Yeast Methionine Transfer Ribonucleic Acid: Purification, Properties, and Terminal Nucleotide Sequences. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 1104–1113.
- [9] H. Goodman, J. Abelson, A. Landy, S. Brenner, J. D. Smith, Amber Suppression: a Nucleotide Change in the Anticodon of a Tyrosine Transfer RNA. *Nature* **1968**, *217*, 1019–1024.
- [10] H. M. Goodman, J. N. Abelson, A. Landy, S. Zadrazil, J. D. Smith, The nucleotide sequences of tyrosine transfer RNAs of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **1970**, *13*, 461–483.

- [11] B. P. Doctor, J. E. Loebel, M. A. Sodd, D. B. Winter, Nucleotide sequence of Escherichia coli tyrosine transfer ribonucleic acid. *Science* **1969**, *163*, 693–695.
- [12] F. Harada, S. Nishimura, Possible anticodon sequences of tRNA^{His}, tRNA^{Asn}, and tRNA^{Asp} from Escherichia coli. Universal presence of nucleoside O in the first position of the anticodons of these transfer ribonucleic acid. *Biochemistry* **1972**, *11*, 301–308.
- [13] C. E. Singer, G. . Smith, Histidine regulation in Salmonella typhimurium XIII. Nucleotide se-quence of histidine transfer ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **1972**, *247*.
- [14] B. N. White, G. Tener, J. Holden, D. T. Suzuki, Activity of a transfer RNA modifying en-zyme during the development of Drosophila and its relationship to the su(s) locus. *J. Mol. Biol.* **1973**, *74*.
- [15] H. Kasai, Z. Ohashi, F. Harada, S. Nishimura, N. J. Oppenheimer, P. F. Crain, J. G. Liehr, D. L. von Minden, J. A. McCloskey, Structure of the modified nucleoside Q isolated from Escherichia coli transfer ribonucleic acid. 7-(4,5-cis-dihydroxy-1-cyclopenten-3-ylaminomethyl)-7-deazaguanosine. *Biochemistry* **1975**, *14*.
- [16] T. Ohgi, T. Goto, H. Kasai, S. Nishimura, Stereochemistry of the cyclopentene side chain in the nucleoside Q obtained from Escherichia Coli tRNA. *Tetrahedron Lett.* **1976**, *17*, 367–370.
- [17] S. Yokoyama, T. Miyazawa, Y. Iitaka, Z. Yamaizumi, H. Kasai, S. Nishimura, Three-dimensional structure of hyper-modified nucleoside Q located in the wobbling position of tRNA. *Nature* **1979**, *282*, 107–109.
- [18] Y. C. Chen, A. F. Brooks, D. M. Goodenough-Lashua, J. D. Kittendorf, H. D. Showalter, G. A. Garcia, Evolution of eukaryal tRNA-guanine transglycosylase: Insight gained from the heterocyclic substrate recognition by the wild-type and mutant human and Escherichia coli tRNA-guanine transglycosylases. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, 2834–2844.
- [19] J. S. Reader, D. Metzgar, P. Schimmel, V. de Crécy-Lagard, Identification of four genes necessary for biosynthesis of the modified nucleoside queuosine. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 6280–6285.
- [20] G. Phillips, B. El Yacoubi, B. Lyons, S. Alvarez, D. Iwata-Reuyl, V. De Crécy-Lagard, Biosynthesis of 7-deazaguanosine-modified tRNA nucleosides: A new role for GTP cyclohydrolase I. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 7876–7884.

- [21] I. Biela, N. Tidten-luksch, F. Immekus, S. Glinca, T. Xuan, P. Nguyen, D. Gerber, A. Heine, G. Klebe, K. Reuter, Investigation of Specificity Determinants in Bacterial tRNA-Guanine Transglycosylase Reveals Queuine , the Substrate of Its Eucaryotic Counterpart , as Inhibitor. **2013**, 8.
- [22] R. M. McCarty, Á. Somogyi, G. Lin, N. E. Jacobsen, V. Bandarian, The deazapurine biosynthetic pathway revealed: In vitro enzymatic synthesis of PreQ0 from guanosine 5'-triphosphate in four steps. *Biochemistry* **2009**, 48, 3847–3852.
- [23] B. W. K. Lee, S. G. Van Lanen, D. Iwata-Reuyl, Mechanistic studies of *Bacillus subtilis* QueF, the nitrile oxidoreductase involved in queuosine biosynthesis. *Biochemistry* **2007**, 46, 12844–12854.
- [24] G. C. Hoops, L. B. Townsend, G. A. Garcia, TRNA-Guanine Transglycosylase from *Escherichia coli*: Structure-Activity Studies Investigating the Role of the Aminomethyl Substituent of the Heterocyclic Substrate PreQ1. *Biochemistry* **1995**, 34, 15381–15387.
- [25] N. Okada, S. Nishimura, Isolation and characterization of a guanine insertion enzyme, a specific tRNA transglycosylase, from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 3061–3066.
- [26] C. Romier, K. Reuter, D. Suck, R. Ficner, Crystal structure of tRNA-guanine transglycosylase: RNA modification by base exchange. *EMBO J.* **1996**, 15, 2850–2857.
- [27] W. Xie, X. Liu, R. H. Huang, Chemical trapping and crystal structure of a catalytic tRNA guanine transglycosylase covalent intermediate. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, 10, 781–788.
- [28] S. G. Van Lanen, S. D. Kinzie, S. Matthieu, T. Link, J. Culp, D. Iwata-Reuyl, TRNA modification by S-adenosylmethionine:tRNA ribosyltransferase-isomerase. Assay development and characterization of the recombinant enzyme. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 10491–10499.
- [29] B. Frey, J. McCloskey, W. Kersten, H. Kersten, New function of vitamin B12: cobamide-dependent reduction of epoxyqueuosine to queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **1988**, 170, 2078–2082.
- [30] C. Boland, P. Hayes, I. Santa-Maria, S. Nishimura, V. P. Kelly, Queuosine formation in eukaryotic tRNA occurs via a mitochondria-localized heteromeric transglycosylase. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 18218–18227.

- [31] Y. Chen, V. P. Kelly, S. V Stachura, Y. Chen, V. P. Kelly, S. V Stachura, G. A. Garcia, Characterization of the human tRNA-guanine transglycosylase : Confirmation of the heterodimeric subunit structure Characterization of the human tRNA-guanine transglycosylase : Confirmation of the heterodimeric subunit structure. *RNA* **2010**, *16*, 958–968.
- [32] S. Johannsson, P. Neumann, R. Ficner, Crystal structure of the human tRNA guanine transglycosylase catalytic subunit QTRT1. **2018**, 1–17.
- [33] C. Behrens, I. Biela, S. Petiot-Bécard, T. Botzanowski, S. Cianférani, C. P. Sager, G. Klebe, A. Heine, K. Reuter, Homodimer Architecture of QTRT2, the Noncatalytic Subunit of the Eukaryotic tRNA-Guanine Transglycosylase. *Biochemistry* **2018**, *57*, 3953–3965.
- [34] S. R. Hörtnner, T. Ritschel, B. Stengl, C. Kramer, W. B. Schweizer, B. Wagner, M. Kansy, G. Klebe, F. Diederich, Potent inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase, an enzyme linked to the pathogenicity of the Shigella bacterium: Charge-assisted hydrogen bonding. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46*, 8266–8269.
- [35] T. Ritschel, P. C. Kohler, G. Neudert, A. Heine, F. Diederich, G. Klebe, How to replace the residual solvation shell of polar active site residues to achieve nanomolar inhibition of trna-guanine transglycosylase. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 2012–2023.
- [36] P. C. Kohler, T. Ritschel, W. Bernd Schweizer, G. Klebe, F. Diederich, High-affinity inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase replacing the function of a structural water cluster. *Chem. - A Eur. J.* **2009**, *15*, 10809–10817.
- [37] T. Ritschel, C. Atmanene, K. Reuter, A. Van Dorsselaer, S. Sanglier-Cianferani, G. Klebe, An integrative approach combining noncovalent mass spectrometry, enzyme kinetics and X-ray crystallography to decipher Tgt protein-protein and protein-RNA interaction. *J. Mol. Biol.* **2009**, *393*, 833–847.
- [38] B. Stengl, K. Reuter, G. Klebe, Mechanism and substrate specificity of tRNA-guanine transglycosylases (TGTs): tRNA-modifying enzymes from the three different kingdoms of life share a common catalytic mechanism. *Chembiochem* **2005**, *6*, 1926–1939.
- [39] J. K. Hurt, S. Olgen, G. A. Garcia, Site-specific modification of Shigella flexneri virF mRNA by tRNA-guanine transglycosylase in vitro. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 4905–4913.

- [40] J. M. Durand, B. Dagberg, B. E. Uhlin, G. R. Björk, Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the *virF* gene. *Mol. Microbiol.* **2000**, *35*, 924–935.
- [41] H. Beier, M. Barciszewska, G. Krupp, R. Mitnacht, H. J. Gross, UAG readthrough during TMV RNA translation: isolation and sequence of two tRNAs with suppressor activity from tobacco plants. *EMBO J.* **1984**, *3*, 351–356.
- [42] H.-J. Chou, E. Donnard, H. T. Gustafsson, M. Garber, O. J. Rando, Transcriptome-wide Analysis of Roles for tRNA Modifications in Translational Regulation. *Mol. Cell* **2017**, *68*, 978-992.e4.
- [43] P. F. Johnson, J. Abelson, The yeast tRNA^{Tyr} gene intron is essential for correct modification of its tRNA product. *Nature* **1983**, *302*, 681–687.
- [44] F. Meier, B. Suter, H. Grosjean, G. Keith, E. Kubli, Queuosine modification of the wobble base in tRNA^{His} influences “in vivo” decoding properties. *EMBO J.* **1985**, *4*, 823–827.
- [45] S. Kulkarni, M. A. T. Rubio, E. Hegedúsová, R. L. Ross, P. A. Limbach, J. D. Alfonzo, Z. Paris, Preferential import of queuosine-modified tRNAs into *Trypanosoma brucei* mitochondrion is critical for organellar protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 8247–8260.
- [46] J. M. Zaborske, V. L. Bauer DuMont, E. W. J. Wallace, T. Pan, C. F. Aquadro, D. A. Drummond, A Nutrient-Driven tRNA Modification Alters Translational Fidelity and Genome-wide Protein Coding across an Animal Genus. *PLoS Biol.* **2014**, *12*.
- [47] F. Tuorto, C. Legrand, C. Cirzi, G. Federico, R. Liebers, M. Müller, A. E. Ehrenhofer-Murray, G. Dittmar, H. Gröne, F. Lyko, Queuosine-modified tRNAs confer nutritional control of protein translation. *EMBO J.* **2018**, *37*, 1–14.
- [48] A. Jeltsch, A. Ehrenhofer-Murray, T. P. Jurkowski, F. Lyko, G. Reuter, S. Ankri, W. Nellen, M. Schaefer, M. Helm, Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation. *RNA Biol.* **2017**, *14*, 1108–1123.
- [49] M. Müller, M. Hartmann, I. Schuster, S. Bender, K. L. Thüring, M. Helm, J. R. Katze, W. Nellen, F. Lyko, A. E. Ehrenhofer-Murray, Dynamic modulation of Dnmt2-dependent tRNA methylation by the micronutrient queuine. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*,

- 10952–10962.
- [50] T. Suzuki, Y. Yashiro, I. Kikuchi, Y. Ishigami, H. Saito, I. Matsuzawa, S. Okada, M. Mito, S. Iwasaki, D. Ma, X. Zhao, K. Asano, H. Lin, Y. Kirino, Y. Sakaguchi, T. Suzuki, Complete chemical structures of human mitochondrial tRNAs. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–15.
- [51] S. Varghese, M. Cotter, F. Chevot, C. Fergus, C. Cunningham, K. H. Mills, S. J. Connon, J. M. Southern, V. P. Kelly, In vivo modification of tRNA with an artificial nucleobase leads to full disease remission in an animal model of multiple sclerosis. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 2029–2039.
- [52] J. P. Reyniers, J. R. Pleasants, B. S. Wostmann, J. R. Katze, W. R. Farkas, Administration of exogenous queuine is essential for the biosynthesis of the queuosine-containing transfer RNAs in the mouse. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 11591–11594.
- [53] T. Rakovich, C. Boland, I. Bernstein, V. M. Chikwana, D. Iwata-Reuyl, V. P. Kelly, Queuosine deficiency in eukaryotes compromises tyrosine production through increased tetrahydrobiopterin oxidation. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 19354–19363.
- [54] J. Zhang, R. Lu, Y. Zhang, Ź. Matuszek, W. Zhang, Y. Xia, T. Pan, J. Sun, tRNA queuosine modification enzyme modulates the growth and microbiome recruitment to breast tumors. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*.
- [55] S. Nagaraja, M. W. Cai, J. Sun, H. Varet, L. Sarid, M. Trebicz-Geffen, Y. Shaulov, M. Mazumdar, R. Legendre, J.-Y. Coppée, T. J. Begley, P. C. Dedon, S. Gourinath, N. Guillen, Y. Saito-Nakano, C. Shimokawa, H. Hisaeda, S. Ankri, Queuine Is a Nutritional Regulator of *Entamoeba histolytica* Response to Oxidative Stress and a Virulence Attenuator. *MBio* **2021**, *12*.
- [56] C. J. Dorman, M. E. Porter, The *Shigella* virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms. *Mol. Microbiol.* **1998**, *29*, 677–684.
- [57] I. Biela, Untersuchung der Substratspezifität (TGT) aus Eukaryoten und Prokaryoten und Charakterisierung der eukaryotischen TGT. **2013**.
- [58] UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D480–D489.
- [59] D. T. Jones, Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring

- matrices. *J. Mol. Biol.* **1999**, *292*, 195–202.
- [60] L. D. Kapp, J. R. Lorsch, The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation. *Annu. Rev. Biochem.* **2004**, *73*, 657–704.
- [61] M. T. Weinstock, E. D. Heseck, C. M. Wilson, D. G. Gibson, *Vibrio natriegens* as a fast-growing host for molecular biology. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 849–851.
- [62] C. Mülhardt, *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. **2013**.
- [63] J. J. Barlow, A. P. Mathias, R. Williamson, D. B. Gammack, A simple method for the quantitative isolation of undegraded high molecular weight ribonucleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1963**, *13*, 61–66.
- [64] K. R. Rupesh, A. Smith, P. E. Boehmer, Ligand induced stabilization of the melting temperature of the HSV-1 single-strand DNA binding protein using the thermal shift assay. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *454*, 604–608.
- [65] A. Bijelic, A. Rompel, Ten Good Reasons for the Use of the Tellurium-Centered Anderson-Evans Polyoxotungstate in Protein Crystallography. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 1441–1448.
- [66] S. G. Mauracher, C. Molitor, R. Al-Oweini, U. Kortz, A. Rompel, Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of latent isoform PPO4 mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. *Acta Crystallogr. Sect. F Structural Biol. Commun.* **2014**, *70*, 263–266.
- [67] A. Bijelic, C. Molitor, S. G. Mauracher, R. Al-Oweini, U. Kortz, A. Rompel, Hen egg-white lysozyme crystallisation: Protein stacking and structure stability enhanced by a tellurium(VI)-centred polyoxotungstate. *ChemBioChem* **2014**, *16*, 233–241.
- [68] L. M. Rice, T. N. Earnest, A. T. Brunger, Single-wavelength anomalous diffraction phasing revisited. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2000**, *56*, 1413–1420.
- [69] N. Shindo-Okada, N. Okada, T. Ohgi, T. Goto, S. Nishimura, Transfer Ribonucleic Acid Guanine Transglycosylase Isolated from Rat Liver†. *Biochemistry* **1980**, *19*, 395–400.
- [70] M. Sebastiani, C. Behrens, S. Dörr, H.-D. Gerber, R. Benazza, O. Hernandez-Alba, S. Cianfèrani, G. Klebe, A. Heine, K. Reuter, Structural and Biochemical Investigation of the Heterodimeric Murine tRNA-Guanine Transglycosylase. *ACS Chem. Biol.* **2022**, *17*, 2229–2247.

- [71] A. J. McCoy, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, R. J. Read, Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674.
- [72] A. L. Patterson, A Fourier Series Method for the Determination of the Components of Interatomic Distances in Crystals. **1934**.
- [73] T. Pape, T. R. Schneider, HKL2MAP: a graphical user interface for macromolecular phasing with SHELX programs. *J. Appl. Crystallogr.* **2004**, *37*, 843–844.
- [74] G. M. Sheldrick, Macromolecular phasing with SHELXE. *Zeitschrift für Krist. - Cryst. Mater.* **2002**, *217*, 644–650.
- [75] T. R. Schneider, G. M. Sheldrick, Substructure solution with SHELXD. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2002**, *58*, 1772–1779.
- [76] S. Brennan, P. Cowan, A Suite of Programs for Calculating X-Ray Absorption, Reflection, and Diffraction Performance for a Variety of Materials at Arbitrary Wavelengths. **1992**.
- [77] S. Jakobi, P. T. X. Nguyen, F. Debaene, S. Cianférani, K. Reuter, G. Klebe, What Glues a Homodimer Together: Systematic Analysis of the Stabilizing Effect of an Aromatic Hot Spot in the Protein-Protein Interface of the tRNA-Modifying Enzyme Tgt. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1897–1907.
- [78] S. Jakobi, T. X. P. Nguyen, F. Debaene, A. Metz, S. Sanglier-Cianférani, K. Reuter, G. Klebe, Hot-spot analysis to dissect the functional protein-protein interface of a tRNA-modifying enzyme. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **2014**, *82*, 2713–2732.
- [79] K. Sievers, L. Welp, H. Urlaub, R. Ficner, Structural and functional insights into human tRNA guanine transglycosylase. *RNA Biol.* **2021**, *18*, 1–15.
- [80] N. Tidten, B. Stengl, A. Heine, G. A. Garcia, G. Klebe, K. Reuter, Glutamate versus glutamine exchange swaps substrate selectivity in tRNA-guanine transglycosylase: Insight into the regulation of substrate selectivity by kinetic and crystallographic studies. *J Mol Biol.* **2007**, *374*, 764–776.
- [81] R. Brenk, M. T. Stubbs, A. Heine, K. Reuter, G. Klebe, Flexible adaptations in the structure of the tRNA-modifying enzyme tRNA-guanine transglycosylase and their implications for substrate selectivity, reaction mechanism and structure-based drug design. *Chembiochem* **2003**, *4*, 1066–1077.

- [82] N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, M. J. Holst, J. A. McCammon, Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2001**, *98*, 10037–10041.
- [83] B. Z. Lin, Z. Li, B. H. Xu, L. W. He, X. Z. Liu, C. Ding, First Strandberg-type polyoxotungstate compound: Synthesis and characterization of organic-inorganic hybrid (H₂en)(Hen)₂[H₂P₂W₅O₂₃]·5.42H₂O. *J. Mol. Struct.* **2006**, *825*, 87–92.
- [84] D. Meyer, Klonierung , Expression und enzymkinetische Charakterisierung der hämagglutininspaltenden Protease TMPRSS2. Klonierung , Expression und enzymkinetische Charakterisierung der hämagglutininspaltenden Protease TMPRSS2, **2014**.
- [85] U. Grädler, H. D. Gerber, D. A. M. Goodenough-Lashua, G. A. Garcia, R. Ficner, K. Reuter, M. T. Stubbs, G. Klebe, A new target for shigellosis: Rational design and crystallographic studies of inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase. *J. Mol. Biol.* **2001**, *306*, 455–467.
- [86] A. W. Curnow, F. L. Kung, K. A. Koch, G. A. Garcia, TRNA-Guanine Transglycosylase from Escherichia coli: Gross tRNA Structural Requirements for Recognition. *Biochemistry* **1993**, *32*, 5239–5246.
- [87] M. Göbbringer, D. Helmecke, K. Köhler, A. Schön, L. A. Kirsebom, A. Bindereif, R. K. Hartmann, Enzymatic RNA Synthesis Using Bacteriophage T7 RNA Polymerase. *Handb. RNA Biochem.* **2014**, 1–28.
- [88] W. R. Farkas, K. B. Jacobson, J. R. Katze, Substrate and inhibitor specificity of tRNA-guanine ribosyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *781*, 64–75.
- [89] C. Fergus, M. Al-Qasem, M. Cotter, C. M. McDonnell, E. Sorrentino, F. Chevot, K. Hokamp, M. O. Senge, J. M. Southern, S. J. Connon, V. P. Kelly, The human tRNA-guanine transglycosylase displays promiscuous nucleobase preference but strict tRNA specificity. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 4877–4890.
- [90] A. Nguyen, D. Nguyen, T. X. P. Nguyen, M. Sebastiani, S. Dörr, O. Hernandez-Alba, F. Debaene, S. Cianferani, A. Heine, G. Klebe, K. Reuter, The importance of charge in perturbing the aromatic glue stabilizing the protein-protein interface of homodimeric tRNA-guanine transglycosylase. *ACS Chem. Biol.* **2020**, *15*, 3021–3029.
- [91] L. J. Barandun, F. Immekus, P. C. Kohler, S. Tonazzi, B. Wagner, S. Wendelspiess, T.

- Ritschel, A. Heine, M. Kansy, G. Klebe, F. Diederich, From lin-benzoguanines to lin-benzohypoxanthines as ligands for *Zymomonas mobilis* tRNA-guanine transglycosylase: Replacement of protein-ligand hydrogen bonding by importing water clusters. *Chem. - A Eur. J.* **2012**, *18*, 9246–9257.
- [92] L. D. Movsisyan, E. Schäfer, A. Nguyen, F. R. Ehrmann, A. Schwab, T. Rossolini, D. Zimmerli, B. Wagner, H. Daff, A. Heine, G. Klebe, F. Diederich, Sugar Acetonides are a Superior Motif for Addressing the Large, Solvent-Exposed Ribose-33 Pocket of tRNA-Guanine Transglycosylase. *Chem. - A Eur. J.* **2018**, *24*, 9957–9967.
- [93] L. J. Barandun, F. Immekus, P. C. Kohler, T. Ritschel, A. Heine, P. Orlando, G. Klebe, F. Diederich, High-affinity inhibitors of *Zymomonas mobilis* tRNA-guanine transglycosylase through convergent optimization. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2013**, *69*, 1798–1807.
- [94] F. R. Ehrmann, J. Kalim, T. Pfaffeneder, B. Bernet, C. Hohn, E. Schäfer, T. Botzanowski, S. Cianféroni, A. Heine, K. Reuter, F. Diederich, G. Klebe, Swapping Interface Contacts in the Homodimeric tRNA-Guanine Transglycosylase: An Option for Functional Regulation. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2018**, *57*, 10085–10090.
- [95] L. J. Barandun, F. R. Ehrmann, D. Zimmerli, F. Immekus, M. Giroud, C. Grünenfelder, W. B. Schweizer, B. Bernet, M. Betz, A. Heine, G. Klebe, F. Diederich, Replacement of water molecules in a phosphate binding site by furanoside-appended lin-benzoguanine ligands of tRNA-guanine transglycosylase (TGT). *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 126–135.
- [96] E. A. Meyer, N. Donati, M. Guillot, W. B. Schweizer, F. Diederich, B. Stengl, R. Brenk, K. Reuter, G. Klebe, Synthesis, biological evaluation, and crystallographic studies of extended guanine-based (lin-benzoguanine) inhibitors for tRNA-guanine transglycosylase (TGT). *Helv. Chim. Acta* **2006**, *89*, 573–581.
- [97] F. L. Kung, G. A. Garcia, tRNA-guanine transglycosylase from *Escherichia coli*: Recognition of full-length “queuine-cognate” tRNAs. *FEBS Lett.* **1998**, *431*, 427–432.
- [98] J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., **1989**.
- [99] W. Kabsch, XDS. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *D66*, 125–132.
- [100] D. Liebschner, P. V. Afonine, M. L. Baker, G. Bunkoczi, V. B. Chen, T. I. Croll, B. Hintze, L. W. Hung, S. Jain, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. D. Oeffner, B. K. Poon,

- M. G. Prisant, R. J. Read, J. S. Richardson, D. C. Richardson, M. D. Sammito, O. V. Sobolev, et al., Macromolecular structure determination using X-rays, neutrons and electrons: Recent developments in Phenix. *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* **2019**, *75*, 861–877.
- [101] P. V. Afonine, R. W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J. J. Headd, N. W. Moriarty, M. Mustyakimov, T. C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P. H. Zwart, P. D. Adams, Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2012**, *68*, 352–367.
- [102] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *66*, 486–501.
- [103] I. J. Bruno, J. C. Cole, M. Kessler, J. Luo, W. D. S. Momerwell, L. H. Purkis, B. R. Smith, R. Taylor, R. I. Cooper, S. E. Harris, A. G. Orpen, Retrieval of crystallographically-derived molecular geometry information. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, *44*, 2133–2144.
- [104] S. J. Cottrell, T. S. G. Olsson, R. Taylor, J. C. Cole, J. W. Liebeschuetz, Validating and Understanding Ring Conformations Using Small Molecule Crystallographic Data. *J. Chem. Inf. Model* **2012**.
- [105] G. B. S. Smart, T.O. Womack, A. Sharff, C. Flensburg, P. Keller, W. Paciorek, C. Vonrhein, Cambridge, United Kingdom, Global Phasing Ltd., Grade Web Server, kann gefunden werden unter <http://www.globalphasing.com>, zuletzt geprüft am: 15.07.2021. **2021**.
- [106] N. W. Moriarty, R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, Electronic Ligand Builder and Optimization Workbench (eLBOW): a tool for ligand coordinate and restraint generation. *Acta Crystallogr. Sect. D* **2009**, *65*, 1074–1080.
- [107] Molecular Operating Environment (MOE), 2019.01; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7,. **2021**.
- [108] R. A. Laskowski, M. W. MacArthur, D. S. Moss, J. M. Thornton, PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **1993**, *26*, 283–291.
- [109] G. J. Kleywegt, J.-Y. Zou, M. Kjeldgaard, T. A. Jones, International Tables for Crystallography. Springer Netherlands, Amsterdam, **2006**.

- [110] Schrodinger LLC, The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8. **2015**.
- [111] M. Dixon, The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Biochem. J.* **1953**, *55*, 170–171.

Anhang

A.1	Kristallographische Tabellen.....	156
A.2	Rohdaten und sekundäre Auftragung der QTRT2-Varianten	158
A.3	Rohdaten und sekundäre Auftragung der Inhibitoren	160
A.4	Rohdaten und sekundäre Auftragung nicht-radioaktiv markierter Substrate	161
A.5	Gensequenz der separat präparierten QTRT1-Untereinheit (Wildtyp).....	165
A.6	Gensequenz der separat präparierten QTRT2-Untereinheit (Wildtyp).....	166
A.7	Gensequenz der QTRT1-Untereinheit (N-9) im Rahmen der Koexpression im pETDuet-1 Vektor.....	167
A.8	Gensequenz der QTRT2-Untereinheit (Wildtyp) im Rahmen der Koexpression im pETDuet-1 Vektor.....	168
A.9	SEC-nMS Experimente einer äquimolaren Mischung von QTRT1 und QTRT2-Varianten	169

A.1 Kristallographische Tabellen

Tabelle 21: Datensammlungs-, Prozessierungs-, und Verfeinerungsstatistiken der deponierten Datensätze.

Crystal data	Apo-mTGT	mTGT, Citrate	mTGT, Queuine
PDB ID	7OV9	7B2I	7OVO
(A) Data collection and processing			
Collection site	BESSY II BL 14.1	BESSY II BL 14.1	BESSY II BL 14.1
Wavelength [Å]	0.918400	0.918400	0.918400
Space group	$P4_322$	$P4_322$	$P4_322$
a, b, c [Å]	100.3, 100.3, 202.5	100.6, 100.6, 202.2	100.4, 100.4, 202.9
β [°]	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
(B) Diffraction data			
Resolution range [Å]	48.66-1.90 (2.01-1.90)	48.90-1.65 (1.75-1.65)	48.97-2.10 (2.23-2.10)
No. of unique reflections ^a	82085 (13000)	125031 (19850)	61375 (9724)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%]	8.0 (111.0)	7.2 (119.3)	7.5 (105.3)
Completeness [%]	99.9 (99.7)	99.9 (99.7)	99.9 (99.7)
Multiplicity	14.6 (14.5)	13.2 (13.3)	13.1 (13.3)
Mean $I/\sigma(I)$	24.6 (2.7)	23.2 (2.4)	20.7
$CC_{1/2}$ [%]	100.0 (87.2)	100.0 (82.2)	99.9 (89.4)
Matthews coefficient [Å ³ /Da]	2.83	2.84	2.84
Solvent content [%]	56.52	56.72	56.69
Overall B factor from Wilson Plot [Å ²]	31.5	22.6	44.1
No. proteins per asymmetric unit	2	2	2
(C) Refinement with Phenix (version 1.16_3549)			
Resolution range [Å]	48.68-1.90	45.22-1.65	48.76-2.10
Reflections used in refinement	82017	125012	61338
$R_{\text{work}}^b/R_{\text{free}}^c$ [%]	17.6/20.0	17.7/20.1	19.0/23.5
No. of atoms (non-hydrogen)			
Protein (residues)	5786 (747)	5897 (755)	5697 (755)
water molecules	368	485	239
Zn ²⁺ ions	2	2	2
Ligand atoms	-	13	20
rmsd from ideality			
bond angles [°]	0.8	0.8	0.8
bond length [Å]	0.006	0.006	0.007
Ramachandran plot^d			
most favored [%]	93.5	93.5	91.8
additional allowed [%]	6.3	6.3	8.0
generously allowed [%]	0.1	0.1	0.0
Mean B factor^e [Å²]			
Protein atoms	38.1	30.2	57.6
Water molecules	42.8	38.8	55.0
Zn ²⁺	28.9	20.2	49.1
SO ₄ ²⁻	64.3	41.4	84.8
Polyethylene glycol/DMSO	52.9 (PEG)	42.9 (PEG)	67.5 (DMSO)
Ligand	-	36.6 (citrate)	38.6 (queuine)

Crystal data	mTGT, TEW	mTGT, TEW, Queuine
PDB ID	7OVS	7OWZ
(A) Data collection and processing		
Collection site	BESSY II BL 14.1	BESSY II BL 14.1
Wavelength [Å]	0.918400	0.918400
Space group	<i>P</i> 6 ₂ 22	<i>P</i> 6 ₂ 22
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> [Å]	199.5, 199.5, 90.3	199.5, 199.5, 90.6
β [°]	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
(B) Diffraction data		
Resolution range [Å]	48.56-2.60 (2.76-2.60)	45.29-2.60 (2.75-2.60)
No. of unique reflections ^a	61920 (9959)	62234 (9974)
$R(I)_{\text{sym}}$ ^a [%]	8.5 (79.0)	8.2 (100.5)
Completeness [%]	99.9 (99.5)	99.9 (99.4)
Multiplicity	8.8 (8.7)	12.8 (12.1)
Mean $I/\sigma(I)$	17.1 (2.65)	24.1 (2.75)
$CC_{1/2}$ [%]	99.9 (83.3)	100.0 (83.3)
Matthews coefficient [Å ³ /Da]	2.88	2.89
Solvent content [%]	57.31	57.46
Overall <i>B</i> factor from Wilson Plot [Å ²]	58.3	59.7
No. proteins per asymmetric unit	2	2
(C) Refinement with Phenix (version 1.16_3549)		
Resolution range [Å]	48.6-2.60	48.6-2.60
Reflections used in refinement	61915	62228
$R_{\text{work}}^b/R_{\text{free}}^c$ [%]	21.1/24.2	21.2/23.8
No. of atoms (non-hydrogen)		
Protein (residues)	5616 (761)	5555 (763)
Water molecules	49	47
Zn ²⁺ ions	2	2
Ligand atoms	-	20
rmsd from ideality		
bond angles [°]	1.2	1.0
bond length [Å]	0.003	0.003
Ramachandran plot^d		
most favored [%]	92.5	92.8
additional allowed [%]	7.0	6.8
generously allowed [%]	0.5	0.4
Mean <i>B</i> factor^e [Å²]		
Protein atoms	59.2	61.8
Water molecules	54.1	56.0
Zn ²⁺	51.2	53.4
TEW / Strandberg-type POM	73.1 / 58.0	70.1 / 52.9
Ligand	-	61.6

Die Werte in Klammern entsprechen den Statistiken für die höchste Auflösungsschale.

$$^a R_{\text{sym}} = \frac{\sum |I - \bar{I}|}{\sum I}$$

I Beobachtete Intensitäten
 \bar{I} Durchschnittliche Intensitäten für Mehrfachmessungen

$$^b R_{\text{work}} = \frac{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}|}{\sum_{hkl} |F_{\text{obs}}|}$$

^c R_{free} wurde wie R_{work} berechnet, anhand von 5% der Daten, die zuvor von der Verfeinerung separiert wurden.

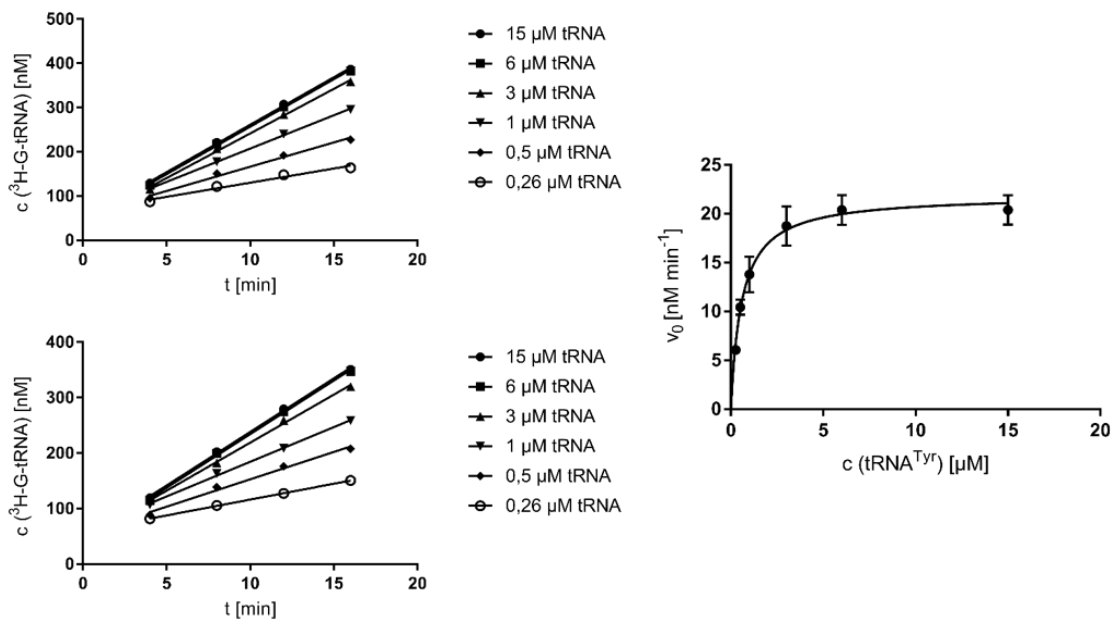
^d berechnet mit PROCHECK^[108]

^e berechnet mit MOLEMAN^[109]

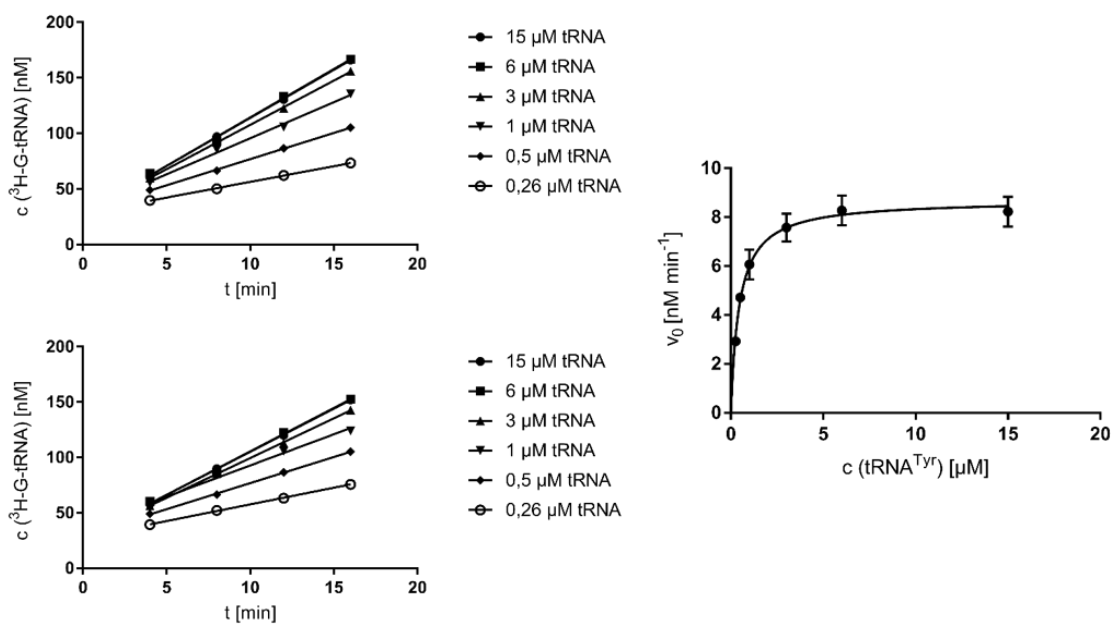
A.2 Rohdaten und sekundäre Auftragung der QTRT2-Varianten

Zeitumsatzkurven und resultierende Michaelis-Menten-Diagramme der jeweiligen Heterodimere der eukaryotischen TGT bestehend aus QTRT1 und den jeweiligen QTRT2-Varianten in einem äquimolaren Verhältnis. Die einzelnen Untereinheiten wurden separat präpariert.

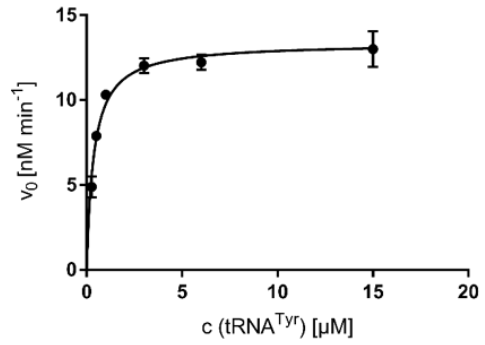
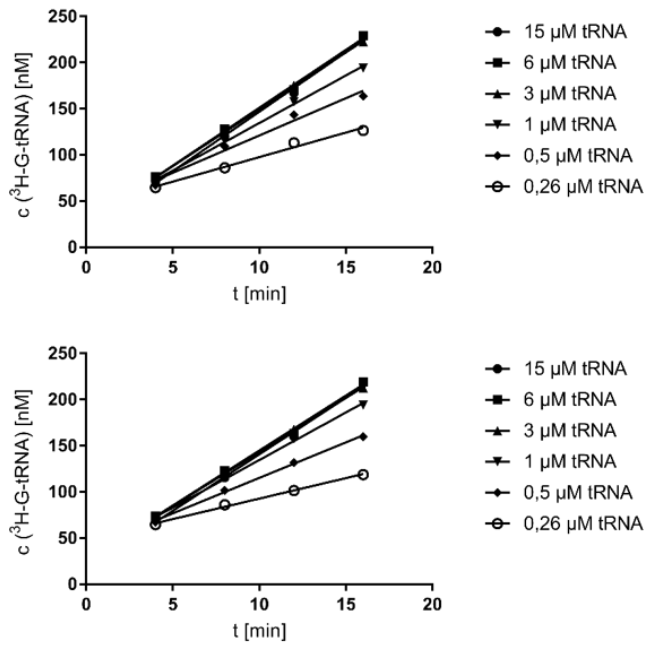
QTRT1 / QTRT2 (Wildtyp)



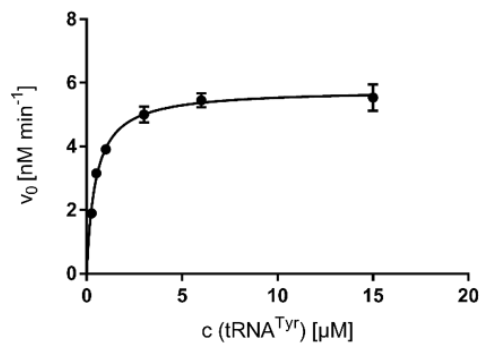
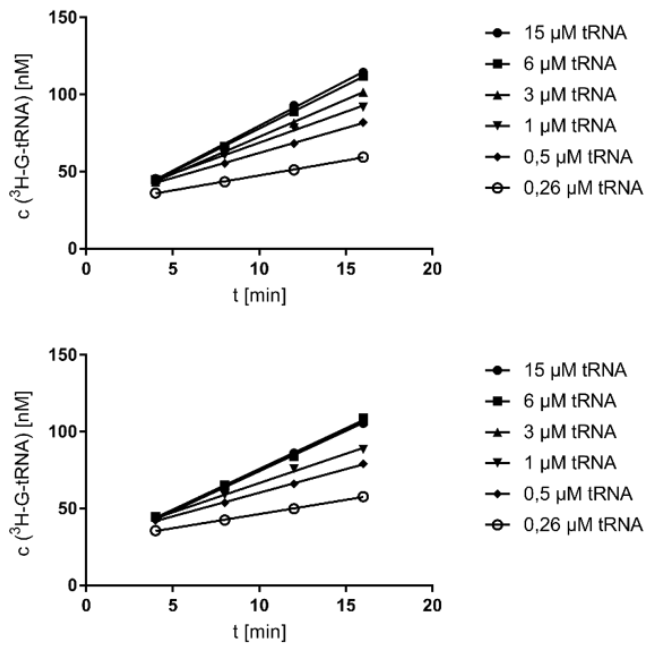
QTRT1 / QTRT2 (Ser41Ala)



QTRT1 / QTRT2 (Tyr354Phe)



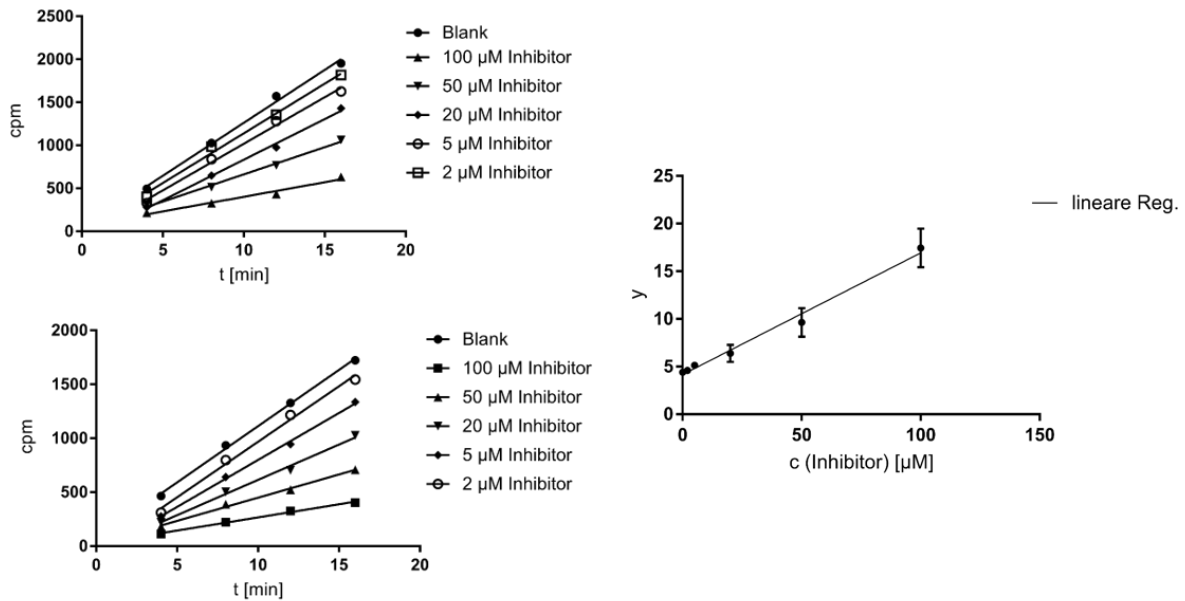
QTRT1 / QTRT2 (Ser41Ala/Tyr354Phe)



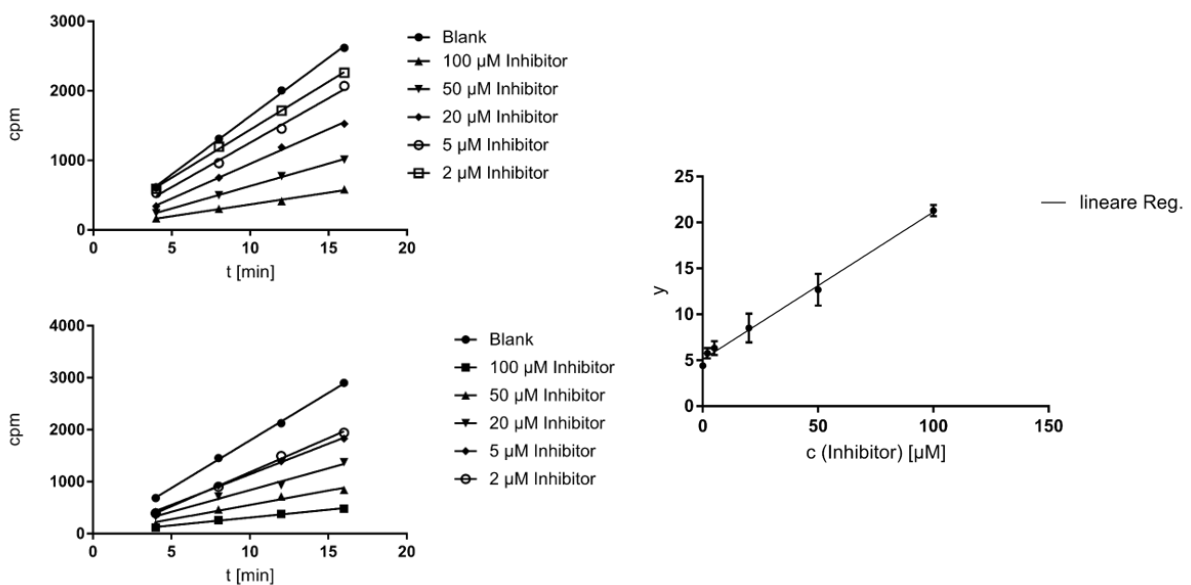
A.3 Rohdaten und sekundäre Auftragung der Inhibitoren

Zeitumsatzkurven und resultierende Dixon-Diagramme der jeweiligen Inhibitoren der eukaryotischen TGT. Die Ordinate „y“ entspricht der Berechnung gemäß Formel 3 nach Dixon.

Inhibitor I8



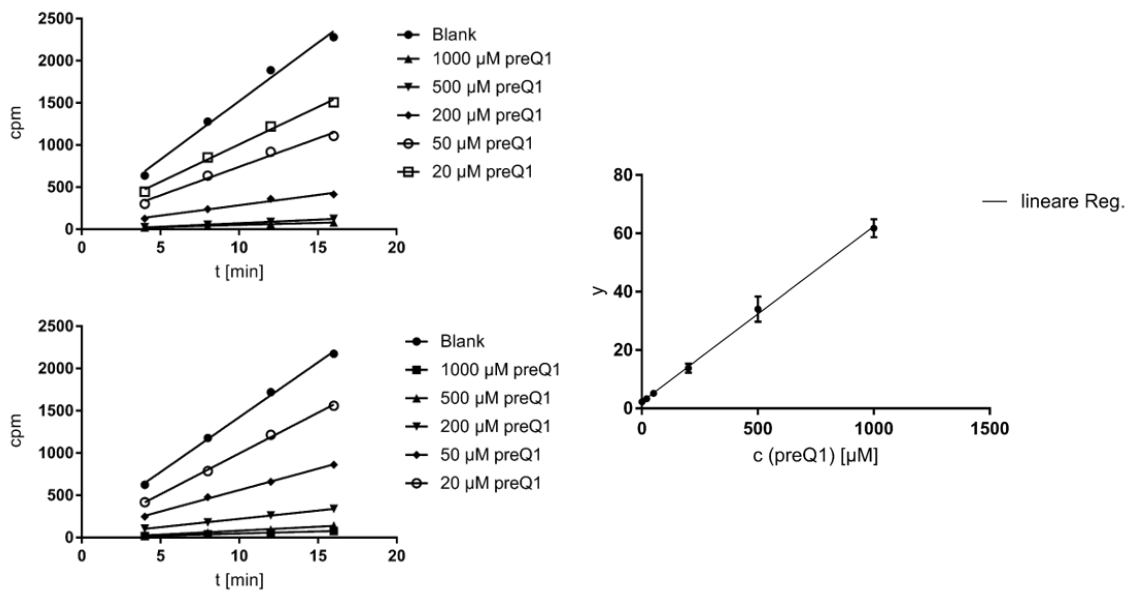
Inhibitor I9



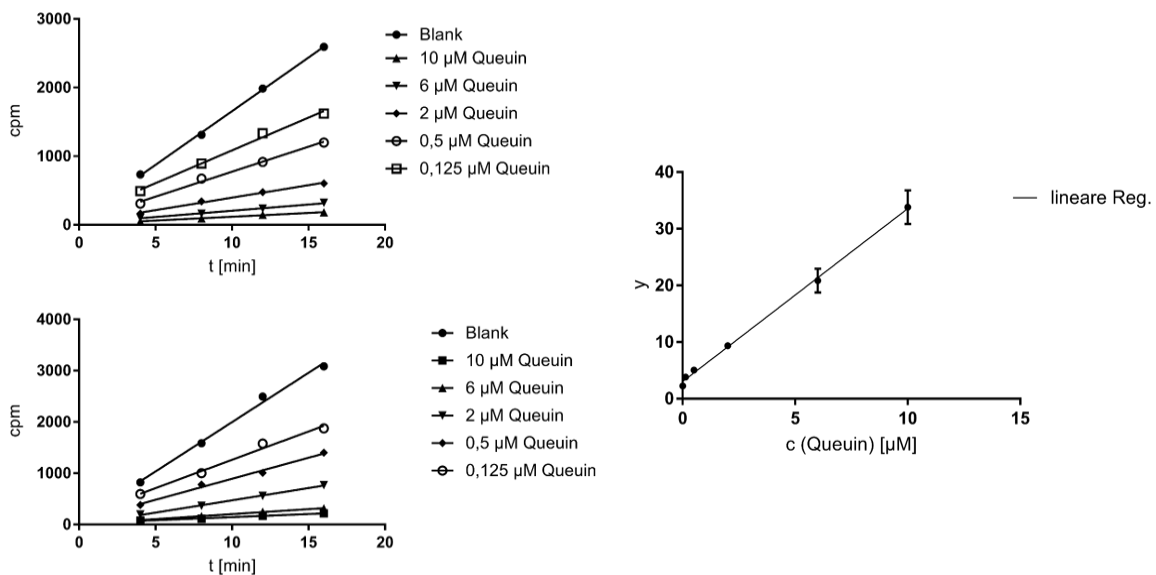
A.4 Rohdaten und sekundäre Auftragung nicht-radioaktiv markierter Substrate

Zeitumsatzkurven und resultierende Dixon-Diagramme der jeweiligen nicht-radioaktiv markierten Substrate der eukaryotischen TGT. Die Ordinate „y“ entspricht der Berechnung gemäß Formel 3 nach Dixon. Die K_m -Werte wurden analog zu den K_i -Werten der Inhibitoren berechnet.

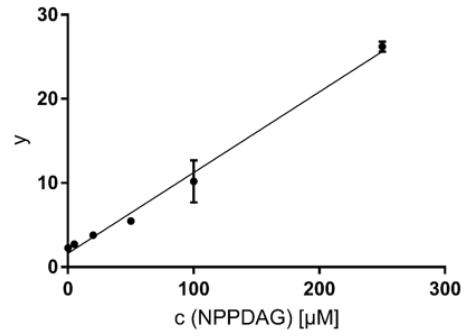
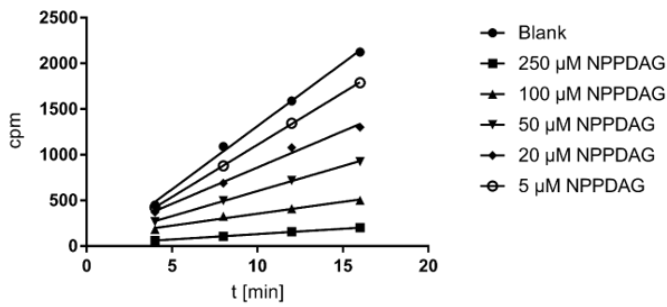
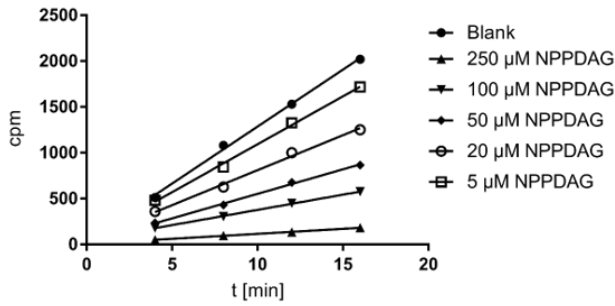
preQ1



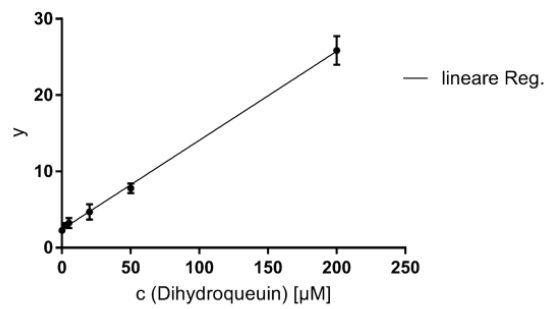
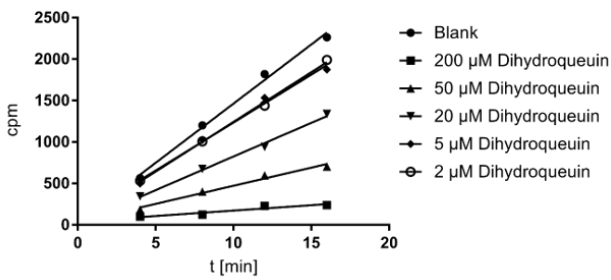
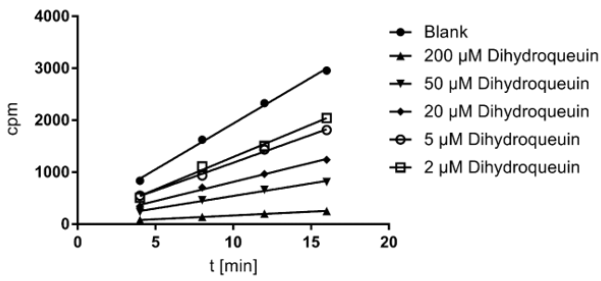
Queuin



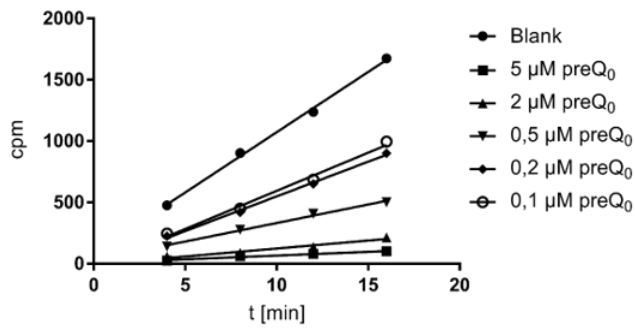
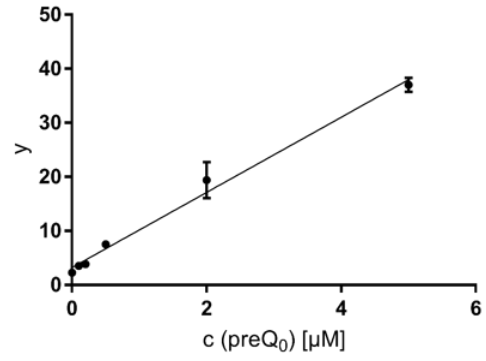
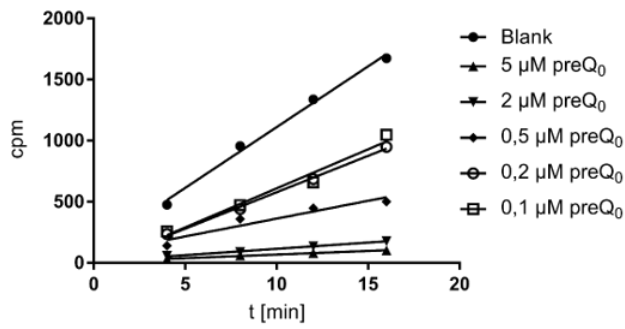
NPPDAG



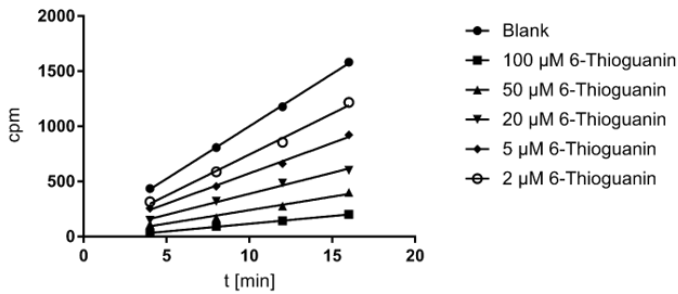
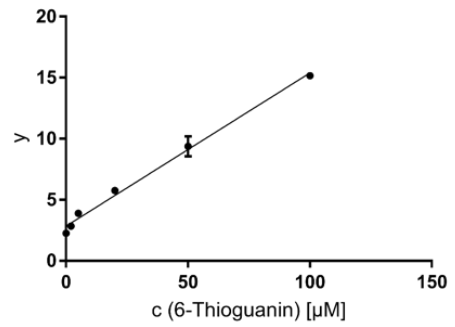
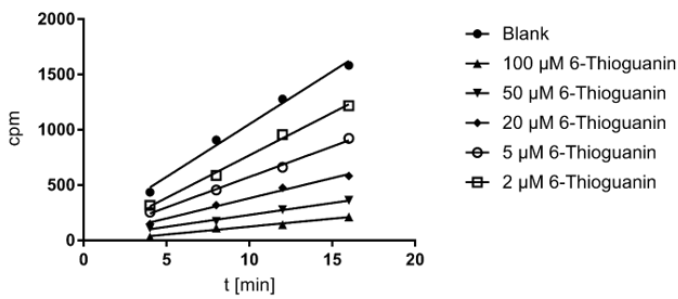
Dihydroqueuin



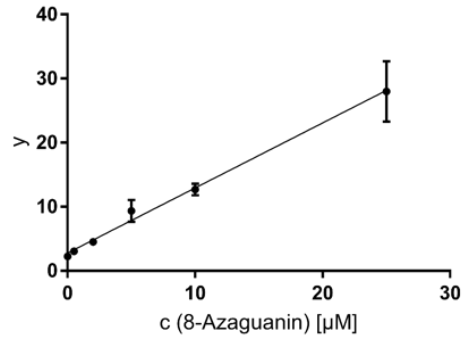
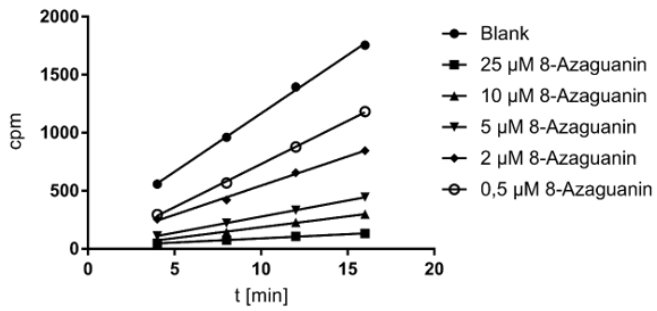
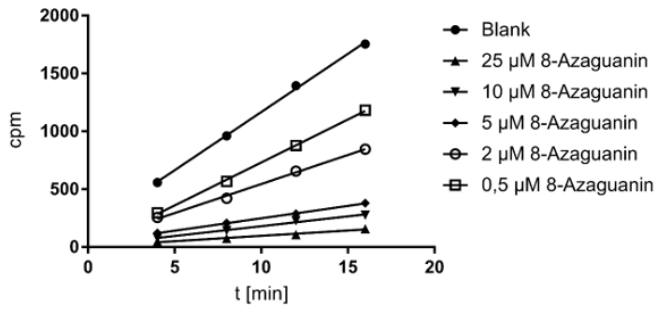
preQ₀



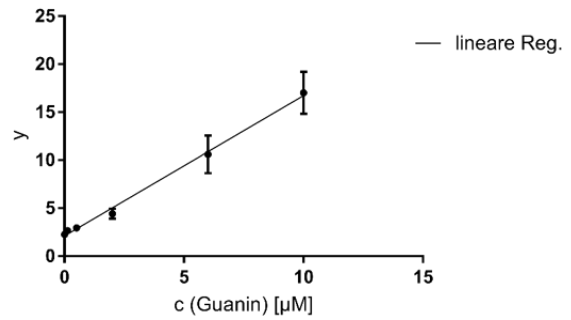
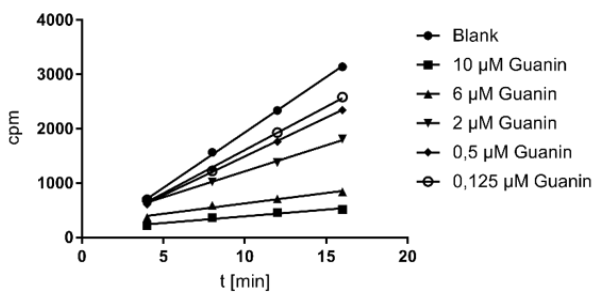
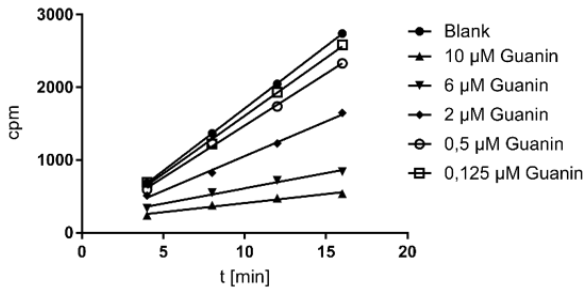
6-Thioguanin



8-Azaguanin



Cold Guanin-Kontrolle



A.5 Gensequenz der separat präparierten QTRT1-Untereinheit (Wildtyp)

DNA- und Aminosäuresequenz der QTRT1 aus der Maus (Wildtyp). Die Sequenzen für *Strep-Tag II* sowie die Thrombin-Erkennungssequenz sind farblich abgehoben.

0001	ATG GCT AGC TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAA TCT GGT GGT GGT GGT GGT
	M A S W S H P Q F E K S G G G G G
0018	CTG GTT CCG CGT GGC TCC ATG GCA GCA GTT GGT AGT CCG GGT AGC CTG GAA
	L V P R G S M A A V G S P G S L E
0035	AGC GCA CCG CGT ATT ATG CGT CTG GTT GCA GAA TGT AGC CGT AGC GGT GCA
	S A P R I M R L V A E C S R S G A
0052	CGT GCC GGT GAA CTG CGT CTG CCG CAT GGC ACC GTT GCA ACA CCG GTT TTT
	R A G E L R L P H G T V A T P V F
0069	ATG CCG GTT GGC ACC CAG GCA ACC ATG AAA GGT ATT ACC ACC GAA CAG CTG
	M P V G T Q A T M K G I T T E Q L
0086	GAT AGC CTG GGT TGT CGT ATT TGT CTG GGT AAT ACC TAT CAT CTG GGT CTG
	D S L G C R I C L G N T Y H L G L
0103	CGT CCG GGT CCG GAA CTG ATT CGT AAA GCA CAG GGT CTG CAT GGT TTT ATG
	R P G P E L I R K A Q G L H G F M
0120	AAT TGG CCT CAT AAT CTG CTG ACC GAT AGC GGT GGT TTT CAG ATG GTT AGC
	N W P H N L L T D S G G F Q M V S
0137	CTG TTT AGC CTG AGC GAA GTT ACC GAA GAA GGT GTT CAT TTT CGT AGC CCG
	L F S L S E V T E E G V H F R S P
0154	TAT GAT GGT GAA GAA ACC CTG CTG AGT CCG GAA CGT AGC GTT GAA ATT CAG
	Y D G E E T L L S P E R S V E I Q
0171	AAT GCA CTG GGT AGC GAT ATC ATT ATG CAG CTG GAT CAT GTT GTT AGC AGC
	N A L G S D I I M Q L D H V V S S
0188	ACC GTT ACC GGT CCG CTG GTT GAA GAA GCA ATG CAT CGT AGC GTT CGT TGG
	T V T G P L V E E A M H R S V R W
0205	CTG GAT CGT TGT ATT GCA GCA CAT AAA CAT CCG GAT AAA CAG AAC CTG TTT
	L D R C I A A H K H P D K Q N L F
0222	GCC ATT ATT CAG GGT GGT CTG AAT GCA GAT CTG CGT ACC ACC TGT CTG AAA
	A I I Q G G L N A D L R T T C L K
0239	GAA ATG ACC AAA CGT GAT GTT CCG GGT TTT GCA ATT GGT GGT CTG AGC GGT
	E M T K R D V P G F A I G G L S G
0256	GGT GAA AGC AAA GCA CAG TTT TGG AAA ATG GTT GCA CTG AGC ACC AGC ATG
	G E S K A Q F W K M V A L S T S M
0273	CTG CCG AAA GAT AAA CCG CGT TAT CTG ATG GGT GTT GGT TAT GCA ACC GAT
	L P K D K P R Y L M G V G Y A T D
0290	CTG GTT GTT TGT GTT GCA CTG GGT TGT GAT ATG TTT GAT TGT GTT TAT CCG
	L V V C V A L G C D M F D C V Y P
0307	ACC CGT ACC GCA CGT TTT GGT AGC GCA CTG GTT CCG ACC GGT AAT CTG CAG
	T R T A R F G S A L V P T G N L Q
0324	CTG AAA AAA AAA CAG TAT GCC AAA GAT TTT AGC CCG ATT AAT CCG GAA TGT
	L K K K Q Y A K D F S P I N P E C
0341	CCG TGT CCG ACC TGT CAG ACC CAT AGC CGT GCA TTT CTG CAT GCA CTG CTG
	P C P T C Q T H S R A F L H A L L
0358	CAT AGC GAT AAT ACC ACC GCA CTG CAT CAT CTG ACC GTT CAT AAT ATT GCA
	H S D N T T A L H H L T V H N I A
0375	TAT CAG CTG CAG CTG CTG AGC GCA GTT CGT AGC AGC ATT CTG GAA CAG CGT
	Y Q L Q L L S A V R S S I L E Q R
0392	TTT CCG GAT TTT GTG CGT AAT TTT ATG CGT ACC ATG TAT GGC GAT CAT AGC
	F P D F V R N F M R T M Y G D H S
0409	CTG TGT CCG GCA TGG GCA GTT GAA GCA CTG GCA AGC GTT GGT ATT ATG CTG
	L C P A W A V E A L A S V G I M L
0426	ACC
	T

A.6 Gensequenz der separat präparierten QTRT2-Untereinheit (Wildtyp)

DNA- und Aminosäuresequenz der QTRT2 aus der Maus (Wildtyp). Die Sequenzen für *Strep-Tag II* sowie die Thrombin-Erkennungssequenz sind farblich abgehoben.

0001	ATG	GCT	AGC	TGG	AGC	CAC	CCG	CAG	TTC	GAA	AAA	TCT	GGT	GGT	GGT	GGT	GGT
	M	A	S	W	S	H	P	Q	F	E	K	S	G	G	G	G	G
0018	CTG	GTT	CCG	CGT	GGC	TCC	ATG	ATG	AAA	CTG	AGC	CTG	ATT	AAA	GTT	GTT	AAT
	L	V	P	R	G	S	M	M	K	L	S	L	I	K	V	V	N
0035	GGT	TGT	CGC	CTG	GGC	AAA	ATT	CAG	AAT	CTG	GGT	AAA	GCC	GGT	GAT	TGT	ACC
	G	C	R	L	G	K	I	Q	N	L	G	K	A	G	D	C	T
0052	GTT	GAT	ATT	CCG	GGT	TGT	CTG	CTG	TAT	ACC	CGT	ACC	GGT	AGC	GCA	CCG	CAT
	V	D	I	P	G	C	L	Y	T	R	T	G	S	A	P	H	
0069	CTG	ACC	CAT	CAG	ACC	CTG	CGC	AAT	ATT	CAT	GGT	GTT	CCG	GGT	ATT	GCA	CAG
	L	T	H	Q	T	L	R	N	I	H	G	V	P	G	I	A	Q
0086	CTG	ACC	CTG	AGC	AGC	CTG	GCA	GAG	CAT	CAT	GAA	GTT	CTG	GCC	GAA	TAT	AAA
	L	T	L	S	S	L	A	E	H	H	E	V	L	A	E	Y	K
0103	AAA	GGT	GTG	GGT	AGC	TTT	ATT	GGT	ATG	CCG	GAA	AGC	CTG	TTT	TAT	TGT	AGC
	K	G	V	G	S	F	I	G	M	P	E	S	L	F	Y	C	S
0120	CTG	CAT	GAT	CCG	GTT	ACA	CCG	GGT	CCG	GCA	GGT	TAT	GTG	ACC	AGC	AAA	AGC
	K	G	V	G	S	F	I	G	M	P	E	S	L	F	Y	C	S
0137	GTT	AGC	GTT	TGG	GGT	TTT	GGT	GGT	CGT	GTT	GAA	ATG	ACC	GTT	AGC	AAA	TTT
	V	S	V	W	G	F	G	G	R	V	E	M	T	V	S	K	F
0154	ATG	GCA	ATT	CAG	GAA	GCA	CTG	CAG	CCG	GAT	TGG	TTT	CAG	TGT	CTG	AGT	GAT
	M	A	I	Q	E	A	L	Q	P	D	W	F	Q	C	L	S	D
0171	GGT	GAA	GCA	AGC	TGT	GCA	GAA	ACC	ACC	AGT	ATT	AAA	CGT	GCA	CGT	AAA	AGC
	G	E	A	S	C	A	E	T	T	S	I	K	R	A	R	K	S
0188	GTT	GAT	CGT	AGC	CTG	CTG	TTT	CTG	GAT	AGC	TGT	CTG	CGT	CTG	CAG	GAA	GAA
	V	D	R	S	L	L	F	L	D	S	C	L	R	L	Q	E	E
0205	AGC	GAA	GTT	CTG	CAG	AAA	AGC	GTT	ATT	ATT	GGT	GTG	ATT	GAA	GGC	GGT	GAT
	S	E	V	L	Q	K	S	V	I	I	G	V	I	E	G	G	D
0222	GTT	ATG	GAA	GAA	CGT	CTG	CGT	AGC	GCA	CGT	GAA	ACC	GCA	AAA	CGT	CCG	GTT
	V	M	E	E	R	L	R	S	A	R	E	T	A	K	R	P	V
0239	GGT	GGT	TTT	CTG	GAT	GGT	TTT	CAG	GGT	GAT	CCG	GCA	GTT	ACC	GAA	ACC	
	G	G	F	L	L	D	G	F	Q	G	D	P	A	V	T	E	T
0256	CGT	CTG	CAT	CTG	CTG	AGC	AGC	GTT	ACC	GCA	GAA	CTG	CCG	GAA	GAT	AAA	CCG
	R	L	H	L	L	S	S	V	T	A	E	L	P	E	D	K	P
0273	CGT	CTG	ATT	TGT	GGT	GTT	AGC	CGT	CCG	GAT	GAA	GTG	CTG	GAA	TGT	ATT	GAA
	R	L	I	C	G	V	S	R	P	D	E	V	L	E	C	I	E
0290	CGT	GGT	GTT	GAC	CTG	TTT	GAA	TCA	TTT	TTT	CCG	TAT	CAG	GTT	ACC	GAA	CGT
	R	G	V	D	L	F	E	S	F	F	P	Y	Q	V	T	E	R
0307	GGT	TGT	GCA	CTG	ACC	TTT	ACC	TTT	GAT	TGT	CAG	CTG	AAT	CCG	GAA	GAA	ACC
	G	C	A	L	T	F	T	F	D	C	Q	L	N	P	E	E	T
0324	CTG	CTG	CAA	CAG	AAT	GGT	ATT	CAG	GAA	AAA	ATT	AAA	GGT	CTG	GAT	CAG	GCC
	L	L	Q	Q	N	G	I	Q	E	K	I	K	G	L	D	Q	A
0341	AAA	AAA	ATT	GAA	GCA	ACC	GGT	TGT	AAT	CAG	GAA	ATG	ACC	AGC	TTT	GAA	ATT
	K	K	I	E	A	T	G	C	N	Q	E	M	T	S	F	E	I
0358	AAT	CTG	AAA	GAA	AAG	AAA	TAT	CAG	GAA	GAT	TTT	GAT	CCG	CTG	GTT	CGT	GGT
	N	L	K	E	K	K	Y	Q	E	D	F	D	P	L	V	R	G
0375	TGT	AGC	TGT	TAT	TGT	TGC	AAA	AAT	CAT	ACC	CGT	GCC	TAT	ATT	CAT	CAT	CTG
	C	S	C	Y	C	C	K	N	H	T	R	A	Y	I	H	H	L
0392	CTG	ATG	ACC	AAT	GAA	CTG	CTG	GCA	GGC	GTT	CTG	CTG	ATG	ATG	CAT	AAT	TTT
	L	M	T	N	E	L	L	A	G	V	L	L	M	H	N	F	
0409	GAA	CAT	TAT	TTT	GGC	TTT	TTT	TGC	AGC	ATT	CGC	GAA	GCC	CTG	AAA	AAT	GAT
	E	H	Y	F	G	F	F	C	S	I	R	E	A	L	K	N	D
0426	ACC	CTG	GCA	CAG	CTG	AAA	GAA	CTG	ATT	TGT	CGT	CAG	ATG	TTT	GGT	CTC	TGA
	T	L	A	Q	L	K	E	L	I	C	R	Q	M	F	G	L	-

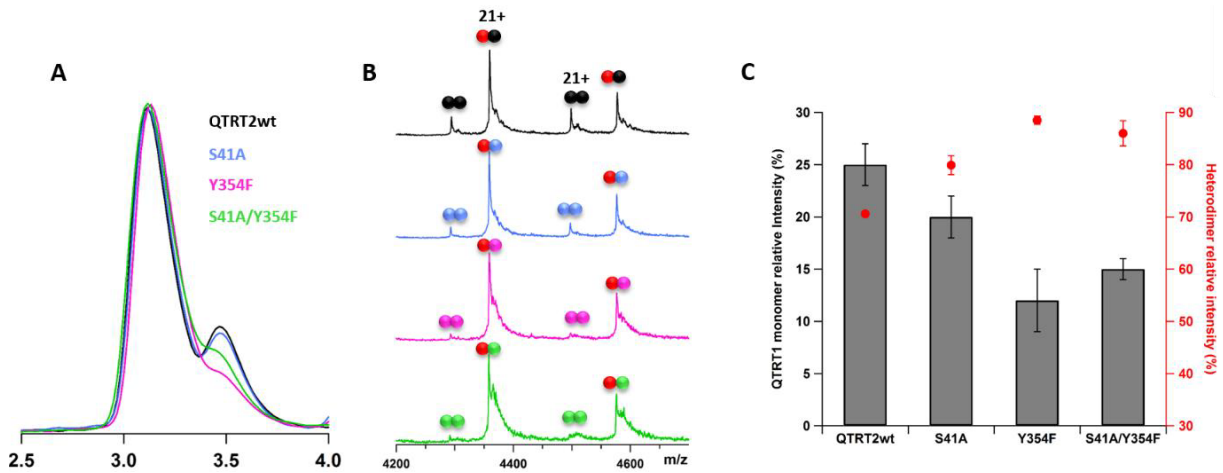
A.7 Gensequenz der QTRT1-Untereinheit (N-9) im Rahmen der Koexpression im pETDuet-1 Vektor

DNA- und Aminosäuresequenz der QTRT1 aus der Maus (N-9). Die Sequenzen für His₆-Tag sowie die PreScission-Protease-Erkennungssequenz sind farblich abgehoben.

0001	ATG	GGC	AGC	AGC	CAT	CAC	CAT	CAT	CAC	CAC	AGC	CAG	GAT	CCG	CTG	GAA	GTT	CTG	TTC	CAG
	M	G	S	S	H	H	H	H	H	H	S	Q	D	P	L	E	V	L	F	Q
0021	GGG	CCC	GAA	AGC	GCA	CCG	CGT	ATT	ATG	CGT	CTG	GTT	GCA	GAA	TGT	AGC	CGT	AGC	GGT	GCA
	G	P	E	S	A	P	R	I	M	R	L	V	A	E	C	S	R	S	G	A
0041	CGT	GCC	GGT	GAA	CTG	CGT	CTG	CCG	CAT	GGC	ACC	GTT	GCA	ACA	CCG	GTT	TTT	ATG	CCG	GTT
	R	A	G	E	L	R	L	P	H	G	T	V	A	T	P	V	F	M	P	V
0061	GGC	ACC	CAG	GCA	ACC	ATG	AAA	GGT	ATT	ACC	ACC	GAA	CAG	CTG	GAT	AGC	CTG	GGT	TGT	CGT
	G	T	Q	A	T	M	K	G	I	T	T	E	Q	L	D	S	L	G	C	R
0081	ATT	TGT	CTG	GGT	AAT	ACC	TAT	CAT	CTG	GGT	CTG	CGT	CCG	GGT	CCG	GAA	CTG	ATT	CGT	AAA
	I	C	L	G	N	T	Y	H	L	G	L	R	P	G	P	E	L	I	R	K
0101	GCA	CAG	GGT	CTG	CAT	GGT	TTT	ATG	AAT	TGG	CCT	CAT	AAT	CTG	CTG	ACC	GAT	AGC	GGT	GGT
	A	Q	G	L	H	G	F	M	N	W	P	H	N	L	L	T	D	S	G	G
0121	TTT	CAG	ATG	GTT	AGC	CTG	TTT	AGC	CTG	AGC	GAA	GTT	ACC	GAA	GAA	GGT	GTT	CAT	TTT	CGT
	F	Q	M	V	S	L	F	S	L	S	E	V	T	E	E	G	V	H	F	R
0141	AGC	CCG	TAT	GAT	GGT	GAA	GAA	ACC	CTG	CTG	AGT	CCG	GAA	CGT	AGC	GTT	GAA	ATT	CAG	AAT
	S	P	Y	D	G	E	E	T	L	L	S	P	E	R	S	V	E	I	Q	N
0161	GCA	CTG	GGT	AGC	GAT	ATC	ATT	ATG	CAG	CTG	GAT	CAT	GTT	GTT	AGC	AGC	ACC	GTT	ACC	GGT
	A	L	G	S	D	I	I	M	Q	L	D	H	V	V	S	S	T	V	T	G
0181	CCG	CTG	GTT	GAA	GAA	GCA	ATG	CAT	CGT	AGC	GTT	CGT	TGG	CTG	GAT	CGT	TGT	ATT	GCA	GCA
	P	L	V	E	E	A	M	H	R	S	V	R	W	L	D	R	C	I	A	A
0201	CAT	AAA	CAT	CCG	GAT	AAA	CAG	AAC	CTG	TTT	GCC	ATT	ATT	CAG	GGT	GGT	CTG	AAT	GCA	GAT
	H	K	H	P	D	K	Q	N	L	F	A	I	I	Q	G	G	L	N	A	D
0221	CTG	CGT	ACC	ACC	TGT	CTG	AAA	GAA	ATG	ACC	AAA	CGT	GAT	GTT	CCG	GGT	TTT	GCA	ATT	GGT
	L	R	T	T	C	L	K	E	M	T	K	R	D	V	P	G	F	A	I	G
0241	GGT	CTG	AGC	GGT	GGT	GAA	AGC	AAA	GCA	CAG	TTT	TGG	AAA	ATG	GTT	GCA	CTG	AGC	ACC	AGC
	G	L	S	G	G	E	S	K	A	Q	F	W	K	M	V	A	L	S	T	S
0261	ATG	CTG	CCG	AAA	GAT	AAA	CCG	CGT	TAT	CTG	ATG	GGT	GTT	GGT	TAT	GCA	ACC	GAT	CTG	GTT
	M	L	P	K	D	K	P	R	Y	L	M	G	V	G	Y	A	T	D	L	V
0281	GTT	TGT	GTT	GCA	CTG	GGT	TGT	GAT	ATG	TTT	GAT	TGT	GTT	TAT	CCG	ACC	CGT	ACC	GCA	CGT
	V	C	V	A	L	G	C	D	M	F	D	C	V	Y	P	T	R	T	A	R
0301	TTT	GGT	AGC	GCA	CTG	GTT	CCG	ACC	GGT	AAT	CTG	CAG	CTG	AAA	AAA	AAA	CAG	TAT	GCC	AAA
	F	G	S	A	L	V	P	T	G	N	L	Q	L	K	K	K	Q	Y	A	K
0321	GAT	TTT	AGC	CCG	ATT	AAT	CCG	GAA	TGT	CCG	TGT	CCG	ACC	TGT	CAG	ACC	CAT	AGC	CGT	GCA
	D	F	S	P	I	N	P	E	C	P	C	P	T	C	Q	T	H	S	R	A
0341	TTT	CTG	CAT	GCA	CTG	CTG	CAT	AGC	GAT	AAT	ACC	ACC	GCA	CTG	CAT	CAT	CTG	ACC	GTT	CAT
	F	L	H	A	L	L	H	S	D	N	T	T	A	L	H	H	L	T	V	H
0361	AAT	ATT	GCA	TAT	CAG	CTG	CAG	CTG	CTG	AGC	GCA	GTT	CGT	AGC	AGC	ATT	CTG	GAA	CAG	CGT
	N	I	A	Y	Q	L	Q	L	L	S	A	V	R	S	S	I	L	E	Q	R
0381	TTT	CCG	GAT	TTT	GTG	CGT	AAT	TTT	ATG	CGT	ACC	ATG	TAT	GGC	GAT	CAT	AGC	CTG	TGT	CCG
	F	P	D	F	V	R	N	F	M	R	T	M	Y	G	D	H	S	L	C	P
0401	GCA	TGG	GCA	GTT	GAA	GCA	CTG	GCA	AGC	GTT	GGT	ATT	ATG	CTG	ACC					
	A	W	A	V	E	A	L	A	S	V	G	I	M	L	T					

A.9 SEC-nMS Experimente einer äquimolaren Mischung von QTRT1 und QTRT2-Varianten.

Ausschnitt A zeigt die überlagerten SEC-Profile der äquimolaren Mischung von QTRT1 sowie verschiedener QTRT2-Varianten. In Ausschnitt B sind die nMS-Spektren der korrespondierenden Proben dargestellt. Die resultierenden relativen Intensitäten des monomeren QTRT1 sowie des Heterodimers sind in Abschnitt C gezeigt.



Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen beteiligten Personen bedanken, die mich bei der Durchführung und Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Zu aller erst möchte ich meinem Betreuer Prof. Dr. Klaus Reuter für das Vertrauen danken, meine Doktorarbeit in seinem Arbeitskreis durchführen zu dürfen. Vielen Dank für deine wertvollen Impulse und dein stets offenes Ohr. Ich wusste den wissenschaftlichen Freiraum bei der Gestaltung meiner Arbeit sehr zu schätzen. Gleichzeitig gabst du mir wichtige Orientierung, wenn ich sie brauchte.

Ein besonderer Dank gilt auch Prof. Dr. Gerhard Klebe. Vielen Dank für das tolle Arbeitsumfeld, das Sie geschaffen haben. So konnte ich während meiner Arbeit auf zahlreiche Methoden und Kompetenzen zurückgreifen, die Sie in Ihrem Umfeld etabliert haben. Den regelmäßigen Austausch innerhalb der Arbeitsgruppenseminare werde ich in guter Erinnerung behalten.

Prof. Dr. Julia Weigand möchte ich für die spontane Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Prof. Dr. Andreas Heine möchte ich für die intensive Unterstützung bei allen kristallographischen Themen danken. Vielen Dank für deine gewissenhafte Überprüfung meiner Kristallstrukturen. In dieser Zeit konnte ich sehr viel über Proteinkristallographie lernen.

Ich hatte großes Glück mit den Menschen, mit denen ich das Büro teilen durfte. Eure positive und herzliche Art habe ich sehr genossen. Ich möchte Stefanie Dörr, Marina Gárdonyi, Lea-Sophie Klee und Matthias Oebbeke für die tolle Atmosphäre danken. Ich bin mir sicher, dass unsere Freundschaft auch in Zukunft Bestand hat.

Besonders erwähnen möchte ich an dieser Stelle Stefanie Dörr. Zu Beginn meiner Doktorarbeit hast du mir sehr dabei geholfen, mir neue Labortechniken aneignen. Vielen Dank, dass du mich mit den enzymkinetischen Messungen nicht alleine gelassen hast. So hast du mir diese eher weniger spannende Aufgabe mit angenehmen Gesprächen und viel Musik um einiges verschönert.

Christian Sohn möchte ich für die Einführung und Betreuung am Röntgengerät sowie die Übernahme vieler organisatorischer Aufgaben im Hintergrund danken.

Hans-Dieter Gerber möchte ich für die Synthese mehrerer TGT-Substrate sowie den sehr angenehmen persönlichen Austausch bedanken.

Jud Badran und Janis Müller danke ich für die Einführung in die Kristallographie sowie die Software zum Lösen von Kristallstrukturen. Ich danke euch beiden für euer offenes Ohr und eure Geduld bei zerbrechlichen Kristallen.

Meinen Vertiefungsstudenten Daniel Hammerl, Erika Sima, Anna Trodler, Nadim Omari, Joshua Rosner und Moritz Ruf möchte ich für ihr Interesse an meinem Forschungsthema sowie ihrer Unterstützung im Labor danken.

Ich möchte allen Synchrotron-Fahrern danken, die ihre Wochenenden an den Beamlines dieser Welt verbracht haben, um für die Arbeitsgruppe Daten zu sammeln.

Einen besonders großen Dank gilt Matthias Oebbeke und Oliver Pilgram für das Korrekturlesen meiner gesamten Arbeit.

Weiterhin danke ich Anna Sandner, Steffen Glöckner, Khang Ngo, Andreas Nguyen, Dzung Nguyen, William Scanlan, Alexander Metz und Francesca Magari für die tolle Arbeitsatmosphäre, die wunderbare Zeit in Marburg und die tollen Erinnerungen.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir mein Studium erst ermöglicht haben. Ich bin euch für die bedingungslose Unterstützung während dieser Zeit sehr dankbar.

Zu guter Letzt danke ich meiner Verlobten Jule, die mir am meisten Kraft gibt. Du hast mir immer dann Mut gemacht, wenn ich am stärksten gezweifelt habe. Aber auch einen Arschtritt konntest du verteilen, wenn es nötig war. Wir können stolz auf das sein, was wir zusammen erreicht haben und auf die Zukunft, die vor uns liegt. In bin unendlich froh, dich zu haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Biochemische und kristallographische Charakterisierung der eukaryotischen tRNA-Guanin-Transglykosylase (TGT)“

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

.....

(Maurice Sebastiani)