



Von der funktionellen Untersuchung von tRNA CCA-addierenden Enzymen hin zu ihrer Charakterisierung durch serielle Röntgenkristallographie

Meine Doktorarbeit wurde unter der Leitung von Dr. Claude Sauter (ARN - IBMC - CNRS, Universität Straßburg) und Prof. Dr. Mario Mörl (Biochemie und Molekularbiologie, Universität Leipzig) im Rahmen eines von der Deutsch-Französischen Hochschule unterstützten Cotutelle-Programms durchgeführt. Der Schwerpunkt lag auf der Anwendung neuartiger röntgenkristallographischer Methoden zur Untersuchung einer bestimmten Klasse von Polymerasen, den so genannten CCA-addierenden Enzymen, die die Addition des 3'-CCA-Schwanzes von Transfer-RNAs (tRNAs) katalysieren.

Im letzten Jahrzehnt gab es wichtige technologische Entwicklungen im Bereich der



Kontrollenzyme. Zunächst stellte mein Gastteam in Leipzig fest, dass RcuCCA in der Lage ist, an kanonische tRNA zu binden und ein vollständiges CCA₉₇₄₂₉₂₈₂₉ zu bilden, ebenso wie HsaCCA und EcoCCA. Allerdings konnte nur RcuCCA miniaturisierte tRNAs aus *R. culicivox* verarbeiten. Dann wurde eine Reihe von Chimären entworfen, indem Fragmente von RcuCCA, die vermutlich an der tRNA-Bindung beteiligt sind, in HsaCCA injiziert wurden. Wir analysierten die Affinität dieser chimären Enzyme für kleine tRNAs mittels elektrophoretischem Mobilitätsverschiebungstest (EMSA). Durch die Kombination von biochemischen Ergebnissen und dem Rechenmodell RcuCCA konnten wir die wichtige Rolle von zwei Lysinen aus dem katalytischen Kern für die Stabilität der Bindung von kleinen tRNAs und die korrekte Ausrichtung des 3'-Primers in der katalytischen Stelle aufzeigen. Alle oben beschriebenen Ergebnisse wurden im International Journal of Molecular Sciences veröffentlicht (Hennig et al., 2020).

Sobald die biochemischen Eigenschaften eines Enzyms feststehen, können die Kristallisationsversuche beginnen. Einerseits versuchten wir, große Kristalle zu züchten, die für die "traditionelle" Synchrotronanalyse geeignet sind. Andererseits ging es darum, mikrokristalline Proben für die neue Generation serieller Röntgenkristallografie-Experimente herzustellen. Bei dieser Unternehmung kombinierten wir konventionelle Methoden, d. h. Dampfdiffusion in Mikrotiterplatten, Mikroaussaat und Batch, mit fortschrittlicheren Methoden, die in dieser Arbeit beschrieben werden. Bei einer dieser Techniken kam ein mikrofluidisches Gerät namens ChipX zum Einsatz, das von meinem Labor in Straßburg entwickelt wurde. ChipX wurde für Gegendiffusionsexperimente entwickelt und ermöglicht das Screening von acht verschiedenen Kristallisationsmitteln in einem breiten Konzentrations- und Übersättigungsbereich. Darüber hinaus kann ChipX direkt bei Raumtemperatur an Standard-Synchrotron-Anlagen eingesetzt werden. Auf der Grundlage des Konzepts der seriellen Kristallographie sammelten wir mehrere Datensätze zu einer Auswahl von Kristallen und kombinierten die Daten, um die Struktur des Makromoleküls zu rekonstruieren. Die

