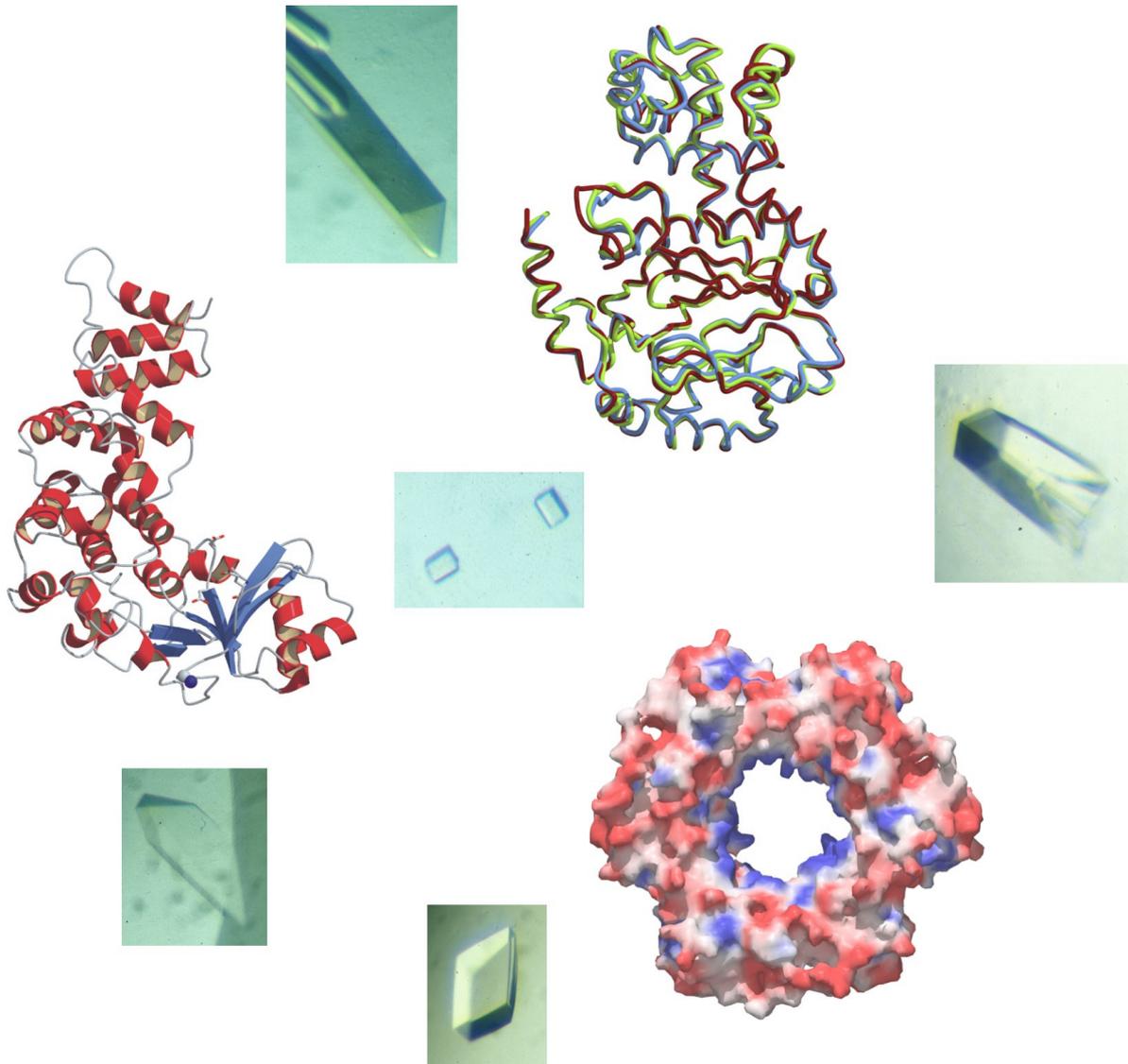


**Martin Augustin**

**Strukturanalyse ausgewählter Komponenten der  
Replikationsmaschinerie aus  
*Pyrococcus furiosus***

**Strukturanalyse der humanen mitochondrialen tRNA-  
Nukleotidyltransferase**



Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Strukturforschung

**Strukturanalyse ausgewählter Komponenten der Replikationsmaschinerie aus  
*Pyrococcus furiosus*  
Strukturanalyse der humanen mitochondrialen tRNA-Nukleotidyltransferase**

Martin Augustin

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

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Dr. h. c. R. Huber

2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

3. Priv.-Doz. Dr. habil A. Messerschmidt,  
Universität Konstanz

Die Dissertation wurde am 10.03.2003 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 16.05.2003 angenommen.

Teile der Arbeit sind zur Veröffentlichung eingereicht bzw. wurden bereits veröffentlicht in:

Augustin, M.A., Huber, R. and Kaiser, J.T. (2001) *Crystal Structure of a DNA-dependent RNA polymerase (DNA primase)*. *Nature Structural Biology* 8, 57 - 61

Augustin, M.A., Huber, R. and Kaiser, J.T. (2002) *Structural implications for substrate binding by Pyrococcus furiosus DNA primase*. Poster presentation at the *XIX Congress and general assembly of the International Union of Crystallography*, Geneva, Switzerland

Augustin, M.A., Reichert, A.S., Betat, H., Huber, R. Mörl, M. and Steegborn, C. *Crystal Structure of the Human CCA-adding Enzyme: Insights Into Template Independent Polymerisation*. Zur Publikation akzeptiert bei *Journal of Molecular Biology*

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Å	Angström
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
CTP	Cytosintriphosphat
DNA	2'-Desoxyribonukleinsäure
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytosin-5'-triphosphat
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat
dNMP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-monophosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat
dUTP	2'-Desoxy-Uracil-5'-triphosphat
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
MAD	multiwavelength anomalous dispersion
MCM	minichromosome maintenance
MES	2-Morpholinoethylsulfonsäure
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol
nm	Nanometer

NMP	Nukleosid-5'-monophosphat
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OD <sub>xxx</sub>	optische Dichte bei xxxnm
ORC	origin recognition complex
ori	origin of replication
PEG	Polyethylenglycol
pMol	Picomol
ppp	5'-Triphosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RFC	replication factor C
Rmsd	root mean square deviation
RPA	replication protein A
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunden
SIR	single isomorphous replacement
tRNA	transfer- Ribonukleinsäure
U/min	Umdrehungen/Minute
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
Vol	Volumenanteil
w/v	Masse/Volumen

DNA-Basen werden im Einbuchstabencode bezeichnet.

Zur Benennung von einzelnen Aminosäuren wurden sowohl der Einbuchstabencode als auch der Dreibuchstabencode verwendet.

---

<b>1</b>	<b>Danksagung</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
3.1	DNA-Replikation in Eukaryoten	11
3.1.1	Ausgewählte Komponenten der Eukaryontischen DNA-Replikation	11
3.1.2	Molekularer Mechanismus der Basenaddition (Elongation) bei DNA-Polymerasen	13
3.2	PCNA als zentrale Schaltstelle der Replikation	15
3.2.1	Strukturelle Charakterisierung von DNA-Polymerase <i>sliding clamps</i> aus verschiedenen Lebensreichen	15
3.3	Der DNA-Polymerase $\alpha$ -Primase-Komplex in Eukaryoten	16
3.3.1	Klassifizierung von DNA-Primasen	17
3.4	DNA-Replikation in Archaea	18
3.5	Prozessierung von tRNA	21
3.5.1	3'-Prozessierung bakterieller tRNAs	22
3.5.2	Prozessierung eukaryontischer und archaealer tRNAs	23
3.5.2.1	Prozessierung von Organellen-tRNAs	24
3.5.2.2	<i>CCA adding enzymes</i> und CCA-Addition	24
<b>4</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>27</b>
4.1.1	Materialien für molekularbiologische Arbeiten	27
4.1.1.1	DNA-Oligos	27
4.1.1.2	Bakterien	27
4.1.1.3	Plasmide	28
4.1.1.4	Enzyme und Kits	28
4.2	Molekularbiologische Methoden	29
4.2.1	Präparation genomischer DNA aus <i>Pyrococcus furiosus</i>	29
4.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
4.2.3	Agarosegelelektrophorese von DNA	30
4.2.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
4.2.5	Restriktionsverdau von DNA	31
4.2.6	Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase	31
4.2.7	Ligation von DNA Fragmenten	31
4.2.8	Automatisierte Sequenzierung von DNA ( <i>cycle sequencing</i> )	31

---

4.2.9	Klonierung von <i>Pfu-PCNA</i> .....	32
4.2.10	Klonierung von <i>Pfu-Prim</i> .....	32
4.2.11	Klonierung von Deletionsmutanten von <i>hmtCCase</i> .....	32
4.2.12	Qualitativer Primase-Assay .....	33
4.3	Mikrobiologische Methoden .....	33
4.3.1	<i>E. coli</i> Flüssigkulturen .....	33
4.3.2	<i>E. coli</i> Plattenkulturen .....	34
4.3.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen .....	34
4.3.4	Transformation in kompetente <i>E. coli</i> Zellen .....	34
4.3.5	Transformation über Elektroporation .....	35
4.3.6	Expression von <i>Pyrococcus furiosus</i> PCNA .....	35
4.3.7	Expression der katalytischen Untereinheit von <i>Pyrococcus furiosus</i> DNA-Primase .....	35
4.3.8	Expression von humaner mitochondrialer tRNA-Nukleotidyltransferase.....	36
4.3.9	Herstellung von <i>E. coli</i> Rohextrakten.....	36
4.4	Proteinchemische Methoden .....	36
4.4.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	36
4.4.2	Proteinfällung mit TCA .....	37
4.4.3	Umpufferung .....	37
4.4.4	Konzentrierung von Proteinlösungen .....	37
4.4.5	Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
4.4.6	Coomassie-Färbung .....	38
4.4.7	Proteinpräparation.....	38
4.4.7.1	Reinigung von <i>Pyrococcus furiosus</i> PCNA .....	38
4.4.7.2	Reinigung der katalytischen Untereinheit der DNA-Primase aus <i>Pyrococcus furiosus</i> .....	39
4.4.7.3	Reinigung von humaner mitochondrialer tRNA-Nukleotidyl-transferase ...	39
4.5	Kristallographische Methoden .....	39
4.5.1	Kristallisation.....	39
4.5.2	Datensammlung und Datenreduktion .....	40
4.5.3	Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung.....	41
4.5.4	Analyse von Atommodellen .....	41
4.5.5	Graphische Darstellungen und Sequenzvergleiche .....	42
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>

5.1	Strukturbestimmung von <i>Pyrococcus furiosus</i> PCNA.....	43
5.1.1	Klonierung, Expression, Reinigung und Kristallisation von <i>Pyrococcus furiosus</i> PCNA.....	43
5.1.2	Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung.....	44
5.1.3	Struktur von <i>Pfu</i> -PCNA.....	45
5.1.4	Strukturelle Homologie zu eukaryontischem PCNA.....	47
5.2	Strukturanalyse der katalytischen Untereinheit von <i>Pyrococcus furiosus</i> DNA-Primase.....	50
5.2.1	Identifikation und Klonierung der katalytischen DNA-Primase-Untereinheit aus <i>Pyrococcus furiosus</i> .....	50
5.2.2	Rekombinante Expression und Reinigung der katalytischen Untereinheit der DNA-Primase aus <i>Pyrococcus furiosus</i> .....	51
5.2.3	Nachweis enzymatischer Aktivität.....	52
5.2.4	Kristallisation und Datensammlung.....	53
5.2.5	Phasierung, Modellbau und Verfeinerung.....	54
5.2.6	Überblick über die Struktur.....	56
5.2.7	Oberflächenstruktur und Ladungsverteilung.....	58
5.2.8	Das aktive Zentrum.....	59
5.2.9	Der „Zinkknöchel“.....	61
5.2.10	Versuche zur Kokristallisation.....	62
5.3	Strukturbestimmung von <i>hmtCCase</i> .....	68
5.3.1	Expression, Reinigung und Kristallisation von humaner mitochondrialer tRNA-Nukleotidyltransferase.....	67
5.3.2	Datensammlung und Strukturlösung.....	67
5.3.3	Überblick über die Struktur.....	69
5.3.4	Ladungsverteilung und konservierte Aminosäuren an der Oberfläche von <i>hmtCCase</i> .....	73
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>75</b>
6.1	PCNA aus <i>Pyrococcus furiosus</i> .....	75
6.1.1	Klonierung, Expression und Reinigung.....	75
6.1.2	Strukturanalyse.....	75
6.1.3	Thermostabilität von <i>Pfu</i> -PCNA.....	77
6.1.4	Interaktion mit archaealer DNA-Polymerase I.....	77
6.2	Die katalytische Untereinheit der DNA-Primase aus <i>Pyrococcus furiosus</i> .....	79

6.2.1	Identifikation, Nachweis enzymatischer Aktivität und Strukturlösung.....	79
6.2.2	Strukturelle Unterschiede bekannter Primasen.....	80
6.2.3	Das aktive Zentrum.....	82
6.2.4	Strukturelle Homologie zu eukaryontischer Primase .....	84
6.2.5	Hypothetisches Modell der aktiven prim-Typ Primase .....	85
6.3	Das humane <i>CCA-adding enzyme</i> .....	87
6.3.1	Kristallisation und Strukturlösung.....	87
6.3.2	Strukturelle Klassifizierung und Sequenzvergleiche.....	88
6.3.3	Strukturvergleiche.....	89
6.3.4	Das aktive Zentrum.....	91
6.3.5	Modelle für CCA-Addition .....	92
<b>Literaturverzeichnis.....</b>		<b>97</b>

### 1 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

Ein Besonderer Dank geht an Herrn apl.-Prof. Dr. Robert Huber, der es mir ermöglicht hat, diese interessanten Projekte zu bearbeiten und der mir jederzeit mit Rat zur Seite stand.

Ein herzliches Dankeschön geht vor allem auch an die Personen, die mir als Biologen die Kristallographie nahegebracht haben, insbesondere Herrn Dr. Jens T. Kaiser, Herrn Dr. Manuel E. Than, Herrn Dr. Stefan Steinbacher, Herrn Dr. Markus C. Wahl, Herrn Dr. Hans Brandstetter.

Danke sagen möchte ich auch meinen Kollegen im Labor und im Büro, die mir immer hilfreich zur Seite standen: Herr Dr. Hans-Georg Beisel, Herr Dr. Michael Blaesse, Herr Dr. Holger Dobbek, Herr Michael Engel, Herr Dr. Rainer Friedrich, Herr Dr. Pablo Fuentes-Prior, Herr Dr. Michael Groll, Herr Stefan Henrich, Herr Dr. Norman Kairies, Herr Michael Koch, Herr Martin Locher, Herr Dr. Ulf Marquardt, Frau Kerstin Rohr, Frau Anna Tochowicz, Herr Dr. Tobias Ullrich, Frau Katja Wenig, Herr Dr. Michael Worbs.

Ein herzliches „Vergelt's Gott“ geht an die Personen, die mir bei allen technischen und organisatorischen Problemen geholfen haben: Frau Gina Beckmann, Frau Monika Bumann, Frau Renate Rüller, Frau Monika Schneider, Frau Marion Heinze, Herr Werner Dersch, Herr Ottmar Paul, Herr Carsten-Peter Kaerlein, Herr Snezan Marinkovic, Herr Dr. Gleb Bourenkov und Herr Dr. Albrecht Messerschmidt, Herr Dr. Reiner Kiefersauer.

Während der vergangenen vier Jahre habe ich an der Abteilung Strukturforschung viele Freunde gewonnen. Zu diesen zähle ich insbesondere (sofern nicht oben schon genannt): Herr Dr. Stefan „Wie viele Seiten, Gusti?“ Gerhardt, Herr Dr. Clemens Steegborn, Herrn Dr. Tim Clausen, Herrn Dr. Stefan Riedl, Herrn Dr. Stephan Ehlert, Herrn Dr. Uwe Jacob, Herrn Dr. Peter Sondermann, Frau Dr. Kerstin Wendt, Herrn Rasso „Feel free!“ Willkomm, Herrn Werner Atzenhofer, Frau Daniela Jozic, Frau Marianne Braun, Frau Iris Fritze, Herrn Dr. Klaus Maskos, Herrn Arne Ramsperger, Herrn Stephan Krapp, Frau Constanze

Breithaupt, Herrn Dr. Hyun Kyu Song, Herrn Dr. Jeong Sun Kim, Herrn Dr. Rupert Lang, Herrn Tobias Krojer, Herrn Otto Kyrieleis, Frau Irena Bonin, Frau Stefanie Bauer, Frau Susanne Stanitzek, Frau Marina Rubini.

Besonders danken möchte ich auch meinen Kooperationspartnern am Max-Planck-Institut für evolutionäre Anthropologie in Leipzig: Frau Dr. Heike Betat, Herrn Dr. Mario Mörl und Herrn Dr. Andreas Reichert.

Den wichtigsten Personen in meinem Leben gilt mein letzter und größter Dank: Meinen Eltern und meiner Lebensgefährtin Carolin Edlhuber.

Abschließend möchte ich mich noch bei all jenen Kollegen bedanken, die mir hier eine schöne Zeit ermöglicht haben und mich bei denjenigen, die ich in der obigen Aufzählung versehentlich vergessen habe, entschuldigen.

## 2 Zusammenfassung

Die DNA-Replikation ist einer der zentralen Vorgänge in allen Organismen und bildet die Grundlage für Fortpflanzung und Evolution. Zwei an diesem Prozess beteiligte Proteine sind PCNA (**p**roliferating **c**ell **n**uclear **a**ntigen) und DNA-Primase. PCNA besitzt keine enzymatische Aktivität, seine Aufgabe während der Replikation besteht in der Erhöhung der Prozessivität von DNA-Polymerasen. Es bildet einen Ring um DNA und bindet die replikativen DNA-Polymerasen, wodurch diese während der DNA-Synthese an der DNA „festgeklammert“ werden, weshalb PCNA und seine funktionellen Homologen auch als *sliding clamps* bezeichnet werden. Zusätzlich erfüllt PCNA in Eukaryonten durch die Bindung an zahlreiche Enzyme des DNA-Metabolismus' eine wesentliche Funktion in der Koordination von Replikation, DNA-Reparatur und Zellzyklus-Kontrolle.

Der erste Schritt der eigentlichen DNA-Replikation wird von der sogenannten DNA-Primase katalysiert. DNA-Polymerasen sind im allgemeinen nicht dazu in der Lage, DNA *de novo* zu synthetisieren. Für ihre Aktivität benötigen sie neben einer Matrize (*template*) einen *primer* mit einem freien 3'-OH-Ende. Dieser *primer* besteht in allen Organismen aus RNA und wird *template*-abhängig von der DNA-Primase synthetisiert.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Kristallstruktur des PCNA-Homologen aus dem Archaeum *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-PCNA) bestimmt und die katalytische Untereinheit der DNA-Primase aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-Prim) identifiziert sowie ihre Kristallstruktur ermittelt.

*Pfu*-PCNA besitzt funktionelle und strukturelle Homologie zu den Prozessivitätsfaktoren von DNA-Polymerasen aus Bakterien, Bakteriophagen und Eukaryonten. Im Kristall bildet es ein kristallographisches Trimer und entspricht darin dem ebenfalls trimeren eukaryontischen PCNA und der *sliding-clamp* aus Bakteriophagen, nicht jedoch der nur dimeren beta-Untereinheit der bakteriellen DNA-Polymerase III. Dies bestätigt die auf Aminosäuresequenz-Homologie beruhenden Vermutungen, daß DNA-Replikationsproteine von Archaea größere Verwandtschaft zu den entsprechenden Faktoren von Eukaryonten als von Bakterien zeigen würden. Im Vergleich zu PCNA aus Mensch und Bäckerhefe enthält *Pfu*-PCNA zwei verkürzte *loop*-Regionen sowie eine erhöhte Anzahl an intramolekularen Ionen-Paaren, eine Merkmalskombination, die im allgemeinen als zumindest mitverantwortlich für erhöhte Thermostabilität von Proteinen angesehen wird.

Die katalytische Untereinheit der DNA-Primase aus *Pyrococcus furiosus* ist das erste Protein mit Primase-Aktivität, von dem die dreidimensionale Struktur bestimmt werden konnte. Keine der beiden Domänen in der Struktur von *Pfu*-Prim zeigt Ähnlichkeit zu bekannten Faltungsmotiven, womit *Pfu*-Prim eine neue Familie in der SCOP-Datenbank (structural classification of proteins) definiert. Die *active site*-Domäne von *Pfu*-Prim enthält alle innerhalb der *prim*-Typ-Primasen konservierten Aminosäuren, darunter drei invariante negativ geladene Reste, welche durch Mutagenese-Studien in Maus-Primase als essentiell für die Primase-Aktivität identifiziert worden waren. Die dreidimensionale Anordnung dieser drei Aminosäuren entspricht der katalytischen Triade von DNA-Polymerasen, was auf einen ähnlichen Mechanismus während des Nukleotidyltransfers schließen lässt. *Pfu*-Prim enthält im Gegensatz zu dem Zinkfinger in bakteriellen DnaG-Typ-Primasen ein Zinkknöchel-Motiv, welches vermutlich eine funktionelle Rolle spielt. Die gesamte Struktur von *Pfu*-Prim ist rigide und im Vergleich zu DNA-Polymerasen relativ offen, was eine nur schwache Interaktion mit einzelsträngiger DNA vermuten lässt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Kristallstruktur der humanen mitochondrialen tRNA-Nukleotidyltransferase (*hmtCCase*, *CCA-adding enzyme*) gelöst. Dieses in Eukaryonten essentielle Enzym katalysiert die sequentielle Addition des 3'-CCA-Endes an tRNA-Moleküle, eine Aktivität, die durch unvollständige tRNA-Gene und partiellen Nuklease-Verdau von eigentlich kompletten tRNAs nötig wird. Das *CCA-adding enzyme* besitzt ein einziges aktives Zentrum für die Addition beider NTP-Substrate, allerdings existiert keine Nukleinsäure-Matrize. Das Enzym fungiert somit als RNA-Polymerase und bildet gleichzeitig das *template* für die spezifische Addition von CCA aus. Die Struktur der *hmtCCase* zeigt in ihrem definierten Bereich einen Aufbau aus drei Domänen. Die N-terminale Domäne zeigt strukturelle Homologie zur Familie der Kanamycin-Nukleotidyltransferasen und beinhaltet das aktive Zentrum aus zwei innerhalb der eukaryontischen und bakteriellen *CCA-adding enzymes* invarianten Aspartat-Resten. Die intermediäre Domäne ist Sitz des Protein-*templates*, welches in der Lage ist, innerhalb einer Bindungs-Stelle sowohl CTP als auch ATP zu binden. Aus Struktur-Vergleichen mit der strukturell homologen DNA-Polymerase beta konnte ein Modell für die CCA-Addition entwickelt werden. Dieses „Korkenzieher“-Modell ist im Gegensatz zu allen anderen Modellen mit sämtlichen bekannten biochemischen Daten kompatibel und beinhaltet die Bindung eines in der Struktur ungeordneten Bereichs innerhalb der N-terminalen Domäne an das tRNA-Substrat.

### 3 Einleitung

*“It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.”*

(Watson and Crick, 1953)

Mit diesen Worten beenden Watson und Crick ihren Artikel, in dem sie – basierend unter anderem auf röntgenkristallographischen Daten von Wilkins und Franklin – ein bis heute gültiges Struktur-Modell des Salzes von Desoxyribonukleinsäure (DNA) vorstellten.

Bis ins Jahr 1944 war man davon ausgegangen, daß chromosomale Proteine die Träger der genetischen Information wären, doch diese Ansicht musste nach der Veröffentlichung des „Transformations-Experiments“ von Avery, MacLeod und McCarty (Avery et al., 1944) revidiert werden. Frederick Griffith hatte vorher (Griffith, 1928) herausgefunden, daß genetische Information aus einem zellfreien Extrakt von vorher durch Hitze abgetöteten Bakterien auf andere Bakterien übertragen (transformiert) werden kann, und Avery und seine Mitarbeiter konnten nachweisen, daß Desoxyribonukleinsäure oder DNA (*deoxyribonucleic acid*) für die Transformation verantwortlich war. Diese Erkenntnis wurde 1952 durch die Experimente von Hershey und Chase bestätigt, als sie entdeckten, daß bei der Infektion eines Bakteriums mit dem Bakteriophagen T2 die Phagen-DNA in die Bakterienzelle injiziert wird, während die Phagen-Proteine außerhalb der infizierten Zelle verbleiben (Hershey and Chase, 1952). Damit war eindeutig die DNA als genetischer Informationsträger identifiziert.

Erwin Chargaff hatte bereits früher bei der Untersuchung der Basenzusammensetzung von DNA verschiedener Organismen festgestellt, daß in einem Organismus der Prozentgehalt an Thymin immer gleich dem von Adenin ist, ebenso wie der prozentuale Anteil von Cytosin dem von Guanin entspricht (Chargaff, 1950; Chargaff, 1951), und der Grund für diese sogenannte „Chargaff’sche Äquivalenzregel“ wurde durch das Modell zweier helikal

angeordneter gegenläufiger Polynukleotidstränge mit spezifischer Paarung der Basen offensichtlich.

DNA hat sich bei praktisch allen Organismen als Speicher der genetischen Information durchgesetzt. Offensichtlich bietet sie für die Natur die besten Voraussetzungen, um einerseits die Konservierung und möglichst originalgetreue Weitergabe der Erbinformation zu gewährleisten, andererseits aber auch durch die Möglichkeit von Rekombinations- und Mutationsereignissen einen genügend großen Spielraum für genetische Variabilität und damit Evolution zur Verfügung zu stellen. Die Vervielfältigung des genetischen Materials wird in der Zelle von einer Vielzahl von Enzymen und Enzymkomplexen realisiert, und in den vergangenen nahezu 50 Jahren wurden die an diesem Prozess beteiligten Enzyme in Bakterien und Eukaryonten größtenteils identifiziert, biochemisch charakterisiert und teilweise auch strukturell beschrieben. Es zeigte sich innerhalb dieser beiden Lebensreiche ein im Prinzip identisches Bild in Bezug auf die Funktion der am eigentlichen Vorgang der Replikation beteiligten Komponenten (Abbildung 1):

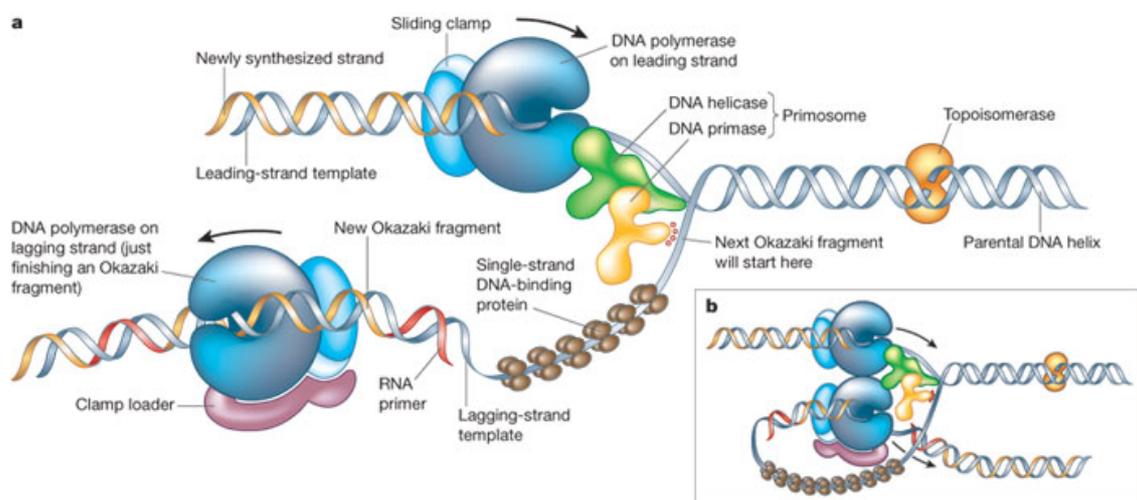


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Replikationsgabel (entnommen aus Alberts, 2003)

Der erste Schritt der DNA-Replikation wird von der sogenannten Primase katalysiert und besteht in allen Organismengruppen aus der Synthese eines kurzen (in der Regel etwa 4-10 Basen langen) *primers* aus RNA. Der *primer* wird anschließend von der/den replikativen DNA-Polymerasen mit Desoxyribonukleotiden verlängert, wodurch ein RNA/DNA-Hybrid entsteht. In finalen Schritten wird der RNA-Anteil durch spezifische RNase-Funktionen aus diesem Hybrid entfernt und die beiden sequentiellen DNA-Stränge können kovalent durch eine DNA-Ligase miteinander verbunden werden.

Obwohl dieser fundamentale Prozess innerhalb unterschiedlicher Lebensreiche konserviert und vermutlich auch auf ähnliche mechanistische Art und Weise abläuft, gibt es doch spezifische Unterschiede bezüglich Art, Aufbau und Anzahl der beteiligten Proteine.

Zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit waren die Erkenntnisse über die an der Replikation des archaealen Genoms beteiligten Faktoren relativ begrenzt (siehe Abschnitt 3.2), deshalb sollen die am Replikationsprozess beteiligten Enzyme und Enzymkomplexe zumeist am Beispiel der Eukaryonten unter spezieller Berücksichtigung der in der Arbeit behandelten Proteine näher erläutert werden.

### 3.1 DNA-Replikation in Eukaryonten

Die meisten Erkenntnisse über DNA-Replikation in Eukaryonten wurden durch Untersuchungen mit Säugerzell-Extrakten gewonnen, welche die Replikation von Plasmiden mit dem Replikationsursprung des Simian Virus 40 (SV40 *ori*) ermöglichten (Übersichtsartikel von Waga and Stillman, 1998). Eine begrenzte Auswahl von unmittelbar an der Replikation beteiligten Proteinen wird im Folgenden beschrieben. Allerdings gibt es in Eukaryonten zusätzliche Faktoren, die im weiteren Sinne der DNA-Replikation zugeordnet werden können. Diese werden aufgrund der komplexen Struktur des eukaryontischen Genoms, des oftmals spezifischen Zeitpunkts des Replikationsstarts, der Vielzahl von DNA-Reparaturmechanismen während der Replikation und der Notwendigkeit, eine exakt einmalige Verdopplung des Erbguts pro Zellzyklus sicherzustellen, im Organismus benötigt. Da sie jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit waren, sei auf entsprechende Übersichtsartikel und die darin zitierten Originalartikel verwiesen (Initiation der DNA-Replikation: Takisawa et al., 2000; *repair* DNA-Polymerasen: Beard and Wilson, 2001; Sutton and Walker, 2001; Carson and Christman, 2001; Aguilera, 2001; Stucki et al., 2001; Bebenek and Kunkel, 2002). Auch auf die Replikation von mitochondrialer (Lecrenier and Foury, 2000; Taanman, 1999) und Plastid-DNA (Birky, 2001) kann an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.

#### 3.1.1 Ausgewählte Komponenten der Eukaryontischen DNA-Replikation

Für die Replikation von SV40 ist nur ein viral kodiertes Protein nötig, das sogenannte SV40 große Tumorantigen (T Antigen). Dieses agiert vor und während der Replikation sowohl als

Initiatorprotein als auch als replikative Helikase an der Replikationsgabel. Alle anderen notwendigen Funktionen werden von Proteinen der infizierten Zelle ausgeführt. Eine Übersicht über die biologischen Aktivitäten von direkt in die Replikation von SV40 involvierten Proteinen gibt Tabelle 1 (modifiziert nach Waga and Stillman, 1998).

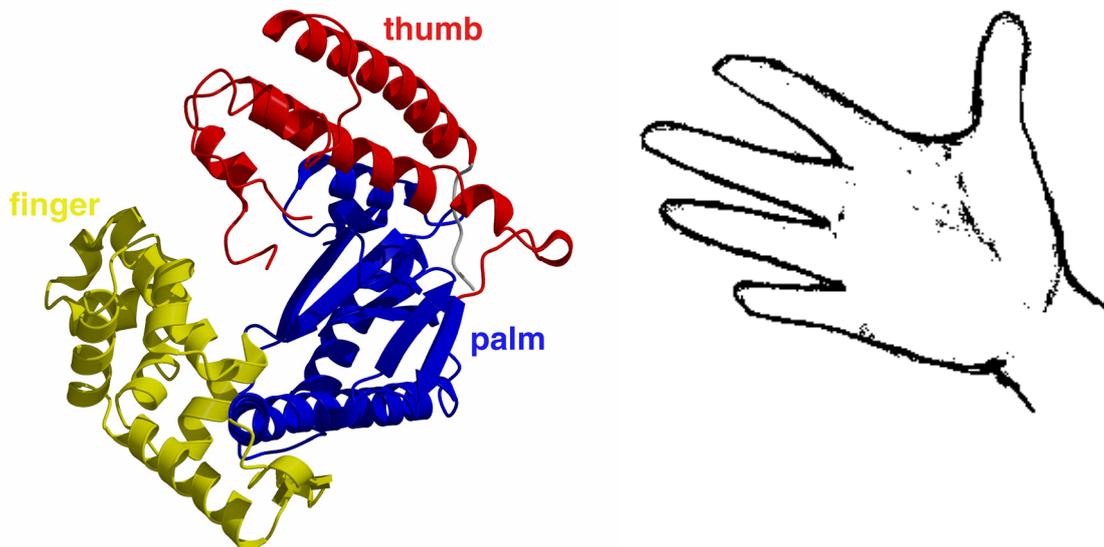
**Tabelle 1: Funktion verschiedener Komponenten der eukaryontischen Replikationsgabel**

<i>Protein/ Proteinkomplex</i>	<i>Funktion(en)</i>
RPA	bindet einzelsträngige DNA; aktiviert DNA-Polymerasen; ermöglicht Beladung von DNA mit DNA-Helikase
PCNA	erhöht die Prozessivität von DNA-Polymerasen; aktiviert RFC
RFC	ermöglicht Beladung von DNA mit PCNA (ATP-anhängig)
Polymerase $\alpha$ -Primase	<i>primer</i> -Synthese; Initiation der Replikation
Polymerase $\delta/\epsilon$	DNA-Synthese; 3'-5'-Exonuclease
FEN1	Nuklease zur Entfernung von RNA- <i>primer</i>
RNase HI	Nuklease zur Entfernung von RNA- <i>primer</i>
DNA Ligase	Ligation von DNA-Enden
evtl. MCM-Proteine	DNA-Helikase

Die eigentliche DNA-Synthese wird im Zellkern in 5'-3'-Richtung von den drei replikativen DNA-Polymerasen  $\alpha$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  durchgeführt. Obwohl bis zum jetzigen Zeitpunkt keine dieser DNA-Polymerasen strukturell bekannt ist, kann aufgrund von Sequenzhomologie zu der strukturell exzellent charakterisierten eukaryontischen DNA-Polymerase beta (Davies et al., 1994, Sawaya et al., 1994 Pelletier et al., 1994) sowie zu anderen strukturell aufgeklärten DNA-Polymerasen aus Bakterien und Archaea (siehe 3.1.2) ein allen DNA-Polymerasen sehr ähnlicher Reaktionsmechanismus postuliert werden.

### 3.1.2 Molekularer Mechanismus der Basenaddition (Elongation) bei DNA-Polymerasen

Aminosäuresequenz-Vergleiche und Kristallstrukturanalysen einer Vielzahl von DNA-Polymerasen ermöglichten eine Klassifizierung dieser Enzyme in zumindest vier verschiedene Familien (Familien A, B, X, Y; Ito and Braithwaite, 1991; Braithwaite and Ito, 1993; Steitz, 1999; Bebenek and Kunkel, 2002). Trotz einiger Unterschiede in Bezug auf Domänenstruktur, ist in allen bisher strukturell bekannten DNA-Polymerasen ein gemeinsamer Grundaufbau erkennbar. Diese Basalstruktur ist in etwa einer „rechten Hand“ mit „Finger- (*finger*)“, „Handfläche- (*palm*)“ und „Daumen (*thumb*)“-Domäne vergleichbar (Kohlstaedt et al., 1992).

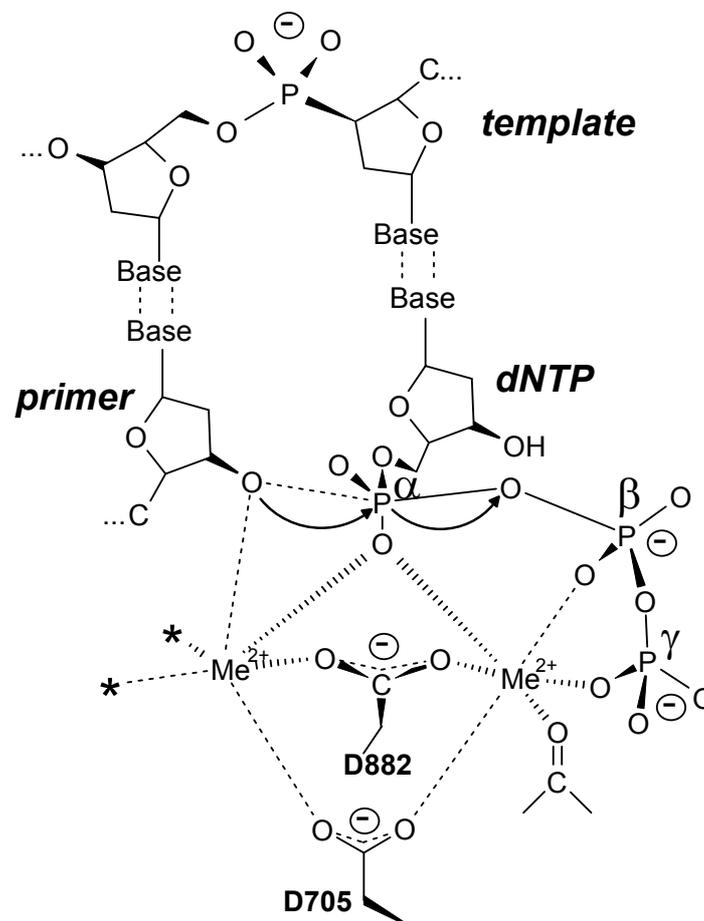


**Abbildung 2: Domänenstruktur von DNA-Polymerasen**

Die *finger*-, *palm*- und *thumb*-Domänen von *E. coli* DNA-Polymerase I (PDB-Eintrag 1DPI, Ollis et al., 1985a,b) eingefärbt in grün, blau und rot (links), sowie zum Vergleich die Darstellung einer rechten Hand (rechts).

Die Funktion der Handfläche liegt in der Katalyse der NMP-Addition, während die Finger-Domäne wichtige Interaktionen mit dem einzubauenden Desoxynukleosidtriphosphat und der entsprechenden *template*-Base eingeht. Der Daumen könnte in die Positionierung der DNA-Doppelhelix sowie in Prozessivität und Translokation involviert sein (Steitz, 1999). Die Struktur der *palm*-Domäne ist innerhalb der verschiedenen Polymerase-Familien homolog, die *finger*- und *thumb*-Domänen zeigen dagegen deutliche strukturelle Variabilität.

Eine allen DNA-Polymerasen gemeinsame Eigenschaft ist das Vorhandensein einer katalytischen Triade aus drei negativ geladenen Aminosäuren. Zwei invariante Aspartat-Reste komplexieren zwei Metall-Ionen (natürlicherweise  $Mg^{2+}$ ), wobei das erste Metall-Ion das 3'-OH-Endes des *primers* für den nukleophilen Angriff aktiviert. Während dieses nukleophilen Angriffs wird am  $\alpha$ -Phosphat des zu inkorporierenden Desoxynucleosidtriphosphats ein pentakoordinierter Übergangszustand erzeugt, welcher durch beide Metall-Ionen stabilisiert wird. Zusätzlich bindet das zweite Metall die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphate des einzubauenden dNTPs und ermöglicht dadurch vermutlich die Abgabe von Pyrophosphat. Die funktionelle Rolle der dritten sauren Aminosäure ist unklar, bei DNA-Polymerase beta ist er direkt an der Bindung eines Metall-Ions beteiligt, in anderen DNA-Polymerasen dient er möglicherweise dazu, die 3'-OH-Gruppe zu aktivieren.



**Abbildung 3: Der molekulare Mechanismus der Basenelongation**

Schematische Darstellung des Elongationsmechanismus („two metal ion mechanism“) von DNA-Polymerasen nach Steitz (Steitz, 1999) am Beispiel der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Die beiden Metall-Ionen sind mit  $Me^{2+}$  beschriftet, die beiden Aspartat-Reste von *E. coli* Pol I sind nummeriert

## 3.2 PCNA als zentrale Schaltstelle der Replikation

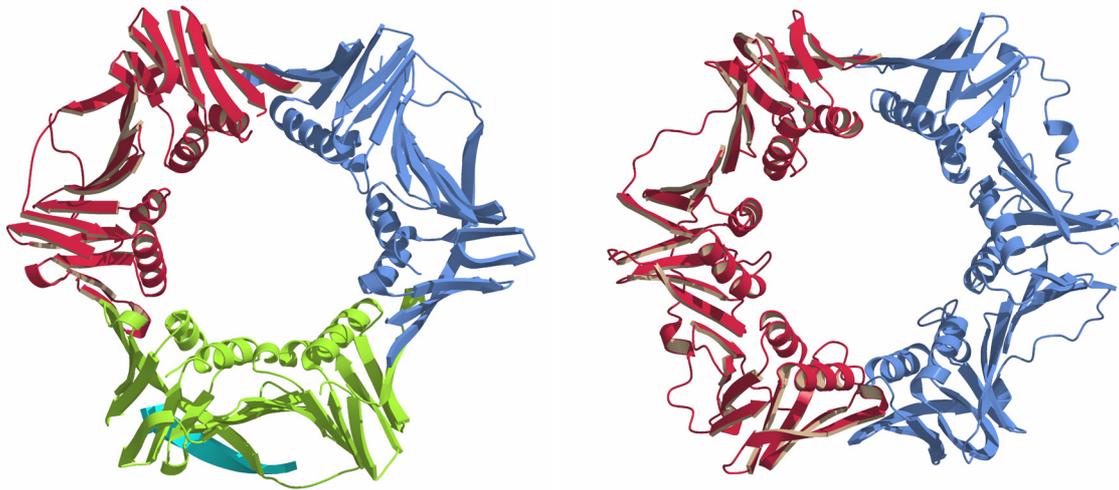
Eines der am besten untersuchten Proteine innerhalb der eukaryontischen Replikationsmaschinerie ist vermutlich PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*). Dies erscheint umso verwunderlicher, als das Protein selbst keine enzymatische Aktivität besitzt. Seine Aufgabe während der DNA-Synthese besteht in der Erhöhung der Prozessivität von an PCNA bindenden DNA-Polymerasen, insbesondere von DNA-Polymerase  $\delta$  (Tan et al., 1986; Bravo et al., 1987; Prelich et al., 1987a,b; Bauer and Burgers 1988). Bindung von PCNA an DNA-Polymerase  $\epsilon$  und damit einhergehende Aktivitätssteigerung dieses Enzyms wurde zwar beobachtet, allerdings nur unter speziellen Bedingungen (Hamatake et al., 1990; Lee et al., 1991; Chui and Lin, 1995). Um diese Funktion zu erfüllen, bildet PCNA (Molekularmasse etwa 36kDa), das selbst keine DNA-Bindungsaktivität zeigt, mit Hilfe von RFC (*replication factor C*) einen trimeren Ring um DNA, ähnlich der allerdings nur dimeren beta-Untereinheit der *E. coli* DNA-Polymerase III (siehe 1.1.3.1). Über diesen Ring wird die DNA-Polymerase an der DNA festgeklammert, weshalb PCNA alternativ auch als *sliding clamp* bezeichnet wird. Die Stellung von PCNA bei der eukaryontischen Replikation wird klar, wenn man die Liste seiner Bindungspartner betrachtet: die FEN1/RAD27/MF1 Nuklease (Li et al., 1995; Chen et al., 1996; entfernt RNA-*primer*); DNA-Ligase 1 (Levin et al., 1997); den p53-induzierbaren CDK-Inhibitor p21/WAF/CIP1 (Flores-Rozas et al., 1994; Waga et al., 1994); das p53-induzierbare Protein GADD45 (Smith et al., 1994; Hall et al., 1995); die DNA-Reparaturproteine XPG (Gary et al., 1997), MLH1 und MLH2 (Umar et al., 1996); DNA-(Cytosin-5)-methyltransferase (Chuang et al., 1997) und Cyclin D (Xiong et al., 1992; Matsuoka et al., 1994).

Diese Vielzahl an möglichen Interaktionen mit verschiedensten Proteinen des DNA-Metabolismus impliziert eine zentrale Position des eukaryontischen PCNA in der Koordination von DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Zellzyklus-Kontrolle.

### 3.2.1 Strukturelle Charakterisierung von DNA-Polymerase *sliding clamps* aus verschiedenen Lebensreichen

*Sliding clamps* bilden ringförmige Oligomere mit einem Innendurchmesser von ca. 30-35Å, weit genug um die DNA-Doppelhelix ohne sterische Behinderung zu umschließen und damit auf der DNA entlangzugleiten. Zu Beginn dieser Arbeit waren die *sliding clamps* von *E. coli* sowie von *S. cerevisiae* und *H. sapiens* (im Komplex mit einem Peptid von p21) strukturell aufgeklärt (Kong et al., 1992; Krishna et al., 1994; Gulbis et al., 1996). Ein PCNA-Monomer

besteht aus zwei strukturell ähnlichen Domänen, die über einen flexiblen *loop* miteinander verbunden sind. Trotz nur geringer Sequenzhomologie auch innerhalb der Eukaryonten und unterschiedlicher oligomerer Zustände zwischen Bakterien und Eukaryonten weisen die *sliding clamps* eine deutlich erkennbare strukturelle Ähnlichkeit auf (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Strukturen von *sliding clamps***

Ribbon-Diagramme der *sliding clamps* von *Homo sapiens* (links, im Komplex mit einem Peptid von p21, PDB-Eintrag: 1AXC) und *E. coli* (rechts, PDB-Eintrag: 2POL) in strukturell homologer Orientierung. Die drei Monomere von PCNA in rot, blau und grün, die beiden Monomere der beta-Untereinheit in rot und blau.

Die Interaktion von PCNA mit den unter 1.2 genannten Proteinen scheint in allen Fällen auf ähnliche Weise zu erfolgen, nämlich über eine allen PCNA-Interaktionspartnern gemeinsame konservierte Sequenz hydrophober Aminosäuren (PCNA-Bindemotiv; Warbrick, 1998) mit einer ebenfalls hydrophoben Region an der Oberfläche von PCNA. Obwohl durch den trimeren Aufbau gleichzeitig drei potentielle Bindungsstellen zugänglich wären, gibt es bislang keine Hinweise auf eine simultane Bindung mehrerer Proteine (Hingorani and O'Donnell, 2000).

### 3.3 Der DNA-Polymerase $\alpha$ -Primase-Komplex in Eukaryonten

Der sogenannte DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase-Komplex wurde als einer der ersten - für die chromosomale Replikation essentieller - eukaryontischen Replikationskomplexe genauer

charakterisiert (Miller et al., 1985; Murakami et al., 1986; Wong et al., 1988; Burgers et al., 1990). Er setzt sich aus vier verschiedenen Einzelproteinen zusammen, von denen die mit ca. 165-180 kDa größte Untereinheit (p180-Untereinheit) die DNA-Polymerase-Aktivität trägt (Wang, 1991). Die zweitgrößte Untereinheit des DNA-Polymerase  $\alpha$ -Primase-Komplexes (die sogenannte B-Untereinheit) besitzt eine Molekularmasse von etwa 68-86 kDa. Ihre genaue Funktion im Komplex ist bisher unbekannt, allerdings deuten einige experimentelle Befunde (Collins et al., 1993; Foiani et al., 1994) auf eine phosphorylierungsabhängige Funktion in der Initiation der Replikation hin. Die beiden kleinsten Untereinheiten des Komplexes mit jeweils etwa 54-60 bzw. 46-50 kDa (Lehmann and Kaguni, 1989; Wang, 1991) können als Heterodimer vom restlichen Komplex abgetrennt werden und tragen die Primase-Aktivität (Tseng and Ahlem, 1983; Kaguni et al., 1983; Plevani et al., 1985; Holmes et al., 1986; Nasheuer and Grosse, 1988; Brooks and Dumas, 1989). Die Frage, ob *in vivo* zur *primer*-Synthese nur eine der beiden Untereinheiten (die kleinere, sogenannte p48-Untereinheit) oder der Komplex aus beiden Untereinheiten (Copeland and Wang, 1993) notwendig ist, wird immer noch diskutiert. Allerdings deuten neuere Befunde darauf hin, daß die Funktion der größeren Untereinheit (p58-Untereinheit) vor allem darin besteht, die Primase-Aktivität der p48-Untereinheit zu stabilisieren und deren Bindung an die p180-Untereinheit zu vermitteln (Santocanale et al., 1993; Longhese et al., 1993; Stadlbauer et al., 1994; Schneider et al., 1998).

### 3.3.1 Klassifizierung von DNA-Primasen

DNA-Primasen können auf Grund von Aminosäuresequenz-Vergleichen im Wesentlichen in zwei verschiedene Klassen unterteilt werden. Die erste Klasse enthält die Primasen von Bakterien und Bakteriophagen, welche dem sogenannten DnaG-Typ angehören (benannt nach dem für die Primase kodierenden Gen aus *E. coli*). Diese Primasen sind mit replikativen Helikasen assoziiert und enthalten drei verschiedene Domänen: eine N-terminale Zinkfinger-Domäne, die für die Bindung von Matrizen-DNA verantwortlich ist, eine katalytische RNA-Polymerase-Domäne sowie eine C-terminale Domäne, welche entweder im Falle von Bakterien die Bindung an eine replikative Helikase vermittelt oder wie im Falle von Bakteriophagen selbst eine DNA-Helikase darstellt.

Die zweite große Primase-Klasse (prim-Typ) beinhaltet die eukaryontischen Primasen, deren funktionelle Interaktion mit DNA-Polymerase  $\alpha$  bereits unter 3.1.4 beschrieben wurde. Die katalytische Untereinheit enthält ebenfalls eine potentielle Zink-bindende Region, im Falle

der eukaryontischen Primasen wie oben ein klassisches Zinkfinger-Motiv. Innerhalb dieser Klasse ist die Funktion des Zink-bindenden Bereiches allerdings bis heute unbekannt.

Nicht alle bekannten Primasen gehören einer dieser beiden Klassen an, beispielsweise bestimmte Plasmid-kodierte Primasen wie das Produkt des *sog* Gens aus dem Plasmid ColIb-P9. Dieses Plasmid kodiert ein Protein mit einer Molekularmasse von 210 kDa, dessen N-terminaler Bereich eine funktionelle Primase darstellt (Lanka et al., 1979; Strack et al., 1992; Wilkins et al., 1981). Weitere Beispiele sind die ColE2 Rep Primase (Yasueda et al., 1989) oder die Primase des Herpes Simplex Virus (Holmes et al., 1988, Crute et al., 1988; Crute et al., 1989). Eine Übersicht über biochemische Eigenschaften verschiedener Primasen gibt Tabelle 2 (modifiziert nach Frick and Richardson, 2001).

**Tabelle 2: Biochemische Eigenschaften verschiedener Primasen**

<i>Quelle</i>	<i>Gen-Name</i>	<i>Anzahl Aminosäuren</i>	<i>primer-Länge (Basen)</i>	<i>primer-Sequenz</i>	<i>Erkennungs-Sequenz</i>
<i>E. coli</i>	DnaG	581	10-12	pppAG(N) <sub>8-10</sub>	5'-CTG-3'
T7	gene 4	566	4-5	pppAC(N) <sub>2-3</sub>	5'-GTC-3'
SP6	primase	661	4-10	pppGC(N) <sub>2-8</sub>	5'-GCA-3'
T4	gene 61	342	4-5	pppAC(N) <sub>2-3</sub>	5'-GTT-3'
P4	$\alpha$	777	2-5	pppAG(N) <sub>0-3</sub>	5'-CT-3'
ColE2	rep	308	2-3	ppAGA	5'-TCTG-3'
HSV	UL52	1058	10-12	pppGG(N) <sub>8-10</sub>	5'-ACCCTCCCGA-3'
<i>S. cerevisiae</i>	PRI1	409	8-10	ppp(A/G)(N) <sub>7-9</sub>	
	PRI2	528			
<i>D. melanogaster</i>	PRI1	438	8-15	ppp(A/G)(N) <sub>7-14</sub>	
	PRI2	533			
<i>M. musculus</i>	PRI1	417	9-11	ppp(A/G)(N) <sub>8-10</sub>	
	PRI2	505			
<i>H. sapiens</i>	PRI1	420	11-14	ppp(A/G)(N) <sub>8-13</sub>	
	PRI2	509			

### 3.4 DNA-Replikation in Archaea

Im Gegensatz zu den vergleichsweise gut untersuchten Prozessen während der DNA-Replikation von Bakterien und Eukaryonten, war die Erforschung der DNA-Replikation in Archaea in Bezug auf die daran beteiligten Proteine und ihre funktionelle Interaktion zu Beginn dieser Arbeit noch mehr oder weniger in ihren Anfängen. Andererseits ergab sich

durch die komplette Sequenzierung mehrerer archaealer Genome (Bult et al., 1996; Klenk et al., 1997; Smith et al., 1997; Kawarabayasi et al., 1998) die Möglichkeit, aufgrund von Aminosäuresequenz-Homologie zu bekannten Replikationsproteinen aus Eukarya potentielle Komponenten der archaealen Replikationsmaschinerie zu identifizieren (Edgell and Doolittle, 1997; Bernander, 1998).

Eine Liste der zu Beginn dieser Arbeit anhand der genomischen Sequenz identifizierten Bestandteile des archaealen DNA-Replikationsapparats aus *Methanococcus jannashii* (*Mja*) ist dem Übersichtsartikel von Edgell und Doolittle (Edgell and Doolittle, 1997) entnommen (Tabelle 3):

**Tabelle 3: Komponenten der archaealen Replikationsmaschinerie**

<i>Eukaryontisches Protein</i>	<i>Methanococcus jannashii-Gen(e)</i>
ORC	MJ0632
DNA_2	aDNA_2 (MJ0104)
RFC	ARF-C (MJ1422, MJ0884)
PCNA	APCNA (MJ0026, MJ0247)
FEN-1/RAD2	ARAD2/FEN-1 (MJ1444)
DNA-Polymerase $\alpha$ , $\delta$ , $\epsilon$	DNA polB (MJ0855)

Einige dieser Proteine, insbesondere – nicht zuletzt wegen ihrer kommerziellen Nutzung in der Molekularbiologie – die archaealen DNA-Polymerasen vom B-Typ (Ito and Braithwaite, 1991), waren teilweise sowohl biochemisch als auch strukturell charakterisiert (Hosfield et al., 1998; Hopfner et al., 1999), bei anderen wurde in der Folgezeit die vermutete Aktivität nachgewiesen, so daß sich mittlerweile ein immer genaueres Bild der an der Replikation des Archaeengenoms beteiligten Enzyme und Kofaktoren ergibt (Übersichtsartikel von MacNeill, 2001; Cann and Ishino, 1999; Kelman, 2000).

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß Replikationsproteine von Archaeen generell denen von Eukaryonten ähneln (Edgel and Doolittle, 1997; Bernander, 2000; Kelman, 2000), weshalb diese meist thermostabilen Proteine mittlerweile als ausgezeichnetes Studienobjekt der eukaryontischen Replikationsmaschinerie angesehen werden (MacNeill, 2001). Allerdings ergaben sich auch spezifische Unterschiede, wie beispielsweise das Vorkommen einer neuartigen heterodimeren DNA-Polymerase in sämtlichen bis dato sequenzierten Euryarchaeota (Uemori et al., 1997; Ishino et al., 1998; Cann et al., 1998).

Unter anderem wurde in Archaea auch ein hypothetisches Protein identifiziert, welches Sequenzhomologie zur katalytischen Untereinheit eukaryontischer DNA-Primasen zeigte (Aravind et al., 1998).

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Kristallstruktur des PCNA-Homologen aus *Pyrococcus furiosus* bestimmt werden. Aus Vergleichen mit den zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannten Kristallstrukturen der *sliding clamps* aus Bakterien und Eukaryonten sollten Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede dieser funktionell homologen Proteine ermittelt werden, um die vermutete Verwandtschaft der eukaryontischen und archaealen Replikationsmaschinerie experimentell zu bestätigen.

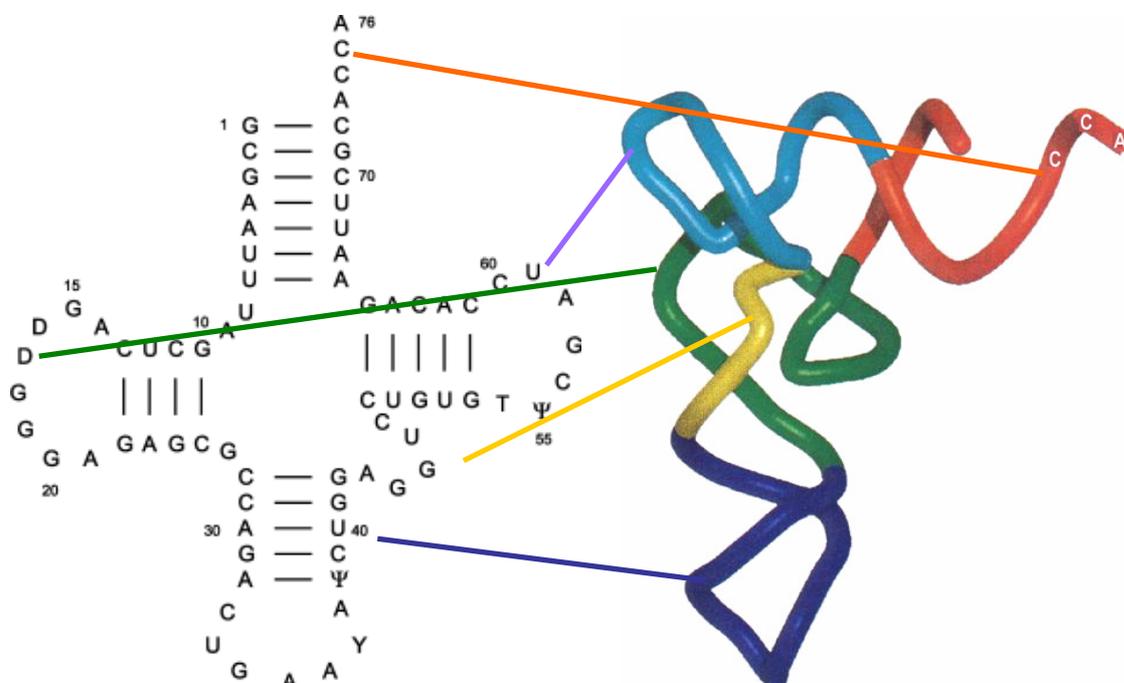
Im zweiten Teilprojekt sollte die katalytische Domäne der archaealen DNA-Primase im Genom von *Pyrococcus furiosus* identifiziert, das entsprechende Gen kloniert und das Genprodukt rekombinant exprimiert und strukturell charakterisiert werden. Die Struktur sollte ermöglichen, den auf der Grundlage von DNA-Polymerase-Strukturen für DNA-Primasen postulierten Reaktionsmechanismus zu verifizieren und die veränderte Aktivität von bekannten Mutanten in Proteinen des prim-Typs erstmals in struktureller Hinsicht zu interpretieren.

### 3.5 Prozessierung von tRNA

Transfer-RNA (tRNA) ist das Adapter-Molekül zwischen Transkription und Translation und besetzt als solches eine zentrale Position innerhalb der Genexpression (Crick, 1958). Die dreidimensionale Struktur von tRNA wurde im Jahre 1973 von Alexander Rich und seinen Mitarbeitern aufgeklärt (Kim et al., 1973), und seitdem konnte eine Vielzahl von tRNA-interagierenden Proteinen teilweise im Komplex mit tRNA-Substraten strukturell aufgeklärt werden.

In ihrer zweidimensionalen Darstellung erinnert tRNA an ein Kleeblatt (Abbildung 5, links) und kann in folgende Einzel-Bereiche unterteilt werden:

1. Anticodon-loop
2. D-loop
3. TΨC-loop
4. v-loop
5. Akzeptor-Stamm



**Abbildung 5: Struktur eines tRNA-Moleküls**

Zweidimensionale „Kleeblatt“-Darstellung und reale 3D-Struktur einer tRNA, die einzelnen Strukturelemente sind unterschiedlich eingefärbt: Anticodon-loop dunkelblau; D-loop grün; TΨC-loop hellblau; v-loop gelborange; Akzeptor-Stamm rot

Die beiden entscheidenden Bestandteile einer tRNA sind wohl zum einen die Anticodon-Region, welche eine fehlerfreie Proteinsynthese sicherstellen soll, zum anderen die Akzeptor-Stamm-Region. Maturierte tRNAs aller drei Lebensreiche besitzen an ihrem 3'-Ende die Sequenz 5'-CCA-3', wobei die Beladung der tRNA mit ihrer spezifischen Aminosäure am 3'-terminalen Adenosin-Rest erfolgt. Manche Organismen (z. B. *E. coli*) codieren die CCA-Sequenz in all ihren tRNAs, die meisten sind allerdings auf posttranskriptionale Modifikationen angewiesen.

In allen Organismen werden tRNA-Spezies als Vorläufer-Moleküle (*precursor*) synthetisiert, welche durch verschiedene Prozessierungs-Schritte in die aktive tRNA umgewandelt werden müssen. Diese Modifikationen beinhalten unter anderem *splicing*-Vorgänge sowie ein „Zurechtschneiden“ der RNA an beiden Enden (Deutscher, 1984; Söll and RajBhandary, 1995; Mörl and Marchfelder, 2001). Während nun die tRNA-Prozessierung am 5'-Ende über *Rnase P* einen uniformen Prozess innerhalb aller Organismengruppen darstellt, ist die Aufbereitung des 3'-Endes - welche im Folgenden genauer beschrieben wird - erstens weitaus komplexer und scheint zweitens von Art zu Art unterschiedlich zu funktionieren (Mörl and Marchfelder, 2001).

### 3.5.1 3'-Prozessierung bakterieller tRNAs

Die meisten Experimente zur Klärung der bakteriellen Mechanismen der 3'-tRNA-Prozessierung wurden in *E. coli* mit einer suppressor-tRNA (*tyrT*, SuUAG-tRNA) durchgeführt. Dies sollte vorangeschickt werden, weil diese Begrenzung auf ein Modell alternative Mechanismen nicht ausschließen kann (Deutscher, 1995). Die bakteriellen tRNA-Gene werden im Allgemeinen polycistronisch transkribiert, entweder als eine Reihe von tRNA-Genen oder im Komplex mit rRNA-Genen (Deutscher, 1995). Das primäre Transkript enthält die kompletten tRNAs inklusive des CCA-Endes. Der Prozessierungsweg beginnt mit einem endonukleolytischen Verdau in einer Region in 3'-Richtung des finalen tRNA-3'-Terminus'. In einer darauf folgenden *trimming*-Reaktion werden die überstehenden 3'-Basen sukzessive exonukleolytisch abgespalten. Ob die in diesen Prozess involvierten Enzyme zumindest teilweise spezifisch für die Modifikation von tRNAs sind, konnte noch nicht geklärt werden. Die bisher identifizierten Komponenten, *RNase III* und *RNase E* (Ray and Apirion, 1981a,b; Apirion and Miczak, 1993; Deutscher, 1995) sowie die *RNasen II, BN, D, PH, T* und *PNPase*, sind neben der tRNA-Prozessierung auch an der Prozessierung andere

RNA-Spezies' beteiligt (*RNase III* und *Rnase E*) oder zeigen keinerlei Spezifität für tRNA-typische Motive oder Regionen (*RNasen II, BN, D, PH, T* und *PNPase*; Deutscher, 1990). Die Deletion eines dieser Gene führt in *E. coli* nicht zum Verlust der tRNA-Prozessierungsaktivität, was auf eine gewisse Redundanz der beteiligten Komponenten hinweist (Reuven and Deutscher, 1993).

### 3.5.2 Prozessierung eukaryontischer und archaealer tRNAs

Zellkernkodierte eukaryontische tRNAs besitzen relativ kurze 5'- und 3'-flankierende Sequenzen (etwa 5-15 Basen), gelegentlich auch Intron-Sequenzen und kodieren nicht das 3'-CCA-Ende. In verschiedenen Organismen wurden unterschiedliche 3'-Prozessierungswege beobachtet: Manche verwenden Exonukleasen (Garber and Altman, 1979; Solari and Deutscher, 1983; Engelke et al., 1985), die Mehrheit allerdings Endonukleasen (Garber and Gage, 1979; Hagenbüchle et al., 1979; Castaño et al., 1985; Stange et al., 1991; Oommen et al., 1992; Franklin et al., 1995; Levinger et al., 1995; Han and Kang, 1997; Nashimoto, 1995). In *Saccharomyces cerevisiae* wurden sowohl Exo- als auch Endonukleasen gefunden (Papadimitriou and Gross, 1996), welche *in vitro* die Reifung einer tRNA bewerkstelligen konnten, allerdings scheinen *in vivo* nur Endonukleasen an der tRNA-Reifung beteiligt zu sein.

Die Reifung von archaealen tRNAs ist bisher noch weitgehend unverstanden, erste Befunde deuten auf einen Weg ähnlich dem der Eukarya hin (Schürer et al., 2001).

Einige der eukaryontischen 3'-Endonukleasen wurden teilweise gereinigt und charakterisiert (Schürer et al., 2001). Es zeigte sich, daß diese Endonukleasen (Molekularmasse etwa zwischen 40 und 450 kDa) in monomere und oligomere Spezies unterteilt werden können, ist auch die Reihenfolge der einzelnen Schritte der tRNA-Bearbeitung ist unterschiedlich. Sie wird bei Intron-enthaltenden tRNA-Vorläufern noch zusätzlich verkompliziert und scheint unter anderem von den Konzentrationen an tRNA-*precursor* abzuhängen (Schürer et al., 2001).

### 3.5.2.1 Prozessierung von Organellen-tRNAs

Die tRNA-Vorläufer eukaryontischer Organellen werden mit langen flankierenden Sequenzen transkribiert, kodieren im Allgemeinen nicht das CCA-Ende und enthalten kaum Introns (Maréchal-Drouard et al., 1993). Nach der Endosymbiontentheorie (Gray, 1989) sollte der tRNA-Reifungsprozess in Mitochondrien und Chloroplasten dem bakteriellen Weg ähneln, allerdings wurden in den Mitochondrien von Menschen, Hefen, Ratten und Pflanzen und auch in Chloroplasten ausschließlich Endonukleasen mit Schnittstellen nahe oder direkt am 3'-Ende gefunden (Schürer et al., 2001). Daraus wurde gefolgert, daß der Bearbeitungsweg von tRNAs in Organellen nicht dem bakteriellen, sondern dem eukaryontischen ähnelt. Dieses Erkenntnis wurde dahingehend interpretiert, daß Organellen im Laufe der Evolution nicht nur die Kontrolle über zahlreiche ihrer Gene an ihren „Wirt“ abgegeben, sondern auch den tRNA-Prozessierungsapparat ihres „Wirts“ übernommen haben.

Das mitochondriale Genom von Metazoa ist relativ klein (14-18 Kilobasen) und jeder der beiden DNA-Stränge wird von einem einzelnen Promotor aus komplett als *precursor*-RNA transkribiert. Eine zusätzliche Komplikation ergibt sich dadurch, daß manche tRNA-Gene teilweise überlappen. In diesen Fällen wird die RNA von einer Endonuklease derartig prozessiert, daß ein vollständiger 5'-Terminus und folglich ein inkompletter 3'-Terminus entstehen. Die dafür zuständigen Endonukleasen scheinen mit ihren entsprechenden tRNA-Genen koevolviert zu sein, da überlappende *precursor* aus anderen Metazoa nicht prozessiert werden (Reichert et al., 1998). In Chloroplasten besitzen die meisten tRNA-Gene einen Cytosin-Rest vor dem 3'-Terminus. Hier wird der *precursor* ein Nukleotid vor dem 3'-Ende geschnitten, wodurch ebenfalls eine tRNA mit inkomplettem 3'-Ende entsteht.

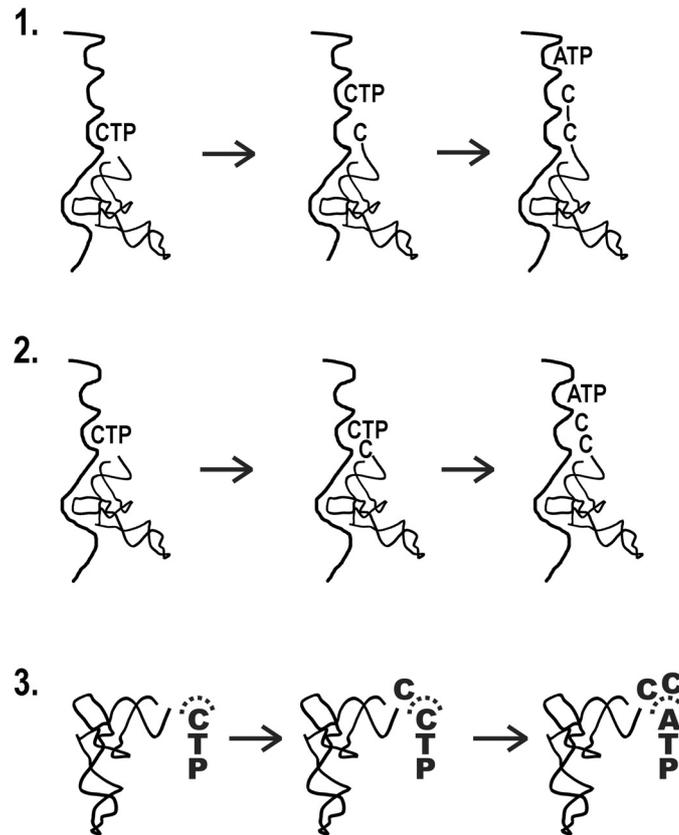
Durch diese nicht vollständigen tRNA-Spezies ergibt sich die Notwendigkeit einer Komplettierungsreaktion, also einer enzymatischen Synthese der fehlenden 3'-Nukleotide. Diese wird von der sogenannten ATP(CTP):tRNA-Nukleotidyltransferase (*CCA adding enzyme*, CCCase, NTase, *tRNA nucleotidyltransferase*) oder homologen Enzymen katalysiert.

### 3.5.2.2 CCA adding enzymes und CCA-Addition

*CCA adding enzymes* wurden in Vertretern aller drei Lebensreiche identifiziert und teilweise charakterisiert (Zhou and Deutscher, 1987; Yue et al., 1996). Alle diese Enzyme katalysieren die Addition des Basentriplets CCA aus einzelnen NTPs in einer hochspezifischen, *template*-unabhängigen Reaktion. In Organismen, welche in allen tRNAs ein korrektes 3'-CCA-Ende

kodieren (z. B. *E. coli*), besteht ihre Funktion in der Reparatur von durch RNasen partiell degradierten tRNAs, eine Inaktivierung des Enzyms ist folglich nicht letal sondern führt lediglich zu einer Verlangsamung des Wachstums (Zhu and Deutscher, 1987). In Arten ohne komplettes 3'-Ende ist eine funktionelle tRNA-Nukleotidyltransferase dagegen essentiell. Ihre Substrate sind tRNAs mit ganz oder teilweise fehlendem 3'-CCA-Ende (Yue et al., 1996; Shi et al., 1998a), eine Unterscheidung zwischen Aminosäure-Spezifität oder zellulärer Herkunft der tRNA wird nicht gemacht (Hegg and Thurlow, 1990). Abgesehen von der Addition von CCA sind *CCA adding enzymes* auch dazu in der Lage, tRNAs mit fehlenden Basen im Akzeptor-Stamm zu komplettieren (Reichert et al., 1998; Reichert and Mörl, 2000).

Auf Grund ihrer Aminosäuresequenz werden CCasen der Familie der Nukleotidyltransferasen zugeordnet (Holm and Sander, 1995; Martin and Keller, 1996). Innerhalb dieser Familie bilden die archaealen CCasen, die eukaryontischen poly(A)-Polymerasen, Kanamycin Transferase sowie Terminale Transferase die Klasse I, die eukaryontischen und bakteriellen CCasen sowie bakterielle poly(A)-Polymerasen wegen ihres konservierten N-terminalen Bereichs mit den Konsensus-Motiven DXD und RRD die Klasse II (Yue et al., 1996). Das DXD-Motiv wurde hierbei als katalytisches Zentrum identifiziert, Mutationen eines der beiden Aspartate führen zu einem nahezu kompletten Aktivitätsverlust. Die Funktion des RRD-Motivs ist bisher unklar, allerdings wurde vermutet, daß das in dem Motiv enthaltene Aspartat den dritten Rest einer den DNA-Polymerasen analogen katalytischen Triade darstellen könnte. Der Mechanismus der CCA-Addition ohne Nukleobasen-*template* war und ist Gegenstand vieler Spekulationen. Es wurden verschiedene Modelle entwickelt (siehe Abbildung 6), angefangen mit drei unabhängigen Bindungstaschen für jedes der einzubauenden NTPs (Masiakowski and Deutscher, 1980a,b). Ein zweites Modell beinhaltet jeweils eine Bindungstasche für CTP bzw. ATP (Tomari et al., 2000) und basiert auf Mutationsanalysen, welche eine räumliche Trennung von CMP- und AMP-Einbau implizieren (Zhu et al. 1986). Das dritte Modell (*collaborative templating*, Shi et al., 1998) beruht auf den beiden Befunden, daß CCasen nur ein aktives Zentrum für CMP- und AMP-Addition besitzen (Yue et al., 1998), und die während der CCA-Addition vom Enzym kontaktierten tRNA-Basen bei CMP- und AMP-Einbau identisch sind (Shi et al., 1998a). Daraus wurde gefolgert, daß die tRNA während der gesamten Reaktion am Enzym gebunden bleibt. Dieses Modell geht von einer einzigen Bindungstasche für beide NTP-Substrate aus, welche durch die jeweils 3'-liegende tRNA-Base ihre Spezifität für entweder CTP oder ATP erhält.



**Abbildung 6: Theorien zum Mechanismus der CCA-Addition**

Schematische Darstellung der drei wichtigsten Theorien der CCA-Addition. 1. drei unterschiedliche Bindungstaschen; 2. je eine CTP- und ATP-Bindungstasche; 3. *collaborative templating*. In den ersten beiden Modellen existieren getrennte Bindungstaschen für CTP bzw. ATP, im dritten Modell induziert das jeweilige tRNA-Substrat je nach 3'-Ende im Enzym eine Spezifität der Bindungstasche für CTP oder ATP

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Kristallstruktur der humanen mitochondrialen CCCase bestimmt werden, um damit Aussagen über den molekularen Mechanismus der *template-unabhängigen sequenzspezifischen Polymerisation* zu ermöglichen.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1.1 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

#### 4.1.1.1 DNA-Oligos

Sämtliche DNA-Oligomere wurden bei MWG (Ebersberg), am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) oder am Synthesezentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München (München) synthetisiert.

Tabelle 4: Liste der verwendeten DNA-Oligomere

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendungszweck
<b>PCNA</b>		
<i>Pfu-PCNA-f</i>	GGAGGTGGAAAGGCATGCCATTTG	Klonierung von <i>Pfu-PCNA</i>
<i>Pfu-PCNA-r</i>	GGAAAAGATCTGTCACTCTTCAACTCTTG	Klonierung von <i>Pfu-PCNA</i>
<b>Primase</b>		
Prim-seq-f	GATATGAGGGTAATAACCGAGG	Sequenzierung des <i>Pfu-Prim</i> -Gens
Prim-seq-r	TATTAGCAGGAAGATAGAGCCTAG	Sequenzierung des <i>Pfu-Prim</i> -Gens
<i>Pfu-Prim-f</i>	GGAGGGCCACATATGCTGATGAGG	Klonierung von <i>Pfu-Prim</i>
<i>Pfu-Prim-r</i>	ATGGATCCTTTATTTCATATTCCAAGG	Klonierung von <i>Pfu-Prim</i>
prim-act	GCACTGCGTGGTAGCGGTGCGTGGGGTCTGCTG	<i>Pfu-prim</i> Aktivitätsmessung
cocryst1	ATCCG	Kokristallisation
cocryst2	AATCCG	Kokristallisation
cocryst3	AAATCCG	Kokristallisation
cocryst4	GAAATCCG	Kokristallisation
cocryst5	AGAAATCCG	Kokristallisation

#### 4.1.1.2 Bakterien

Sämtliche molekularbiologischen Arbeiten sowie die heterologe Expression rekombinanter Proteine wurden in folgenden Derivaten des *E. coli* Stammes K12 durchgeführt:

Klonierung:

*E. coli* DH5 $\alpha$  (Stratagene GmbH, Heidelberg)  
 Genotyp: F', *deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup>), *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*),  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15F $\lambda$ <sup>-</sup>

*E. coli* JM109 (New England Biolabs)  
 Genotyp: F', *traD36* *proA*+*B*+ *lacIq* D(*lacZ*)

*E. coli* XL1Blue (Stratagene GmbH, Heidelberg)  
 Genotyp: *recA*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR-17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, [F' *proAB*, *lacI*<sup>q</sup> $\Delta$ M15, *Tn10*(tet<sup>r</sup>)]

Expression:

<i>E. coli</i> BL21(DE3) Genotyp:	(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA) F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> , ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) RIL Genotyp:	(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA) F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> , ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)
<i>E. coli</i> BL21(DE3) RP Genotyp:	(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA) F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS<sub>B</sub></i> , ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)
<i>E. coli</i> M15 (pREP4) Genotyp:	(Qiagen, Hilden) lac, ara, gal, mtl, recA <sup>+</sup> , uvr <sup>+</sup> , Str <sup>R</sup> , (pREP4: Kan <sup>R</sup> , lacI)
<i>E. coli</i> Rosetta™ DE3 Genotyp:	(Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA) F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> <i>hsdS<sub>B</sub></i> , ( <i>irB</i> - <i>mB</i> -), <i>gal dom lacY1</i> , (DE3), pRARE(CmR)
<i>E. coli</i> BL 834	(freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Nedijlko Budisa, MPI für Biochemie, Abt. Strukturforschung)

**4.1.1.3 Plasmide**

PET15b (Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA) Klonierungs- und Expressionsvektor für *E. coli*, wobei die Expression über einen IPTG-induzierbaren T7-Promotor gesteuert wird.

PET19b (Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA) Klonierungs- und Expressionsvektor für *E. coli*, wobei die Expression über einen IPTG-induzierbaren T7-Promotor gesteuert wird.

PET22b(+) (Novagen, INC. Madison Wisconsin, USA) Klonierungs- und Expressionsvektor für *E. coli*, wobei die Expression über einen IPTG-induzierbaren T7-Promotor gesteuert wird.

PQE70 (Qiagen, Hilden) Klonierungs- und Expressionsvektor für *E. coli*, wobei die Expression über einen IPTG-induzierbaren T5-Promotor gesteuert wird.

**4.1.1.4 Enzyme und Kits**

*Pwo* DNA-Polymerase (Roche Molecular Biology, Penzberg)

*Vent* DNA-Polymerase (New England Biolabs (NEB), Schwalbach)

*Taq* DNA-Polymerase (Roche Molecular Biology, Penzberg)

*HiFi* DNA-Polymerase (Roche Molecular Biology, Penzberg)

Restriktionsenzyme (New England Biolabs (NEB), Schwalbach)

T4 DNA-Ligase (New England Biolabs (NEB), Schwalbach oder Promega)

*Calf intestine alkaline phosphatase* (alkalische Phosphatase, CIP) (New England Biolabs (NEB), Schwalbach)

*PRISM Ready Reaction BigDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer, Überlingen)

*Qiagen Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden)

*QIAquick PCR purification Kit* (Qiagen, Hilden)

*QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden)

*DIG Nucleic Acid Detection Kit* (Roche Molecular Biology, Penzberg)

*Crystal Screen* (Hampton, Laguna Niguel)

*Crystal Screen II* (Hampton, Laguna Niguel)

*Crystal Screen Lite* (Hampton, Laguna Niguel)

*Crystal Screen Cryo* (Hampton, Laguna Niguel)

*MembFac* (Hampton, Laguna Niguel)

*Natrix* (Hampton, Laguna Niguel)

*Wizard I* (Emerald Biostructures, Bainbridge Island)

*Wizard II* (Emerald Biostructures, Bainbridge Island)

*Cryo I* (Emerald Biostructures, Bainbridge Island)

*Cryo II* (Emerald Biostructures, Bainbridge Island)

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Präparation genomischer DNA aus *Pyrococcus furiosus*

Genomische DNA von *Pyrococcus furiosus* wurde durch mehrmalige Phenolextraktion gereinigt. Hierzu wurden ca. 100mg Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Karl-Otto Stetter, Universität Regensburg) in 500µl Puffer P1 (*Qiagen Spin Miniprep Kit*) resuspendiert und durch 10 Zyklen von Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 50°C aufgeschlossen. Durch jeweils dreimalige Extraktion mit a) Tris gesättigtem Phenol und b) Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (24:24:1) wurden Proteine denaturiert. Durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 2min) wurde die DNA-haltige wässrige Phase von der

Phenol-Phase und der Interphase getrennt. Die DNA-haltige Lösung wurde nun dreimal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, um Phenolrückstände aus dem Ansatz zu entfernen. Gereinigte DNA wurde durch Zugabe von 1Vol. Isopropanol und 1/10Vol. 4M LiCl gefällt, bei 15300g pelletiert (30min, 4°C) und zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in H<sub>2</sub>O gelöst. Die Qualität der DNA wurde gelelektrophoretisch überprüft und die Ausbeute photometrisch bestimmt.

### 4.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur exakten Bestimmung der Konzentration gelöster DNA wurde die DNA-Lösung UV-spektrometrisch bei 260nm vermessen. Eine  $A_{260nm}=1,0$  entspricht dabei einer Konzentration von  $50\mu\text{gml}^{-1}$  doppelsträngiger oder  $33\mu\text{gml}^{-1}$  einzelsträngiger DNA.

### 4.2.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrem Molekulargewicht erfolgte in Agarosegelen. Zur Herstellung eines Agarosegels wurden, je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente, 0,8-1,5% Agarose (w/v) (Biomol, Hamburg) in 0,5x TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde die Lösung in eine Gelapparatur gegossen und nach ihrem Erstarren mit 0,5xTAE-Puffer überschichtet. Die zu trennenden DNA-Proben wurden mit 6x Probenpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 5-10V/cm Gellänge für 45 bis 120min. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht ( $\lambda =254\text{nm}$ ) detektiert und ihre Länge anhand von DNA-Längenstandards ermittelt.

0,5xTAE-Puffer:            20mM Tris  
                                  10mM Essigsäure  
                                  0,5mM EDTA gelöst bei pH=8.0

6fach Probenpuffer:    30% (v/v) Glycerin  
                                  0,25% (w/v) Bromphenolblau

### 4.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) wurden in einem *Hot-Top Thermocycler* (PE9600, Perkin Elmer) bei folgenden Bedingungen durchgeführt.

50µl PCR Ansatz:           5µl 10x PCR-Puffer  
                                  1µl dNTP-Mix [10mM je dNTP]  
                                  1µl *forward-primer* [10µM]  
                                  1µl *reverse-primer* [10µM]  
                                  50-200ng *template*  
                                  1-2,5 *units* DNA-Polymerase  
                                  d 50µl ddH<sub>2</sub>O

#### 4.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Zur Klonierung wurden 0,1–2,0µg DNA (PCR-Produkt bzw. Vektor-DNA) mit 5–20*units* der geeigneten Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers geschnitten und die verdaute DNA über ein Agarosegel und den *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt.

Plasmid-DNA zur Transformanden-Analyse wurde mit Hilfe des *Qiagen Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden) gereinigt und wie oben verdaut und analysiert.

#### 4.2.6 Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Geschnittene Vektor-DNA wurde mit alkalischer Phosphatase (CIP, New England Biolabs, Schwalbach) behandelt, um eine Religation partiell geschnittener Plasmide zu verhindern. Dem Restriktionsansatz wurden 0,2*units* alkalische Phosphatase pro µg DNA zugesetzt und die Dephosphorylierungsreaktion für 30min bei 37°C durchgeführt.

#### 4.2.7 Ligation von DNA Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung zweier DNA-Fragmente nach Spaltung durch Restriktionsenzyme erfordert die Bildung von Phosphodiesterbindungen durch DNA-Ligase. Dazu muß mindestens ein DNA-Fragment einen Phosphatrest am 5'-Ende tragen. In einem Ligationsansatz wurden geschnittener Vektor und die Insert-DNA in einem Verhältnis 1:1 oder 1:3 in Bezug auf pMol DNA-Enden eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 4°C.

Ligationsansatz:           150-300ng Vektor DNA  
                                  x g *insert* DNA  
                                  2µl 10x Ligationspuffer (NEB)  
                                  1µl T4 DNA-Ligase (NEB)  
                                  ad 20µl ddH<sub>2</sub>O

#### 4.2.8 Automatisierte Sequenzierung von DNA (*cycle sequencing*)

0,5µg Plasmid-DNA oder gereinigtes PCR-Produkt wurden mit 3pMol Sequenzier-*primer* und 4µl *ABI PRISM ready reaction BigDyeDeoxy terminator cycle sequencing kit* versetzt und mit Wasser auf 10µl Reaktionsvolumen gebracht. Der Ansatz wurde mit 20µl Mineralöl überschichtet und einer Thermocycling Reaktion unterzogen.

Cycling-Programm: [4min 96°C]  
[30sec 96°C, 15sec 50°C, 4min 60°C]<sub>25 Zyklen</sub>  
[4°C Lagerung]

Anschließend wurden die Proben auf 20µl Volumen mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt und einer DNA-Sequenzanalyse zugeführt. Die Elektrophorese, die Detektion der Fluoreszenzsignale und deren Auswertung wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Marius Boicu am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried mit einem DNA-Sequenator (Modell 373, Applied Biosystems, USA) durchgeführt.

### 4.2.9 Klonierung von *Pfu-PCNA*

Das PCNA-Homologe aus *Pyrococcus furiosus* wurde mit *HiFi* DNA-Polymerase und den beiden primern *Pfu-PCNA-f* und *Pfu-PCNA-r* aus genomischer DNA mit folgendem PCR-Protokoll amplifiziert:

initiale Denaturierung: 10min 94°C  
Amplifikation: [20sec 94°C, 20sec 50°C, 30sec 72°C]<sub>30 Zyklen</sub>

Das entstandene PCR-Produkt einer Länge von ca. 770 Basenpaaren (bp) wurde mit dem *QIAquick PCR purification Kit* gereinigt, mit jeweils 5units BglII und SphI verdaut, anschließend in den Vektor pQE70 kloniert und in kompetente JM109-Zellen transformiert. Ein Klon mit einem *insert* der erwarteten Länge wurde sequenziert und nach der Bestätigung der Sequenz für weitere Arbeiten verwendet (*Pfu-PCNA-1*).

### 4.2.10 Klonierung von *Pfu-Prim*

Die katalytische Untereinheit der DNA-Primase aus *Pyrococcus furiosus* wurde mit *HiFi* DNA-Polymerase und den beiden primern *Pfu-Prim-f* und *Pfu-Prim-r* aus genomischer DNA mit folgendem PCR-Protokoll amplifiziert:

initiale Denaturierung: 10min 95°C  
Amplifikation: [30sec 95°C, 30sec 50°C, 1min 72°C]<sub>30 Zyklen</sub>  
finale Elongation : 7min 72°C

Das entstandene PCR-Produkt mit einer Länge von ca. 1200bp wurde mit jeweils 10units NdeI und BamHI verdaut und in pET22b(+) kloniert. Ein Klon mit einem *insert* der erwarteten Länge wurde sequenziert und nach der Bestätigung der Sequenz für weitere Arbeiten verwendet (*Pfu-prim-1*).

### 4.2.11 Klonierung von Deletionsmutanten von *hmtCCase*

Zur Klonierung der Deletionsmutanten von *hmtCCase* wurden die entsprechenden Bereiche des Gens mit Vent DNA-Polymerase (New England Biolabs) ausgehend von dem Plasmid

hCCA\_pET30EKLic (Reichert et al., 2001) amplifiziert, verdaut und in den Vektor pET19b kloniert.

#### 4.2.12 Qualitativer Primase-Assay

Zum Nachweis der Aktivität von gereinigtem *Pfu*-p41 wurde ein qualitativer Aktivitätstest durchgeführt. Dazu wurden 4µg rekombinantes Protein für 20min bei 45°C in einem Gesamtvolumen von 50µl mit 100pMol einzelsträngiger DNA (33-mer, prim-act) sowie den vier NTPs (je 5nMol) inkubiert (Puffer: 10mM Tris/HCl, pH=8,3, 50mM KCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>). Anschließend wurden 5µl einer Mischung von 0,25units<sup>-1</sup> *Taq* DNA-Polymerase und 50µM dATP, dGTP, dCTP und 65:35 dTTP/Digoxigenin-dUTP (Roche Molecular Biology) in dem gleichen Puffer zugegeben, und das Reaktionsgemisch für weitere je 15min bei 45°C sowie bei 60°C inkubiert. 5µl bzw. 10µl des Reaktionsansatzes wurden auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche Molecular Biology) aufgetragen, durch Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda=254\text{nm}$ , 5min) auf der Membran fixiert, und die synthetisierte Digoxigenin-markierte DNA anschließend mit Hilfe von *anti-digoxigenin-AP* (*Fab fragments*) und dem DIG *Nucleic Acid Detection Kit* (beides Roche Molecular Biology) nach Herstellerangaben detektiert.

### 4.3 Mikrobiologische Methoden

Bei allen Arbeiten mit Bakterien wurde sorgfältig auf die Sterilität der verwendeten Arbeitsgeräte, Medien und Lösungen geachtet. Medien und Lösungen wurden autoklaviert oder steril filtriert.

#### 4.3.1 *E. coli* Flüssigkulturen

Autoklaviertes LB (Luria-Bertani)-Flüssigmedium wurde mit den benötigten Antibiotika versetzt und *E. coli* Flüssigkulturen – soweit nicht anders beschrieben – bei 37°C und 250 U/min im Schüttler kultiviert. Von den Antibiotika wurden 1000fach konzentrierte Stammlösungen hergestellt, steril filtriert und bei -20°C gelagert.

<u>Antibiotika-Lösungen:</u>	Ampicillin (Amp)	1000x (100mgml <sup>-1</sup> in ddH <sub>2</sub> O)
	Kanamycin (Kan)	1000x (50mgml <sup>-1</sup> in ddH <sub>2</sub> O)
	Chloramphenicol (Cam)	1000x (34mgml <sup>-1</sup> in Ethanol)

LB-Medium:                    10g NaCl  
                                      10g Bacto-Trypton  
                                      5g Hefe-Extrakt  
                                      mit NaOH auf pH 7.2 eingestellt  
                                      ddH<sub>2</sub>O ad 1 Liter

### 4.3.2 *E. coli* Plattenkulturen

LB-Medium wurde mit 15g l<sup>-1</sup> Agar versetzt und autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Mediums auf ca. 60°C wurden benötigte Antibiotika in der gewünschten Konzentration zugegeben und das Medium steril in Petrischalen gegossen. Die Platten wurden nach dem Erstarren des Mediums bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

### 4.3.3 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Transformationskompetente Zellen wurden modifiziert nach einer Vorschrift von D. Alexander (ARCO Plant Cell Research Institute, Stanford, USA) hergestellt. 100ml LB-Medium wurden mit 1ml einer Über-Nacht-Kultur der entsprechenden Zellen angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 geschüttelt. Nach Zugabe von 2ml 1M MgCl<sub>2</sub> wurde für weitere 10min bei 37°C und anschließend 1h in Eiswasser inkubiert. Nach Zentrifugation (5min, 2000g, 4°C) wurde das Zellpellet in 40ml Puffer A (100mM CaCl<sub>2</sub>, 70mM MnCl<sub>2</sub>, 40mM Na-Acetat, pH=5,5) resuspendiert und 1h bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben) wurde das Zellpellet in 4ml Puffer B (100mM CaCl<sub>2</sub>, 70mM MnCl<sub>2</sub>, 40mM Na-Acetat, pH=5,5, 15% Glycerin) aufgenommen, in 100µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Zellen für die Transformation mittels Elektroporation wurden bei 37°C in 1l SOC-Medium kultiviert und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,7 pelletiert. Das Bakterienpellet wurde zweimal mit 15%iger Glycerinlösung gewaschen und abschließend in 4ml 15%iger Glycerinlösung resuspendiert, in 50µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

SOC-Medium:                    0,5g NaCl  
                                      20g Bacto-Trypton  
                                      5g Hefe-Extrakt  
                                      ddH<sub>2</sub>O ad 1 Liter

### 4.3.4 Transformation in kompetente *E. coli* Zellen

100µl transformationskompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 10µl eines Ligationsansatzes oder 0,01–1µg Plasmid-DNA versetzt und 30min auf Eis inkubiert.

Anschließend erfolgte ein Hitzeschritt für 1min bei 42°C, wonach der komplette Transformationsansatz auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert oder direkt zum Animpfen von Expressionskulturen verwendet wurde.

### 4.3.5 Transformation über Elektroporation

50µl elektrokompente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in einer Elektroporationsküvette (1mm) mit 2µl Ligationsansatz oder Plasmid-DNA versetzt. Die Elektroporation erfolgte bei einer Spannung von 1650V mit einem *BioPulse* (BioRad, München). Die Zellen wurden in 500µl LB-Medium aufgenommen, 30min bei 37°C inkubiert und anschließend 100µl der Zellsuspension auf LB-Agar-Platten (4.3.2) ausgestrichen.

### 4.3.6 Expression von *Pyrococcus furiosus* PCNA

Das PCNA-Homologe aus *Pyrococcus furiosus* wurde in *E. coli* M15 (pREP4) exprimiert. Dazu wurden kompetente Zellen mit *Pfu*-PCNA-1 (diese Arbeit) transformiert und auf Amp/Kan-Platten ausgestrichen. Mit einer einzelnen Kolonie wurde eine 100ml-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Zellen der gewachsenen Vorkultur wurden abzentrifugiert und in 10ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurden mit jeweils 1ml der resuspendierten Zellen 6 Hauptkulturen eines Volumens von 800ml angeimpft und die Zellen bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 geschüttelt. Die Expression wurde durch Zugabe von 1mM IPTG (Endkonzentration) induziert und bei 37°C für 6h durchgeführt. Nach Beendigung der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert, in Aufschlußpuffer (100mM Tris/HCl, pH=8,0; 10mM NaCl; 10ml je 800ml-Kultur) resuspendiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 4.3.7 Expression der katalytischen Untereinheit von *Pyrococcus furiosus* DNA-Primase

Die katalytische Untereinheit der DNA-Primase aus *Pyrococcus furiosus* wurde in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Kompetente Zellen wurden mit dem Plasmid *Pfu*-prim-1 (diese Arbeit) transformiert und auf Amp/Cam-Platten ausgestrichen. Mit einer einzelnen Kolonie wurde eine 100ml-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Hauptkulturen (Volumen 1l) wurden mit der Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 geschüttelt. Die Expression wurde durch Zugabe von 1mM IPTG (Endkonzentration) induziert und bei 37°C für 4h durchgeführt. Nach Beendigung der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert, in Aufschlußpuffer (50mM Kalium-Phosphat,

pH=6,5; 100mM NaCl; 10 ml je 1l-Kultur) resuspendiert und bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 4.3.8 Expression von humaner mitochondrialer tRNA-Nukleotidyltransferase

Zur Expression von humaner mitochondrialer tRNA-Nukleotidyltransferase wurden die *E. coli*-Stämme BL21 (DE3) RP und Rosetta (DE3) verwendet. Kompetente Zellen wurden mit dem Plasmid hCCA\_pET30EKLic (Reichert et al., 2001) transformiert und auf Kan/Cam-Platten ausgestrichen. Mit einer einzelnen Kolonie wurde eine 100ml-Vorkultur angeimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Hauptkulturen eines Volumens von 800ml wurden bei  $25^{\circ}\text{C}$  bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,9 geschüttelt. Die Expression wurde durch Zugabe von 0,2mM IPTG (Endkonzentration) induziert und bei  $25^{\circ}\text{C}$  für 4h durchgeführt. Nach Beendigung der Expression wurden die Zellen abzentrifugiert, in Aufschlußpuffer (50mM Kalium-Phosphat, 300mM NaCl, pH=8,2; 10 ml je 800ml-Kultur) resuspendiert und bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Expression von Deletionsmutanten erfolgte unter gleichen Bedingungen.

### 4.3.9 Herstellung von *E. coli* Rohextrakten

Resuspendierte Zellen mit rekombinatem *Pfu-PCNA* und *Pfu-Prim* wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und in einem Rosettengefäß unter Eiskühlung durch Ultraschall (*MacroTip*, 15-20 min auf Stufe 10 bei 80 % Puls-Zyklus) aufgeschlossen (Branson, Sonifier 250). Die Trennung von löslichen und unlöslichen Bestandteilen erfolgte durch Zentrifugation (45 min, JA20-Rotor, 20 000 U/min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Im Falle von humaner mitochondrialer tRNA-Nukleotidyltransferase wurden die aufgetauten Zellen vor der Ultraschallbehandlung 15 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  mit Lysozym (10 $\mu\text{g}$  je 10 ml Volumen) inkubiert und der Zellaufschluß für 15min auf Stufe 10 bei 20 % Puls-Zyklus durchgeführt.

## 4.4 Proteinchemische Methoden

### 4.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinen in Lösung wurde mit der Methode nach Bradford photometrisch bei 595nm bestimmt. Dazu wurde eine Eichegrade mit BSA in den Konzentrationen 0,1 bis 15 $\mu\text{gml}^{-1}$  im Absorptionsbereich von 0 bis 1,2 erstellt. 200 $\mu\text{l}$  Bradfordreagenz (BioRad, München) wurden mit 1 bis 50 $\mu\text{l}$  Probenlösung versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf 1ml Volumen aufgefüllt. Nach 5min Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595nm photometrisch bestimmt.

#### 4.4.2 Proteinfällung mit TCA

Niedrig konzentrierte Proteinlösungen wurden mit 1/9 Volumen TCA (Trichloressigsäure) versetzt und 15min auf Eis inkubiert. Gefällte Proteine wurden durch 15min Zentrifugation in einer Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand abpipettiert und verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen (Zentrifugation wie oben), mit 2x SDS-Auftragspuffer versetzt und die Probe durch SDS-PAGE analysiert.

#### 4.4.3 Umpufferung

Pufferwechsel von Proteinlösungen mit kleinen Volumina (bis 2,5ml) wurden mit Hilfe von NAP-Säulen (Pharmacia) nach dem Prinzip der Gelpermeationschromatographie durchgeführt.

#### 4.4.4 Konzentrierung von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen nach dem Prinzip der Ultrafiltration wurden Zentrifugationskonzentratoren des Typs Centriprep und Centricon (Millipore, Eschborn) eingesetzt.

#### 4.4.5 Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden aufgrund ihres Molekulargewichtes im elektrischen Feld in einer diskontinuierlichen, denaturierenden Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt.

Die SDS-PAGE wurde mit einem 7-10%igen Sammelgel und einem 12-16%igen Trenngel durchgeführt.

Sammelgel:	Xml Acrylamid-Stammlösung (Protogel) 7,5ml 1M Tris/HCl pH=6.8 300µl (w/v) 20%SDS ad 50ml H <sub>2</sub> O
Trenngel:	Yml Acrylamid-Stammlösung (Protogel) 17ml 2M Tris/HCl pH 8.8 450µl 20% (w/v) SDS ad 90ml H <sub>2</sub> O

Es wurden jeweils acht Gele (8,5x8cm<sup>2</sup>) in einer Gelgießkammer (Eigenbau, MPI Martinsried) gegossen. Die Trenngellösung wurde nach Zugabe von 90µl TEMED und 450µl (0,1gml<sup>-1</sup>) APS in die vorbereitete Apparatur gegossen und mit 300µl Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde die Alkoholschicht entfernt, das Sammelgel mit 32µl TEMED und 300µl (0,1gml<sup>-1</sup>) APS versetzt und in den Gießstand

eingefüllt. Teflon-Kämme mit zehn bis 18 Geltaschen wurden luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt und die ausgehärteten Gele bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Für die Gelelektrophorese wurden die Proteinproben mit 2fach Probenpuffer versetzt und 2min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 30mA im SDS-Laufpuffer.

2x Probenpuffer: 100mM Tris/HCl pH=6.8  
200mM DTT  
0,2% (w/v) Bromphenolblau  
20% (w/v) Glycerin

SDS-Laufpuffer: 25mM Tris/HCl pH=8.3  
200mM Glycin  
0,1% (w/v) SDS

### 4.4.6 Coomassie-Färbung

Polyacrylamid-Gele wurden nach erfolgter Elektrophorese in einer Coomassie-Lösung gefärbt. Dazu wurden die Gele in der Färbelösung kurz erhitzt, 15min bei RT geschüttelt, danach in Entfärbelösung solange gewaschen, bis der Hintergrund farblos erschien.

Coomassie-Färbelösung: 0,1% (w/v) Coomassie Brillant Blue R-250  
40% (v/v) Ethanol  
10% (v/v) Essigsäure  
Entfärbelösung: 40% (v/v) Ethanol  
10% (v/v) Essigsäure

### 4.4.7 Proteinpräparation

#### 4.4.7.1 Reinigung von *Pyrococcus furiosus* PCNA

Zellextrakte mit rekombinantem *Pfu-PCNA* wurden für 20min bei 85°C inkubiert. Hitze-denaturierte *E. coli*-Proteine wurden durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand nach Ultrafiltration auf eine mit Aufschlußpuffer (100mM Tris, pH=8,0; 10mM NaCl) äquilibrierte Q-Sepharose-Säule (Volumen 50ml; Flußrate 2mlmin<sup>-1</sup>) geladen. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Aufschlußpuffer entfernt und *Pfu-PCNA* anschließend mit einem Gradienten von 10-600mM NaCl eluiert (Volumen 600ml, Flußrate 5mlmin<sup>-1</sup>). Fraktionen mit *Pfu-PCNA* wurden mit festem NaCl ad 2M NaCl versetzt, über eine Ultrafiltrationseinheit mit einem *cutoff* von 10kDa aufkonzentriert und durch Gelpermeationschromatographie auf einer Sephacryl S-200-Säule (Pharmacia) gereinigt (Laufpuffer 10mM Tris/HCl, 2M NaCl, 0,02% (w/v) NaN<sub>3</sub>, pH=8,0; Flußrate 1mlmin<sup>-1</sup>).

#### **4.4.7.2 Reinigung der katalytischen Untereinheit der DNA-Primase aus *Pyrococcus furiosus***

Rohextrakte, welche die katalytische Primase-Untereinheit enthielten, wurden für 20min auf 85°C erhitzt. Denaturierte Proteine wurden durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand nach Ultrafiltration auf eine mit Aufschlußpuffer (50mM Kaliumphosphat, pH=6,5; 100mM NaCl) äquilibrierte *HiTrap* Heparin-Säule (Pharmacia, Volumen 5ml, Flußrate 1mlmin<sup>-1</sup>) geladen. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Aufschlußpuffer entfernt und Primase mit einem Gradienten von 100-800mM NaCl eluiert (Volumen 100ml, Flußrate 2mlmin<sup>-1</sup>). Fraktionen mit Primase wurden konzentriert und durch Gelpermeationschromatographie auf einer Sephacryl S-200-Säule weiter gereinigt (Laufpuffer 10mM Tris/HCl, 350mM NaCl, 0,02 (w/v) NaN<sub>3</sub>, pH=8,0; Flußrate 1-2mlmin<sup>-1</sup>).

#### **4.4.7.3 Reinigung von humaner mitochondrialer tRNA-Nukleotidyltransferase**

Rohextrakte mit rekombinanter *hmtCCase* wurden sterilfiltriert und direkt auf eine mit Resuspendierungspuffer (50mM Kalium-Phosphat, 300mM NaCl, pH=8,2) äquilibrierte Nickel-NTA-Säule (Volumen 20ml) aufgetragen (Flußrate 1mlmin<sup>-1</sup>). Die Säule wurde bis zum Erreichen einer stabilen Grundlinie mit Resuspendierungspuffer gewaschen (Flußrate 3mlmin<sup>-1</sup>) und gebundenes Protein mit einem linearen Gradienten von 0-75mM Imidazol in Resuspendierungspuffer eluiert (Volumen 200ml, Flussrate 1mlmin<sup>-1</sup>). *hmtCCase* enthaltende Fraktionen wurden mit DTT (5mM Endkonzentration) versetzt, über eine 30kDa-Membran aufkonzentriert und anschließend durch Gelpermeationschromatographie auf einer Superdex 200-Säule (oder Superdex 75, Pharmacia) weiter gereinigt (Laufpuffer 20mM Tris/HCl, 400mM NaCl, pH=7,5; Flußrate 1mlmin<sup>-1</sup>).

### **4.5 Kristallographische Methoden**

#### **4.5.1 Kristallisation**

Die Kristallisationsansätze erfolgten bei 20°C nach der Dampfdiffusionsmethode im sitzenden Tropfen (*sitting drop*) in CrysChem Platten (Charles Supper Company), im hängenden Tropfen (*hanging drop*) in Limbro-Platten oder in Polystyroidosen von 3 cm Höhe und 7,5 cm Durchmesser auf 1,5 cm hohen Kunststoffbänkchen. Die CrysChem Platten wurden mit transparenter Klebefolie (CrystalClear, MancoInc., Avon, USA) verschlossen. Der Kristallisationsverlauf wurde über mehrere Monate verfolgt.

Für das *screening* einer großen Anzahl von Kristallisationsbedingungen wurde das Prinzip des *sparse matrix sampling* angewandt. Dabei wurden jeweils 1  $\mu\text{l}$  (10  $\text{mgml}^{-1}$ ) Proteinlösung mit 1  $\mu\text{l}$  des Kristallisationspuffers vermischt und gegen 250-500  $\mu\text{l}$  Reservoirlösung äquilibriert. Initiale Kristallisationsbedingungen wurden durch Variation verschiedener Parameter (Konzentration von Protein, Präzipitanz sowie etwaiger Additive; Tropfenvolumen und Mischungsverhältnis; Temperatur; *screening* verschiedener Additive) optimiert.

### 4.5.2 Datensammlung und Datenreduktion

Zur Aufnahme von Röntgendiffraktionsdaten bei 291K wurden Kristalle in silanisierten Quarzkapillaren (0,5mm  $\varnothing$ , Mark-Röhrchen für röntgenographische Aufnahmen, W. Müller, Berlin) montiert. Beide Seiten der Kapillare wurden anschließend mit etwas Reservoirlösung gefüllt und mit Dentalwachs (Richter&Hoffmann Harvard Dental GmbH) verschlossen. Die Kapillaren wurden auf einem Goniometerkopf fixiert und die Datensätze als Serie von Rotationsaufnahmen auf einer Drehanode bei (50kV, 100mA) gesammelt. Die Messungen erfolgten mit Graphit-monochromatisierter  $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung ( $\lambda=1,5418\text{\AA}$ ) auf einer MAR345 *Image Plate* (MAR Research, Hamburg). Alternativ wurden Cryo-Datensätze bei 100K aufgenommen. Dazu wurde ein Kristall in einer Nylon-Schleufe (Hampton Research) aufgenommen, in einem geeigneten Cryoprotektans äquilibriert und entweder in flüssigem Stickstoff oder im Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren.

Die Bestimmung der Kristallorientierung, der Elementarzelle und der Raumgruppe, sowie die Integration der Reflexintensitäten erfolgte mit MOSFLM, Version 6.01 – Version 6.11 (Leslie, 1998) oder DENZO (Otwinowski and Minor, 1997). Die weitere Analyse der Daten wurde mit den Programmen des CCP4 *program package* (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER, 1994) oder des HKL-Programmpakets (Otwinowski and Minor, 1997) durchgeführt.

MAD-Daten der DNA-Primase aus *Pyrococcus furiosus* sowie hochaufgelöste Daten des PCNA aus *Pyrococcus furiosus* wurden an der *Beamline* BW6 (Wiggler-Beamline mit Toroidspiegel) am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY, Hamburg) aufgenommen. Dazu wurde Synchrotronstrahlung einer Wellenlänge von 0,949 bis 1,28 $\text{\AA}$  verwendet.

### 4.5.3 Strukturlösung, Modellbau und Verfeinerung

Die Kristallstruktur des *Pfu*-PCNA wurde durch *PATTERSON*-Suchmethoden (*Molecular Replacement*) gelöst. Die Berechnungen wurden mit dem Programm MOLREP des CCP4 Programmpaketes (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER, 1994) durchgeführt. Als Suchmodell diente ein Monomer des PCNA aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die erste Kristallstruktur der *Pyrococcus furiosus* Primase wurde mittels *Multiwavelength Anomalous Dispersion* (MAD) mit Selenomethionin als anomalem Streuer gelöst. Selen-Positionen wurden mit dem Programm SOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999) lokalisiert und mit SHARP (Fortelle and Bricogne, 1997) verfeinert. Die weiteren Strukturen in den Raumgruppen  $P2_12_12_1$  und  $P3_1$  wurden wie oben mittels *Molecular Replacement* mit einem Monomer als Suchmodell gelöst.

Die Struktur der *hmtCCase* wurde mit der Methode des *Single Isomorphous Replacement* (SIR) mit Hilfe eines Quecksilber-Derivats gelöst. Zwei Quecksilberlagen wurden mit dem Programm SOLVE (Terwilliger and Berendzen, 1999) lokalisiert und wie oben mit SHARP (Fortelle and Bricogne, 1997) verfeinert.

Atomare Proteinmodelle wurden auf einer SILICON GRAPICS *work station* mit dem Programm MAIN (Turk, 1996) in die Elektronendichte eingepaßt. Diese Atommodelle wurden mit CNS (Brünger, 1998) oder REFMAC5.0 (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER, 1994) verfeinert. Als Zielfunktion wurde der freie R-Faktor minimiert, wobei 5% bzw. 10% der Reflexe zufällig ausgewählt und als Test-Set nicht in die Verfeinerung einbezogen (Brünger, 1992).

### 4.5.4 Analyse von Atommodellen

Die Molekülgeometrien wurde mit dem Programm PROCHECK (Laskowski, 1993) analysiert. Überlagerungen und *least-square-fits* von Koordinaten wurden mit TOP3D (COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER, 1994) oder MAIN (Turk, 1996) durchgeführt. Sekundärstrukturelemente wurden mit den Programmen STRIDE (Frishman and Argos, 1995) und MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) automatisch zugeordnet und visuell überprüft und angepaßt.

#### **4.5.5 Graphische Darstellungen und Sequenzvergleiche**

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme BOBSCRIPT (Esnouf, 1997) , MOLSCRIPT (Kraulis, 1991) und Raster3D (Merritt, 1994) benutzt. Moleküloberflächen wurden mit dem Programm GRASP (Nicholls et al., 1991) berechnet und dargestellt.

Zur graphischen Darstellung von Sequenzvergleichen wurde das Programm ALSRIPT (Barton, 1993) verwendet.

Zur Nachbearbeitung von Bildern, sowie zu deren Konvertierung kamen die Programme PHOTOSHOP (Adobe Systems Inc., USA), XV (J. Bradley, Pennsylvania, USA) und CorelDRAW (Corel Corporation Limited, 1998) zur Anwendung.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Strukturbestimmung von *Pyrococcus furiosus* PCNA

#### 5.1.1 Klonierung, Expression, Reinigung und Kristallisation von *Pyrococcus furiosus* PCNA

Aus *Pyrococcus furiosus* Zellen, die freundlicherweise von Prof. Dr. Karl-Otto Stetter (Universität Regensburg, Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie) zur Verfügung gestellt wurden, wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion genomische DNA präpariert. Das PCNA-Homologe von *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-PCNA) wurde aus dieser genomischen DNA kloniert, exprimiert und in seiner monomeren Form mittels dreier Reinigungsschritte (Hitzenaturierung, Anionenaustauscher- und Gelpermeationschromatographie) gereinigt. Die finale Ausbeute an für die Kristallisation ausreichend gereinigtem Protein betrug etwa 2mg je Liter Expressionskultur.

Rekombinantes *Pfu*-PCNA wurde in CrysChem-Platten im sitzenden Tropfen kristallisiert. Dazu wurden 2µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 5mgml<sup>-1</sup> mit 2µl Präzipitanzlösung (0,1M Natrium-Citrat, pH=5,3 29% PEG 4000; 0,2M LiSO<sub>4</sub>) gemischt und bei 20°C gegen 500µl Mutterlauge äquilibriert. Stabförmige Kristalle mit einer hexagonalen Grundfläche (Durchmesser etwa 0,05-0,1mm) bildeten sich innerhalb von zwei Tagen und erreichten nach etwa zwei Wochen eine maximale Länge von etwa 0,3mm. Die Kristalle gehörten der Raumgruppe P6<sub>3</sub> an (a=b=87,62Å c=62,43Å), mit einem *Pfu*-PCNA-Molekül in der asymmetrischen Einheit.

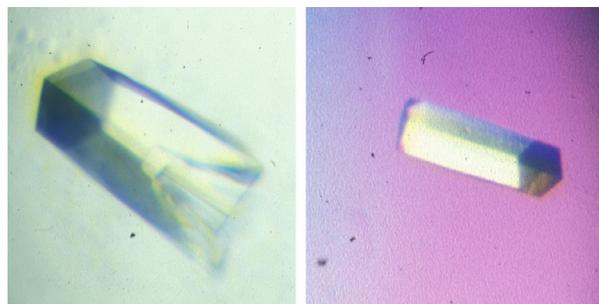


Abbildung 7: hexagonale Kristalle von *Pfu*-PCNA

### 5.1.2 Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung

Ein kompletter Datensatz von *Pfu*-PCNA mit einer maximalen Auflösung von 2,5Å wurde freundlicherweise von Dr. Ulf Marquardt und Dr. Gleb Bourenkov am deutschen Elektronensynchrotron (DESY) in Hamburg gemessen. Dazu wurde ein Kristall für einige Sekunden in Cryopuffer (Reservoirpuffer + 25% (v/v) Glycerin) eingelegt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Datensatz wurde mit Programmen des CCP4-Programmpakets ausgewertet und die Struktur durch molekularen Ersatz mit einem Poly-Alanin-Modell von *Saccharomyces cerevisiae*-PCNA (Krishna et al., 1994) bei 3Å mit Hilfe des Programms MOLREP gelöst. Einen Überblick über die Datensammlungs-, Strukturlösungs- und Verfeinerungsstatistiken gibt Tabelle 5:

**Tabelle 5: Kristallographische Statistik für *Pfu*-PCNA, Raumgruppe P6<sub>3</sub>**

<i>Datensammlung</i>			
Wellenlänge [Å]	1,5418		
maximale Auflösung [Å]	2,5		
Vollständigkeit <sup>a</sup> [%]	97,0 (95,4)		
I/σ <sup>a</sup>	6,0 (1,6)		
R <sub>sym</sub> <sup>a,b</sup> [%]	7,6 (42,7)		
<i>Molekularer Ersatz</i>			
Rotationslösungen 1 und 2			
Rf/sigma	3,50	2,85	
Translationslösungen 1, 2 und 3 (für RF 1)			
Dens/sigma	14,4	12,64	9,47
R-Faktor [%]	55,8	57,3	58,3
Korrelation [%]	47,7	45,9	42,1
<i>Verfeinerungsstatistik</i>			
R <sub>cryst</sub> (R <sub>free</sub> <sup>c</sup> ) [%]	24,61 (27,3)		
Rmsd bonds [Å]	0,009		
Rmsd angles [°]	1,44		
Rmsd bonded B-factors [Å <sup>2</sup> ] main chain	1,49		
Rmsd bonded B-factors [Å <sup>2</sup> ] side chain	1,86		
overall B-factor [Å <sup>2</sup> ]			

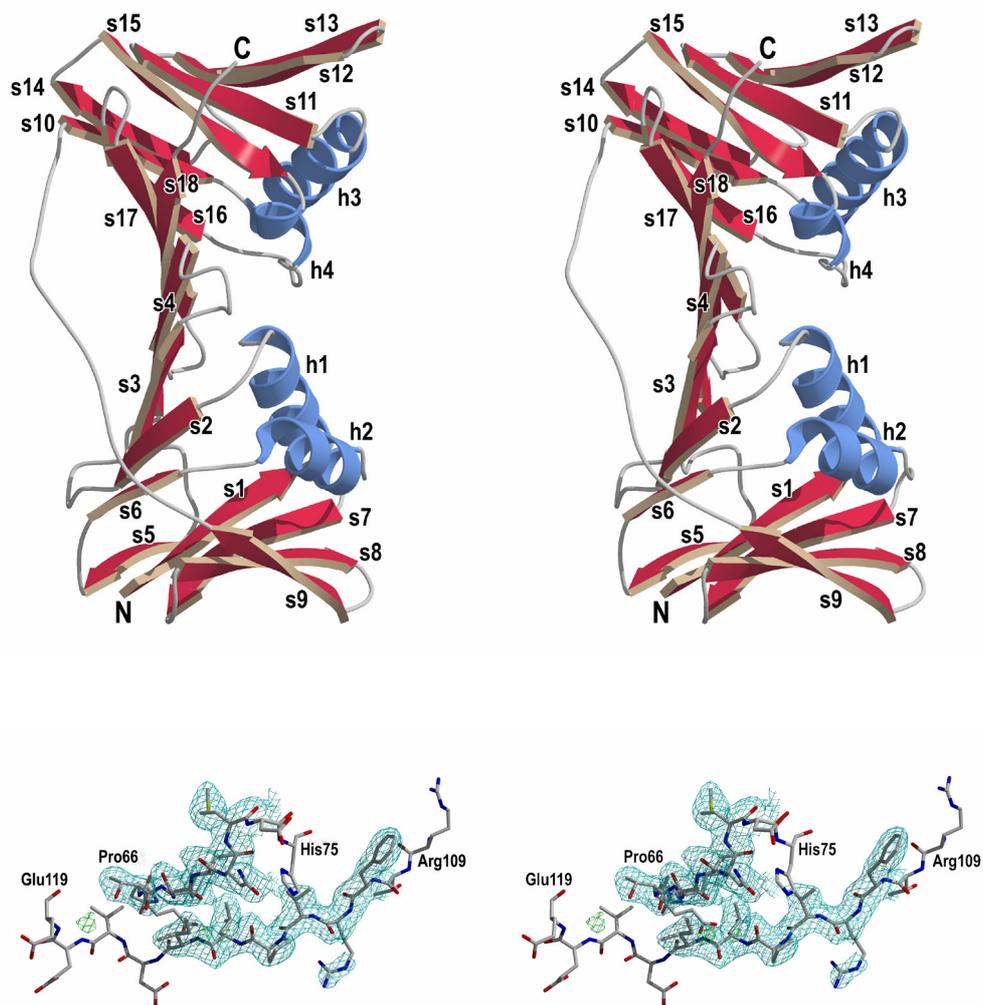
a Zahlen in Klammern geben die entsprechenden Werte für die äußerste Auflösungsschale an (2,68-2,49Å)

$$b \quad R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle I(hkl)_i \rangle}$$

c der R<sub>free</sub> wurde für 5% der Reflexe bestimmt

### 5.1.3 Struktur von *Pfu*-PCNA

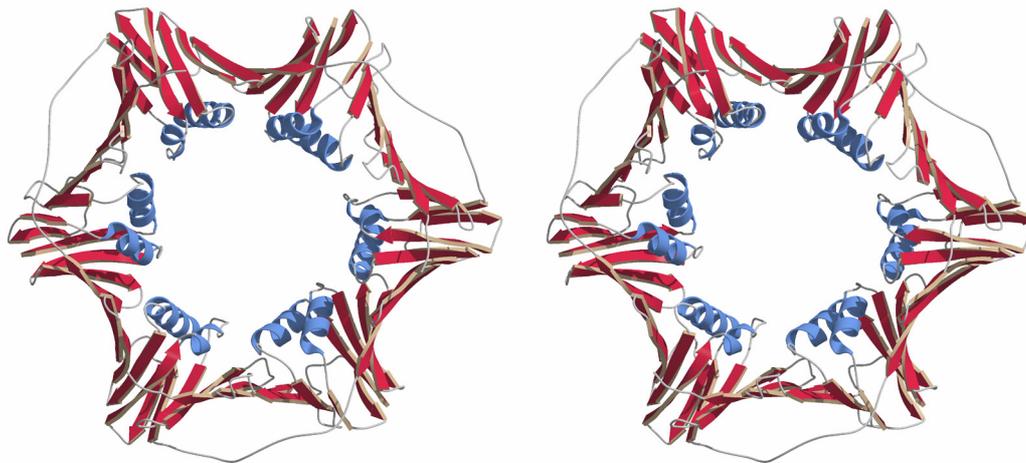
Ein *Pfu*-PCNA-Monomer besitzt eine Ausdehnung von ca. 60x55x40Å und besteht wie das eukaryontische PCNA (Krishna et al., 1994; Gulbis et al., 1996) aus zwei zueinander strukturell homologen gemischten  $\alpha/\beta$ -Domänen (Domäne 1: Stränge s1-s9, Helices h1 und h2; Domäne 2: Stränge s10-s18, Helices h3 und h4). Die beiden Domänen sind über einen flexiblen und in der Elektronendichte nicht definierten Bereich („*connecting loop*“) einer Länge von 11 Resten miteinander verbunden (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Struktur eines *Pfu*-PCNA-Monomers**

Oben: Stereo-Ribbondarstellung eines Monomers von *Pfu*-PCNA mit bezeichneten Sekundärelementen. Unten: Finale Elektronendichten um den *connecting loop* bei einem Konturierungslevel von  $1\sigma$  für die (2Fo-Fc)-Dichte (dunkelgrün) und  $2,5\sigma$  für die (Fo-Fc)-Dichte (hellgrün).

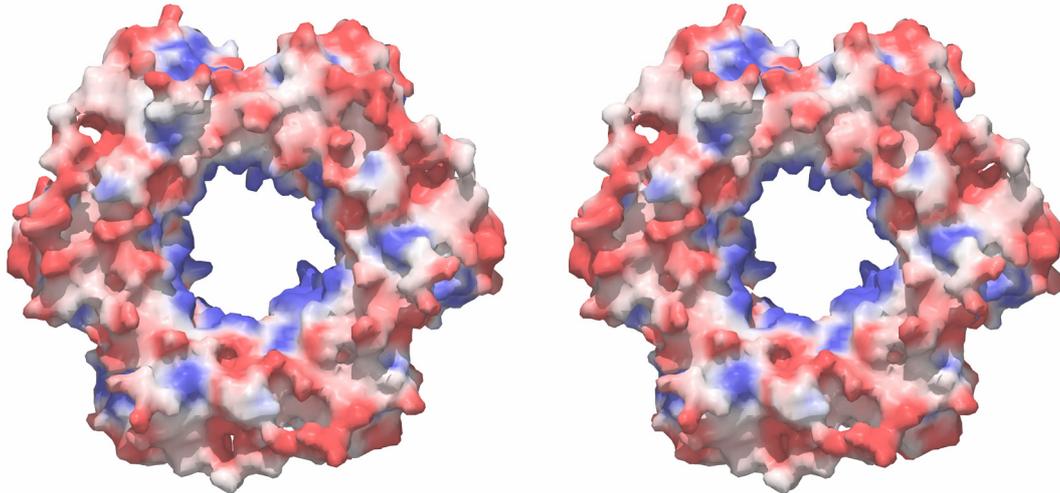
*Pfu*-PCNA bildet über die durch die  $P6_3$ -Symmetrie erzeugte dreizählige Achse ein Trimer mit einem pseudo-sechszähligen, ringförmigen Aufbau analog zu den DNA-Polymerase-Prozessivitätsfaktoren aus *E. coli*, Mensch und Bäckerhefe. Der Innendurchmesser des Rings beträgt wie auch bei den bereits bekannten *sliding clamps* etwa 30Å. Die Interaktionsregion von jeweils zwei *Pfu*-PCNA-Monomeren wird von den antiparallelen Strängen s9 und s13 gebildet. Vorherrschende Kontakte sind vier Wasserstoffbrücken zwischen den Amid- und Carbonyl-Funktionen der Hauptkette.



**Abbildung 9: Das *Pfu*-PCNA-Trimer**

Stereo-Ribbondarstellung eines Trimers von *Pfu*-PCNA. Die dreizählige Achse verläuft rechtwinklig zur Papierebene durch den Mittelpunkt des Trimers.

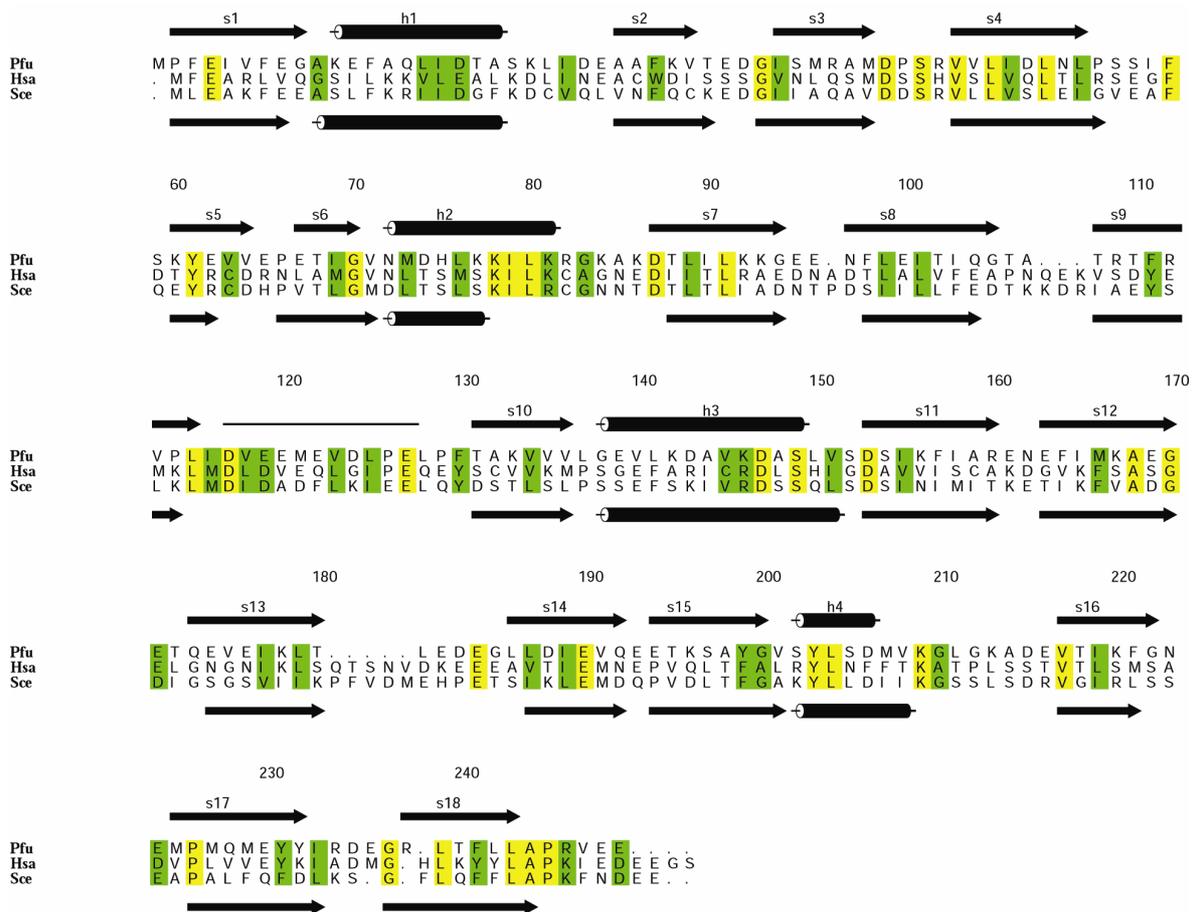
Die Gesamtfläche der Interaktionsregion zweier Monomere beträgt etwa  $1430\text{\AA}^2$  im Vergleich zu ca.  $1555\text{\AA}^2$  bei *S. cerevisiae*. In der Oberflächendarstellung von *Pfu*-PCNA (Abbildung 10) wird deutlich, daß das Trimere an der Innenseite nahezu ausschließlich positiv geladene Reste trägt, auf der Außenseite des Moleküls dagegen negativ geladene Aminosäuren vorherrschen.



**Abbildung 10: Elektrostatisches Potential an der Oberfläche eines *Pfu*-PCNA-Trimers**  
Stereo-Darstellung der molekularen Oberfläche des *Pfu*-PCNA-Trimers in mit Abb. 9 identischer Orientierung. Die elektrische Ladung an der Moleküloberfläche ist dargestellt in blau (positive Ladung) und rot (negative Ladung).

#### 5.1.4 Strukturelle Homologie zu eukaryontischem PCNA

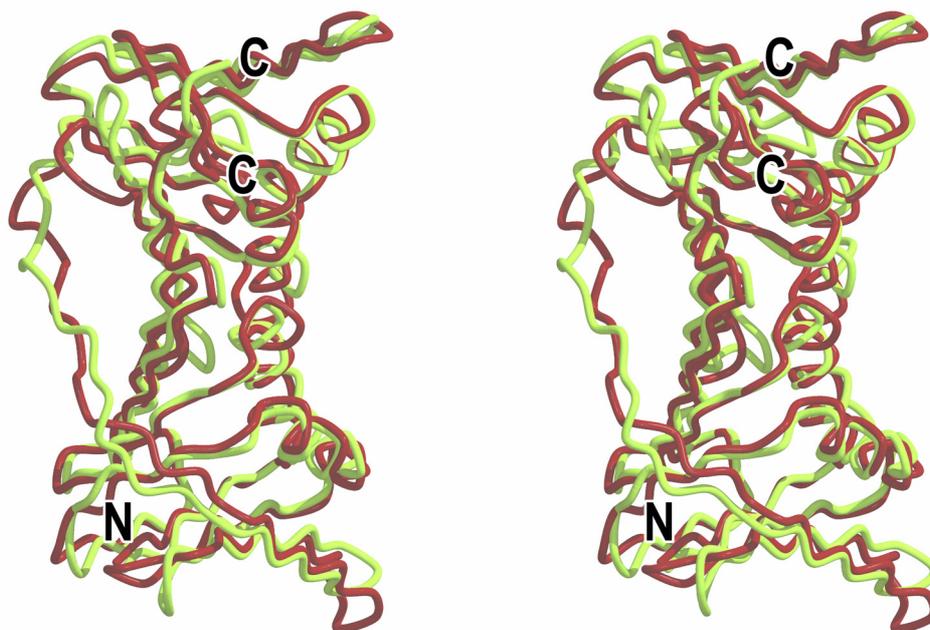
Die Sequenzidentität (Abbildung 11) zwischen *Pfu*-PCNA und den strukturell bekannten eukaryontischen Prozessivitätsfaktoren aus Mensch und Bäckerhefe beträgt 24% bzw. 27% (für 245 bzw. 256 verglichene Aminosäuren), der Anteil an homologen Resten liegt bei 48% bzw. 47%. Vergleicht man alle drei Proteine, beträgt die Identität 13% (34 Aminosäuren), die Homologie etwa 18% (46 Aminosäuren, bezogen auf 256 Reste). Die Verteilung von konservierten Aminosäuren ist dabei über das gesamte Protein hinweg relativ homogen. Eine Überlagerung der Monomere von *Pfu*-PCNA und *Sce*-PCNA ergibt für 209 C $\alpha$ -Atome eine mittlere Koordinatenabweichung von 1,2Å.



**Abbildung 11: Strukturbasierter Aminosäuresequenz-Vergleich verschiedener sliding clamps**

Strukturbasierter Sequenzvergleich von *Pfu*-PCNA (*Pfu*, die Sekundärstrukturelemente sind oberhalb des Sequenzvergleichs entsprechend der Zuordnung in Abbildung 8 angegeben) und den beiden strukturell bekannten eukaryontischen PCNAs aus Mensch (Hsa) und Bäckerhefe (Sce, Sekundärstrukturelemente unterhalb des Sequenzvergleichs).

Abbildung 12 zeigt die strukturelle Ähnlichkeit dieser Proteine am Beispiel jeweils einer Untereinheit von *Pfu*-PCNA und *Saccharomyces cerevisiae* PCNA.



**Abbildung 12: Überlagerung der Prozessivitätsfaktoren aus *Pfu* und *Sce***  
Stereoabbildung einer Überlagerung der Kristallstrukturen von *Pfu*-PCNA (hellgrün) und *Sce*-PCNA (rotbraun). Die Positionen der beiden N- und C-Termini sind angegeben.

---

## 5.2 Strukturanalyse der katalytischen Untereinheit von *Pyrococcus furiosus* DNA-Primase

### 5.2.1 Identifikation und Klonierung der katalytischen DNA-Primase-Untereinheit aus *Pyrococcus furiosus*

Um die katalytische Domäne der DNA-Primase aus *Pyrococcus furiosus* zu identifizieren, wurde mit Hilfe des Programms BLAST im zu Beginn dieser Arbeit teilweise verfügbaren Genom von *Pyrococcus furiosus*, Stamm OT3 ([www.genome.utah.edu](http://www.genome.utah.edu)), nach Sequenzabschnitten gesucht, welche ein Motiv ähnlich der für die katalytische Untereinheit eukaryontischer DNA-Primasen charakteristischen Proteinsequenz „EKELVFDID“ (*active-site-signature*) beinhalteten. Dabei wurden mehrere potentielle *open-reading-frames* (ORF) identifiziert. Diese hypothetischen Gene wurden anschließend auf das Vorkommen einer zweiten in eukaryontischen Primasen hochkonservierten Aminosäure-Sequenz („YSGRRGVH“) untersucht. Mit Hilfe dieser beiden Kriterien wurde ein ORF identifiziert, der ein Protein der Größe von 40,8 kDa (347 Aminosäuren) kodieren konnte (ORF-Name Pf\_114881, Startcodon bei Position 115924, Stopcodon bei Position 114881).

Dieses potentielle Gen sowie flankierende Bereiche auf der 3'- und 5'-Seite des Gens wurden aus genomischer DNA mit Hilfe einer *proof-reading* DNA-Polymerase amplifiziert und das erhaltene PCR-Produkt nach Aufreinigung mittels der Kettenabbruch-Methode direkt sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab eine 100%ige Übereinstimmung des sequenzierten Bereiches mit der in der Datenbank hinterlegten DNA-Sequenz.

Anschließend wurde der kodierende Bereich amplifiziert und das Gen nach Restriktionsverdau mit NdeI und BamHI in den Expressionsvektor pET 22 b(+) kloniert. Klone wurden auf das Vorhandensein eines Plasmids mit einem *insert* der entsprechenden Größe von 1044 Basenpaaren getestet und bei einem Plasmid die Identität von *insert*-Sequenz und genomischer Sequenz durch DNA-Sequenzierung bestätigt (Abbildung 13). Dieses Plasmid (Bezeichnung: *Pfu*-prim-1) wurde für sämtliche weiteren Arbeiten verwendet.

```

atgctgatgaggggaagtgcacaaggaggaaaggagcgaattctacagtaaagaatggagt
M L M R E V T K E E R S E F Y S K E W S
gcaagaaaaatacceaagttcatagtgacactctagaaagtagagaattcggcttcgat
A K K I P K F I V D T L E S R E F G F D
cataacggggaaggtccaagtgacaggaaaaatcaatattctgacataagagatttagag
H N G E G P S D R K N Q Y S D I R D L E
gactacattagagccacatccccctacgcagtatattcaagtggtgacattttatgaaaac
D Y I R A T S P Y A V Y S S V A F Y E N
cccaggagatggaaggggtggagaggagctgagttagtttttgacattgatgccaaggat
P R E M E G W R G A E L V F D I D A K D
ctccccctaaagaggtgcaaccacgaacctgggacagtgtgtccaatatgccttgaagat
L P L K R C N H E P G T V C P I C L E D
gcaaaagagctagctaaagatactctaataattctcaggggaagaactcggctttgaaaat
A K E L A K D T L I I L R E E L G F E N
atccatgtagtctactccggaaggatatacacataagaatcctagatgaatgggcccctc
I H V V Y S G R G Y H I R I L D E W A L
caattggactccaaaagtagagaaagaattcttgccctttatttcagctagtgaattgag
Q L D S K S R E R I L A F I S A S E I E
aacgttgaagaatttagaagatttctactggagaagagaggatggtttggttaaaggat
N V E E F R R F L L E K R G W F V L K H
ggctaccgagatatttaggttgagactgggatactttattctaaggggtaacgtacct
G Y P R V F R L R L G Y F I L R V N V P
cacttgctaagcattggaataagaagaatattgcaaagaaaattctagatcacaagaa
H L L S I G I R R N I A K K I L D H K E
gaaatatacgagggatttgtaaggaaggcaatattggcatcttttccagaaggcgtggga
E I Y E G F V R K A I L A S F P E G V G
attgaaagcatggctaagctctttgccctatcaactagattttcaaaggcctattttgat
I E S M A K L F A L S T R F S K A Y F D
ggtagggttacagttgatataaagagaatcctaaggttgccctcaacactccattccaaa
G R V T V D I K R I L R L P S T L H S K
gtgggccttatagcaacttatggttgaaccaaggagagagaggtcatgaagtttaacca
V G L I A T Y V G T K E R E V M K F N P
tttagacatgcagtgccaaagttcaggaaaaaagaagtgcgcgaagcttataaactgtgg
F R H A V P K F R K K E V R E A Y K L W
agagagtccttggaatatgaataa
R E S L E Y E -

```

**Abbildung 13: DNA- und daraus abgeleitete Protein-Sequenz der katalytischen Untereinheit von *Pfu*-Primase**

Die aus der DNA abgeleitete Protein-Sequenz ergab nach einem Sequenzvergleich mit CLUSTAL W am European Bioinformatics Institute (EBI) 78 identische Reste mit der katalytischen Primase-Untereinheit aus *Homo sapiens* (entsprechend 23% von 347 Aminosäuren) sowie 74 hochkonservierte Reste (21%).

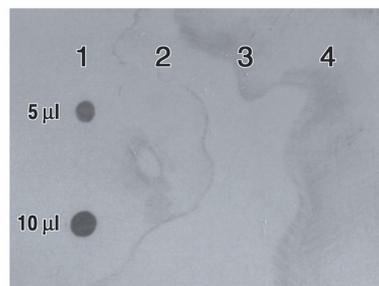
### 5.2.2 Rekombinante Expression und Reinigung der katalytischen Untereinheit der DNA-Primase aus *Pyrococcus furiosus*

Rekombinantes p41-Protein wurde in *E. coli* exprimiert und mittels dreier Reinigungsschritte (Hitzenaturierung, Affinitäts- und Gelpermeationschromatographie) aufgereinigt. Aus einem Liter Expressionskultur konnten mit diesem Protokoll Mengen zwischen 1-5 mg

Protein dargestellt werden. Selenomethionin enthaltendes p41-Protein wurde analog in *E. coli* BL834 exprimiert und gereinigt, die Ausbeute an kristallisierbarem Protein lag dabei bei etwa 300µg je Liter Kulturansatz.

### 5.2.3 Nachweis enzymatischer Aktivität

Mit dem gereinigten p41-Protein wurde ein qualitativer Primase-Aktivitätstest durchgeführt. Dazu wurde das rekombinante Protein in Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen mit einzelsträngiger DNA und den vier Ribonukleotidtriphosphaten inkubiert und der gebildete *primer* von *Taq* DNA-Polymerase in Gegenwart dreier natürlicher dNTPs und einer Mischung aus dTTP und Digoxigenin-markiertem dUTP verlängert. Ein Teil des Reaktionsansatzes wurde auf eine positiv geladene Membran aufgebracht und dort mit Hilfe von UV-Strahlung fixiert. Anschließend wurde die gebundene Digoxigenin-markierte DNA über einen Anti-Digoxigenin-Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase mittels einer Chemolumineszenz-Reaktion detektiert (Augustin et al., 2001).



**Abbildung 14: Qualitativer Primase-Aktivitätstest**

*Dot-blot* eines qualitativen Primase-Assays wie unter 2.2.12 beschrieben; 5 (oben) bzw. 10µl (unten) wurden auf einer positiv geladene Membran aufgetragen: (1) Reaktionsansatz mit *Pfu*-p41, ss-DNA, NTPs; (2-4) Negativ-Kontrollen wie (1) mit (2) ohne ss-DNA; (3) ohne *Pfu*-p41; (4) ohne *Pfu*-p41 und ss-DNA

Abbildung 14 zeigt, daß bei diesem Aktivitätstest in Anwesenheit von p41, *template*-DNA und den vier NTPs Digoxigenin-markierte DNA nachgewiesen wird (Spalte 1). In Kontrollen ohne *template*-DNA (Spalte 2), ohne p41-Protein (Spalte 3) sowie ohne *template*-DNA und p41 (Spalte 4) konnte kein Signal von Digoxigenin-markierter DNA detektiert werden.

### 5.2.4 Kristallisation und Datensammlung

Die katalytische Untereinheit der DNA-Primase aus *Pyrococcus furiosus* wurde im sitzenden Tropfen bei 20°C kristallisiert. Eine initiale Kristallisationsbedingung wurde in einem *screening* verschiedener potentieller Bedingungen gefunden. Diese wurde im Anschluß verfeinert und führte zu folgenden finalen Kristallisationsansätzen:

2µl Proteinlösung einer Konzentration von 6-13 mgml<sup>-1</sup> wurden mit 1µl Kristallisationslösung (100mM Tris/HCl, 2,0M Ammoniumsulfat, pH=8,5) gemischt und gegen 500µl Mutterlauge äquilibriert. Kristalle bildeten sich innerhalb von zwei Tagen und erreichten nach etwa zwei Wochen eine maximale Größe von 0,4x0,4x0,2 mm<sup>3</sup>. Erste Diffraktionsexperimente bei Raumtemperatur zeigten, daß die Kristalle durch Strahlungsschäden innerhalb von wenigen Stunden ihre Streukraft verloren und die Aufnahme eines kompletten Datensatzes nicht möglich war, weshalb die folgenden Messungen bei 100K durchgeführt wurden. Dazu wurden die Kristalle für einige Sekunden in ein Cryoprotektans bestehend aus Mutterlauge + 33% Glycerin eingelegt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Mit dieser Methode konnte auf der abteilungseigenen Drehanode ein kompletter Datensatz bis zu einer maximalen Auflösung von 2,3Å gesammelt werden. *Pfu*-Primase kristallisierte in der orthorhombischen Raumgruppe p2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 mit Zellkonstanten von a=129,9Å, b=136,3Å, c=61,9Å ( $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ ) mit zwei Molekülen in der asymmetrischen Einheit, was einem Lösungsmittelgehalt von 63% entspricht.

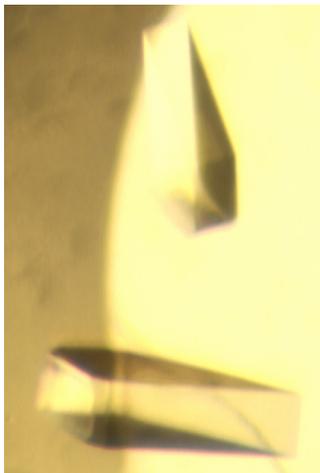


Abbildung 15: Othorhombische Kristalle von *Pfu*-Prim

Zur Strukturlösung wurde die Methode der *Multiwavelength Anomalous Dispersion* (MAD) mit Selen als anomalem Streuer benutzt. Das Selenomethionin enthaltende Protein kristallisierte unter der gleichen Bedingung wie das nicht substituierte Enzym, auch die Größe der Kristalle war vergleichbar. An der *beamline* BW6 am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg wurde bei einem initialen Wellenlängenscan festgestellt, daß in den Kristallen neben Selen auch Zink enthalten war, weshalb mit einem wie oben gefrorenen Kristall ebenfalls bei einer Temperatur von 100K zwei komplette MAD-Experimente (jeweils eines für Selen und Zink) bis zu einer Auflösung von 2,5Å durchgeführt wurden.

### 5.2.5 Phasierung, Modellbau und Verfeinerung

Mit Hilfe von Differenz-Patterson Methoden konnten in den Selen-Datensätzen von *Pfu*-Prim vier initiale Selen-Positionen gefunden werden. In einer mit den Phasenwinkeln aus diesen vier Selen-Lagen gerechneten anomalen Differenz-Fourier-Dichte wurden weitere vier Selen-Positionen identifiziert, die ebenfalls zur Phasierung hinzugezogen wurden. Die aus der Phasierung mit diesen acht Selen-Lagen resultierende Elektronendichte-Verteilung wurde mit Hilfe der *solvens-flipping*-Prozedur so weit verbessert (Abbildung 16), daß manuell mit Hilfe des Programms MAIN (Turk, 1996) ein nahezu komplettes poly-Alanin-Modell mit einigen Seitenketten gebaut werden konnte.

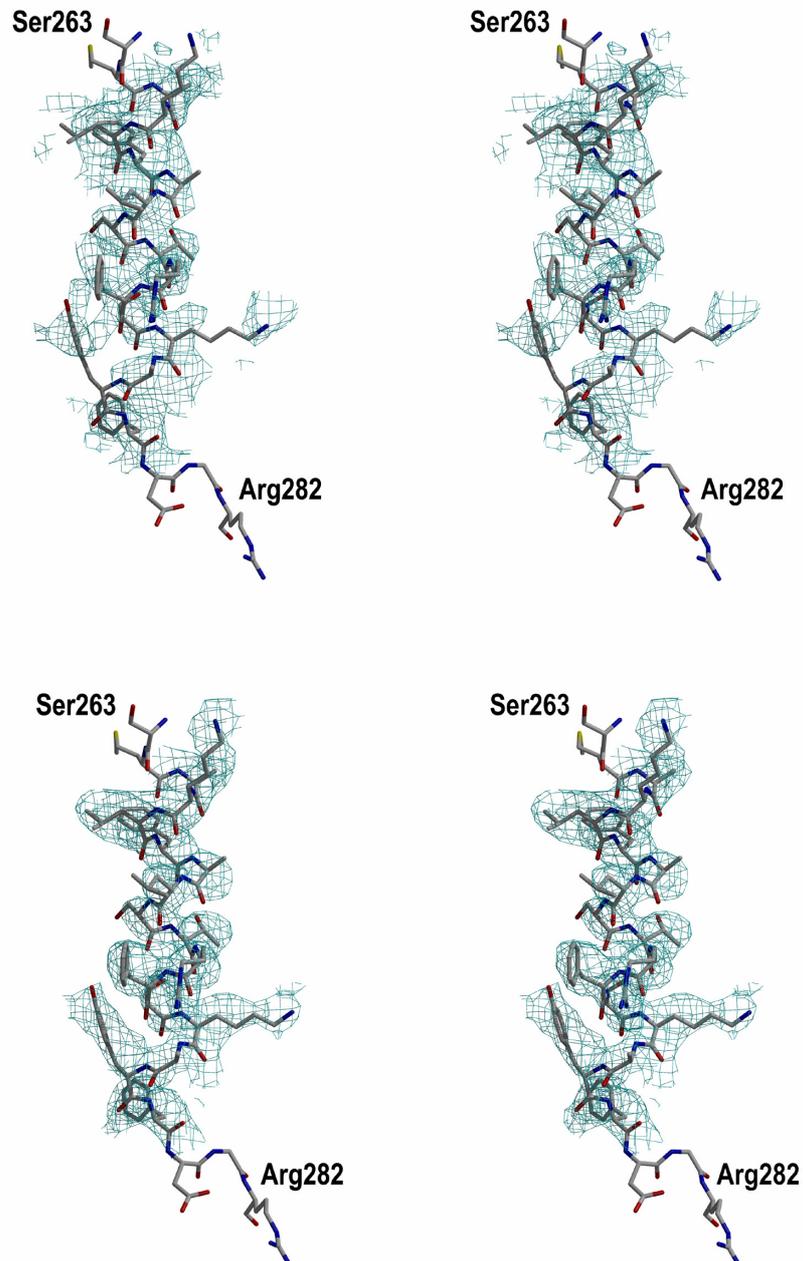
Dieses initiale Modell wurde in mehreren Zyklen von Verfeinerung und manuellem Überbauen erweitert und verbessert und enthält final in beiden kristallographisch unabhängigen Molekülen jeweils die Aminosäuren 1-344. Eine Übersicht über die kristallographischen Statistiken gibt Tabelle 6.

**Tabelle 6: Kristallographische Statistiken für *Pfu*-p41, Raumgruppe P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2**

<i>Datensammlung</i>	<i>nativ</i>	<i>remote</i>	<i>Peak (Se)</i>	<i>Edge (Se)</i>	<i>Peak (Zn)</i>	<i>Edge (Zn)</i>	
Wellenlänge [Å]	1.5418	0.95	0.9791	0.9796	1.2811	1.2827	
Auflösung [Å]	2.3	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	
Vollständigkeit <sup>a</sup> [%]	93.0 (74.8)	98.9 (94.9)	99.2 (96.5)	98.7 (93.9)	98.2 (91.5)	98.5 (94.1)	
I/σ <sup>a</sup>	15.1 (4.6)	12.5 (2.0)	13.9 (2.5)	13.0 (2.3)	14.9 (2.1)	14.2 (2.3)	
R <sub>sym</sub> <sup>a,b</sup> [%]	5.9 (31.6)	6.0 (34.8)	6.3 (27.7)	5.5 (26.4)	6.2 (38.5)	5.8 (29.4)	
<b>Phasierungsstatistik</b>							
Phasing power	Iso	-	-	1.26	1.74	0.68	0.57
	Ano	-	-	2.7	2.5	0.7	0.6
<b>Verfeinerungsstatistik</b>			<b>Ramachandran-Plot</b>				
R <sub>cryst</sub> (R <sub>free</sub> <sup>c</sup> ) [%]	21.08 (24.86)		Most favored [%]		89.0		
Rmsd bonds [Å]	0.009		Allowed [%]		10.6		
Rmsd angles [°]	1.45		Generously allowed [%]		0.3		
Rmsd bonded B-factors [Å <sup>2</sup> ]	1.38						
overall B-factor [Å <sup>2</sup> ]	29.9						
<b>Zahl der Atome</b>							
Protein	5706						
Wasser	338						
Ionen	12						

a Zahlen in Klammern geben die entsprechenden Werte für die äußerste Auflösungsschale an (2.39-2.29Å im Falle des nativen Kristalls, 2.59-2.49Å für den Selenomethionin-substituierten Kristall)

- b  $R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle I(hkl)_i \rangle}$
- c der  $R_{\text{free}}$  wurde für 10% der Reflexe bestimmt

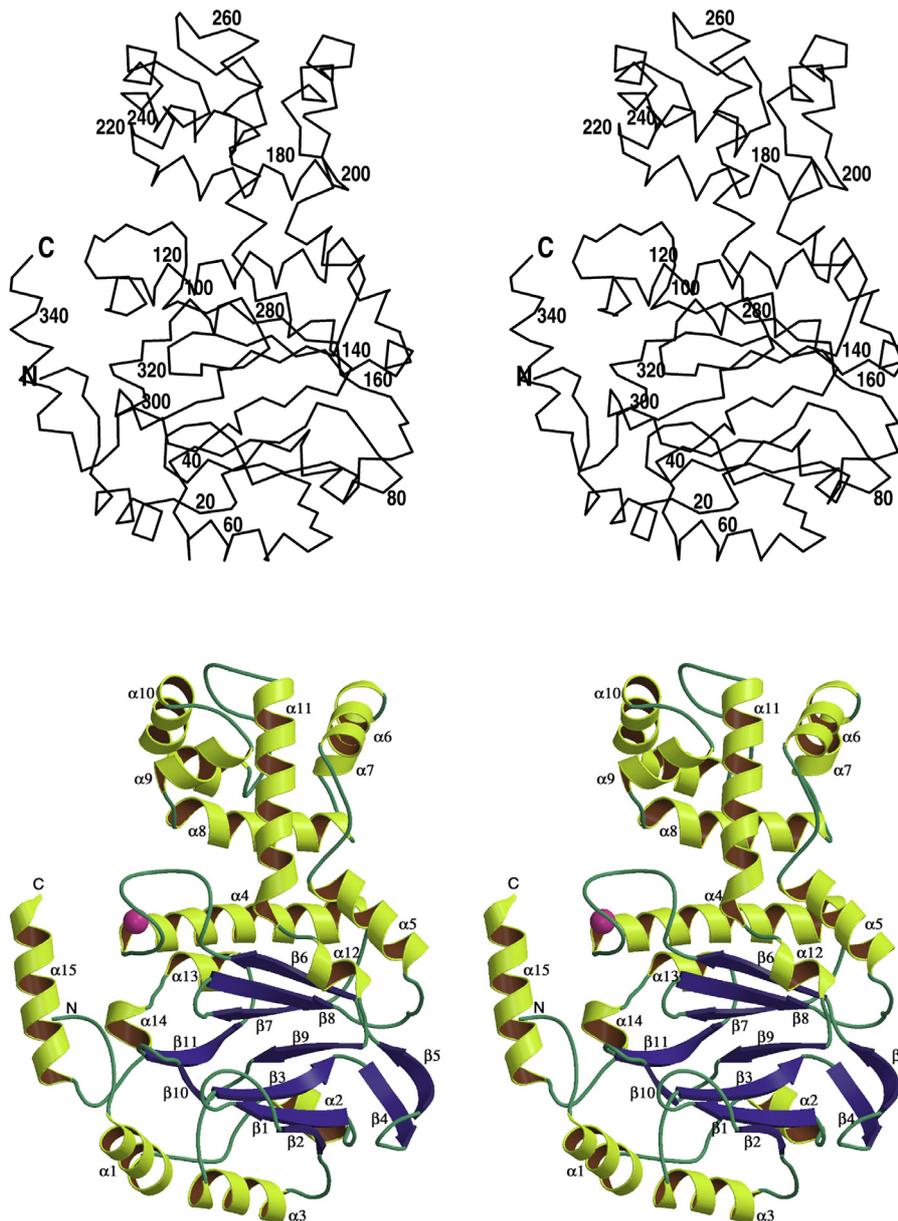


**Abbildung 16: Experimentelle Elektronendichten von *Pfu-p41***

Oben: Ausschnitt aus der initialen Elektronendichte nach Phasierung mit acht Selen-Positionen überlagert mit dem finalen Atommodell. Unten: Der gleiche Ausschnitt aus der Elektronendichte nach Dichtemodifikation mit SOLOMON, ebenfalls überlagert mit dem finalen Atommodell.

### 5.2.6 Überblick über die Struktur

Die katalytische Untereinheit der DNA-Primase aus *Pyrococcus furiosus* hat Dimensionen von etwa  $75 \times 55 \times 40 \text{ \AA}^3$  (Höhe x Breite x Tiefe in Abb. 17) und besteht aus zwei dicht gepackten annähernd globulären Domänen.

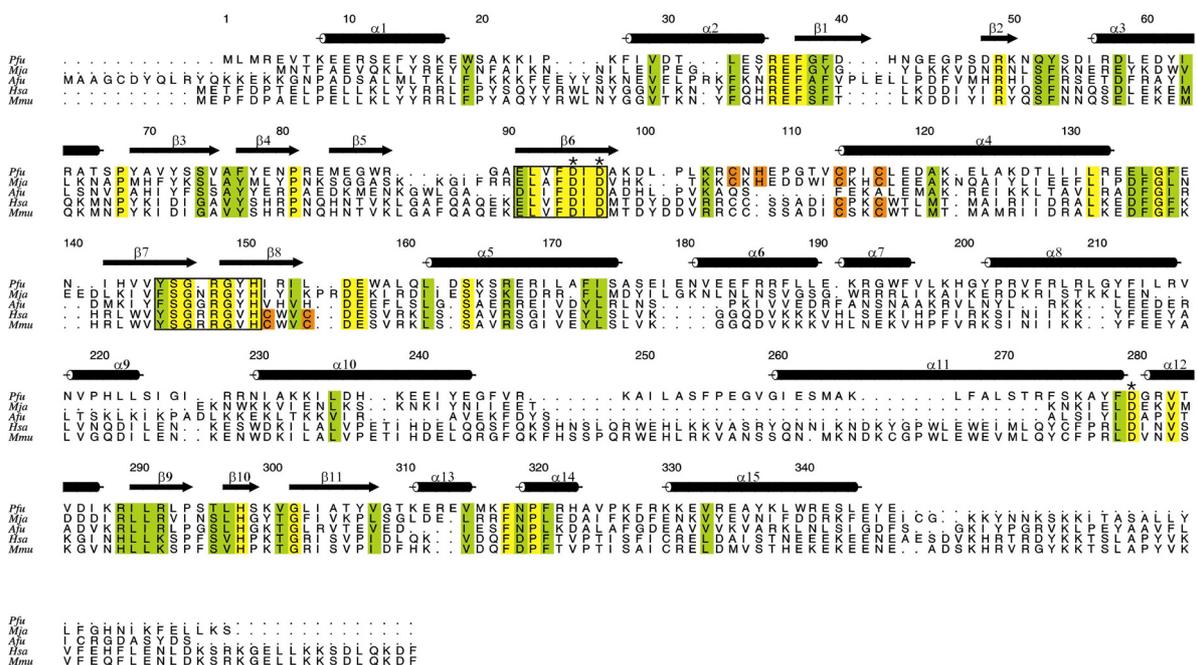


**Abbildung 17: Struktur von *Pfu*-Prim**

oben: Stereoabbildung eines *Ca*-trace von *Pfu*-p41, beide Termini sowie jede zwanzigste Aminosäure sind beschriftet. unten: Stereo-Ribbondarstellung von *Pfu*-p41 mit beschrifteten Sekundärstrukturelementen. Das Zink-Ion ist als CPK-Modell (pink) dargestellt.

Die größere der beiden Domänen (Dimensionen analog etwa  $50 \times 55 \times 40 \text{ \AA}^3$ ) wird von den Aminosäuren 1-174 und 279-344 gebildet und besteht aus zwei  $\beta$ -Faltblättern, welche durch

eine zweisträngige Einheit ( $\beta 4$ ,  $\beta 5$ ) miteinander verbunden sind. Diese beiden Faltblätter packen gegen 9  $\alpha$ -helices (helices  $\alpha 1$ - $\alpha 5$  und  $\alpha 12$ - $\alpha 15$ ), weshalb diese Domäne unter die „mixed alpha/beta-domains“ fällt. Faltblatt 1 (bestehend aus Strängen  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\beta 9$ ,  $\beta 10$ ) und Faltblatt 2 (Stränge  $\beta 6$ ,  $\beta 7$ ,  $\beta 8$ ,  $\beta 11$ ) sind nahezu rechtwinklig zueinander angeordnet und bilden dadurch zwischen sich eine bis zu 12Å weite Furche mit einer Tiefe von bis zu 8 Å aus. In dieser Domäne (im Folgenden „active site-Domäne“ genannt) befinden sich alle in der prim-Typ-Familie invarianten Aminosäuren inklusive des aktiven Zentrums und der Zinkbindenden Region (vgl. Abbildung 18).



**Abbildung 18: Aminosäuresequenz-Vergleich von Primasen der prim-Typ-Familie**

Aminosäuresequenz-Vergleich der katalytischen Primase-Untereinheiten von *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Methanococcus jannashii* (Mja), *Archaeoglobus fulgidus* (Afu), *Homo sapiens* (Hsa) und *Mus musculus* (Mmu) mit Sekundärstrukturelementen von Pfu-p41 analog Abbildung 17, unten, über dem Sequenzvergleich. Die Nummerierung entspricht der Sequenz von Pfu-p41. Invariante Aminosäuren sind gelb hinterlegt, konservierte Aminosäuren grün. Die drei Aminosäuren der katalytischen Triade sind mit einem Stern markiert, die Zinkbindenden Aminosäuren sind rot hinterlegt.

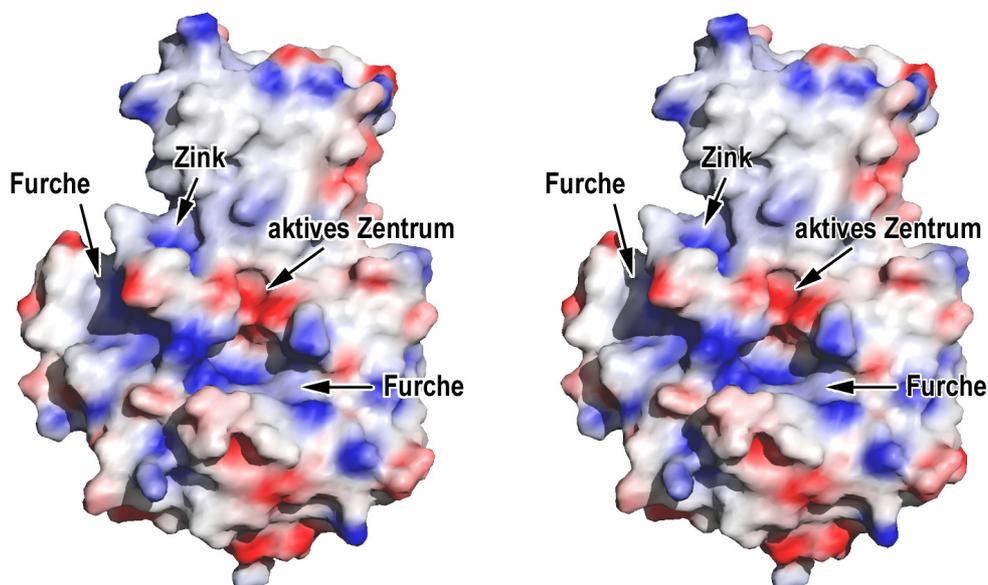
Die kleinere Domäne (Aminosäuren 175-278, Dimensionen etwa 25x25x25 Å<sup>3</sup>) ist ausschließlich  $\alpha$ -helikal (helices  $\alpha 6$ - $\alpha 11$ ) und zeigt keinerlei strukturelle Besonderheiten. Wie aus dem Sequenzvergleich in Abbildung 18 hervorgeht, ist sowohl die Länge als auch die Sequenz dieser Domäne innerhalb der Familie sehr variabel.

Mit dem gesamten Protein sowie mit beiden einzelnen Domänen wurde mit Hilfe des DALI-Servers nach strukturell ähnlichen Proteinen in der Protein-Datenbank gesucht, es konnte

jedoch keine verwandte Struktur identifiziert werden. Die katalytische Untereinheit der *Pyrococcus furiosus* DNA-Primase wurde infolge dessen in der Datenbank zur strukturellen Charakterisierung von Proteinen (SCOP, *Structural Classification of Proteins*) als erster Vertreter einer neuen „DNA-Primase Superfamily“ eingeordnet.

### 5.2.7 Oberflächenstruktur und Ladungsverteilung

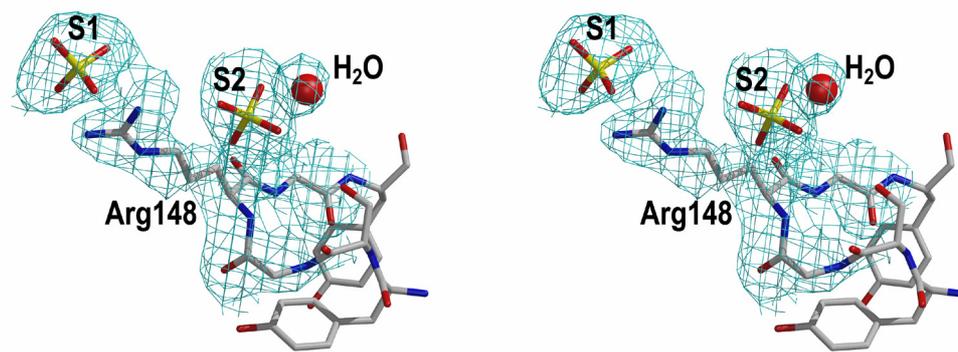
Die molekulare Oberfläche von *Pfu*-Prim zeigt einige auffallende Besonderheiten in der *active site*-Domäne: Die oben beschriebene Furche wird von dem Zink-bindenden *loop* sowie den N-terminalen Resten Met1 bis Met3 und der C-terminalen Helix  $\alpha 15$  verlängert und erstreckt sich damit diagonal über nahezu die gesamte *active site*-Domäne (vgl. Abbildung 19).



**Abbildung 19: Oberflächenstruktur und elektrostatisches Potential**

Ladungsverteilung an der molekularen Oberfläche von *Pfu*-p41. Positiv geladene Bereiche sind blau, negativ geladene Bereiche rot eingefärbt. Das aktive Zentrum, die Position des Zink-Ions sowie die über die Moleküloberfläche verlaufende Furche sind markiert.

In der Nähe des aktiven Zentrums wird die Furche von der Seitenkette des Restes Arg148 blockiert. Dieses innerhalb der Familie der prim-Typ-Primasen invariante Arginin liegt in dem *beta-turn* zwischen den Strängen  $\beta 7$  und  $\beta 8$ , einem in der Elektronendichte genau definierten Bereich. Auch Arg148 ist exakt definiert, die Seitenkette wird von zwei Sulfat-Ionen aus dem Kristallisationspuffer fixiert (Abbildung 20).



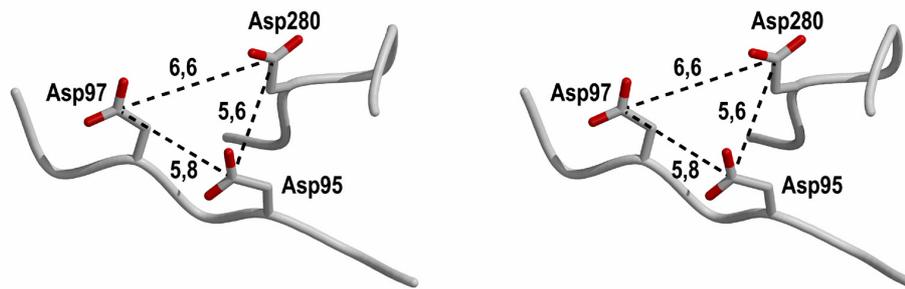
**Abbildung 20: Umgebung von Arg148**

Stereodarstellung eines Ausschnitts aus der finalen 2fo-fc-Elektronendichte in der Umgebung von Arg148, überlagert mit dem finalen Atommodell. Die beiden Sulfat-Ionen aus der Kristallisationsbedingung fixieren die Seitenkette von Arg148.

In der Mitte der Furche, in Abbildung 19 genau unterhalb des aktiven Zentrums, liegt eine mit Wasser gefüllte Vertiefung. Die Ladung an der Oberfläche ist mit Ausnahme der Region um das aktive Zentrum gleichmäßig verteilt. Das aktive Zentrum selbst ist negativ geladen, die angrenzende Furche überwiegend positiv.

### 5.2.8 Das aktive Zentrum

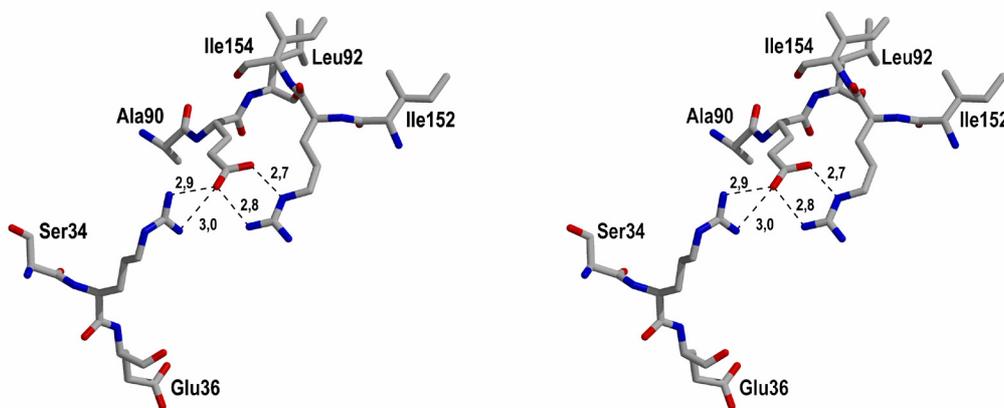
Das aktive Zentrum von *Pfu*-Prim wird von drei Aspartatresten gebildet (Asp95, Asp97 und Asp280). Diese drei Aminosäuren sind innerhalb der prim-Typ-Familie hochkonserviert und bilden eine katalytische Triade (Abbildung 21). Asp280 liegt in dem kurzen *turn* zwischen helices  $\alpha 11$  und  $\alpha 12$  und ist der erste invariante Rest nach der kleinen Domäne. Die beiden anderen Aspartatreste Asp95 und Asp97 liegen am C-terminalen Ende von beta-Strang  $\beta 6$  innerhalb des für Primasen vom prim-Typ charakteristischen Motivs „ELVFDID“, welches durch Mutagenesestudien an der katalytischen Untereinheit der DNA-Primase aus *Mus musculus* bereits als Teil des aktiven Zentrums in Primasen des prim-Typs identifiziert war (Copeland and Tan, 1995).



**Abbildung 21: Die katalytische Triade von *Pfu*-p41**

Stereodarstellung der katalytischen Triade von *Pfu*-Prim. Die Abstände der einzelnen Carboxylat-Kohlenstoffatome voneinander sind in Å angegeben.

Die in diesem Motiv enthaltene – ebenfalls innerhalb der Familie hoch konservierte – dritte negativ geladene Aminosäure Glutamat (im Falle von *Pfu*-Prim Glu91), ist selbst nicht Teil des Aktivzentrums, sondern erfüllt eine strukturstabilisierende Funktion, indem sie Wasserstoffbrücken zu den invarianten Resten Arg35 und Arg153 ausbildet (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Umgebung von Glu91**

Stereodarstellung der unmittelbaren Umgebung von Glu91. Die Abstände der beiden Carboxylat-Sauerstoffatome zu den interagierenden Stickstoffatomen von Arg35 und Arg153 sind in Å angegeben.

Obwohl keine strukturelle Homologie zwischen *Pfu*-p41 und anderen bekannten Proteinen existiert, ist die dreidimensionale Anordnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum für DNA-Polymerasen und andere Nukleotidyltransferasen typisch. Eine Überlagerung der C $\alpha$ - und C $\beta$ -Atome der katalytischen Triade von *Pfu*-Prim mit den entsprechenden Atomen der

katalytisch aktiven Reste verschiedener DNA-Polymerasen (Singh and Modak, 1998), welche mit DNA kokristallisiert worden waren (vgl. Tabelle 7; Jacobo-Molina et al., 1993; Eom et al., 1996; Sawaya et al., 1997; Doublet et al., 1998), ergibt eine mittlere Koordinatenabweichung zwischen 0,7 Å im Falle der humanen DNA-Polymerase beta (PDB-Eintrag 1BPX) und 3,15 Å für die DNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 (PDB-Eintrag 1T7P).

**Tabelle 7: Mittlere Koordinatenabweichung der C $\alpha$ - und C $\beta$ -Atome der katalytischen Triade von *Pfu*-Prim und verschiedenen DNA-Polymerasen**

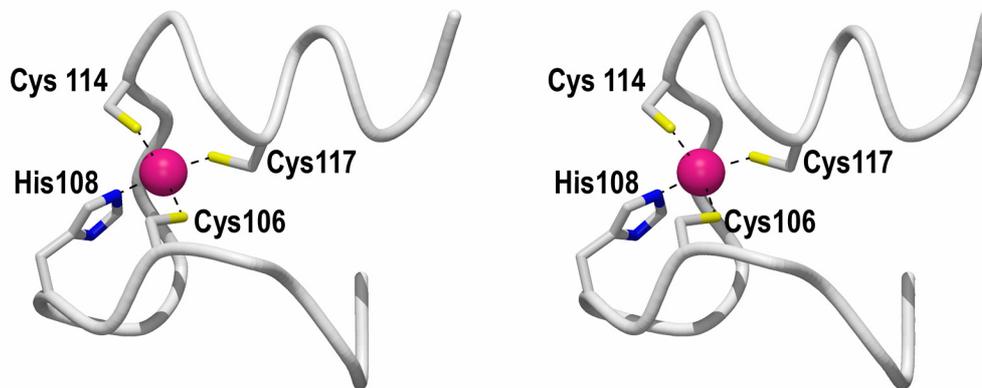
Enzym	Rest 1	Rest 2	Rest 3	rmsd [Å]	PDB-Eintrag
<i>Pfu</i> -Primase	Asp97	Asp95	Asp280	0,0	1G71
DNA-Polymerase beta	Asp190	Asp192	Asp256	0,7	1BPX
HIV Reverse Transkriptase	Asp110	Asp113	Asp185	2,4	2HMI
Taq DNA-Polymerase	Asp610	Glu615	Asp785	3,0	1TAU
T7 DNA-Polymerase	Asp475	Glu480	Asp654	3,2	1T7P

### 5.2.9 Der „Zinkknöchel“

Eine allen katalytischen Primase-Untereinheiten gemeinsame Eigenschaft ist das Vorhandensein einer zumindest potentiellen Zink-bindenden Region. Im Unterschied zu anderen Primasen ist dieser Bereich in den archaealen Enzymen jedoch verkürzt, er entspricht damit nicht dem strukturell gut charakterisierten herkömmlichen Zinkfinger. Stattdessen gleicht die Struktur einem so genannten Zinkknöchel, der erstmals im *gag*-Protein des *human immunodeficiency virus* (HIV) (De Guzman et al., 1998a) strukturell beschrieben wurde. Anhand des Aminosäuresequenz-Vergleichs verschiedener katalytischer Primase-Untereinheiten aus Archaea ergibt sich für den Zinkknöchel ein Konsensus-Motiv von C-X-(C/H)-X<sub>3-5</sub>-C-X<sub>2</sub>-C (X steht hierbei für eine beliebige Aminosäure), allerdings ist diese Sequenz innerhalb der archaealen DNA-Primasen nicht durchgehend konserviert.

Die Zink-bindenden Reste liegen sowohl sequentiell als auch strukturell in unmittelbarer Nachbarschaft zum aktiven Zentrum im *loop* hinter beta-Strang  $\beta_6$  und am Beginn der prominenten Helix  $\alpha_4$  (Abbildung 23). Das Zink-Ion ist tetragonal koordiniert, die

koordinierenden Reste sind drei Cysteine (Cys106, Cys114 und Cys117) sowie ein Histidin (His108).



**Abbildung 23: Der Zinkknöchel**

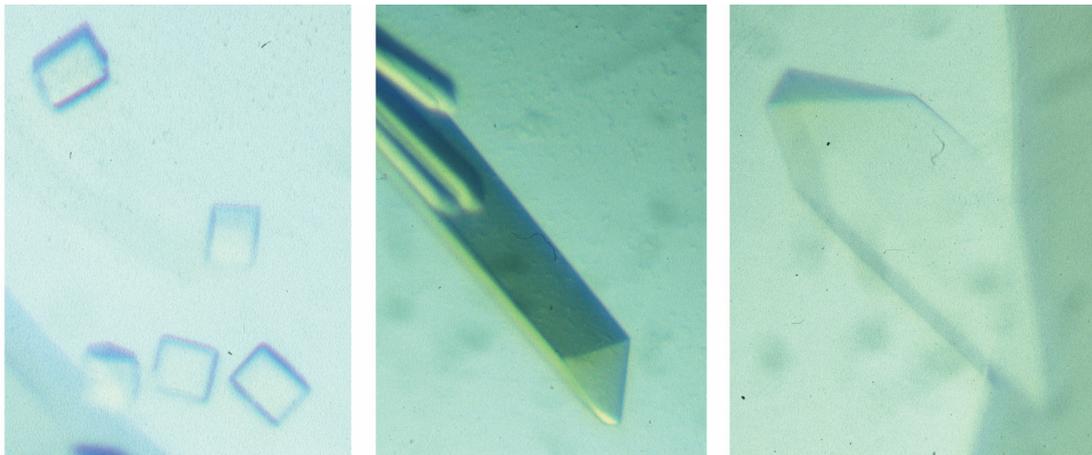
Stereodarstellung des Zinkknöchels. Das Zink-Ion ist als CPK-Modell (pink) dargestellt, die Seitenketten der Zink-koordinierenden Aminosäuren als *stick*-Modelle.

### 5.2.10 Versuche zur Kokristallisation

Bei *soaking*-Experimenten von *Pfu*-Prim-Kristallen mit Metall-Ionen und NTP wurde kein Kristall mit gebundenem NTP erhalten, weshalb versucht wurde, *Pfu*-Prim mit einzelsträngiger DNA, NTPs und Metall-Ionen zu kokristallisieren. Dazu wurde das gereinigte Protein einer Endkonzentration von  $5\text{mgml}^{-1}$  in einem molaren Verhältnis von 1:1,2:5 (Protein : einzelsträngige DNA :  $\text{Mg}^{2+}$ -NTP) mit in Länge und Sequenz verschiedenen DNA-*templates*, NTP und  $\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  gemischt (Bezeichnung Kokrist.-Mix) und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Mischungen wurden analog dem Vorgehen für *Pfu*-Prim für Kristallisationsexperimente bei  $20^\circ\text{C}$  verwendet. Innerhalb des initialen *screenings* wurden drei Kristallisationsbedingungen identifiziert (Abbildung 24), welche anschließend verfeinert wurden und folgende finalen Bedingungen ergaben:

Ein stabförmiger Kristall mit dreieckiger Grundfläche (Raumgruppe  $P3_1$ , ein *Pfu*-Prim-Molekül pro asymmetrischer Einheit) wurde in *Limbrioplates* im hängenden Tropfen durch Mischung von  $1\mu\text{l}$  Kokrist.-Mix mit  $1\mu\text{l}$  Reservoirolösung (0,1M MOPS, pH=6,6; 200mM Ammoniumsulfat; 10% PEG 8000) und Äquilibrierung gegen  $500\mu\text{l}$  Reservoirolösung erhalten. Der Kristall erschien nach einem Zeitraum von acht Monaten und wuchs zu einer finalen Größe von ca.  $0,15 \times 0,15 \times 0,4\text{mm}^3$ . Zur Datensammlung wurde der Kristall einige Sekunden in Cryopuffer (Reservoirolösung + 30% (v/v) Glycerin) eingelegt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei einer Temperatur von 100K wurde ein kompletter

Datensatz bis zu einer maximalen Auflösung von 2,9 Å aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Programmen des CCP4-Programmpakets, die Struktur wurde durch molekularen Ersatz mit einem *Pfu*-Prim-Monomer mit Hilfe des Programms MOLREP bei einer Auflösung von 3Å gelöst. Beim manuellen Überbauen mit MAIN wurde festgestellt, daß weder einzelsträngige DNA noch GTP gebunden war, weshalb die Verfeinerung (CNS Version 1.1) bei einem freien R-Faktor von 28,8 abgebrochen wurde.



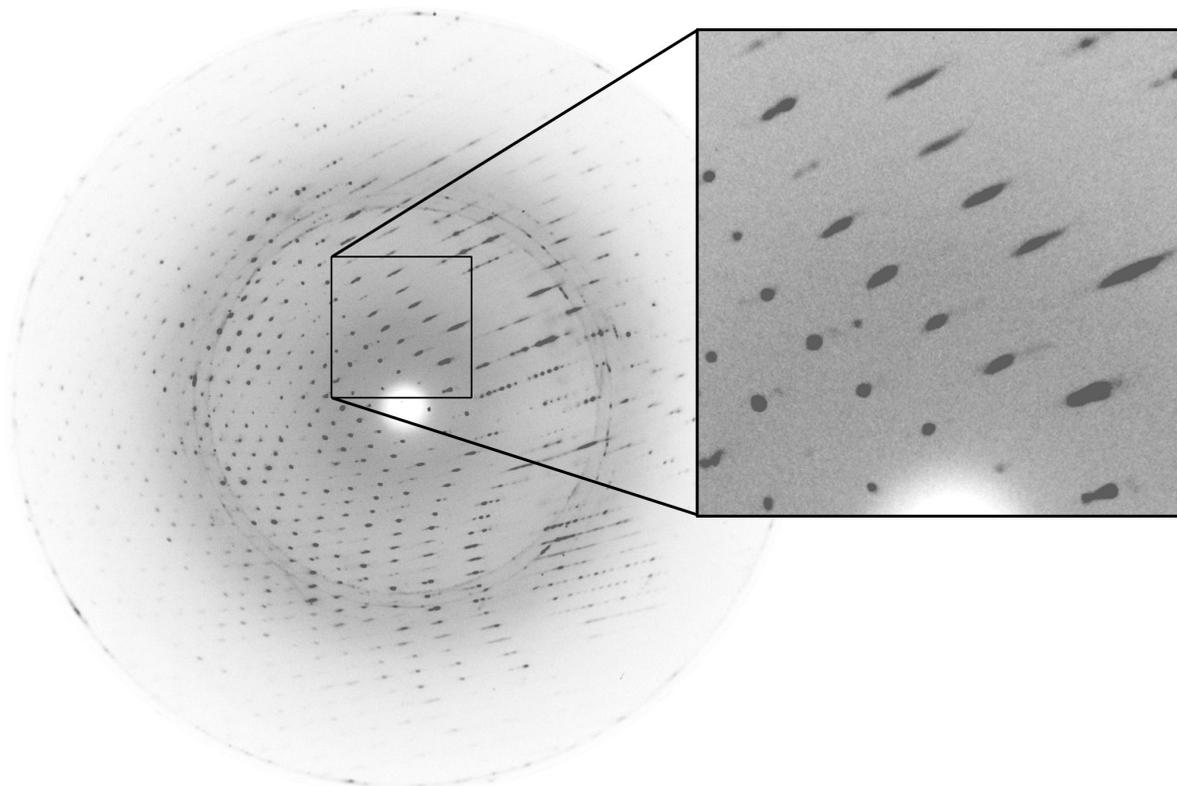
**Abbildung 24: Weitere Kristallformen von *Pfu*-p41**

Die Abbildung zeigt *Pfu*-p41-Kristalle der Raumgruppen  $P2_12_12_1$  (links) und  $P3_1$  (Mitte). Die dritte Kristallform (rechts) ist vermutlich monoklin ( $P2_1$ ).

Kristalle der Raumgruppe  $P2_12_12_1$  mit einem *Pfu*-Prim-Monomer in der asymmetrischen Einheit wurden im sitzenden Tropfen durch Mischung von 1µl Kokrist.-Mix mit 1µl Reservoirlösung (0,1M Phosphat-Citrat, pH=4.2; 40% PEG 300) und Äquilibration gegen 250µl Reservoirlösung erhalten. Die Kristalle bildeten sich innerhalb von zwei Tagen und erreichten eine maximale Größe von ca.  $0,1 \times 0,1 \times 0,1 \text{ mm}^3$ . Zur Messung wurde ein Kristall direkt aus dem Tropfen im Stickstoff-Strom gefroren und bei einer Temperatur von 100K ein kompletter Datensatz bis zu einer maximalen Auflösung von 2,6 Å aufgenommen. Die Auswertung und Strukturlösung erfolgte analog dem  $P3_1$ -Kristall. Auch in dieser Kristallform war keines der beiden Substrate gebunden, die Verfeinerung wurde bei einem freien R-Faktor von 28,7 abgebrochen.

Die dritte Kristallform wurde durch Mischung von 1µl Kokrist.-Mix mit 1µl Reservoirlösung (0,1M MES; pH=6,0; 42% PEG 400) und Äquilibration gegen 500µl Reservoirlösung erhalten. Kristalle bildeten sich innerhalb von vier Tagen und erreichten eine maximale Größe von etwa  $0,3 \times 0,3 \times 0,5 \text{ mm}^3$ . Diffraktionsexperimente zeigten sowohl bei Raumtemperatur als auch bei 100K eine extreme Fehlordnung innerhalb der Kristalle (Abbildung 25). Ein cryo-Datensatz dieser Kristallform konnte in den Raumgruppen  $P1$ ,  $P2$ ,  $C2$  und  $C222$  mit

annähernd gleichen Statistiken prozessiert werden. Der Molekulare Ersatz lieferte für P1 und P2<sub>1</sub> jeweils eine eindeutige Lösung, nicht jedoch für C2 und C222/C222<sub>1</sub> (Daten nicht gezeigt), weshalb diese Kristallform vermutlich primitiv monoklin ist (a=61.9Å b=105.9Å c=62.0Å; gamma=100.25°; zwei *Pfu*-p41-Moleküle in der asymmetrischen Einheit) und eine pseudo-C222-Symmetrie zeigt. Allerdings konnte die Struktur wegen der schlechten Datenqualität nur bis zu einem freien R-Faktor von 35,5% verfeinert werden. Auch hier war kein gebundenes Substrat erkennbar.



**Abbildung 25: Diffraktionsbild der fehlgeordneten Kristallform**

Die Aufnahme wurde bei einer Temperatur von 100K mit einem Drehwinkel von 1° aufgenommen, die Auflösung am Plattenrand entspricht 2,2Å. Ein Bereich mit nicht separierten Reflexen ist rechts vergrößert dargestellt.

Versuche in Zusammenarbeit mit Dr. Reiner Kiefersauer (Max-Planck-Institut für Biochemie, Abt. Strukturforschung), die Fehlordnung in den Kristallen durch kontrollierte Regulation der Feuchtigkeit im Kristall zu verringern, waren nicht erfolgreich.

Eine Übersicht über die Datensammlungs- und Verfeinerungsstatistiken der beiden gut auswertbaren Kristallformen gibt Tabelle 8.

Tabelle 8: Kristallographische Statistiken für *Pfu*-p41 aus Kokristallansätzen

<i>Raumgruppe</i>	P3 <sub>1</sub>		P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	
<b>Zellkonstanten[Å]</b>	a=89,97		a=46,78	
	b=89,97		b=54,76	
	c=47,28		c=128,72	
<b>Datensammlung</b>				
Wellenlänge [Å]	1,5418		1,5418	
maximale Auflösung [Å]	2,9		2,6	
Vollständigkeit <sup>a</sup> [%]	99,9 (100)		97,8 (87,8)	
I/σ <sup>a</sup>	6,5 (2,7)		4,8 (2,3)	
R <sub>sym</sub> <sup>a,b</sup> [%]	8,5 (30,1)		11,4 (33,1)	
<b>Molekularer Ersatz</b>				
Rotationslösungen (RF) 1 und 2				
Signal/sigma	6,39	3,93	11,66	4,05
Translationslösungen 1 und 2 (für jeweilige RF 1)				
Dens/sigma	21,6	3,52	24,61	11,63
R-Faktor [%]	40,6	51,4	45,1	53,2
Korrelation [%]	54,7	26,9	55,6	37,2
<b>Verfeinerungsstatistik</b>				
Definierte Reste	1-336		1-344	
H <sub>2</sub> O	-		169	
R <sub>cryst</sub> (R <sub>free</sub> <sup>c</sup> ) [%]	23,2 (28,8)		21,6 (28,7)	
Rmsd bonds [Å]	0,01		0,006	
Rmsd angles [°]	1,37		1,28	
Rmsd bonded B-factors [Å <sup>2</sup> ] main chain	1,27		1,21	
Rmsd bonded B-factors [Å <sup>2</sup> ] side chain	1,71		1,81	

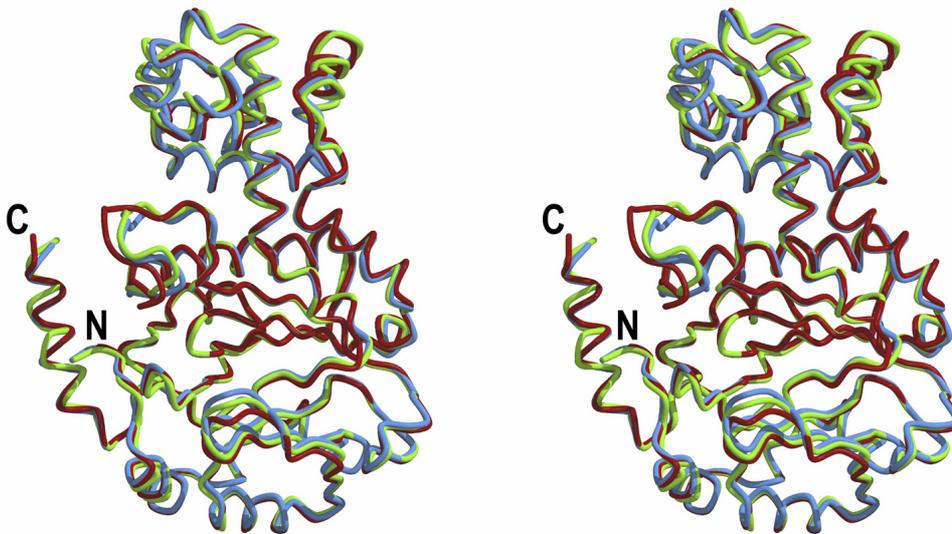
a Zahlen in Klammern geben die entsprechenden Werte für die äußerste Auflösungsschale an (3,13-2,89Å für p3<sub>1</sub>, 2,73-2,59Å für p2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>)

$$b \quad R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle I(hkl)_i \rangle}$$

c der R<sub>free</sub> wurde für 5% (p2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>) bzw. 10% (p3<sub>1</sub>) der Reflexe bestimmt

### 5.2.10.1 Überblick über die Strukturen

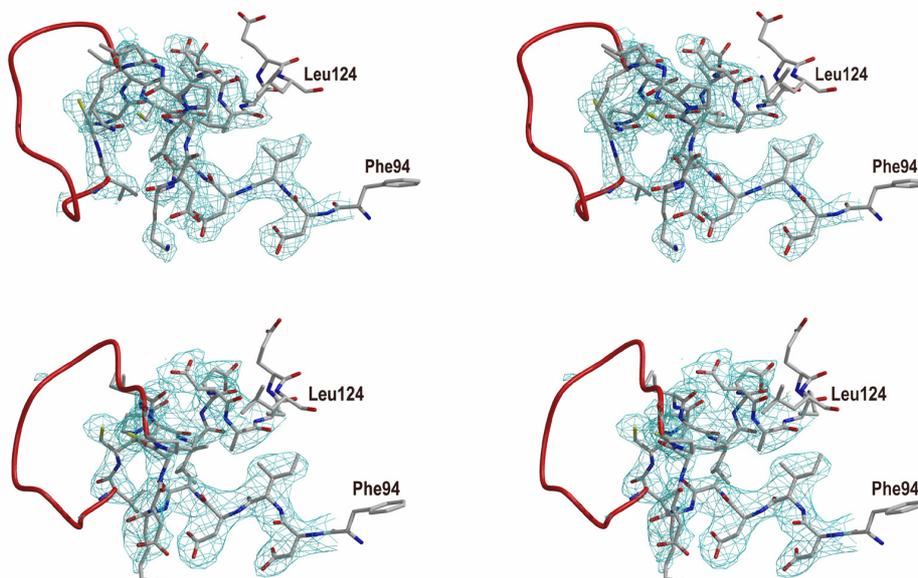
Die beiden alternativen *Pfu*-Prim-Strukturen stimmen mit der original bestimmten Kristallstruktur weitgehend überein, die mittlere Koordinatenabweichung beträgt 0,85Å für 336 verglichene Cα-Atome im Falle von P3<sub>1</sub> und 0,92Å für 344 verglichen Cα-Atome im Falle von P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Überlagerung der drei *Pfu*-p41-Strukturen**

Stereodarstellung der Strukturen von *Pfu*-p41 in den drei Kristallformen P<sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub> (hellgrün), P<sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub> (blau) und P<sub>3</sub><sub>1</sub> (braun). N- und C-Termini sind beschriftet.

Beide neu bestimmten Strukturen von *Pfu*-Prim enthalten jedoch kein Metall-Ion. Die Zinkbindende *loop*-Region ist in beiden Fällen ungeordnet, auch die Helix  $\alpha_4$ , deren N-terminaler Bereich in der Original-Struktur ebenfalls an der Zink-Bindung beteiligt ist, ist in ihrer ersten Windung nicht geordnet (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Die Zink-Bindestelle**

Stereodarstellung der finalen 2Fo-Fc-Elektronendichte um die Zinkbindende Region von *Pfu*-p41 in den Kristallformen P<sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub><sub>2</sub><sub>1</sub> (oben) und P<sub>3</sub><sub>1</sub> (unten) überlagert mit den finalen Atommodellen. Der nicht-definierte Bereich ist jeweils rot eingefärbt.

### 5.3 Strukturbestimmung von *hmtCCase*

#### 5.3.1 Expression, Reinigung und Kristallisation von humaner mitochondrialer tRNA-Nukleotidyltransferase

Humane mitochondriale tRNA-Nukleotidyltransferase (*hmtCCase*) wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert und mittels zweier chromatographischer Schritte (Affinitätschromatographie und Gelpermeationschromatographie) in monomerem Zustand gereinigt. Mit diesem Protokoll konnten aus 800ml Expressionskultur etwa 10mg rekombinantes Protein in für die Kristallisation ausreichender Reinheit dargestellt werden.

Zur Kristallisation wurde *hmtCCase* auf  $6\text{mgml}^{-1}$  konzentriert und im sitzenden Tropfen bei  $20^\circ\text{C}$  gegen  $300\mu\text{l}$  Kristallisationslösung (100mM Natrium-Citrat,  $\text{pH}=5,7$ ; 2,2M Ammoniumsulfat; Tropfenverhältnis von Protein zu Präzipitanzlösung = 3:1) äquilibriert. Kristalle der Raumgruppe  $P3_221$  ( $a=b=102.52\text{\AA}$ ,  $c=206.66\text{\AA}$ ) mit zwei *hmtCCase*-Molekülen in der asymmetrischen Einheit (entsprechend einem Lösungsmittelgehalt 60%) bildeten sich innerhalb von drei bis vier Tagen und erreichten nach drei bis vier Wochen eine maximale Größe von  $0,3 \times 0,3 \times 0,8\text{mm}^3$ .

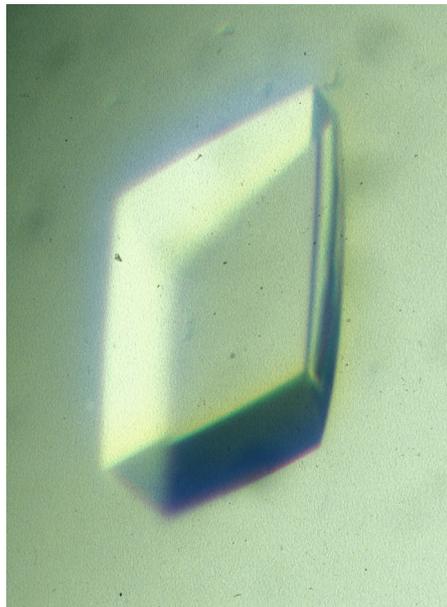


Abbildung 28: Trigonaler Kristall von *hmtCCase*

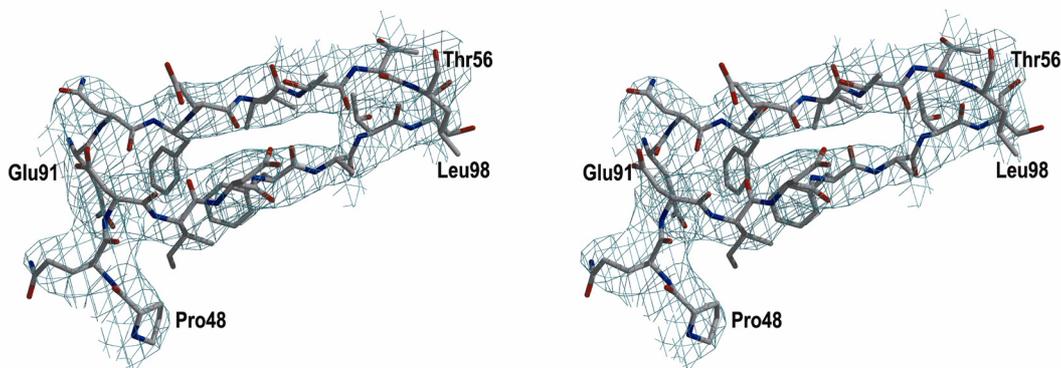
#### 5.3.2 Datensammlung und Strukturlösung

Initiale Diffraktions-Experimente bei Raumtemperatur zeigten, daß die Kristalle durch Strahlungsschäden innerhalb weniger Stunden ihre Streukraft verloren, deshalb erfolgte die Datensammlung bei 100K. Zum Einfrieren wurden die Kristalle einige Sekunden in cryo-Protetans überführt (Kristallisationspuffer + 23% [v/v] Glycerin) und anschließend im

Stickstoffstrom gefroren. Die maximale Auflösung der Kristalle konnte durch eine *in-vitro-annealing*-Prozedur ausgehend von ca. 6Å bis zu einer finalen Auflösung von 3,4Å verbessert werden. Dazu wurden die gefrorenen Kristalle zwei- bis dreimal wieder aufgetaut, jeweils weitere 20 Sekunden in cryo-Protokoll eingelegt und im Stickstoffstrom gefroren.

Obwohl sowohl die Kristallisation als auch diese *annealing*-Prozedur in allen getesteten Fällen qualitativ reproduziert werden konnte, war die Streukraft der Kristalle aus unterschiedlichen Reinigungen sehr variabel, im allgemeinen lag die maximal erreichte Auflösung zwischen 5-6 Å.

Ein Quecksilber-substituierter Kristall wurde durch Zugabe von 0,5mM Thimerosal in den Kristallisationsansatz präpariert, wobei die Inkubationszeit 45min betrug. Die *annealing*-Prozedur wurde analog dem nativen Kristall durchgeführt und es konnte ein Datensatz mit einer maximalen Auflösung von 3,7Å aufgenommen werden. Mit Hilfe des Programms SOLVE wurden zwei Quecksilber-Positionen in dem Hg-substituierten Kristall identifiziert und mit SHARP verfeinert. Nach Dichtemodifikation mit SOLOMON konnte mit Hilfe des Programms MAIN manuell ein Poly-Alanin-Modell mit je ca. 300 Aminosäuren pro Molekül gebaut werden.



**Abbildung 29: experimentelle Elektronendichte nach Dichte-Modifikation**

Stereo-Abbildung der SIR-Elektronendichte von *hmtCCase* nach Dichte-Modifikation mit SOLOMON überlagert mit dem finalen Atommodell.

Die Qualität der Elektronendichte wurde weiter durch zweifache Mittelung (MAIN) und Phasenexpansion bis 3,4Å (CCP4-Programme) verbessert, wodurch in Kombination mit der homologen Struktur von DNA-Polymerase beta die Zuordnung von Aminosäure-Seitenketten möglich wurde. Das initiale Modell wurde in mehreren Zyklen aus Verfeinerung (CNS Version 1.1 und REFMAC Version 5) und manuellem Überbauen (MAIN) erweitert und verbessert und konnte bis zu einem freien R-Faktor von 31,8 verfeinert werden.

Einen Überblick über die Datensammlungs-, Phasierungs- und Verfeinerungsstatistiken gibt Tabelle 8.

**Tabelle 8: Kristallographische Statistiken für hmtCCase**

<i>Datensammlung</i>	<i>Nativ</i>	<i>Thiomersal</i>
Wellenlänge [Å]	1,5418	1,5418
maximale Auflösung [Å]	3,4	3,7
Vollständigkeit <sup>a</sup> [%]	99,1 (100)	97,9 (87,5)
$I/\sigma^a$	10,0 (2,7)	5,2 (2,3)
$R_{\text{sym}}^{a,b}$ [%]	6,9 (27,3)	11,5 (32,8)
<b><i>Phasierung</i></b>		
Figure of merit (30-3,7Å)	0,26	
Phasing power (30-3,7Å)		
Zentrische Reflexe	0,87	
Azentrische Reflexe	1,14	
Cullis R-Faktor (30-3,7Å)		
Zentrische Reflexe	0,74	
Azentrische Reflexe	0,81	
<b><i>Verfeinerungsstatistik</i></b>		
$R_{\text{cryst}} (R_{\text{free}}^c)$ [%]	27,7 (31,8)	
Rmsd bonds [Å]	0,011	
Rmsd angles [°]	1,65	
overall B-factor [Å <sup>2</sup> ]	30,8	

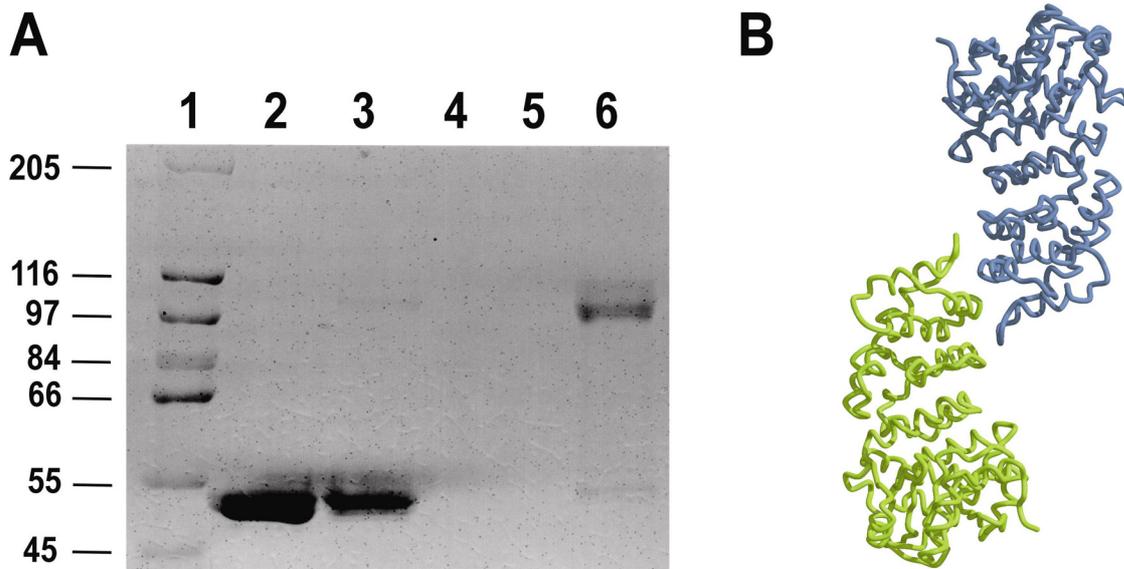
a Zahlen in Klammern geben die entsprechenden Werte für die äußerste Auflösungsschale an (3,63-3,39Å für den nativen Datensatz, 3,92-3,72Å für den Quecksilbersubstituierten Datensatz)

$$b \quad R_{\text{sym}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle I(hkl)_i \rangle}$$

c der  $R_{\text{free}}$  wurde für 10% der Reflexe bestimmt

### 5.3.3 Überblick über die Struktur

Das finale Modell von *hmtCCase* enthält in beiden Molekülen die letzten beiden Aminosäuren des His-tags sowie mit Ausnahme der nicht geordneten Reste 99-110 die Aminosäuren 1-354 der klonierten humanen tRNA-Nukleotidyltransferase. Die beiden kristallographisch unabhängigen Moleküle in der asymmetrischen Einheit sind miteinander über ihre Cystein-Reste an Position 344 durch eine intermolekulare Disulfid-Brücke miteinander verknüpft und durch eine Drehung von nahezu 180° ineinander überführbar.

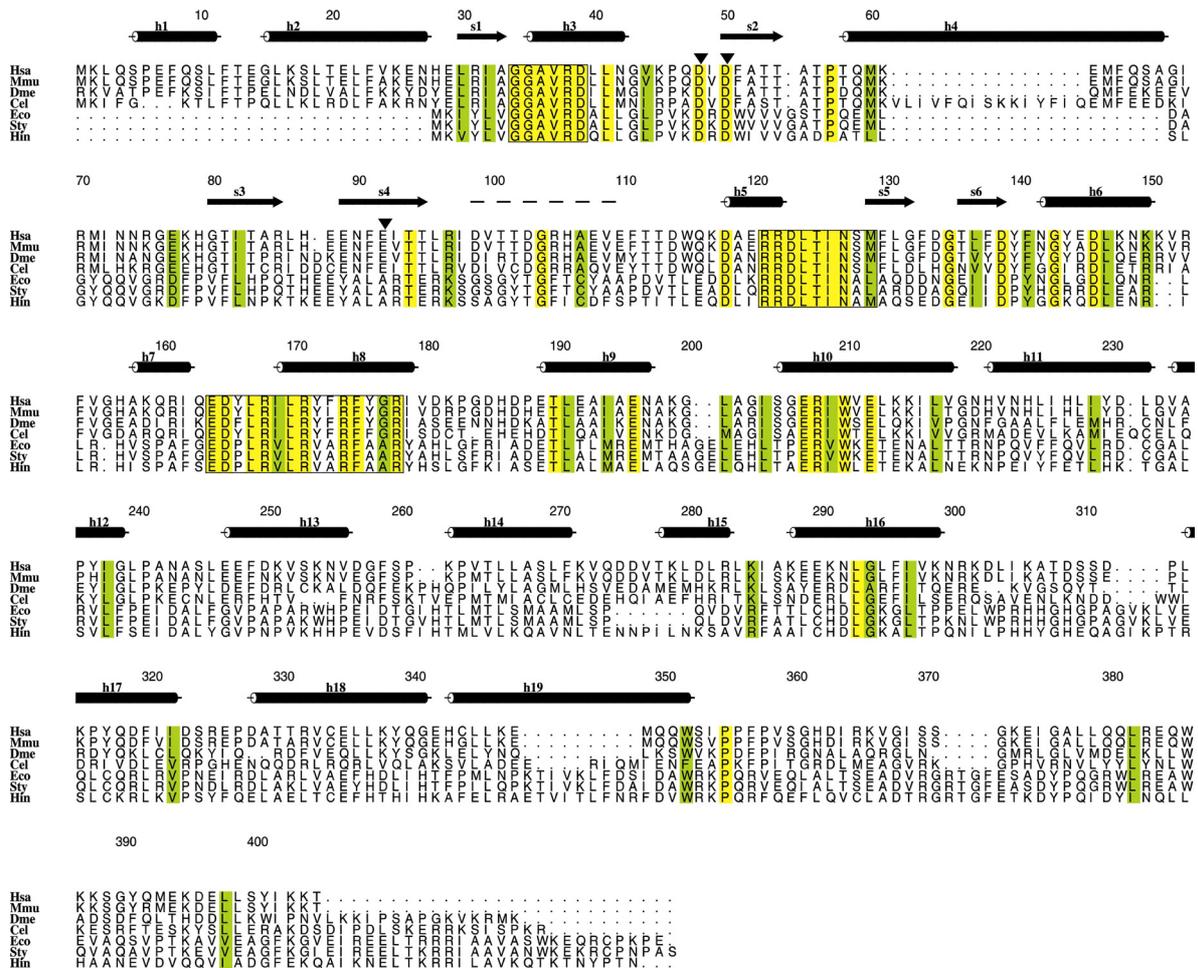


**Abbildung 30: Dimerisierung von *hmtCCase***

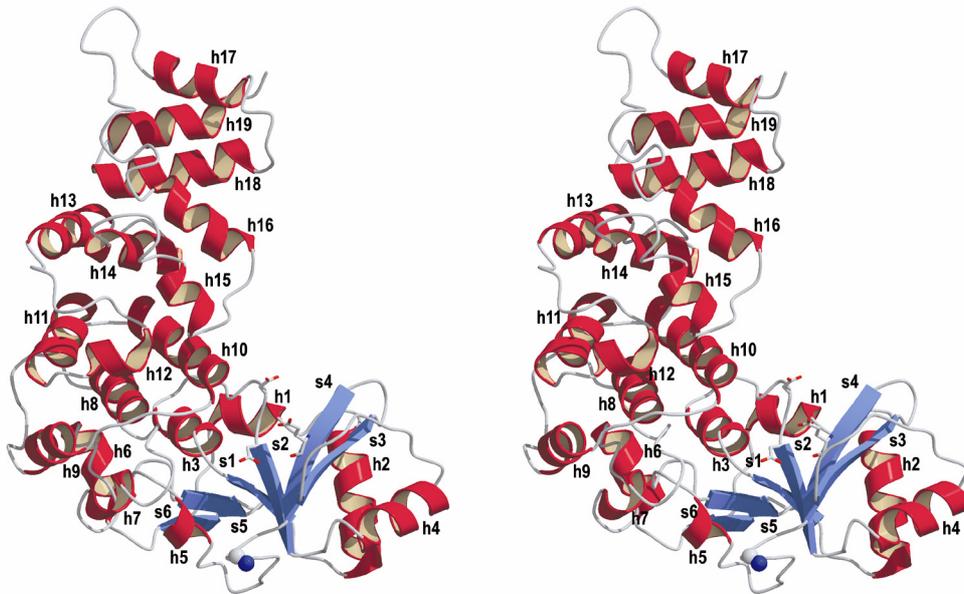
A: Elektrophoretische Analyse (SDS-PAGE) von *hmtCCase*: (1) Protein-Standard (die Molekularmasse der einzelnen Banden in kDa ist links angegeben); (2) gereinigte *hmtCCase*; (3) Kristalle von *hmtCCase* aufgetrennt unter reduzierenden Bedingungen; (4, 5) leere Spuren; (6) Kristalle von *hmtCCase* aufgetrennt unter nicht-reduzierenden Bedingungen

B: Anordnung der beiden NCS-verwandten *hmtCCase*-Moleküle mit Blickrichtung entlang der nicht-kristallographischen zweizähligen Achse

Wie aus dem Aminosäuresequenz-Vergleich in Abbildung 31 ersichtlich ist, sind mit Ausnahme von Pro355 alle innerhalb der verglichenen Proteine invarianten Aminosäuren in der Struktur definiert. Dieser definierte Bereich der humanen mitochondrialen tRNA-Nukleotidyltransferase hat eine hakenähnliche Form (Abbildung 32) und ist in drei Domänen unterteilt, von denen die ersten beiden eine quer über das gesamte Molekül laufende tiefe Furche begrenzen. Die N-terminale Domäne (im Folgenden *active site*-Domäne genannt) wird von den Aminosäuren 1-140 gebildet und besteht aus einem von fünf alpha-helices (h1-h5) flankierten gemischten sechssträngigen beta-Faltblatt (s1-s6). Innerhalb dieser Domäne liegt genau in der Verlängerung der Furche ein nicht definierter Bereich von etwa 11 Aminosäuren (siehe Abbildung 31).



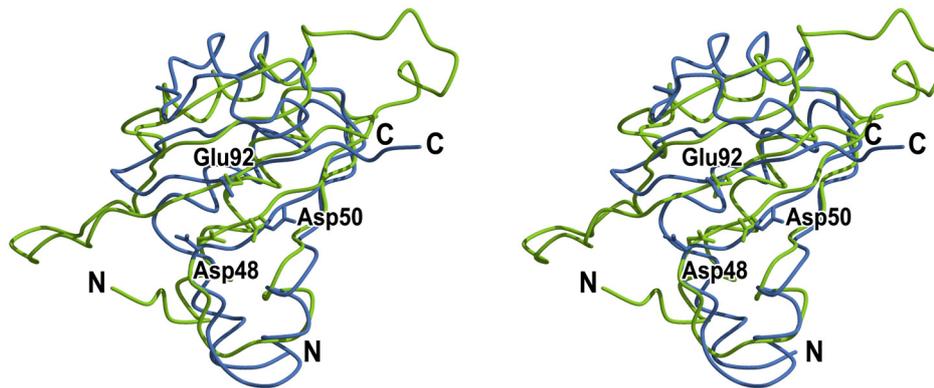
**Abbildung 31: Aminosäuresequenz-Vergleich von eukaryontischen und bakteriellen CCAsen**  
 Aminosäuresequenz-Vergleich der CCA-adding enzymes von *Homo sapiens* (Hsa), *Mus musculus* (Mmu), *Drosophila melanogaster* (Dme), *Caenorhabditis elegans* (Cel), *Escherichia coli* (Eco), *Salmonella typhimurium* (Sty) und *Haemophilus influenzae* (Hin) mit Sekundärstrukturelementen von *hmt*CCase analog Abbildung 32 über dem Sequenzvergleich. Der fehlgeordnete loop ist durch eine gestrichelte Linie markiert, die Nummerierung entspricht der Sequenz von *hmt*CCase ohne die mitochondriale Lokalisationssequenz. Invariante Aminosäuren sind gelb hinterlegt, konservierte Aminosäuren grün. Die drei Aminosäuren der katalytischen Triade sind durch schwarze Dreiecke markiert.



**Abbildung 32: Struktur von hmtCCase**

Stereo-Ribbondarstellung des definierten Bereichs von hmtCCase mit beschrifteten Sekundärstrukturelementen. Die C- bzw. N-Atome der Aminosäuren Ile98 und Phe111, welche den fehlgeordneten *loop* begrenzen, sind als CPK-Modell (grau bzw. blau), die Seitenketten der drei Aminosäuren der katalytischen Triade als Stick-Modell dargestellt.

Die *active site*-Domäne zeigt eine deutlich erkennbare strukturelle Homologie zu den katalytischen Domänen anderer Proteine aus der Familie der Kanamycin-Nukleotidyltransferasen und enthält zwei durch Mutagenesestudien und kristallographische Untersuchungen an verschiedenen anderen Proteinen dieser Klasse bekannte Reste des Aktivzentrums (Asp48 und Asp50, Holm and Sander, 1995). Diese beiden sauren Aminosäuren liegen am Beginn von beta-Strang s2 und ihre Seitenketten zeigen zur zweiten Domäne, die im weiteren intermediäre Domäne genannt wird. In unmittelbarer struktureller Nachbarschaft der beiden Aspartat-Reste befindet sich eine dritte saure Aminosäure (Glu95). Glu95 ist innerhalb der eukaryontischen CCasen hochkonserviert, nicht jedoch in den bakteriellen. Seine dreidimensionale Lage entspricht den Positionen des jeweiligen dritten Restes im katalytischen Zentrum von anderen Mitgliedern der Kanamycin-Nukleotidyltransferase Superfamilie (Abbildung 33).



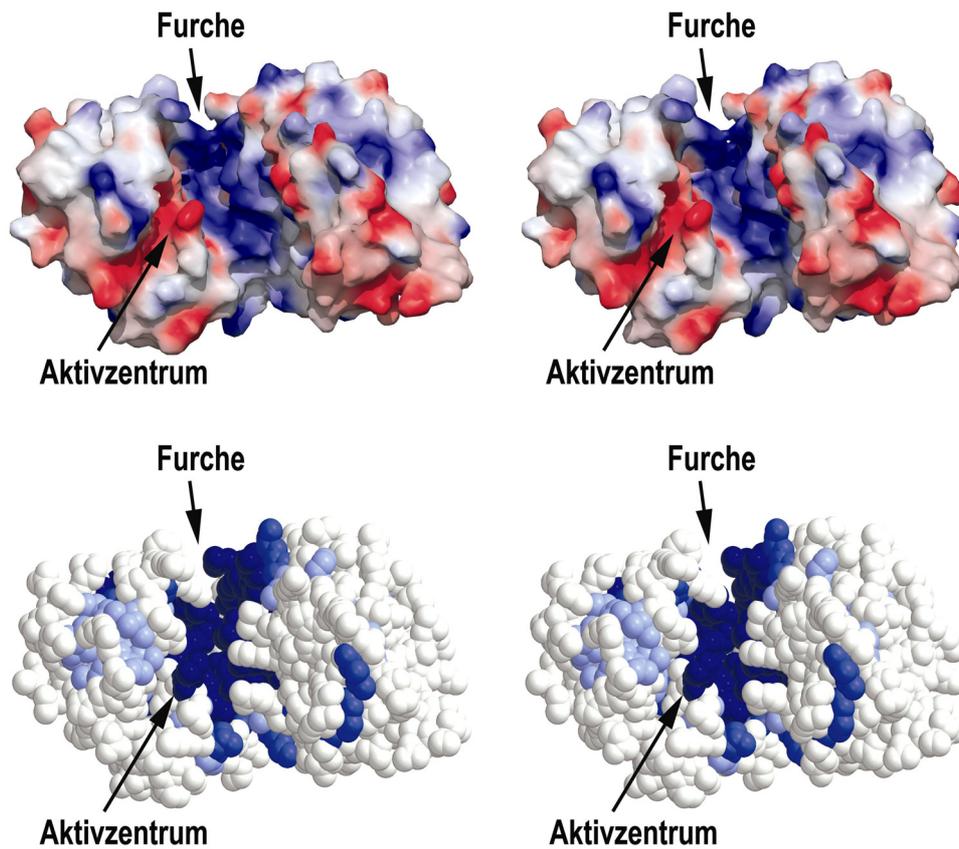
**Abbildung 33: Überlagerung mit DNA-Polymerase beta**

Stereo-Darstellung der homologen Bereiche von *hmtCCase* (blau) und humaner DNA-Polymerase beta (grün) nach Überlagerung mit TOP3D. Beide N- bzw. C-Termini und die Reste der katalytischen Triade von *hmtCCase* sind beschriftet.

Die zweite Domäne der *hmtCCase* ist ausschließlich alpha-helikal (h6-h12). Sie enthält das NTP-Bindemotiv und bildet eine rechtsgängige Superhelix aus, die von der C-terminalen Domäne (h13-h19) entlang der längsten Molekülachse verlängert wird. In der Protein Datenbank (PDB) finden sich für diese beiden Domänen jeweils mehrere strukturell homologe Proteine, allerdings ist keines dieser Proteine als DNA- oder RNA-bindend klassifiziert.

#### 5.3.4 Ladungsverteilung und konservierte Aminosäuren an der Oberfläche von *hmtCCase*

Eine Analyse des elektrostatischen Potentials an der Oberfläche von *hmtCCase* zeigt, daß die oben beschriebene Furche als einziger Bereich des Moleküls nahezu komplett positiv geladen ist (Abbildung 31 oben). Aminosäuren an der Proteinoberfläche, die innerhalb der tRNA-Nukleotidyltransferasen der Klasse II konserviert sind (Abbildung 34 unten), sind nahezu ausschließlich auf diesen positiv geladenen Bereich beschränkt.



**Abbildung 34: Oberflächenstruktur von *hmtCCase***

Stereo-Darstellung der Ladungsverteilung (oben) und Lage konservierter Aminosäuren (unten) auf der Oberfläche von *hmtCCase*. Positiv und negativ geladene Bereiche auf der *hmtCCase*-Oberfläche sind blau bzw. rot eingefärbt. Konservierte Aminosäuren sind von dunkelblau (invariant) über blau (hochkonserviert) nach hellblau (mäßig konserviert) eingefärbt. Die Lage des aktiven Zentrums und der Furche zwischen den ersten beiden Domänen von *hmtCCase* sind bezeichnet.

## 6 Diskussion

### 6.1 PCNA aus *Pyrococcus furiosus*

Das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) wird wegen seiner Interaktion mit zahlreichen an unterschiedlichsten zellulären Prozessen beteiligten Proteinen als eine der zentralen Komponenten der Replikationsmaschinerie angesehen (Jonsson and Hübscher, 1997; Kelman, 1997; Kelman and Hurwitz, 1998; Tsurimoto, 1998). Kristallstrukturen der *sliding clamps* von *E. coli* (*Eco*-beta), Bäckerhefe (*Sce*-PCNA) und Mensch (*Hsa*-PCNA) (Kong et al., 1992; Krishna et al., 1994; Gulbis et al., 1996) waren zu Beginn diese Arbeit bereits bekannt, auch das archaeale PCNA war bereits identifiziert und biochemisch charakterisiert worden (Cann et al., 1999; De Felice et al., 1999). Dabei wurde gezeigt, daß das PCNA aus Archaea dazu in der Lage ist, die DNA-Syntheserate sowohl der „klassischen“ archaealen B-Typ DNA-Polymerase (pol I) als auch der kurz vorher identifizierten Klasse II-DNA-Polymerase (pol II; Ishino et al., 1998) zu erhöhen (Cann et al., 1999).

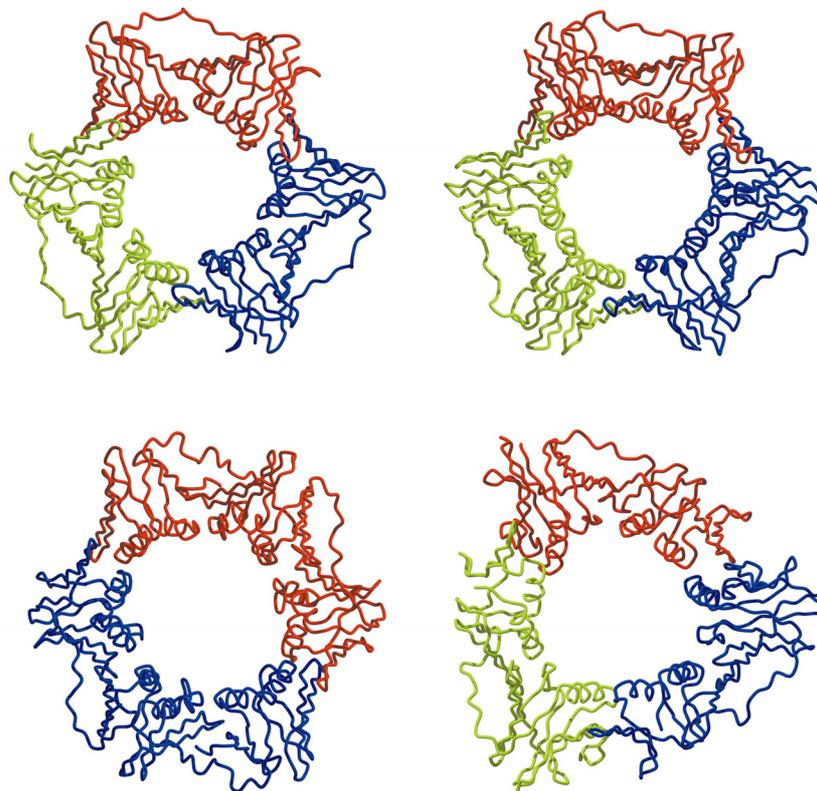
#### 6.1.1 Klonierung, Expression und Reinigung

Das Gen für PCNA aus *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*-PCNA) wurde ausgehend von genomischer DNA in einen bakteriellen Expressionsvektor kloniert, in *E. coli* exprimiert und gereinigt. Dabei wurde festgestellt, daß während der Expression zusätzlich zu dem Volllängen-Protein (Molekularmasse ca. 27kDa) ein verkürztes PCNA-Produkt mit einer Molekularmasse von etwa 20kDa gebildet wurde, welches einem internen *in-frame*-Translationsstart ab Met73 entsprach. Dieses verkürzte Gen-Produkt interagiert mit dem Volllängen-Protein (nicht gezeigt), was während der abschließenden Gelfiltration eine nicht-trennbare Mischung aus unterschiedlichen Protein-Komplexen zur Folge hatte. Dies machte eine Reinigung von *Pfu*-PCNA in seiner monomeren Form nötig, was durch Gelfiltration in einem Puffer mit 2M NaCl erreicht wurde.

#### 6.1.2 Strukturanalyse

Die Struktur von *Pfu*-PCNA wurde durch molekularen Ersatz mit der bekannten Struktur des *Sce*-PCNA (Krishna et al., 1994) als Suchmodell gelöst und bis zu einer Auflösung von 2,5Å verfeinert. Während der Verfeinerung wurde eine bis 2,1Å aufgelöste *Pfu*-PCNA-Struktur

veröffentlicht (Matsumiya et al., 2001). Die Raumgruppe und die Zellkonstanten waren trotz unterschiedlicher Kristallisationsbedingungen identisch, die gesamte Struktur ist nahezu identisch zu der hier beschriebenen. Wie vermutet (Cann et al., 1999), stimmen die Strukturen der archaealen und eukaryontischen PCNA-Monomere weitgehend überein, Abweichungen beschränken sich auf den C-Terminus sowie auf *loop*-Regionen zwischen den Strängen s8-s9 und s13-s14 (Abbildungen 11, 12), welche in *Pfu*-PCNA (249 Aminosäuren) im Vergleich zu den Eukaryontischen PCNAs (258 für *Sce*-PCNA und 261 Aminosäuren für *Hsa*-PCNA) verkürzt sind. *Pfu*-PCNA bildet im Kristall über eine durch die kristallographische sechszählige Schraubenachse erzeugte dreizählige Achse ein ringförmiges Trimer, welches vermutlich der physiologischen Situation entspricht. Dieses ringförmige *assembly* war bereits für das eukaryontische PCNA sowie die funktionell homologe beta-Untereinheit der bakteriellen DNA-Polymerase III bekannt und konnte kürzlich auch für die Prozessivitätsfaktoren der Bakteriophagen T4 und RB69 (Shamoo and Steitz, 1999; Moarefi et al., 2000) nachgewiesen werden.



**Abbildung 35: Strukturen von *sliding clamps***

Die Abbildung zeigt Kristallstrukturen der funktionellen Einheiten der *sliding clamps* aus Archaea (oben links, *Pyrococcus furiosus*, diese Arbeit und Matsumiya et al., 2001), Eukaryonten (oben rechts, *Saccharomyces cerevisiae*, Krishna et al, 1994), Bakterien (*Escherichia coli*, Kong et al, 1992) und Bakteriophagen (RB69, Shamoo and Steitz, 1999) in strukturell homologer Orientierung. Die einzelnen Monomere sind unterschiedlich eingefärbt.

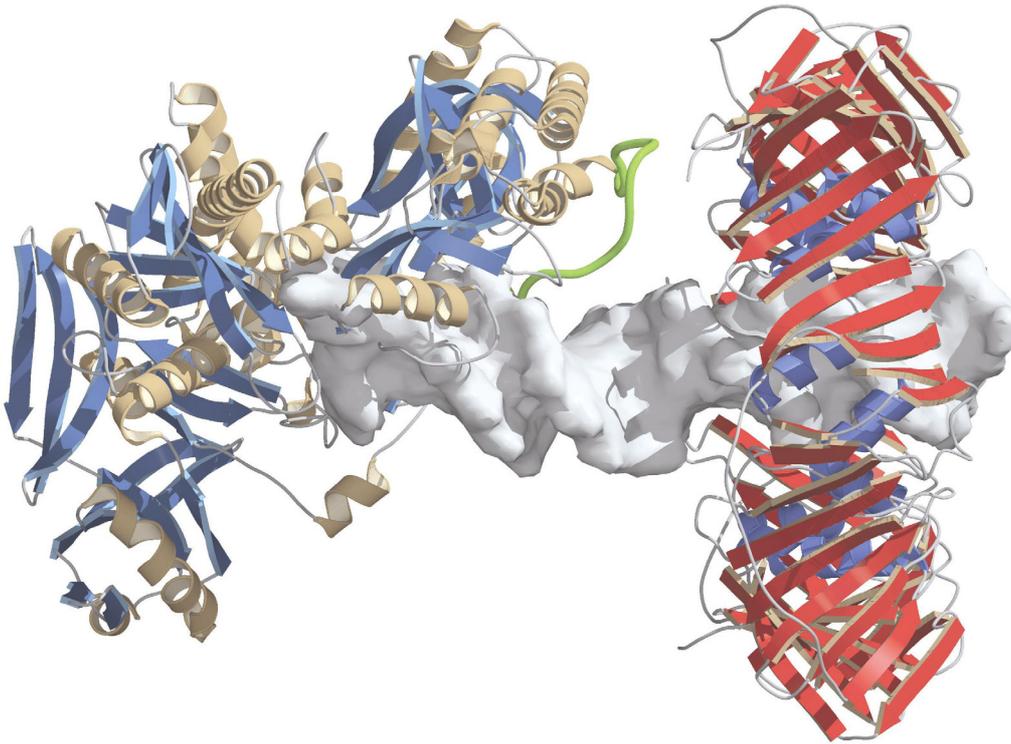
---

### 6.1.3 Thermostabilität von *Pfu*-PCNA

*Pyrococcus furiosus* ist ein hyperthermophiles Archaeum mit einer optimalen Wachstumstemperatur von 100°C (Fiala and Stetter, 1986). Es gibt einige mögliche Erklärungen für die extreme Thermostabilität von Proteinen aus hyperthermophilen Organismen (Vogt and Argos, 1997; Jaenicke and Böhm, 1998), und ein Vergleich von thermostabilem *Pfu*-PCNA und den strukturell homologen *sliding clamps* aus Mensch und Hefe zeigt, daß *Pfu*-PCNA einige der postulierten Eigenschaften thermostabiler Proteine besitzt: wie oben beschrieben, sind zwei *loop*-Regionen in *Pfu*-PCNA im Vergleich zu eukaryontischem PCNA verkürzt, eine Beobachtung, die auch in der Citrat-Synthase von *Pyrococcus furiosus* gemacht wurde (Russell et al., 1997). Dazu enthält *Pfu*-PCNA etwa 5% mehr geladene Aminosäuren (DEKRH) und ca. 5%-10% weniger polare/ungeladene (GTSQNCY), was einem in thermostabilen Proteinen beobachteten Trend entspricht (Deckert et al., 1998). Auch die Anzahl an Ionenpaaren, die als einer der Hauptgründe für Thermostabilität angesehen wird, ist innerhalb eines *Pfu*-PCNA Monomers mit 29 im Vergleich zu 9 (Hefe-PCNA) und 13 (humanes PCNA) deutlich erhöht.

### 6.1.4 Interaktion mit archaealer DNA-Polymerase I

Es wurde gezeigt, daß *Pfu*-PCNA in der Lage ist, die Aktivität beider bisher in Archaea charakterisierten DNA-Polymerasen zu stimulieren (De Felice et al., 1999; Cann et al., 1999; Kelman and Hurwitz, 2000). Die mittlerweile bekannten Kristallstrukturen der archaealen DNA-Polymerase I aus verschiedenen Organismen (Hopfner et al., 1999; Zhao et al., 1999; Rodriguez et al., 2000; Hashimoto et al., 2001) zeigen deutliche strukturelle Homologie zur DNA-Polymerase des Bakteriophagen RB69 (Wang et al., 1997). Aus der Struktur eines Fragments der RB69-Polymerase im Komplex mit ihrer *sliding clamp* (Shamoo and Steitz, 1999) kann durch Überlagerung der einzelnen Komponenten ein Interaktions-Modell von *Pfu*-PCNA und DNA-Polymerase I erstellt werden (Abbildung 36).



**Abbildung 36: Modell eines replikativen PCNA-Polymerase-Komplexes**

Die Abbildung zeigt ein theoretische Modell eines Komplexes aus *Thermococcus gorgonarius* DNA-Polymerase I (Hopfner et al., 1999) in ihrer replikativen Konformation mit *Pfu*-PCNA und doppelsträngiger DNA.

Die Interaktion zwischen PCNA und der DNA-Polymerase ist in diesem Modell nicht offensichtlich, sie scheint lediglich über den in der Polymerase-Struktur schlecht definierten C-terminalen Bereich (Dr. K.-P. Hopfner, persönliche Mitteilung) der Polymerase zu erfolgen. Die Richtung der DNA-Synthese in Abbildung 36 verläuft von rechts nach links.

---

## 6.2 Die katalytische Untereinheit der DNA-Primase aus *Pyrococcus furiosus*

### 6.2.1 Identifikation, Nachweis enzymatischer Aktivität und Strukturlösung

Die DNA-Replikation ist ein fundamentaler Prozess in allen Organismen, durch den die genetische Information eines Lebewesens an nachfolgende Generationen weitergegeben wird. Die Verdopplung von DNA wird in der Zelle von DNA-Polymerasen durchgeführt, allerdings sind diese Enzyme meist nicht in der Lage, DNA *de novo* zu synthetisieren. Auch bei den wenigen DNA-Polymerasen, bei welchen *in vitro* die Fähigkeit zur *de novo*-Synthese von DNA nachgewiesen werden konnte, ist eine physiologische Bedeutung dieser Aktivität bisher unklar. Stattdessen verläuft die Initiation der Replikation über einen RNA-*primer*, der von der sogenannten DNA-Primase synthetisiert wird. Die an der Replikation beteiligten eukaryontischen und bakteriellen Faktoren waren zu Beginn dieser Arbeit weitgehend identifiziert und biochemisch charakterisiert. Bei Archaea dagegen war noch kein Protein mit Primase-Aktivität bekannt, allerdings hatte die Analyse der bis dahin sequenzierten Archaeen-Genome gezeigt, daß die an der DNA-Replikation beteiligten Proteine vermutlich den eukaryontischen Faktoren ähneln würden (Edgell and Doolittle, 1997; Ishino and Cann, 1998). Die DNA-Primase ist in Eukaryonten in einem funktionellen Komplex aus vier verschiedenen Untereinheiten mit DNA-Polymerase  $\alpha$  assembliert (Polymerase  $\alpha$ /Primase-Komplex), wobei die kleinste Komponente dieses Komplexes (p48) die Primase-Aktivität trägt.

Innerhalb der p48-Untereinheit waren einige hochkonservierte Bereiche bekannt, darunter ein Motiv mit drei invarianten sauren Aminosäuren, die bei Mutation zu Alanin in der Maus-Primase (Copeland und Tan, 1995) einen völligen Aktivitätsverlust zur Folge hatten (EKELVFDID, die invarianten sauren Reste sind fett gedruckt). Mit dieser Sequenz wurden innerhalb des Genoms von *Pyrococcus furiosus* mehrere *open reading frames* (*orf*) identifiziert, welche auf das Vorkommen weiterer in p48 konservierten Bereiche untersucht wurden. Einer dieser *orfs* beinhaltete eine Variation der vermuteten Nukleotid-Bindestelle (in Eukaryonten SGRRGXH, wobei X eine variable Aminosäure bezeichnet) und wurde als potentielle katalytische Primase-Untereinheit identifiziert. Ein mit dem gereinigten Protein durchgeführter qualitativer Primase-Aktivitätstest zeigte Primase-Aktivität von *Pfu*-p41 (vergleiche Abbildung 14), wodurch dieses Protein als die katalytische Untereinheit der archaealen DNA-Primase identifiziert war. Während der Kristallisationsexperimente wurde

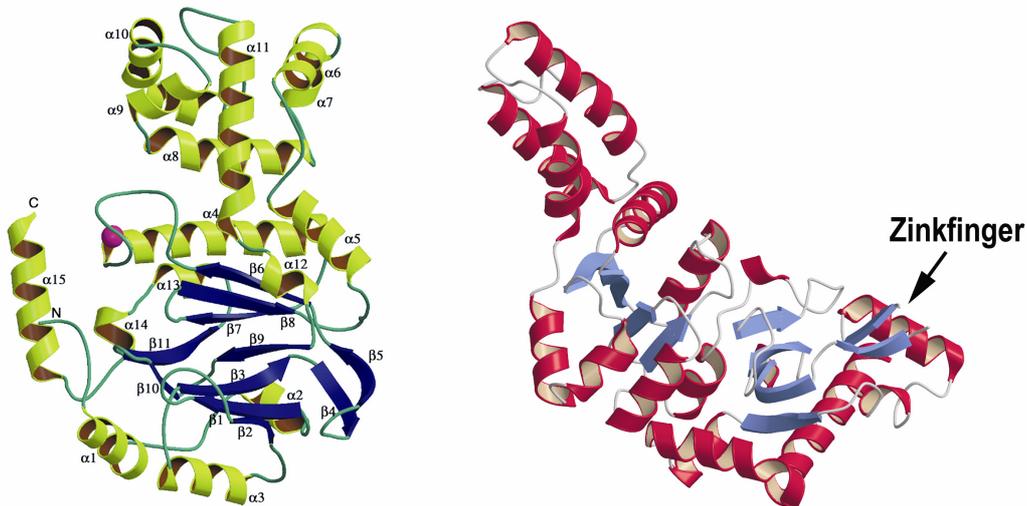
dann von Pisani und ihren Mitarbeitern die Identifikation und biochemische Charakterisierung der katalytischen Untereinheit DNA-Primase aus *Methanococcus jannaschii* (*Mja*) veröffentlicht (Desogus et al., 1999). Aminosäuresequenz-Vergleiche von Primasen des prim-Typs (siehe Abbildung 18) zeigen zwei innerhalb der Familie relativ konservierte Bereiche in den N- und C-Termini, dagegen ist die intermediäre Region sowohl innerhalb der archaealen als auch verglichen mit den eukaryontischen Enzymen hochvariabel.

Die Strukturlösung von *Pfu*-p41 erfolgte mit Hilfe der *multiwavelength anomalous dispersion* (MAD). Vorhergehende kristallographische Experimente hatten gezeigt, daß p41-Kristalle nach dem Einfrieren nicht mehr isomorph waren, weshalb eine Strukturlösung durch *multiple isomorphous replacement* nicht möglich war. Bei der Datensammlung am Deutschen Elektronensynchrotron wurde in den p41-Kristallen Zink-Absorption festgestellt, obwohl sämtliche Reinigungsschritte sowie auch die Kristallisation ohne Zugabe von Zink erfolgt waren. Das Vorkommen von Zink war bereits in DnaG-Typ Primasen von Bakterien und Bakteriophagen festgestellt worden und wurde auch in prim-Typ Primasen postuliert, allerdings konnte alleine aus der Aminosäuresequenz in der Primase von *Mja* (Desogus et al., 1999) kein Zink-Bindemotiv eindeutig identifiziert werden. Von der Gruppe um Ishino wurde inzwischen eine eingehendere biochemische Charakterisierung der archaealen Primase veröffentlicht (Bocquier et al., 2001; Liu et al., 2001). Dabei konnte erstens gezeigt werden, daß die hier beschriebene katalytische Untereinheit eine akkessorische Untereinheit mit bisher unbekannter Funktion bindet (p46). Zum zweiten zeigt die p41-Untereinheit alleine *in vitro* eine eindeutige DNA-Polymerase-Aktivität, sie scheint in der Tat sogar dNTPs als Substrate zu bevorzugen. Diese Aktivität ist einerseits nicht überraschend, da auch andere Primasen zum Einbau von dNTPs in der Lage sind (Rowen and Kornberg, 1978; Conaway and Lehman, 1982; Gronostajski et al., 1984), andererseits deuten erste Befunde darauf hin, daß trotzdem das erste inkorporierte Triphosphat ein NTP – vermutlich ein ATP – sein muß. Eine physiologische Bedeutung dieser DNA-Polymerase-Aktivität ist bisher noch nicht gezeigt, es wird jedoch vermutet, daß in Archaea möglicherweise dadurch eine Kopplung von Primase- und DNA-Polymerase  $\alpha$ -Aktivität erzeugt wird, was erklären könnte, warum in den sequenzierten Archaea kein DNA-Polymerase  $\alpha$ -Homologes gefunden wurde.

### 6.2.2 Strukturelle Unterschiede bekannter Primasen

Die Struktur der katalytischen Untereinheit der DNA-Primase aus *Pyrococcus furiosus* zeigt keinerlei Ähnlichkeit zu bekannten Strukturen und definiert eine neue Familie in der SCOP-

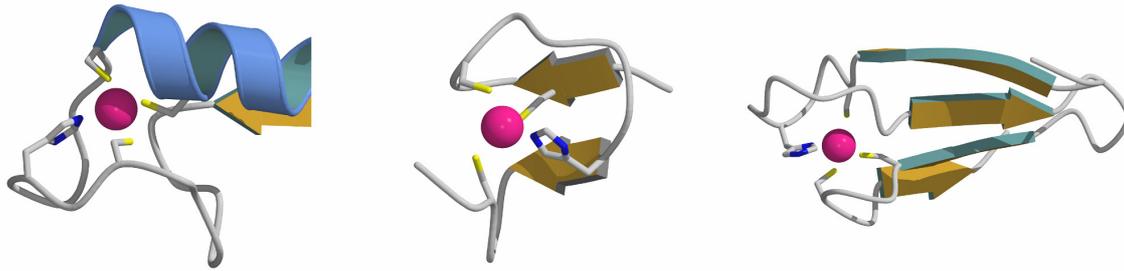
Datenbank. Auch zur katalytischen Domäne der DNA-Primase aus *E. coli* (Keck et al., 2000; Podobnik et al., 2000) ist keine strukturelle Homologie vorhanden (siehe Abbildung 37), und zwar weder in Hinsicht auf Anzahl noch auf die relative Anordnung einzelner Domänen. Dies entspricht den Ergebnissen von Leipe et al. (Leipe et al., 1999), welche keine Verwandtschaft zwischen eukaryontischen und bakteriellen DNA-Primasen entdecken konnten.



**Abbildung 37: Strukturvergleich bekannter Primasen**

Ribbondarstellung von *Pfu*-p41 (links) und der katalytischen Domäne der DNA-Primase aus *E. coli* (rechts, Keck et al., 2000). Die ungefähre Position der in der Kristallstruktur fehlenden Zinkfinger-Domäne von *E. coli* Primase ist gekennzeichnet.

Beiden strukturell charakterisierten Primase-Typen gemeinsam ist dagegen das Vorkommen einer Zink-bindenden Region. Diese entspricht innerhalb der DnaG-Familie einem klassischen Zinkfinger, wie am Beispiel des Zinkfingers der DNA-Primase aus *Bacillus stearothermophilus* (Pan and Wigley, 2000) ersichtlich wird und ist an der Bindung einzelsträngiger DNA beteiligt (Kusakabe et al., 1996). Die Zink-bindende Region in *Pfu*-p41 dagegen ähnelt aufgrund ihrer Länge von nur 12 Aminosäuren (gerechnet vom ersten an der Zink-Koordination beteiligten Cystein), verglichen mit etwa 30-40 bei Zinkfingern, dem sogenannten Zinkknöchel, welcher erstmals bei einer NMR-Struktur eines Teils des *gag*-Proteins aus HIV beschrieben wurde (siehe Abbildung 38) und in diesem Protein ebenfalls als Nukleinsäure-Bindestelle fungiert (De Guzman et al., 1998).



**Abbildung 38: Vergleich unterschiedlicher Zink-Bindebereiche**

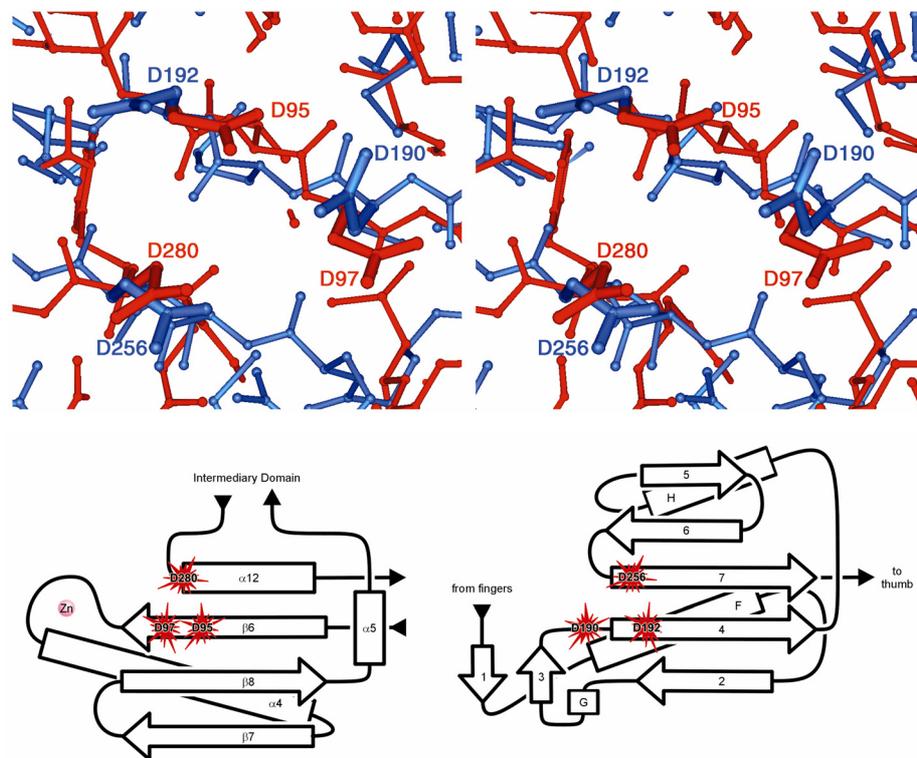
Die Abbildung zeigt die Zinkknöchel von *Pfu*-p41 (links), HIV *gag* (Mitte) und den Zinkfinger der Primase aus *Bacillus stearothermophilus* (rechts) als Ribbon-Darstellung mit den Zink-koordinierenden Aminosäuren als *stick*-Modelle.

Dies läßt eine Beteiligung des Zinkknöchels an der Bindung von einzelsträngiger DNA vermuten, eine rein strukturstabilisierende Funktion dieses Motivs kann nahezu ausgeschlossen werden, da die Zink-freien Strukturen trotz unterschiedlicher Kristallpackung nahezu mit der Original-Struktur identisch sind (vergleiche Abbildung 26). Es sollte an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, daß der Zinkknöchel vermutlich nicht in der katalytischen Domäne eukaryontischer Primasen vorhanden ist. Stattdessen enthalten diese ebenfalls ein klassisches Zinkfinger-Motiv, in welcher Form sich dies jedoch auf strukturelle Unterschiede auswirkt (siehe 6.2.4), kann aufgrund fehlender Vergleichsdaten zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt werden.

### 6.2.3 Das aktive Zentrum

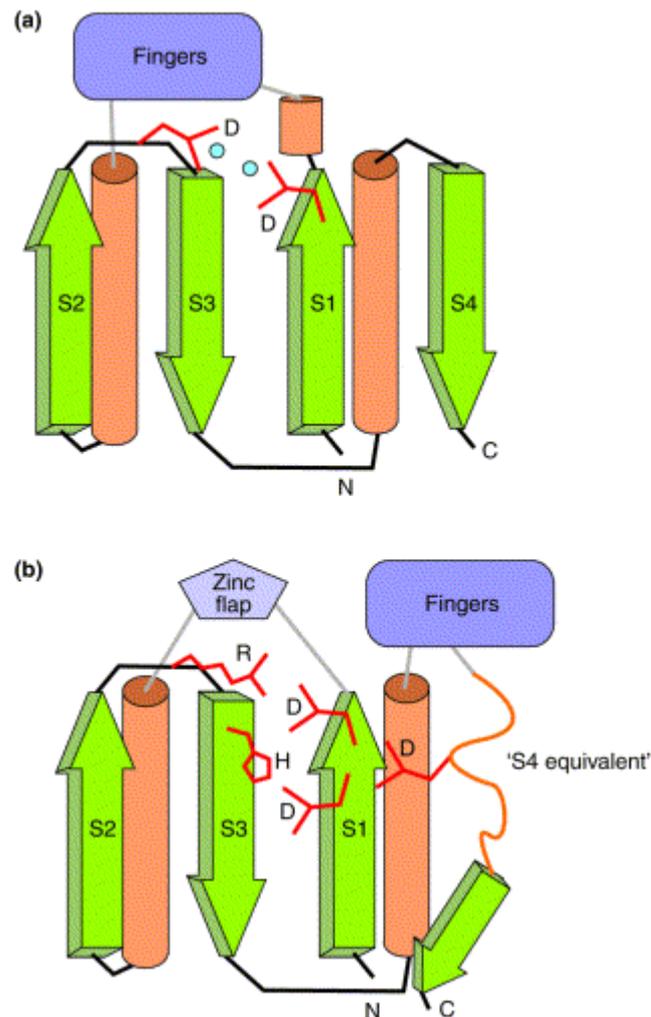
Das aktive Zentrum von Primasen des prim-Typs wurde durch Mutagenesestudien an Maus-Primase teilweise identifiziert. Der systematische Ersatz jeder einzelnen negativ geladenen Aminosäure durch Alanin (Copeland and Tan, 1995) ergab einen nahezu völligen Aktivitätsverlust bei Mutationen der drei invarianten sauren Reste im *signature*-Motiv („ELVFDID“), weshalb vermutet wurde, daß die Anordnung dieser drei Aminosäuren der katalytischen Triade (Steitz et al., 1994) von DNA-Polymerasen entsprechen würde. In der Struktur von *Pfu*-p41 liegen diese Reste allerdings benachbart auf einem beta-Strang ( $\beta_6$ ), wobei Glu91 offensichtlich ausschließlich eine strukturstabilisierende Funktion erfüllt. Stattdessen entspricht die Position von Asp280 der des dritten sauren Rests einer typischen katalytischen Triade von DNA-Polymerasen. Das dieser Aminosäure entsprechende Asp305 der Primase aus Maus war ebenfalls als für die Aktivität essentieller Rest identifiziert worden. Abbildung 39 zeigt eine Überlagerung dieser drei Aminosäuren mit den strukturell

homologen Resten der DNA-Polymerase beta, sowie eine schematische Darstellung der benachbarten Sekundärstrukturelemente.



**Abbildung 39: Vergleich des Aktivzentrums von *Pfu-p41* und DNA-Polymerase beta**  
 Oben: Stereodarstellung einer Überlagerung der Aminosäuren der katalytischen Triade von *Pfu-p41* (rot) mit den strukturell homologen Resten von DNA-Polymerase beta (blau)  
 Unten: Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente in der Umgebung des Aktivzentrums von *Pfu-p41* (links) und DNA-Polymerase beta (rechts). Die Positionen der Aminosäuren der katalytischen Triade sind gekennzeichnet.

Obwohl aus Abbildung 39 keine Ähnlichkeit zwischen der *active site*-Domäne von *Pfu*-Prim und der *palm*-Domäne von DNA-Polymerasen ersichtlich ist, deuten neuere Analysen (Aravind et al., 2002) möglicherweise auf ein sogenanntes RRM-Motif (*RNA recognition motif*) als gemeinsamen Vorläufer der *palm*-Domäne aller Polymerasen hin. Diese Theorie geht davon aus, daß sich aus einer rein Nukleinsäure-bindenden Domäne wie zum Beispiel im ribosomalen Protein S6 (Agalarov et al., 2000) durch Entwicklung katalytischer Aktivität eine ursprüngliche Polymerase entwickelte. Aus dieser hätten sich dann nach der divergenten Entwicklung in die Haupt-Polymerasefamilien durch Übernahme und funktionelle Anpassung einzelner Komponenten hochspezifische Enzyme gebildet. Abbildung 40 zeigt den dieser Theorie zugrundeliegenden Vergleich einer *palm*-Domäne mit der entsprechenden Region von *Pfu-p41*.



**Abbildung 40 (entnommen aus Aravind et al., 2002): Vergleich einer Polymerase *palm*-Domäne mit der *active site*-Domäne von *Pfu*-p41**

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung einer klassischen *palm*-Domäne von DNA-Polymerasen (a) und des entsprechenden Bereichs in *Pfu*-p41 (b). Laut den Autoren homologe Sekundärstrukturelemente sind in identischer Orientierung mit gleicher Nomenklatur dargestellt. Die  $\beta$ -Stränge S1, S2 und S3 entsprechen in *Pfu*-p41  $\beta 6$ ,  $\beta 7$  und  $\beta 8$ . Das sogenannte „*S4 equivalent*“ entspricht der Region um Asp280, der Zinkknöchel und die intermediäre Domäne von *Pfu*-p41 werden als *Zinc flap* bzw. *Fingers* bezeichnet.

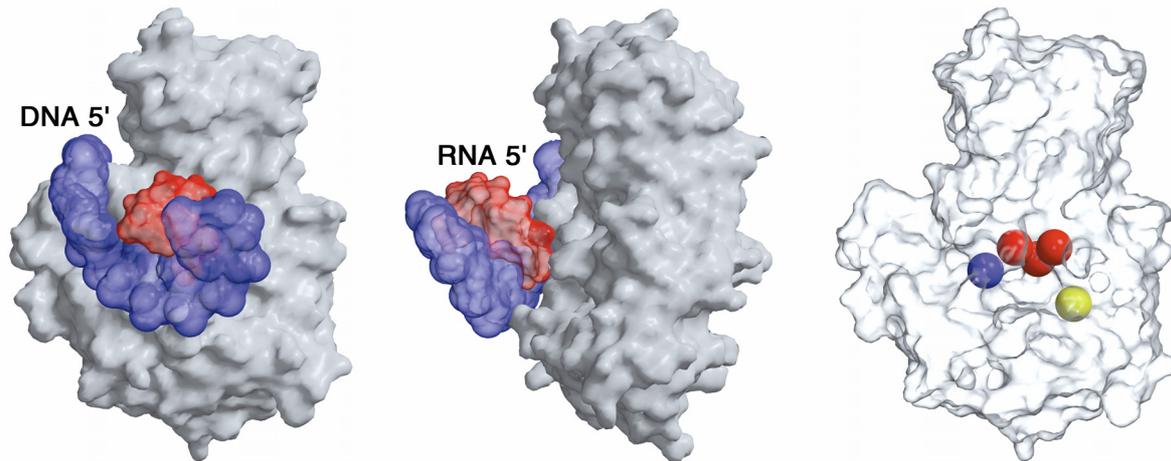
#### 6.2.4 Strukturelle Homologie zu eukaryontischer Primase

Die unter den vorhergehenden Punkten diskutierte Aminosäuresequenz-Homologie zwischen Primasen des prim-Typs innerhalb der *active site*-Domäne sowie die Tatsache, daß aus der Struktur die veränderte Aktivität einiger Mutanten der Maus-Primase erklärt werden kann, läßt zumindest für diese Domäne eine strukturelle Homologie zwischen den katalytischen Untereinheiten der archaealen und eukaryontischen Primasen vermuten. Allerdings wird noch zu klären sein, welche strukturellen Konsequenzen sich aus den unterschiedlichen Zink-Binderegionen (Zinkknöchel vs. Zinkfinger, siehe 6.2.2) ergeben. Die Frage nach einer

strukturellen Homologie der zweiten *Pfu*-Prim-Domäne mit einer entsprechenden Region der eukaryontischen katalytischen Primase-Untereinheit kann aufgrund fehlender Informationen über die Funktion dieser Domäne nicht eindeutig beantwortet werden. Allerdings könnte diese Domäne für die Interaktion mit *Pfu*-p46 verantwortlich sein. *Pfu*-p46 zeigt nur in einigen Bereichen Aminosäure-Sequenzhomologie zur eukaryontischen p60-Untereinheit, weshalb in diesem Falle eine funktionelle und nicht notwendigerweise strukturelle Ähnlichkeit vermutet werden kann. Untersuchungen zur Klärung der Funktion von *Pfu*-p46 werden derzeit in einer Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie durchgeführt.

### **6.2.5 Hypothetisches Modell der aktiven prim-Typ Primase**

Aus der oben diskutierten strukturellen Ähnlichkeit der Aktivzentren von *Pfu*-p41 und verschiedenen DNA-Polymerasen sowie unter der Voraussetzung, daß der Zinkknöchel – ähnlich wie der Zinkfinger in DnaG-Typ-Primasen – an der Bindung von einzelsträngiger DNA beteiligt ist, kann ein hypothetisches Modell (Abbildung 41) für die Interaktion der katalytischen Primase-Untereinheit von *Pyrococcus furiosus* mit einzelsträngiger DNA abgeleitet werden. Überlagert man die in Tabelle 7 angegebenen Aminosäuren der katalytischen Triaden von *Pfu*-p41 mit den entsprechenden Aminosäuren der verschiedenen Enzym-Substrat-Komplexe, erhält man eine weitgehend identische Orientierung der gebildeten DNA-Doppelhelix. Diese Orientierung ist derart, daß sich die Doppelhelix (in Abbildung 41 ein RNA/DNA-Hybrid) während der Synthese nahezu rechtwinklig vom Aktivzentrum von *Pfu*-p41 entfernt (Abbildung 41, links und mitte). Das 3'-Ende des RNA-primers liegt am aktiven Zentrum, der noch nicht replizierte Bereich der einzelsträngigen DNA verläuft oberhalb der Guanidino-Gruppe von Arg148 in der positiv geladenen Furche in Richtung des Zinkknöchels. Abbildung 41 (rechts) zeigt zusätzlich die Lage der Carboxylat-Gruppen der Reste der katalytischen Triade (rot) und von Glu91 (gelbgrün), sowie die Position Guanidino-Gruppe von Arg148 (blau).



**Abbildung 41: Hypothetische Modell der aktiven *Pfu*-Primase**

Aus der Überlagerung von *Pfu*-p41 mit verschiedenen DNA-Polymerasen entwickeltes Modell der aktiven archaealen katalytischen Primase-Untereinheit. (links und mitte). Das DNA-*template* ist in blau, das RNA-Produkt in rot dargestellt. Rechts: Lage einiger hochkonservierter Aminosäuren am Aktivzentrum.

Obwohl *Pfu*-p41 (siehe 6.2.1) möglicherweise als DNA-Polymerase betrachtet werden kann, unterscheidet sich die in Abbildung 41 skizzierte Situation in wesentlichen Punkten von der in „klassischen“ DNA-Polymerasen. Während letztere durch ihren flexiblen modularen Aufbau dazu in der Lage sind, relativ stabile Enzym/Substrat-Komplexe auszubilden, sind die beiden *Pfu*-p41-Domänen starr miteinander verbunden, woraus sich eine limitierte Kontaktregion zwischen Enzym und ss-DNA ergibt. Das doppelsträngige Produkt interagiert nicht mit dem Enzym. Folglich scheint die Interaktion der katalytischen Primase-Untereinheit mit Substrat/Produkt vergleichsweise schwach zu sein (Liu et al., 2001), was auch erklären könnte, warum die Versuche zur Kristallisation eines Enzym/Substrat-Komplexes bislang nicht erfolgreich waren.

---

## 6.3 Das humane *CCA-adding enzyme*

### 6.3.1 Kristallisation und Strukturlösung

Die Prozessierung des 3'-Endes eukaryontischer tRNAs erfordert das koordinierte Zusammenspiel mehrerer Proteine mit unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten. Einer der an diesem essentiellen Vorgang beteiligten Faktoren ist die sogenannte tRNA-Nukleotidyltransferase (*CCA-adding enzyme*), welche aus einzelnen NTPs das CCA-Ende an inkompletten tRNA-3'-Termini synthetisiert und damit funktionelle tRNAs produziert.

Das humane *CCA-adding enzyme* konnte rekombinant als *His-tag*-Protein exprimiert und über zwei chromatographische Schritte in für die Strukturlösung mittels Röntgenkristallographie ausreichender Menge und Reinheit dargestellt werden. Gereinigtes Protein wurde mit Ammoniumsulfat als Präzipitant kristallisiert, wobei die Qualität der Kristalle in Bezug auf Größe und Aussehen zwischen verschiedenen Proteinpräparationen makroskopisch keinerlei Unterschiede aufwies. Allerdings variierte die maximal erreichbare Auflösung bei röntgenkristallographischen Experimenten um bis zu 2Å, nur bei einer Proteincharge wurden Kristalle mit einer höchsten Auflösung von unter 4Å erhalten. Diese Varianz könnte auf unterschiedlichen Verhältnissen von Protein- zu NTP-Konzentration in den verschiedenen Chargen beruhen. Ein allen Kristallen dagegen gemeinsamer und auch vergleichbarer Effekt war die Steigerung der maximalen Auflösung durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Kristalle. Dadurch konnte die maximale Auflösung nahezu ohne Verlust von Isomorphie jeweils um etwa 2Å verbessert werden, was eine Strukturlösung mit Hilfe eines isomorphen Quecksilber-Derivats erst ermöglichte. Die experimentellen Phasen wurden durch *solvens-flattening* soweit verbessert, daß für beide Moleküle in der asymmetrischen Einheit manuell ein unvollständiges Poly-Alanin-Modell gebaut werden konnte. Mit Hilfe dieses Modells wurde der NCS-Operator zwischen beiden kristallographisch unabhängigen Molekülen bestimmt. Nach zweifacher Mittelung und Phasenexpansion konnte mit dem Einbau von Seitenketten begonnen werden. Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, liegt die humane CCase im Kristall nahezu ausschließlich als über eine Disulfid-Brücke kovalent verknüpftes Dimer mit nahezu properer zweifacher Symmetrie vor. Eine teilweise Dimer-Bildung des Enzyms wurde auch während der Reinigung beobachtet, allerdings lag der Anteil des Proteins in der monomeren Form bei etwa 95%. Für das funktionell homologe Enzym aus dem Archaeum *Sulfolobus shibatae* wurde gezeigt (Li et al., 2000), daß dieses in Lösung ein Dimer bildet und nach Bindung einer tRNA je Dimer zwei Protein/tRNA-Komplexe zu einer höhermolekularen

Struktur von dann vier Protein-Untereinheiten und zwei tRNAs assemblieren. Im Gegensatz zu der Situation in Archaea wurde eine funktionelle Oligomerisierung bei Klasse-II-tRNA-Nukleotidyltransferasen bisher nicht beobachtet. Weiterhin ist das die intermolekulare Disulfid-Brücke bildende Cys344 innerhalb dieser Klasse nicht konserviert, was eine konservierte Funktion dieser Dimerisierung zumindest unwahrscheinlich macht.

Ein Problem bei der Strukturlösung von *hmtCCase* war die vergleichsweise niedrige Auflösung der einzelnen Datensätze. Während des Modellbaus und der Verfeinerung stellte sich heraus, daß für große Teile der beiden unabhängigen Moleküle keine interpretierbare Elektronendichte zu erhalten war. Dies beschränkte sich nicht nur auf den flexiblen *His-tag*, sondern zusätzlich waren auch ein Abschnitt im Dimer-*interface* sowie der komplette C-terminale Bereich (ab Rest 355 in beiden Monomeren) komplett ungeordnet. Ähnliche strukturelle Flexibilität wurde bereits mehrfach in verschiedensten Proteinfamilien beobachtet und scheint oft eine unabdingbare Voraussetzung für die enzymatische Funktion zu sein (Übersichtsartikel von Dunker et al., 2002). Zusätzlich könnte das Fehlen von etwa einem Viertel der Streumasse auch den relativ hohen freien R-Faktor von 31,8% erklären. Eine während der Kristallisation stattfindende C-terminale Degradation des Proteins kann hierbei ausgeschlossen werden, da das gereinigte und das in den Kristallen enthaltene Protein in der Gelelektrophorese identisches Laufverhalten aufwies. Daher wurde versucht, durch Umklonierung des Gens in einen Expressionsvektor mit kürzerem *His-tag* und gleichzeitige Deletion der C-terminalen Domäne besser streuende Kristalle zu erhalten. Dieses Konstrukt konnte ebenfalls rekombinant exprimiert und in ausreichenden Mengen gereinigt werden (Laufverhalten in der Gelelektrophorese entsprechend), lieferte allerdings keine Kristalle. Eine weitergehende C-terminale Deletion (nach Helix h15, Aminosäure Ile286) wurde nicht löslich exprimiert, von dem homologen Enzym aus *E. coli* wurden keine Kristalle erhalten.

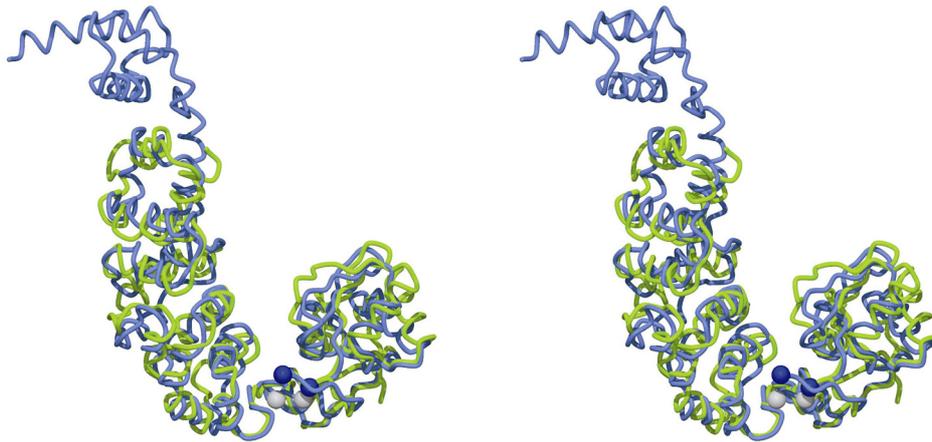
### 6.3.2 Strukturelle Klassifizierung und Sequenzvergleiche

Der in der Struktur definierte Bereich des humanen *CCA-adding enzymes* bildet drei distinkte Domänen. Die N-terminale  $\alpha/\beta$ -Domäne ähnelt in ihrer Faltung der katalytischen Domäne bekannter Mitglieder der Kanamycin-Nukleotidyltransferase-Familie (Holm and Sander, 1995), weswegen das Enzym dieser Proteinfamilie zuzuordnen ist. Die ausschließlich helikalen Domänen zwei und drei zeigen strukturelle Homologie zu verschiedenen Proteinen, eine Zuordnung zu einer bestimmten Familie ist allerdings nicht zu treffen. Auch war bisher keine entsprechende Kombination dieser Struktur motive bekannt. Diese Befunde

widersprechen bisherigen auf Aminosäuresequenz-Vergleichen beruhenden Vermutungen, wonach Klasse II-CCasen eine hochkonservierte Domäne von etwa 200 Aminosäuren (im N-terminalen Teil) sowie eine variable Domäne besitzen würden. Statt dessen trägt der konservierte Bereich sowohl zur katalytischen als auch zur intermediären Domäne bei. Betrachtet man nun diese konservierte Region, so bemerkt man auf der molekularen Oberfläche des Enzyms im Domäneninterface eine deutliche Kolokalisation von konservierten Resten und positiver elektrischer Ladung (vergleiche Abbildung 34).

### 6.3.3 Strukturvergleiche

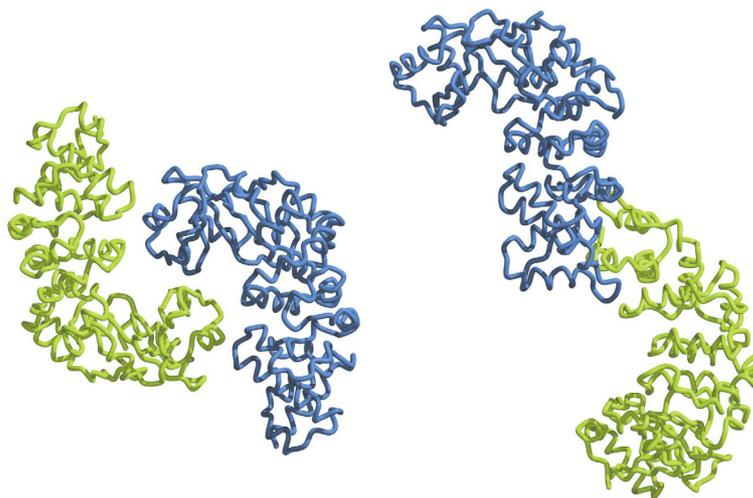
Entsprechend der Aminosäuresequenz-Homologie zwischen CCasen und ihren Strukturhomologen wurde für den molekularen Mechanismus der CCA-Addition ein dem Elongationsmechanismus von DNA-Polymerasen („*two-metal-ion mechanism*“) ähnliches Modell postuliert. Fraglich war anfangs allerdings, ob für jeden einzelnen Additionsschritt ein eigenes Aktivzentrum mit zugehöriger spezifischer Bindungstasche existieren würde, oder nur ein einziges Aktivzentrum mit zwei bzw. drei Bindungstaschen unterschiedlicher Spezifität vorhanden wäre. Diese Frage konnte durch Mutagenesestudien an der Klasse I-CCase aus *Sulfolobus shibatae* zugunsten eines Aktivzentrums für die Inkorporation beider NTP-Substrate beantwortet werden (Yue et al., 1998). Auf welche Art jedoch die spezifische Selektion der beiden unterschiedlichen NTP-Substrate erfolgt, war lange Zeit unklar. Die kürzlich publizierten Kristallstrukturen des *CCA-adding enzymes* aus *Bacillus stearothermophilus* (*BstCCase*) im Komplex mit ATP bzw. CTP (Li et al., 2002) können diese Frage zumindest teilweise beantworten. Die Struktur dieses bakteriellen Enzyms stimmt trotz einer Sequenzidentität von nur etwa 22,7% (Analyse mit CLUSTALW) weitgehend mit derjenigen der humanen CCCase überein (siehe Abbildung 42), enthält jedoch auch die in der humanen CCCase nicht definierte vierte Domäne, weshalb im Folgenden die Domänen-Nomenklatur der Veröffentlichung von Li et al. (2002) verwendet wird: *head*-, *neck*-, *body*- und *tail*-Domäne für die Domänen 1-4. Interessanterweise (siehe Abbildung 42) enthält auch dieses Enzym ein ungeordneten Bereich von etwa 10 Aminosäuren innerhalb der *head*-Domäne.



**Abbildung 42: Strukturelle Homologie der CCA-adding enzymes aus *Homo sapiens* und *Bacillus stearothermophilus***

Stereodarstellung einer Überlagerung von *hmtCCase* (grün) und *BstCCase* (blau, Li et al., 2002). Anfang und Ende der in beiden Kristallstrukturen nicht definierten Region sind durch CPK-Modelle der nächsten Hauptketten-Atome (N und C, jeweils blau und grau) gekennzeichnet.

Auch die *BstCCase* liegt im Kristall als nicht-kristallographisches Dimer vor (Li et al., 2002), allerdings ist der Modus der Dimerisierung von der humanen CCase verschieden (vergleiche Abbildung 43), weshalb die Frage nach einer physiologischen Relevanz der beobachteten Dimerisierung nicht eindeutig beantwortet werden kann.

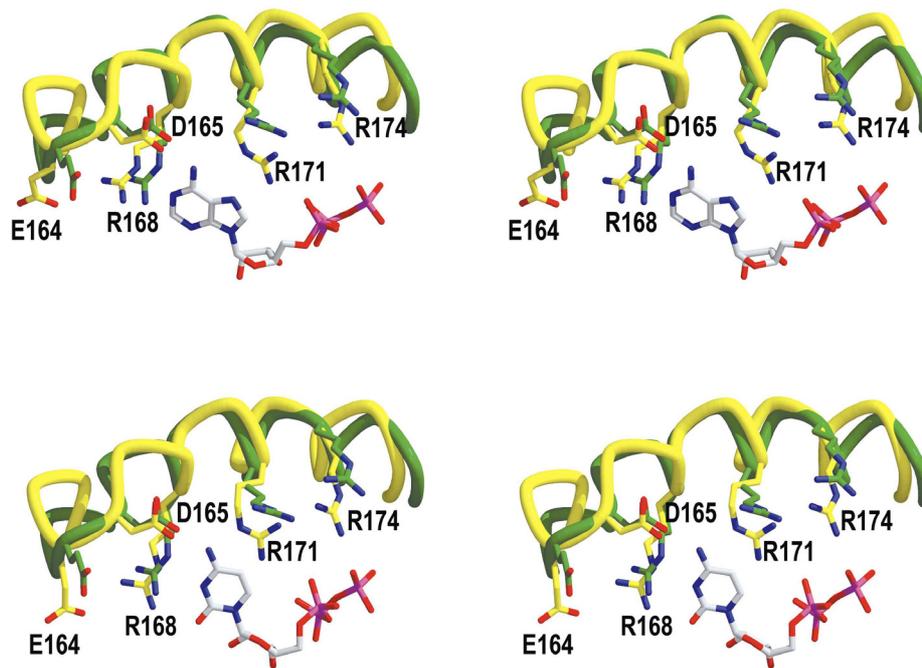


**Abbildung 43: Dimere von *hmtCCase* und *BstCCase***

Die Abbildung zeigt die nicht-kristallographischen Dimere von *BstCCase* ohne die *tail*-Domäne (links) und *hmtCCase* (rechts). Die Orientierung der beiden blauen Monomere ist identisch.

Die Strukturen der Komplexe von *BstCCase* mit ATP/CTP zeigten eine einzige Bindungstasche für beide NTP-Substrate, welche durch relativ kleine strukturelle Änderungen Spezifität für CTP bzw. ATP erhält. Die an der Ausbildung der Bindungstasche beteiligten

Aminosäuren sind innerhalb der *CCA-adding enzymes* der Klasse II hochkonserviert, weshalb für die humane CCCase ein identisches Selektivitätsprinzip postuliert werden kann. Allerdings zeigt eine Überlagerung der Bindungstaschen von *hmtCCCase* und *BstCCCase* (in beiden NTP-gebundenen Formen), daß die Tasche des humanen Enzyms in einer „neutralen“ Konformation ohne Spezifität für ATP oder CTP vorliegt (vergleiche Abbildung 44).



**Abbildung 44: NTP-Bindestellen von *hmtCCCase* und *BstCCCase***

Stereo-Darstellungen der NTP-Bindungstaschen von *hmtCCCase* (grün) und *BstCCCase* (gelb). Oben: *BstCCCase* in der ATP-gebundenen Form. Unten: *BstCCCase* in der CTP-gebundenen Form. Die an der NTP-Bindung beteiligten invarianten Aminosäuren und die gebundenen NTP-Substrate sind als *stick*-Modelle dargestellt.

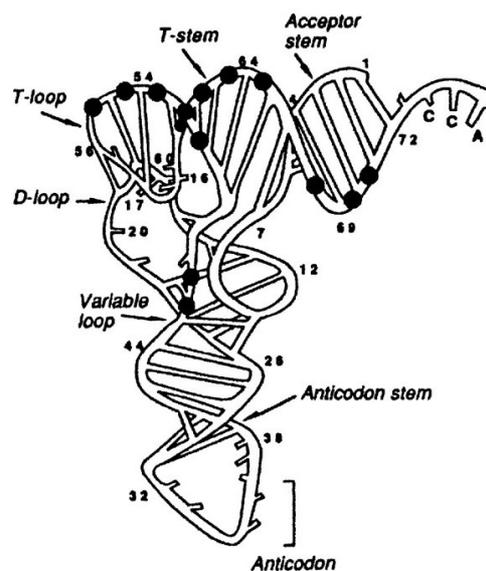
#### 6.3.4 Das aktive Zentrum

Wie unter 5.3.3 beschrieben (Abbildung 33), ähnelt die *head*-Domäne von *hmtCCCase* den *active site*-Domänen verschiedener Mitglieder der Kanamycin-Nukleotidyltransferase-Familie. Aus einem automatischen Vergleich dieser Domänen entsprechend ihrer Sekundärstrukturelemente (TOP3D) wurde Glu92 als dritter Rest der katalytischen Triade identifiziert. Diese Zuordnung erfolgt jedoch aus rein beschreibenden Gründen, da eine E92A-Mutante von *hmtCCCase* noch Wildtyp-Aktivität besitzt, also zur kompletten Synthese des CCA-Endes in der Lage ist (Dr. H. Betat, persönliche Mitteilung). Ähnliches könnte für das strukturell homologe Glu79 von *BstCCCase* gelten, allerdings gibt es hier noch keine

Mutationsanalysen (Li et al., 2002). Auch in der CCCase aus *Sulfolobus shibatae* konnte bei einer systematischen Mutagenesestudie, in der alle saueren Aminosäuren einzeln zu Alanin mutiert wurden, kein für die komplette CCA-Addition essentieller dritter Rest identifiziert werden (Yue et al., 1998). Inwieweit sich diese Ergebnisse auf den postulierten *two metal ion-mechanism* auswirken, kann im Moment nicht beantwortet werden, vor allem, weil dieser dritten Aminosäure auch in den meisten DNA-Polymerasen trotz intensiver Analyse bisher keine katalytische Funktion sicher zugeordnet werden konnte.

### 6.3.5 Modelle für CCA-Addition

Der molekulare Mechanismus der CCA-Addition ist auch nach der Veröffentlichung der beiden Komplexstrukturen von *BstCCCase* mit CTP/ATP (Li et al., 2002) noch nicht vollständig geklärt. Allerdings können nun die Modelle mit unterschiedlichen Bindungstaschen für die verschiedenen NTP-Substrate ausgeschlossen werden, weshalb im Folgenden nur die postulierten Modelle mit einer einzigen Bindungstasche diskutiert werden sollen. Die Gruppe um Weiner (Shi et al., 1998b) hatte durch Alkylierungs-Interferenz-Experimente mit *E. coli* und *S. shibatae* CCCase gefunden, daß sich für die Synthese des CCA-Endes wichtige Phosphatreste der tRNA über den sogenannten „oberen“ Bereich der tRNA erstrecken, das heißt den Akzeptor-/T-Stamm, den TΨC-loop und den variablen loop (Abbildung 45).



**Abbildung 45: Für CCA-Addition kritische tRNA-Phosphate**

Die Abbildung (entnommen aus Shi et al., 1998b) zeigt die Positionen von tRNA-Phosphat-Resten, welche als kritisch für die CCA-Addition durch *SshCCCase* und *EcoCCCase* identifiziert wurden.

Bei dieser Untersuchung wurde zudem festgestellt, daß diese tRNA-Phosphate während der kompletten CCA-Synthese identisch waren, ein Ergebnis, welches mit dem Modell der *“polymerization without translocation“* bzw. *“collaborative templating“* erklärt wurde. Der wesentliche Gesichtspunkt dieses Modells beinhaltet, daß die tRNA während der gesamten CCA-Addition auf der CCCase fixiert bleibt. Nur der 3'-Terminus der tRNA ist flexibel und bewirkt durch die Einnahme unterschiedlicher Konformationen in der NTP-Bindestelle des Enzyms eine Substrat-Spezifität für CTP bzw. ATP.

Nach der Veröffentlichung der *BstCCCase*-Strukturen wurde dieses Modell angepasst, da gezeigt werden konnte, daß CCCase ohne Zuhilfenahme von tRNA spezifische Bindungstaschen für beide zu inkorporierenden NTP-Substrate ausbilden kann. Allerdings ist auch das von der Gruppe um Steitz auf der Grundlage dieser Komplexstrukturen formulierte Modell (*“modified scrunching-model“*; Li et al., 2002) vermutlich so nicht haltbar: Auch dieses Modell basiert auf der Annahme, daß die tRNA während der CCA-Addition auf der CCCase fixiert bleibt und beinhaltet eine sukzessive Konformationsänderung des unmittelbaren tRNA-3'-Endes, welche in einen engen Bereich zwischen den beiden kristallographisch unabhängigen Monomeren erfolgt. Im Unterschied zum *collaborative templating* soll durch diese Umlagerung zusätzlich zu einer Beeinflussung der Spezifität der NTP-Bindungstasche auch durch sterische Behinderung die Länge des gebildeten tRNA-Endes begrenzt werden.

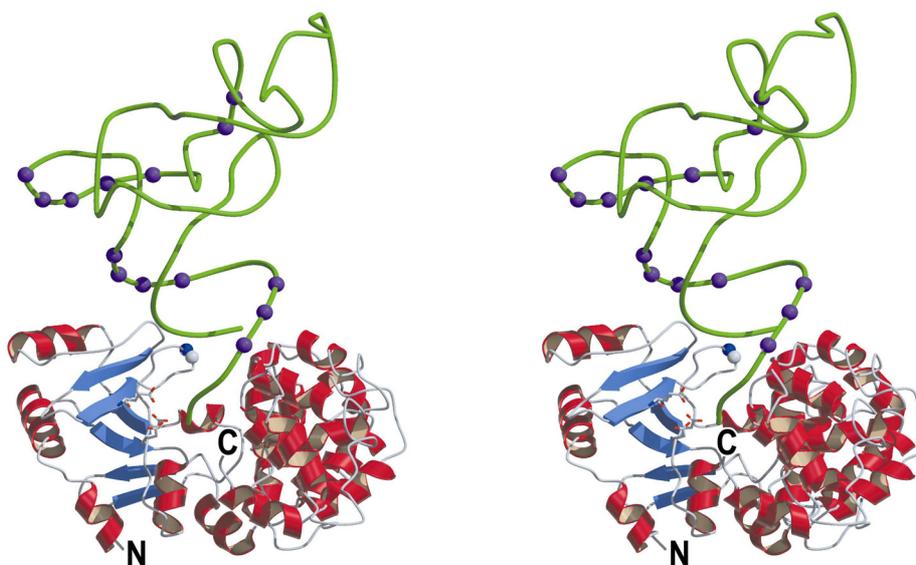
Beide hier dargestellten Modelle sind jedoch nicht mit der Aktivität einer seit langem bekannten Mutante in *EcoCCCase* kompatibel. Diese G70D-Mutante zeigt normalen CMP-Einbau, ist allerdings nicht mehr in der Lage, den finalen AMP-Rest zu inkorporieren (Zhou et al., 1986). Aufgrund dieses Resultats und einer gewissen Sequenz-Homologie zu ATP-Bindestellen wurde vermutet, daß die dem mutierten Rest benachbarte Protein-Region als an der ATP-Bindung beteiligt wäre (Zhou et al., 1986), dies kann jedoch mittlerweile ausgeschlossen werden (Li et al., 2002, vergleiche Abbildung 44). Stattdessen liegt die Mutation innerhalb der in beiden CCCase-Strukturen fehlgeordneten, jedoch zwischen Bakterien und Eukaryonten nicht konservierten *loop*-Region.

Bei Modellen mit einer fest auf dem Enzym fixierten tRNA gibt es offensichtlich keine Erklärung für eine Mutante außerhalb der NTP-Bindestelle, welche nur zum Einbau eines NTPs in der Lage ist. Um diesen Konflikt unter Berücksichtigung der bekannten biochemischen Daten zu beseitigen wurde ein im Folgenden beschriebenes *“corkscrew-model“* entwickelt.

Aus der strukturellen Homologie der *head*-Domäne von *hmtCCCase* und der *active site*-Domäne von DNA-Polymerase beta lässt sich durch manuelle Überlagerung der drei

Aminosäuren der katalytischen Triade ein Modell für die Interaktion von CCase mit tRNA aufstellen. Die unterschiedliche Tertiärstruktur von tRNA verglichen mit doppelsträngiger DNA muß hierbei nicht unbedingt eine Einschränkung darstellen, da CCasen in der Lage sind, so unterschiedliche Moleküle wie eine tDNA-Minihelix, U2 snRNA, TMV RNA und TYMV RNA als Substrate zu akzeptieren (Litvak et al., 1970; Hegg et al., 1990; Shi et al., 1998b; Cho et al., 2002).

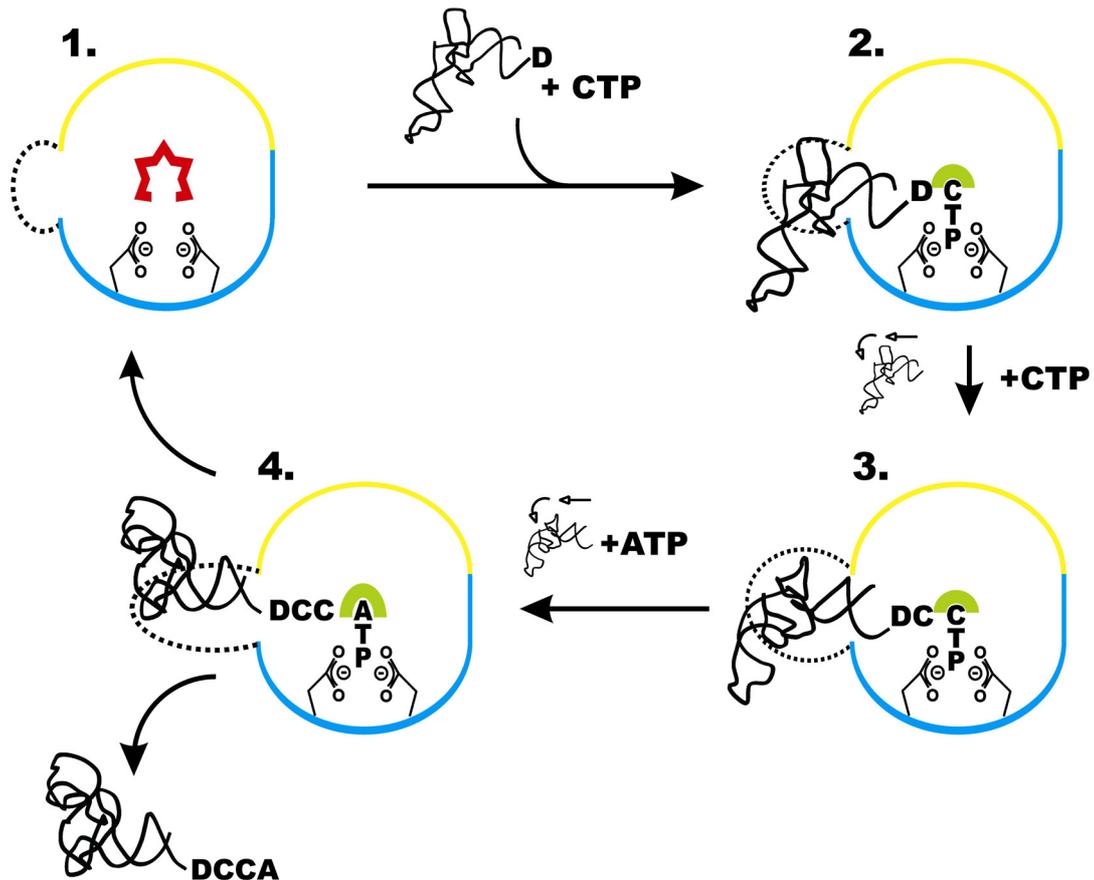
Solch eine Überlagerung platziert die doppelsträngige DNA eines Komplexes von DNA-Polymerase beta mit *primer/template* (PDB-Eintrag 1BPX) in die positiv geladene Furche zwischen den *head*- und *neck*-Domänen von *hmtCCase*. Legt man den Akzeptor-Stamm einer tRNA derart auf diesen DNA-Doppelstrang, daß die Diskriminator-Base der tRNA an equivalent zur 3'-Base des DNA-*primers* liegt, ergibt sich folgendes Modell (Abbildung 46): Die tRNA liegt in der Furche, etwa vier Basenpaare des tRNA-Akzeptor-Stamms bilden direkte Kontakte mit dem definierten Bereich der *hmtCCase* aus. Diese im Vergleich zu der engen Interaktion zwischen tRNA und tRNA-Synthetasen (vergleiche Übersichtsartikel von De Guzman et al., 1998b) relativ geringe Anzahl von Kontakten, kann dadurch erklärt werden, daß CCasen in der Lage sein müssen, alle verschiedenen tRNA-Species eines Organismus' zu erkennen. In der Tat erinnert das Modell auch mehr an einen Komplex von tRNA mit Elongationsfaktor Tu (EFTu, De Guzman et al., 1998b), für den bezüglich der tRNA-Erkennung ebenfalls keine Spezifität existiert.



**Abbildung 46: Modell eines *hmtCCase*/tRNA-Komplexes**  
Stereo-Darstellung eines Modells von *hmtCCase* gebunden an tRNA. Die kritischen tRNA-Phosphate sind als CPK-Modelle dargestellt.

Aus Abbildung 46 wird ersichtlich, daß in diesem Modell nicht alle für die CCA-Addition kritischen Phosphate vom Enzym kontaktiert werden. Die fehlenden Kontakte könnten zumindest im Falle der Phosphat-Reste im Bereich des *T-loops* von der in den CCCase-Strukturen fehlgeordneten Region gebildet werden. Dies gilt nicht für die beiden Phosphate im variablen *loop* der tRNA, allerdings hat hier eine Alkylierung auch keine Verminderung, sondern im Gegenteil eine Steigerung der CCCase-Aktivität zur Folge, was eventuell auf eine lokale Destabilisierung der tRNA zurückzuführen ist (Shi et al., 1998b). Die Tatsache, daß die Aminosäure-Sequenz in dem fehlgeordneten *loop* zwar jeweils innerhalb der Bakterien und der Eukaryonten, nicht aber zwischen diesen beiden Gruppen konserviert ist, scheint dieser Interpretation zu widersprechen. Allerdings besteht die Möglichkeit, daß die humane mitochondriale CCCase nicht nur in Mitochondrien, sondern auch im Kern/Cytoplasma aktiv ist (Dr. M. Mörl, persönliche Mitteilung). Damit müßte dieses Enzym Kern-codierte und mitochondriale tRNA-Spezies erkennen, wobei die tRNAs in Mitochondrien teilweise große Unterschiede zu den Kern-codierten tRNAs zeigen.

Im *corkscrew*-Modell (Abbildung 47) liegt die CCCase anfangs in einer neutralen Konformation vor. Durch Bindung einer tRNA mit 3'-terminaler Diskriminator-Base an den in der Struktur nicht definierten *loop* und in die Furche zwischen den *head*- und *neck*-Domänen wird in der NTP-Bindungstasche des Enzyms eine Konformationsänderung hin zu einem CTP-Bindungskompetenten Zustand induziert. Nach Addition von CMP wird die nun verlängerte tRNA relativ zum Aktivzentrum translatiert und rotiert, um den neuen 3'-Terminus für den nächsten nukleophilen Angriff zu positionieren. Nach einer weiteren Inkorporation von CMP und Repositionierung der tRNA-CC wechselt die Spezifität der Bindungstasche zu ATP, und der finale AMP-Rest wird eingebaut. In diesem Modell bleibt die tRNA ebenfalls während der CCA-Addition am Enzym gebunden, wird trotzdem aber je nach einzubauendem NTP relativ zum aktiven Zentrum relokalisiert.



**Abbildung 47: CCA-Addition nach dem corkscrew-Modell**

Schematische Darstellung der CCA-Addition nach dem corkscrew-Modell. 1. *hmtCCase* im Ausgangszustand (*head*-Domäne in blau mit den beiden Aspartat-Resten, *neck*-Domäne in gelb, flexible Region zwischen den beiden Domänen in schwarz, NTP-Bindestelle (rot) in ihrer neutralen Konformation); 2. CCase mit gebundener tRNA-D (iskriminator) und CTP (NTP-Bindestelle (grün) in CTP-Konformation); 3. CCase mit gebundener tRNA-DC und CTP (NTP-Bindestelle noch in CTP-Konformation); 4. CCase mit gebundener tRNA-DCC und ATP (NTP-Bindestelle in ATP-Konformation). Die Bewegung der verschiedenartigen tRNA-Substrate zwischen den einzelnen Inkorporationsschritten ist durch Pfeile angedeutet.

Dieses Modell ist mit allen biochemischen Daten kompatibel, fraglich ist jedoch – wie in allen anderen Modellen auch – auf welche Weise die Kommunikation zwischen tRNA und CCase erfolgt, um tatsächlich die beobachtete Sequenzspezifität zu erreichen. Diese Frage wird nur durch die Strukturbestimmung entsprechender Enzym/Substrat-Komplexe zu beantworten sein.

---

---

**Literaturverzeichnis**

- Agalarov, S.C., Sridhar Prasad, G., Funke, P.M., Stout, C.D. and Williamson, J.R. (2000) *Structure of the S15,S6,S18-rRNA complex: assembly of the 30S ribosome central domain*. Science 288, 107-113
- Aguilera A. (2001) *Double-strand break repair: are Rad51/RecA--DNA joints barriers to DNA replication?* Trends in Genetics 17, 318-321
- Alberts, B. (2003) *DNA replication and recombination*. Nature 421, 431-435
- Apirion, D., and Miczak, A. (1993) *RNA Processing in Prokaryotic Cells*. Bioessays 15, 113-120
- Aravind, L., Leipe, D.D. and Koonin, E.V. (1998) *Toprim--a conserved catalytic domain in type IA and II topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins*. Nucleic Acids Research 26, 4205-4213
- Aravind, L., Mazumder, R., Vasudevan, S. and Koonin, E.V. (2002) *Trends in protein evolution inferred from sequence and structure analysis*. Current Opinions in Structural Biology 12, 392-399
- Augustin, M.A., Ankenbauer, W. and Angerer, B. (2001) *Progress towards single-molecule sequencing: enzymatic synthesis of nucleotide-specifically labeled DNA*. Journal of Biotechnology 86, 289-301
- Avery, O.T, MacLeod, C.M and McCarty, M. (1944) *Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III*. Journal of Experimental Medicine 79, 137-158
- Barton, G.J. (1993) *ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments*. Protein Engineering 6, 37-40
- Bauer, G.A. and Burgers, P.M. (1988) *The yeast analog of mammalian cyclin/proliferating-cell nuclear antigen interacts with mammalian DNA polymerase delta*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 85, 7506-7510
- Beard, W.A. and Wilson, S.H. (2001) *DNA lesion bypass polymerases open up*. Structure 9(9), 759-764
- Bebenek, K. and Kunkel, T.A. (2002) *Family growth: the eukaryotic DNA polymerase revolution*. Cellular and Molecular Life Sciences 59, 54-57
- Bernander, R. (1998) *Archaea and the cell cycle*. Molecular Microbiology 29(4), 955-961
- Birky, C.W. Jr. (2001) *The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models*. Annual Reviews in Genetics 35, 125-148
- Bocquier, A.A., Liu, L., Cann, I.K., Komori, K., Kohda, D. and Ishino, Y. (2001) *Archaeal primase: bridging the gap between RNA and DNA polymerases*. Current Biology 11, 452-456
- Braithwaite, D.K. and Ito, J. (1993) *Compilation, alignment, and phylogenetic relationships of DNA polymerases*. Nucleic Acids Research 21(4), 787-802
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A. and Macdonald-Bravo, H. (1987) *Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta*. Nature 326, 515-517
- Brooks, M. and Dumas, L.B. (1989) *DNA primase isolated from the yeast DNA primase-DNA polymerase complex. Immunoaffinity purification and analysis of RNA primer synthesis*. Journal of Biological Chemistry 264, 3602-3610

- Brünger, A.T. (1992) *Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures*. Nature 355, 472-475
- Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice, L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) *Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination*. Acta Crystallographica Section D 54, 905-921
- Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrick, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S. and Venter, J.C. (1996) *Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, Methanococcus jannaschii*. Science, 273, 1058-1073
- Burgers, P.M., Bambara, R.A., Campbell, J.L., Chang, L.M., Downey, K.M., Hubscher, U., Lee, M.Y., Linn, S.M., So, A.G. and Spadari, S. (1990) *Revised nomenclature for eukaryotic DNA-Polymerases*. European Journal of Biochemistry 191, 617-618
- Cann, I.K., Komori, K., Toh, H., Kanai, S. and Ishino, Y. (1998) *A heterodimeric DNA-Polymerase: evidence that members of Euryarchaeota possess a distinct DNA-Polymerase*. Proceedings of the National Academy of Science of the USA 95, 14250-14255
- Cann, I.K., Ishino, S., Hayashi, I., Komori, K., Toh, H., Morikawa, K. and Ishino Y. (1999) *Functional interactions of a homolog of proliferating cell nuclear antigen with DNA-Polymerases in Archaea*. Journal of Bacteriology 181, 6591-6599
- Cann, I.K. and Ishino, Y. (1999) *Archaeal DNA replication: identifying the pieces to solve a puzzle*. Genetics 152, 1249-1267
- Carson, D.R. and Christman, M.F. (2001) *Evidence that replication fork components catalyze establishment of cohesion between sister chromatids*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98, 8270-8275
- Castaño, J.G., Tobian, J.A., and Zasloff, M. (1985) *Purification and characterization of an endonuclease from Xenopus laevis ovaries which accurately processes the 3' terminus of human Pre-tRNA<sup>i</sup> Met (3'Pre-tRNase)*. Journal of Biological Chemistry 260, 9002-9008
- Chargaff E. (1950) *Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymic degradation*. Experientia 6, 201-209
- Chargaff, E. (1951) *Structure and function of nucleic acids as cell constituents*. Federation Proceedings 10, 654-659
- Chen J., Chen, S., Saha, P. and Dutta, A. (1996) *p21Cip1/Waf1 disrupts the recruitment of human Fen1 by proliferating-cell nuclear antigen into the DNA replication complex* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 93, 11597-11602
- Cho, H.D., Tomita, K., Suzuki, T. and Weiner, A.M. (2002) *U2 small nuclear RNA is a substrate for the CCA-adding enzyme (tRNA nucleotidyltransferase)*. Journal of Biological Chemistry 277, 3447-3455
- Chuang, L.S., Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G. and Li, B.F. (1997) *Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1*. Science 277, 1996-2000
- Chui, G.S. and Linn, S. (1995) *Purification of mammalian polymerases: DNA polymerase epsilon*. Methods in Enzymology 262, 93-98

- COLLABORATIVE COMPUTATIONAL PROJECT NUMBER 4 (1994) *The CCP4 suite: programs for protein crystallography*. Acta Crystallographica section D, 50, 760-763
- Collins, K.L., Russo, A.A., Tseng, B.Y., and Kelly, T.J. (1993) *The role of the 70 kDa subunit of human DNA polymerase alpha in DNA replication*. EMBO Journal 12, 4555-4566
- Copeland, W.C. and Wang, T.S. (1993) *Enzymatic characterization of the individual mammalian primase subunits reveals a biphasic mechanism for initiation of DNA replication*. Journal of Biological Chemistry 268, 26179-26189
- Copeland, W.C. and Tan, X. (1993) *Active site mapping of the catalytic mouse primase subunit by alanine scanning mutagenesis*. Journal of Biological Chemistry, 270, 3905-3913
- Crick, F.C.H. (1958) *On Protein Synthesis*. Symposium of the Society of Experimental Biology 12, 138-163
- Crute, J.J., Mocarski, E.S. and Lehman, I.R. (1988) *A DNA helicase induced by herpes simplex virus type 1*. Nucleic Acids Research 16, 6585-6596
- Crute, J.J., Tsurumi, T., Zhu, L.A., Weller, S.K., Olivo, P.D., Challberg, M.D., Mocarski, E.S. and Lehman, I.R. (1989) *Herpes simplex virus 1 helicase-primase: a complex of three herpes-encoded gene products*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 86(7), 2186-2189
- Davies 2nd, J. F., Almasy, R. J., Hostomska, Z., Ferre, R. A. & Hostomsky, Z. (1994) *2.3 A crystal structure of the catalytic domain of DNA polymerase beta*. Cell 76, 1123-1133
- De Felice, M., Sensen, C.W., Charlebois, R.L., Rossi, M. and Pisani, F.M. (1999) *Two DNA polymerase sliding clamps from the thermophilic archaeon Sulfolobus solfataricus*. Journal of Molecular Biology 291, 47-57
- De Guzman, R.N., Wu, Z.R., Stalling, C.C., Pappalardo, L., Borer, P.N. and Summers, M.F. (1998a) *Structure of the HIV-1 nucleocapsid protein bound to the SL3 psi-RNA recognition element*. Science 279, 384-388
- De Guzman, R.N., Turner, R.B. and Summers, M.F. (1998b) *Protein-RNA recognition*. Biopolymers 48, 181-195
- Desogus, G., Onesti, S., Brick, P., Rossi, M. and Pisani, F.M. (1999) *Identification and characterization of a DNA primase from the hyperthermophilic archaeon Methanococcus jannaschii*. Nucleic Acids Research 27, 4444-4450
- Deutscher, M.P. (1984) *Processing of tRNA in prokaryotes and eukaryotes*. CRC Critical Reviews in Biochemistry 17, 45-71
- Deutscher, M.P. (1990) *Ribonucleases, tRNA nucleotidyltransferase, and the 3' processing of tRNA*. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 39, 209-240
- Deutscher, M.P. (1995) *tRNA Processing Nucleases*. In: tRNA: Structure, Biosynthesis and Function, D. Söll and U.L. RajBhandary (Washington, DC, USA: ASM Press), pp. 51 – 65
- Doublet, S., Tabor, S., Long, A.M., Richardson, C.C. and Ellenberger, T. (1998) *Crystal structure of a bacteriophage T7 DNA replication complex at 2.2 Å resolution*. Nature 391, 251-258
- Dunker, A.K. Brown, C.J., Lawson, J.D., Iakoucheva, L. M. and Obradovic, Z. (2002) *Intrinsic Disorder and Protein Function*. Biochemistry 41, 6573-6582
- Edgell, D.R. and Doolittle, W.F. (1997) *Archaea and the origin(s) of DNA replication proteins*. Cell 89, 995-998

- Engelke, D.R., Gegenheimer, P. and Abelson, J. (1985) *Nucleolytic processing of a tRNA Arg-tRNA Asp dimeric precursor by a homologous component from Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Biological Chemistry 260, 1271-1279
- Eom, S.H., Wang, J. and Steitz, T.A. (1996) *Structure of Taq polymerase with DNA at the polymerase active site*. Nature 382, 278-281
- Esnouf, R.M. (1997) *An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities*. Journal of Molecular Graphics and Modeling 15, 112-113, 132-134
- Fiala, G. and Stetter, K.O. (1986) *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. Archives of Microbiology 145, 56-61
- Flores-Rozas, H., Kelman, Z., Dean, F.B., Pan, Z.Q., Harper, J.W., Elledge, S.J., O'Donnell, M. and Hurwitz, J. (1994) *Cdk-interacting protein 1 directly binds with proliferating cell nuclear antigen and inhibits DNA replication catalyzed by the DNA polymerase delta holoenzyme*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91, 8655-8629
- Fortelle, E.D.L. and Bricogne, G. (1997). *Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for the multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods*. Methods in Enzymology 276, 472-494
- Foiani, M., Liberi, G., Lucchini, G. and Plevani, P. (1994) *Cell cycle-dependent phosphorylation and dephosphorylation of the yeast DNA polymerase alpha-primase B subunit*. Molecular and Cellular Biology 15, 883-891
- Franklin, S.E., Zwick, M.G., and Johnson, J.D. (1995) *Characterization and partial purification of two pre-tRNA 5'-processing activities from Daucus carota (carrot) suspension cells*. Plant Journal 7, 553-563
- Frick, D.N. and Richardson, C.C. (2001) *DNA primases*. Annual Reviews in Biochemistry 70, 39-80
- Frishman, D. and Argos, P. (1995) *Knowledge-based protein secondary structure assignment*. Proteins 23, 566-579
- Garber, R.L., and Altman, S. (1979) *In vitro processing of B. mori transfer RNA precursor molecules*. Cell 17, 389-397
- Garber, R.L., and Gage, L.P. (1979) *Transcription of a cloned Bombyx mori tRNA 2 Ala gene: nucleotide sequence of the tRNA precursor and its processing in vitro*. Cell 18, 817-828
- Gary, R., Ludwig, D.L., Cornelius, H.L., MacInnes, M.A. and Park, M.S. (1997) *The DNA Repair Endonuclease XPG Binds to Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and Shares Sequence Elements with the PCNA-binding Regions of FEN-1 and Cyclin-dependent Kinase Inhibitor p21*. Journal of Biological Chemistry 272, 24522 – 24529
- Gray, M.W. (1989) *The evolutionary origins of organelles*. Trends in Genetics 5, 294-299
- Griffith F. (1928) *The Significance of Pneumococcal Types*, Journal für Hygiene 27, 113-159
- Gronostajski, R.M., Field, J. and Hurtwitz, J. (1984) *Purification of a primase activity associated with DNA polymerase from HeLa cells*. Journal of Biological Chemistry 259, 9479–9486
- Gulbis, J.M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (1996) *Structure of the C-terminal region of p21(WAF1/CIP1) complexed with human PCNA*. Cell. 87, 297-306

- Hagenbüchle, O., Larson, D., Hall, G.I., and Sprague, K.U. (1979) *The primary transcription product of a silkworm alanine tRNA gene: identification of in vitro sites of initiation, termination and processing.* Cell 18, 1217-1229
- Hall, P.A., Kearsley, J.M., Coates, P.J., Norman, D.G., Warbrick, E. and Cox, L.S. (1995) *Characterisation of the interaction between PCNA and Gadd45.* Oncogene 1995, 10, 2427-2433
- Hamatake, R.K., Hasegawa, H., Clark, A.B., Bebenek, K., Kunkel, T.A. and Sugino, A. (1990) *Purification and characterization of DNA polymerase II from the yeast Saccharomyces cerevisiae. Identification of the catalytic core and a possible holoenzyme form of the enzyme.* Journal of Biological Chemistry 265, 4072-4083
- Han, S.J. and Kang, H.S. (1997) *Purification and characterization of the precursor tRNA 3'-end processing nuclease from Aspergillus nidulans.* Biochemical and Biophysical Research Communications 233, 354-358
- Hashimoto, H., Nishioka, M., Fujiwara, S., Takagi, M., Imanaka, T., Inoue, T. and Kai, Y. (2001) *Crystal structure of DNA polymerase from hyperthermophilic archaeon Pyrococcus kodakaraensis KOD1.* Journal of Molecular Biology 306, 469-477
- Hegg, L.A. and Thurlow, D.L. (1990) *Cytidines in tRNAs that are required intact by ATP/CTP:tRNA nucleotidyltransferases from Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae.* Nucleic Acids Research 18, 5975-5979
- Hershey A.D. and Chase M. (1952) *Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage.* Journal of Genetics and Physiology 36, 39-56
- Hingorani, M.M. and O'Donnell, M. (2000) *Sliding clamps: a (tail)ored fit.* Current Biology 2000 10, 25-29
- Holm, L. and Sander, C. (1995) *DNA polymerase beta belongs to an ancient nucleotidyltransferase superfamily.* Trends in Biochemical Sciences 20, 345-347
- Holmes, A.M., Cheriathundam, E., Bollum, F.J. and Chang, L.M. (1986) *Immunological analysis of the polypeptide structure of calf thymus DNA polymerase-primase complex.* Journal of Biological Chemistry 261, 11924-11930
- Holmes, A.M., Wietstock, S.M., Ruyechan, W.T. (1988) *Identification and characterization of a DNA primase activity present in herpes simplex virus type 1-infected HeLa cells.* Journal of Virology 62, 1038-1045
- Hopfner, K.P., Eichinger, A., Engh, R.A., Laue, F., Ankenbauer, W., Huber, R. and Angerer, B. (1999) *Crystal structure of a thermostable type B DNA polymerase from Thermococcus gorgonarius.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 96, 3600-3605
- Hosfield, D.J., Mol, C.D., Shen, B. and Tainer, J.A. (1998) *Structure of the DNA repair and replication endonuclease and exonuclease FEN-1: coupling DNA and PCNA binding to FEN-1 activity.* Cell 95,135-146
- Ishino, Y., Komori, K., Cann, I.K. and Koga, Y. (1998) *A novel DNA polymerase family found in Archaea.* Journal of Bacteriology 180, 2232-2236
- Ishino, Y. and Cann, I.K. (1998) *The euryarchaeotes, a subdomain of Archaea, survive on a single DNA polymerase: fact or farce?* Genes and Genetic Systems 73, 323-336
- Ito, J. and Braithwaite, D.K. (1991) *Compilation and alignment of DNA polymerase sequences.* Nucleic Acids Research 19, 4045-4057
- Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R.G., Clark, A.D. Jr, Lu, X., Tantillo, C., Williams, R.L., Kamer, G., Ferris, A.L., Clark, P., Hizi, A., Hughes, S.H. and Arnold, E. (1993) *Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with*

- double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 90, 6320-6324
- Jaenicke, R. and Böhm, G. (1998) *The stability of proteins in extreme environments*. Current Opinion in Structural Biology 8, 738-748
- Jonsson, Z.O. and Hubscher, U. (1997) *Proliferating cell nuclear antigen: more than a clamp for DNA polymerases*. Bioessays 19, 967-975
- Kaguni, L.S., Rossignol, J.M., Conaway, R.C and Lehman, I.R. (1983) *Isolation of an intact DNA polymerase-primase from embryos of Drosophila melanogaster*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 80, 2221-2225
- Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., Yamamoto, S., Sekine, M., Baba, S., Kosugi, H., Hosoyama, A., Nagai, Y., Sakai, M., Ogura, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Ohfuku, Y., Funahashi, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K. and Kikuchi, H. (1998) *Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaeobacterium, Pyrococcus horikoshii OT3*. DNA Research 5, 55-76
- Keck, J.L., Roche, D.D., Lynch, A.S. and Berger, J.M. (2000) *Structure of the RNA polymerase domain of E. coli primase*. Science 287, 2482-2486
- Kelman, Z. (1997) *PCNA: structure, functions and interactions*. Oncogene 14, 629-40
- Kelman, Z. and Hurwitz, J. (1998) *Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism?* Trends in Biochemical Sciences 23, 236-238
- Kelman, Z. and Hurwitz, J. (2000) *A unique organization of the protein subunits of the DNA polymerase clamp loader in the archaeon Methanobacterium thermoautotrophicum deltaH*. Journal of Biological Chemistry 275, 7327-7336
- Kelman, Z. (2000) *DNA replication in the third domain (of life)*. Current Protein and Peptide Science 1, 139-154
- Kim, S.H., Quigley, G.J., Suddath, F.L. McPherson, A., Sneden, D., Kim, J.J. Seeman, N.C., Weinzierl, J. and Rich, A. (1973) *Three-Dimensional Structure of Yeast Phenylalanine Transfer RNA: Folding of the Polynucleotide Chain*. Science, 179, 285-288
- Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J.F., White, O., Nelson, K.E., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Gwinn, M., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Richardson, D.L., Kerlavage, A.R., Graham, D.E., Kyrpides, N.C., Fleischmann, R.D., Quackenbush, J., Lee, N.H., Sutton, G.G., Gill, S., Kirkness, E.F., Dougherty, B.A., McKenney, K., Adams, M.D., Loftus, B., Peterson, S., Reich, C.I., McNeil, L.C., Badger, J.H., Glodek, A., Zhou, L., Overbeek, R., Gocayne, J.D., Weidman, J.F., McDonald, L., Utterback, T., Cotton, M.D., Spriggs, T., Artiach, P., Kaine, B.P., Sykes, S.M., Sadow, P.W., D'Andrea, K.P., Bowman, C., Fujii, C., Garland, S.A., Mason, T.M., Olsen, G.J., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R. and Venter, J.C. (1997) *The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon Archaeoglobus fulgidus*. Nature 390, 364-370
- Kohlstaedt, L.A., Wang, J., Friedman, J.M., Rice, P.A. and Steitz, T.A. (1992) *Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor*. Science 256, 1783-1790
- Kong, X.P., Onrust, R., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (1992) *Three-dimensional structure of the beta subunit of E. coli DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp*. Cell 69, 425-437
- Kraulis, P. J. (1991). *MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures*. Journal of Applied Crystallography 24, 946-950

- Krishna, T.S., Kong, X.P., Gary, S., Burgers, P.M. and Kuriyan, J. (1994) *Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA*. Cell 79, 1233-1243
- Kusakabe, T. and Richardson, C.C. (1996) *The role of the zinc motif in sequence recognition by DNA primases*. Journal of Biological Chemistry 271, 19563-19570
- Lanka, E., Scherzinger, E., Gunther, E. and Schuster, H. (1979) *A DNA primase specified by I-like plasmids*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 76, 3632-3636
- Lecrenier, N. and Foury, F. (2000) *New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man*. Gene 246, 37-48
- Lee, S.H., Pan, Z.Q., Kwong, A.D., Burgers, P.M. and Hurwitz, J. (1991) *Synthesis of DNA by DNA polymerase epsilon in vitro* Journal of Biological Chemistry 266, 22707-22717
- Lehman, I.R. and Kaguni, L.S. (1989) *DNA polymerase alpha*. Journal of Biological Chemistry 264, 4265-4268
- Leipe, D.D., Aravind, L. and Koonin, E.V. (1999) *Did DNA replication evolve twice independently?* Nucleic Acids Research 27, 3389-3401
- Levin, D.S., Bai, W., Yao, N., O'Donnell, M. and Tomkinson, A.E. (1997) *An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 94, 12863-12868
- Levinger, L., Vasisht, V., Greene, V., Bourne, R., and Birk, A., 1995; *Sequence and structure requirements for Drosophila tRNA 5'- and 3'-end processing*. Journal of Biological Chemistry 270, 18903-18909
- Leslie, A.G.W. (1998) MOSFLM version 6.0 (Cambridge)
- Li, F., Wang, J. and Steitz, T. A. (2000) *Sulfolobus shibatae CCA-adding Enzyme Forms a Tetramer upon Binding Two tRNA Molecules: A Scrunching-shuttling Model of CCA Specificity*. Journal of Molecular Biology 304, 483-492
- Li, F., Xiong, Y., Wang, J. Cho, H.D., Tomita, K., Weiner, A.M. and Steitz, T.A. (2002) *Crystal Structures of the Bacillus stearothermophilus CCA-Adding Enzyme and Its Complexes with ATP or CTP*. Cell 111, 815-824
- Litvak, S., Carr, D.S. and Chapeville, F. (1970) *TYMV RNA As a substrate of the tRNA nucleotidyltransferase*. FEBS Letters 11, 316-319
- Liu, L., Komori, K., Ishino, S., Bocquier, A.A., Cann, I.K., Kohda, D. and Ishino, Y. (2001) *The archaeal DNA primase: biochemical characterization of the p41-p46 complex from Pyrococcus furiosus*. Journal of Biological Chemistry 276, 45484-45490
- Longhese, M.P., Jovine, L., Plevani, P. and Lucchini, G. (1993) *Conditional mutations in the yeast DNA primase genes affect different aspects of DNA metabolism and interactions in the DNA polymerase alpha-primase complex*. Genetics 133, 183-191
- MacNeill, S.A. (2001) *Understanding the enzymology of archaeal DNA replication: progress in form and function*. Molecular Microbiology 40, 520-529
- Maréchal-Drouard, L., Weil, J.H. and Dietrich, A. (1993) *Transfer RNAs and transfer RNA genes in plants*. Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology 44, 13-32
- Martin, G. and Keller, W. (1996) *Mutational analysis of mammalian poly(A) polymerase identifies a region for primer binding and catalytic domain, homologous to the family X polymerases, and to other nucleotidyltransferases*. EMBO Journal 15, 2593-2603

- Masiakowski, P. and Deutscher, M.P. (1980a) *Dissection of the active site of rabbit liver tRNA nucleotidyltransferase. Specificity and properties of the tRNA and acceptor subsites determined with model acceptor substrates.* Journal of Biological Chemistry 255, 11233-11239
- Masiakowski, P. and Deutscher, M.P. (1980b) *Dissection of the active site of rabbit liver tRNA nucleotidyltransferase. Specificity and properties of subsites for donor nucleotide triphosphates.* Journal of Biological Chemistry 255, 11240-11246
- Matsumiya, S., Ishino, Y. and Morikawa, K. (2001) *Crystal structure of an archaeal DNA sliding clamp: proliferating cell nuclear antigen from Pyrococcus furiosus.* Protein Science 10, 17-23
- Matsuoka, S. M Yamaguchi. M. and Matsukage, A. (1994) *D-type cyclin-binding regions of proliferating cell nuclear antigen.* Journal of Biological Chemistry 269, 11030-11036
- Merrit, E.A. & Murphy, M.E.P. (1994) *Raster3D Version 2.0 A program for photorealistic molecular graphics.* Acta Crystallographica section D 50, 869-873
- Miller, M.R., Ulrich, R.G., Wang, T.S. and Korn, D. (1985) *Monoclonal antibodies against human DNA polymerase-alpha inhibit DNA replication in permeabilized human cells.* Journal of Biological Chemistry 260, 134-138
- Moarefi, I., Jeruzalmi, D., Turner, J., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (2000) *Crystal structure of the DNA polymerase processivity factor of T4 bacteriophage.* Journal of Molecular Biology 296, 1215-1223
- Mörl, M. and Marchfelder, A. (2001) *The final cut. The importance of tRNA 3'-processing.* EMBO Reports 2, 17-20
- Murakami, Y., Wobbe, C.R., Weissbach, L., Dean, F.B. and Hurwitz, J. (1986) *Role of DNA polymerase alpha and DNA primase in simian virus 40 DNA replication in vitro.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 83, 2869-2873
- Nasheuer, H.P. and Grosse, F. (1988) *DNA polymerase alpha-primase from calf thymus. Determination of the polypeptide responsible for primase activity.* Journal of Biological Chemistry 263, 8981-8988
- Nashimoto, M. (1995) *Conversion of mammalian tRNA 3' processing endoribonuclease to four-base-recognizing RNA cutters.* Nucleic Acids Research 23, 3642-3647
- Nicholls, A., Sharp, K.A. and Honig, B. (1991) *Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons.* Proteins 11, 281-296
- Ollis, D.L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N.G. and Steitz, T.A. (1985a) *Structure of large fragment of Escherichia coli DNA polymerase I complexed with dTMP.* Nature 313, 762-766
- Ollis D.L., Kline, C. and Steitz, T.A. (1985b) *Domain of E. coli DNA polymerase I showing sequence homology to T7 DNA polymerase.* Nature, 313; 818-819
- Oommen, A., Li, X.Q. and Gegenheimer, P. (1992) *Cleavage specificity of chloroplast and nuclear tRNA 3'-processing nucleases.* Molecular and Cellular Biology 12, 865-875
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode.* Methods in Enzymology 276, 307-326
- Pan, H. and Wigley, D.B. (2000) *Structure of the zinc-binding domain of Bacillus stearothermophilus DNA primase.* Structure with Folding and Design 8, 231-239
- Papadimitriou, A. and Gross, H.J. (1996) *Pre-tRNA 3'processing in Saccharomyces cerevisiae: purification and characterization of exo- and endoribonucleases.* European Journal of Biochemistry 242, 747-759

- Pelletier, H., Sawaya, M.R., Kumar, A., Wilson, S.H. and Kraut, J. (1994) *Structures of ternary complexes of rat DNA polymerase beta, a DNA template-primer, and ddCTP*. Science 264, 1891-903
- Plevani, P., Foiani, M., Valsasnini, P., Badaracco, G., Cheriathundam, E. and Chang, L.M. (1985) *Polypeptide structure of DNA primase from a yeast DNA polymerase-primase complex*. Journal of Biological Chemistry 260, 7102-7107
- Podobnik, M., McInerney, P., O'Donnell, M. and Kuriyan, J. (2000) *A TOPRIM domain in the crystal structure of the catalytic core of Escherichia coli primase confirms a structural link to DNA topoisomerases*. Journal of Molecular Biology 300, 353-362
- Prelich, G., Kostura, M., Marshak, D.R., Mathews, M.B. and Stillman, B. (1987a) *The cell-cycle regulated proliferating cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro*. Nature 326, 471-475
- Prelich, G., Tan, C.K., Kostura, M., Mathews, M.B., So, A.G., Downey, K.M. and Stillman, B. (1987b) *Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein*. Nature 326, 517-520
- Ray, B.K. and Apirion, D. (1981a) *RNAase P is dependent on RNAase E action in processing monomeric RNA precursors that accumulate in an RNAase E - mutant of Escherichia coli*. Journal of Molecular Biology 149, 599-617
- Ray, B.K. and Apirion, D. (1981b) *Transfer RNA precursors are accumulated in Escherichia coli in the absence of RNase E*. European Journal of Biochemistry 114, 517-524
- Reichert, A., Rothbauer, U. and Mörl, M. (1998) *Processing and editing of overlapping tRNAs in human mitochondria*. Journal of Biological Chemistry 273, 31977-31984
- Reichert, A.S. and Mörl, M. (2000) *Repair of tRNAs in metazoan mitochondria*. Nucleic Acids Research 28, 2043-2048
- Reichert, A.S., Thurlow, D.L. and Mörl, M. (2001) *A eubacterial origin for the human tRNA nucleotidyltransferase?* Biological Chemistry 382, 1431-1438
- Reuven, N.B. and Deutscher, M.D. (1993) *Multiple exoribonucleases are required for the 3' processing of Escherichia coli tRNA precursors in vivo*. FASEB Journal 7, 143-148
- Rodriguez, A.C., Park, H.W., Mao, C. and Beese, L.S. (2000) *Crystal structure of a pol alpha family DNA polymerase from the hyperthermophilic archaeon Thermococcus sp. 9 degrees N-7*. Journal of Molecular Biology 299, 447-462
- Rowen, L. and Kornberg, A. (1978) *A ribo-deoxyribonucleotide primer synthesized by primase*. Journal of Biological Chemistry 253, 770-774
- Russell, R.J., Ferguson, J.M., Hough, D.W., Danson, M.J. and Taylor, G.L. (1997) *The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon Pyrococcus furiosus at 1.9 A resolution*. Biochemistry 36, 9983-9994
- Santocanale, C., Foiani, M., Lucchini, G. and Plevani, P. (1993) *The isolated 48,000-dalton subunit of yeast DNA primase is sufficient for RNA primer synthesis*. Journal of Biological Chemistry 268, 1343-1348
- Sawaya, M.R., Pelletier, H., Kumar, A., Wilson, S.H. and Kraut, J. (1994) *Crystal structure of rat DNA polymerase beta: evidence for a common polymerase mechanism*. Science 264, 1930-1935
- Sawaya, M.R., Prasad, R., Wilson, S.H., Kraut, J. and Pelletier, H. (1997) *Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism*. Biochemistry 36, 11205-11215
- Schneider, A., Smith, R.W., Kautz, A.R., Weissart, K., Grosse, F. and Nasheuer, H.P. (1998) *Primase activity of human DNA polymerase alpha-primase. Divalent cations stabilize*

- the enzyme activity of the p48 subunit.* Journal of Biological Chemistry 273, 21608-21615
- Schürer, H., Shiffer, s., Marchfelder, A. and Mörl, M. (2001) *This Is the End: Processing, Editing and Repair at the tRNA 3'-Terminus.* Biological Chemistry 382, 1147-1156
- Shamoo, Y. and Steitz, T.A. (1999) *Building a replisome from interacting pieces: sliding clamp complexed to a peptide from DNA polymerase and a polymerase editing complex.* Cell 99, 155-166
- Shi, P.Y., Maizels, N. and Weiner, A.M. (1998a) *CCA addition by tRNA nucleotidyltransferase: polymerization without translocation?* EMBO Journal 17, 3197-3206
- Shi, P.Y., Weiner, A.M. and Maizels, N. (1998b) *A top-half tDNA minihelix is a good substrate for the eubacterial CCA-adding enzyme.* RNA 4, 276-284
- Singh, K. and Modak, M.J. (1998) *A unified DNA- and dNTP-binding mode for DNA polymerases.* Trends in Biochemical Sciences 23, 277-281
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M. and Fornace, A.J. (1994) *Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen.* Science 266, 1376-1380
- Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D. and Reeve, J.N. (1997) *Complete genome sequence of Methanobacterium thermoautotrophicum deltaH: functional analysis and comparative genomics.* Journal of Bacteriology 179, 7135-7155
- Solari, A. and Deutscher, M.P. (1983) *Identification of multiple RNases in Xenopus laevis oocytes and their possible role in tRNA processing.* Molecular and Cellular Biology 3, 1711-1717
- Söll, D. and RajBhandary, U.L. (1995) *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* (Washington, DC, USA: ASM Press)
- Stadlbauer, F., Brueckner, A., Rehfuess, C., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Forster, V., Tseng, B.Y. and Nasheuer, H.P. (1994) *DNA replication in vitro by recombinant DNA-polymerase-alpha-primase.* European Journal of Biochemistry 222, 781-793
- Stange, N., Beier, D. and Beier, H. (1991) *Expression of nuclear tRNA Tyr genes from Arabidopsis thaliana in HeLa cell and wheat germ extracts.* Plant Molecular Biology 16, 865-875
- Steitz, T.A., Smerdon, S.J., Jager, J. and Joyce, C.M. (1994) *A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases.* Science 266, 2022-2025
- Steitz, T.A. (1999) *DNA polymerases: structural diversity and common mechanisms.* Journal of Biological Chemistry 274, 17395-17398
- Strack, B., Lessl, M., Calendar, R. and Lanka, E. (1992) *A common sequence motif, -E-G-Y-A-T-A-, identified within the primase domains of plasmid-encoded I- and P-type DNA primases and the alpha protein of the Escherichia coli satellite phage P4.* Journal of Biological Chemistry 267, 13062-13072
- Stucki, M., Stagljar, I., Jonsson, Z.O. and Hübscher, U. (2001) *A coordinated interplay: proteins with multiple functions in DNA replication, DNA repair, cell cycle/checkpoint control, and transcription.* Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 65, 261-298

- Sutton, M.D. and Walker, G.C. (2001) *Managing DNA polymerases: Coordinating DNA replication, DNA repair, and DNA recombination* Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98, 8342-8349
- Taanman, J.W. (1999) *The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication*. Biochimica et Biophysica Acta 1410, 103-123
- Tan, C.K., Castillo, C., So, A.G. and Downey, K.M. (1986) *An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus*. Journal of Biological Chemistry 261, 12310-12316
- Takisawa, H., Mimura, S. and Kubota, Y. (2000) *Eukaryotic DNA replication: from pre-replication complex to initiation complex*. Current Opinion in Cell Biology 12, 690-696
- Terwilliger, T.C. and Berendzen, J. (1999) *Automated MAD and MIR structure solution*. Acta Crystallographica section D 55, 849-861
- Tomari, Y., Suzuki, T., Watanabe, K. and Ueda, T. (2000) *The role of tightly bound ATP in Escherichia coli tRNA nucleotidyltransferase*. Genes to Cells 5, 689-698
- Tseng, B.Y. and Ahlem, C.N. (1983) *A DNA primase from mouse cells. Purification and partial characterization*. Journal of Biological Chemistry 258, 9845-9849
- Tsurimoto, T. (1998) *PCNA, a multifunctional ring on DNA*. Biochimica et Biophysica Acta 1443, 23-39
- Turk, D. (1996) *An interactive software for density modifications, model building, structure refinement and analysis*. In Bourne, P.E. and Watenpaugh, K. (eds.), Proceedings from the 1996 Meeting of the International Union of Crystallography Macromolecular Computing School
- Uemori, T., Sato, Y., Kato, I., Doi, H. and Ishino, Y. (1997) *A novel DNA polymerase in the hyperthermophilic archaeon, Pyrococcus furiosus: gene cloning, expression, and characterization*. Genes to Cells 2, 499-512
- Umar, A., Buermeier, A.B., Simon, J.A., Thomas, D.C., Clark, A.B., Liskay, R.M. and Kunkel, T.A. (1996) *Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis*. Cell 87, 65-73
- Vogt, G. and Argos, P. (1997) *Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing?* Folding & Design 2, S40-S46
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. and Stillman, B. (1994) *The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA*. Nature 369, 574-578
- Waga, S. and Stillman, B. (1998) *The DNA replication fork in eukaryotic cells*. Annual Reviews in Biochemistry 67, 721-751
- Wang, T.S. (1991) *Eukaryotic DNA polymerases*. Annual Reviews in Biochemistry 60, 513-552
- Wang, J., Sattar, A.K., Wang, C.C., Karam, J.D., Konigsberg, W.H. and Steitz, T.A. (1997) *Crystal structure of a pol alpha family replication DNA polymerase from bacteriophage RB69*. Cell 89, 1087-1099
- Warbrick, E. (1998) *PCNA binding through a conserved motif*. Bioessays 20, 195-199
- Watson, J.D. and Crick, F.H.C. (1953) *A structure for Deoxyribose Nucleic Acid*, Nature 171, 737
- Wilkins, B.M., Boulnois, G.J. and Lanka, E. (1981) *A plasmid DNA primase active in discontinuous bacterial DNA replication*. Nature 290, 217-221

- 
- Wong, S.W., Wahl, A.F., Yuan, P.M., Arai, N., Pearson, B.E., Arai, K., Korn, D., Hunkapiller, M.W. and Wang, T.S. (1988) *Human DNA polymerase alpha gene expression is cell proliferation dependent and its primary structure is similar to both prokaryotic and eukaryotic replicative DNA polymerases*. EMBO Journal 7, 37-47
- Xiong, Y., Zhang, H. and Beach, D. (1992) *D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA*. Cell 71, 505-514
- Yasueda, H., Horii, T. and Itoh, T. (1989) *Structural and functional organization of ColE2 and ColE3 replicons*. Molecular and General Genetics 215, 209-216
- Yue, D., Maizels, N. and Weiner, A.M. (1996) *CCA-adding enzymes and poly(A) polymerases are all members of the same nucleotidyltransferase superfamily: characterization of the CCA-adding enzyme from the archaeal hyperthermophile Sulfolobus shibatae*. RNA 2, 895-908
- Yue, D., Weiner, A.M. and Maizels, N. (1998) *The CCA-adding enzyme has a single active site*. Journal of Biological Chemistry 273, 29693-29700.
- Zhao, Y., Jeruzalmi, D., Moarefi, I., Leighton, L., Lasken, R. and Kuriyan, J. (1999) *Crystal structure of an archaeobacterial DNA polymerase*. Structure 7, 1189-1199
- Zhu, L.Q., Cudney, H. and Deutscher, M.P. (1986) *A mutation in Escherichia coli tRNA nucleotidyltransferase that affects only AMP incorporation in a sequence often associated with nucleotide-binding proteins*. Journal of Biological Chemistry 261, 14875-14877
- Zhu, L. and Deutscher, M.P. (1987) *tRNA nucleotidyltransferase is not essential for Escherichia coli viability*. EMBO Journal 6, 2473-2477