

Struktur, Funktion und Evolution von armlosen mitochondrialen tRNAs

Transfer RNAs (tRNAs) übernehmen eine wichtige Rolle bei der Proteinbiosynthese, indem sie die spezifischen Aminosäuren für die schrittweise Synthese der Peptidkette bereitstellen und somit als Bindeglied zwischen dem genetischen Code der Boten-RNA (mRNA) und der Aminosäuresequenz der Proteine fungieren. tRNAs besitzen eine charakteristische hoch konservierte Struktur. Die Sekundärstruktur ähnelt einem Kleeblatt, das aus vier Domänen besteht: dem Akzeptor-Stamm, dem D-Arm, dem Anticodon-Stamm, und dem T-Arm. Die Tertiärstruktur gleicht dem Buchstaben L. Sekundär- und Tertiärstruktur werden von zahlreichen Reifungs- und Modifikationsenzymen erkannt, sowie von spezifischen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, welche die tRNAs mit der passenden Aminosäure beladen. In Eukaryonten sind die tRNA Reifungs- und Aminoacylierungsprozesse nicht nur auf den Zellkern beschränkt, sondern finden auch in Organellen wie Chloroplasten und Mitochondrien statt. Mitochondrien kodieren einen zusätzlichen Satz von tRNAs in ihrem eigenen Genom und besitzen dementsprechend eine eigene Translationsmaschinerie.

Viele mitochondriale tRNAs haben eine reduzierte Größe und typische Strukturelemente sind teilweise oder komplett verloren gegangen. Ein extremer Fall dieser minimalisierten tRNAs wurde in den Mitochondrien von Nematoden gefunden. Diesen neu entdeckten tRNAs fehlen sowohl der D-Arm, als auch der T-Arm. Sie wurden deshalb „armlose“ tRNAs genannt. Der Rundwurm *Romanomermis culicivorax* ist ein typischer Vertreter, der solche armlosen tRNAs besitzt.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung von armlosen tRNAs. Dabei wurden vor allem ihre strukturellen Eigenschaften und ihrer Funktionalität, insbesondere in Bezug auf ihre Interaktion mit Partnerproteinen, wie der tRNA-Nukleotidyltransferase (CCA-addierendes Enzym) und einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase untersucht (aaRS). Zunächst wurde die Struktur von zwei tRNAs mit Hilfe von enzymatischen und chemischen Probing, der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und der Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) analysiert. Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen, dass armlose tRNAs eine Haarnadel-ähnliche Sekundärstruktur bilden, die sich aus zwei Helix mit klassischen Watson-Crick

Basenpaarungen zusammensetzt. Die zwei Helix werden durch eine zentrale Ausbuchtung getrennt, die keine spezifischen internen tertiären Basenpaarungen enthält. Wir nehmen aufgrund der konstruierten 3D-Struktur eine größere Flexibilität für die Interaktion mit Partnerproteinen an.

In dieser Studie wurden zum ersten Mal rekombinante Proteine aus *R. culicivorax*, nämlich das CCA-addierenden Enzyme und die mitochondriale ArgRS, exprimiert und gereinigt. Sequenz und Struktur beide Proteine ähneln mehr ihren eukaryotischen als bakteriellen Homologen, insbesondere denen aus anderen Nematoden. Allerdings konnten wir auch strukturelle Veränderungen für beide Enzyme feststellen, welche eine Anpassung an die armlosen tRNAs darstellen könnte.

Die Ergebnisse zeigen, dass das CCA-addierenden Enzym in der Lage ist, sowohl armlose als auch klassische tRNAs zu erkennen und zu prozessieren. Aminoacylierungstests wurden mit dem gereinigten ArgRS Enzym durchgeführt. Das Enzym zeigte unter den getesteten Bedingungen jedoch weder mit den armlosen tRNAs noch mit klassischen tRNAs Enzymaktivität.