



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

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

Im letzten Jahrzehnt gab es wichtige technologische Entwicklungen im Bereich der Strukturbiochemie, insbesondere in der Röntgenkristallographie. Die Einführung von linearen Elektronenbeschleunigern, den sogenannten XFEL-Lasern (X-ray Free Electron Lasers), stellt eine echte Revolution zur Erforschung der enzymatischen Katalyse auf atomarer Ebene dar. Auf der Grundlage der seriellen zeitaufgelösten Röntgenkristallografie wird dieses System zur Verfolgung und Überwachung chemischer und biologischer Reaktionen im Femto- bis Mikrosekundenbereich eingesetzt (Chapman et al., 2011). Unter dem Eindruck dieser Technologie begannen Synchrotrons der neuen Generation mit der Entwicklung von Biokristallographie-Strahlrohren für zeitaufgelöste Experimente, wie z. B. das T-REXX-Strahlrohr am DESY-Synchrotron (Hamburg) (Pearson & Mehrabi, 2020).

Ziel dieses PhD-Projekts ist die Entwicklung einer reproduzierbaren Pipeline für die Probenvorbereitung und -charakterisierung, die für zeitaufgelöste serielle Kristallographieexperimente geeignet ist. Unser Schwerpunkt liegt auf tRNA-Nukleotidyltransferasen oder CCA-addierenden Enzymen, die die sequentielle Addition des CCA-Trinukleotids an die 3'-Position von tRNAs katalysieren. Diese Reaktion ist von entscheidender Bedeutung, da das CCA-Ende der universelle Ort für die Bindung von Aminosäuren an tRNAs ist, die sie dann zum Ribosom transportieren. Diese Nukleotidyltransferasen unterscheiden sich von allen anderen Polymerasen, da sie keine Nukleotidvorlage benötigen, um ihre Aufgabe zu erfüllen (Augustin et al., 2003).

Um die verschiedenen Schritte der CCA-Addition zu erforschen und Momentaufnahmen zu erhalten, wählten wir eine Reihe von drei verschiedenen Klasse-II-Enzymen aus. Unser erster Kandidat war das CCA-addierende Enzym des psychrophilen Bakteriums *Planococcus halocryophilus* (PhaCCA), das bei hoher Salzkonzentration und negativen Temperaturen im arktischen Permafrost lebt (Mykytczuk et al., 2013). Der zweite Kandidat wurde in dem Moskito-Spulwurm-Parasiten *Romanomeris culicivorax* (RcuCCA) identifiziert, dem Organismus mit den kleinsten jemals beobachteten funktionellen tRNAs (von 42 bis 46 Nukleotiden) (Jühling et al., 2018). Unser letzter Kandidat schließlich entsprach einem potenziellen letzten gemeinsamen Vorfahren (AncCCA) des Enzyms der Gammaproteobakteriengruppe, das von meinem Team in Leipzig entwickelt wurde.

Zunächst mussten wir die biochemischen Eigenschaften ausgewählter Enzyme bestimmen. Da die Studie bereits für PhaCCA und AncCCA durchgeführt wurde, konnte ich mich an der Untersuchung von RcuCCA beteiligen, das in der Lage ist, minimale tRNAs zu verarbeiten, denen sowohl der T- als auch der D-Arm fehlt. Während herkömmliche tRNA:Nukleotidyltransferase-Komplexe eine Interaktion und Verankerung am T-Arm der tRNA zeigen (Weiner, 2004), galt die Hauptfrage den Elementen von RcuCCA, die die Spezifität für solche Nicht-Standardsubstrate verleihen. Die Studie umfasste das menschliche (HsaCCA) und das *Escherichia coli* (EcoCCA) als



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

Sobald die biochemischen Eigenschaften eines Enzyms feststehen, können die Kristallisationsversuche beginnen. Einerseits versuchten wir, große Kristalle zu züchten, die für die "traditionelle" Synchrotronanalyse geeignet sind. Andererseits ging es darum, mikrokristalline Proben für die neue Generation serieller Röntgenkristallografie-Experimente herzustellen. Bei dieser Untersuchung kombinierten wir konventionelle Methoden, d. h. Dampfdiffusion in Mikrotiterplatten, Mikroaussaat und Batch, mit fortschrittlicheren Methoden, die in dieser Arbeit beschrieben werden. Bei einer dieser Techniken kam ein mikrofluidisches Gerät namens ChipX zum Einsatz, das von meinem Labor in Straßburg entwickelt wurde. ChipX wurde für Gegendiffusionsexperimente entwickelt und ermöglicht das Screening von acht verschiedenen Kristallisationsmitteln in einem breiten Konzentrations- und Übersättigungsbereich. Darüber hinaus kann ChipX direkt bei Raumtemperatur an Standard-Synchrotron-Anlagen eingesetzt werden. Auf der Grundlage des Konzepts der seriellen Kristallographie sammelten wir mehrere Datensätze zu einer Auswahl von Kristallen und kombinierten die Daten, um die Struktur des Makromoleküls zu rekonstruieren. Die endgültige Version von ChipX wurde im IUCr Journal vorgestellt, wo die Struktur von psychrophilem PhaCCA in seiner apo-Form sowie mit nicht hydrolisierbarem CMPcPP gelöst wurde (de Wijn et al., 2019). Darüber hinaus haben wir ein benutzerfreundliches Protokoll für alle Kristallzüchter ausgearbeitet, die mit solchen Geräten nicht vertraut sind. In einem Video, das im Journal of Visualized Experiments veröffentlicht wurde, haben wir gezeigt, wie man mit wenigen Mikrolitern Makromoleküllösung und einer grundlegenden Laborausüstung in wenigen Minuten einen ChipX herstellt und ihn für die Datenerfassung an einer Standard-Synchrotron-Strahlführung verwendet (de Wijn et al., 2021).

Jahrzehntelang bestand ein wesentlicher Engpass und zeitaufwändiger Schritt bei der Kristallisation darin, das genaue Phasendiagramm eines Makromoleküls zu bestimmen, ohne den Gleichgewichtsprozess im Kristallisationstropfen vollständig kontrollieren zu können. Mit dem steigenden Bedarf an Mikro- und Nanokristallen für Synchrotrons und XFELs hat unser Labor in Zusammenarbeit mit der Firma Xtal concept (Hamburg) und dem Team von Pr. Dr. Christian Betzel die Xtal Controller (XC900) Technologie erworben, die es ermöglicht, (1) durch kontrollierte Injektion von Kristallisationsmittel und Wasser in das Phasendiagramm zu navigieren, (2) dank des integrierten DLS-Moduls (Dynamic Light Scattering) erste Keimbildungsereignisse in einem Kristallisationstropfen zu erkennen und zu überwachen, (3) wachsende Kristalle im Versuchstropfen mit einem Mikroskop in Verbindung mit einer CCD-Kamera zu visualisieren. Anhand von PhaCCA und Lysozym aus Hühnereiweiß in Kombination mit Tb-Xo4 als Keimbildner konnten wir zeigen, dass wir (1) die frühe Bildung von Keimen effizient verfolgen können, (2) die Produktion von gut beugenden Kristallen kontrollieren können, indem wir auf Kristallisations-/Auflösungszyklen anspielen, (3) reproduzierbare Bedingungen schaffen können, um stabile nano- bis mikrokristalline



Proben zu erhalten, die für zeitaufgelöste Experimente geeignet sind. Alle diese Ergebnisse wurden gesammelt und in der Zeitschrift *Crystals* in 2020 veröffentlicht (de Wijn et al., 2020).

Es ist wichtig zu erwähnen, dass sowohl in Leipzig als auch in Straßburg viel Zeit auf die Optimierung der Vorbereitung und Reinigung der drei für das Projekt ausgewählten Enzyme sowie der in vitro transkribierten tRNAs verwendet wurde. Darüber hinaus wurden alle im Straßburger Team verfügbaren Kristallisationsmethoden für Kristallisationsversuche eingesetzt. Ein besonderes Augenmerk wurde auf AncCCA gelegt, das an der PX2A-Beamline (Soleil-Synchrotron, Saint-Aubin) zunächst Kristalle bildete, die sich bei 6 bis 7 Å schlecht beugten. Für dieses Projekt hatten wir als Erstnutzer Zugang zu einem kürzlich an der PROXIMA2A-Beamline (Synchrotron SOLEIL, Saint-Aubin) entwickelten Plate-Screener-System für serielle In-situ-Experimente bei Raumtemperatur (Jeangerard et al., 2018). Dieses neue System hilft bei der schnellen Identifizierung von Bedingungen, die zu gut beugenden Kristallen führen, ohne dass die Kristalle direkt gehandhabt, montiert und im Blitzlicht gekühlt werden müssen. Trotz aller Bemühungen haben wir bisher noch keine Beugung mit einer Auflösung von weniger als 6 Å erreicht, aber einige Verbesserungen sind noch im Gange.

Der letzte Schritt unserer Pipeline ergänzt die zeitaufgelösten Experimente. Sie zielt darauf ab, "eingefrorene" Strukturen ausgewählter Enzyme zu bestimmen, um (1) die Gesamtarchitektur des Proteins besser zu verstehen; (2) Eigenschaften des Enzyms auf atomarer Ebene zu identifizieren; (3) als Modell für den molekularen Ersatz in zeitaufgelösten Experimenten zu dienen. Da wir fünf Kristallstrukturen von PhaCCA mit hoher Auflösung (bis zu 1,8 Å) sowohl in seiner apo-Form als auch im Komplex mit CTP lösen konnten, haben wir diese Informationen mit . Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen des Leipziger Teams Um die zugrunde liegenden Kälteanpassungsmechanismen dieses Enzyms besser zu verstehen. Der Haupttrend zur Kälteanpassung besagt, dass eine erhöhte Flexibilität dem Enzym die Fähigkeit verleihen sollte, seine Aufgabe bei niedrigen Temperaturen zu erfüllen. Diese Einschätzung ist mit der für PhaCCA nachgewiesenen Aktivität mit verringerter Treue vereinbar (Ernst et al., 2018). Um die genauen strukturellen Merkmale dieses Proteins zu bestimmen, verglichen wir es mit dem eng verwandten Analogon aus dem thermophilen *Geobacillus stearothermophilus* (GstCCA). Wie erwartet zeigten unsere Ergebnisse eine insgesamt erhöhte Flexibilität von PhaCCA, die sich hauptsächlich auf die nicht konservierte C-terminale Seite auswirkt, wo eine geringere Anzahl (14%) von Sekundärstrukturen beobachtet wurde. Darüber hinaus verliert das N-terminale Motiv C, das als Federelement für die Neuausrichtung der Kopf-Hals-Domäne während des Nukleotidwechsels fungiert, ein Helix-Capping-Element, das normalerweise auf Helix $\alpha 5$ beobachtet wird. Zusammengefasst haben unsere hochauflösenden Strukturen Anpassungsstrategien aufgezeigt, die von RNA-Polymerasen unter extremen Kältebedingungen genutzt werden. Unsere Ergebnisse wurden im *Computational and Structural Biotechnology Journal* veröffentlicht (de Wijn et al., 2021).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Doktorarbeit ein Ensemble von Werkzeugen und Strategien, die in der Kristallogenie verfügbar sind, angewandt wurde, um die Struktur und Funktion von drei CCA-addierenden Enzymen der Klasse II durch Röntgenkristallographie zu charakterisieren. Insbesondere im Fall von AncCCA und RcuCCA sind noch Verbesserungen erforderlich. Unsere vielversprechenden Ergebnisse sollten uns jedoch bald zu einem weiteren Schritt führen, nämlich zur Anwendung neuer serieller Kristallographieprotokolle dank Synchrotron- und XFEL-Strahlung, um einen molekularen Film der 3'CCA-Addition in Echtzeit zu erstellen und die Wirkung dieser faszinierenden Polymerasen mit großen atomaren Details zu dokumentieren.