

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Biochemie und
chemischer Mechanismus
der Thiomethylierung von RNA**

Dorothea Maria Sophia Matschkal
aus
Moosburg a. d. Isar
Deutschland

2014

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	5
2 Summary	7
3 Einleitung	9
3.1 Modifikationen der Ribonukleinsäure	9
3.1.1 Allgemeines	9
3.1.2 Modifizierte Basen in der transfer-RNA	10
3.1.3 Die Isopentenyl-Modifikation	11
3.2 Radikal-SAM-Enzyme	14
3.2.1 Allgemeines	14
3.2.2 Strukturelle Gemeinsamkeiten	15
3.2.3 Methyltransferasen	17
3.2.3.1 Übersicht	17
3.2.3.2 Die Enzyme RlmN und Cfr	18
3.2.4 Methylthiotransferasen	20
3.2.4.1 Übersicht	20
3.2.4.2 Struktureller Aufbau	22
3.2.4.3 Biosynthese von ms ² 6A	24
3.2.4.4 Postulierter Mechanismus der Thiomethylierung	26
4 Aufgabenstellung	29
5 Isolierung von mRNA über die 5'-Cap-Struktur	31
5.1 Methoden zur Aufreinigung von mRNA	31
5.2 Expressionsplasmid von eIF4E _{K119A}	32
5.3 Überexpression und Aufreinigung von eIF4E _{K119A}	33
5.4 Aufreinigung von mRNA	35
6 Humanes Homolog der Methylthiotransferase MiaB	37
6.1 Bioinformatische Analyse	37
6.2 Komplementationsassay	39
6.2.1 Prinzip des Komplementationsassays	39
6.2.2 Allgemeine Methode zur Quantifizierung von RNA-Modifikationen	39
6.2.3 Herstellung des Expressionsplasmids	41
6.2.4 Überexpression von CDK5RAP1_v2 in <i>E. coli</i> ΔmiaB	42
6.2.5 Auswertung	42
6.3 siRNA-Knockdown	45
6.3.1 Prinzip des siRNA-Knockdowns	45
6.3.2 Auswertung	46
6.4 Subzelluläre Lokalisation der CDK5RAP1-Varianten	47
6.5 Das humane Protein CDK5RAP1_v2	49
6.5.1 Überexpression von Strep-CDK5RAP1_v2	49

6.5.2	Klonierung des Expressionsplasmids pDEST008_TEV_CDK5RAP1_v2.....	49
6.5.3	Überexpression und Aufreinigung von MBP-CDK5RAP1_v2.....	50
6.5.4	Aktivitätsassay.....	52
7	Untersuchungen der Methylthiotransferase MiaB.....	53
7.1	MiaB aus <i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	53
7.2	Klonierung und Expression von <i>H. th. MiaB</i>	55
7.3	Aerobe Aufreinigung von <i>H. th. MiaB</i>	56
7.4	Anaerobe Aufreinigung von <i>H. th. MiaB</i>	58
7.5	Charakterisierung des Eisen-Schwefel-Cluster.....	59
7.6	Aktivitätsassays.....	60
7.6.1	Assays mit Gesamt-RNA.....	60
7.6.2	Assays mit RNA-Hairpin.....	61
7.7	Die mechanistische Fragestellung.....	63
7.7.1	Stand der Wissenschaft.....	63
7.7.2	Neu postulierter Mechanismus.....	63
7.7.3	Nachweis von Dehydroalanin.....	65
7.7.4	Kontrollexperiment.....	70
7.7.4.1	Klonierung des Expressionsplasmids pDEST007_TEV_HthMiaB.....	70
7.7.4.2	Überexpression und Aufreinigung von Strep-HthMiaB.....	71
7.7.4.3	Analyse.....	72
7.7.5	Markierungsexperiment.....	72
8	Experimenteller Teil.....	75
8.1	Allgemeine Chemikalien und Lösungen.....	75
8.2	Geräte.....	75
8.3	DNA- und Protein-Standard.....	77
8.4	Plasmide mit Inserts.....	77
8.5	Plasmide ohne Inserts.....	78
8.6	Oligonukleotide.....	78
8.7	Bakterienstämme und Zelllinien.....	79
8.8	Enzyme.....	80
8.9	Puffer.....	80
8.9.1	RNA-Aufreinigung.....	80
8.9.2	RNA-Verdau.....	81
8.9.3	RNA-Analytik.....	81
8.9.4	RNA-Agarosegel-Elektrophorese.....	81
8.9.5	DNA-Aufreinigung.....	81
8.9.6	DNA-Agarosegel-Elektrophorese.....	81
8.9.7	Protein-Aufreinigung.....	82
8.9.8	SDS-Gelelektrophorese.....	83
8.9.9	Western Blot.....	83
8.10	Lösungen.....	83

8.10.1	SDS-Gelelektrophorese.....	83
8.10.2	Western Blot.....	84
8.10.3	Proteininduktion.....	84
8.11	Medien.....	84
8.12	Antibiotika (1000x Stocklösung).....	85
8.13	Mikrobiologische Methoden.....	86
8.13.1	Herstellen von chemisch kompetenten Zellen.....	86
8.13.2	Transformation in chemisch-kompetente <i>E. coli</i> -Zellen.....	86
8.13.3	Bakterien-Übernachtskultur.....	86
8.14	Molekularbiologische Methoden.....	87
8.14.1	Primer Design.....	87
8.14.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	87
8.14.2.1	Amplifikation von DNA.....	87
8.14.2.2	Überprüfung der Mutanten.....	88
8.14.3	DNA-Agarosegelelektrophorese.....	89
8.14.4	Reinigung und Isolierung von DNA.....	89
8.14.4.1	Reinigung der DNA nach der PCR.....	89
8.14.4.2	Mini-Plasmidpräparation.....	89
8.14.5	Gerichtete Topo-Klonierung.....	90
8.14.6	Gateway-Klonierung.....	91
8.14.7	Restriktion von DNA.....	92
8.14.8	Sequenzierung.....	92
8.14.9	RNA Isolierung.....	92
8.14.9.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	93
8.14.9.2	Isolierung von tRNA.....	93
8.14.9.3	Isolierung von polyA-RNA.....	94
8.14.9.4	Isolierung von 5'-gecappter mRNA.....	94
8.14.10	RNA-Agarosegelelektrophorese.....	95
8.15	Zellbiologische Methoden.....	96
8.15.1	siRNA-Knockdown.....	96
8.15.2	Subzelluläre Lokalisation der CDK5RAP1-Varianten.....	96
8.16	Proteinchemische Methoden.....	97
8.16.1	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	97
8.16.2	Komplementationsassay.....	97
8.16.3	Zellaufschluss unter aeroben Bedingungen.....	98
8.16.4	Arbeiten unter anaeroben Bedingungen.....	98
8.16.5	Zellaufschluss unter anaeroben Bedingungen.....	98
8.16.6	Protein Chromatographische Methoden.....	98
8.16.6.1	Strep-Tag II Affinitätschromatographie.....	99
8.16.6.2	MBP-Tag Affinitätschromatographie.....	99
8.16.6.3	GST-Tag Affinitätschromatographie.....	99

8.16.6.4	Ni-NTA Affinitätschromatographie.....	100
8.16.6.5	<i>Batch</i> -Aufreinigung.....	100
8.16.6.6	MonoQ-Aufreinigung.....	100
8.16.7	Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters.....	101
8.16.8	Enzymaktivitäts-Assay.....	101
8.16.9	Markierungsexperiment.....	101
8.16.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	101
8.16.11	Western Blot.....	102
8.17	Analytische Methoden.....	104
8.17.1	UV/Vis-Spektroskopie.....	104
8.17.2	Nano-LC-MS/MS Analytik.....	104
8.17.2.1	Tryptischer <i>in-Gel</i> -Verdau von Proteinen.....	104
8.17.2.2	Nano-LC-MS/MS Messungen.....	105
8.17.3	ESI-LC/MS Analytik.....	105
8.17.3.1	Enzymatischer Verdau von RNA.....	105
8.17.3.2	ESI-LC/MS Messungen.....	105
8.17.3.3	Auswertung.....	106
9	Anhang.....	107
9.1	Quantifikationsdaten.....	107
9.2	Trypsin-Verdau.....	109
10	Abkürzungsverzeichnis.....	113
11	Literaturverzeichnis.....	115
12	Danksagung.....	125