

**Expression, Charakterisierung und
Kristallisation der spleißosomalen Proteine
SMNrp, U4/U6-60k und U4/U6-90k**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christos Gouloudis
aus Göttingen

Göttingen 2004

D7

Referent: Prof. Dr. R. Ficner

Korreferent: Prof. Dr. G. H. Braus

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Januar 2005

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Modifikation von prä-mRNA in Eukaryonten	1
1.2	Das humane Spleißosom	2
1.3	Prä-mRNA Spleißen	5
1.4	Der U4/U6-snRNP-Komplex	6
1.5	Der U4/U6-20k/60k/90k-Komplex und SMNrp	6
1.6	Zielsetzung	10
2.	Material und Methoden	11
2.1	Material	11
2.1.1	Organismen, Gene, Proteine und Plasmide	11
2.1.2	DNA-Oligonukleotide, DNA-Größenmarker und Protein-Größen-Standard	13
2.1.3	Antibiotika, Kulturmedien und Medienzusätze	15
2.1.4	Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme	15
2.2	Methoden	16
2.2.1	Behandlung von Geräten, Lösungen und Puffer	16
2.2.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren	16
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	16
2.2.2.2	Fällung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	16
2.2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	17
2.2.2.4	Größenbestimmung von Nukleinsäuren	17
2.2.2.5	Isolierung von Nukleinsäuren	18
2.2.2.5.1	Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (MiniPrep)	18
2.2.2.5.2	Präparative Plasmidisolierung (MidiPrep)	18
2.2.2.5.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	19
2.2.2.5.4	Reinigung von PCR-Fragmenten	19
2.2.2.6	Restriktionsspaltung von DNA	20
2.2.2.7	Ligation von DNA-Fragmenten	20
2.2.2.8	Konstruktion einer PreScission-Protease-Erkennungssequenz	20
2.2.2.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	21
2.2.2.10	DNA-Sequenzierung	21
2.2.2.11	Analyse der Sequenzdaten	22

2.2.3	Arbeiten mit Bakterien	22
2.2.3.1	Trübungsmessung	22
2.2.3.2	DNA-Transfer durch vermittelte Kompetenz	22
2.2.3.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	22
2.2.3.2.2	Transformation durch Hitzeschock	23
2.2.3.2.3	Durchmusterung von Transformanten	23
2.2.3.3	Stammhaltung	23
2.2.3.4	Reinheitskontrollen	23
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen	24
2.2.4.1	Expression heterologer Proteine	24
2.2.4.1.1	Expression im analytischen Maßstab	24
2.2.4.1.2	Expression im präparativen Maßstab	24
2.2.4.2	Zellernte und Zellaufschluss	25
2.2.4.2.1	Zellaufschluss im analytischen Maßstab	25
2.2.4.2.2	Zellaufschluss im präparativen Maßstab	25
2.2.4.3	Diskontinuierliche SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970)	26
2.2.4.4	Färbung von Proteingelen	27
2.2.4.5	Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)	27
2.2.5	Proteinreinigung	28
2.2.5.1	Affinitätsreinigung	28
2.2.5.1.1	Reinigung der Proteine im <i>batch</i> -Verfahren mittels Glutathion Sepharose	28
2.2.5.1.2	Reinigung der Proteine mit Hilfe einer Amylose-Säule	29
2.2.5.1.3	Reinigung der Proteine mittels IMAC (Immobilisierte Metal Ionen Affinitäts-Chromatographie)	30
2.2.5.2	Ionenaustauschchromatographie	31
2.2.5.3	Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie	32
2.2.5.4	Gelfiltrationschromatographie	33
2.2.5.5	Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins	33
2.2.5.5.1	Spaltung mit einer Factor-Xa-Protease	33
2.2.5.5.2	Spaltung mit PreScission-Protease	34
2.2.5.5.3	Spaltung auf einer Säulenmatrix mit PreScission-Protease	34
2.2.5.6	Bindungsexperimente	34
2.2.5.7	Umpufferung von Proteinen	36
2.2.5.8	Konzentrierung von Proteinen	36
2.2.5.9	Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	37
2.2.5.9.1	Kristallisation biologischer Makromoleküle	37

2.2.5.9.2	Montage der Kristalle zur Datensammlung	38
3.	Ergebnisse	39
3.1	Expression und Reinigung des humanen U4/U6-60k	39
3.1.1	Expression des GST-60k	39
3.1.2	Umklonierung des 60k in den pMAL-c2X-Vektor	40
3.1.3	Expression und Reinigung des MBP-60k	42
3.1.4	Proteolytische Spaltung des MBP-60k	43
3.1.5	Insertion einer PreScission-Protease-Erkennungssequenz in den pMAL-c2X-Vektor	43
3.1.6	Expression, Reinigung und proteolytische Spaltung des MBP-60k mit PreScission-Protease	45
3.1.7	Reinigung mit Hilfe eines Anionenaustauschers	45
3.1.8	Überprüfung des MBP-60k auf unspezifische Aggregation durch Gelfiltration	47
3.1.9	Reinigung des MBP-60k::20k-Komplexes durch Gelfiltration	48
3.2	Expression und Reinigung des humanen SMNrp	49
3.3	Expression und Reinigung des humanen U4/U6-90k	52
3.3.1	Expression und Reinigung des His-90k	52
3.3.2	Reinigung des His-90k mit Hilfe eines Kationenaustauschers	53
3.3.3	Umklonierung des 90k-Gens in pMAL-c2XP	55
3.3.4	Expression des MBP-90k	58
3.3.5	Insertion eines C-terminalen His-tags am 90k	58
3.3.6	Expression und Reinigung des MBP-90k-His	59
3.3.7	Proteolytische Spaltung des MBP-90k-His und Trennung der Proteine durch Gelfiltration	60
3.4	Generierung, Expression und Reinigung verkürzter 90k-Fragmente	61
3.4.1	Generierung verkürzter 90k-Fragmente und Klonierung in den pMAL-c2XP-Vektor	61
3.4.2	Expression und Reinigung des MBP-90k(1-174)	63
3.4.2.1	Reinigung des 90k(1-174) durch Gelfiltration	64

3.4.3	Expression und Reinigung des MBP-90k(1-426)	66
3.4.3.1	Reinigung des 90k(1-426) mit Hilfe eines Kationenaustauschers	66
3.4.4	Insertion eines C-terminalen His-tags am 90k(1-426)	68
3.4.5	Expression und Reinigung des MBP-90k(1-426)-His	69
3.4.5.1	Reinigung des 90k(1-426)-His mit Hilfe eines Kationenaustauschers und durch Gelfiltration	69
3.4.6	Expression und Reinigung des MBP-90k(175-426)	72
3.4.6.1	Proteolytische Spaltung des MBP-90k(175-426) und Reinigung mit Hilfe eines Kationenaustauschers	72
3.4.6.2	Ermittlung der Molekularmasse von 90k(175-426)	74
3.5	Zusammenfassung der Expression und Reinigung der Proteine	75
3.6	Bindungsstudien	76
3.6.1	20k::60k-Interaktion	76
3.6.2	60k::90k-Interaktion	77
3.6.3	SMNrp::90k-Interaktion	78
3.6.4	SMNrp::90k(1-426)-Interaktion	79
3.6.5	SMNrp::90k(1-174)-Interaktion	79
3.6.6	SMNrp::90k(175-426)-Interaktion	81
3.6.7	Zusammenfassung der Bindungsstudien	81
3.7	Kristallisation rekombinanter Proteine	82
4.	Diskussion	84
4.1	Rekonstitution des SMNrp::90k-Komplexes	84
4.2	Rekonstitution des 60k::90k-Komplexes	86
4.3	Rekonstitution des 20k::60k-Komplexes	87
4.4	Modell des 20k/60k/90k::SMNrp-Komplexes	88
4.5	Kristallisationsversuche der Proteine und Protein-komplexe	89
4.6	Ausblick	90
5.	Anhang	91

6.	Zusammenfassung	94
7.	Literaturverzeichnis	96

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
<i>ad</i>	bis
Amp	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
bp	Basenpaare
BR	Broad Range
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Cam ^r	Chloramphenicolresistenz
cm	Zentimeter
C-terminal	carboxyterminal
deion.	deionisiert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-5`-triphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E.</i>	Escherichia
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, Dinatrium Salz
et al.	et alteri
Fa.	Firma
x g	-fache Erbeschleunigung
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
IMAC	Immobilisierte Metal Ionen Affinitäts-Chromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Ile	Isoleucin
Kan ^r	Kanamycinresistenzgen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
Leu	Leucin
log	Logarithmus (dekalischer)
m	Milli-

M	Molar
μ	Mikro-
MBP	Maltose-Bindungs-Protein
MCS	Multiple Cloning Site
M ³ G	2,2,7-Trimethylguanosin
M ⁷ G	7-Methylguanosin
min	Minute
ml	Milliliter
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MPD	2-Methyl-2,4-Pentandiol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Nano-
N-terminal	aminoterminal
Ni-NTA	Nickelchelat-Nitrilotriacetic Acid
NLS	nukleares Lokalisationssignal
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OD	Optische Dichte
%	Prozent
OH	Hydroxy-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
prä	vor
Pro	Prolin
Py	Polypyrimidin
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	self made
SMN	Survival Motor Neuron
SMNrp	Survival Motor Neuron related protein
sn	small nuclear
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
SRm160	serine/arginine repeated-related nuclear matrix protein of 160 kDa

RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tet ^r	Tetracyclinresistenz
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	(Einheit der Enzymaktivität)
U	uridin-reich
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
V _{el}	Elutionsvolumen
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
w/v	Masse pro Volumen

Einbuchstabencode für Aminosäuren

A	Alanin	C	Cystein	D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure	F	Phenylalanin	G	Glycin
H	Histidin	I	Isoleucin	K	Lysin
L	Leucin	M	Methionin	N	Asparagin
P	Prolin	Q	Glutamin	R	Arginin
S	Serin	T	Threonin	V	Valin
W	Tryptophan	Y	Tyrosin		

1. Einleitung

1.1 Modifikation von prä-mRNA in Eukaryonten

Ein Charakteristikum der Expression prokaryotischer Gene ist die enge räumliche und zeitliche Kopplung von Transkription und Translation. Diese finden im Cytoplasma statt. Das 5'-Ende eines mRNA-Moleküls entsteht bei der Transkriptionsinitiation und das 3'-Ende bei der Transkriptionstermination durch die RNA-Polymerase. Ein mRNA-Molekül kann Sequenzabschnitte enthalten, die für mehrere unterschiedliche Proteine kodieren.

In Eukaryonten hingegen kodiert ein mRNA-Molekül in der Regel nur für ein Protein. Im Vergleich zu Prokaryonten wird während der Synthese die prä-mRNA (Primärtranskript) durch verschiedene Enzyme im Zellkern modifiziert, um anschließend als reife mRNA ins Cytoplasma transportiert und in ein Protein translatiert zu werden. Sobald die RNA-Polymerase II eine weniger als 30 Nukleotide lange RNA-Kette hergestellt hat, wird am 5'-Ende ein 7-Methylguanosin (m^7G -Kappe) angefügt. Diese so genannte „Capping Reaktion“ wird nacheinander durch zwei Enzyme katalysiert. Das eine Enzym besitzt sowohl eine Guanyltransferase- als auch eine Triphosphatase-Aktivität, während das andere eine Methyltransferase-Aktivität aufweist. Nachdem die Triphosphatase ein Phosphat vom 5'-Ende der wachsenden RNA-Kette entfernt hat, fügt die Guanyltransferase ein GMP in 5'→5' Richtung an. Durch die Methyltransferase wird abschließend eine Methylgruppe auf das Guanosin übertragen (SHATKIN und MANLEY, 2000; GOLDSTROHM et al., 2001). Neben der schützenden Funktion vor 5'→3' exonukleolytischem Abbau spielt die Kappe bei der Translation eines Proteins eine wichtige Rolle (COUGOT et al., 2004).

Eine weitere Modifikation ist die Synthese eines Poly-A-Schwanzes am 3'-Ende der prä-mRNA durch die Poly-A-Polymerase. Poly-A-Bindeproteine binden auf dem Weg der mRNA vom Kern ins Cytosol an einen Poly-A-Schwanz und spielen eine wichtige Rolle bei der Initiation der Translation. Außerdem sind sie für die Stabilität der mRNA verantwortlich (ADAM et al., 1986; SACHS et al., 1986; KÜHN und WAHLE, 2004).

Um eine reife mRNA zu erhalten, müssen Introns (nicht kodierende Sequenzen), die durch Exons (kodierende Sequenzen) unterbrochen werden, entfernt werden. Anschließend werden die Exons miteinander ligiert. Dieser Vorgang wird als Spleißen bezeichnet und durch das Spleißosom (s. 1.2) katalysiert. Es erfolgt in zwei nacheinander ablaufenden Transesterreaktionen (Abb. 1) (KRÄMER, 1996,

STALEY und GUTHRIE, 1998). Im ersten Schritt greift die 2'-OH-Gruppe eines Adenosins, das sich an der Verzweigungsstelle befindet, die 3',5'-Phosphodiester-Bindung an der 5'-Spleißstelle an. Nach Spaltung der Bindung wird das 5'-terminale Guanosin des Introns kovalent an das Adenosin in eine 2',5'-Phosphodiester-Bindung angeheftet. Das durch das Spleißen resultierende Intermediat hat eine Lasso ähnliche Struktur (Lariat). Im zweiten Schritt greift die 3'-OH-Gruppe des 5'-Exons die Phosphodiester-Bindung an der 3'-Spleißstelle an, wobei es zur Freisetzung der Intron-Lassostruktur und Ligation der Exons kommt.

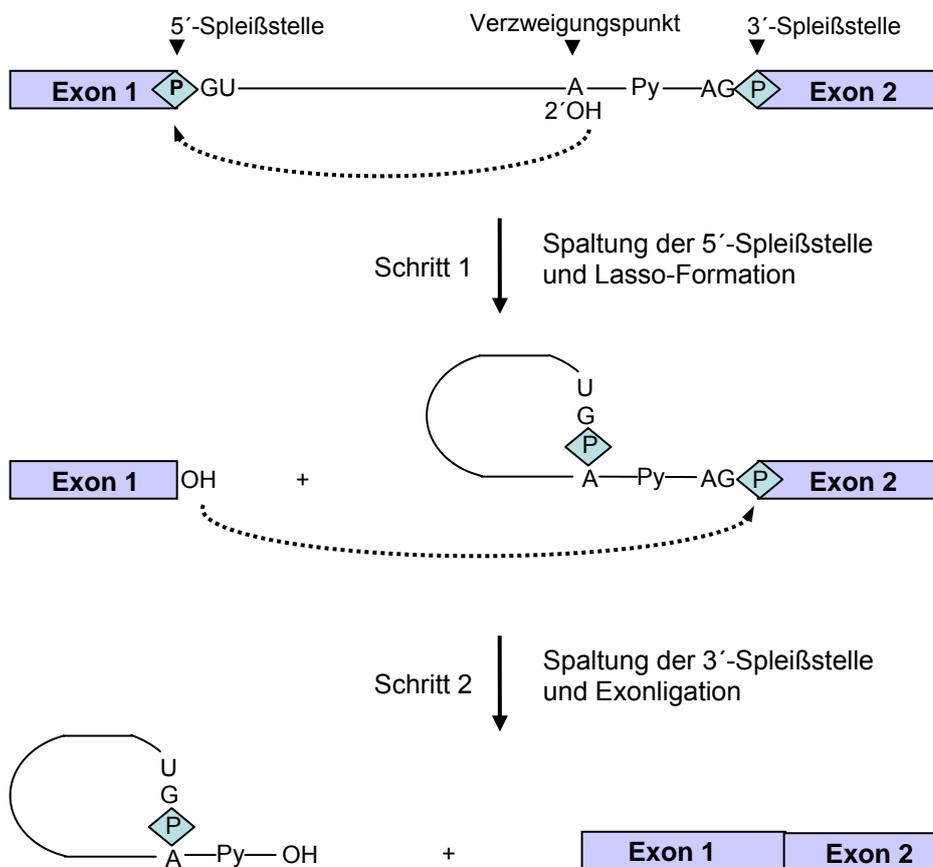


Abb. 1: Schematische Darstellung des prä-mRNA-Spleißens: Die Exons sind als Boxen dargestellt. Konservierte Nucleotide und Phosphate an der 5'- und 3'-Spleißstelle sind mit Pfeilen markiert. Py steht für Polypyrimidin. Die gestrichelten Linien repräsentieren den nukleophilen Angriff der Hydroxylgruppen an der Exon/Intron Grenze.

1.2 Das humane Spleißosom

Von allen Spleißosomen ist das menschliche, aus HeLa-Zellen, am besten charakterisiert. Das Spleißosom ist eine komplexe, makromolekulare Maschinerie, die Introns aus eukaryotischer prä-mRNA ausschneidet. Es besteht aus den fünf Uridin-reichen snRNAs (small nuclear RNA) U1, U2, U4/U6, U5 (Abb. 2), und vielen

Proteinen, die miteinander komplexiert sind, auch U-snRNPs (uridine-rich small nuclear ribonucleoproteins) genannt. Zusätzlich enthält es einige nicht snRNP-Proteine (COLINS und GUTHRIE, 2000; HASTING und KRAINER, 2001; NAGAI et al., 2001). Die Assemblierung des Spleißosoms auf der prä-mRNA erfolgt auf einem geordneten Weg, der snRNP-snRNP und snRNP-snRNA Interaktionen beinhaltet (NILSEN, 1998; STALEY und GUTHRIE, 1998; NOTTROT, 2002). Die genauen Wechselwirkungen der Proteine während der Assemblierung des Spleißosoms und des Spleißvorganges sind weitestgehend ungeklärt. Neben dem häufig vorkommenden „U2-Spleißosom“ existiert ein „U12-Spleißosom“, das ~0.1 % aller Introns entfernt. Die Bezeichnung der Spleißosome kommt durch die U2-snRNPs bzw. U12-snRNPs abhängige Intronentfernung zustande (PATEL und STEITZ, 2003). Mit Hilfe von Immunpräzipitationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Proteinzusammensetzung in beiden Spleißosomen sehr ähnlich ist (SCHNEIDER et al., 2002).

Wie bereits erwähnt, setzt sich das Spleißosom unter anderem aus fünf snRNAs zusammen. Mit Ausnahme der U6-snRNA werden die snRNAs durch die RNA-Polymerase II im Nukleus transkribiert und am 5'-Ende eine m⁷G-Kappe angehängt. Nachdem die snRNAs bis auf U6 ins Cytoplasma exportiert wurden, binden sieben Sm-Proteine an der Sm-Bindungsstelle. Die Sm-Proteine und eine snRNA bilden einen so genannten U-snRNP-Kern-Komplex. Der anschließenden Umwandlung der m⁷G-Kappe in ein 2,2,7-Trimethylguanosin (m³G-Kappe) folgt der Import zurück in den Nukleus (WILL und LÜHRMANN, 2001). Die m³G-Kappe und die Sm-Kern-Domäne bilden zusammen ein nukleares Lokalisationssignal (NLS), das für den Import in den Nukleus benötigt wird (FISCHER et al., 1993). Im Nukleus assoziieren z.B. U1-spezifische Proteine mit dem U1-snRNP-Kern-Komplex zum „reifen“ U1-snRNP. Die U6-snRNA hingegen wird durch die RNA-Polymerase III transkribiert (PANONNE et al., 1998) und besitzt am 5'-Ende eine γ -Monomethyl-Kappe (WILL und LÜHRMANN, 2001). Im Vergleich zu den beschriebenen snRNAs fehlt U6 eine Sm-Bindungsstelle. U6 interagiert hingegen im Zellkern über ihre Uridin-reiche Sequenz am 3'-Ende mit sieben Sm-ähnlichen Proteinen (LSm2-8). In Hefe stabilisieren LSm-Proteine die U6-snRNA und sind für die Assemblierung eines funktionalen U6-snRNPs verantwortlich (ACHSEL et al., 1999; MAYERS et al., 1999; SALGADO-GARIDO et al., 1999; VIDAL, 1999; XUE et al., 2000; WILL und LÜHRMANN, 2001).

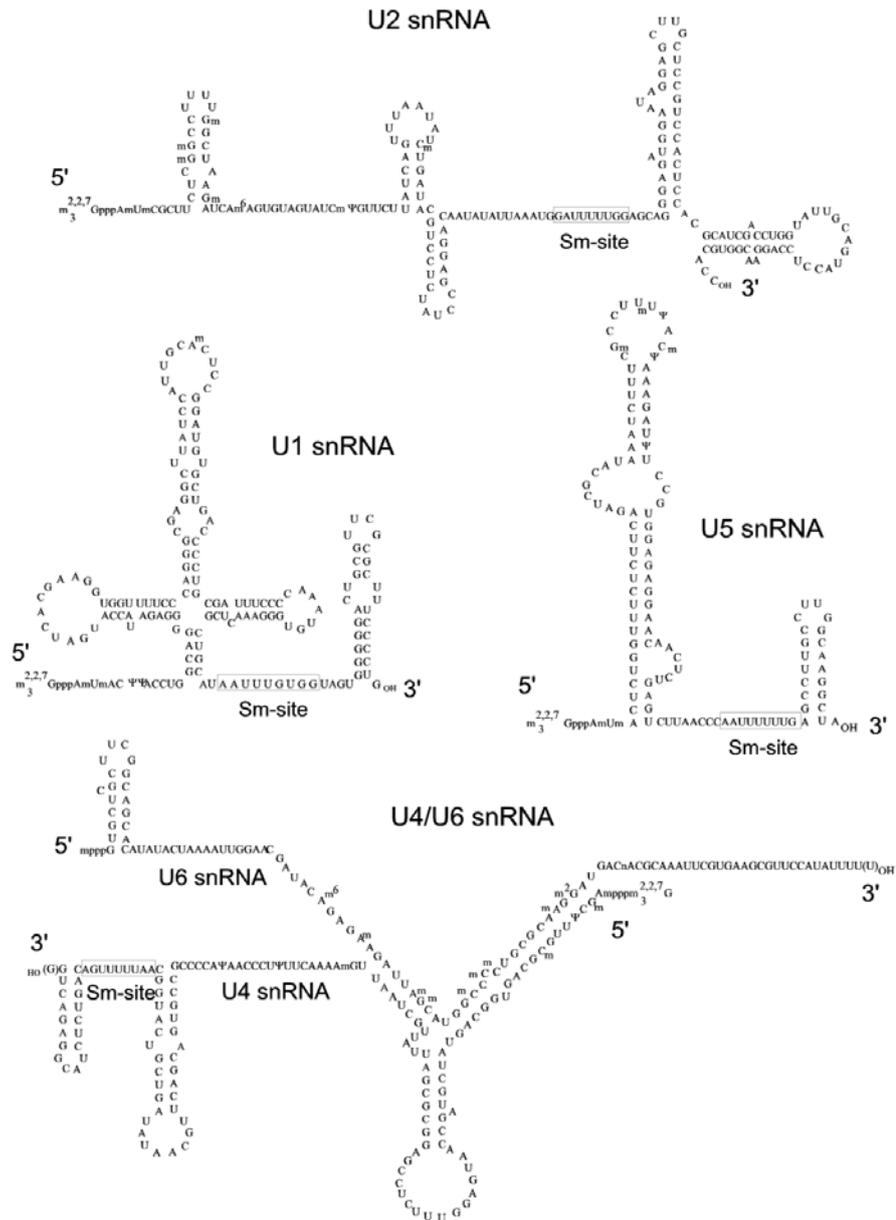


Abb. 2: Sekundärstruktur der snRNAs. Die Sm-Bindungsstellen sind eingerahmt (Promotionsarbeit U. Reidt, 2001, Philipps-Universität Marburg).

1.3 Prä-mRNA Spleißen

Das prä-mRNA-Spleißen ist ein dynamischer Prozess, der mit der Assemblierung der snRNPs zum Spleißosom beginnt. Nachdem das U1-snRNP mit der 5'-Spleißstelle interagiert hat, binden das U2-snRNP und nicht snRNP-Proteine an die Verzweigungsstelle (LEGRAIN et al., 1988; SERAPHIN und ROSBACH, 1989; MICHAUD und REED, 1991; MEISTER et al., 2001). Nach Anlagerung des U5-snRNPs an U4/U6-snRNP wird der U4/U6*U5-tri-snRNP-Komplex zum prä-Spleißosom rekrutiert. Es wird angenommen, dass die Rekrutierung des tri-snRNP-Komplexes durch das U2-snRNP-assoziierte SMNrp (Survival motor neuron related protein) erfolgt (LAMM et al., 1991; MARONEY et al., 2000; MEISTER et al., 2001; MAKAROV et al., 2002). Der resultierende Komplex B durchläuft eine Serie von RNA-RNA Umlagerungen, die schließlich das katalytische RNA-Netzwerk des Spleißosoms bilden (STALEY und GUTHRIE, 1998; MEISTER et al., 2001). Nachdem eine Reihe von snRNP spezifischen Proteinen, U1 und U4 dissoziiert sind, schneiden das basengepaarte U2/U6 und U5-snRNP, wie in Abschnitt 1.1 beschrieben, in einer Zweischrittreaktion die Introns in Form eines Lassos heraus. Anschließend dissoziiert das Spleißosom in seine Bestandteile und die Assemblierung beginnt von neuem (Abb. 3) (NOTTROT et al., 2002; MAKAROV et al., 2002). In Tab. 1 ist eine Übersicht der U-snRNPs und nicht snRNPs, die an der Assemblierung und/oder am Spleißvorgang beteiligt sind, dargestellt.

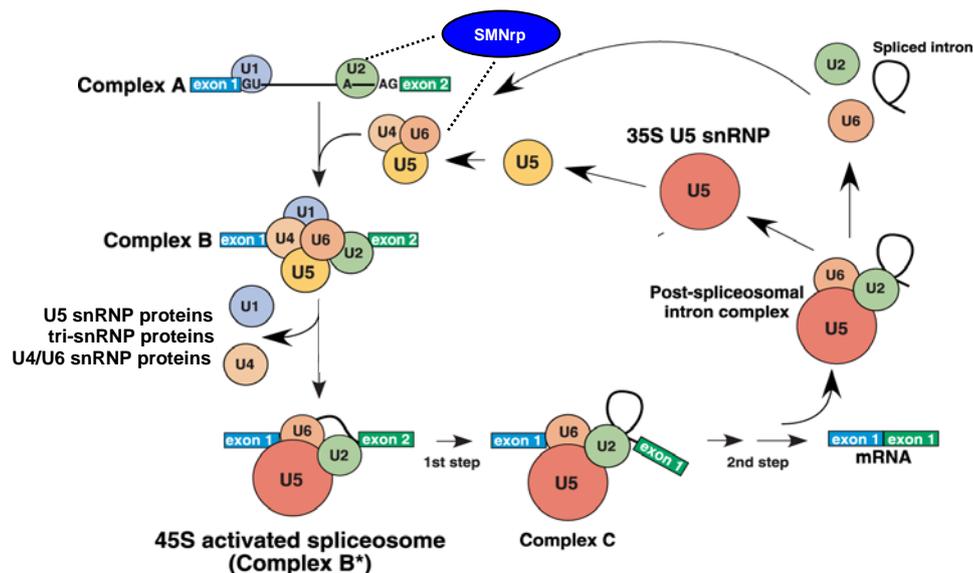


Abb. 3: Schematischer Überblick der Assemblierung und Disassemblierung des „U2-Spleißosoms“ (MEISTER et al., 2001; MAKAROV et al., 2002).

45S activated spliceosome (B*)	35S U5 snRNP	25S [U4/U6.U5] tri-snRNP
Sm proteins B, D1, D2, D3, E, F, G LSm proteins LSm 2, 3	Sm proteins B,D1,D2,D3,E,F,G	Sm proteins B,D1,D2,D3,E,F,G LSm proteins LSm 2,3,4,5,6,7,8
17S U2	U5 snRNP	U5 snRNP
SF3b155	220K	220K
SF3b145	200K	200K
SF3b130	116K	116K
SF3b49	40K	40K
p14	102K	•
SF3b14b	•	•
SF3b10	•	•
SF3a120	tri-snRNP	tri-snRNP
SF3a66	110K	•
SF3a60	•	•
U2A'	•	•
U2B''	•	•
17S U2 AP	•	•
hPrp43	•	•
SR140	•	•
CBP80	•	•
CBP20	•	•
ALY	hPrp19	hPrp19
hnRNP	CDC5	CDC5
L	hSyf1	hSyf1
G	hSyf3	hSyf3
C1/C2	hlsy1	hlsy1
A2/B1	PRL1	PRL1
SR	SPF27	SPF27
hTra-2	SKIP	SKIP
9G8	hECM2	hECM2
Srp30c	GCIP p29	GCIP p29
Srp20	AD-002	AD-002
PPlase-like 3	KIAA0560	KIAA0560
MGC13125	MGC23918	MGC23918
hPrp22	G10	G10
p68	Cyp-E	Cyp-E
hDBP5	PPlase-like 1	PPlase-like 1
PSF	KIAA1590	hPrp17
hSnu23	KIAA0853	DDX3
CA150	p55PIK	HSP73
CDC2L2p110	TPX2	FLJ10206
CPSF160	TIP-49	KIAA0773
PABP1	LOC56912	C25A1.10p
PABP2	RACK1	S100 A8
TFIP11	NOSIP	S100 A9
RED	DKFZP586O0120	
MFAP1	UBL5p	
hSmu-1		
pinin		
HDB/DICE1		
Cyp-60		
HsKin17		

Tab. 1: Proteinzusammensetzung des aktivierten 45S Spleißosoms, des 35S U5-snRNPs und 25S U4/U6*U5-tri-snRNPs. Die Partikel wie z.B. 25 S wurden entsprechend ihres Sedimentationsverhaltens benannt. Die U-snRNPs und nicht snRNPs wurden aus HeLa-Zellen extrahiert und durch Massenspektroskopie identifiziert. (MAKAROV et al., 2002).

1.4 Der U4/U6-snRNP-Komplex

Der U4/U6-snRNP-Komplex setzt sich aus 15.5k, 61k, 20k, 60k, 90k, die entsprechend ihrer Molekulargewichte benannt wurden, sowie Sm- und LSm-Proteinen zusammen. Er assoziiert mit U5-snRNP zum U4/U6*U5-snRNP-Komplex, der wiederum zum prä-Spleißosom rekrutiert wird (MEISTER et al., 2001; MAKAROV et al., 2002; NOTTROT et al., 2002). Es wird angenommen, dass durch die Bindung des 15.5k an U4 die Interaktion des 61k und 20k/60k/90k-Komplexes mit U4/U6 ermöglicht wird. Bevor das aktive Spleißosom sich formt, dissoziieren 20k/60k/90k und U4-15.5k/61k unter Bildung einer U2/U6-Duplex (NOTTROT et al., 2002).

1.5 Der U4/U6-20k/60k/90k-Komplex und SMNrp

Der U4/U6 spezifische 20k/60k/90k-Komplex ist stabil in Abwesenheit von RNA. Im humanen Komplex interagiert 60k mit 90k. Diese Bindung kann auch bei den Orthologen yPrp4 und yPrp3 aus *Saccharomyces cerevisiae* beobachtet werden.

Des Weiteren bindet 20k an 60k (HOROWITZ et al., 1997; LAUBER et al., 1997; NOTTROT et al., 2002). Das 20k-Protein (Abb. 4) besteht aus 177 Aminosäuren und gehört zur Familie der Cyclophiline, die abundant in jedem Organismus exprimiert werden. Cyclophiline besitzen eine Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase-Aktivität und ändern die Konformation von Proteinen (MARKS, 1996; GALAT und REVIERE, 1998; HUNTER, 1998; HOROWITZ et al., 2002). Daher wird vermutet, dass 20k an Rearrangierungsereignissen während der Assemblierung des Spleißosoms beteiligt ist.

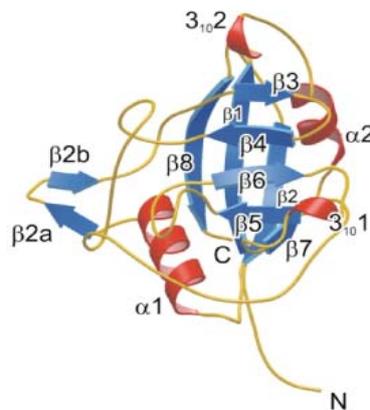


Abb. 4: Kristallstruktur des 20k. 20k setzt sich aus acht antiparallelen β -Faltblättern zusammen, die ein β -barrel bilden, zwei kurze β -Faltblätter (β 2a, β 2b), zwei α -Helices und zwei 3_{10} -Helices (REIDT et al., 2003).

Im Unterschied zu Cyclophilinen enthält 20k einen zusätzlichen Bereich (48-62), der für die Interaktion mit 60k essentiell ist (REIDT et al., 2003). In Bindungsstudien konnten HOROWITZ et al. (2002) zeigen, dass eine 31 Aminosäuren umfassende Region (107-136) des 60k-Proteins, das aus 521 Aminosäuren besteht, für die Interaktion mit 20k benötigt wird. Die Kristallstruktur des 20k mit dem U4/U6-60k-Peptid wurde von REIDT et al. (2003) aufgeklärt (Abb. 5).

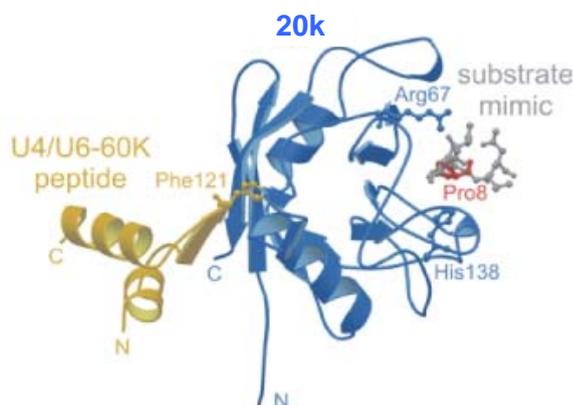


Abb. 5: Kristallstruktur des 20k mit dem U4/U6-60k-Peptid. Das U4/U6-60k-Peptid besteht aus zwei α -Helices und einem kleinen β -Faltblatt, das über einen Phenylalaninrest an 20k bindet. Im katalytischen Zentrum ist ein Prolin als Substrat eingezeichnet (REIDT et al., 2003).

60k und dessen Ortholog yPrp4 aus *Saccharomyces cerevisiae* besitzen am C-Terminus jeweils ein WD-Motiv, das in der β -Untereinheit von G-Proteinen am besten charakterisiert ist. (DALRYMPLE et al., 1989; AYADI et al., 1998). Es besteht aus sieben WD-Wiederholungen und wurde entsprechend der Aminosäuren Tryptophan und Aspartat benannt, die sich am Ende jeder WD-Wiederholung befinden. Es faltet sich zu einem β -Propeller, der aus sieben Propellerflügeln besteht. Jeder Propellerflügel wiederum setzt sich aus vier antiparallel angeordneten β -Faltblättern zusammen (Abb. 6) (HOROWITZ et al., 1997; LAUBER et al., 1997; AYADI et al., 1998). Die Bindung des 60k an 90k wurde anhand ihrer Orthologen yPrp4 und yPrp3 aus *Saccharomyces cerivisiae* untersucht. Mit Hilfe eines yeast-two-hybrid-Experimentes konnte gezeigt werden, dass yPrp4 über den β -Propeller mit yPrp3 interagiert (AYADI et al., 1998).

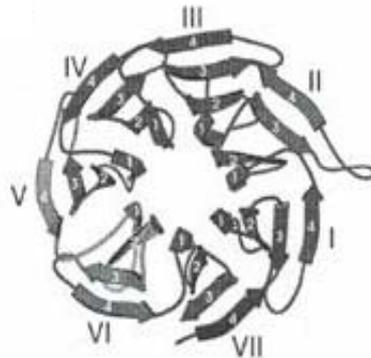


Abb. 6: Aufsicht des β -Propellers der β -Untereinheit von G-Proteinen (AYADI et al., 1998).

90k weist am C-Terminus eine putative doppelsträngige RNA-Bindungsdomäne auf. Es wird angenommen, dass der 20k/60k/90k-Komplex über diese Domäne an die U4/U6-snRNA bindet (LAUBER et al., 1997; SUN et al., 2001; GONZALES-SANTOS et al. 2002). Am N-Terminus besitzt 90k ein PWI-Motiv, das entsprechend der Aminosäuren Prolin, Tryptophan und Isoleucin benannt wurde, und faltet sich zu einem vier-Helix-Bündel (Abb. 7). Es wird postuliert, dass das PWI-Motiv ein neuer Typ von RNA/DNA-Bindungsdomäne ist. Die Funktion des PWI-Motivs wurde unter anderem anhand des SRm160-Proteins (serine/arginine repeated-related nuclear matrix protein of 160 kDa) näher charakterisiert (BLENCOWE und OUZOUNIS, 1999; SZYMCZYNA et al., 2003).

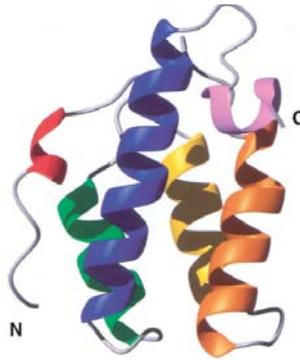


Abb. 7: NMR-Struktur der PWI-Domäne des SRm160 (SZYMCZYNA et al., 2003).

SMNrp ist ein 30 kDa Protein und enthält eine zentrale Tudor-Domäne, die bei SMN (Survival Motor Neuron) essentiell für die Bindung an Sm-Proteine ist. Sie besteht aus fünf β -Faltblättern, die sich zu einem β -barrel falten (Abb. 8) (TALBOT et al., 1998; SELENKO et al., 2001). In Bindungsstudien wurde von MEISTER et al. (2001) die direkte Bindung des SMNrp an 90k nachgewiesen. Daher wird angenommen, dass SMNrp an der Rekrutierung des U4/U6*U5-snRNPs zum prä-Spleißosom beteiligt ist (s. 1.3, 1.4).

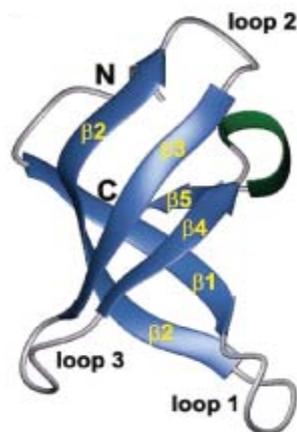


Abb. 8: NMR-Struktur der Tudor-Domäne des SMN-Proteins (SELENKO et al., 2001).

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten SMNrp, 90k und 60k *in Escherichia coli* überexprimiert und gereinigt werden. Diese Proteine sollten für Bindungsstudien verwendet werden, in denen die Komplexe SMNrp::90k, 20k::60k und 60k::90k rekonstituiert werden. Zusätzlich sollten verkürzte Fragmente vom 90k generiert, überexprimiert und gereinigt werden. Diese sollten zur näheren Charakterisierung der SMNrp::90k-Interaktion benutzt werden. Um genauere Kenntnisse über die Funktion der erwähnten Proteine während der Assemblierung des Spleißosoms zu erhalten, sollten die gereinigten Proteine und Protein-Komplexe kristallisiert und strukturell beschrieben werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Organismen, Gene, Proteine und Plasmide

ORGANISMEN

Klonierungsstämme:

Escherichia coli DH5 α

Escherichia coli XL1-blue

Escherichia coli XL10-Gold

Expressionstämme:

Escherichia coli BL21

Escherichia coli BL21(DE3)-RIL (Cam^r)

Tab. 2: Genotypen der Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
DH5 α	F ⁻ f80 Δ lacZDM15 D(lacZYA-argF)U169 deoR thi-1 recA1 endA1 hsdR17/r _k ⁻ m _k ⁺ phoA supE44 Γ gyrA96 relA1	INVITROGEN, Karlsruhe
XL1-blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	STRATAGENE, La Jolla, USA
XL10-Gold	Tetr Δ (mcrA)I83 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)I73 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 (Tet ^r) Tn5 (Kan ^r) Amy	STRATAGENE
BL21	<i>E. coli</i> B F ⁻ dcm ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) gal	STRATAGENE
BL21(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> B F ⁻ ompT hsdS(rB ⁻ mB ⁻) dcm ⁺ Tetr gal λ (DE3) endA Hte [argU ileYleuW Cam ^r]	STRATAGENE

GENE UND PROTEINE

Die Gene, die für das U4/U6-90k (hprp3) und für U4/U6-60k (hPrp4) kodieren, waren bereits in pET28a (NOVAGEN) und pGEX-6P1+1 (AMERSHAM BIOSCIENCE) als NdeI-XhoI-Fragmente kloniert. Die Expressionsplasmide und das rekombinante U4/U6-20k wurden freundlicherweise von Uli Reidt bzw. Liu Sunbin (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) zur Verfügung gestellt. Das Gen, das für das

Survival Motor Neuron related protein (SMNrp) kodiert, war als *EcoRI-XhoI*-Fragment in pGEX-6P-1 kloniert und wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Utz Fischer (Institut für Biochemie, Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Um die 90k-Fragmente [90k(1-174), 90k(1-426), 90k(175-426)] mittels PCR zu generieren zu können, wurde die Gensequenz aus der Datenbank Pubmed mit der Accession Nr. NM_004698 entnommen. In Tab. 3 sind die Beschreibungen der verwendeten Gene und deren Accession Nr. aufgeführt. Das verwendete 60k Gen wurde noch nicht in der Datenbank hinterlegt. Die dazugehörige Sequenz ist im Anhang (5) zu finden.

Tab. 3: Beschreibung der spleißosomalen Gene und deren Accession Nr.

Gen	Beschreibung	Accession Nr.
hPrp3	humanes 90k	NM_004698
hPrp4	humanes 60k	-----
SnuCyp-20	humanes 20k	NM_006347
SMNrp(SPF30)	humanes SMNrp	O75940

PLASMIDE

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Klonierung und Expression die in Tab. 4 aufgelisteten Plasmide verwendet.

Tab. 4: Plasmide

Plasmide	Herkunft/Beschreibung
pET28a	NOVAGEN, Bad Soden
pGEX-6P1	AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg
pGEX-6P1+1	zwischen der <i>Bam</i> HI- und <i>Eco</i> RI-Schnittstelle befindet sich noch eine zusätzliche <i>Nde</i> I-Schnittstelle
pMAL-c2X	NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a.M.
pMAL-c2XP	diese Arbeit; enthält stromabwärts der Factor Xa Protease noch eine PreScission Protease-Sequenz-Erkennungssequenz

2.1.2 DNA-Oligonukleotide , DNA-Größenmarker, Protein-Größen-Standard

DNA-OLIGONUKLEOTIDE

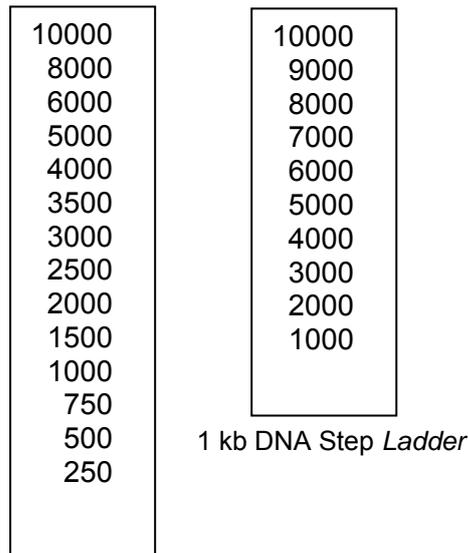
Die Primer wurden von der Firma MWG BIOTECH (Ebersberg) bezogen. Sie wurden zur Herstellung der 90k-Fragmente und zur Sequenzierung verwendet. Außerdem wurden die Primer zur Konstruktion einer PreScission-Protease-Erkennungssequenz im pMAL-c2X benutzt (Tab. 5).

Tab. 5: DNA-Oligonukleotide

Primer	Sequenzen
1BamHlforw:	5'-ggg tat gga tcc atg gca ctg tca aag agg gag-3' (33mer)
2Pstlrev:	5'-ggg tat ctg cag tca aga agg agt ctt tgg ctg agg-3' (36mer)
3Pstlrev:	5'-ggg tat ctg cag tca agg att gag ctg ggc tgg atg-3' (36mer)
4BamHlforw:	5'-ggg tat gga tcc cct cag cca aag act cct tct tcc-3' (36mer)
7Pstlrev:	5'-ggc tgc agt cag tga tgg tga tgg tga tga gga ttg agc tgg gct gg-3' (47mer)
8Pstlrev:	5'-ggc tgc agt cag tga tgg tga tgg tga tga tca gtg gac tct aac ac-3' (47mer)
MALpresc.1_forw:	5'-ctg gaa gtt ctg ttc cag ggg ccc g-3' (25mer)
mal_pres_rev:	5'-gat ccg ggc ccc tgg aac aga act tcc ag-3' (29mer)
malE:	5'-ggt cgt cag act gtc gat gaa gcc-3' (21mer) Sequenzierungsprimer
M13/pUC:	5'-cgc cag ggt ttt ccc agt cac gac-3' (21mer) Sequenzierungsprimer

DNA-GRÖSSENMARKER

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten mittels Agarosegel-Elektrophorese wurden der Gene Ruler 1 kb DNA *Ladder* (MBI, FERMENTAS, St. Leon-Rot) und der 1 kb DNA Step *Ladder* (PROMEGA, Mannheim) eingesetzt (Abb. 11).

Abb. 11: DNA-Größenmarker

Gene Ruler 1 kb DNA Ladder

PROTEIN-GRÖSSENSTANDARD

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes der rekombinanten Proteine mittels SDS-PAGE wurden der Protein-Größenstandard BR (Broad Range) von der Firma NEW ENGLAND BIOLABS (Frankfurt a. M.) und der selbst hergestellte SM-Marker (Self Made) verwendet. Auf einem 15%-igen bzw. 4-20%-igen SDS-Gel ergibt sich für den SM-Marker bzw. für den BR-Marker das in Abb. 12 bzw. Abb. 13 beschriebene Bandenmuster:

Abb.12: SM-Marker (in kDa)

102
97
66
45
27
15

Abb.13: BR-Marker (in kDa)

212
158
116
97.2
66.4
55.6
42.7
35.5
27
20
14.3
6.5
2.4

2.1.3 Antibiotika, Kulturmedien und Medienzusätze

ANTIBIOTIKA

Die Antibiotika Stammlösung wurde nach SAMBROCK et al. (1989) eingesetzt, sterilfiltriert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Aus diesen sterilen Stammlösungen wurden die Antibiotika den Nährmedien nach dem Autoklavieren und Abkühlen zugegeben.

- Ampicillin wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ gelöst (100 mg/ml). Es wurde in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt
- Kanamycin wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ gelöst (50 mg/ml). Die eingesetzte Endkonzentration betrug 50 $\mu\text{g/ml}$
- Chloramphenicol wurde in Ethanol gelöst (35 mg/ml). Die Endkonzentration betrug 35 $\mu\text{g/ml}$

KULTURMEDIEN UND MEDIENZUSÄTZE

-Luria Bertani (LB)-Medium: 1 % (w/v) Trypton, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, *ad* 1 l $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$, autoklaviert.

-LB-Agar: 1,5 % (w/v) Agar, *ad* 1 l LB-Medium, autoklaviert

-IPTG (Isopropyl- β -thio-galactosid) wurde als 1 M Stammlösung hergestellt und sterilfiltriert. Die eingesetzte Endkonzentration betrug 1 mM

2.1.4 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien mit den Reinheitsgraden „p.a.“ oder „reinst“ von den Firmen APPLICHEM (Darmstadt), FLUKA (Buchs, Schweiz), OXOID (Basingtoke, Hampshire), ROTH (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg), SIGMA-ALDRICH (Steinheim) bezogen. Die Restriktionsendonukleasen und die T4-DNA-Ligase stammten von der Firma NEW ENGLAND BIOLABS (Fankfurt a. M.).

2.2 Methoden

2.2.1 Behandlung von Geräten, Lösungen und Puffer

Zur Inaktivierung eventuell vorhandener Nukleasen wurden alle hitzestabilen Geräte und Lösungen für 20 min bei 120 °C autoklaviert. Kleingeräte aus Metall wurden vor Gebrauch mit Ethanol abgeflammt und nicht autoklavierbare Materialien mit 70% (v/v) Ethanol gespült. Lösungen mit hitzeempfindlichen Chemikalien und Puffer wurden sterilfiltriert.

2.2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentrationsbestimmungen doppelsträngiger DNA wurden in entsprechenden Verdünnungsstufen photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ in Kunststoffeinmal-Küvetten durchgeführt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm gilt für gereinigte dsDNA: $\Delta E_{260} = 1$ entspricht 50 μg dsDNA (DAVIS et al., 1980).

Verunreinigungen z.B. durch Polysaccharide und Proteine konnten durch eine zusätzliche Messung bei 230 nm und 280 nm erfaßt werden. Im Idealfall gilt für eine reine DNA-Lösung: ΔE_{230} (Polysaccharide): ΔE_{260} (DNA): ΔE_{280} (Proteine) verhält sich wie 0,45 : 1 : 0,515 (MARMUR, 1961) bzw. ΔE_{260} (DNA) : ΔE_{280} (Proteine) wie 1,8 : 1 (SAMBROCK et al., 1989). Signifikante Abweichungen des DNA-Werts vom Polysaccharid- bzw. Protein-Wert erlaubten keine verlässliche Konzentrationsbestimmung.

2.2.2.2 Fällung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

Die DNA-Lösung wurde mit einer 7 M Ammoniumacetat Lösung auf eine Salzkonzentration von 0,7 M eingestellt und schließlich mit 2 Vol. eiskaltem Ethanol (96 % (v/v), unvergällt) oder 0,7 Vol. Isopropanol versetzt. Nach Durchmischen wurde die DNA bei der Ethanolfällung 30 min bei -20 °C bzw. bei Isopropanolfällung ca. 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die DNA bei 16000 x g für 30 min bei 4 °C sedimentiert (Eppendorf Centrifuge 5415R, EPPENDORF, Hamburg). Der Vorteil des Ammoniumacetats war, dass es sich bei Trocknung des DNA Pellets verflüchtigte und somit die Salzkonzentration in der DNA-Lösung bei Wiederaufnahme des Pellets

in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ geringer war. Durch Fällung und Aufnahme des DNA Pellets in entsprechend geringeren Volumina war es möglich, DNA-Lösungen zu konzentrieren.

2.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Gelelektrophoretische Auftrennungen von Nukleinsäuren sowohl für analytische als auch für präparative Zwecke erfolgten in horizontalen Elektrophoresekammern. Die Gelvolumina betragen 25-40 ml (8 x 11.5 cm) für Analysen und 150-200 ml (16 x 21.5 cm) für präparative Gele. Es wurde 1% (w/v) Agarose in TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) aufgekocht, wobei der TBE-Puffer gleichzeitig als Elektrophorese-Puffer diente.

Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die DNA-Proben auf einen Parafilmstreifen pipettiert und mit 1/6 Volumen Schwerelösung (DNA Loading Dye, MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot) versetzt. In der Regel wurde bei den analytischen Gelen eine Spannung von 100-120 V (Laufzeit 30-45 min) und bei präparativen Gelen eine Spannung von 100 V (Laufzeit ca. 1 h) angelegt. Anschließend wurde das Agarosegel in einem mit Ethidiumbromid (2 µg/ml) versetzten TBE-Bad inkubiert und schließlich mit einer Geldoc 2000 (BIORAD, München) unter UV-Licht dokumentiert.

TBE-Puffer

Tris	0.089 M
EDTA	0.02 M
Borsäure	0.089 M

2.2.2.4 Größenbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Größe gelelektrophoretisch aufgetrennter, linearer DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurde als Längenstandard der Gene Ruler 1 kb DNA *Ladder* (MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot) und der 1 kb DNA Step *Ladder* (PROMEGA, Mannheim) parallel in dem selben Gel aufgetrennt. Durch anschließenden Vergleich der Laufstrecke der DNA-Probe mit der kommerziell erhältlichen DNA-*Ladder* konnte die Größe der DNA-Probe bestimmt werden.

2.2.2.5 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.2.5.1 Analytische Isolierung von Plasmid-DNA (MiniPrep)

Für eine schnelle Isolierung von Plasmid-DNA diente das kommerziell erhältliche QIAprep Spin MiniPrep Kit (QIAGEN, Hilden), das prinzipiell auf der Plasmidisolierungsanleitung von BIRNBOIM und DOLY (1979) beruhte. Dabei adsorbiert die DNA in Gegenwart chaotroper Salze, die die Wasserstruktur zerstören, an eine Silica Membran und wird anschließend z.B. durch $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ eluiert. Die Zusammensetzung der nachfolgend angeführten Puffer und Lösungen sind im Handbuch des Herstellers beschrieben.

Dazu wurden 1,5 ml der über Nacht im LB-Medium gewachsenen Kultur bei $2.300 \times g$ für 5 min sedimentiert (Eppendorf Centrifuge 5415R, EPPENDORF, Hamburg) und das erhaltene Zellpellet in 250 μl P1-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte in Form der alkalischen SDS-Lyse durch Zusatz von 250 μl P2-Puffer und Inkubation für 5 min bei RT. Nach Zugabe von 350 μl N3-Puffer zur Proteindenaturierung wurde die Suspension für 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde dann auf eine QIAprep spin Säule überführt und zentrifugiert ($16.000 \times g$, 30 s, RT). Die Säulen wurden mit 750 μl PE-Puffer versetzt und nach zwei Mal Zentrifugieren erfolgte die Zugabe von 50 μl EB-Puffer. Nach einer Inkubation für 1 min bei RT wurde die DNA dann eluiert. Die so erhaltene DNA konnte anschließend für Restriktionsspaltungen oder für Transformationen eingesetzt werden.

2.2.2.5.2 Präparative Plasmidisolierung (MidiPrep)

Die Isolierung von Plasmid-DNA in größeren Mengen wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen QIAGEN Plasmid Midi Kits (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das für Plasmid-DNA selektive Aufreinigungsprinzip beruht dabei auf einer alkalischen SDS-Lyse der Zellen mit nachgeschalteter Anionenaustausch-Chromatographie. Die Zusammensetzung der nachfolgend angeführten Puffer und Lösungen sind in dem Handbuch des Herstellers beschrieben.

Eine 50 ml über Nacht angezogene Kultur wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min bei $3000 \times g$ bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ sedimentiert (Allegra 2IR, BECKMANN COULTER, Krefeld) und das erhaltene Zellpellet in 4 ml P1-Puffer mit 40 μl RNase-Lösung resuspendiert. Es erfolgte dann die Zugabe von 4 ml P2-Puffer und nach Inkubation für 5 min bei RT wurden 4 ml P3 zugesetzt. Anschließend wurde das Lysat

in eine QIAfilter Midi-Spritze überführt und 10 min bei RT stehen gelassen. Das durch die Spritze filtrierte Lysat wurde auf eine zuvor mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte QIAGEN-tip-100 Säule gegeben und zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 5 ml QF-Puffer eluiert und durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol bei RT gefällt. Durch die 30-minütige Zentrifugation bei 27.000 x g (AVANTI J-20 XPI, BECKMAN COULTER,) wurde ein Pellet erhalten und mit 2 ml eiskaltem 70%-igem (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bei RT getrocknet und in 80 µl H₂O_{deion.} aufgenommen. Die gewonnene Plasmid-DNA konnte direkt für Restriktionsspaltungen oder für Transformationen eingesetzt werden.

2.2.2.5.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei adsorbiert die DNA in Gegenwart chaotroper Salze, die die Wasserstruktur zerstören, an eine Silica Membran und wird anschließend durch z.B. H₂O_{deion.} eluiert. Dazu wurden die DNA Fragmente nach Anfärben mit Ethidiumbromid unter UV Licht mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und anschließend 3 Volumen QG zu 1 Volumen Gelstück gegeben. Nach Inkubation bei 50 °C für 10 min wurde die Suspension auf eine QIAquick spin Säule gegeben und bei 16.000 x g für 1 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415R, EPPENDORF, Hamburg). Nachdem der Durchfluss verworfen worden war, wurden 750 µl PE Puffer, der 80% Ethanol enthielt, zugegeben und für 1 min zentrifugiert. Um mögliche Ethanolspuren zu entfernen, wurde die Säule für eine weitere Minute zentrifugiert. Abschließend wurde die Säule in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, 30 µl bis 50 µl EB Puffer auf die Membran gegeben und 1 min bei RT inkubiert. Durch die anschließende Zentrifugation für 1 min wurde die DNA von der Säule eluiert.

2.2.2.5.4 Reinigung von PCR-Fragmenten

Die Umpufferung bzw. Reinigung von PCR Produkten wurde mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurden 5 Volumen des PB Puffers zu 1 Volumen PCR Probe gegeben und gründlich vermischt. Dann wurde die Suspension auf eine QIAquick spin Säule überführt und für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415R, EPPENDORF, Hamburg). Nachdem der Durchfluss verworfen worden war, wurde die Säule mit 750 µl PE Puffer versetzt und für 1 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die Säule

wurde noch einmal für 1 min zentrifugiert und dann in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Abschließend wurden 30 µl auf die Säule gegeben und die DNA durch Zentrifugation eluiert.

2.2.2.6 Restriktionsspaltung von DNA

Die in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ gelöste DNA wurde mit 2-10 U/µg DNA der entsprechenden Restriktionsendonuklease in dem vom jeweiligen Hersteller des Enzyms angegebenen Puffer für 1 bis 3 h bei 37 °C inkubiert. Die entsprechenden Puffer wurden dabei in der Regel als 10-fach konzentrierte Stammlösungen geliefert und mit 0.1 Volumen zu den Ansätzen gegeben, deren Volumina zwischen 20 und 50 µl variierte. Restriktionsspaltungen mit mehr als einem Enzym erfolgten, soweit möglich, im selben Puffersystem. War dies nicht möglich, wurden die Restriktionsspaltungen nacheinander mit einer dazwischen geschalteten Ethanolfällung vorgenommen.

2.2.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der T4-DNA-Ligase Kits (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a. M.) durchgeführt. Das Gesamtvolumen einer Ligation betrug 20 µl. Zur Ligation wurde die DNA den Präparationen nach der Isolierung aus Agarosegelen entnommen. In einem 3 fachen molaren Überschuss wurde Insert-DNA zu Vektor-DNA in 1-fach konzentriertem T4-DNA-Ligationspuffer gegeben. Anschließend wurde 1 µl T4-DNA-Ligase zugegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Alternativ wurde der Ligationsansatz über Nacht bei 16 °C inkubiert. Der Ansatz wurde dann für Transformationen eingesetzt.

2.2.2.8 Konstruktion einer PreScission-Protease-Erkennungssequenz

Zur Konstruktion einer PreScission-Protease-Erkennungssequenz wurden die zueinander komplementären Primer MALpresc.1_forw und mal_pres_rev (2.1.2) verwendet. Dazu wurden jeweils 20 µl Primer (100 µM) zu 5 µl T-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8) und 5 µl $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ gegeben. Nach einer Inkubation für 5 min bei 95 °C wurde die Suspension für 30 min bei RT inkubiert. In der Ligationsreaktion wurde die Insert-DNA in 10-fachen molaren Überschuss zu Vektor-DNA gegeben.

2.2.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist eine *in vitro* Amplifikation eines definierten DNA Fragmentes. Der Reaktion liegt folgendes Prinzip zugrunde: DNA wird durch Hitze (95 °C) in ihre Einzelstränge zerlegt. Durch eine Temperaturänderung z.B. auf 50 °C werden zwei chemisch synthetisierte Oligonukleotide (Primer) an die denaturierte DNA anhybridisiert. Die Sequenz der 5'- und 3'-Primer ist so gewählt, dass sie komplementär zu jeweils einem der Bereiche ist, die die zu vermehrende DNA flankieren. Die so entstehenden kurzen doppelsträngigen DNA-Regionen mit den in Richtung der zu amplifizierenden DNA weisenden 3'-OH-Enden der Primer sind Substrat für die DNA-Polymerase. Unter für das Enzym geeigneten Temperaturbedingungen werden die Primer mit dNTPs verlängert, so dass die entstehenden DNA-Stränge nun als Matrize für den jeweils anderen Primer dienen können. So kommt es zur Anreicherung der DNA.

Für die Generierung der 90k Fragmente wurde folgender Ansatz pipettiert und anschließend folgendes Temperaturprofil gewählt.

<u>50 µl PCR-Ansatz</u>	<u>Temperaturprofil</u>		
50 ng pMAL-c2XP-90k	95 °C	180 s	
1 µM Primer forw/rev	95 °C	60 s	} 30x
0.2 µM dNTPs	55-60 °C	45 s	
5 µl Taq-Puffer (10x)	72 °C	120 s	
x µl H ₂ O _{deion.}	72 °C	600 s	
1 µl Taq Polymerase			

Die Annealing-Temperatur für 90k(1-174), 90k(1-426) und 90k(175-426) betrug 55 °C und für 90k-His und 90k(1-426)-His 60 °C.

2.2.2.10 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte nach dem Sanger-Verfahren (SANGER, 1977) durch fluoreszenzmarkierte Nukleotide, die zugleich als Terminatoren dienten. Die Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA erfolgte im „Göttinger Genomics Laboratory“ (Institut für Mikrobiologie und Genetik, Universität Göttingen) am ABI PRISM 337 DNA-Sequencer.

2.2.2.11 Analyse der Sequenzdaten

Die Sequenzen wurden mit dem Programm Chromas Version 1.45 (C. McCarthy, Southport, Australia) geöffnet, und mit Hilfe des online zur Verfügung stehenden Programms ClustalW wurde die Sequenz mit der aus der Datenbank (2.1.1) auf ihre Richtigkeit analysiert.

2.2.3 Arbeiten mit Bakterien

2.2.3.1 Trübungsmessung

Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde in Einmalküvetten in einem Spektralphotometer (Eppendorf Biophotometer, EPPENDORF, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) gegen LB-Medium bestimmt. Proben mit hohen Zelldichten wurden stets mit LB-Medium auf eine optische Dichte zwischen 0,07 und 0,7 verdünnt und anschließend die Extinktion bestimmt.

2.2.3.2 DNA-Transfer durch vermittelte Kompetenz

2.2.3.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente Zellen haben die Eigenschaft, zirkuläre, fremde DNA aufzunehmen. Dies kann z.B. durch einen Hitzeschock induziert werden. Dafür müssen die Bakterien vorher mit Chemikalien wie z.B. $CaCl_2$ oder $RbCl_2$ Transformationskompetent gemacht werden.

Die *E. coli*-Zellen wurden durch die $CaCl_2$ -Methode kompetent gemacht. Dazu wurden 500 ml LB-Medium mit einer 10 ml Übernachtskultur inokuliert, bei 37 °C inkubiert und bei einer OD_{600} von 0,4-0,5 die Zellen für 10 min bei 4000 x g sedimentiert (AVANTI 20 XPI, BECKMAN COULTER, Krefeld). Im Fall der BL21(DE3)-RIL-Zellen enthielt das LB-Medium zusätzlich Chloramphenicol. Das Pellet wurde in 100 ml eiskaltem 0,1 M $MgCl_2$ aufgenommen, 20 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (2500 x g, 10 min). Dieser Schritt wurde mit 250 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ wiederholt und das Pellet dann in 5 ml $CaCl_2$ -Lösung [85% (v/v) 0,1 M $CaCl_2$, 15% (v/v) Glycerin] aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2.2 Transformation durch Hitzeschock

Die kompetenten *E. coli* Zellen wurden auf Eis aufgetaut, und pro Ansatz wurden in einem vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäß 50-100 µl kompetente Zellen mit 10 bis 200 ng DNA versetzt. Nach vorsichtigem Vermischen wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert und dann für 30 s auf 42 °C erwärmt. Zur Regenerierung der Zellen folgte nach Zugabe von 800 µl LB-Medium eine Inkubation für 20 min bei 37 °C. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3.2.3 Durchmusterung von Transformanten

Nach der Klonierung wurden mehrere Klone gepickt und mit Hilfe einer MiniPrep die rekombinante DNA isoliert. Zur Kontrolle der Insertgröße wurden Restriktionsenzyme eingesetzt, die auch bei der Klonierung verwendet wurden. Anschließend wurde der Ansatz auf einem Agarosegel analysiert.

2.2.3.3 Stammhaltung

Für die kurzfristige Stammhaltung wurde *E. coli* auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum-Zusatz bei 4 °C gelagert. Diese Kulturen wurden alle 4 Wochen überimpft. Für eine langfristige Stammhaltung wurden 850 µl eine Übernachtskultur mit 150 µl 87%igem Glycerin versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

2.2.3.4 Reinheitskontrollen

Kulturen von *E. coli* wurden im Phasenkontrastmikroskop (CARL ZEISS, Oberkochen) anhand ihrer Zellmorphologie auf Reinheit überprüft. Auch die Koloniemorphologie wurde als Nachweis für eine Reinkultur verwendet, wozu von *E. coli* Vereinzelungsausstriche auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum angelegt wurden.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1 Expression heterologer Proteine

2.2.4.1.1 Expression im analytischen Maßstab

Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte in *E. coli* BL21(DE3)-RIL Zellen. Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Einzelkolonie des frisch transformierten Expressionsstammes angeimpft und bei 37 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert (200 Upm). 20 ml Hauptkultur wurden 1:30 mit einer Übernachtskultur inokuliert und bei 15-37 °C inkubiert. Bei $OD_{600} \sim 0.7$ erfolgte die Induktion durch Zugabe von 1 mM IPTG und die Expressionsdauer betrug 2-16 h. Dabei wurde kurz vor der Expression (nicht induziert) und nach Beendigung der Expression (induziert) jeweils eine 1ml Probe für die SDS-Gel Analyse genommen. Die 1 ml Proben wurden für 2 min bei 2.300 x g (Eppendorf, Centrifuge 5415 R, EPPENDORF, Hamburg) zentrifugiert und die resultierenden Zellpellets mit 10 µl Laemmli-Lösung pro $OD_{600} \sim 0,1$ versetzt.

2.2.4.1.2 Expression im präparativen Maßstab

Die Expression der rekombinanten Proteine erfolgte in der Regel im 1 l Maßstab mit Hilfe der *E. coli*-BL21 bzw. BL21(DE3)-RIL-Zellen. Dazu wurde eine 50 ml in LB-Medium wachsende Kultur mit einer Einzelkolonie des frisch transformierten Expressionsstammes angeimpft und in Gegenwart des entsprechenden Antibiotikums bei 37 °C über Nacht inkubiert (200 Upm). Im Fall der Proteine, die als MBP-Fusionsprotein (Maltose Bindungs Protein) exprimiert wurden, wurde 1% Glucose dazugegeben, um die *E. coli* *Aamy* (alpha-Amylase) und die *maE* (MBP) Gene zu reprimieren. Die Hauptkultur (500 ml LB-Medium pro 2 l Erlenmeyerkolben) wurde 1:30 mit einer Übernachtskultur inokuliert. Nach Erreichen von $OD_{600} \sim 0,7$ wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG eingeleitet. Die Inkubation erfolgte bei 15-37 °C für 4-16 h. Kurz vor der Expression (nicht induziert) und nach Beendigung der Expression (induziert) wurde jeweils eine 1 ml Probe für die SDS-Gel Analyse genommen. Die 1 ml Proben wurden für 2 min bei 2.300 x g (Eppendorf, Centrifuge 5415 R, EPPENDORF, Hamburg) zentrifugiert und die resultierenden Zellpellets mit 10 µl Laemmli-Lösung pro $OD_{600} \sim 0,1$ versetzt. Nach der Expression wurden die Zellen bei 4.000 x g für 15 min sedimentiert (Avanti J-20 XPI, BECKMAN COULTER, Krefeld)

und der Überstand vollständig verworfen. Das Pellet wurde entweder bei -20 °C weggefroren oder gleich aufgearbeitet.

2.2.4.2 Zellernte und Zellaufschluss

2.2.4.2.1 Zellaufschluss im analytischen Maßstab

Es wurden 1,5 ml *E. coli* BL21(DE3)-RIL-Zellen (2.1.1) in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 min bei 2.300 x g zentrifugiert [(4 °C), Eppendorf Centrifuge 5810 R, EPPENDORF, Hamburg] und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 500 µl vorgekühltem Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl) in Gegenwart von 1 mg/ml Lysozym, 1 mM EDTA, 10 µl complete EDTA-free Protease Inhibitor Lösung [(1 Tablette pro 2 ml H₂O_{deion.}), ROCHE, Penzberg] resuspendiert und für 20 min bei 4 °C unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Suspension alternierend 5 Mal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C aufgetaut. Die lysierten Zellen (Rohextrakt) wurden anschließend für 15 min bei 10.000 x g (4 °C) zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile von der Suspension zu trennen. Der klare Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Für die Analyse des Gesamtzellproteins, des löslichen Überstandes und Pellets durch SDS-PAGE wurden jeweils 50 µl Probe genommen und in einem 1:1-Verhältnis mit Laemmli-Lösung versetzt.

2.2.4.2.2 Zellaufschluss im präparativen Maßstab

Die pelletierten Zellen wurden in 50 ml eiskaltem Lysis-Puffer pro Liter Expressionskultur in Gegenwart einer halben complete EDTA-free Protease Inhibitor Tablette (ROCHE, Penzberg) und 1 mM EDTA resuspendiert. Im Fall der IMAC Reinigung wurde kein EDTA verwendet. Die Zellyse erfolgte mit Hilfe eines Fluidizers (MICROFLUIDICS, Masechussats, USA). Zuerst wurde der Fluidizer bei 7 bar und unter Kühlung (4 °C) mit 500 ml H₂O_{deion.} gespült und anschließend mit dem gewünschten Puffer äquilibriert. Anschließend wurde der Fluidizer mit der Zellsuspension versetzt, und nach 5 Durchgängen waren die Zellen lysiert (Rohextrakt). Mit 500-1000 ml H₂O_{deion.} wurde der Fluidizer gespült und in Isopropanol gelagert. Zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurde die Suspension für 15 min bei 4 °C zentrifugiert (27.000 x g). Der klare Überstand wurde vorsichtig abgenommen und sterilfiltriert (0,25 µm oder 0,45 µm Filter) und anschließend für die Affinitätschromatographie verwendet. Für die Analyse des Gesamtzellproteins, des

löslichen Überstandes und Pellets durch SDS-PAGE wurden jeweils 50 µl Probe genommen und in einem 1:1- Verhältnis mit Laemmli-Lösung versetzt.

2.2.4.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach LAEMMLI (1970)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine denaturiert und nach deren Molekulargewichten aufgetrennt. Dabei werden die Disulfidbrücken durch β -Mercaptoethanol gelöst reduziert und mit Hilfe von SDS wird die dreidimensionale Struktur aufgelöst. Durch die Bindung des SDS an das Protein wird eine starke negative Ladung in die Polypeptidkette eingeführt. Als Gelmatrix dient polymeres Acrylamid.

20-50 µl Proteinprobe wurden 1:1 mit Laemmli-Lösung versetzt und 10 µl in die zuvor mit einer Pipette gespülten Geltaschen geladen. Um die Molekulargewichte gelelektrophoretischer aufgetrennter, denaturierter Proteine abschätzen zu können, wurden 10 µl Protein-Größenstandard parallel zu den Proben aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 120 V bis kurz vor Auslaufen des Farbfront. In Tab. 6 ist die Zusammensetzung der SDS-Gele dargestellt.

Benötigte Lösungen:

- 30% Acrylamid-Stammlösung (PAA₃₀; Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid von 37,5:1)
- Trenngelpuffer: 1,88 M Tris/HCl, pH 8,8
- Sammelgelpuffer: 0,625 M Tris/HCl, pH 6,8
- 0,5% (w/v) SDS-Lösung
- 100% N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)
- 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
- Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,8, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS
- 2x SDS-Probenpuffer: 20% 0,625 M Tris/HCl, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) β -Mercaptoethanol, 1% (v/v) Bromphenolblau (1%-ig in Ethanol) → Laemmli-Lösung

Tab. 6: SDS-Gele

Komponenten	10% iges Trenngel	12,5%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
PAA ₃₀ [ml]	2	2,5	0,33
Trenngelpuffer [ml]	1,2	1,2	--
Sammelgelpuffer [ml]	--	--	0,4
SDS-Lösung [ml]	1,2	1,2	0,4
H ₂ O _{deion.} [ml]	1,6	1,1	0,87
Temed [µl]	5	5	2
APS [µl]	30	30	10

2.2.4.4 Färbung von Proteingelen

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel in eine mit Coomassie-Färbelösung [25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig, 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 0,05% (w/v) Coomassie G250] gefüllte Schale gelegt und für mindestens 15 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach der Färbung wurde das Proteingel in eine Entfärbelösung [45% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure] gelegt und solange entfärbt, bis Banden zu erkennen waren. Anschließend wurde das Gel in H₂O überführt und mit einer Geldoc 2000 (BIO-RAD, München) dokumentiert.

2.2.4.5 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Bradford Reagenzes (BIORAD, München). Der Bradford-Assay beruht auf der Anfärbung durch den Farbstoff Coomassie Brilliantblau G 250. Dabei kommt es beim Kontakt von Proteinen mit dem Farbstoff zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) auf 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form), da die anionische Sulfonatform in einem Proteinkomplex stabilisiert wird. Die Bindung erfolgt an kationische und exponierte hydrophobe Seitenketten des Proteins.

Dazu wurden 20 µl Proteinsuspension zu 980 µl einer 1:5 mit H₂O_{deion.} verdünnten Bradfordlösung in einer Einmalküvette gegeben und sorgfältig vermischt. Es folgte eine Inkubation für 5 min bei RT. Die Probe wurde anschließend im Photometer (Eppendorf

BioPhotometer) gegen den Leerwert bei 595 nm gemessen und die Extinktion entsprach unmittelbar der Proteinkonzentration in mg/ml.

2.2.5 Proteinreinigung

2.2.5.1 Affinitätsreinigung

Die Grundlagen der Affinitätschromatographie liegen in den spezifischen Wechselwirkungen zwischen (Makro)Molekülen. Besonders wichtig sind hierbei Antikörper – Antigen, Protein – Substrat, Hormon – Rezeptor, Kohlenhydrat – Lectin und komplementäre Nukleinsäuren. Zur Affinitätsreinigung nimmt man so genannte *beads* (Kügelchen), die aus einer Matrix wie z.B. Agarose bestehen, an der kovalent spezifische Liganden (Substrat) gebunden sind. Bei der Affinitätsreinigung bindet das Zielprotein an seinem Substrat und wird abschließend mit einem kompetitiven Liganden eluiert.

2.2.5.1.1 Reinigung der Proteine im *batch*-Verfahren mittels Glutathion Sepharose

Im Falle des Enzyms Glutathion S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* benutzt man dessen Affinität zu dem Tripeptid N-Glu-Cys-Gly-C (kurz GSH, Glutathion), um es aus einem Proteinrohextrakt von *E. coli* zu reinigen. Der Ligand GSH ist dabei kovalent an eine Trägermatrix wie z. B. Sepharose gebunden. So bindet das GST-Fusionsprotein an GSH, während die restlichen *E. coli*-Proteine durchlaufen. Das GST-Fusionsprotein kann anschließend durch einen Überschuss an reduziertem GSH von den *beads* eluiert werden.

20 ml Glutathion Sepharose 4B (AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg), welche vom Hersteller in 20%iger Ethanollösung geliefert wird, wurden auf eine Leersäule (Poly-Prep *Chromatography Columns*, BIORAD, München) gegeben und mit drei Säulenvolumen $H_2O_{\text{deion.}}$ gewaschen. Dann wurden 50 ml des löslichen Proteinextraktes auf einer mit Lysis-Wasch-Puffer äquilibrierten Säulenmatrix gegeben und anschließend solange mit Lysis-Wasch-Puffer gespült, bis im Durchfluss kein Protein mittels Bradford nachweisbar war. Anschließend wurde das GST-Fusionsprotein auf der Säulenmatrix gespalten und das Zielprotein mit Wasch-Puffer von der Säulenmatrix gespült. Abschließend wurde GST mit Elutions-Puffer von der Säule eluiert.

Lysis-Wasch-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7.5
120 mM NaCl
2 mM DTT

Elutions-Puffer

20 mM Tris-HCl, pH 7.5
120 mM NaCl
2 mM DTT
15 mM reduziertes Glutathion

Regeneration der Säulenmatrix

Die Glutathion Sepharose-Säule wurde mit 2 Säulenvolumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$, 1 Säulenvolumen 6 M Guanidiniumhydrochlorid und 3-5 Säulenvolumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ gespült. Die Säulenmatrix wurde dann in 20 % Ethanol überführt.

2.2.5.1.2 Reinigung der Proteine mit Hilfe einer Amylose-Säule

Im Fall des Maltose Bindungs Proteins (MBP) nutzt man dessen Affinität zur Amylose, die aus mehreren Maltoseeinheiten besteht. Das Zielprotein bindet über den MBP-Fusionsanteil an Amylose (NEW ENGLAND BIOLABS, Frankfurt a.M.), die kovalent an paramagnetischen Partikel gekoppelt ist, und wird nach dem Waschen der Säule mit Maltose eluiert.

Dazu wurden 50 ml des Überstandes einer 1 l Expressionskultur auf eine mit Lysis-Puffer äquilibrierte 25 ml Amylose-Säule [XK16/20, AMERSHAM BIOSCIENCE, Freiburg], die an der Äkta-Prime oder dem Äkta-Purifier (AMERSHAM BIOSCIENCE, Freiburg) angeschlossen war, geladen. Die Flussgeschwindigkeit betrug dabei 1 ml/min und die Absorption der Moleküle wurde bei 280 nm verfolgt. Der Durchfluss wurde in 8 ml und die Elution der Proteine in 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Säulenmatrix wurde solange mit Lysis/Wasch-Puffer gewaschen, bis keine Absorption der Moleküle bei 280 nm zu erkennen war. Anschließend wurde das MBP-Fusionsprotein mit Elutions-Puffer eluiert und alle Proben auf einem SDS-Gel analysiert.

Lysis/Wasch-Puffer für 90k und 90k-Fragmente

50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-HCl}$ oder 50mM Tris-HCl, pH 7.5
300 mM NaCl,
1 mM EDTA

Elutions-Puffer für 90k und 90k Fragmente

50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-HCl}$ oder 50mM Tris-HCl, pH 7.5
300 mM NaCl, 1 mM EDTA , 10 mM Maltose

Die Fragmente, die anschließend mit einem Kationenaustauscher weiter gereinigt worden sind, wurden in Gegenwart des $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-HCl}$, pH 7.5 Puffers aufgereinigt

Lysis/Wasch-Puffer für MBP-60k

50 mM Tris-HCl, pH 7.5
300 mM NaCl
1 mM EDTA
2 mM DTT

Elutions-Puffer für MBP-60k

50 mM Tris-HCl, pH 7.5
300 mM NaCl
1 mM EDTA
10 mM Maltose
2 mM DTT

Regeneration einer Amylose-Säule

Die Amylose-Säule wurde mit 2 Säulenvolumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$, 2 Volumen 0.1% SDS und 3 Volumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ regeneriert. Anschließend wurde die Säulenmatrix in 20% Ethanol überführt.

2.2.5.1.3 Reinigung der Proteine mittels IMAC (Immobilisierte Metal Ionen Affinitäts-Chromatographie)

Eine effektive Methode der Aufreinigung rekombinanter Proteine ist die Adsorption an Ni-NTA (Nickelchelat-Nitrilotriacetacic Acid). Dabei bilden die konsekutiven Histidinreste (His-tag) einen stabilen Koordinationskomplex mit den Nickelionen, die an der NTA gekoppelt sind. Das NTA ist seinerseits an einer Matrix wie z.B. Agarose gebunden. Durch das Imidazol, welches mit dem Histidin um die Bindung an Nickel konkurriert, kann das Protein in einem Konzentrationsgradienten eluiert werden.

Im Fall des His-90k Proteins wurde die Reinigung im *batch*-Verfahren durchgeführt. Dazu wurden 4 ml Ni-NTA (QIAGEN, Hilden) auf eine Leersäule (Poly-Prep *Chromatography Columns*, BIORAD, München) gegeben und mit Puffer1 (Lysis-Puffer) äquilibriert. 50 ml des löslichen Proteinextraktes einer 1 l Expressionskultur wurden auf einer Säule geladen, und anschließend wurde die Säulenmatrix mit 25 ml Puffer2 und 25 ml Puffer3 gewaschen. Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgte durch die Zugabe von Puffer4, dabei wurden 1 ml Fraktionen gesammelt.

Puffer für His-90k

Puffer1

50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-HCl}$ pH 7.5
300 mM NaCl
2 mM β -Mercaptoethanol

Puffer2

50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-HCl}$ pH 7.5
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
2 mM β -Mercaptoethanol

Puffer3

50 mM NaH₂PO₄-HCl pH 7.5
300 mM NaCl
20 mM Imidazol
2 mM β-Mercaptoethanol

Puffer4

50 mM NaH₂PO₄-HCl pH 7.5
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
2 mM β-Mercaptoethanol

Im Fall der MBP-90k-His und MBP-90k(1-426)-His wurde eine 10 ml Ni-NTA-Säule (XK16/20, AMERSHAM BIOSCIENCE, Freiburg) benutzt, die an eine Äkta-Prime oder einen Äkta-Purifier (AMERSHAM BIOSCIENCE) angeschlossen war. Die Flussgeschwindigkeit betrug dabei 1 ml/min und die Absorption der Moleküle wurde bei 280 nm verfolgt. Es wurde ein Gradient von 0 bis 250 mM Imidazol über 8 Säulenvolumen angelegt. Der Durchfluss wurde in 8 ml und die Elution in 2 ml Fraktionen gesammelt.

Puffer für MBP-90k(1-426)-HisPufferA

50 mM NaH₂PO₄-HCl pH 7.5
300 mM NaCl
2 mM β-Mercaptoethanol

PufferB

50 mM NaH₂PO₄-HCl pH 7.5
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
2 mM β-Mercaptoethanol

Puffer für MBP-90k-HisPufferA

50 mM Tris-HCl pH 7.5
800 mM NaCl
2 mM β-Mercaptoethanol

PufferB

50 mM Tris-HCl pH 7.5
800 mM NaCl
250 mM Imidazol
2 mM β-Mercaptoethanol

Regeneration einer Ni-NTA-Säule

Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumen H₂O_{deion.}, 1 Säulenvolumen 6 M Guanidiniumhydrochlorid und 3-5 Volumen H₂O_{deion.} regeneriert und anschließend in 20% Ethanol gelagert.

2.2.5.2 Ionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie basiert auf der elektrostatischen Anziehung zwischen elektrisch entgegengesetzt geladene Ionen. Im ersten Schritt werden die

ionischen Substanzen über elektrostatische Anziehungskräfte an die positiv geladene (Anionenaustauscher) oder an die negativ geladenen (Kationenaustauscher) Gruppen einer Matrix gebunden; im zweiten Schritt werden sie sukzessiv eluiert und dadurch voneinander getrennt. Die sukzessive Elution kann entweder durch Änderung der Ladung der gebunden Ionen oder durch Verdrängung durch Ionen höherer Ladungsdichte oder höherer Konzentrationen erfolgen. Die Proteinreinigung erfolgte an einem Äkta-System (Äkta-Prime und Äkta-Purifier, AMERSHAM BIOSCIENCE, Freiburg).

Puffer für einen Anionenaustauscher (ResourceQ-1ml)

Puffer A: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2 mM DTT

Puffer B: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM DTT

Puffer für einen Kationenaustauscher (ResourceS-1ml, Source30S-16ml)

Puffer A: 50 mM NaH₂PO₄-HCl pH 7.5, 2 mM DTT

Puffer B: 50 mM NaH₂PO₄-HCl pH 7.5, 1 M NaCl, 2 mM DTT

2.2.5.3 Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie

Viele lösliche Proteine besitzen auf ihrer Oberfläche hydrophobe Bereiche. In wässriger Lösung assoziieren diese hydrophoben Bereiche mit hydrophoben Oberflächen. Die Assoziationsneigung hängt von der Struktur des Wassers ab und diese wiederum von den darin gelösten Salzen. Durch hohe Konzentrationen bestimmter Salze wie z.B. (NH₄)₂SO₄ werden hydrophobe Wechselwirkungen verstärkt. Die Probe wird bei hoher Ionenstärke (Puffer A) auf die hydrophobe Matrix (Phenylsepharose) geladen und mit einem abnehmenden Salzgradienten (Puffer B) werden die Proteine eluiert.

Puffer für MBP + 90k(1-174)

Puffer A: 50 mM NaH₂PO₄-HCl pH 7.5, 1 M (NH₄)₂SO₄, 2mM DTT

Puffer B: 50 mM NaH₂PO₄-HCl pH 7.5, 2mM DTT

Puffer für MBP + 60k

Puffer A: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M (NH₄)₂SO₄, 2mM DTT

Puffer B: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 2mM DTT

2.2.5.4 Gelfiltrationschromatographie

Bei der Gelfiltration werden Moleküle nach ihrer Größe getrennt. Über die Proteintrennung hinaus kann die Gelfiltration auch zur Molekulargewichtsbestimmung eingesetzt werden.

Der über die Säule fließende Puffer stellt die flüssige Phase dar. Bei der stationären Phase handelt es sich um keine feste Phase im klassischen Sinne, sondern die feste Phase besteht vielmehr aus schwammartigen Gelpartikeln, die in ihrem Inneren mit Pufferflüssigkeit gefüllt sind und den Puffer fixieren. Die Gelpartikel bestehen aus einem inerten, stark hydratisierten polymeren Material wie z.B. Dextran-Gel.

Die in 20% Ethanol gelagerte Gelfiltrationsäule wurde mit 1,5 Säulenvolumen $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ und anschließend mit dem gewünschten Puffer äquilibriert. Es wurden Puffer verwendet, die aus 20-50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 bzw. 800 mM NaCl und 2 mM DTT, bestanden.

Für analytische Zwecke wurde eine Superdex 75-Säule (10/30) bzw. Superdex 200-Säule (10/30) (AMERSHAM BIOSCIENCE, Freiburg) benutzt, wobei das Probenvolumen 0,5-1 ml mit einer Proteinkonzentration von 0,5-4 mg/ml betrug. Die Flussgeschwindigkeit betrug dabei 0,5 ml/min. Läufe im präparativen Maßstab wurden hingegen mit Hilfe einer Superdex 75-Säule (26/60) und Superdex 200-Säule (26/60) (AMERSHAM BIOSCIENCE, Freiburg) bei einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min durchgeführt. Das Probenvolumen betrug zwischen 2 ml und 5 ml mit einer Konzentration von 4 mg/ml bis 8 mg/ml.

2.2.5.5 Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins

2.2.5.5.1 Spaltung mit einer Factor-Xa-Protease

Es wurden die Proteasen der Firmen AMERSHAM BIOSCIENCE (Freiburg) und NOVAGEN (Bad Soden) benutzt.

Unit Definition

AMERSHAM BIOSCIENCE: 1 U schneidet 100 μg GST Fusionsprotein in einem Puffer bestehend aus 1 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl und 50 mM Tris-HCl pH 8.0 bei 22 °C für 16 h zu mehr als 90%.

NOVAGEN: 1 U schneidet 50 μg Fusionsprotein in einem Puffer bestehend aus 5 mM CaCl_2 , 100 mM NaCl und 50 mM Tris-HCl pH 8.0 bei 20 °C für 16 h.

2.2.5.5.2 Spaltung mit PreScission-Protease

Zu 1 mg Protein wurden 20 µl GST-PreScission Protease (~0.3 mg/ml) gegeben und für 16 h bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert.

2.2.5.5.3 Spaltung auf einer Säulenmatrix mit PreScission-Protease

Nach dem Zellaufschluss wurde der Überstand mit Glutathion Sepharose, die sich in eine Leersäule (*Poly-Prep Chromatography Columns*, BIORAD, München) befand, inkubiert und anschließend die Verunreinigungen durch Spülen mit Wasch-Puffer entfernt. Dann wurde zu einem Bettvolumen Säulenmaterial ein Volumen Wasch-Puffer gegeben. Die Suspension wurde in ein Falcon Röhrchen überführt und anschließend mit PreScission Protease unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Säulenmaterial wieder in eine Leersäule (*Poly-Prep Chromatography Columns*, BIORAD, München) überführt und das Zielprotein aufgefangen. Durch Zugabe eines Wasch-Puffers wurde das auf der Säulenmatrix noch befindliche Zielprotein heruntergewaschen. Abschließend wurde mit Elutions-Puffer das GST von der Säulenmatrix eluiert.

2.2.5.6 Bindungsexperimente

- **Interaktion des 90k bzw. 90k-Fragmente mit SMNrp**

Das Pellet einer 50 ml Expressionskultur (GST-SMNrp) wurde in 2 ml PD-Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT) aufgenommen und im analytischen Maßstab aufgeschlossen. Für den Kontrollversuch wurde zusätzlich GST (pGEX-6P-1) bei 37 °C für 2 h im 50 ml Maßstab exprimiert. Der Rohextrakt (Zelllysat) wurde mit 6 ml PD-Puffer versetzt und für 10 min bei 16000 x g (4 °C) zentrifugiert [Eppendorf Centrifuge, 5415R, EPPENDORF, Hamburg]. Anschließend wurde der Überstand auf eine zuvor mit PD-Puffer äquilibrierte 300 µl Glutathion Sepharose-Säule (*Poly-Prep Chromatography Columns*, BIORAD, München) gegeben. Die Säulenmatrix wurde so lange mit PD-Puffer gewaschen bis mittels Bradford kein Protein mehr nachweisbar war.

Es wurden 150 µl (von 300 µl) Glutathion Sepharose, an der GST-SMNrp oder GST gebunden war, entnommen und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 1 ml Proteinlösung (s. Tab. 7) versetzt und für 5 min unter gelegentlichem Schwenken der Reaktionsgefäße inkubiert. Zuvor wurden die

gereinigten 90k(1-174), 90k(1-426)-His und 90k(175-426) durch Zugabe von 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 auf eine Salzkonzentration von 150 mM NaCl und das gereinigte 90k-His auf eine Salzkonzentration von 200 mM NaCl verdünnt. Nachdem die Reaktionsgefäße für 1.5 min bei 2.300 x g (Eppendorf Centrifuge, 5415R) zentrifugiert wurden, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen (Durchflussfraktion). Danach wurde das Säulenmaterial 2 Mal mit 1 ml PD-Puffer gewaschen, durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand vollständig abgenommen. Abschließend wurden zu dem Säulenmaterial 30 µl PD-Puffer gegeben, resuspendiert und zusammen mit den anderen Proben mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert.

Tab. 7: Eingesetzte Proteinkonzentrationen

Protein	Konzentration (mg/ml)
90k-His	0.6
MBP + 90k-His	0.6
MBP + 90k(1-174)	0.6
90k(1-426)-His	0.8
90k(175-426)	0.5

- **Interaktion des 20k bzw. 90k mit 60k**

Das Pellet einer 50 ml Expressionskultur (MBP-60k) wurde in 2 ml PD-Puffer (s.u.) aufgenommen und im analytischen Maßstab aufgeschossen. Für den Kontrollversuch wurde zusätzlich das MBPlacZ α (pMAL-c2X) bei 37 °C für 2 h im 50 ml Maßstab exprimiert. Das *maIE* Gen besaß kein Stop *codon*, so dass das strom abwärts lokalisierte *lacZ α* als MBP-Fusionsprotein exprimiert wurde. Das Zellysate wurde mit 6 ml PD-Puffer versetzt und für 10 min bei 16000 x g (4 °C) zentrifugiert [Eppendorf Centrifuge, 5415R, EPPENDORF, Hamburg]. Anschließend wurde der Überstand auf eine zuvor mit PD-Puffer äquilibrierte 300 µl Amylose-Säule (Poly-Prep *Chromatography Columns*, BIORAD, München) gegeben. Die Säule wurde so lange mit PD-Puffer gewaschen bis mittels Bradford kein Protein mehr nachweisbar war.

Anschließend wurden 150 µl (von 300 µl) Amylose, an der MBP-60k oder MBP-lacZ α gebunden war, entnommen und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 ml Proteinlösung (s. Tab. 8) versetzt und für 5 min unter gelegentlichem Schwenken der Reaktionsgefäße inkubiert. Das 20k (2.1.1) befand sich in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 120 mM NaCl, 2 mM DTT. Das 90k-His wurde mit 50 mM Tris-HCl pH 7.5 auf eine Salzkonzentration von 200 mM NaCl verdünnt. Für die Bindungsstudie in Gegenwart von Glycerin wurden zur 90k-His-Proteinlösung Glycerin mit einer Endkonzentration von 10 % gegeben.

Nachdem die Reaktionsgefäße für 1.5 min bei 2.300 x g zentrifugiert wurden, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen (Durchflussfraktion). Danach wurden das Säulenmaterial 2 Mal mit 1 ml PD-Puffer gewaschen und nach Zentrifugation der Überstand vollständig abgenommen. Abschließend wurden zu dem Säulenmaterial 30 µl PD-Puffer gegeben, resuspendiert und zusammen mit den anderen Proben mit Hilfe einer SDS-PAGE analysiert.

PD-Puffer für die 60k::20k-Interaktion

20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT

PD-Puffer für die 60k::90k-Interaktion

1) 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT

2) 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 10 % Glycerin

Tab. 8: Eingesetzte Proteinkonzentrationen

Protein	Konzentration (mg/ml)
20k	0.7
90k-His	0.6

2.2.5.7 Umpufferung von Proteinen

Proteinlösungen können z.B. durch Dialyse umgepuffert werden. Eine andere Methode ist die Umpufferung mit Hilfe von PD-10 Säulen (AMERSHAM BIOSCIENCE, Freiburg). Das Prinzip basiert auf einer Gelfiltration. Analog zu der Gelfiltration werden Partikel nach ihrer Größe aufgetrennt.

Dazu wurde eine PD-10-Säule mit 25 ml Puffer X äquilibriert und anschließend 2,5 ml Proteinsuspension aufgetragen. Nach Zugabe von 3,5 ml Puffer X erfolgte die Elution der Proteine.

2.2.5.8 Konzentrierung von Proteinen

Nach der Reinigung wurden die Proteinlösungen mit Hilfe von Konzentratoren (SARTORIUS, Göttingen) auf die gewünschte Konzentration gebracht. Dabei wird die zu konzentrierende Proteinlösung auf einem Filter mit einer definierten Ausschlussgrenze gegeben (cut-off) und bei 3000-4000 x g (Allegra 2IR, BECKMAN

COULTER, Krefeld) zentrifugiert. Das Konzentrat wurde anschließend resuspendiert und in neue Reaktionsgefäße überführt.

2.2.5.9 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

Für eine röntgenkristallographische Analyse braucht man drei Komponenten: Eine Quelle für Röntgenstrahlen, ein Proteinkristall und einen Detektor. Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen. Sie entstehen in einer Röntgenröhre. Diese besteht aus einer Glühkathode und einer Anode. Durch das Anlegen von Spannung zwischen Kathode und Anode werden die aus der Glühkathode austretenden Elektronen in Richtung Anode beschleunigt. Die Elektronen prallen nun auf die Anode und Röntgenstrahlung entsteht. Ein Teil des Röntgenstrahls geht ohne jede Richtungsänderung durch den Kristall hindurch, der Rest aber wird in verschiedene Richtungen gebeugt oder gestreut. Die gebeugte Strahlung kann mit einem Detektor registriert und anschließend können 3-dimensionale Elektronendichtekarten berechnet werden.

2.2.5.9.1 Kristallisation biologischer Makromoleküle

Kleine anorganische und organische Moleküle können durch einfache Methoden (z.B. kontrolliertes Abkühlen einer heißen gesättigten Lösung oder langsame Präzipitation) kristallisiert werden. Das Kristallwachstum von Proteinmolekülen hingegen ist ein Prozess, der von vielen verschiedenen Faktoren (z.B. Temperatur, Konzentration und Reinheit des Proteins, Art und Konzentration von Puffern und Fällungsmitteln) abhängig ist.

Da in den meisten Fällen die Menge des Proteins, die Zeit und das Geld begrenzt sind, gibt es Initial-Screens, deren Zusammensetzung statistisch aus bereits bekannten Kristallisationsbedingungen ermittelt wurde. Auf diese Weise erhält man in ersten Kristallisationsexperimenten Hinweise auf eine mögliche Zusammensetzung der Kristallisationslösung (Mutterlösung). Durch Variation der Komponentenkonzentrationen, den Austausch gleichwertiger Ionen und der Konzentrationsänderung des Proteins können die Kristallisationsbedingungen optimiert werden.

Die verwendete Dampfdiffusion, durchgeführt als hängender oder sitzender Tropfen, ist die häufigste Methode zur Herstellung von Kristallen. Zu Beginn der Experimente werden die Tropfen in einem 1:1-Verhältnis von Proteinlösung zu Kristallisationslösung gemischt und in einem abgeschlossenen System durch die Platzierung auf einem Stempel (sitzender Tropfen) oder unter dem Deckel (hängender Tropfen) von der Reservirolösung räumlich getrennt. Ein Konzentrationsgradient wird aufgrund der

unterschiedlichen Konzentrationen des Fällungsmittels in Tropfen und Reservoir aufgebaut. Daraufhin diffundiert das Wasser aus dem vergleichsweise kleinen Tropfenvolumen und sowohl die Konzentration der Proteinlösung als auch des Fällungsmittels werden erhöht.

Zur Kristallisation der in dieser Arbeit produzierten Proteine wurden Cryschem Platten verwendet (sitzender Tropfen, Hampton Research, USA). Es wurden die kommerziell erhältlichen Screens der Firmen Hampton Research (Crystal Screen 1 und 2, Crystal Screen Lite, Crystal Screen Cryo, PEG/Ion), Jena Bioscience (JBScreen 1-10), Biogenova (Magic Screen), Molecular Dimensions (Footprint Screen, Structure Screen) verwendet. Im Reservoirbehälter befanden sich 400 µl bis 1000 µl Kristallisationslösung, von der in der Regel 1 µl mit 1 µl Proteinlösung (2-20 mg/ml, die Proteine befanden sich in 20-50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 120-150 mM NaCl, 2 mM DTT) vermischt wurde. Anschließend wurden die Platten mit einem lösungsmittelbeständigen Klebeband abgedichtet und bei 4 °C, 20 °C oder 37 °C aufbewahrt. In regelmäßigen Abständen wurden dann die Ansätze mit Hilfe eines Leica MZ125-Stereo Mikroskops kontrolliert und mögliche Kristalle mit einer Nikon-Coolpix 4500 Digitalkamera dokumentiert.

2.2.5.9.2 Montage der Kristalle zur Datensammlung

Mit einer Nylonschleife (Größe: 0,05-0,1 mm), die auf einem Stab mit Magnetkappe befestigt ist, wurde der Kristall gefischt und auf den Goniometerkopf der Drehanode montiert. Als Kryo-Puffer diente im Fall des 90k-His und des MBP-60k die Kristallisationslösung. Die Reflexdaten wurden mit Hilfe einer Röntgenanode (Rigaku) und mar 345 dtb Detektor aufgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Expression und Reinigung des humanen U4/U6-60k

3.1.1 Expression des GST-60k

60k, das bereits als *NdeI-XhoI*-Kassette im modifizierten pGEX-6P1+1 (Abb. 13) kloniert war, sollte als GST-Fusionsprotein (Glutathion S-Transferase) über-exprimiert werden. Nach der Affinitätsreinigung sollte 60k vom GST mit der PreScission-Protease abgespalten und weiter gereinigt werden.

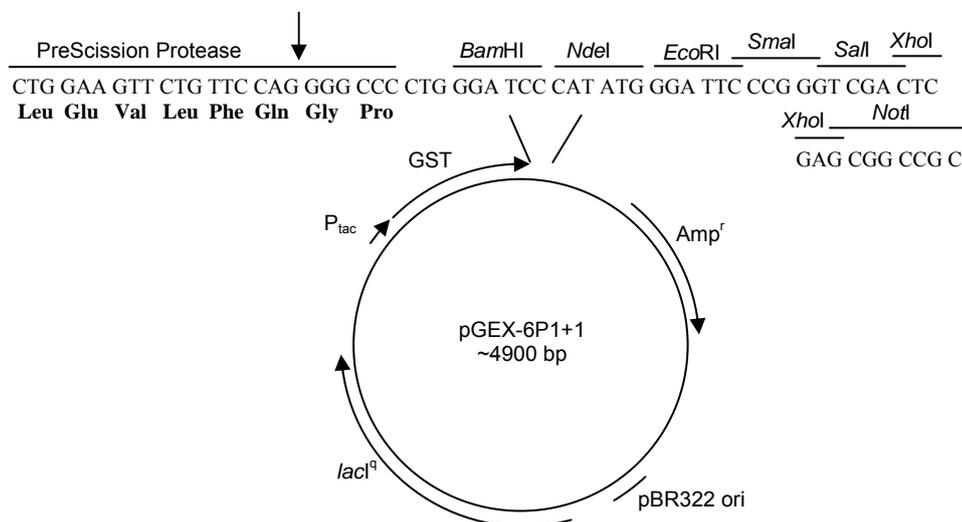


Abb. 13: Schematische Darstellung des pGEX-6P-1+1-Expressionsvektors: Amp^r, pBR322 ori und *lacI*^q bezeichnen das Ampicillinresistenzgen, den Replikationsursprung und das *lacI*^q Repressorgen. Die Expressionskassette steht unter der Kontrolle des P_{tac}-Promotors/Operators. Die gezeigte Sequenz umfasst die MCS (Multiple Cloning Site), in die die Zielgene inseriert werden. Stromaufwärts der MCS befindet sich eine Sequenz, die für eine PreScission-Protease-Erkennungssequenz kodiert und eine Sequenz, die für Glutathion S-Transferase (GST) kodiert. Im Vergleich zum pGEX-6P-1 enthält der pGEX-6P1+1 eine zusätzliche *NdeI*-Schnittstelle in der MCS.

Bei der heterologen Expression in *E. coli* kann es zu geringen Ausbeuten rekombinanter Proteine aufgrund vorzeitigen Abbruchs der Proteinbiosynthese kommen. Dies kann als Ursache haben, dass *E. coli* andere *codons* im Vergleich zum Organismus X, aus dem das zu exprimierende Gen stammt, favorisiert. Um dies auszuschließen, wurde die Gensequenz des humanen 60k mit der von *E. coli* verwendeten *codon usage* mit Hilfe des Programms Rare Codon Calculator (RaCC),

<http://66.75.144.39/cgi-bin/cmura/racc.html>, verglichen. Bei der Überprüfung stellte sich heraus, dass das 60k-Gen eine Vielzahl an seltenen *codons* wie AGG (Arg), AGA (Arg), CGA (Arg), CTA (Leu), ATA (Ile) und CCC (Pro) besitzt. Die dazugehörige Sequenz ist im Anhang abgebildet. Für die Expression solcher Gene gibt es kommerziell erhältliche Stämme wie z.B. den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)-RIL. Dieser Stamm verfügt über zusätzliche Kopien der t-RNA Gene *argU*, *ileY* und *leuW*, die für t-RNAs kodieren, die Arginin *codons* (AGA, AGG), Isoleucin *codons* (AUA) und Leucin *codons* (CUA) erkennen. Deshalb wurde 60k zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-RIL-Zellen transformiert. Die Expression erfolgte im analytischen Maßstab bei 30 °C für 4 h und bei 15 °C für 16 h. In Abb. 14 ist die Expression des GST-60k bei 15 °C dargestellt.

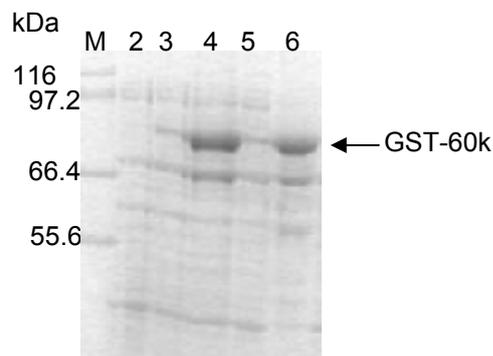


Abb. 14: Expression des GST-60k: 10%-iges SDS-Gel. GST-60k wurde bei 15 °C für 16 h exprimiert. GST-60k läuft auf Höhe des zu erwartenden Molekulargewichtes von 86 kDa und ist mit einem Pfeil markiert. M: BR-Marker, 2: nicht induziert, 3: induziert, 4: Rohextrakt, 5: Überstand, 6: Pellet.

Aus der SDS-PAGE geht hervor, dass GST-60k unlöslich exprimiert wurde (Rohextrakt: Spur 4, Überstand: Spur 5, Pellet: Spur 6). Die Expression bei 30 °C zeigte das gleiche Ergebnis, daher sollte 60k in pMAL-c2X umkloniert und als MBP-Fusionsprotein (Maltose-Bindungs-Protein) exprimiert werden.

3.1.2 Umklonierung des 60k in den pMAL-c2X-Vektor

Um auszuschließen, dass 60k eine Factor-Xa-Protease-Erkennungssequenz enthält, wurde vor der Klonierung in pMAL-c2X (Abb. 15) die 60k-Proteinsequenz mit Hilfe des Programms PeptideCutter (www.expasy.ch) überprüft. 60k wurde als *Bam*HI-*Xho*I-Kassette aus pGEX-6P1+1 und pMAL-c2X mit *Bam*HI-*Sa*I geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurde 60k

in pMAL-c2X ligiert. Die Klonierung des 60k in pMAL-c2X konnte durchgeführt werden, da die Restriktionsenzyme *XhoI* und *SalI* beim Schneiden von DNA den gleichen Überhang erzeugen. Durch die Klonierung wurde die *SalI*-Schnittstelle des pMAL-c2X-Vektors eliminiert.

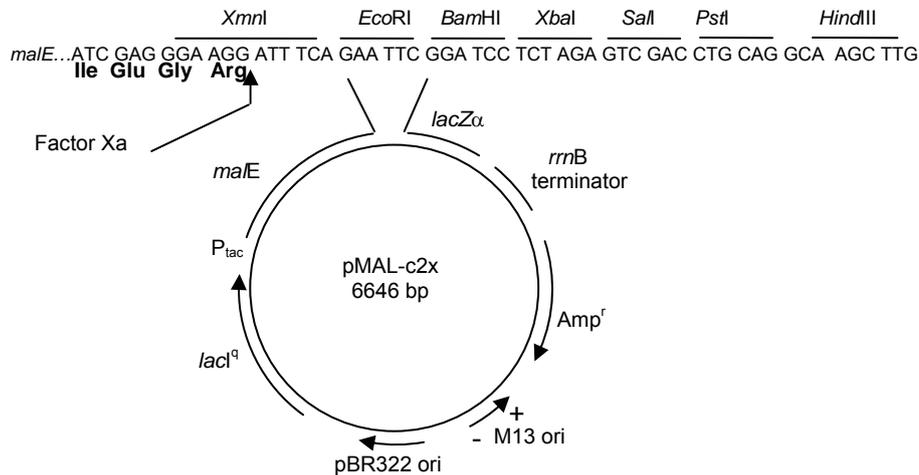


Abb. 15: Schematische Darstellung des pMAL-c2X-Expressionsvektors: Der Vektor setzt sich zusammen aus dem *rrnB* terminator, dem Ampicillinresistenzgen (*Amp^r*), dem Replikationsursprung des Phagen M13 (M13 ori), dem Replikationsursprung des Plasmids (pBR322) und dem *lacI^q* Repressorgen. Der *tac*-Promotor ist für die Expression des *maIE* Gens, der inserierten DNA und des *lacZα*-Fragmentes verantwortlich. Das Zielgen wird in die MCS (Multiple Cloning Site) inseriert und als MBP-Fusionsprotein überexprimiert. Nach der Reinigung kann MBP vom Zielprotein mit Hilfe einer Factor-Xa-Protease abgespalten werden.

3.1.3. Expression und Reinigung des MBP-60k

Nach Umklonierung in pMAL-c2X wurde 60k als MBP-Fusionsprotein im präparativen Maßstab überexprimiert und mit Hilfe einer Amylose-Säule aufgereinigt (Abb. 16). Analog zum Versuch 3.1.1 erfolgte die Expression in *E. coli* BL21(DE3)-RIL bei 15 °C für 16 h.

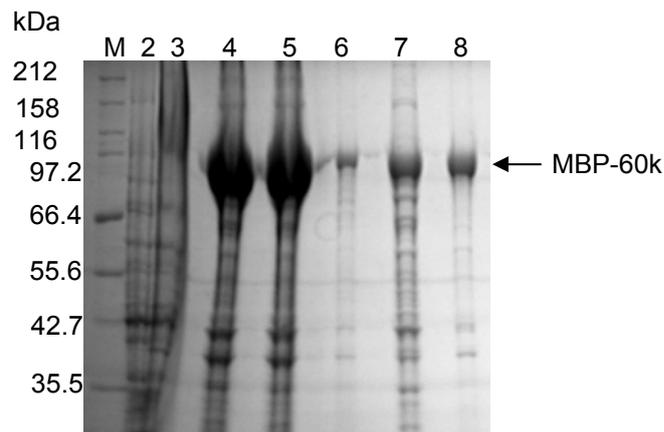


Abb. 16: Expression und Reinigung des MBP-60k: 10%-iges SDS-Gel. MBP-60k wurde bei 15 °C für 16 h exprimiert und anschließend mit Hilfe einer Amylose-Säule aufgereinigt. MBP-60k läuft auf Höhe des zu erwartenden Molekulargewichtes von 102 kDa und ist mit einem Pfeil markiert. M: BR-Marker, 2: nicht induziert, 3: induziert, 4: Rohextrakt, 5: Überstand, 6: Pellet, 7: Durchfluss/Waschfraktion, 8: Elutionsfraktion.

Im Gegensatz zur Expression des 60k als GST-Fusionsprotein (s. 3.1.1, Abb. 14) wurde MBP-60k löslich exprimiert (Rohextrakt: Spur 4, Überstand: Spur 5, Pellet: Spur 6). Da ein Teil des MBP-60k nicht aufgereinigt werden konnte (Durchfluss/Waschfraktion, Spur 7), wurde der Durchfluss zur Aufreinigung des Proteins erneut verwendet. Es ergab sich eine Ausbeute (Spur 8) von über 100 mg pro Liter Ausgangskultur.

3.1.4 Proteolytische Spaltung des MBP-60k

Um 60k weiter reinigen zu können, wurde MBP-60k mit den Factor-Xa-Proteasen der Firmen NOVAGEN (N) und AMERSHAM BIOSCIENCES (A) gespalten. In Abb. 17 ist der zeitliche Verlauf der proteolytischen Spaltung des MBP-60k bei 4 °C gezeigt. Entgegen der Erwartung entstanden neben den Hauptprodukten MBP (42 kDa) und 60k (60 kDa) auch Abbauprodukte des 60k, die mit fortschreitender Inkubationszeit zunahmten.

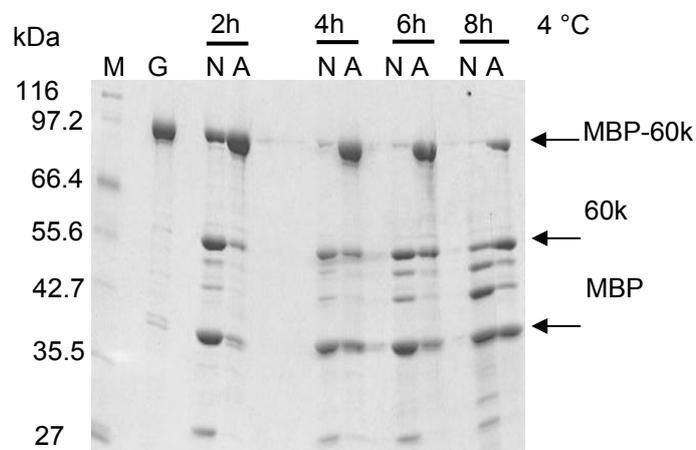


Abb. 17: Proteolytische Spaltung des MBP-60k: 10%-iges SDS-Gel. Die Spaltung des MBP-60k wurde mit Factor-Xa-Protease der Firmen NOVAGEN (abgekürzt mit N) und AMERSHAM BIOSCIENCES (abgekürzt mit A) durchgeführt. Dazu wurden 200 µl (1mg/ml) MBP-60k mit 1U Factor-Xa-Protease pro 50 µg Protein versetzt und für 2, 4, 6 und 8 h bei 4 °C inkubiert. MBP-60k (102 kDa), 60k (60 kDa) und MBP (42 kDa) laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte und sind mit Pfeilen markiert. M: BR-Marker, G: gereinigtes MBP-60k, Spaltung nach 2 h (N), 2 h (A), 4 h (N), 4 h (A), 6 h (N), 6 h (A), 8 h (N), 8 h (A).

3.1.5 Insertion einer PreScission-Protease-Erkennungssequenz in den pMAL-c2X-Vektor

Die Spaltung des MBP-60k mit Factor-Xa-Protease zeigte ein nicht zufriedenstellendes Ergebnis. Im folgenden Versuch sollte eine PreScission-Protease-Erkennungssequenz, die aus 8 Aminosäuren (LEVLFQGP) besteht, in pMAL-c2X-60k inseriert werden. Es wurde erwartet, dass durch den Einsatz einer PreScission-Protease eine bessere Spaltung des MBP-60k erhalten wird, weil im Vergleich zur Factor-Xa-Protease die Erkennungssequenz doppelt so lang ist. Um

auszuschließen, dass 60k eine PreScission-Protease-Erkennungssequenz besitzt, wurde die 60k-Proteinsequenz mit der PreScission-Protease-Erkennungssequenz unter Verwendung des Programms ClustalW (www.expasy.ch) abgeglichen. Die Sequenz, die für eine PreScission-Protease-Erkennungssequenz kodiert, wurde stromabwärts der Factor-Xa-Protease-Erkennungssequenz eingefügt. Dazu wurden zwei zueinander komplementäre Primer, die für eine PreScission-Protease-Erkennungssequenz kodieren, in den mit *XmnI*-*Bam*HI linearisierten pMAL-c2X-Vektor ligiert. Dabei wurde sowohl die *XmnI*-Schnittstelle als auch die *Eco*RI-Schnittstelle eliminiert. Die Konstruktion einer PreScission-Protease-Erkennungssequenz ist in Abschnitt 2.2.2.8 beschrieben. Die Insertion der PreScission-Protease-Erkennungssequenz in pMAL-c2X wurde durch eine Sequenzanalyse verifiziert. Der Vektor wurde als pMAL-c2XP bezeichnet (Abb. 18).

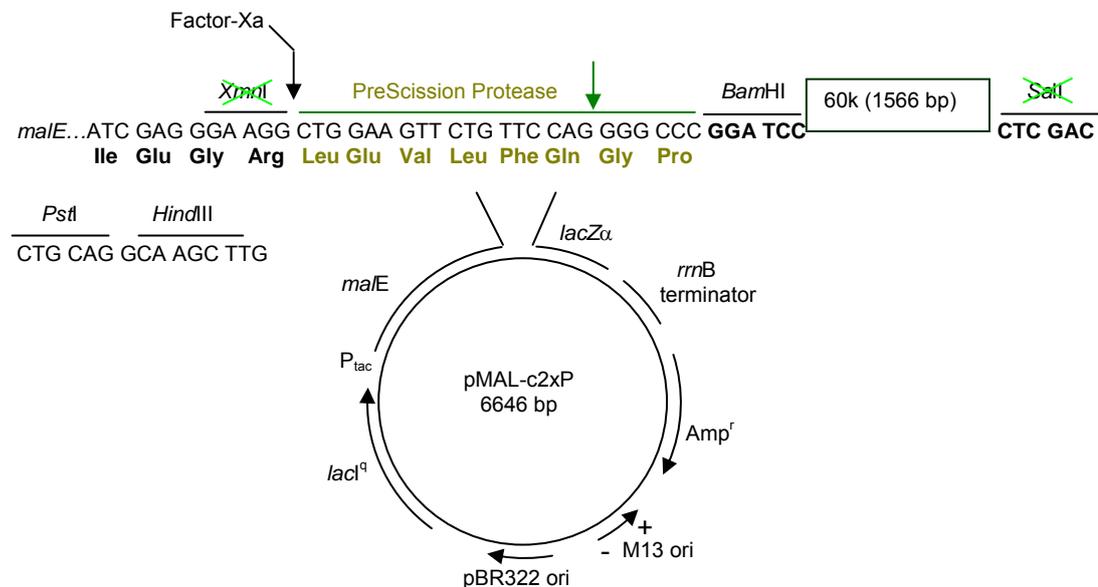


Abb. 18: Schematische Darstellung des pMAL-c2XP-Expressionsvektors: Der Vektor setzt sich zusammen aus dem *rrnB* terminator, dem Ampicillinresistenzgen (Amp^r), dem Replikationsursprung des Phagen M13 (M13 ori), dem Replikationsursprung des Plasmids pBR322 und dem *lacI^q* Repressorgen. Der *tac*-Promotor ist für die Expression des *malE* Gens, der inserierten DNA und *lacZ α* -Fragment verantwortlich. Das Zielgen wird in die MCS (Multiple Cloning Site) inseriert und als MBP-Fusionsprotein überexprimiert. MBP kann vom Fusionsprotein sowohl durch eine Factor-Xa-Protease als auch durch eine PreScission-Protease abgespalten werden. Durch die Insertion einer PreScission-Protease-Erkennungssequenz wurde die *XmnI*-Schnittstelle eliminiert.

3.1.6 Expression, Reinigung und proteolytische Spaltung des MBP-60k mit PreScission-Protease

Nach Insertion einer PreScission-Protease-Erkennungssequenz in pMAL-c2XP-60k wurde MBP-60k, wie in Abschnitt 3.1.3 (Abb. 16) beschrieben, exprimiert und aufgereinigt. Um 60k in einem weiteren Versuch reinigen zu können, wurde MBP-60k mit PreScission-Protease gespalten. In Abb. 19 wird der zeitliche Verlauf der Spaltung bei 4 °C und bei 20 °C gezeigt.

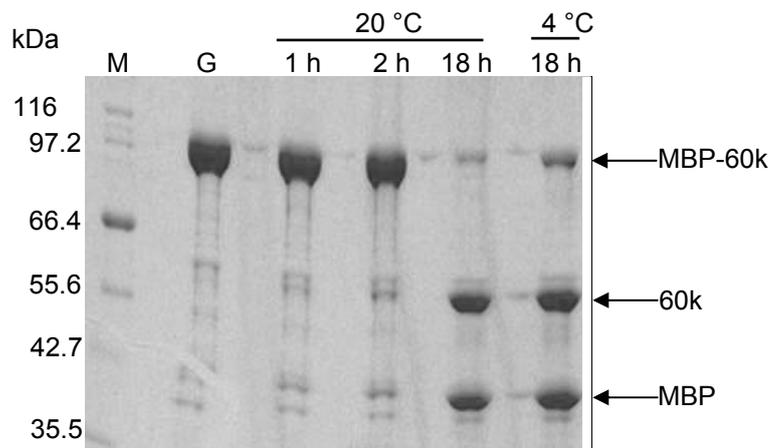


Abb. 19: Spaltung des MBP-60k mit einer PreScission-Protease: 10%-iges SDS-Gel. Es wurden 200 µl (1 mg/ml) MBP-60k mit PreScission-Protease für 1 h, 2 h und 18 h bei 20 °C und 18 h bei 4 °C inkubiert. MBP-60k läuft als ein 102 kDa schweres Fragment. 60k und MBP laufen auf Höhe der erwarteten Molekulargewichte von 60 kDa und 42 kDa. Die rekombinanten Proteine sind mit Pfeilen markiert. M: BR-Marker, G: gereinigtes MBP-60k, Spaltung bei 20 °C für 1 h, 2 h und 18 h, Spaltung bei 4 °C für 18 h.

Aus der SDS-PAGE-Analyse wird ersichtlich, dass die Spaltung des MBP-60k bei 20 °C für 18 h und bei 4 °C für 18 h erfolgreich verlief. Es wurden zwei Fragmente mit den erwarteten Größen von 60 kDa (60k) und 42 kDa (MBP) erhalten. Im Vergleich zur Factor Xa-Protease (s. 3.1.4, Abb. 17) zeigt die Verwendung einer PreScission-Protease in der Spaltung des MBP-60k eine höhere Effektivität.

3.1.7 Reinigung mit Hilfe eines Anionenaustauschers

Anschließend wurde versucht, 60k mit Hilfe einer ResourceQ-1ml-Säule weiter zu reinigen. Das Elutionsprofil (Abb. 20 A) zeigt zwei Absorptionsspeaks bei 280 nm, die sich über die Fraktionen 2/3 und 9 bis 11 erstrecken. MBP wurde mit ca. 150 mM NaCl von der Säulenmatrix in den Fraktionen 2 und 3 eluiert (Abb. 20 A, B). Dagegen ist in den Fraktionen 9 bis 11 auf dem SDS-Gel kein Protein nachweisbar (Abb. 20 B). Da 60k nicht eluiert wurde, wird angenommen, dass es auf der

Säulenmatrix aggregiert ist. 60k zeigte auch bei der Verwendung einer Gelfiltrationssäule oder Phenylsepharosesäule das gleiche Verhalten.

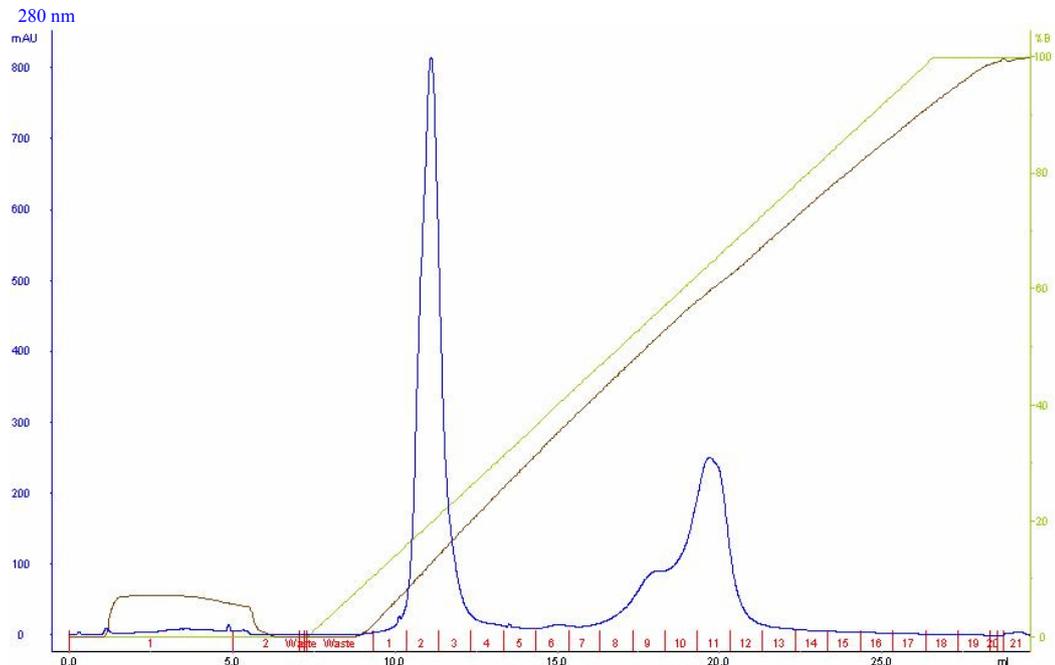


Abb. 20 A: Versuch zur Trennung des 60k vom MBP mit Hilfe einer ResourceQ-1ml-Säule. Nach proteolytischer Spaltung des MBP-60k wurde die Proteinlösung 1:4 mit 50 mM Tris-HCl pH 7.5 auf eine Salzkonzentration von 75 mM NaCl verdünnt. Zur Reinigung wurden 5 ml (0.5 mg/ml) Proteinlösung bei einem Fluss von 2 ml/min auf eine ResourceQ-1ml-Säule aufgetragen und die Absorption der Moleküle bei 280 nm (linke Ordinate) verfolgt. Es wurde ein Gradient (rechte Ordinate) von 0 bis 1 M NaCl (100% B) über 20 Säulenvolumen angelegt. Die Leitfähigkeit ist in Dunkelbraun dargestellt. Der Durchfluss wurde in 5 ml und die Elution in 1 ml Fraktionen (Abszisse) gesammelt.

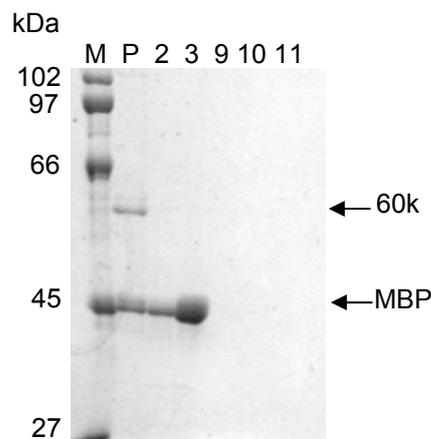


Abb. 20 B: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung: 10%-iges SDS-Gel. 60k und MBP laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte von 60 kDa und 42 kDa. Die rekombinanten Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet. M: SM-Marker, P: MBP-60k mit PreScission-Protease gespalten, Fraktion 2, Fraktion 3, Fraktion 9, Fraktion 10, Fraktion 11.

3.1.8 Überprüfung des MBP-60k auf unspezifische Aggregation durch Gelfiltration

Da 60k vom MBP nicht getrennt werden konnte, wurde geprüft, ob 60k bereits nach der Affinitätsreinigung unspezifisch aggregiert war. Dazu wurde das gereinigte MBP-60k aus Versuch 3.1.3 auf eine Superdex 200-Säule (10/30) aufgetragen und gereinigt. Im Elutionsprofil (Abb. 21 A) befindet sich ein Absorptionspeak bei 280 nm bzw. 260 nm bei Fraktion 7, in der sich MBP-60k befindet (Abb. 21 B). Der Quotient aus 260/280 nm ergab für Fraktion 7 einen Wert von 0.8, der typisch für Proteine ist. Aus der Eichgeraden der verwendeten Säule (s. Anhang) ging hervor, dass MBP-60k im Ausschlussbereich eluiert wurde. Da sich MBP wie ein Monomer verhält (RICHARME, 1982) sollte MBP-60k (102 kDa) folglich bei ca. 12 ml im Trennungsbereich eluiert werden. So liegt der Verdacht nahe, dass MBP-60k unspezifisch aggregiert. Anschließend wurde das affinitätsgereinigte MBP-60k für Bindungsstudien (s. 3.6) und Kristallisationsversuche (s. 3.7) verwendet.

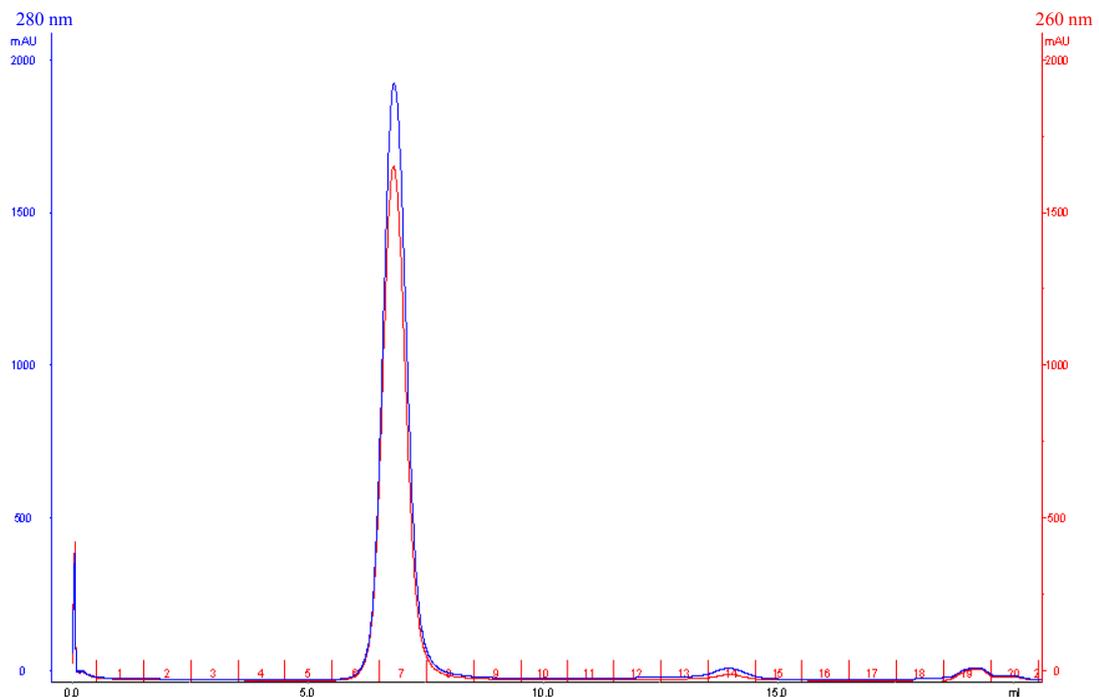


Abb. 21 A: Überprüfung des MBP-60k auf unspezifische Aggregation durch eine Superdex 200-Säule (10/30): Zur Reinigung wurden 0.5 ml (1 mg/ml) bei einem Fluss von 0.5 ml/min auf eine Superdex 200-Säule (10/30) aufgetragen und die Absorption der Moleküle bei 280 nm (linke Ordinate) verfolgt. Zusätzlich wurde die Absorption der Moleküle bei 260 nm (rechte Ordinate) aufgezeichnet. Die Elution erfolgte in 1 ml Fractionen (Abszisse).

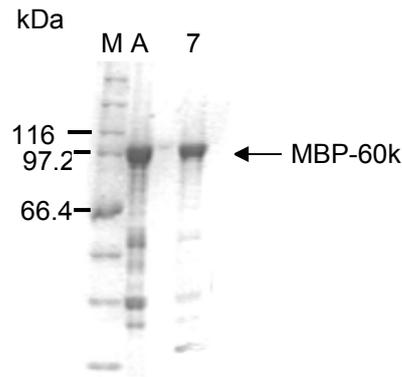


Abb. 21 B: SDS-PAGE-Analyse: 10%-iges SDS-Gel. MBP-60k läuft auf Höhe des zu erwartenden Molekulargewichtes von 102 kDa und ist mit einem Pfeil markiert. M: BR-Marker, A: affinitätsgereinigtes MBP-60k, Fraktion 7.

3.1.9 Reinigung des MBP-60k::20k-Komplexes durch Gelfiltration

Im Rahmen dieser Arbeit konnte der MBP-60k::20k-Komplex rekonstituiert werden (s. 3.6.1). Um die unspezifische Aggregation des 60k zu verhindern, wurde MBP-60k mit 20k inkubiert und anschließend der gebildete Komplex über eine Superdex 200-Säule (10/30) gereinigt.

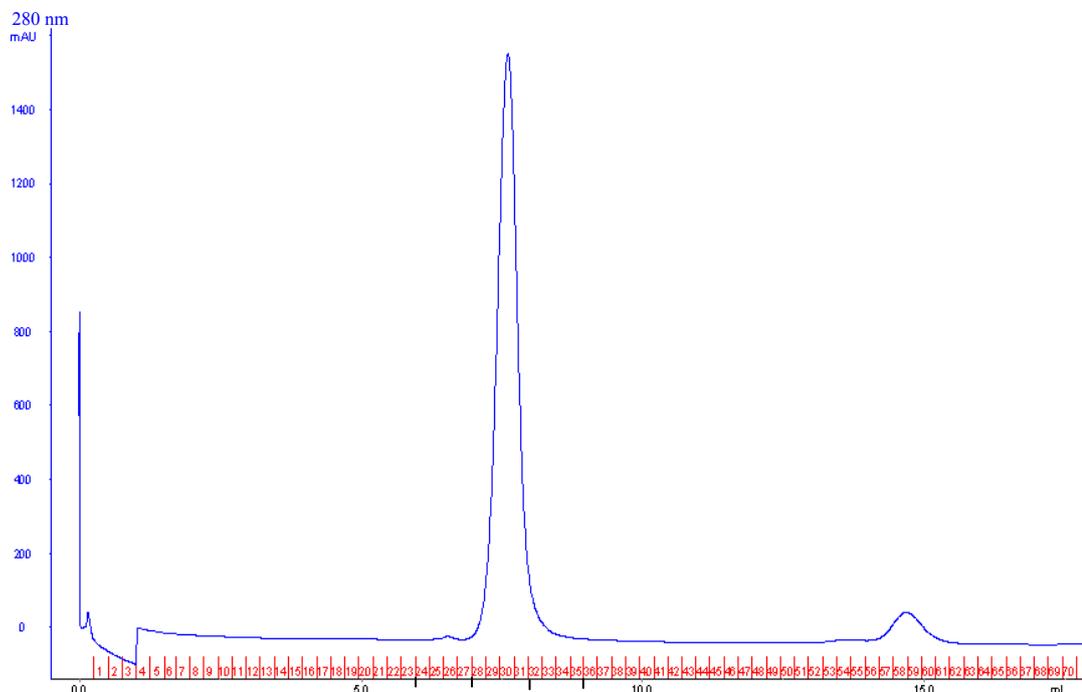


Abb. 22 A: Reinigung des MBP-60k::20k-Komplexes mit Hilfe einer Superdex 200-Säule (10/30): 20k wurde in einem 0.5 fachen molaren Überschuss zum MBP-60k gegeben und für 5 min inkubiert. Zur Reinigung wurden 0.5 ml (0.7 mg/ml) MBP-60k::20k bei einem Fluss von 0.5 ml/min auf eine Superdex 200-Säule (10/30) geladen und die Absorption der eluierten Moleküle bei 280 nm aufgezeichnet. Die Fraktionsgröße betrug 0.25 ml (Abszisse).

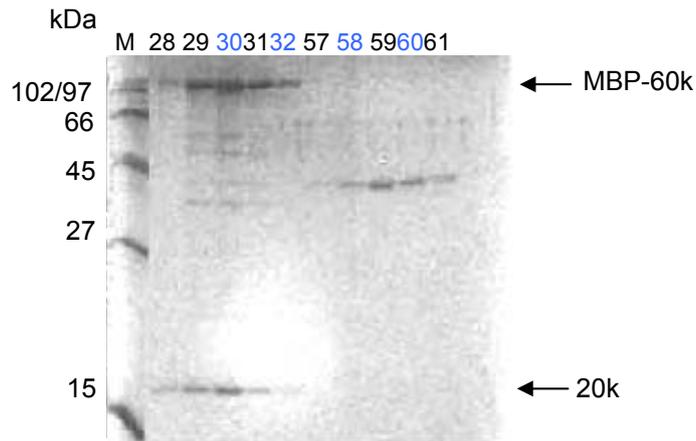


Abb. 22 B: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung: 15%-iges SDS-Gel. MBP-60k und 20k laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte von 102 kDa und 20 kDa. Die rekombinanten Proteine sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, Fraktionen 28 bis 32, Fraktionen 57 bis 61.

Im Elutionsprofil (Abb. 22 A) erstreckt sich ein großer Absorptionspeak bei 280 nm über die Fraktionen 28 bis 32 und ein kleiner über die Fraktionen 57 bis 61. Die entsprechenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 22 B). Analog zum MBP-60k (s. 3.1.8, Abb. 21 A, B) wurde der MBP-60k::20k-Komplex im Ausschlussbereich (s. Anhang) in den Fraktionen 28 bis 32 eluiert. Auch in Gegenwart des 20k konnte die unspezifische Aggregation des MBP-60k nicht verhindert werden. Analog zum MBP-60k wurde der MBP-60k::20k-Komplex für Kristallisationsversuche benutzt (s. 3.7).

3.2 Expression und Reinigung des humanen SMNrp

Das im pGEX-6P-1 (Abb. 23) als *EcoRI-XhoI*-Fragment klonierte SMNrp (Survival Motor Neuron related protein) sollte als GST-Fusionsprotein überexprimiert und gereinigt werden. Die Expressionsbedingungen waren bereits in der Arbeitsgruppe etabliert worden. Zur Expression wurde die rekombinante DNA in *E. coli* BL21-Zellen transformiert und abweichend von 2.2.4.1.2 eine 2 Liter Kultur angesetzt. Die Induktion der Expression erfolgte bei 30 °C für 4 h. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und der durch Zentrifugation erhaltene Überstand auf eine Glutathion Sepharose-Säule geladen. Nach dem Waschen wurde GST-SMNrp mit PreScission-Protease gespalten und SMNrp mit Puffer von der Säulenmatrix gespült.

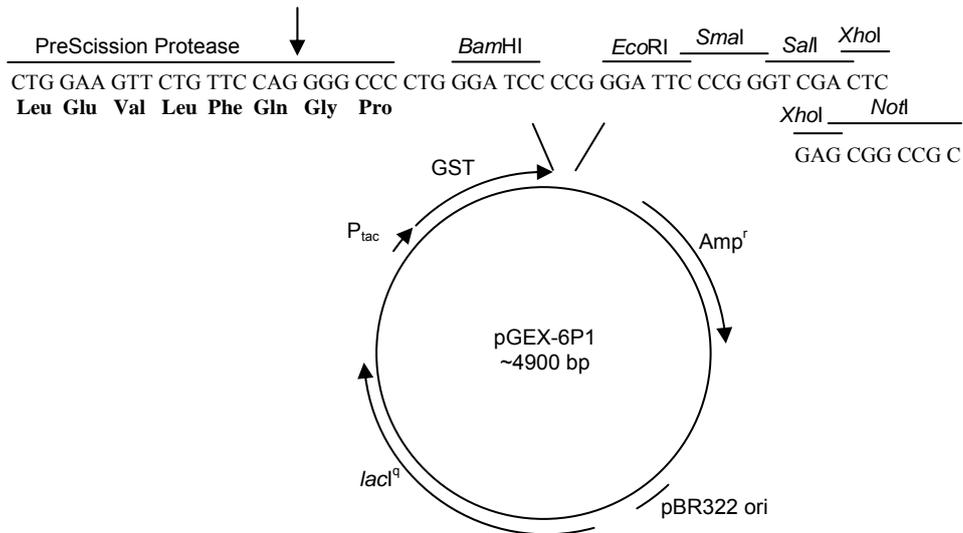


Abb. 23: Schematische Darstellung des pGEX-6P1-Expressionsvektors: Amp^r, pBR322 ori, lacI^q bezeichnen das Ampicillinresistenzgen, den Replikationsursprung und das lacI^q Repressorgen. Die Expressionskassette steht unter der Kontrolle des P_{tac}-Promotors/Operators. Die gezeigte Sequenz umfasst die MCS (Multiple Cloning Site), in der die Zielgene inseriert werden. Stromaufwärts der MCS befinden sich eine Sequenz, die für eine PreScission-Protease-Erkennungssequenz und für GST kodieren.

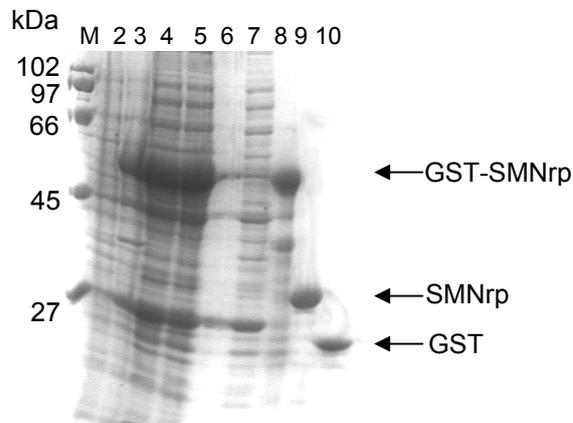


Abb. 24: Expression und Reinigung des SMNrp: 12,5%-iges SDS-Gel. GST-SMNrp wurde bei 30 °C für 4 h exprimiert und mit Glutathion Sepharose im *batch*-Verfahren gereinigt, ohne GST-SMNrp von der Säulenmatrix zu eluieren. Nach Inkubation mit PreScission-Protease wurde SMNrp von der Säulenmatrix gewaschen. GST-SMNrp, SMNrp und GST laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte von 56 kDa, 30 kDa und 26 kDa und sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, 2: nicht induziert, 3: induziert 4: Rohextrakt, 5: Überstand, 6: Pellet, 7: Durchfluss/Waschfraktion 8: GST-SMNrp gebunden an Glutathion Sepharose. Anschließend wurde SMNrp vom GST mit PreScission-Protease abgespalten, 9: SMNrp wurde mit Wasch-Puffer von der Säulenmatrix gewaschen. 10: eluiertes GST.

Aus der SDS-PAGE-Analyse (Abb. 24) wird ersichtlich, dass GST-SMNrp in großen Mengen löslich exprimiert wurde (Rohextrakt: Spur 4, Überstand: Spur 5,

Pellet: Spur 6). Die Ausbeute des gereinigten SMNrp (Spur 9) betrug ca. 10 mg pro Liter Ausgangskultur. SMNrp wurde anschließend für Bindungs- und Kristallisationsversuche verwendet (s. 3.6.3-3.6.6 und 3.7).

3.3 Expression und Reinigung des humanen U4/U6-90k

3.3.1 Expression und Reinigung des His-90k

Im nachfolgenden Versuch sollte 90k in *E. coli* überexprimiert und anschließend gereinigt werden. Vor der Expression wurde die *codon usage* des humanen 90k mit der von *E. coli* mit Hilfe des Programms Rare Codon Calculator (RaCC), <http://66.75.144.39/cgi-bin/cmura/racc.html>, verglichen. Es stellte sich heraus, dass 90k analog zum 60k (s. 3.1.1) *codons* wie CGA (Arg), AGG (Arg), AGA (Arg), ATA (Ile), CCC (Pro) und CTA (Leu) enthält, die von *E. coli* selten verwendet werden. Die Sequenz dazu ist im Anhang abgebildet. Zur Expression wurde das in pET28a (Abb. 25) klonierte 90k-Fragment in *E. coli* BL21(DE3)-RIL-Zellen transformiert.

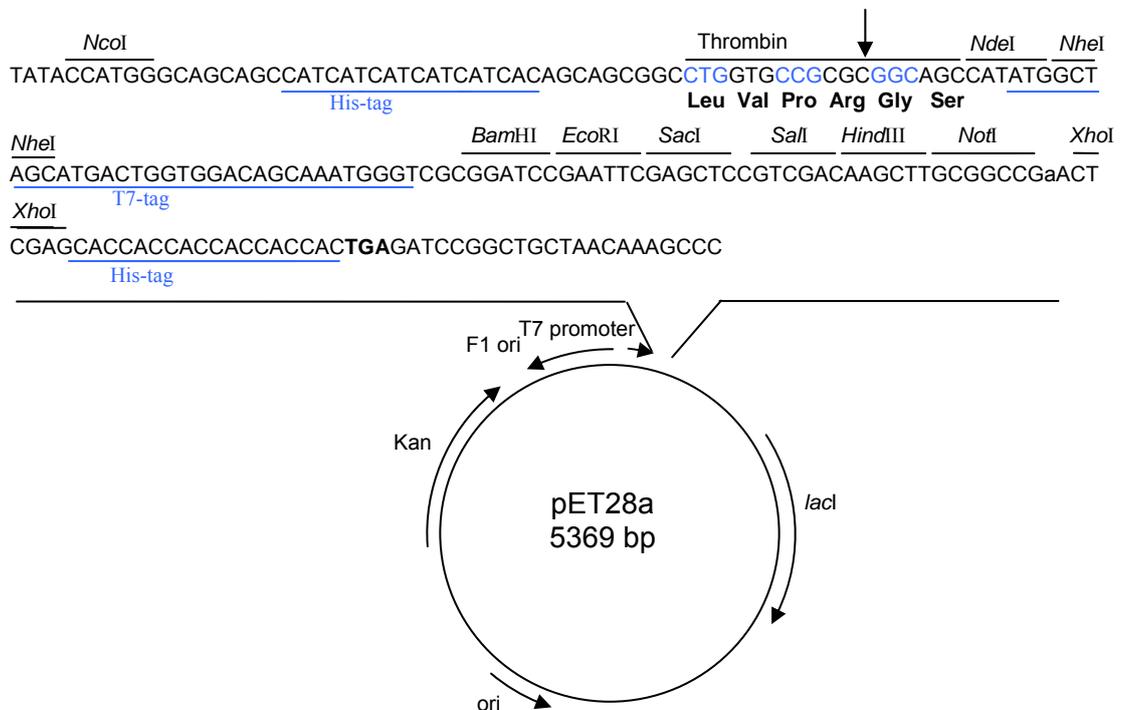


Abb. 25: Schematische Darstellung des pET28a: Der Vektor setzt sich zusammen aus dem *lacI* Repressorgen, dem Replikationsursprung des Plasmids (*ori*), dem Kanamycin (Kan) Resistenzgen und dem Replikationsursprung des Phagen F1 (F1 *ori*). Der T7-Promotor ist für die Expression des Zielgens, welches in die Multiple Cloning Site (MCS) inseriert ist, verantwortlich. Nach der Expression besitzt das Zielprotein einen N-terminalen His-tag. Im Fall, dass das Zielgen ohne Stop *codon* in die MCS inseriert wird, besitzt das Zielprotein zusätzlich einen C-terminalen His-tag. Ausserdem befinden sich stromabwärts des N-terminalen His-tags Sequenzen, die für eine Thrombin-Protease-Erkennungssequenz und einen T7-tag kodieren.

Ein Expressions- und Reinigungsprotokoll für His-90k war bereits vor Beginn dieser Arbeit in der Abteilung etabliert worden. His-90k wurde im präparativen Maßstab bei 25 °C für 5 h exprimiert und mit Ni-NTA im *batch*-Verfahren aufgereinigt. Dafür wurden

Puffer verwendet, die 300 mM NaCl enthielten. Es wurde von jedem Reinigungsschritt eine Probe entnommen und mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 26).

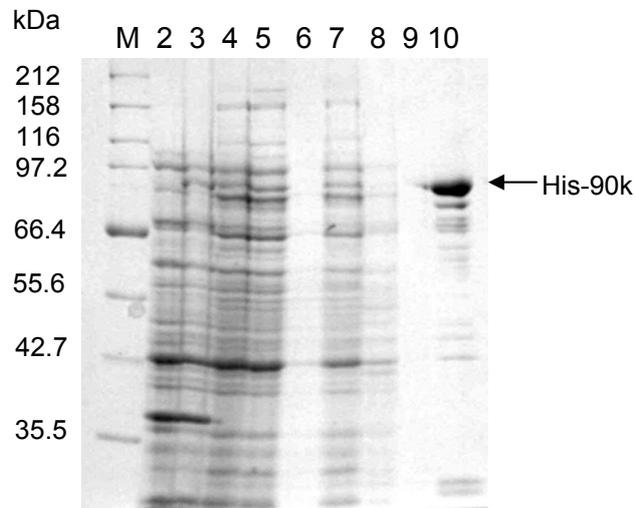


Abb. 26: Expression und Reinigung des His-90k: 10%-iges SDS-Gel. His-90k wurde bei 25 °C für 5 h exprimiert und mit Ni-NTA im *batch*-Verfahren aufgereinigt. Das rekombinante Protein läuft auf Höhe von 90 kDa und ist mit einem Pfeil markiert. M: BR-Marker 2: nicht induziert, 3: induziert, 4: Rohextrakt, 5: Überstand, 6: Pellet, 7: Durchfluss, 8: Waschfraktion (10 mM Imidazol), 9: Waschfraktion (20 mM Imidazol), 10: Elutionsfraktion (250 mM Imidazol).

Betrachtet man Rohextrakt, Überstand und Pellet (Abb. 26, Spur 4, 5 und 6) wird ersichtlich, dass His-90k löslich exprimiert wurde. Die Ausbeute des gereinigten His-90k (Spur 10) betrug 1.8 mg pro Liter Ausgangskultur.

Es wird postuliert, dass 90k an die U4/U6-snRNA bindet (LAUBER et al., 1997; GONZALES-SANTOS et al., 2002). Um zu verifizieren, ob das rekombinant exprimierte His-90k eventuell *E. coli*-RNA gebunden hatte, wurde der Quotient aus 260/280 nm bestimmt. Es ergab sich ein Wert von 1.6, der für einen hohen Nukleinanteil spricht.

3.3.2 Reinigung des His-90k mit Hilfe eines Kationenaustauschers

Um His-90k von Nukleinsäuren und Verunreinigungen zu trennen, wurde im nächsten Schritt eine ResourceS-1ml-Säule verwendet. Der theoretische isoelektrische Punkt des His-90k liegt bei pH 9.5. Deshalb sollte es in Gegenwart eines Laufpuffers mit einem pH von 7.5 an die Säulenmatrix binden und anschließend in einem Salzgradienten eluiert werden. Da Nukleinsäuren negativ geladen sind, sollten diese nicht an die Säulenmatrix binden.

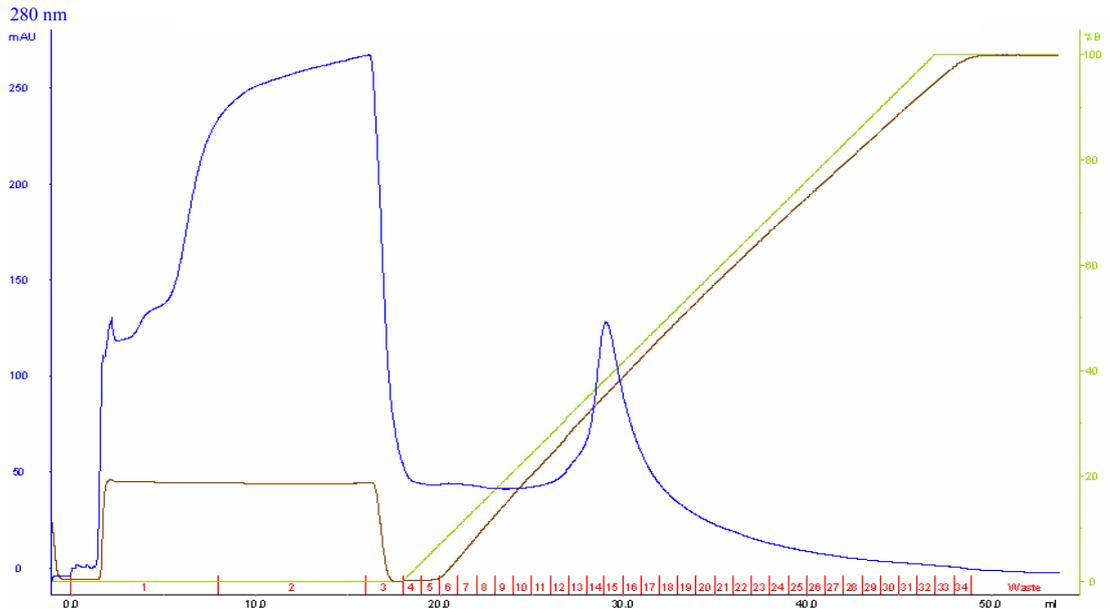


Abb. 27 A: Elutionsprofil der Reinigung des His-90k mit Hilfe einer ResourceS-1ml-Säule: Das mit Ni-NTA im *batch*-Verfahren gereinigte His-90k wurde 1:4 mit 50 mM Natriumphosphat Puffer pH 7.5 auf eine Salzkonzentration von 75 mM NaCl verdünnt. Zur Reinigung wurden 16 ml (1.8 mg) Proteinlösung bei einem Fluss von 2 ml/min auf die ResourceS-1ml-Säule aufgetragen. Die Absorption der eluierten Moleküle wurde bei 280 nm (linke Ordinate) verfolgt. Es wurde ein Gradient (rechte Ordinate) von 0 bis 1 M NaCl (100% B) über 30 Säulenvolumen angelegt. Die Leitfähigkeit ist in Dunkelbraun dargestellt. Der Durchfluss wurde in 8 ml und die Elution in 1 ml Fraktionen (Abszisse) gesammelt.

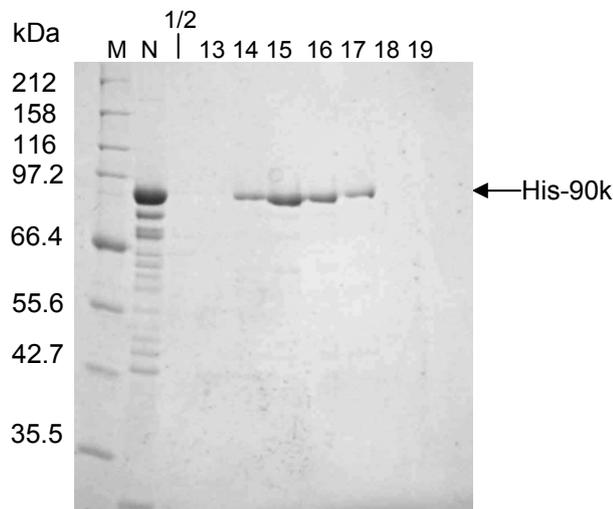


Abb. 27 B: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung: 10%-iges SDS-Gel. Das rekombinante His-90k läuft mit einem Molekulargewicht von 90 kDa und ist mit einem Pfeil markiert. M: BR-Marker, N: Ni-NTA gereinigtes His-90k (unverdünnt), Fraktionen 1 und 2 (Durchfluss), Fraktionen 13 bis 19.

Im Elutionsprofil (Abb. 27 A) sind zwei Absorptionspeaks bei 280 nm erkennbar, die sich über Fraktion 1/2 (Durchfluss) und die Fraktionen 13 bis 19 erstrecken. His-90k wurde mit ca. 400 mM NaCl von der Säulenmatrix in den Fraktionen 14 bis 17

(Abb. 27 A, B) eluiert und konnte von den Verunreinigungen getrennt werden. Obwohl im Durchfluss (Abb. 27 B, Fraktionen 1 und 2) kein Protein erkennbar ist, befindet sich im Elutionsprofil ein Absorptionspeak bei 280 nm. Deshalb wurden die betreffenden Fraktionen und zusätzlich die Fraktionen 14 bis 17 auf Nukleinsäuren untersucht. Für den Durchfluss ergab der Quotient aus 260/280 nm einen Wert von 1.8, der typisch für Nukleinsäuren ist. Im Gegensatz dazu wurde für die Fraktionen 14 bis 17 ein Wert von 0.7 ermittelt, der typisch für Proteine ist. Mit Hilfe eines Kationenaustauschers konnten sowohl die Nukleinsäuren als auch die Verunreinigungen vom His-90k separiert werden. Nach Reinigung mit Ni-NTA im *batch*-Verfahren (s. 3.3.1) und mit Hilfe einer ResourceS-1ml-Säule brachte die Ausbeute des His-90k ~0.3 mg pro Liter Ausgangskultur. Für anschließende Kristallisationsversuche und Bindungsstudien war die Ausbeute nicht ausreichend. Deshalb wurde 90k zur Expression in pMAL-c2XP umklontiert.

3.3.3. Umklonierung des 90k-Gens in pMAL-c2XP

Da 90k mit dem pET-System nur in geringer Ausbeute produziert werden konnte, sollte es mit Hilfe des pMAL-Systems (Abb. 28) exprimiert werden, da die Expression des 60k (s. 3.1.2, 3.1.3) mit diesem System bereits gute Ergebnisse zeigte.

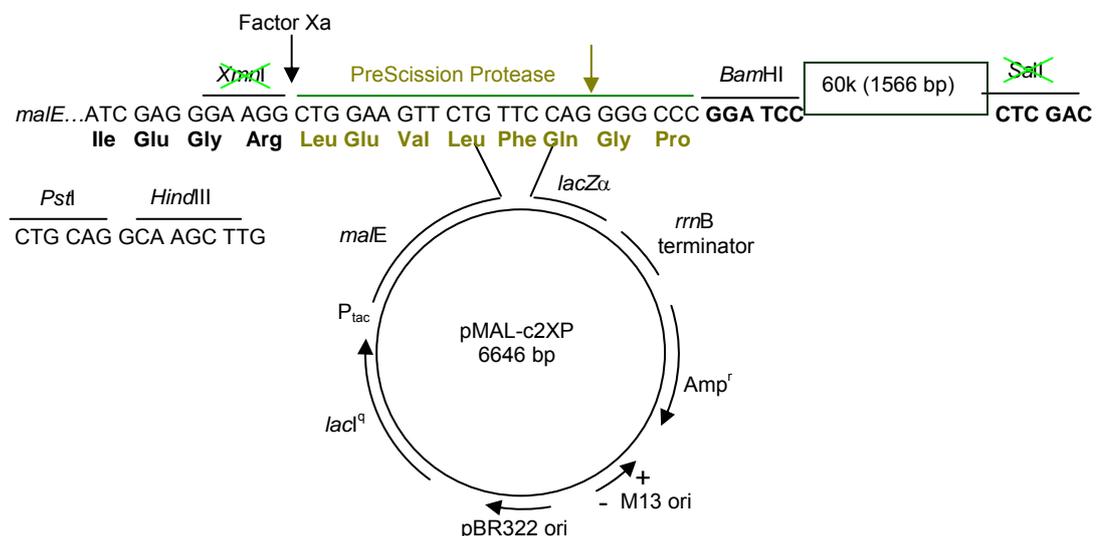


Abb. 28: Schematische Darstellung des pMALc-2XP-Expressionsvektors: Der Vektor setzt sich zusammen aus dem *rrnB* terminator, dem Ampicillinresistenzgen (*Amp^r*), dem Replikationsursprung des Phagen M13 (M13 ori), dem Replikationsursprung des Plasmids pBR322 und dem *lacI^q* Repressorgen. Der *tac* Promotor ist für die Expression des *malE* Gens, der inserierten DNA und des *lacZα*-Fragmentes verantwortlich. Das Zielgen wird in die MCS (Multiple Cloning Site) inseriert und als MBP-Fusionsprotein überexprimiert. MBP kann vom Zielprotein sowohl durch Factor-Xa-Protease als auch durch PreScission-Protease abgespalten werden.

Das in pET28a inserierte 90k konnte aufgrund der Schnittstellen nicht direkt in pMAL-c2XP kloniert werden und musste deshalb in pGEX-6P1+1 (Abb. 29) und pMAL-c2X (Abb. 30) subkloniert werden. So wurden 90k aus pET28a und 60k aus pGEX-6P1+1 (s. 3.1.1) als *NdeI-XhoI*-Fragmente herausgeschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel extrahiert. Anschließend wurde 90k in pGEX-6P1+1 kloniert.

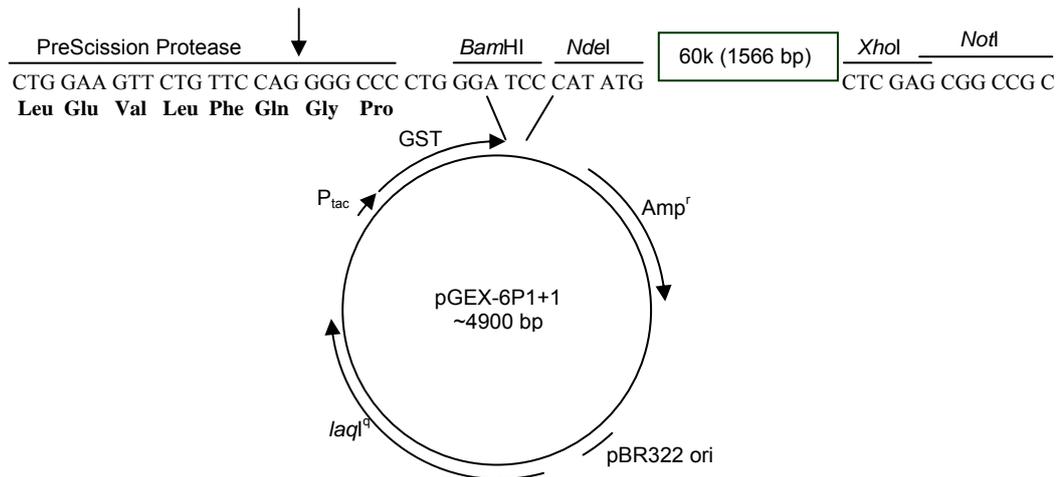


Abb. 29: Schematische Darstellung des pGEX-6P1+1-Expressionsvektors: Amp^r , pBR322 ori, $lacI^q$ bezeichnen das Ampicillinresistenzgen, den Replikationsursprung und das $lacI^q$ Repressorgen. Die Expressionskassette steht unter der Kontrolle des P_{tac} -Promotor/Operators. Die gezeigte Sequenz umfasst die MCS (Multiple Cloning Site) für die Insertion von Fremdgenen. Stromaufwärts des als *NdeI-XhoI* klonierten 60k-Gens befindet sich eine Sequenz, die für eine PreScission-Protease-Erkennungssequenz für GST kodieren.

Im nächsten Schritt wurde das im pGEX-6P1+1 als *NdeI-XhoI*-Fragment inserierte 90k als *Bam*HI-*Xho*I-Kassette in den zuvor mit *Bam*HI-*Sa*II linearisierten pMAL-c2X (Abb. 30) ligiert. Die Klonierung in pMAL-c2X war deshalb möglich, weil die Restriktionsenzyme *Xho*I und *Sa*II beim Schneiden von DNA den gleichen Überhang erzeugen (Isoschizomere). 90k konnte nicht direkt in den pMAL-c2XP Vektor kloniert werden, da durch die Insertion des 60k Gens die *Sa*II Schnittstelle eliminiert wurde (s. 3.1.2). Nach Subklonierung in pMAL-c2X besaß 90k nach der Expression zwei zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus.

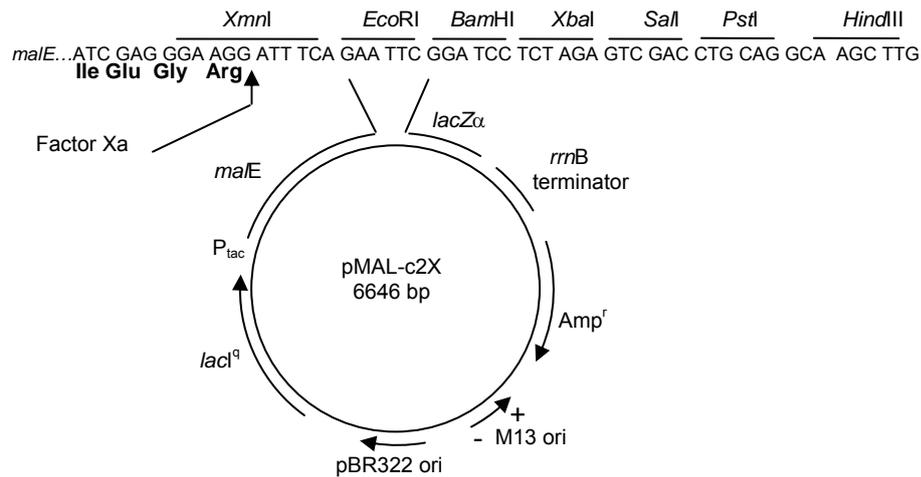


Abb. 30: Schematische Darstellung des pMAL-c2X-Expressionsvektors: Der Vektor setzt sich zusammen aus dem *rrnB* terminator, dem Ampicillinresistenzgen (Amp^r), dem Replikationsursprung des Phagen M13 (M13 ori), dem Replikationsursprung des Plasmids pBR322 und dem *lacI^q* Repressorgen. Der *tac*-Promotor ist für die Expression des *maE* Gens, des inserierten Gens und des *lacZ α* -Fragmentes verantwortlich. Das Zielgen wird in die MCS (Multiple Cloning Site) ligiert und als MBP-Fusionsprotein überexprimiert. MBP kann vom Zielprotein durch Factor-Xa-Protease abgespalten werden.

Im letzten Schritt wurde 90k als *Bam*HI-*Pst*I-Fragment in pMAL-c2XP (Abb. 28) kloniert. In Abb. 31 ist ein schematischer Überblick der Klonierung des 90k-Gens in den pMAL-c2XP-Expressionsvektor dargestellt.

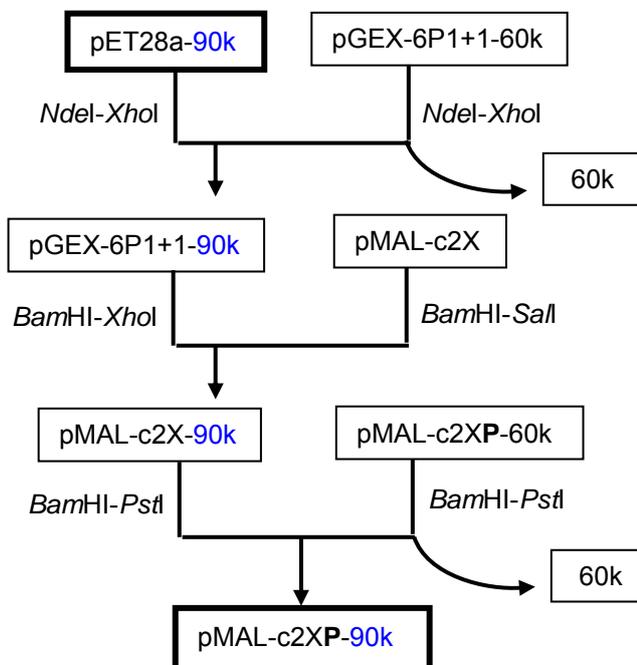


Abb. 31: Schematische Darstellung der Klonierung: 90k wurde aus pET28a als *Nde*I-*Xho*I-Kassette herausgeschnitten und in den modifizierten pGEX-6P1+1-Vektor inseriert. Das in pGEX-6P1+1 klonierte 90k wurde als *Bam*HI-*Xho*I-Fragment herausgeschnitten und in den mit *Bam*HI-*Sal*I geschnittenen pMAL-c2X-Vektor ligiert. Abschließend wurde das Fragment als *Bam*HI-*Pst*I-Kassette in pMAL-c2XP kloniert.

3.3.4 Expression des MBP-90k

Nach Umklonierung des 90k-Gens in den pMAL-c2XP-Vektor wurde im analytischen Maßstab untersucht, bei welcher Temperatur MBP-90k löslich exprimiert wird. Analog zum Versuch 3.1.1 erfolgte die Expression in *E. coli* BL21(DE3)-RIL-Zellen. Die Expression bei 30 °C für 4 h zeigte ein positives Ergebnis (Rohextrakt: Spur 4, Überstand: Spur 5) (Abb. 32). Allerdings konnte MBP-90k nicht aufgereinigt werden, da keine Bindung zur Säulenmatrix erfolgte.

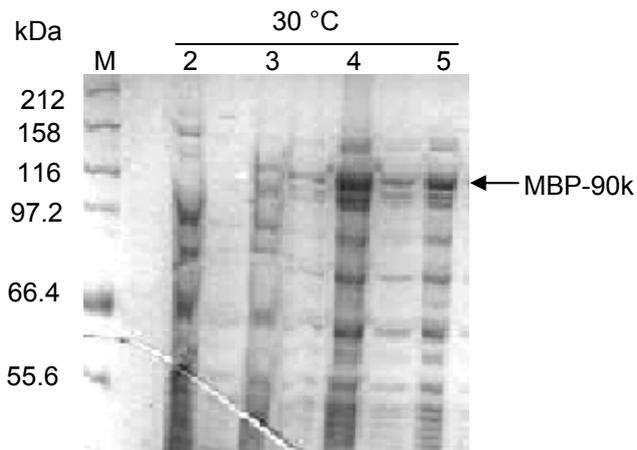


Abb. 32: Analyse der Expression des MBP-90k: 7.5%-iges SDS-Gel. Die Expression des MBP-90k wurde bei 30 °C für 4 h durchgeführt. MBP-90k läuft auf Höhe von 132 kDa und ist mit einem Pfeil markiert. M: BR-Marker, 2 nicht induziert, 3: induziert, 4: Rohextrakt, 5: Überstand.

3.3.5 Insertion eines C-terminalen His-tags am 90k

Da 90k über MBP nicht aufgereinigt werden konnte, sollte es als MBP-Fusionsprotein exprimiert und anschließend über einen C-terminalen His-tag, der mittels PCR angefügt werden sollte, aufgereinigt werden. Es wurden die Primer 1BamHlforw und 8PstIrev dafür verwendet, die aus der Anfangs- und Endsequenz des 90k-Gens abgeleitet worden waren. Das PCR-Produkt besaß somit am 5'-Ende eine *Bam*HI- und am 3'-Ende eine *Pst*I-Schnittstelle. Außerdem wurde durch den 3'-Primer stromabwärts der *Pst*I-Schnittstelle noch eine Sequenz, die für einen His-tag und für ein Stop *codon* kodiert, eingefügt. Es wurde ein Fragment mit der erwarteten Größe von ca. 2 kb amplifiziert (Abb. 33).

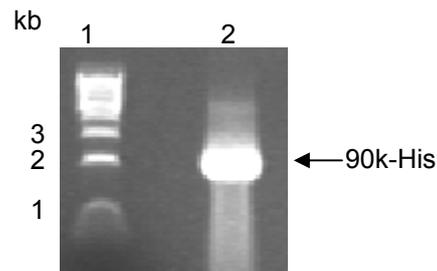


Abb. 33: Generierung des 90k-His-Fragmentes mittels PCR: 1: 1 kb DNA Step Ladder, 2: 90k-His (ca. 2 kb).

Anschließend wurden das mit Hilfe eines PCR Purification-Kits gereinigte 90k-His-Fragment und der pMAL-c2XP-Vektor mit *Bam*HI-*Pst*I geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und die DNA aus dem Agarosegel isoliert. 90k-His wurde zur Expression in pMAL-c2XP (s. 3.3.3, Abb. 28) kloniert.

3.3.6 Expression und Reinigung des MBP-90k-His

Die Expression des MBP-90k-His erfolgte wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben bei 30 °C für 4 h. Zur Aufreinigung mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule wurden, abweichend von 3.3.1, Puffer verwendet, die 800 mM NaCl enthielten, um Protein-Nukleinsäuren-Interaktionen zu schwächen.

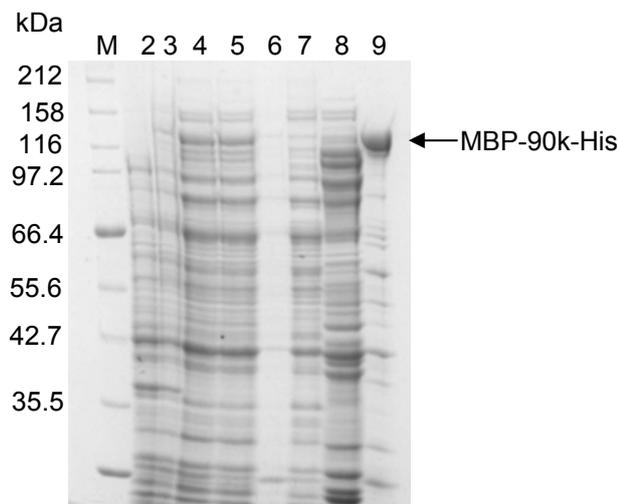


Abb. 34: Expression und Reinigung des MBP-90k-His: 10%-iges SDS-Gel. MBP-90k-His wurde bei 30°C für 4 h exprimiert und mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Das rekombinante MBP-90k-His läuft mit einem Molekulargewicht von 132 kDa und ist mit einem Pfeil markiert. M: BR-Marker, 2: nicht induziert, 3: induziert, 4: Rohextrakt, 5: Überstand, 6: Pellet, 7: Durchfluss, 8: Waschfraktion, 9: Elutionsfraktion.

Aus der SDS-PAGE-Analyse (Abb. 34) wird ersichtlich, dass MBP-90k-His löslich exprimiert wurde (Rohextrakt: Spur 4, Überstand: Spur 5, Pellet: Spur 6). Es konnten ca. 23 mg MBP-90k-His (Spur 9) aus einem Liter Ausgangskultur gereinigt werden.

3.3.7 Proteolytische Spaltung des MBP-90k-His und Trennung der Proteine durch Gelfiltration

Nach erfolgreicher Affinitätsreinigung wurde 90k-His vom MBP mit PreScission-Protease abgespalten (Abb. 35 B, Spur V) und sollte anschließend durch Gelfiltration weiter gereinigt werden. Da 90k-His (90 kDa) ungefähr die doppelte Masse von MBP (42 kDa) besitzt, sollten die Proteine bei Verwendung einer Superdex 200-Säule (10/30) getrennt werden.

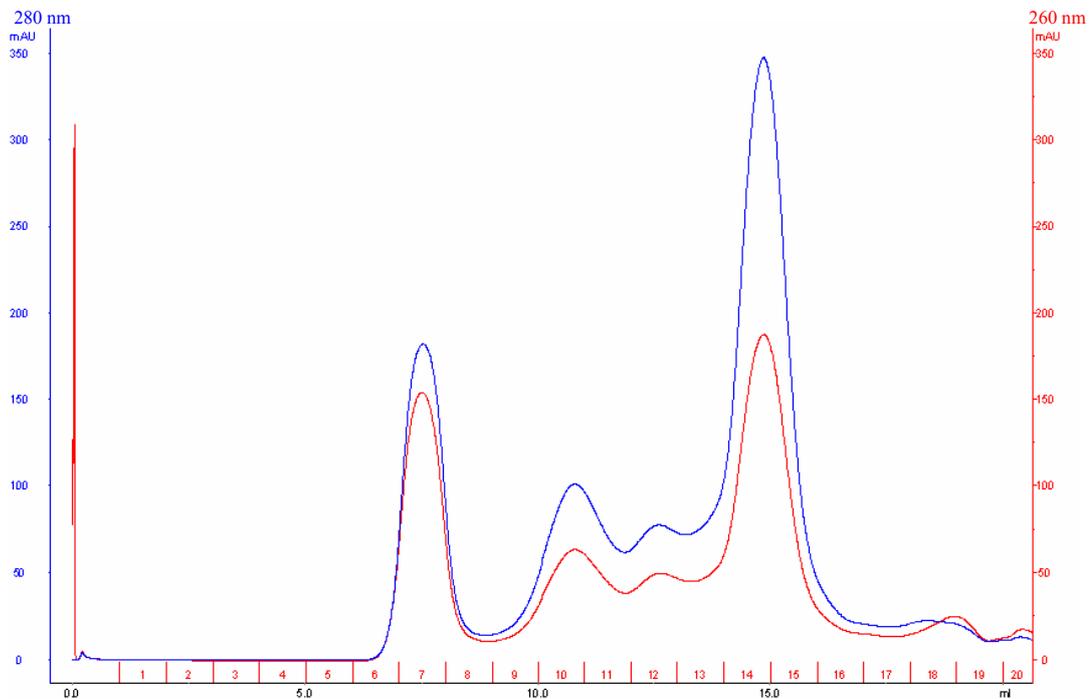


Abb. 35 A: Elutionsprofil der Reinigung des 90k-His mit Hilfe einer Superdex 200-Säule (10/30): 90k-His wurde vom MBP mit PreScission-Protease abgespalten. Zur Reinigung wurde 1 ml Proteinlösung (4 mg/ml) bei einem Fluss von 0.5 ml/min auf eine Superdex 200-Säule (10/30) aufgetragen. Die Trennung der Proteine erfolgte in Gegenwart eines Puffers, der 800 mM NaCl enthielt. Die Absorption der eluierten Moleküle wurde bei 280 nm (linke Ordinate) und 260 nm (rechte Ordinate) verfolgt. Es wurden 1 ml Fraktionen (Abszisse) gesammelt.

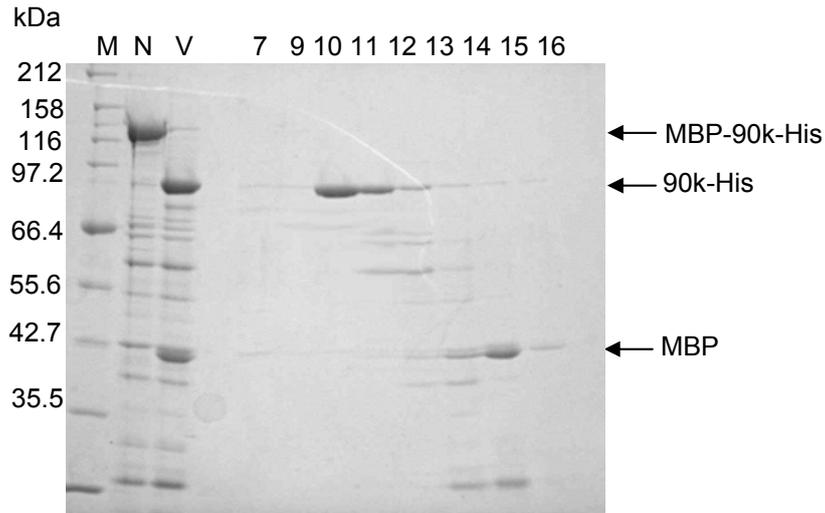


Abb. 35 B: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung: 10%-iges SDS-Gel. MBP-90k-His (132 kDa), 90k-His (90 kDa) und MBP (42 kDa) sind mit Pfeilen markiert. M: BR-Marker, N: gereinigtes MBP-90k-His, V: MBP-90k-His mit PreScission-Protease gespalten; Fraktion 7, Fraktionen 9 bis 16.

Im Elutionsprofil (Abb. 35 A) befinden sich vier Absorptionsspeaks bei 280 nm bzw. 260 nm, die sich über die Fraktionen 7, 9 bis 11, 12 und 13 bis 16 erstrecken. Aus der SDS-PAGE-Analyse (Abb. 35 B) wird ersichtlich, dass 90k-His (Fraktionen 10 und 11) vom MBP (Fraktionen 13 und 14) getrennt werden konnte. Mit Hilfe der Eichgeraden der verwendeten Superdex 200-Säule (10/30) (s. Anhang) konnte ermittelt werden, dass sich 90k-His wie ein Dimer verhält.

Nach Reinigung mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule (s. 3.3.6) und einer Superdex 200-Säule (10/30) betrug die Ausbeute des 90k-His (Abb. 35 B, Fraktion 10) ca. 4 mg 90k-His pro Liter Ausgangskultur. Im Vergleich dazu ergab die Ausbeute des gereinigten His-90k nur ~0.3 mg (s. 3.3.1, 3.3.2) pro Liter Ausgangskultur. Anschließend wurde 90k-His für Bindungsstudien (s. 3.6.2) und Kristallisationsversuche (s. 3.7) eingesetzt.

3.4 Generierung, Expression und Reinigung verkürzter 90k-Fragmente

3.4.1 Generierung verkürzter 90k-Fragmente und Klonierung in den pMAL-c2XP-Vektor

In einer Bindungsstudie konnte der 90k::SMNrp-Komplex rekonstituiert werden (s. 3.6.3). Mit erzeugten 90k-Deletionsmutanten sollten putative Bindungspartner für SMNrp erzeugt werden, um den Bindungsbereich des 90k eingrenzen zu können.

Unter Berücksichtigung des Sekundärstrukturvorhersage-Programms SOPMA (www.expasy.ch) wurden die 90k-Fragmente geplant, die mittels PCR erzeugt werden sollten. Um eine stabile Faltung der Proteinfofragmente zu ermöglichen, wurde darauf geachtet, dass sie am N-Terminus und am C-Terminus mit einem *random coil* enden. In Abb. 36 A ist eine putative Sekundärstruktur des 90k-Proteins dargestellt und mit Pfeilen sind die Bereiche markiert, die den N-Terminus bzw. C-Terminus der Fragmente bestimmen. In Abb. 36 B ist die Planung der drei Fragmente aufgeführt.

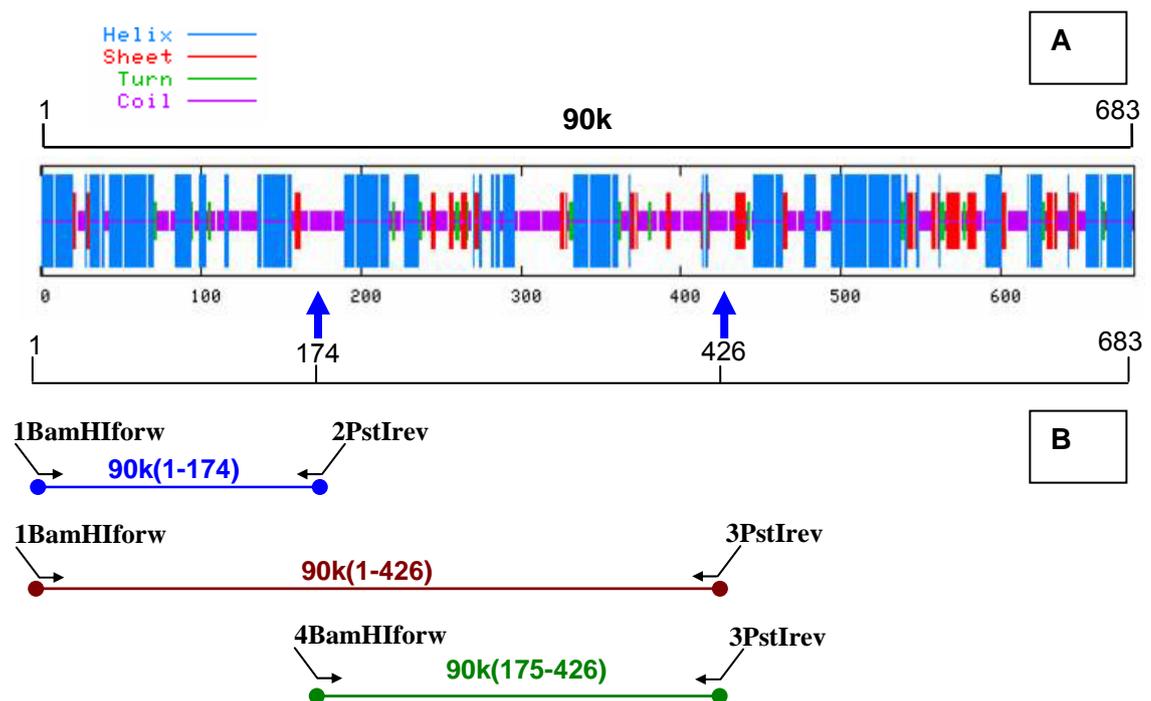


Abb. 36 A: Sekundärstrukturvorhersage des 90k mit Hilfe des Programms SOPMA (www.expasy.ch). α -Helices sind in blau, β -Faltblätter in rot, *turns* in grün und *coils* in violett dargestellt. Die blauen Pfeile markieren die Aminosäurepositionen, die den N- und C-Terminus der verkürzten Fragmente bestimmen. Die Fragmente wurden als 90k(1-174), 90k(1-426) und 90k(175-426) bezeichnet.

Abb. 36 B: Übersicht der drei 90k-Fragmente. Die Primer wurden vom 90k-Gen abgeleitet und für die Generierung der Fragmente verwendet.

Die vom 90k-Gen abgeleiteten Primer wurden so gewählt, dass am 5'-Ende eine *Bam*HI- und am 3'-Ende eine *Pst*I-Schnittstelle angefügt wurden. Außerdem besaßen die Fragmente stromaufwärts der *Pst*I-Schnittstelle noch ein Stop *codon*. Die Fragmente konnten mit den erwarteten Größen amplifiziert werden (Abb. 37).

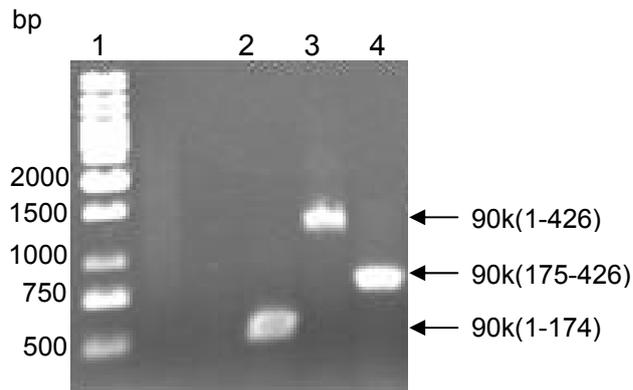


Abb. 37: Generierung verkürzter 90k-Fragmente mittels PCR: 1: Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, 2: 90k(1-174) [~600 bp], 3: 90k(1-426) [~1300 bp], 4: 90k(175-426) [~800 bp].

Die 90k-Fragmente wurden mit einem PCR Purification-Kit gereinigt und ebenso wie pMAL-c2XP mit *Bam*HI-*Pst*I geschnitten. Die DNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel extrahiert. Anschließend wurden die isolierten 90k-Fragmente in pMAL-c2XP kloniert und sequenziert.

3.4.2. Expression und Reinigung des MBP-90k(1-174)

Da die Expression des MBP-90k-His in *E. coli* BL21(DE3)-RIL bei 30 °C für 4 h erfolgreich war (s. 3.3.4), wurde MBP-90k(1-174) unter denselben Bedingungen im präparativen Maßstab exprimiert und anschließend mit Hilfe einer Amylose-Säule gereinigt.

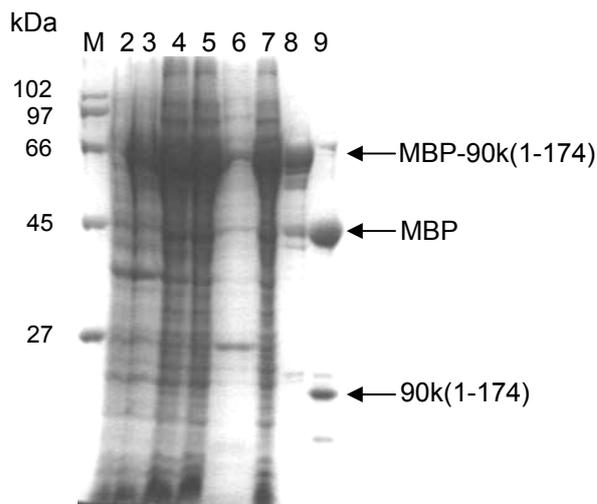


Abb. 38: Expression, Reinigung des MBP-90k(1-174) und Spaltung des Proteins mit PreScission-Protease: 12.5%-iges SDS-Gel. MBP-90k(1-174) wurde bei 30 °C für 4 h exprimiert, mit Hilfe einer Amylose-Säule aufgereinigt und mit PreScission-Protease gespalten. MBP-90k(1-174) läuft mit einem Molekulargewicht von 65 kDa. 90k(1-174) und MBP laufen auf Höhe von 23 kDa und 42 kDa. Die rekombinanten Proteine sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, 2: nicht induziert, 3: induziert, 4: Rohextrakt, 5: Überstand, 6: Pellet, 7: Durchfluss/Waschfraktion, 8: Elutionsfraktion, 9: MBP-90k(1-174) mit PreScission-Protease gespalten.

Aus der SDS-PAGE-Analyse (Abb. 38) geht hervor, dass MBP-90k(1-174) löslich exprimiert wurde (Rohextrakt: Spur 4, Überstand: Spur 5, Pellet: Spur 6). Da ein Teil des MBP-90k(1-174) nicht aufgereinigt werden konnte (Durchfluss/Waschfraktion, Spur 7), wurde der Durchfluss zur Aufreinigung des Proteins noch mal benutzt. Aus 1 Liter Ausgangskultur konnten ca. 20 mg MBP-90k(1-174) (Spur 8) aufgereinigt werden. Um 90k(1-174) (23 kDa) weiter reinigen zu können, wurde es vom MBP (42 kDa) mit PreScission-Protease abgespalten (Spur 9).

3.4.2.1 Reinigung des 90k(1-174) durch Gelfiltration

In einem weiteren Versuch sollte MBP von 90k(1-174) mit Hilfe einer Superdex 75-Säule (10/30) getrennt werden. 90k(1-174) weist ein Molekulargewicht von 23 kDa auf und ist somit 19 kDa „leichter“ als MBP, daher sollte eine Gelfiltration zur Trennung der Proteine führen. Im Elutionsprofil (Abb. 39 A) sind drei Absorptionspeaks (280 nm) erkennbar, die sich über die Fraktionen 7, 9 und 10/11 erstrecken.

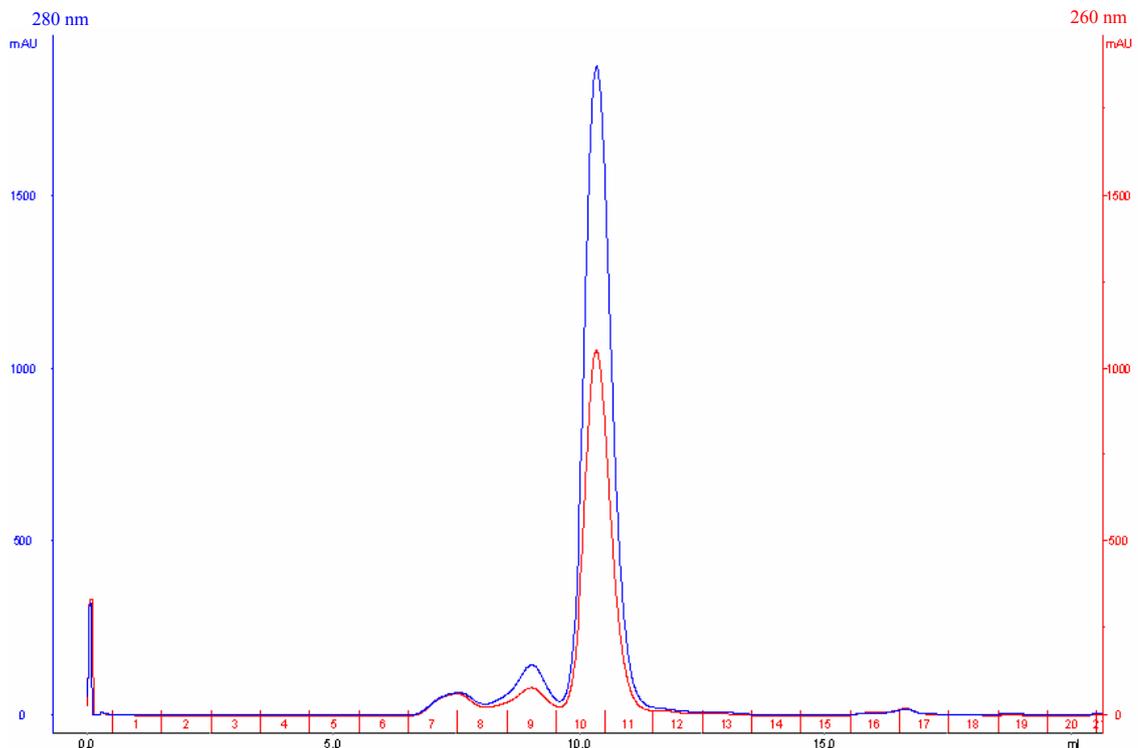


Abb. 39 A: Separierung des 90k(1-174) vom MBP mit Hilfe einer Superdex 75-Säule (10/30): Nachdem MBP vom 90k(1-174) proteolytisch abgespalten wurde, wurden zur Reinigung 0.5 ml (1.7 mg/ml) Proteinlösung bei einem Fluss von 0.5 ml/min auf eine Superdex 75-Säule (10/30) geladen. Die Absorption der eluierten Moleküle wurde bei 280 nm (linke Ordinate) und bei 260 nm (rechte Ordinate) aufgezeichnet. Dabei wurden 1 ml Fraktionen gesammelt (Abszisse).

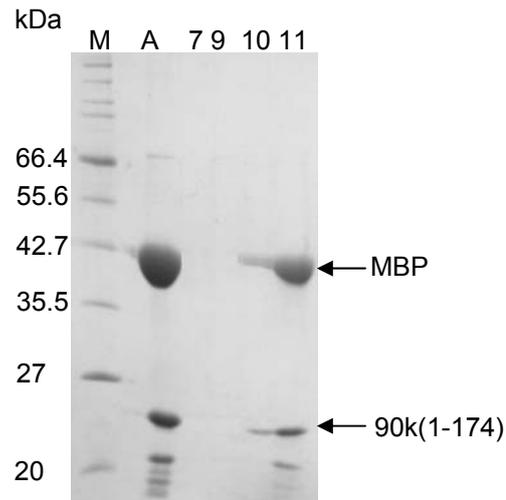


Abb. 39 B: SDS-PAGE-Analyse der 90k(1-174)-Reinigung: 12.5%-iges SDS-Gel. 90k(1-174) und MBP laufen mit den erwarteten Molekulargewichten von 23 kDa und 42 kDa und sind mit Pfeilen markiert. M: BR-Marker, A: MBP-90k(1-174) mit PreScission-Protease gespalten, Fraktion 7, Fraktion 9 bis 11.

Obwohl MBP ungefähr die doppelte Masse von 90k(1-174) besitzt, wurden beide Proteine im Trennbereich in den Fraktionen 10 und 11 (Abb. 39 A, B) eluiert. Der Grund dafür ist, dass 90k(1-174) sich analog zum 90k-His (s. 3.3.7) auf einer Gelfiltrationssäule wie ein Dimer verhält (s. Anhang). Auch mit Hilfe einer Phenylsepharose-, ResourceS-1ml- oder ResourceQ-1ml-Säule konnte 90k(1-174) nicht gereinigt werden. Das gespaltene MBP-90k(1-174) wurde für Bindungsstudien (s. 3.6.5) und Kristallisationsversuche benutzt (s. 3.7).

3.4.3 Expression und Reinigung des MBP-90k(1-426)

MBP-90k(1-426) wurde wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben exprimiert und mit Hilfe einer Amylose-Säule aufgereinigt. Um 90k(1-426) anschließend reinigen zu können, wurde MBP-90k(1-426) mit PreScission-Protease gespalten.

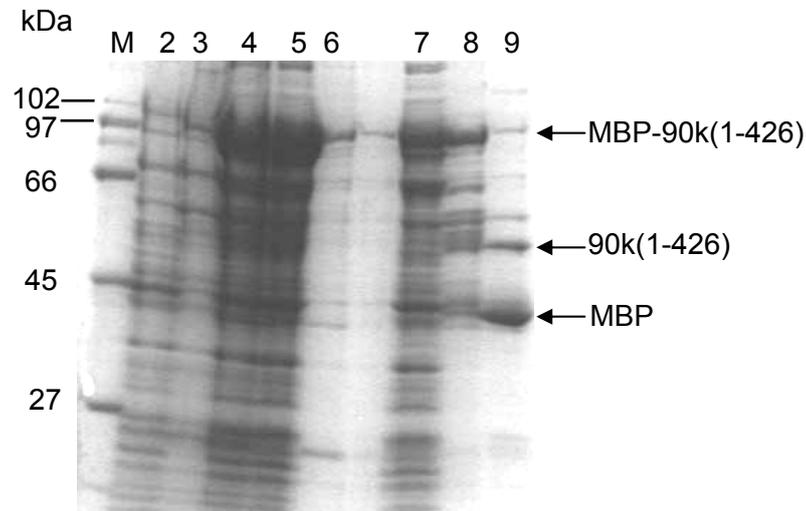


Abb. 40: Expression, Reinigung des MBP-90k(1-426) und proteolytische Spaltung des Proteins. 10%-iges SDS-Gel. MBP-90k(1-426) wurde bei 30 °C für 4 h exprimiert, mit Hilfe einer Amylose-Säule aufgereinigt und mit PreScission-Protease inkubiert. MBP-90k(1-426) läuft mit einem Molekulargewicht von 98 kDa. 90k(1-426) und MBP laufen auf Höhe von 56 kDa und 42 kDa. Die rekombinanten Proteine sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, 2: nicht induziert, 3: induziert, 4: Rohextrakt, 5: Überstand, 6: Pellet, 7: Durchfluss/Waschfraktion, 8: eluiertes MBP-90k(1-426), 9: MBP-90k(1-426) mit PreScission-Protease gespalten.

Die SDS-PAGE-Analyse (Abb. 40) zeigt, dass MBP-90k(1-426) löslich exprimiert wurde (Rohextrakt: Spur 4, Überstand: Spur 5, Pellet: Spur 6). Es konnte nur ein Teil des MBP-90k(1-426) aufgereinigt werden, da ein großer Teil an die Säulenmatrix nicht gebunden hatte (Durchfluss/Waschfraktion: Spur 7, Elutionsfraktion: Spur 8). Nach Spaltung mit PreScission-Protease wurden zwei Fragmente mit den erwarteten Molekulargewichten von 42 kDa (MBP) und 56 kDa [90k(1-426)] erhalten (Spur 9). Entgegen der Erwartung wurden die Proteine nicht im äquimolaren Verhältnis gespalten. Es ergab sich eine Ausbeute von ca. 6 mg pro Liter Ausgangskultur.

3.4.3.1 Reinigung des 90k(1-426) mit Hilfe eines Kationenaustauschers

Anschließend sollte MBP vom 90k(1-426) mit Hilfe einer Source30S-16ml-Säule getrennt werden. Der theoretische isoelektrische Punkt des MBP liegt bei pH 5.5 und der des 90k(1-426) bei pH 9.3. In Gegenwart eines Laufpuffers mit pH 7.5 sollte folglich

nur 90k(1-426) an die Säulenmatrix binden und anschließend in einem Salzgradienten eluiert werden.

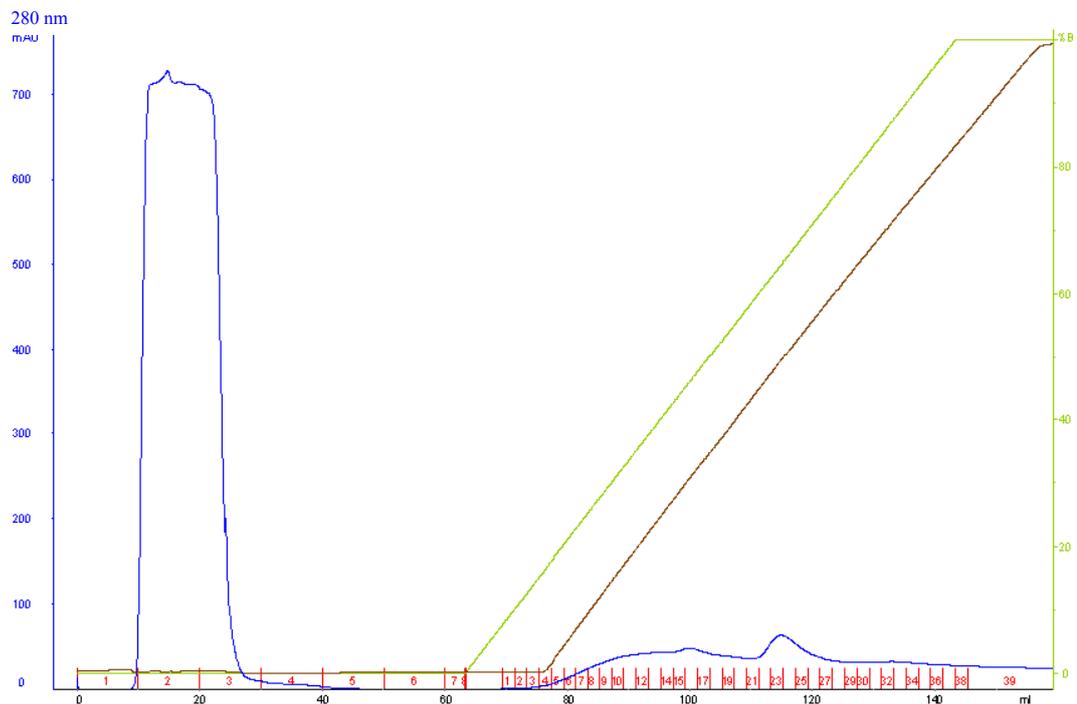


Abb. 41 A: Separierung des 90k(1-426) vom MBP mit Hilfe einer Source30S-16ml-Säule: Die Proteinlösung wurde ankonzentriert und mit Hilfe einer PD-10-Säule in 50 mM Natriumphosphat Puffer pH 7.5 umgepuffert. Zur Reinigung wurden 14 ml (6 mg) Proteinlösung bei einem Fluss von 2 ml/min auf einer Source30S-16ml-Säule aufgetragen. Es wurde ein Gradient (rechte Ordinate) von 0 bis 1 M NaCl (100% B) über 5 Säulenvolumen angelegt und die Absorption der eluierten Moleküle bei 280 nm (linke Ordinate) gemessen. Die Leitfähigkeit ist in Dunkelbraun dargestellt. Der Durchfluss wurde in 10 ml und die Elution in 2 ml Fraktionen gesammelt (Abszisse).

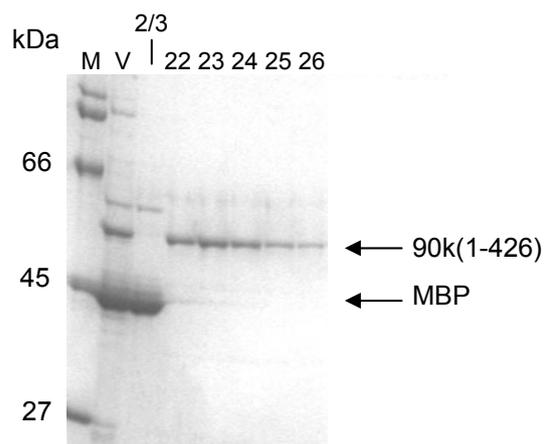


Abb. 41 B: SDS-PAGE-Analyse der 90k(1-426)-Reinigung. 10%-iges SDS-Gel. 90k(1-426) läuft mit einem Molekulargewicht von 56 kDa und MBP auf Höhe von 42 kDa. Die rekombinanten Proteine sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, V: MBP-90k(1-426) mit PreScission-Protease gespalten, Fraktionen 2 und 3 (Durchfluss), Fraktionen 22 bis 26.

Im Elutionsprofil befinden sich zwei Absorptionspeaks bei 280 nm, die sich über Fraktion 2/3 (Durchfluss) und über die Fraktionen 22 bis 26 erstrecken (Abb. 41 A). 90k(1-426) konnte mit ca. 450 mM NaCl von der Säulenmatrix in den Fraktionen 22 bis 26 eluiert werden (Abb. 41 A, B). Nach Reinigung mit Hilfe einer Amylose-Säule (s. 3.4.3) und einer Source30S-16ml-Säule betrug die Ausbeute des 90k(1-426) 0.7 mg pro Liter Ausgangskultur.

3.4.4 Insertion eines C-terminalen His-tags am 90k(1-426)

Um die Ausbeute des 90k(1-426) zu erhöhen, sollte MBP-90k(1-426) über einen C-terminalen His-tag, der mit Hilfe der PCR angefügt werden sollte, gereinigt werden. Nach der PCR besaß 90k(1-426) am 5'-Ende eine *Bam*HI (1*Bam*HIforw) und am 3'-Ende eine *Pst*I (7*Pst*Irev) Schnittstelle, die zur Klonierung in pMAL-c2XP benötigt wurden. Außerdem wurde stromaufwärts der *Pst*I-Schnittstelle noch eine Sequenz, die für einen 6His-tag und ein Stop *codon* kodiert, angefügt. Es wurde ein Fragment mit der erwarteten Größe von ca. 1.3 kb amplifiziert (Abb. 42). Das Fragment wurde als 90k(1-426)-His bezeichnet.

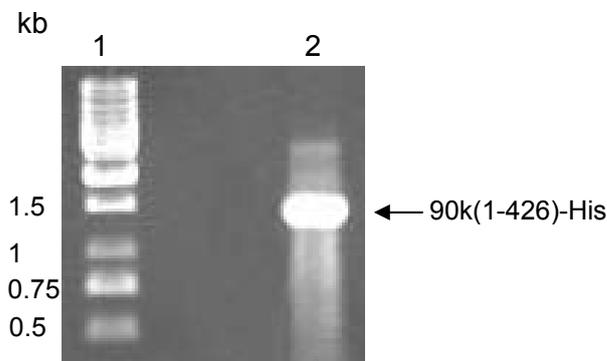


Abb. 42: Analyse des PCR-Produktes: 1%-iges Agarosegel. 1: Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, 2: 90k(1-426)-His [~1.3 kb].

Das mit einem PCR Purification-Kit gereinigte Fragment wurde ebenso wie pMAL-cXP mit *Bam*HI-*Pst*I geschnitten, elektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel extrahiert. Anschließend wurde 90k(1-426)-His in pMAL-c2XP kloniert und sequenziert.

3.4.5 Expression und Reinigung des MBP-90k(1-426)-His

MBP-90k(1-426)-His wurde wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben exprimiert und anschließend mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule aufgereinigt. Abweichend von 2.2.4.1.2 wurde hier eine 2 Liter Kultur angesetzt.

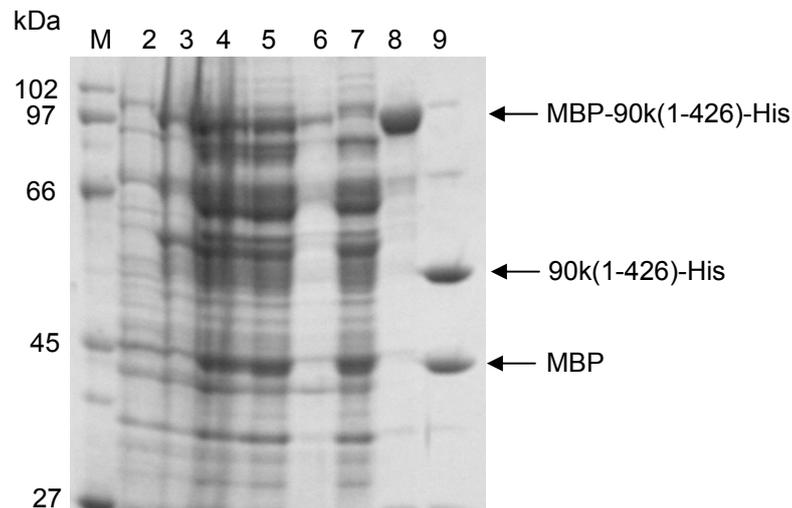


Abb. 43: Expression, Reinigung und proteolytische Spaltung des MBP-90k(1-426)-His. 10%-iges SDS-Gel. MBP-90k(1-426)-His wurde bei 30 °C für 4 h exprimiert. Nach Reinigung mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule wurde MBP-90k(1-426)-His mit PreScission-Protease gespalten. MBP-90k(1-426)-His [98 kDa], 90k(1-426)-His [56 kDa] und MBP (42 kDa) laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte und sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, 2: nicht induziert, 3: induziert, 4: Rohextrakt, 5: Überstand, 6: Pellet, 7: Durchfluss/Waschfraktion, 8: Elutionsfraktion, 9: MBP-90k(1-426)-His mit PreScission-Protease gespalten.

Im Vergleich zur Reinigung des MBP-90k(1-426) mit Hilfe einer Amylose-Säule (s. 3.4.3, Abb. 40, Spur 7: Durchfluss/Waschfraktion, Spur 8: Elutionsfraktion) konnte MBP-90k(1-426)-His mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule effektiver gereinigt werden (Abb. 43, Spur 7: Durchfluss/Waschfraktion, Spur 8: Elutionsfraktion). Außerdem wurde MBP-90k(1-426)-His im Vergleich zum MBP-90k(1-426) (s. 3.4.3, Abb. 40, Spur 9) im äquimolaren Verhältnis gespalten (Abb. 43, Spur 9). Die Aufreinigung ergab eine Ausbeute von ca. 22 mg 90k(1-426)-His pro Liter Ausgangskultur.

3.4.5.1 Reinigung des 90k(1-426)-His mit Hilfe eines Kationenaustauschers und durch Gelfiltration

Da 90k(1-426) vom MBP mit Hilfe einer Source30S-16ml-Säule erfolgreich getrennt werden konnte (s. 3.4.3.1), wurde 90k(1-426)-His auf dieselbe Weise gereinigt.

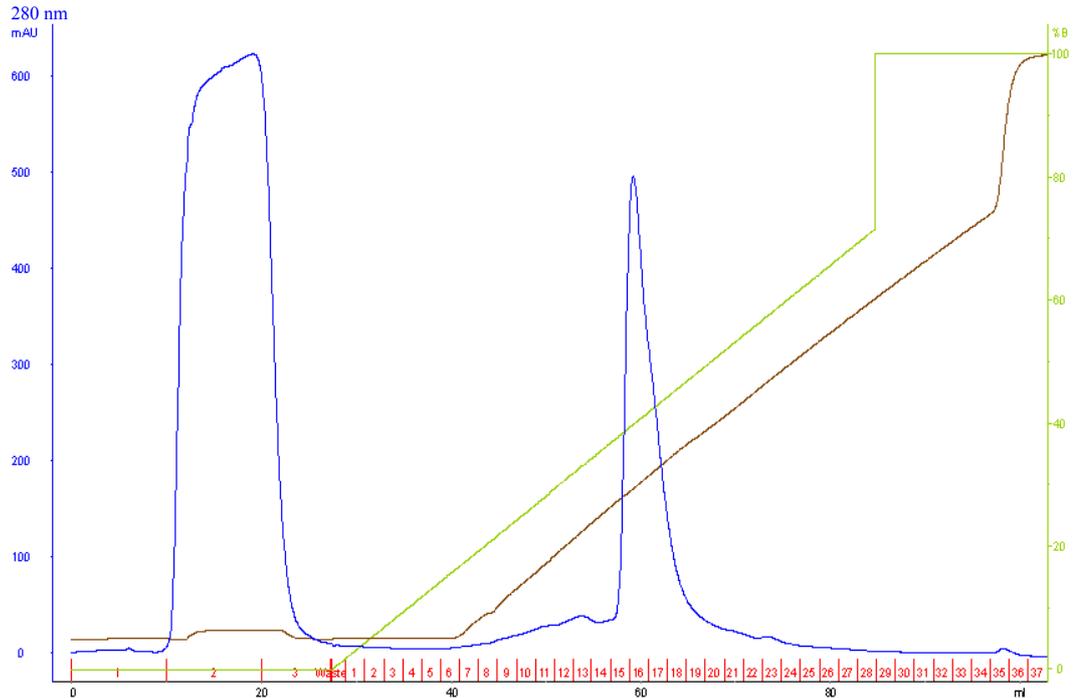


Abb. 44 A: Separierung des 90k(1-426)-His vom MBP mit Hilfe einer Source30S-16ml-Säule. Nach proteolytischer Spaltung des MBP-90k(1-426)-His wurde die Proteinlösung ankonzentriert und anschließend mit Hilfe einer PD-10 Säule in 50 ml Natriumphosphat-Puffer pH 7.5 umgepuffert. Zur Reinigung wurden 14 ml (44 mg) Proteinlösung bei einem Fluss von 2 ml/min auf eine Source30S-16ml-Säule geladen. Es wurde ein Gradient (rechte Ordinate) von 0 bis 1 M NaCl (100% B) über 3,5 Säulenvolumen angelegt und die Absorption der eluierten Moleküle bei 280 nm (linke Ordinate) gemessen. Die Leitfähigkeit ist in Dunkelbraun dargestellt. Der Durchfluss wurde in 10 ml und die Elution in 2 ml Fraktionen gesammelt (Abszisse).

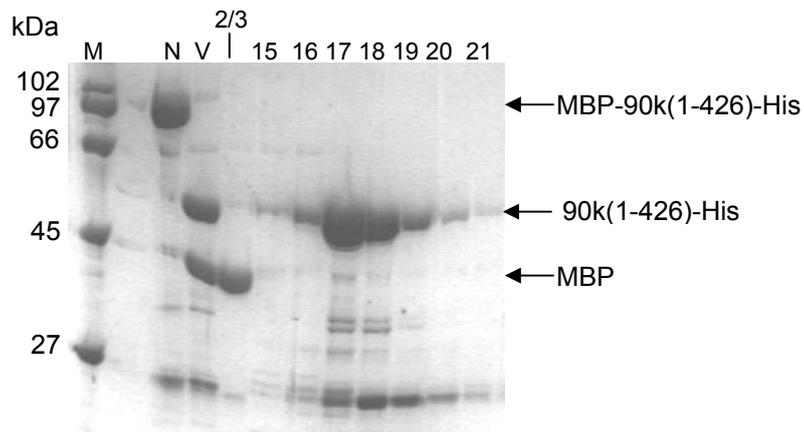


Abb. 44 B: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung: 10%-iges SDS-Gel. MBP-90k(1-426)-His, 90k(1-426)-His und MBP laufen auf Höhe der erwarteten Molekulargewichte von 98 kDa, 56 kDa und 42 kDa und sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, N: gereinigtes MBP-90k(1-426)-His, V: MBP-90k(1-426)-His mit PreScission-Protease gespalten, Fraktionen 2 und 3 (Durchfluss), Fraktionen 15 bis 21.

Im Elutionsprofil sind zwei Absorptionspeaks bei 280 nm über Fraktion 2/3 (Durchfluss) und den Fraktionen 15 bis 21 (Abb. 44 A) erkennbar. 90k(1-426)-His wurde mit ca. 370 mM NaCl mit einigen Verunreinigungen von der Säulenmatrix in den Fraktionen 15

bis 21 eluiert (Abb. 44 A, B). Für Kristallisationsversuche und Bindungsstudien war 90k(1-426)-His nicht ausreichend sauber und wurde deshalb durch eine Superdex 200-Säule (10/30) weiter gereinigt.

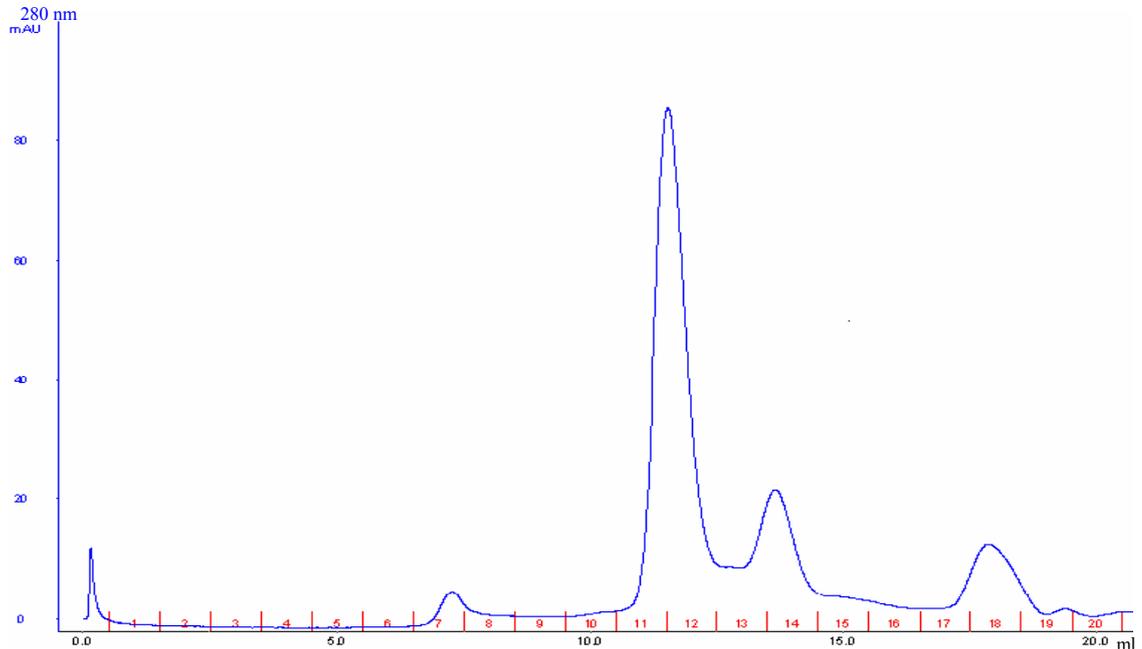


Abb. 45 A: Reinigung des 90k(1-426)-His mit Hilfe einer Superdex 200-Säule (10/30). Zur Reinigung wurden 0.5 ml (1.2 mg/ml) Proteinlösung bei einem Fluss von 0.5 ml/min auf eine Superdex 200-Säule (10/30) geladen. Die Absorption der eluierten Moleküle wurde bei 280 nm (linke Ordinate) gemessen. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml (Abszisse).

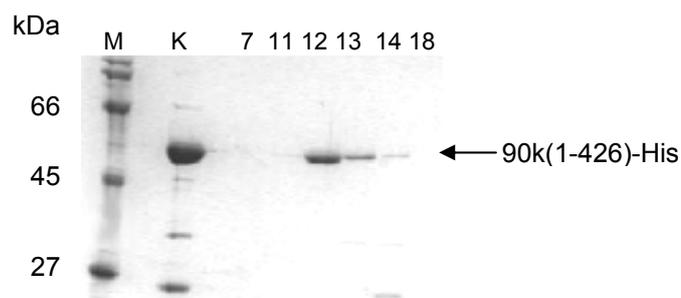


Abb. 45 B: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung: 10%-iges SDS-Gel. 90k(1-426)-His läuft mit einem Molekulargewicht von 56 kDa und ist mit einem Pfeil markiert. M: SM-Marker, K: gereinigtes 90k(1-426)-His, Fraktion 7, Fraktionen 11 bis 14, Fraktion 18.

Im Elutionsprofil befinden sich vier Absorptionspeaks bei 280 nm, die sich über die Fraktionen 7, 11/12, 13/14 und 18 erstrecken (Abb. 45 A). Bei Betrachtung der SDS-PAGE-Analyse (Abb. 45 B) wird ersichtlich, dass 90k(1-426)-His von den Verunreinigungen getrennt werden konnte (Fraktionen 12 und 13).

Mit Hilfe der Eichgeraden der verwendeten Säule (s. Anhang) konnte ermittelt werden, dass 90k(1-426)-His sich ebenso wie 90k-His (s. 3.3.7) und 90k(1-174) [s. 3.4.2.1] wie

ein Dimer verhält. Nach Reinigung mit Hilfe einer Ni-NTA-Säule (s. 3.4.5), einer Source30S-16ml- und einer Superdex 200-Säule (10/30) ergab die Ausbeute des 90k(1-426)-His (Fraktionen 12 und 13) ca. 10 mg pro Liter Ausgangskultur. 90k(1-426)-His wurde anschließend zu Kristallisationsversuchen (s. 3.7) und für Bindungsstudien benutzt (s. 3.6.4).

3.4.6 Expression und Reinigung des MBP-90k(175-426)

90k(175-426) wurde wie in Abschnitt 3.3.4 beschrieben exprimiert und anschließend mit Hilfe einer Amylose-Säule aufgereinigt.

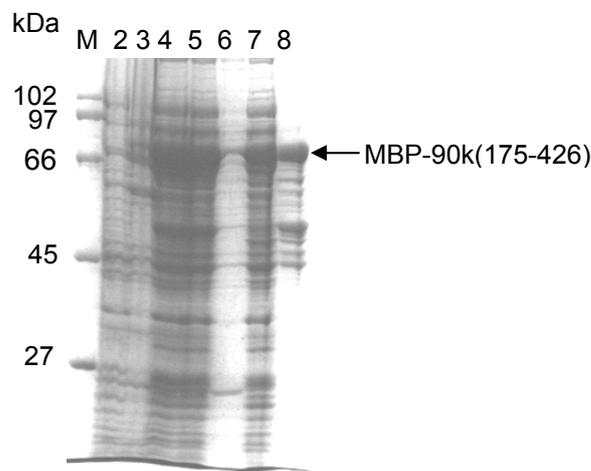


Abb. 46: Expression und Reinigung des MBP-90k(175-426): 10%-iges SDS-Gel. MBP-90k(175-426) wurde bei 30 °C für 4 h exprimiert und anschließend mit Hilfe einer Amylose-Säule aufgereinigt. Das MBP-90k(175-426) läuft auf Höhe des zu erwartenden Molekulargewichtes von 75 kDa und ist mit einem Pfeil markiert. M: SM-Marker, 2: nicht induziert, 3: induziert, 4: Rohextrakt, 5: Überstand, 6: Pellet, 7: Durchfluss/Waschfraktion, 8: Elutionsfraktion.

Aus der SDS-PAGE-Analyse (Abb. 46) wird ersichtlich, dass MBP-90k(175-426) löslich überexprimiert wurde (Rohextrakt: Spur 4, Überstand: Spur 5, Pellet: Spur 6). Da nur ein Teil des MBP-90k(175-426) aufgereinigt werden konnte (Spur 8), wurde der Durchfluss (Spur 7) zur Aufreinigung des Proteins erneut verwendet. Die Ausbeute des affinitätsgereinigten MBP-90k(175-426) ergab ca. 24 mg pro Liter Ausgangskultur.

3.4.6.1 Proteolytische Spaltung des MBP-90k(175-426) und Reinigung mit Hilfe eines Kationenaustauschers

Nach Spaltung des affinitätsgereinigten MBP-90k(175-426) mit PreScission-Protease (Abb. 47 B, Spur V) wurde 90k(175-426) mit Hilfe einer Source30S-16ml-Säule analog zum 90k(1-426) (s. 3.4.3.1) weiter gereinigt.

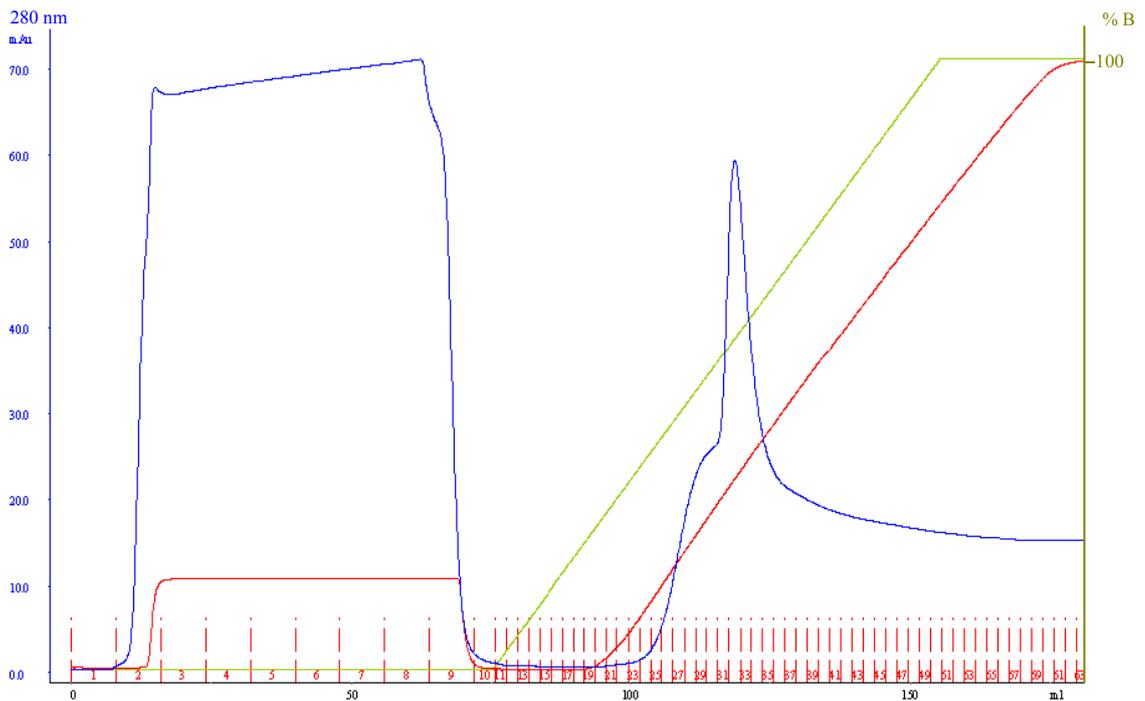


Abb. 47 A: Proteolytische Spaltung des MBP-90k(175-426) und Reinigung mit Hilfe einer Source30S-16ml-Säule: Nach Spaltung des MBP-90k(175-426) mit PreScission-Protease wurde die Proteinlösung 1:2 mit 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7.5 auf eine Salzkonzentration von 150 mM NaCl verdünnt. Zur Reinigung wurden 50 ml (24 mg) Proteinlösung bei einem Fluss von 2 ml/min auf eine Source30S-16ml-Säule geladen und die Absorption der eluierten Moleküle bei 280 nm (linke Ordinate) gemessen. Es wurde ein Gradient (rechte Ordinate) von 0 bis 1 M NaCl (100% B) über 5 Säulenvolumen angelegt. Die Leitfähigkeit ist in Rot dargestellt. Der Durchfluss wurde in 8 ml und die Elution in 2 ml Fraktionen (Abszisse) gesammelt.

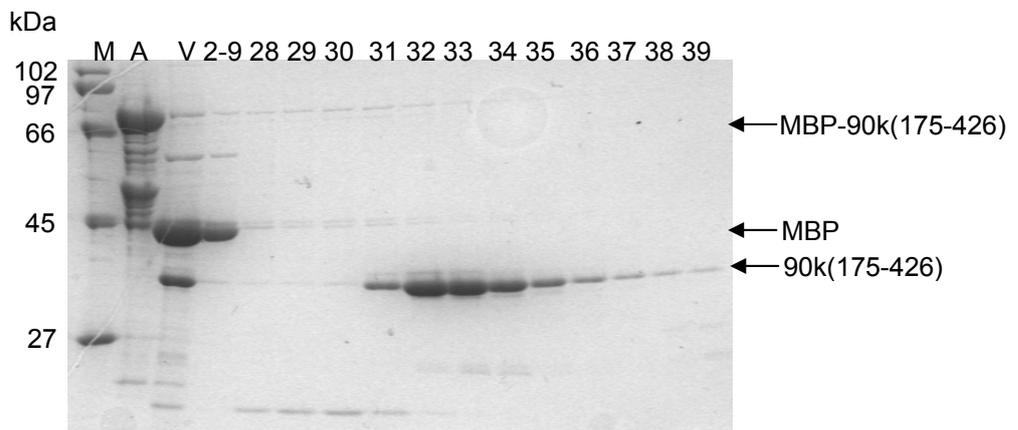


Abb. 47 B: SDS-PAGE-Analyse der Reinigung des 90k(175-426): 10%-iges SDS-Gel. MBP-90k(175-426), 90k(175-426) und MBP laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte von 75 kDa, 33 kDa und 42 kDa. Die rekombinanten Proteine sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, A: MBP-90k(175-426), V: gereinigtes MBP-90k(175-426) mit PreScission-Protease inkubiert, Fraktionen 2 bis 9 (Durchfluss), Fraktionen 28 bis 39.

Im Elutionsprofil erstrecken sich zwei Absorptionspeaks bei 280 nm über die Fraktionen 2 bis 9 (Durchfluss) und die Fraktionen 28 bis 39 (Abb. 47 A). Die Elution des 90k(175-426) von der Säulenmatrix erfolgte mit ca. 350 mM NaCl in den Fraktionen 31 bis 39 (Abb. 47 A, B). Die Reinigung des 90k(175-426) mit Hilfe einer

Amylose-Säule (s. 3.4.6) und einer Source30S-16ml-Säule brachte eine Ausbeute von ca. 4 mg pro Liter Ausgangskultur. Anschließend wurde es für Bindungsstudien (s. 3.6.6) und Kristallisationsversuche verwendet (s. 3.7).

3.4.6.2 Ermittlung der Molekularmasse von 90k(175-426)

Mit Hilfe einer Superdex 75-Säule (10/30) sollte die Molekularmasse des 90k(175-426) ermittelt werden. Dazu wurde 90k(175-426) aus Versuch 3.4.6.1 verwendet. Im Elutionsprofil (Abb. 48 A) befinden sich zwei Absorptionspeaks bei 280 nm, die sich über die Fraktionen 10 und 11, in denen sich 90k(175-426) befindet (Abb. 48 B), und über Fraktion 16/17 erstrecken. Aus der Eichraden der verwendeten Superdex 75-Säule (10/30) (s. Anhang) geht hervor, dass sich 90k(175-426), im Gegensatz zum 90k-His (s. 3.3.7), 90k(1-426)-His (s. 3.4.5.1) und 90k(1-174) (s. 3.4.2.1), wie ein Monomer (33 kDa) verhält.

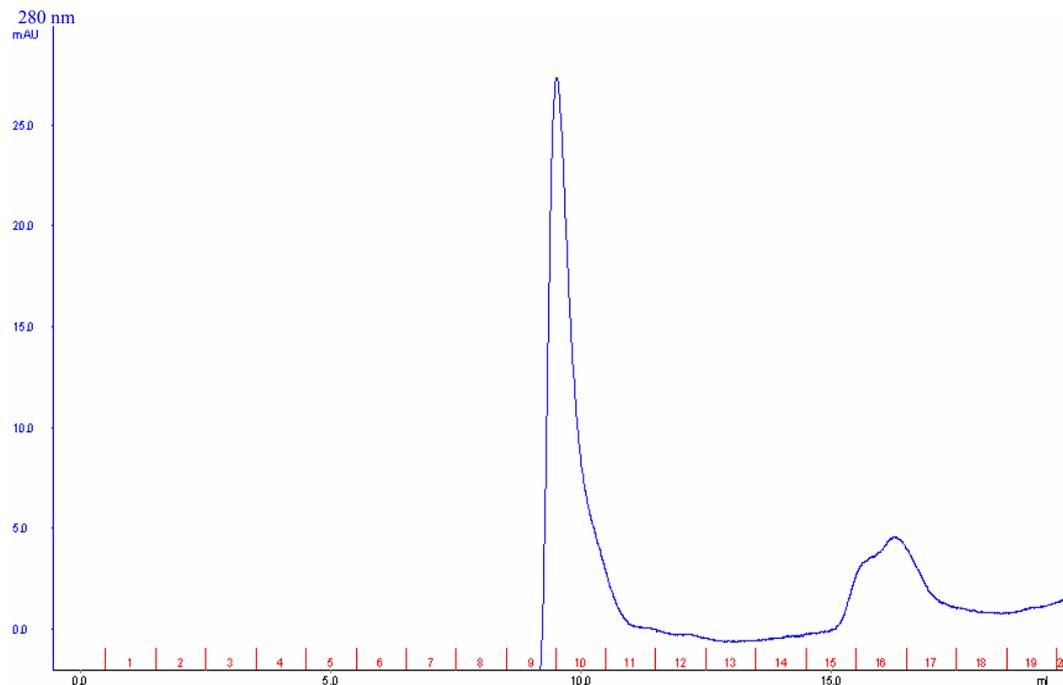


Abb. 48 A: Ermittlung der Molekularmasse des 90k(175-426) durch eine Superdex 75-Säule (10/30): Zur Bestimmung der Molekularmasse wurden 0,5 ml (0,5 mg/ml) gereinigtes 90k(175-426) bei einem Fluss von 0,5 ml/min auf eine Superdex 75-Säule (10/30) aufgetragen. Die Absorption der eluierten Moleküle wurde bei 280 nm (Ordinate) verfolgt. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt (Abszisse).

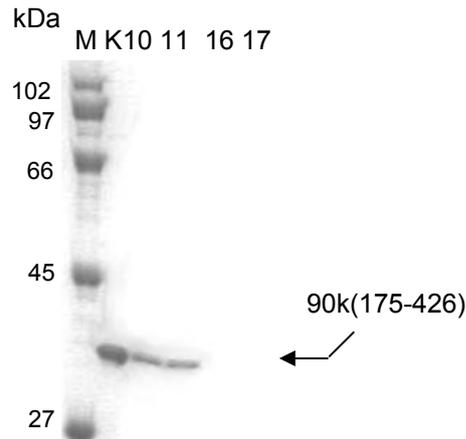


Abb. 48 B: SDS-PAGE-Analyse der Gelfiltration. 12.5%-iges SDS-Gel. 90k(175-426) läuft auf Höhe des zu erwartenden Molekulargewichtes von 33 kDa und ist mit einem Pfeil markiert. M: SM-Marker, K: 90k(175-426), Fraktion 10, Fraktion 11, Fraktion 16, Fraktion 17.

3.5 Zusammenfassung der Expression und Reinigung der Proteine

In Tab. 9 sind die Ergebnisse der Expression und Reinigung der verwendeten Proteine zusammengefasst.

Tab. 9: Übersicht der exprimierten und gereinigten Proteine

Protein	Fusionsprotein/ tag	Expression	Reinigung	Ausbeute (mg) pro Liter Kultur	Abschnitt
SMNrp	GST (N)	30 °C (+)	+	10	3.2
60k	GST (N)	15 °C (-)	-	0	3.1.1
60k	MBP (N)	15 °C (+)	+	>100	3.1.3
90k	His (N)	25 °C (o)	+	0.3	3.3.1/2
90k	MBP (N)	30 °C (+)	-	0	3.3.4/5
90k	MBP (N), His* (C)	30 °C (+)	+	4	3.3.6/7
90k(1-174)	MBP (N)	30 °C (+)	-	0	3.4.2-3.4.2.1
90k(1-426)	MBP (N)	30 °C (+)	o	0.7	3.4.3-3.4.3.1
90k(1-426)	MBP (N), His* (C)	30 °C (+)	+	10	3.4.5-3.4.5.1
90k(175-426)	MBP	30 °C (+)	+	4	3.4.6-3.4.6.1

(N): N-terminal, (C): C-terminal, (+): gut, (o): mäßig, (-): nicht zufrieden stellend

* Reinigung über His-tag

3.6 Bindungsstudien

Nachdem die spleißosomalen Proteine in *E. coli* überexprimiert und gereinigt wurden (s. Tab. 10), sollten die in Tab. 11 aufgelisteten Interaktionen geprüft und die resultierenden Komplexe für Kristallisationsversuche verwendet werden (s. 3.7). Die Durchführung der Experimente ist in dem Abschnitt 2.2.5.6 beschrieben.

Tab. 10: verwendete Proteine

Protein	Abschnitt
GST-SMNrp	3.2
MBP-60k	3.1.3
90k-His	3.3.7
90k(1-174) + MBP	3.4.2
90k(1-426)-His	3.4.5.1
90k(175-426)	3.4.6.1
20k	-----

Tab. 11: Interaktionen

20k::60k
60k::90k
SMNrp::90k
SMNrp::90k(1-426)
SMNrp::90k(1-174)
SMNrp::90k(175-426)

3.6.1 20k::60k-Interaktion

Das rekombinante 20k-Protein wurde freundlicherweise von U. Reidt (MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) bereitgestellt. Aus Abb. 49 wird ersichtlich, dass 20k mit MBP-60k einen Komplex bildet (Spur 6).

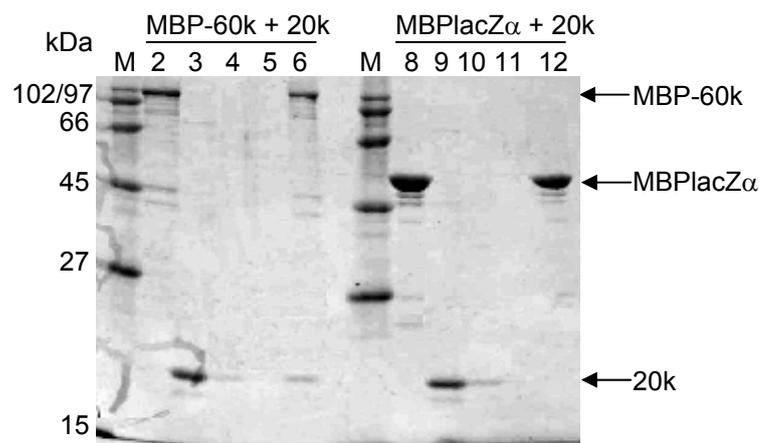


Abb. 49: Analyse der 60k::20k-Bindung: 12.5%-iges SDS-Gel. MBP-60k (102 kDa), 20k (20 kDa) und MBPlacZ α (52 kDa) laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte und sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, 2 bis 6: MBP-60k + 20k, 2: MBP-60k gebunden an Amylose, 3: nicht gebundenes 20k (Durchfluss), 4 und 5: Waschfraktionen, 6: MBP-60k::20k-Komplex gebunden an Amylose. 8 bis 12: Negativkontrolle, 8: MBPlacZ α gebunden an Amylose, 9: nicht gebundenes 20k (Durchfluss), 10 und 11: Waschfraktionen, 12: MBP-lacZ α gebunden an Amylose.

3.6.2 60k::90k-Interaktion

Im nachfolgenden Experiment wurden die 60k::90k-Interaktion und zusätzlich der Einfluss von Glycerin auf die Bindungsstärke untersucht. Aus der SDS-PAGE-Analyse geht hervor, dass in Gegenwart von 10% Glycerin (Abb. 50 A, Spur 12) die MBP-60k::90k-His-Bindung im Vergleich zum Ansatz ohne Glycerin (Abb. 50 B, Spur 6) verstärkt wurde. Dies ist in Übereinstimmung mit Bindungsstudien von GONZALES-SANTOS et al. (2002), die den 60k::90k-Komplex in Gegenwart eines Puffers, der 10% Glycerin enthielt, rekonstituierten.

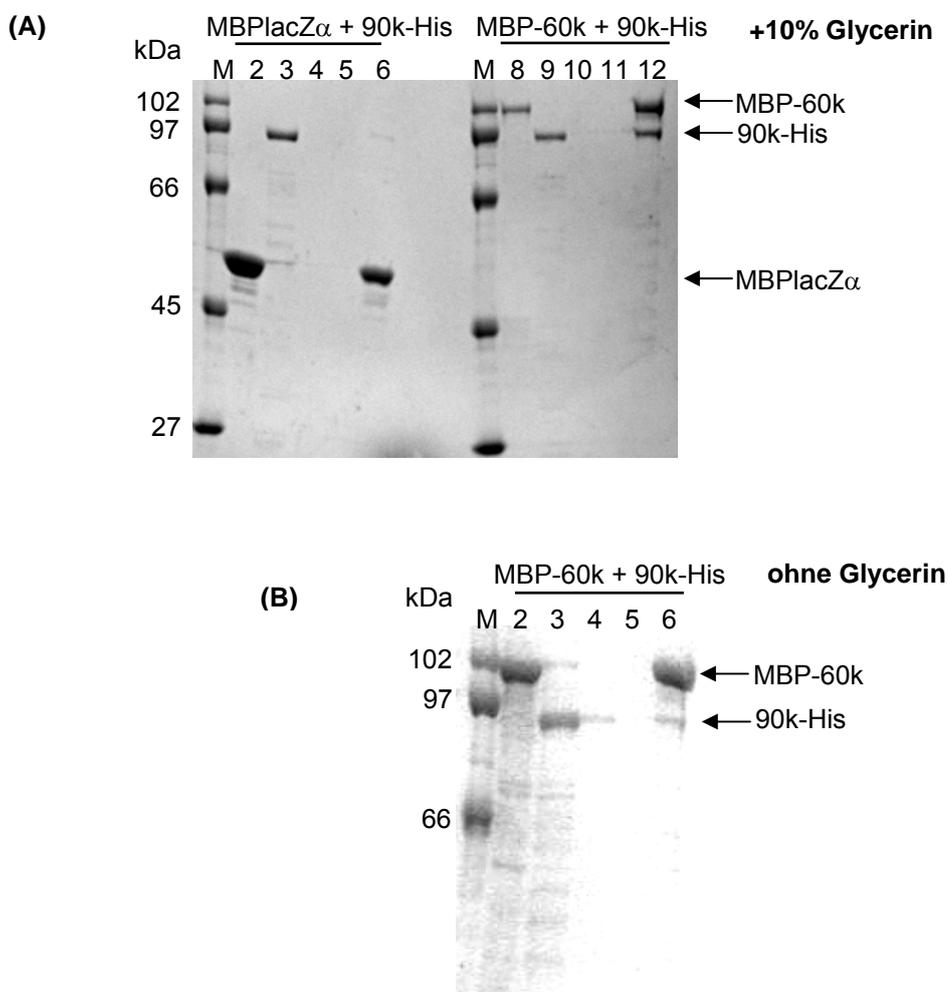


Abb. 50 A: Analyse der 60k::90k-Bindung in Gegenwart von 10% Glycerin: 10%-iges SDS-Gel. MBP-60k (102 kDa), 90k-His (90 kDa) und MBPlacZ α (52 kDa) laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte und sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, 2 bis 6: Negativkontrolle, 2: MBPlacZ α gebunden an Amylose, 3: nicht gebundenes 90k-His (Durchfluss), 4 und 5: Waschfraktionen 6: MBPlacZ α gebunden an Amylose, 8 bis 12: MBP-60k + 90k-His, 8: MBP-60k gebunden an Amylose, 9: nicht gebundenes 90k-His (Durchfluss), 10 und 11: Waschfraktionen, 12: MBP-60k::90k-His-Komplex gebunden an Amylose.

Abb. 50 B: Analyse der 60k::90k-Bindung ohne Glycerin: 7.5%-iges SDS-Gel. M: SM-Marker, 2: MBP-60k gebunden an Amylose, 3: nicht gebundenes 90k-His, 4 und 5: Waschfraktionen, 6: „MBP-60k::90k-His Komplex“ gebunden an Amylose.

3.6.3 SMNrp::90k-Interaktion

MEISTER et al. (2001) hatten den SMNrp::90k-Komplex beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieser Komplex ebenfalls gebildet werden (Abb. 51, Spur 6).

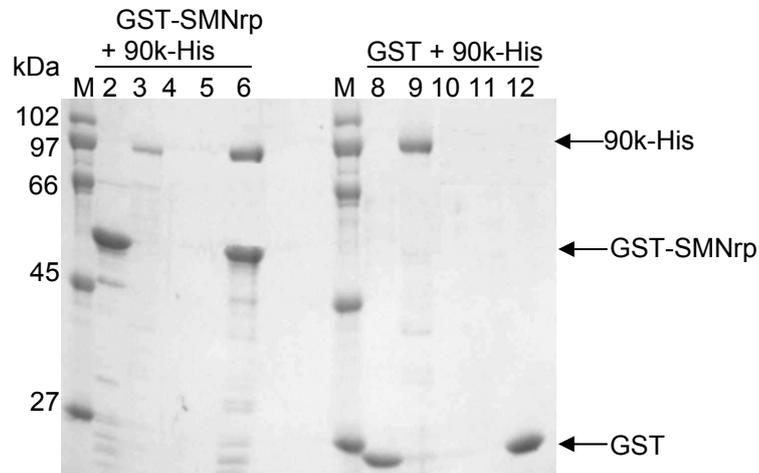


Abb. 51: Analyse der SMNrp::90k-Bindung: 12.5%-iges SDS-Gel. 90k-His (90 kDa), GST-SMNrp (56 kDa) und GST (26 kDa) laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte. Die rekombinanten Proteine sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, 2 bis 6: GST-SMNrp + 90k-His, 2: GST-SMNrp gebunden an Glutathion Sepharose, 3: nicht gebundenes 90k-His (Durchfluss), 4 und 5: Waschfraktionen, 6: GST-SMNrp::90k-His-Komplex gebunden an Glutathion Sepharose, 8 bis 12: Negativkontrolle, 8: GST gebunden an Glutathion Sepharose, 9: nicht gebundenes 90k-His (Durchfluss), 10 und 11: Waschfraktionen, 12: GST gebunden an Glutathion Sepharose.

3.6.4 SMNrp::90k(1-426)-Interaktion

GST-SMNrp und 90k(1-426)-His laufen auf dem SDS-Gel mit einem Molekulargewicht von jeweils 56 kDa. Um sicherzustellen, dass es sich hierbei um den GST-SMNrp::90k(1-426)-His-Komplex handelt (Abb. 52, Spur 6), wurde dieser mit PreScission-Protease, die an GST fusioniert war, vom GST abgespalten (Abb. 52, Spur 7). Anschließend wurden die an Glutathion Sepharose gebundenen GST-PreScission-Protease und GST pelletiert. Der gebildete SMNrp::90k(1-426)-His-Komplex befand sich dabei im Überstand (Abb. 52, Spur 8).

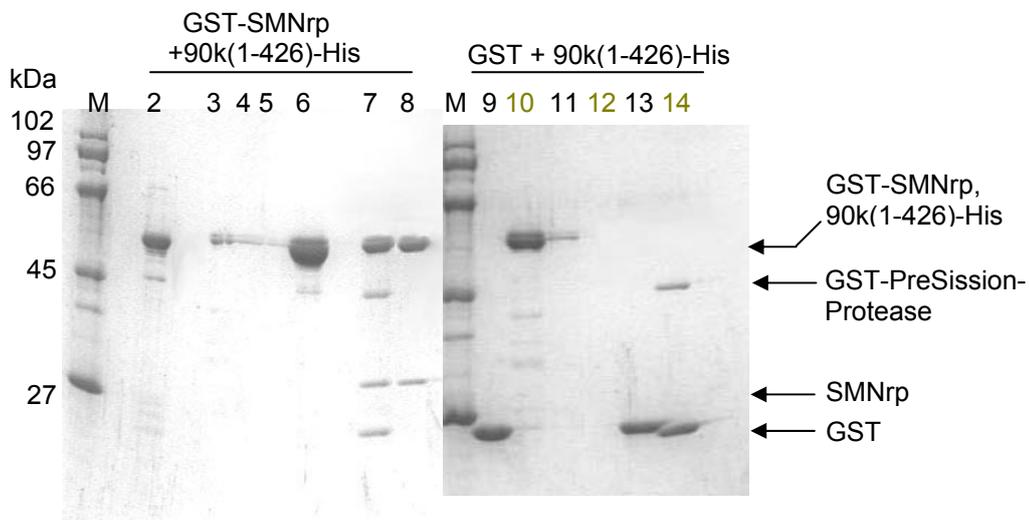


Abb. 52: Analyse der SMNrp::90k(1-426)-Bindung: 12.5%-iges SDS-Gel. GST-SMNrp (56 kDa), 90k(1-426)-His [56 kDa], GST-PreScission-Protease (46 kDa), SMNrp (30 kDa) und GST (26 kDa) laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte. Die rekombinanten Proteine sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, 2 bis 8: GST-SMNrp + 90k(1-426)-His, 2: GST-SMNrp gebunden an Glutathion Sepharose, 3: nicht gebundenes 90k(1-426)-His [Durchfluss], 4 und 5: Waschfraktionen, 6: GST-SMNrp::90k(1-426)-His-Komplex gebunden an Glutathion Sepharose 7: SMNrp::90k(1-426)-His-Komplex vom GST mit PreScission-Protease abgespalten, 8: Überstand der Probe von Spur 7, 9 bis 14: Negativkontrolle, 9: GST gebunden an Glutathion Sepharose, 10: nicht gebundenes 90k(1-426)-His [Durchfluss], 11 und 12: Waschfraktionen, 13: GST gebunden an Glutathion Sepharose, 14: GST gebunden an Glutathion Sepharose und mit PreScission-Protease inkubiert.

3.6.5 SMNrp::90k(1-174)-Interaktion

Wie in Abschnitt 3.4.2.1 beschrieben, konnte 90k(1-174) vom MBP chromatographisch nicht getrennt werden. Deshalb wurde 90k(1-174) und MBP zusammen mit GST-SMNrp (Abb. 53 A, Spuren 8 bis 12) oder GST (Abb. 53 A, Spuren 2 bis 6) inkubiert. Um auszuschließen, dass die Interaktion des 90k(1-174) mit SMNrp durch MBP beeinflusst wird, wurde als Positivkontrolle ein Proteingemisch bestehend aus 90k-His und MBP verwendet (Abb. 53 B, Spuren 8 bis 12).

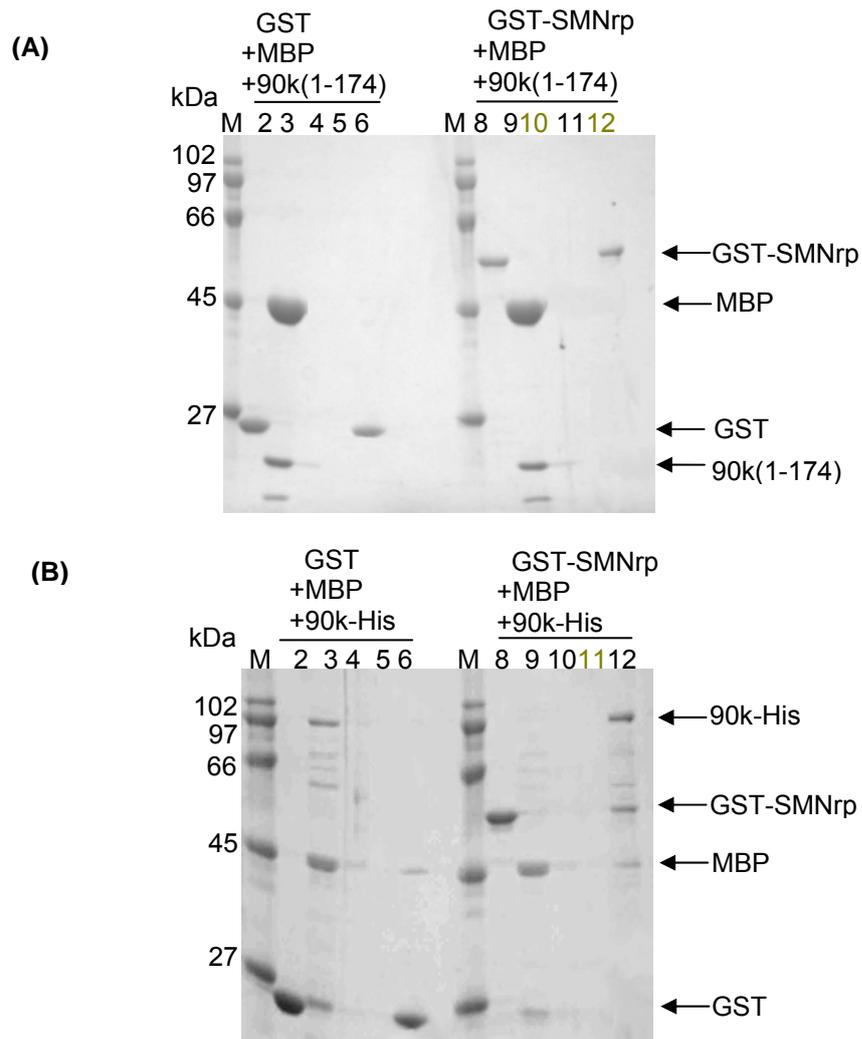


Abb. 53 A: Analyse der SMNrp::90k(1-174)-Bindung: 12.5%-iges SDS-Gel. GST-SMNrp (56 kDa), MBP (42 kDa), GST (26 kDa) und 90k(1-174) [23 kDa] laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte und sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, 2 bis 6: Negativkontrolle, 2: GST gebunden an Glutathion Sepharose, 3: nicht gebundenes MBP und 90k(1-174) [Durchfluss], 4 und 5: Waschfraktionen, 6: GST gebunden an Glutathion Sepharose, 8 bis 12: GST-SMNrp + MBP + 90k(1-174), 8: GST-SMNrp gebunden an Glutathion Sepharose, 9: nicht gebundenes MBP und 90k(1-174) [Durchfluss], 10 und 11: Waschfraktionen, 12: GST-SMNrp gebunden an Glutathion Sepharose.

Abb. 53 B: Analyse der SMNrp::90k-Bindung: 12.5%-iges SDS-Gel. 90k-His (90 kDa), GST-SMNrp (56 kDa), MBP (42 kDa) und GST (26 kDa) laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte und sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, 2 bis 6: Negativkontrolle, 2: GST gebunden an Glutathion Sepharose, 3: nicht gebundenes 90k-His und MBP (Durchfluss), 4 und 5: Waschfraktionen, 6: GST gebunden an Glutathion Sepharose, 8 bis 12: GST-SMNrp + MBP + 90k-His (Positivkontrolle), 8: GST-SMNrp gebunden an Glutathion Sepharose, 9: nicht gebundenes 90k-His und MBP (Durchfluss), 10 und 11: Waschfraktionen, 12: GST-SMNrp::90k-His-Komplex gebunden an Glutathion Sepharose.

Wie erwartet, interagiert 90k-His mit GST-SMNrp (Abb. 53 B, Spur 12). Dagegen bildet 90k(1-174) keinen Komplex mit GST-SMNrp (Abb. 53 A, Spur 12).

3.6.6 SMNrp::90k(175-426)-Interaktion

Aus der SDS-PAGE-Analyse wird ersichtlich, dass 90k(175-426) mit GST-SMNrp einen Komplex bildet (Abb. 54, Spur 6).

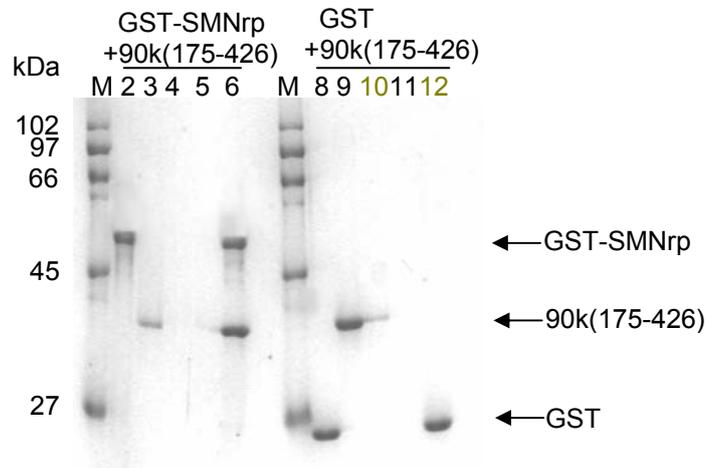


Abb. 54: Analyse der SMNrp::90k(175-426)-Bindung: 12,5%-iges SDS-Gel. GST-SMNrp (56 kDa), 90k(175-426) [33 kDa] und GST (26 kDa) laufen auf Höhe der zu erwartenden Molekulargewichte. Die rekombinanten Proteine sind mit Pfeilen markiert. M: SM-Marker, 2 bis 6: GST-SMNrp + 90k(175-426), 2: GST-SMNrp gebunden an Glutathion Sepharose, 3: nicht gebundenes 90k(175-426) [Durchfluss], 4 und 5: Waschfraktionen, 6: GST-SMNrp::90k(175-426)-Komplex gebunden an Glutathion Sepharose. 8 bis 12: Negativkontrolle, 8: GST gebunden an Glutathion Sepharose, 9: nicht gebundenes 90k(175-426) [Durchfluss], 10 und 11: Waschfraktionen, 12: GST gebunden an Glutathion Sepharose.

3.6.7 Zusammenfassung der Bindungsstudien

In Tab. 12 sind die Ergebnisse der Bindungsstudien zusammengefasst. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die von anderen Arbeitsgruppen gezeigten Komplexe 60k::90k und SMNrp::90k ebenfalls rekonstituiert werden. Zudem konnte die 20k::60k-Interaktion nachgewiesen und der Aminosäurebereich des 90k [90k(175-426)], der zur Bindung an SMNrp benötigt wird, eingegrenzt werden.

Tab. 12: Überblick der Bindungsstudien

Protein-Protein-Interaktion	Komplexbildung	Pufferzusätze	Abschnitt
20k::60k	+	-----	3.6.1
60k::90k	-	-----	3.6.2
60k::90k	+	10% Glycerin	3.6.2
SMNrp::90k	+	-----	3.6.3
SMNrp::90k(1-426)	+	-----	3.6.4
SMNrp::90k(1-174)	-	-----	3.6.5
SMNrp::90k(175-426)	+	-----	3.6.6

3.7 Kristallisation rekombinanter Proteine

Nachdem die spleißosomalen Proteine in großen Mengen in *E. coli* produziert und gereinigt wurden, wurden diese und zusätzlich die in Bindungsstudien gebildeten Komplexe für Kristallisationsversuche eingesetzt (Tab. 13).

Tab. 13: Verwendete Proteine und Proteinkomplexe

Protein	Abschnitt
MBP-60k	3.1.3
MBP-60k::20k	3.3.9
90k	3.3.7
90k(1-174) + MBP	3.4.2.1
90k(1-426)	3.4.5.1
90k(175-426)	3.4.6.1
SMNrp	3.2
SMNrp::90k	3.6.3
SMNrp::90k(1-426)	3.6.4
SMNrp::90k(175-426)	3.6.6

Nach ca. einem Monat fand sich eine aussichtsreiche Bedingung für MBP-60k (Abb. 55). In weiteren Versuchen konnten die Kristalle jedoch nicht reproduziert werden. Die Messung dieser Kristalle mit Hilfe eines Röntgendiffraktometers ergab keine Streuung.

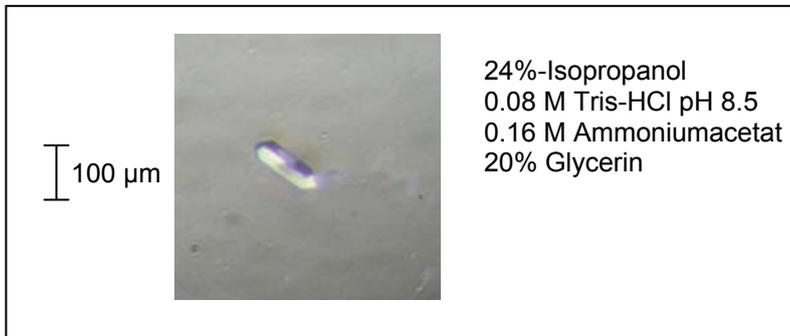
Abb. 55: Kristallisationsversuche des MBP-60k



Im Fall des 90k-His wurde nach 2 Wochen ein Ansatz gefunden, in dem sich ein Kristall gebildet hatte (Abb. 56). Nach der Messung mit Hilfe eines Röntgendiffraktometers stellte sich heraus, dass es sich hierbei um einen Salzkristall

handelt. Für die anderen Proteine und Proteinkomplexe zeigten sich keine aussichtsreichen Bedingungen.

Abb. 56: Kristallisationsversuche des 90k-His



4. Diskussion

In Eukaryonten bestehen Primärtranskripte aus kodierenden Sequenzen (Exons), die durch nicht kodierende Sequenzen (Introns) unterbrochen werden. Die Introns werden im Zellkern in einer Zweischrittreaktion durch das Spleißosom herausgeschnitten und die Exons anschließend miteinander ligiert (Abb. 1, KRÄMER, 1996). Während der Assemblierung der snRNPs wird der U4/U6*U5-snRNP-Komplex zum prä-Spleißosom rekrutiert (MAKAROV et al., 2002). Es wird angenommen, dass die Rekrutierung durch die Bindung des SMNrp an 90k erfolgt. 90k ist wiederum ein Teil des U4/U6-20k/60k/90k-Komplexes, der aus HeLa-Zellen frei von RNA als eine stabile Einheit isoliert werden konnte (HOROWITZ et al., 1997; MEISTER et al., 2001). Um die Funktion des humanen 60k, 90k und SMNrp besser verstehen zu können, ist es erforderlich, neben der Anwendung biochemischer Untersuchungen, die Struktur der Proteine mit Hilfe der Röntgenkristallographie zu lösen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die erwähnten Proteine in *E. coli* in mehreren Milligramm produziert, gereinigt und strukturell beschrieben werden. Die Struktur sollte Kenntnisse über die Domänenbeschaffenheit und folglich einen Aufschluss über die Funktion dieser Proteine während der Assemblierung des Spleißosoms geben. Obwohl diverse Kristallisationsversuche ergebnislos blieben (s. 3.7), konnten neben der Etablierung von Expressions- und Reinigungsprotokollen für 60k, 90k und 90k-Fragmente die in HeLa-Zellen gefundenen Komplexe rekonstituiert werden (s. 3.6). Zudem konnte die Bindung des 90k an SMNrp näher charakterisiert werden.

4.1 Rekonstitution des SMNrp::90k-Komplexes

90k umfasst 683 Aminosäuren und weist auf Proteinebene an Position 25-67 eine 50%-ige und an Position 213-260 eine 56%-ige Homologie zur RNaseIII aus *E. coli* auf. Zudem zeigt der C-Terminus (554-626) eine 40%-ige Homologie zur doppelsträngigen RNA-Bindungsdomäne der RNaseIII. Es wird angenommen, dass der 20k/60k/90k-Komplex über diese Domäne an die U4/U6-snRNA bindet (LAUBER et al., 1997; SUN et al., 2001; GONZALES-SANTOS et al., 2002). Am N-Terminus (3-76) weist 90k ein PWI-Motiv auf, das sich zu einem vier-Helix-Bündel faltet (Abb. 7). In Bindungsstudien wurde die Bindung des SRm160 über das PWI-Motiv an RNA gezeigt. Die beschriebene Bindung konnte auch anhand eines 90k-Fragments (2-94) mit einer ähnlich niedrigen Affinität (5-7 μM) nachgewiesen

werden (SZYMCZYNA et al., 2003). Daraus folgerten SZYMCZYNA et al. (2003), dass das PWI-Motiv während der Assemblierung des Spleißosoms transient an RNA-RNA- oder Protein-RNA-Interaktionen beteiligt ist. Bisher gibt es keine Hinweise über welche Aminosäuren das PWI-Motiv an die RNA bindet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass 90k über den Aminosäurebereich 1-174 ein Dimer bildet (s. 3.3.7, 3.4.2.1, 3.4.5.1 und 3.4.6.2). Daher wird vermutet, dass die Dimer-Bildung des 90k über das PWI-Motiv erfolgt. Des Weiteren wurde 90k im äquimolaren Verhältnis zu 60k und 20k im 20k/60k/90k-Komplex in HeLa-Zellen gefunden (HOROWITZ et al., 1997). Demzufolge könnte 90k als Dimer in diesem Komplex vorliegen und 60k und 20k jeweils an einem Monomer gebunden sein. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass 90k aus Stabilitätsgründen als Dimer vorliegt und erst während der Bildung des 20k/60k/90k-Komplexes zu einem Monomer dissoziiert.

SMNrp enthält eine zentrale Tudor-Domäne (Abb. 8) (TALBOT et al., 1998; MEISTER et al., 2001), die anhand der SMN-Proteine näher beschrieben worden ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Tudor-Domäne direkt an Arginin-Glycin (RG) reiche Bereiche (Abb. 57) der Sm-Proteine *in vitro* bindet (BÜHLER et al., 1999; SELENKO et al., 2001; SPRANGERS et al., 2003).

SmD1 90-K KREAVAGRGR GRGRGRGRGR GRGRGGPRR-119

SmD3 105-AQVAARGRGRGMGRGNIFQKRR-126

Abb. 57: SmD1 und SmD3 weisen eine Arginin-Glycin reiche Sequenz auf.

In Bindungsstudien hatten MEISTER et al. (2001) den SMNrp::90k-Komplex beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die erwähnte Bindung gezeigt und zusätzlich der Bindungsbereich des 90k eingegrenzt. Mit Ausnahme des 90k(1-174) interagierten 90k(1-426) und 90k(175-426) mit SMNrp. Im Fall des 90k(1-174) konnte keine Interaktion beobachtet werden, da dieser Bereich eine RNA-Bindungsdomäne enthält und für die Dimer-Bildung des 90k benötigt wird. Hingegen enthält 90k(175-426) kein bekanntes Motiv. Zudem weist 90k(175-426) im Vergleich zu Sm-Proteinen keine Glycin-Arginin reiche Sequenz auf (Abb. 58). Daher wird vermutet, dass die Bindung des SMNrp an 90k(175-426) über einen bisher unbekanntem Aminosäurebereich erfolgt. Außerdem wird angenommen, dass SMNrp über die Tudor-Domäne an ein weiteres Protein bindet.

175-SSQPER LPIGNTIQPS QAATFMNDAI EKARKAAELQ ARIQAQLALK PGLIGNANMV
 GLANLHAMGI APPKVELKDQ TKPTPLILDE QGRTV DATGK EIELTHRMP T LKANIRAVKR
 EQFKQQLKEK PSEDMESNTF FDP RVSIAPS QRQRRTFKFH DKGKFEKIAQ RLRTKAQLEK
 LQAEISQAAR KTG IHTSTRL ALIAPKKELK EGD IPEIEWW DSYIIPNGFD LTEENPKRED
 YFGITNLVEH PAQLNP-426

Abb. 58: Sequenz des 90k(175-426)-Fragmentes.

4.2 Rekonstitution des 60k::90k-Komplexes

60k weist wie das yPrp4-Ortholog aus *Saccharomyces cerevisiae* am C-Terminus einen Aminosäurebereich auf, der für ein WD-Motiv (Abb. 6) kodiert. Es faltet sich zu einem β -Propeller und ist am besten in der β -Untereinheit von G-Proteinen charakterisiert (DALRYMPLE et al., 1989; AYADI et al., 1998)

Die 60k::90k-Interaktion wurde anhand ihrer Orthologen yPrp4 und yPrp3 aus *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. 90k zeigt zu yPrp3 eine 33%-ige und 60k zu yPrp4 eine 44%-ige Homologie (HOROWITZ et al., 1997). Zur näheren Beschreibung der yPrp3::yPrp4-Bindung wurden, basierend auf der Struktur des β -Propellers, im yPrp4 Mutationen eingefügt. Mit Hilfe eines yeast-two-hybrid-Experimentes wurde gezeigt, dass die große Oberfläche des β -Propellers zur Bindung an yPrp3 benötigt wird (Abb. 59) (AYADI et al., 1998). Daher wird vermutet, dass die Interaktion des 60k::90k auf die gleiche Weise erfolgt.

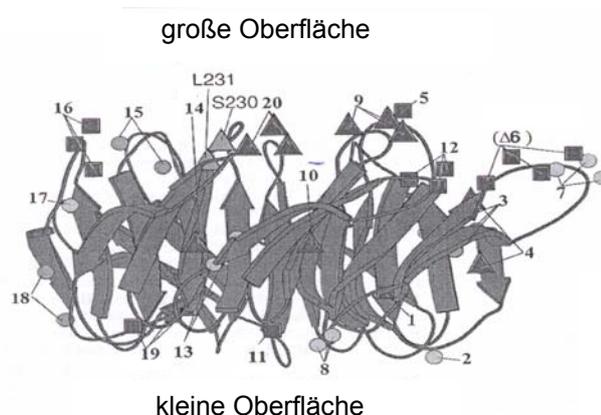


Abb. 59: Seitenansicht des β -Propellers der β -Untereinheit von G-Proteinen (AYADI et al., 1998). Die eingefügten Mutationen sind nummeriert.

In Bindungsstudien wurde von GONZALES-SANTOS et al. (2002) der 60k::90k-Komplex in Gegenwart eines Puffers, der 10 % Glycerin enthielt, rekonstituiert. Außerdem wurde gezeigt, dass 90k über den Aminosäurebereich 195-442, der kein bekanntes Motiv aufweist, mit 60k interagiert. Die Komplex-Bildung erfolgte mit Hilfe einer Immunpräzipitation. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der 60k::90k-Komplex analog zu GONZALES et al. (2002) rekonstituiert (s. 3.6.2). Zudem konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von Glycerin diese Komplexbildung nicht erfolgte. Als Ursache wird angenommen, dass Glycerin einen positiven Effekt auf die Faltung des 60k hatte (s. 3.6.2, 3.1.7 und 3.1.8).

4.3 Rekonstitution des 20k::60k-Komplexes

20k (177 Aminosäuren) gehört zur Familie der Cyclophiline, die abundant in jedem Organismus exprimiert werden (HOROWITZ et al., 2002). Es weist eine Cyclophilin typische Domäne auf, die aus einem β -barrel besteht (Abb. 4). Während der Proteinfaltung katalysieren Cyclophiline die cis-trans-Isomerisierung von Prolyl-Peptidbindungen und ändern dadurch die Konformation der Proteine (SCHREIBER und CRABTREE, 1992; LUBAN, 1996; IVERY, 2000; HOROWITZ et al., 2002). Da 20k eine Bindungstasche für Proline enthält (Abb. 5), wird vermutet, dass es bei Rearrangierungsereignissen während der Assemblierung des Spleißosoms beteiligt ist (HOROWITZ et al., 2002, REIDT et al., 2003). Im Gegensatz zu Cyclophilinen enthält 20k einen zusätzlichen Aminosäurebereich (48-62), der zur Bindung an 60k essentiell ist (REIDT et al., 2003).

Im 60k (521 Aminosäuren) und im humanen Prp18 (hPrp18, 342 Aminosäuren) wurde ein gemeinsames Epitop, das 31 Aminosäuren umfasst, mit einer Identität von 53% identifiziert. Diese Sequenz erstreckt sich bei 60k von Position 107-136 und bei hPrp18 von 83-112. Da *Saccharomyces cerevisiae* kein 20k-Ortholog aufweist und das yPrp18-Ortholog aus *Saccharomyces cerevisiae* die erwähnte Region nicht enthält, wurde angenommen, dass der 31 Aminosäuren umfassende Bereich des 60k essentiell zur 20k-Bindung ist. Die Interaktion des 31 Aminosäuren langen Peptids mit rekombinantem 20k konnte in Bindungsstudien beschrieben werden (HOROWITZ et al. 2002). Die Struktur des 20k mit dem U4/U6-60k-Peptid wurde von REIDT et al. (2003) gelöst (Abb. 5). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die direkte Bindung des Vollängen 60k an 20k gezeigt (s. 3.6.1, Abb. 49).

4.4 Modell des 20k/60k/90k::SMNrp-Komplexes

Anhand der Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen und der im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse wird das in Abb. 60 dargestellte Modell für den 20k/60k/90k::SMNrp-Komplex vorgeschlagen. So bindet 20k am N-Terminus des 60k, das wiederum über den β -Propeller mit 90k (Aminosäurebereich 195-442) interagiert. Des Weiteren bindet 90k über den Aminosäurebereich 175-426 an SMNrp und über die C-terminale, putative doppelsträngige RNA-Bindungsdomäne an U4/U6-snRNA. Zudem bindet SMNrp über die Tudor-Domäne an ein weiteres Protein.

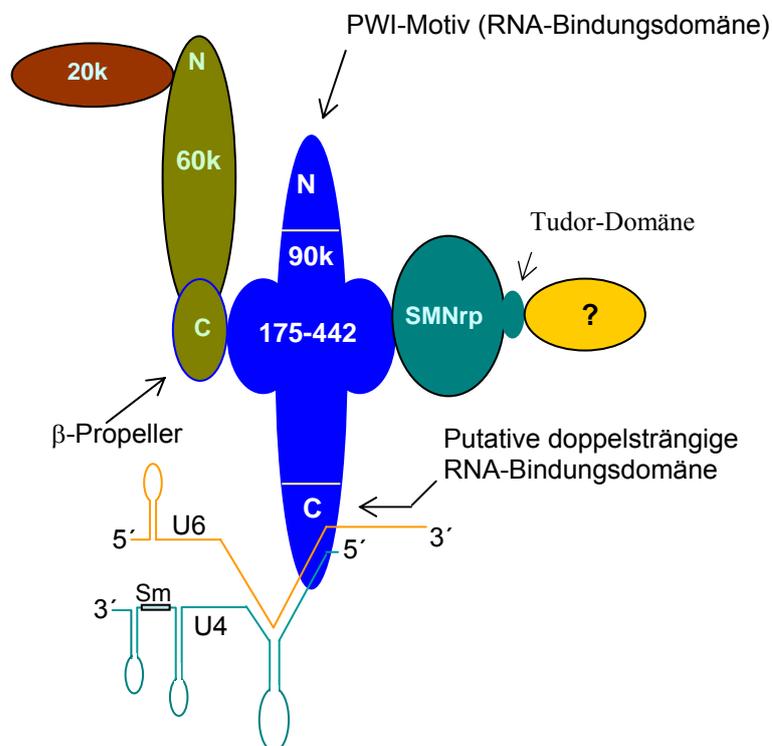


Abb. 60: Modell des 20k/60k/90k::SMNrp-Komplexes. N-Terminus (N), C-Terminus (C).

4.5 Kristallisationsversuche der Proteine und Proteinkomplexe

Die Bestimmung der Struktur eines Proteins auf atomarer Ebene kann mittels NMR-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance) oder der Röntgenkristallographie erfolgen. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie lässt sich die Struktur von Proteinen mit einem Molekulargewicht bis 30 kDa in einer Lösung bestimmen (BRANDEN et al., 1991; WIENCEK, 1999). Die Röntgenkristallographie ist zwar nicht durch das Molekulargewicht eines Proteins limitiert (KIM et al., 1989; MATTEVI et al., 1992; LUGER et al., 1997; KIERZEK und ZIELENKIEWICZ, 2001), aber es wird ein einziger, hoch geordneter dreidimensionaler Proteinkristall benötigt. So wurden 80% aller bisher publizierten Proteinstrukturen mit Hilfe der Röntgenkristallographie gelöst (KIERZEK und ZIELENKIEWICZ, 2001).

Das größte Hindernis in der Röntgenkristallographie ist das Wachstum von Proteinkristallen. Ein Grund ist, dass der Vorgang der Proteinkristallisation nicht ausreichend verstanden ist. Da es nicht möglich ist, eine Bedingung, in der ein Protein kristallisieren könnte, vorherzusagen, verwendet man anfangs so genannte „Initial Screens“. Diese basieren auf Bedingungen, in denen Proteine statistisch häufiger kristallisiert sind. In der Kristallisation können Parameter wie Proteinkonzentration, pH-Wert, Temperatur und Ionen-Konzentration verändert werden. Ein weiterer wichtiger Parameter ist das Protein selbst (DALE et al., 2003). So konnte die Kristallstruktur des Hitzeschock Proteins GroEL nur mit zwei Punktmutationen, die durch die PCR zufällig eingefügt wurden, gelöst werden (BRAIG et al., 1994). Im Fall der Poly(A)-Polymerase aus Rind konnte die Struktur erst gelöst werden, nachdem der C-Terminus verkürzt wurde (MARTIN et al., 2000). Ein weiteres Beispiel ist der DNA binding domain of DNA replication-related element-binding factor (DREF), der als GST-Fusionsprotein kristallisiert werden konnte (KUGE et al., 1997). Einige Proteine wie z.B. wie das beschriebene 20k (Abb. 4) (persönliche Mitteilung von U. Reidt) kristallisieren innerhalb einiger Tage während andere gar nicht kristallisieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für jedes Protein bzw. jeden Proteinkomplex (s. Tab. 13) bis zu 700 Bedingungen getestet, ohne verwertbare Proteinkristalle zu erhalten.

Rigide und stabile Proteine kristallisieren weitaus häufiger als Proteine, die flexible oder dynamische Domänen enthalten, weil sie eher dazu neigen ein Kristallgitter zu bilden (DALE et al., 2003). Eine weitere Voraussetzung zur Kristallbildung ist die richtige Faltung eines Proteins.

Aus der putativen Sekundärstrukturvorhersage des 90k geht hervor, dass es aus mehreren Domänen besteht (s. 3.4.1, Abb. 36 A). Um die Flexibilität des 90k mehr

einschränken zu können, wurden verkürzte Fragmente erzeugt und zusätzlich Komplexe mit SMNrp (s. 3.6.3, 3.6.4 und 3.6.6) hergestellt. Auch dieser Schritt führte nicht zur Kristallbildung.

Im Gegensatz dazu war MBP-60k nach der Affinitätsreinigung unspezifisch aggregiert (s. 3.1.7, 3.1.8). In einem Kristallisationsansatz wurden Kristalle gefunden, die in weiteren Versuchen nicht reproduziert werden konnten. Diese zeigten im Röntgenstrahl keine Streuung und lieferten kein verwertbares Ergebnis (s. 3.7). Auch die Bindung des 20k an MBP-60k konnte die unspezifische Aggregation nicht verhindern (s. 3.1.9, 3.7).

Im Fall des SMNrp wird vermutet, dass die Oberfläche des Proteins keine Protein-Protein-Kontakte zulässt, die eine Voraussetzung für die Kristallbildung sind.

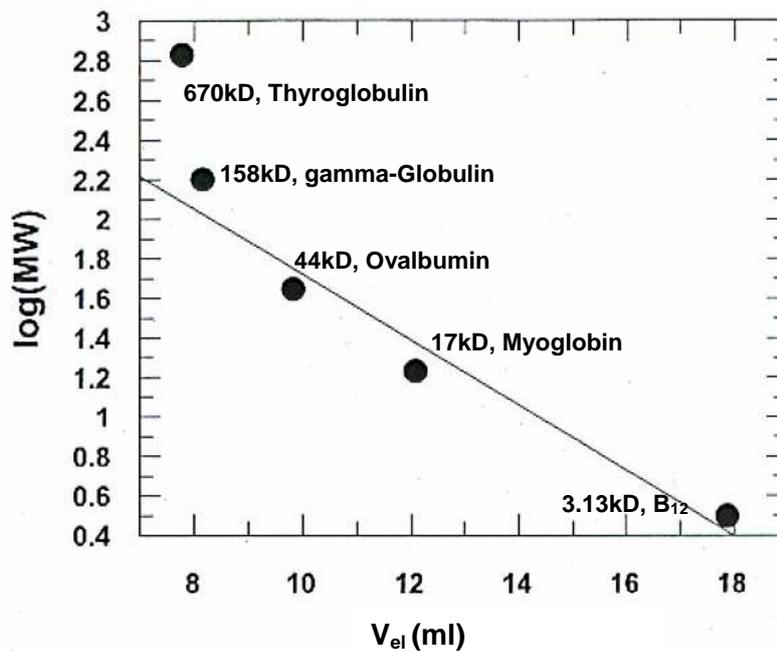
4.6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen für 60k, 90k und 90k-Fragmente jeweils ein Expressions- und Reinigungsprotokoll zu etablieren. Da Kristallisationsversuche mit diesen Proteinen und hergestellten Proteinkomplexen erfolglos blieben, sollten weitergehende Versuche erfolgen. Nach der Affinitätsreinigung war MBP-60k unspezifisch aggregiert. Mittels Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass die Aggregation des MBP-60k in Gegenwart von 10% Glycerin verhindert wird. In einem weiteren Versuch könnte die Reinigung des MBP-60k in Gegenwart von Glycerin erfolgen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Komplexe 20k/60k/90k, 60k/90k, SMNrp::90k und 20k/60k/90k::SMNrp mit und ohne U4/U6-snRNA zu rekonstituieren. Der im Rahmen dieser Arbeit gezeigte SMNrp::90k-Komplex könnte zusätzlich mit U4/U6-snRNA rekonstituiert werden. Außerdem könnte der in dieser Arbeit identifizierte Bereich (175-426) des 90k, der für die Interaktion mit SMNrp benötigt wird, weiter eingegrenzt werden. Zusätzlich können SMNrp-Fragmente hergestellt und diese auf die Interaktion mit 90k(175-426) untersucht werden.

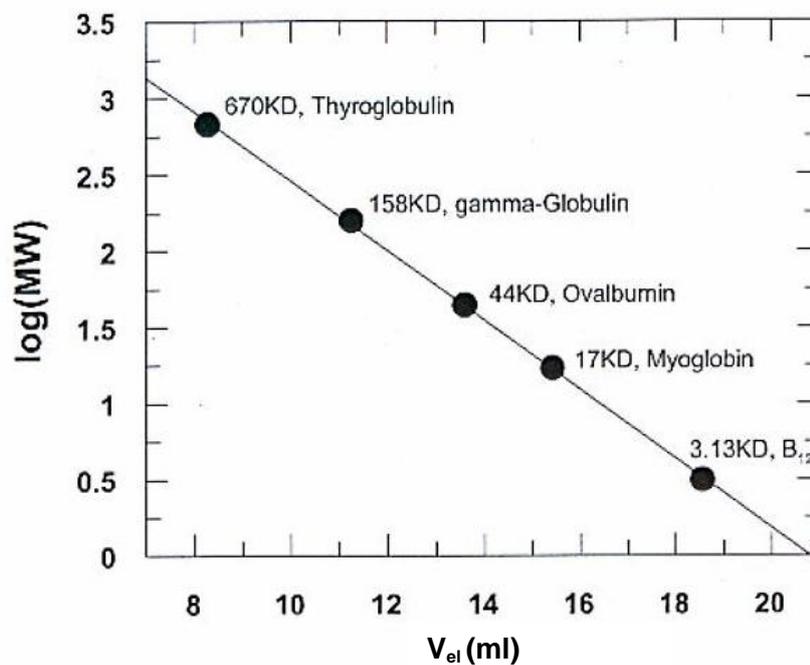
5. Anhang

Es sind die Eichgeraden einer Superdex 75-Säule (10/30) und einer Superdex 200-Säule (10/30) abgebildet. Der Logarithmus der Eichproteine ist gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Der Ausschlussbereich der Gelfiltrationssäulen liegt jeweils bei ca. 8 ml.

Kalibrierung einer Superdex 75-Säule (10/30)



Kalibrierung einer Superdex 200-Säule (10/30)



Es sind die Gen-Sequenzen des 90k und 60k wiedergegeben. Codons, die von *E. coli* selten verwendet werden, sind farbig dargestellt.

90k-Sequenz

1
atg gca ctg tca aag **agg** gag ctg gat gag ctg aaa cca tgg **ATA** gag aag
52
aca gtg aag **agg** gtc ctg ggt ttc tca gag cct acg gtg gtc aca gca gca
103
ttg aac tgt gtg ggg aag ggc atg gac aag aag aag gca gcc gat cat ctg
154
aaa cct ttt ctt gat gat tct act ctc **cga** ttt gtg gac aaa ctg ttt gag
205
gct gtg gag gaa ggc **cga** agc tct **agg** cat tcc aag tct agc agt gac **agg**
256
agc **aga** aaa **cga** gag **CTA** aag gag gtg ttt ggt gat gac tct gag atc tct
307
aaa gaa tca tca gga gta aag aag **cga** **cga** **ATA** **CCC** cgt ttt gag gag gtg
358
gaa gaa gag cca gag gtg atc cct ggg cct cca tca gag agc cct ggc atg
409
ctg act aag ctc cag atc aaa cag atg atg gag gca gca aca **cga** caa atc
460
gag gag **agg** aaa aaa cag ctg agc ttc att agc **CCC** cct aca cct cag cca
511
aag act cct tct tcc tcc caa cca gaa **cga** ctt cct att ggc aac act att
562
cag **CCC** tcc cag gct gcc act ttc atg aat gat gcc att gag aag gca **agg**
613
aaa gca gct gaa ctg caa gct **cga** atc caa gcc cag ctg gca ctg aag cca
664
gga ctc atc ggc aat gcc aac atg gtg ggc ctg gct aat ctc cat gcc atg
715
ggc att gct **CCC** ccg aag gtg gag tta aaa gac caa acg aaa cct aca cca
766
ctg atc ctg gat gag caa ggg cgc act gta gat gca aca ggc aag gag att
817
gag ctg aca cac cgc atg cct act ctg aaa gcc aat att cgt gct gtg aag
868
agg gaa caa ttc aag caa caa **CTA** aag gaa aag cca tca gaa gac atg gaa
919
tcc aat acc ttt ttt gac **CCC** **cga** gtc tcc att gcc cct tcc cag cgc cag
970
aga cgc act ttt aaa ttc cat gac aag ggc aaa ttt gag aag att gct cag
1021
cga tta cgg aca aag gct caa ctg gag aag **CTA** cag gca gag att tca caa
1072
gca gct **cga** aaa aca ggc atc cat act tcg act **agg** ctt gcc ctc att gct
1123
cct aag aag gag **CTA** aag gaa gga gat att cct gaa att gag tgg tgg gac
1174
tct tac **ATA** atc **CCC** aat ggc ttt gat ctt aca gag gaa aat **CCC** aag **aga**
1225
gaa gat tat ttt gga atc aca aat ctt gtt gaa cat cca gcc cag ctc aat
1276
cct cca gtt gac aat gac aca cca gtt act ctg gga gta tat ctt acc aag
1327
aag gaa cag aaa aaa ctt cgg **aga** caa aca **agg** **agg** gaa gca cag aag gaa
1378
CTA caa gaa aaa gtc **agg** ctg ggc ctg atg cct cct cca gaa **CCC** aaa gtg
1429
aga att tct aat ttg atg **cga** gta tta gga aca gaa gct gtt caa gac **CCC**
1480
acg aag gta gaa gcc cac gtc **aga** gct cag atg gca aaa **aga** cag aaa gcg
1531
cat gaa gag gcc aac gct gcc **cga** aaa ctc aca gca gaa cag **aga** aag gtc
1582
aag aaa att aaa aag ctt aaa gaa gac att tca cag ggg gta cac **ATA** tct
1633
gta tat **aga** gtt **cga** aat ttg agc aac cca gcc aag aag ttc aag att gaa
1684
gcc aat gct ggg caa ctg tac ctg aca ggg gtg gtg gta ctg cac aag gat
1735
gtc aac gtg gta gta gtg gaa ggg ggc **CCC** aag gcc cag aag aaa ttt aag

1786
 cgt ctt atg ctg cat cgg ATA aag tgg gat gaa cag aca tct aac aca aag
 1837
 gga gat gat gat gag gag tct gat gag gaa gct gtg aag aaa acc aac aaa
 1888
 tgt gta CTA gtc tgg gag ggt aca gcc aaa gac cgg agc ttt gga gag atg
 1939
 aag ttt aaa cag tgt cct aca gag aac atg gct cgt gag cat ttc aaa aag
 1990
 cat ggg gct gaa cac tac tgg gac ctt gcg ctg agt gaa tct gtg tta gag
 2041
 tcc act gat tga

60k-Sequenz

1
 atg gct tcc tgc cga gcc tct tcc acg gca acc aaa act aaa gca CCC gac
 52
 gac tta gtt gct ccg gtc gtg aag aaa cca cac atc tat tat gga agt ttg
 103
 gaa gag aag gag agg gag cgt ctg gcc aaa gga gag tct ggg att ttg ggg
 154
 aaa gac gga ctt aaa gca ggg atc gaa gct gga aat att aat ATA acc tct
 205
 gga gaa gtg ttt gaa att gaa gag cat atc agc gag cga cag gca gaa gta
 256
 ttg gct gag ttt gag aga agg aag cga gcc cgg cag atc aat gtt tcc aca
 307
 gat gac tca gag gtc aaa gct tgc ctt aga gcc ttg ggg gaa CCC atc aca
 358
 ctt ttt gga gag ggt cct gct gaa aga aga gaa agg tta aga aat atc ctc
 409
 tca gtt gtc ggt act gat gcc ttg aaa aag acc aaa aag gat gat gag aag
 460
 tct aag aag tcc aaa gaa gag tat cag caa acc tgg tat cat gaa gga cca
 511
 aat agc ttg aag gtg gca aga CTA tgg att gct aat tat tgc ttg CCC agg
 562
 gca atg aaa cgc ttg gaa gag gcc cga ctc cat aag gag att cct gag aca
 613
 aca agg acc tcc cag atg caa gag ctg cac aag tct ctc cgg tct ttg aat
 664
 aat ttt tgc agt cag att ggg gat gat cgg cct atc tcc tac tgt cac ttt
 715
 agt CCC aat tcc aag atg ctg gcc aca gct tgt tgg agt ggg ctt tgc aag
 766
 ctc tgg tct gtt cct gat tgc aac ctc ctt cac act ctt cga ggg cat aac
 817
 aca aat gta gga gca att gta ttc cat CCC aaa tcc act gtc tcc ttg gac
 868
 cca aaa gat gtc aac ctg gcc tct tgt gcg gct gat ggc tct gtg aag ctt
 919
 tgg agt ctc gac agt gat gaa cca gtg gca gat att gaa ggc cat aca gtg
 970
 cgt gtg gcg cgg gta atg tgg cat cct tca gga cgt ttc ctg ggc acc acc
 1021
 tgc tat gac cgt tca tgg cgc tta tgg gat ttg gag gct caa gag gag atc
 1072
 ctg cat cag gaa ggc cat agc atg ggt gtg tat gac att gcc ttc cat caa
 1123
 gat ggc tct ttg gct ggc act ggg gga ctg gat gca ttt ggt cga gtt tgg
 1174
 gac CTA cgc aca gga cgt tgt atc atg ttc tta gaa ggc cac ctg aaa gaa
 1225
 atc tat gga ATA aat ttc tcc CCC aat ggc tat cac att gca acc ggc agt
 1276
 ggt gac aac acc tgc aaa gtg tgg gac ctc cga cag cgg cgt tgc gtc tac
 1327
 acc atc cct gct cat cag aac tta gtg act ggt gtc aag ttt gag cct atc
 1378
 cat ggg aac ttc ttg ctt act ggt gcc tat gat aac aca gcc aag atc tgg
 1429
 acg cac cca ggc tgg tcc ccg ctg aag act ctg gct ggc cac gaa ggc aaa
 1480
 gtg atg ggc CTA gat att tct tcc gat ggg cag ctc ATA gcc act tgc tca
 1531
 tat gac agg acc ttc aag ctg tgg atg gct gaa tag

6. Zusammenfassung

1) Der U4/U6-20k/60k/90k-Komplex spielt eine bedeutende Rolle bei der Assemblierung des humanen Spleißosoms. Es wird vermutet, dass die Rekrutierung des U4/U6*U5-snRNP-Komplexes zum prä-Spleißosom durch die Bindung des SMNrp an 90k erfolgt. Zur Kristallisation wurden für 60k, 90k und 90k-Fragmente jeweils ein Expressions- und Reinigungsprotokoll etabliert. Diese wurden in *Escherichia coli* heterolog überexprimiert.

2) 90k wurde mit Hilfe eines N-terminalen His-tags bei 25 °C löslich exprimiert und gereinigt. Da die Ausbeute nicht zufrieden stellend war, wurde es als MBP-Fusionsprotein bei 30 °C produziert. Nach proteolytischer Spaltung wurde 90k bis zur Homogenität aufgereinigt.

3) Es wurden drei verkürzte Fragmente vom 90k (683 Aminosäuren) mittels PCR generiert und diese entsprechend der Anfangs- und Endposition der Aminosäuren benannt: 90k(1-174), 90k(1-426) und 90k(175-426). Diese Fragmente wurden als MBP-Fusionsproteine bei 30 °C exprimiert, affinitätsgereinigt und proteolytisch gespalten. Mit Ausnahme des 90k(1-174) konnten 90k(1-426) und 90k(175-426) weiter gereinigt werden.

4) 60k konnte als GST-Fusionsprotein bei 15 °C nur unlöslich exprimiert werden. Als MBP-Fusionsprotein war 60k zwar löslich aber unspezifisch aggregiert. Auch in Gegenwart des 20k konnte die unspezifische Aggregation nicht verhindert werden.

5) Ein weiteres 90k-bindendes Protein war SMNrp, das als GST-Fusionsprotein bei 30 °C exprimiert und gereinigt wurde. Durch proteolytische Spaltung konnte es vom GST getrennt werden.

6) Die gereinigten Proteine wurden anschließend für Bindungsversuche verwendet. Es konnten folgende Komplexe rekonstituiert werden: SMNrp::90k, SMNrp::90k(1-426), SMNrp::90k(175-426), 60k::90k, 60k::20K. Des Weiteren konnte der Bereich des 90k, der an SMNrp bindet, auf 251 Aminosäuren (175-426) eingegrenzt werden.

7) Abschließend wurden die Proteine und Proteinkomplexe für Kristallisationsversuche verwendet. Es wurden ausschließlich vom MBP-60k Kristalle erhalten, die zur Strukturaufklärung nicht brauchbar waren.

7. Literaturverzeichnis

Achsel T, Brahms H, Kastner B, Bachi A, Wilm M, Lührmann R, (1999): A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. EMBO, 18; 5789-5802

Adam SA, Nakagawa T, Swanson MS, Woodruff TK, Dreyfuss G: (1986): mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. Mol. Cell. Biol. 6, 2932-2943

Ayadi L., Callebaut I., Saguez C., Villa T., Mornon J. P., Banroques J., (1998): Functional and Structural Characterisation of the Prp3 Binding Domain of the Yeast Prp4 Splicing Factor. J. Mol. Biol., 284, 673-687

Birnboim HC, Doly J, (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res., 7; 1513-1523

Blencowe BJ, Ouzounis CA, (1999): The PWI motif: a new protein domain in splicing factors. Trends Biochem. Sci., 24; 179-180

Bradford MM, (1976): A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem., 72; 248-254

Braig K, Otwinowski Z, Hegde R, Boisvert D.C, Joachimiak A, Horwich AL, Sigler PB, (1994): The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. Nature 371; 578-586.

Branden C, Tooze J, (1991): Introduction to protein structure. New York: Garland. 302 pp.

Bühler D, Raker V, Lührmann R, Fischer U, (1999): Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 8; 2351-2357.

Colins CA., Guthrie C., (2000): The question remains: is the spliceosome a ribozyme? *Nat Struct Bio,* 7; 850-854

Cougot N, Dijk E, Babajko S, Seraphin B, (2004): Cap-tabolism, *Trends in Biochemical sciences.* Vol 29, No. 8.

Dale GE, Oefner C, D'Acry A, (2003): The protein as a variable in protein crystallization. *Journal of Structural Biology* 142; 88-97.

Dalrymple MA, Peterson-Bjorn S, Friesen JD, Beggs JD, (1989): The product of the PRP4 gene of *S. Cerevisiae* shows homology to beta subunits of G-proteins. *Cell.* 58; 811-812

Davis RW, Botstein D, Roth JR, (1980): *Advanced bacterial genetics: a manual for genetic engineering:* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA

Fischer U, Stumptner V, Sekine M, Satoh T, Lührmann R, (1993): Nucleocytoplasmic transport of U snRNPs: definition of a nuclear location signal in the Sm core domain that binds a transport receptor independently of the m3G cap. *EMBO,* 12; 573-583

Galat A., Reviere S., (1998): *Peptidyl-prolyl cis/trans Isomerases.* Oxford University Press, Oxford

Goldstrohm AC., Greenleaf AL., Garcia-Blanco MA., (2001): Co-transcriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing. *Gene,* 277; 31-47.

Gonzales-Santos JM, Wang A., Jones J., Ushida C., Liu J., Hu J., (2002): Central region of the human splicing factor Hprp3 interacts with Hprp4. *Biological Chemistry*, Vol. 277, No. 26; 23764-23772

Hastings M. L., Krainer A. R., (2001): Pre-mRNA splicing in the new millenium. *Current Opinion in Cell Biology*, 13:302-309

Horowitz D. S., Kobayashi R., Krainer A. R., (1997): A new cyclophilin and the human homologues of the yeast Prp3 and Prp4 form a complex associated with U4/U6 snRNPs. *RNA*, 3:1374-1387

Horowitz D. S., Lee E., Mabon S.A., Misteli T. (2002): A cyclophilin functions in pre-mRNA splicing . *EMBO Journal*, Vol. 21, No. 3, 470-480

Hu J., Xu Y., Schappert K., Harrington T., Wang A., Braga R., Mogridge J., Friesen J. D., (1994): Mutational analysis of the Prp4 protein of *Saccharomyces cerevisiae* suggests domain structure and snRNP interactions. *Nucleic Acids Res*, 22(9):1724-34

Hunter T., (1998): Prolyl isomerases and nuclear function. *Cell*, 92; 141-143

Ivery MT, (2000): Immunophilins: switched on protein binding domains? *Med. Res. Rev.* 20; 452-484

Jurica MS, Moore MJ, (2002): Capturing splicing complexes to study structure and mechanism. *Methods* 28; 336-345

Kierzek AM, Zielenkiewicz P, (2001): Models of protein crystal growth. *Biophysical Chemistry*, 91; 1-20

Kim SS, Smith TJ, Chapman MS et al., (1989): Crystal structure of human rhinovirus serotype A (HRV1A), *J. Mol. Biol.* 210 (1); 91-111

Krämer A., 1996: The Structure and function of proteins involved in mammalian pre-RNA splicing. Annual review Biochem; 65; 367-409

Kuge M, Fujii Y, Shimizu T, Hirose F, Matsukage A, Hakoshima T, (1997): Use of the fusion protein to obtain crystals suitable for X-ray analysis: crystallization of a GST-fused protein containing the DNA-binding domain of DNA replication-related element-binding factor, DREF. Prot. Sci. 6; 1783-1786

Kühn U, Wahle E, (2004): Structure and function of poly-(A) binding proteins. Biochimica et Biophysica Acta 1678, 67-84

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lamm GM., Blencowe BJ, Sproat BS, Iribarren AM, Ryder U, Lammond AI, (1991): Antisense probes containing 2-aminoadenosin allow efficient depletion of U5 snRNP from HeLa splicing extracts. Nucleic Acids Res, 19; 3193-3198

Lauber J., Plessel G., Prehn S., Will C. L., Fabrizio P., Gröning K., Lane W.S., Lührmann R., (1997): The human U4/U6 snRNP contains 60 and 90kD proteins that are structurally homologues to the yeast splicing factors Prp4p and Prp3p. RNA , 3:926-941

Legrain P., Seraphin B, Rosbach M, (1988): Commitment of yeast pre-mRNA to the spliceosome pathway does not require U2 snRNP. Mol. Cell Biol., Vol. 8; 3755-3760

Luban J, (1996): Absconding with the chaperone: essential cyclophilin-GAG interaction in HIV virions. Cell, 87; 1157-159

Luger K, Mader AW, Richmond, D.F. Sargent, Richmond TJ, (1997): Crystal structure of the cubic core of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389 (6648) 251-260

Makarov E. M., Makarova O. V., Urlaub H., Genzel M., Will L. C., Wilm M., Lührmann R., (2002): Small Nuclear Ribonucleoprotein Remodeling During Catalytic Activation of the Spliceosome. *Science*, Vol. 298, 2205-2208

Maroney PA, Romfo CM, Nilsen TW, (2000): Functional recognition of the 5' splice site by U4/U6*U5 tri-snRNP defines a novel ATP dependent step in early spliceosome assembly. *Mol. Cell*, 6; 317-328

Marks AR, (1996): Cellular functions of immunophilins. *Physiol. Rev.*, 76; 631-649

Marmur J, (1961): A procedure for the isolation of desoxyribonucleic acid from microorganism. *J. Biol. Chem.*, 53, 159-162

Martin G, Keller W, Doublie S, (2000): Crystal structure of mammalian poly(A) polymerase in complex with an analog of ATP. *EMBO J.* 19; 4193-4203

Mattevi A, Obmolova E, Schulze et al., (1992): Atomic structure of the cubic core of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex *Science*. 255 (5051), 1544-1550.

Mayers AE, Verdone L, Legrain P, Beggs JD, (1999): Characterisation of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *EMBO*, 18; 4321-4331

McCracken S., Lamberman M., Blenvowe B. J., 2001: SRm160 Splicing Coactivator Promotes Transcript 3'-End Cleavage. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 22, 148-160

McCracken S., Longaman D., Johnstone I. L., Caceres J. F., Blencowe B. J. (2003): An Evolutionary Conserved Role for SRm160 in 3'-end Processing That Functions Independently of Exon Junction Complex Formation. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, No. 24, 44153-44160

Meister G., Hannus S., Plöttner O., Baars T., Hartmann E., Fakan S., Laggerbauer B., Fischer U., (2001): SMNrp is an essential pre-mRNA splicing factor required for the formation of the mature spliceosome. *EMBO*, Vol. 20, No. 9, 2304-2314

Michaud S., Reed R. (1991): An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway. *Genes, Dev.* 5; 2534-2546)

Nagai K., Muto Y. Pomeranz Kummel D.A., Kambach C., Ignjatovic T., Walke S., Kuglstattler A. (2001): Structure and Assembly of fhte Spliceosomal snRNPSs. *Biochemical Society*, Vol. 29, part 2

Neubauer G., King A., Rappsilber J., Calvio C., Watson M., Ajuh P., Sleeman J., Lamond A., Mann M. (1998): Mass spectrometry and EST-database searching allows characterisation of the multi-protein spliceosome complex. *Nature genetics*, Vol. 20, 46-50

Nilsen TW, (1998): RNA-RNA interactions in nuclear pre mRNA splicing. In Simons RW and Grunberg-Manago M (eds), *RNA structure and function*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 279-307

Nottrott S., Urlaub H., Lührmann R. (2002): Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. *EMBO Journal*, Vol. 21, No. 20, 5527-5538

Panonne BK, Xue D, Wolin, SL, (1998): A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La Protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. EMBO, 17; 7442-7453

Patel AA., Steitz JA., (2003): Splicing double: Insights from the second spliceosome. Molecular cell biology, Vol. 4, 960-970

Rappsilber J., Ajuh P., Angus I. L., Mann M., (2001): SPF30 Is an Essential Human Splicing Factor Required for Assembly of the U4/U5/U6 Tri-small Nuclear Ribonucleoprotein into the Spliceosome. Journal of Biological Chemistry, Vol. 276, No. 33, 31142-31150

Reidt U., Wahl M. C., Fasshauer D., Horowitz D. S., Lührmann R., Ficner R., (2003): Crystal Structure of a Complex Between Human Spliceosomal Cyclophilin H and a U4/U6 snRNP-60k Peptide. J. Mol. Biol., 331, 45-56

Richarme G, (1982): Associative properties of the Escherichia coli galactose binding protein and maltose binding protein. Biochem. Biophys. Res. Comm. 105

Sachs AB, Bond MW, Kornberg RD (1986): A single gene of yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate -binding proteins: domain structure and expression. Cell, 45; 827-835

Salgado-Garido J, Bragado-Nilsson E, Kandels-Lewis S, Sepharin B, (1999): Sm and Sm-like proteins in two related complexes of deep evolutionary origin. EMBO, 18; 3451-3462

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T, (1989): Molecular Cloning: a laboratory manual (2. Auflage). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

Sanger F, Nickler S, Coulson AR, (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74; 5463-5467

Schreiber SL, Crabtree GR, (1992):The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. Immunol. Today. 13; 136-142

Selenko P., Spangers R., Stier G., Bühler D., Fischer U., Sattler M., (2001): SMN Tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. Nature Structural Biology, Vol. 8, No. 1, 27-31

Seraphin B, Rosbach M, (1989): Identification of functional U1 snRNP-pre mRNA complexes committed to spliceosome assembly and splicing. Cell, 59; 349-358

Shatkin AJ., Manley JL., (2000): The ends of the affair: capping and polyadenylation. Nat. Struct. Biol, 7; 838-842

Sprangers R, Groves MR, Sinning I, Sattler M, (2003): High resolution X-ray and NMR structures of the SMN tudor domain: Conformational variation in the binding site for symmetrically dimethylated arginine residues. J. Mol. Biol. 327; 507-520.

Staley JP., Guthrie C., (1998): Mechanical Devices of the spliceosome: motors, clocks, springs and things. Cell, Vol 92, 315-326

Stevens S. W., Abelson, (1999): Purification of the yeast U4/U6·U5 small nuclear ribonucleoprotein particle and identification of its proteins. Vol. 96, Issue 13, 7226-7231

Sun W, Jun E, Nicholson AW, (2001): Intrinsic double-stranded processing activity of Escherichia coli ribonuclease III lacking the dsRNA-binding domain. Biochemistry, 40; 14976-14984

Szymczyna B. R., Bowman J., McCracken S., Pinedia-Lucena A., Lu Y., Cox B., Lambermon M., Graveley B. R., Arrowsmith C. H., Blencowe B. J., (2003): Structure and function of the PWI motif: a novel nucleic acid-binding domain that facilitates pre-mRNA processing. *Genes & Development*, Vol. 17, 461-475

Talbot K., Miguel-Aliaga I., Mohaghegh P., Ponting C. P., Davies K. E., (1998): Characterization of a gene encoding Survival Motor Neuron (SMN)-related protein, a constituent of the spliceosome complex. *Human Molecular Genetics*, Vol.7, No. 13, 2149-2156

Teigelkamp S., Achsel T., Mundt C., Gohtel S. F., Cronshagen U., Lane W. S., Marahiel M., Luhrmann R., (1998): The 20kD protein of human [U4/U6·U5] tri-snRNPs is a novel cyclophilin that forms a complex with the U4/U6-specific 60kD and 90kD proteins. *RNA*, 4(2): 127-41

Vidal VP, Verdone L, Mayers AE, Beggs JD, (1999): Characterisation of U6 snRNA-protein interactions. *RNA*, 5; 1470-1481

Wang A., Forman-Kay J., Luo Y., Luo M., Chow YH., Plumb J., Friesen J. D., Tsui L. C., Heng H. H. Q., Woolford J. L., Jr and Hu J, (1997): Identification and characterisation of human genes encoding Hprp3p and Hprp4p, interacting components of the spliceosome. *Human Molecular Genetics*. Vol. 6, No.12, 2117-2126

Wienczek JM, (1999): New strategies for protein crystal growth. *Annual Rev. Eng.* 01; 505-534

Will LW., Lührmann R., (2001): Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Current Opinion in Cell Biology*, 13:290-301

Xue D, Rubinson DA, Pannone BK, Yoo CJ, Wolin SL, (2000): U snRNP assembly in yeast involves the La protein. *EMBO*, 19; 1650-1660

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. R. Ficner danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, seinem Interesse am Fortgang der Arbeit und für die Möglichkeit zum selbständigen wissenschaftlichen Arbeiten.

Herrn Prof. Dr. G. H. Braus danke ich, für die Bereitschaft sich als Korreferent zur Verfügung zu stellen.

Herrn Dr. E. A. Dickmanns danke ich für die wertvollen Tipps bezüglich experimenteller Arbeiten.

Zusätzlich danke ich Herrn Dr. M. G. Rudolph für die hilfreichen Tipps bezüglich der Proteinreinigung.

Außerdem möchte mich für das nette Arbeitsklima und die lustigen Augenblicke besonders bei folgenden Personen bedanken: Johanna Arnorsdottir, Annette Berndt, Simone Brauns, Chrissoula Greulich, Angela Kopp, Carmen Steinke, Winfried Lendeckel, Peter Thomas Naumann und Oliver Schiewek. Zudem bedanke ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für die angenehme Atmosphäre.

Außerdem möchte ich mich für das Korrekturlesen bei Dr. A. E. Dickmanns, Prof. Dr. O. Einsle, Carmen Steinke, Frau A. Feiertag und Peter Thomas Naumann bedanken.

Ein zusätzlicher Dank geht an Peter Thomas Naumann für die schönen, spannenden und nervenaufreibenden Tischfußball-(Kicker)-Stunden.

Den Mitgliedern der Werkstatt danke ich für die schnelle Hilfe bei allen anfallenden technischen Problemen. Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Familie und bei meiner Freundin Magdalena für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

Lebenslauf

21. September 1972	geboren in Göttingen
1978-1981	Grundschule Alexandroupolis (Griechenland)
1981-1984	Grundschule Göttingen
1984-1986	Orientierungsstufe Göttingen
1986-1990	Realschule Göttingen
1990-1993	Otto-Hahn-Gymnasium Göttingen
Juni 1993	Abitur
November 1993	Immatrikulation an der Georg-August Universität Göttingen für das Fach Biologie
Oktober 1995	Vordiplom in den Fächern Molekulare Genetik, Zoologie, Anorganische Chemie und Physikalische Chemie
März-Juli 1998	Bayer AG, Leverkusen
Februar 1999	Diplom in den Fächern Molekulare Genetik, Immunologie und Organische Chemie
März 1999-Juni 2000	Diplomarbeit mit dem Thema: Heterologe Expression und Charakterisierung von α -Expansinen Bayer AG, Leverkusen
August-November 2000	Bayer AG, Leverkusen
Juni-Oktober 2000	Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen
Seit Oktober 2001	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation