

Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zum m₃G-Cap-vermittelten Kernimport spleißosomaler U snRNPs durch Snurportin1

Dissertation

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

vorgelegt von
Anja Strasser
aus Ludwigshafen am Rhein

Göttingen 2004

D7

Referent: Herr Prof. Dr. R. Ficner
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie
Institut für Mikrobiologie & Genetik
Georg-August-Universität Göttingen

Koreferent: Herr Prof. Dr. S. Irninger
Abteilung für Molekulare Mikrobiologie & Genetik
Institut für Mikrobiologie & Genetik
Georg-August-Universität Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2005

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	NUKLEOZYTOPLASMATISCHER TRANSPORT.....	1
1.2	DAS SPLEIBOSOM UND DER SPLEIBVORGANG.....	5
1.3	DIE BIOGENESE SPLEIBOSOMALER U SNRNPS.....	7
1.3.1	M ⁷ G-CAP ABHÄNGIGER EXPORT DER SNRNAs INS ZYTOPLASMA.....	8
1.3.2	AUFBAU DER SNRNP-CORE-STRUKTUR UND HYPERMETHYLIERUNG DES M ⁷ G-CAP.....	10
1.3.3	KERNIMPORT MODIFIZIERTER SPLEIBOSOMALER UNTEREINHEITEN.....	14
1.4	IMPORTIN β ALS MULTIFUNKTIONELLER KERNIMPORTREZEPTOR.....	16
1.5	DER KERNIMPORTADAPTER SNURPORTIN 1.....	18
1.6	ZIELSETZUNG.....	19
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	20
2.1	MATERIAL.....	20
2.1.1	GROßGERÄTE.....	20
2.1.2	CHROMATOGRAPHIESÄULEN.....	20
2.1.3	FEINCHEMIKALIEN.....	20
2.1.4	ENZYME UND INHIBITOREN.....	21
2.1.5	DNA OLIGONUKLEOTIDE.....	21
2.1.6	MODIFIZIERTE RNA OLIGONUKLEOTIDE.....	22
2.1.7	PLASMIDE.....	22
2.1.8	GENBANKEN.....	22
2.1.9	VERWENDETE ORGANISMEN.....	22
2.1.10	VERWENDETE KIT-SYSTEME.....	22
2.1.11	KRISTALLISATIONSSCREENS.....	23
2.1.12	COMPUTERPROGRAMME.....	23
2.2	METHODEN.....	24
2.2.1	MOLEKULARBIOLOGISCHE UND MIKROBIOLOGISCHE METHODEN.....	24
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
2.2.1.2	Ortsgerichtete Mutagenese.....	25
2.2.1.3	DNA Sequenzierung.....	25
2.2.1.4	DNA Restriktionsverdau.....	26
2.2.1.5	Dephosphorylierung von Plasmiden am 5'-Ende.....	26

2.2.1.6	DNA Ligation	26
2.2.1.7	Agarosegelelektrophorese	27
2.2.1.8	DNA-Isolierung aus Agarosegelen	27
2.2.1.9	Plasmidpräparationen	27
2.2.1.10	Präparation chemisch kompetenter Bakterienstämme	28
2.2.1.11	Transformation von Plasmid DNA	28
2.2.2	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	29
2.2.2.1	Zellkultivierung und –aufschluß	29
2.2.2.2	Affinitätschromatographie	29
2.2.2.2.1	Glutathion-S-transferase	30
2.2.2.2.2	Heparin	30
2.2.2.2.3	IMAC (Ni ²⁺ NTA-Sepharose)	30
2.2.2.3	Ausschlußchromatographie	31
2.2.2.4	Umkehrphasenchromatographie	31
2.2.2.5	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.2.2.6	Proteolytische Spaltungen	33
2.2.2.6.1	PreScission Protease	33
2.2.2.6.2	GluC Protease	33
2.2.2.7	Perchlorsäurefällung	33
2.2.3	IN VITRO KERNIMPORTASSAY	34
2.2.4	RÖNTGENKRISTALLOGRAPHISCHE METHODEN	35
2.2.4.1	Proteinkristallisation	35
2.2.4.1.1	Seeding - Experimente	35
2.2.4.1.2	Kryo - Bedingungen	36
2.2.4.1.3	Soaking - Experimente	36
2.2.4.2	Datensammlung	36
2.2.4.3	Phasenbestimmung und Berechnung der Elektronendichteverteilung	37
2.2.4.4	Modellbau und Strukturverfeinerung	39
2.2.5	SPEKTROSKOPISCHE METHODEN	40
2.2.5.1	Absorption	40
2.2.5.1.1	Berechnung nativer molarer Extinktionskoeffizienten	40
2.2.5.1.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Nukleinsäuren	41
2.2.5.1.3	Absorptionsspektren	42
2.2.5.2	Fluoreszenz	42
2.2.5.2.1	Emissions- und Anregungsspektren	42
2.2.5.2.2	Gleichgewichtstitrationen zur Bestimmung von Bindungskonstanten	43

3	ERGEBNISSE	45
3.1	STRUKTURBESTIMMUNG UND -ANALYSE DER M₃G-CAP-BINDENDEN DOMÄNE VON SNURPORTIN1 IM KOMPLEX MIT M₃GPPP	45
3.1.1	KRISTALLISATIONSVERSUCHE VON SPN1 ALLEINE, IM KOMPLEX MIT IMPORTIN β UND / ODER M ₃ G-CAP	45
3.1.2	KRISTALLISATION DER M ₃ G-CAP-BINDENDEN DOMÄNE VON SPN1 MIT M ₃ G-CAP OLIGO UND KRISTALLANALYSE	46
3.1.3	DATENAUFNAHME UND -PROZESSIERUNG	49
3.1.4	MULTIPLER ISOMORPHER ERSATZ (MIR)	51
3.1.5	MODELLBAU, STRUKTURVERFEINERUNG UND QUALITÄT DES MODELLS	52
3.1.6	BESCHREIBUNG DER STRUKTUR	55
3.1.6.1	Die Cap-Bindungsstelle	56
3.1.6.2	Oberflächenladungsverteilung	59
3.2	BINDUNGSSTUDIEN VERSCHIEDENER CAP-VARIANTEN MIT SPN1WT	60
3.2.1	EIGENFLUORESCENZ UND ABSORPTIONSVERHALTEN VON SPN1WT UND DER METHYLIERTEN CAP-VARIANTEN	60
3.2.2	BESTIMMUNG VON DISSOZIATIONSKONSTANTEN ÜBER FLUORESCENZTITRATION	63
3.2.3	REGENERATION DER VERSCHIEDENEN CAP-ANALOGA ÜBER UMKEHRPHASENCHROMATOGRAPHIE	66
3.3	BINDUNGSBEITRAG DER AMINOSÄUREN IN DER BINDUNGSTASCHE	67
3.3.1	KLONIERUNG UND REINIGUNG VERSCHIEDENER TRYPTOPHAN-MUTANTEN	67
3.3.2	EIGENFLUORESCENZ UND ABSORPTIONSVERHALTEN DER TRYPTOPHAN-MUTANTEN	68
3.3.3	BINDUNGSBEITRAG VON TRP 276 UND TRP 107	70
3.3.3.1	Fluoreszenzemission	70
3.3.3.2	<i>In vitro</i> Importassay	71
3.4	FUNKTIONALITÄT DES ORTHOLOGEN SNURPORTIN1 AUS C. ELEGANS	73
3.4.1	KLONIERUNG, EXPRESSION UND REINIGUNG	74
3.4.2	TRANSPORTAKTIVITÄT	77
3.4.3	KRISTALLISATIONSVERSUCHE IN AN- UND ABWESENHEIT VON M ₃ GPPP	78
3.5	INTERAKTIONSTUDIEN UND KRISTALLISATIONSVERSUCHE DER IMPORTIN β-BINDENDEN (IBB) DOMÄNE VON SPN1 MIT IMPORTIN β	78
3.5.1	KLONIERUNG ZWEIER VARIANTEN DER IBB-DOMÄNE VON SPN1	78
3.5.2	EXPRESSION UND REINIGUNG VON IMPORTIN β UND DER IBB-DOMÄNEN	79
3.5.3	INTERAKTIONSNACHWEIS ÜBER AUSSCHLUßCHROMATOGRAPHIE	81
3.5.4	KRISTALLISATIONSVERSUCHE DER IBB-IMPORTIN β KOMPLEXE	82

4	<u>DISKUSSION</u>	84
4.1	KRISTALLISATION DER M ₃ G-CAP-BINDENDEN DOMÄNE VON SPN1 MIT GEBUNDEMEM M ₃ GPPP M ₃ GPPP.....	85
4.2	SEKUNDÄRSTRUKTURVERGLEICH MIT DEM „MRNA CAPPING ENZYME“.....	86
4.3	BASENSTAPELUNG ALS OPTIMALE INTERAKTIONSFORM FÜR CAP-BINDENDE PROTEINE... 4.3.1 CAP-BINDUNG ÜBER „KATIONEN- π -INTERAKTION“.....	88
4.3.2	DISKRIMINIERUNG MONOMETHYLIERTER CAP-OLIGONUKLEOTIDE DURCH SPN1.....	90
4.3.3	KONFORMATIONEN DER CAP-ANALOGA IM ZUSAMMENHANG MIT BINDUNGS-AFFINITÄTEN.....	92
4.3.4	VERGLEICH STRUKTURELL ANALYSierter CAP-BINDUNGSTASCHEN.....	94
4.4	BINDUNGSBEITRAG VON TRP 276 UND TRP 107 UND DEREN ROLLE BEIM KERNIMPORT SPLEIBOSOMALER USNRNPs.....	98
4.5	CAP-BINDUNG UND DER SNRNP-IMPORT IN HÖHEREN EUKARYOTEN.....	100
4.6	KONKURRENZ ZWISCHEN EIF4E UND SPN1 UM TRIMETHYLIERTE RNAs IN C. ELEGANS.....	102
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	105
6	<u>SUMMARY</u>	106
7	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	107
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	110
9	<u>ANHANG</u>	120
9.1	HERLEITUNG DER FUNKTION ZUM KURVENANGLEICH DER TITRATIONSMEBPUNKTE.....	120
9.2	KOORDINATEN DES M ₃ GPPP-CAP DINUKLEOTIDES.....	122
9.3	PARAMETER- UND TOPOLOGIEDATEIEN.....	123
10	<u>DANKSAGUNG</u>	134

1 Einleitung

In allen Eukaryoten ist der Transport von Makromolekülen zwischen Zytoplasma und Nukleus ein essentieller zellulärer Prozeß. Eine ungewöhnlich hohe Anzahl von Transportsubstraten wird zwischen beiden Kompartimenten ausgetauscht. Diese Kompartimentierung der Zelle ermöglicht eine Trennung von einzelnen Vorgängen komplexer Prozesse, wie z.B. der Genexpression und Signaltransduktion. Der Kerntransport findet durch Kernporenkomplexe (*nuclear pore complex*; NPC) statt; einer der größten makromolekularen Komplexe der Zelle mit einem Molekulargewicht von ca. 125 MDa in höheren Eukaryoten (Fahrenkrog *et al.*, 2001). Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von 50 MDa oder 40 nm Durchmesser passieren die Kernpore, welche einen Innendurchmesser von 50 nm aufweist. Ionen und teilweise auch Makromoleküle bis 40 kDa können den NPC durch passive Diffusion durchqueren, während größere Moleküle, oder solche die einem Gradienten über die Kernmembran unterliegen, nur über signalvermittelten aktiven Transport die Kernpore passieren können (Görlich & Kutay, 1999).

1.1 Nukleozytoplasmatischer Transport

Der aktive Kerntransport ist rezeptorvermittelt; das Transportsubstrat interagiert über ein Kernimport- (NLS) oder Kernexportsignal (NES) entweder direkt mit einem Transportrezeptor, welcher mit der Kernpore wechselwirkt, oder sie benötigen einen Transportadapter, der seinerseits mit dem Transportrezeptor interagiert. Transportrezeptoren interagieren beim Durchtritt des NPC über FG-Bindungsstellen mit *FG-Repeats* (FxFG) der Nukleoporine (Bednenko *et al.*, 2003; Cronshaw *et al.*, 2002; Rout *et al.*, 2000).

Es werden zur Zeit drei Klassen von Transportrezeptoren unterschieden (Weis, 2003). Die größte Gruppierung stellt die Familie der Karyopherin β -($\text{Kap } \beta$)-verwandten Transportfaktoren dar (Tabelle 1). Mehr als 20 Mitglieder dieser Familie werden durchschnittlich in einer eukaryotischen Zelle exprimiert und bewerkstelligen den Im- und Export verschiedenster Transportsubstrate (RNA und Proteine; Abbildung 1) entweder durch direkte Bindung des Transportsubstrates oder über einen Transportadapter (Görlich & Kutay, 1999; Lei & Silver, 2002; Macara, 2001; Mattaj & Englmeier, 1998; Ström & Weis, 2001;

Weis, 2002). Die Mitglieder dieser Familie sind für den Transport eines Großteiles der Transportsubstrate zuständig und werden auch als Importine und Exportine bezeichnet. Die zweite Klasse wird durch den kleinen Kerntransportfaktor NTF2 (*nuclear transport factor 2*) repräsentiert, welcher für den Kernimport der kleinen GTPase Ran zuständig ist (Abbildung 2) (Ribbeck *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998).

Tabelle 1: Proteine der Importin β Familie und deren Transportsubstrate in höheren Eukaryoten.

Transportfaktoren	Transportsubstrate
Importine	
Importin β (Karyopherin β , p97)	NLS-tragende Proteine zusammen mit Importin α (Görlich & Kutay, 1999); m ₃ G-Cap tragende U snRNPs zusammen mit SPN1 (Huber <i>et al.</i> , 1998); XRIP α (Jullien <i>et al.</i> , 1999). Virale Proteine (Truant & Cullen, 1999); Cyclin B1 (Moore <i>et al.</i> , 1999; Takizawa <i>et al.</i> , 1999); Ribosomale Proteine (Jäkel & Görlich, 1998); Smad-Proteine (Xiao <i>et al.</i> , 2000); Tyrosinphosphatase (T-Zellen) (Tiganis <i>et al.</i> , 1997).
Transportin 1 (Karyopherin β 2, importin β 2)	hnRNP Proteine (A1, F) (Pollard <i>et al.</i> , 1996; Siomi <i>et al.</i> , 1997); Ribosomale Proteine (Jäkel & Görlich, 1998).
Transportin-SR(2)	Proteine mit SR-Domäne (Kataoka <i>et al.</i> , 1999; Lai <i>et al.</i> , 2000).
Importin 5 (RanBP5, Karyopherin β 3)	Ribosomale Proteine (Jäkel & Görlich, 1998).
Importin 7 (RanBP7)	Histon H1 zusammen mit Importin β (Jäkel <i>et al.</i> , 1999); Ribosomale Proteine (Jäkel & Görlich, 1998); HIV Reverser Transkriptionskomplex über Bindung an Integrase (Fassati <i>et al.</i> , 2003).
Importin 11	UbcM2 (Plafker & Macara, 2000).
Importin 13	Ubc9 und RBM8, eIF1A (Mingot <i>et al.</i> , 2001).
Exportine	
Exportin 1 (Crm1, XPO1)	NES tragende Proteine (Fornerod <i>et al.</i> , 1997; Fukuda <i>et al.</i> , 1997; Hakata <i>et al.</i> , 1998; Ossareh-Nazari <i>et al.</i> , 1997; Stade <i>et al.</i> , 1997; Yang <i>et al.</i> , 1998; Zhu & McKeon, 1999); m ⁷ G-Cap tragende U snRNAs (Ohno <i>et al.</i> , 2000); Snurportin 1 (Paraskeva <i>et al.</i> , 1999); I κ B α (Sachdev <i>et al.</i> , 2000).
CAS	Importin α (Hood & Silver, 1998; Kunzler & Hurt, 1998; Kutay <i>et al.</i> , 1997; Solsbacher <i>et al.</i> , 1998).
Exportin-t	tRNA (Arts <i>et al.</i> , 1998; Hellmuth <i>et al.</i> , 1998; Kutay <i>et al.</i> , 1998).
Exportin 4	eIF5A (Lipowsky <i>et al.</i> , 2000).

Obwohl NTF2 lediglich Ran in seiner GDP gebundenen Form importiert, ist die Anzahl der zu transportierenden RanGDP-Moleküle immens. In einer Säugerzelle werden innerhalb einer Minute mehrere Millionen Moleküle der kleinen Ras-verwandten GTPase importiert. Die dritte Familie an Transportrezeptoren ist am Kernexport von mRNA beteiligt. Der mRNA-Exportkomplex besteht in höheren Eukaryoten aus einer großen konservierten (TAP/NXF) und einer kleinen NPC-assoziierten Untereinheit (p15/NXT) (Conti & Izaurralde, 2001; Reed & Hurt, 2002).

Die drei vorgestellten Gruppen an Kerntransportrezeptoren weisen keinerlei Sequenzhomologien auf und sind demnach wahrscheinlich unabhängig voneinander entstanden.

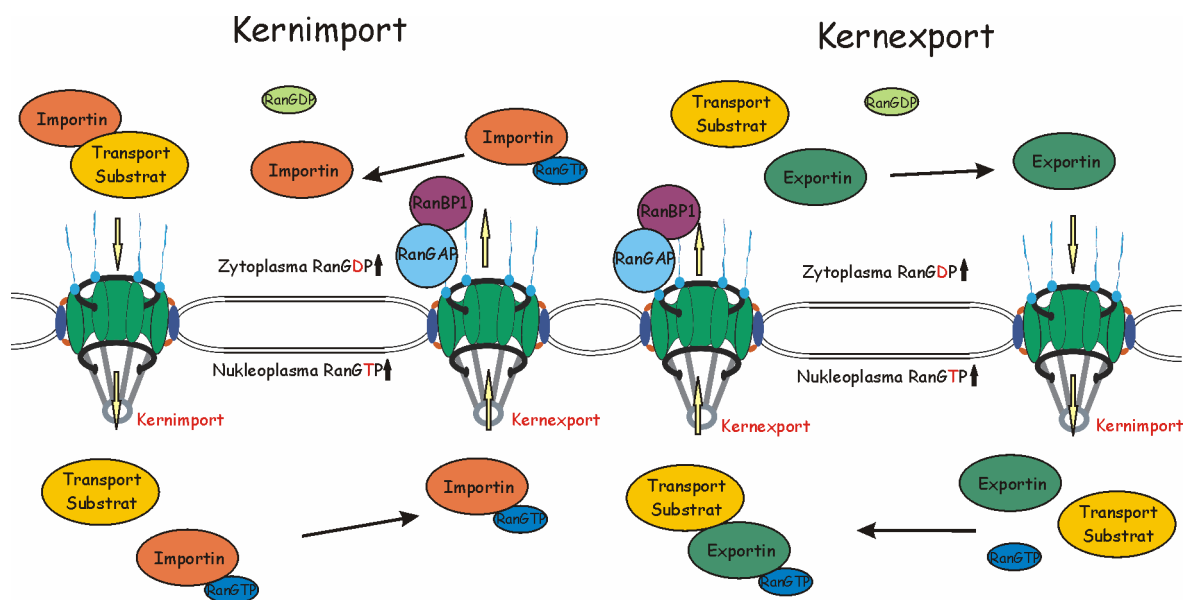


Abbildung 1: Kerntransportzyklen in Abhängigkeit von Ran. Der Kernimport ist auf der rechten Bildseite und der Kernexport auf der linken Hälfte dargestellt. Abkürzungen: *Ran-GTPase activating protein* (RanGAP); *Ran binding protein 1* (RanBP1).

Da Kernim- und export entweder gegen einen Konzentrationsgradienten stattfinden, wie beispielsweise der Import spleißosomaler Untereinheiten, oder aber streng reguliert werden müssen, wie z.B. der Transport von Transkriptionsfaktoren, sind diese Transportprozesse mit einem energieverbrauchenden System gekoppelt. Im Fall der Importine und Exportine der Karyopherin β -Familie ist der Kerntransport durch die kleine GTPase Ran reguliert (Abbildung 1) (Görllich & Kutay, 1999; Lei & Silver, 2002; Macara, 2001; Mattaj & Englmeier, 1998; Weis, 2002). Bindung und Freisetzung des Transportsubstrates werden über eine asymmetrische Verteilung zweier nukleotidgebundener Zustände von Ran

kontrolliert, dem sogenannten RanGTP-Gradienten. Ran kommt in einer GTP- und GDP-gebundenen Form vor, wobei die Umwandlung beider Formen in Abwesenheit von zusätzlichen Faktoren sehr langsam stattfindet. Der Austausch von GDP gegen GTP wird durch den Ran Guanin Nukleotid Austauschfaktor (RanGEF) RCC1 katalysiert, welcher nur im Zellkern vorliegt. Hydrolyse von RanGTP findet hingegen lediglich im Zytoplasma statt und wird durch das *RanGTPase activating protein* (RanGAP) im Komplex mit RanBP1 und/oder RanBP2 katalysiert. Beide RanBPs fördern die GTP-Hydrolyse durch RanGAP auch unabhängig voneinander (Braslavsky *et al.*, 2000). RanBP2 ist Teil der zytoplasmatischen Filamente des NPC (Mahajan *et al.*, 1997; Matunis *et al.*, 1996), wodurch RanGAP und auch RanBP1 hauptsächlich am Kernporenausgang vorliegen. RCC1 liegt im Komplex mit Nukleosomen (H2A/B) vor (Nemergut *et al.*, 2001) und ist dadurch an das Chromatin gebunden. Des Weiteren interagiert RCC1 auch mit RanBP3, das den Nukleotidaustausch an Ran zusätzlich beschleunigt. Dieser RanGTP-Gradient wird aufrechterhalten, indem jedes Molekül RanGDP, was durch ein NTF2-Dimer in den Zellkern transportiert wird (Ribbeck & Görlich, 2001; Ribbeck *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998) durch RCC1 phosphoryliert wird und RanGTP nach dessen Kernexport durch RanGAP/RanBP1/2 dephosphoryliert wird (Abbildung 2).

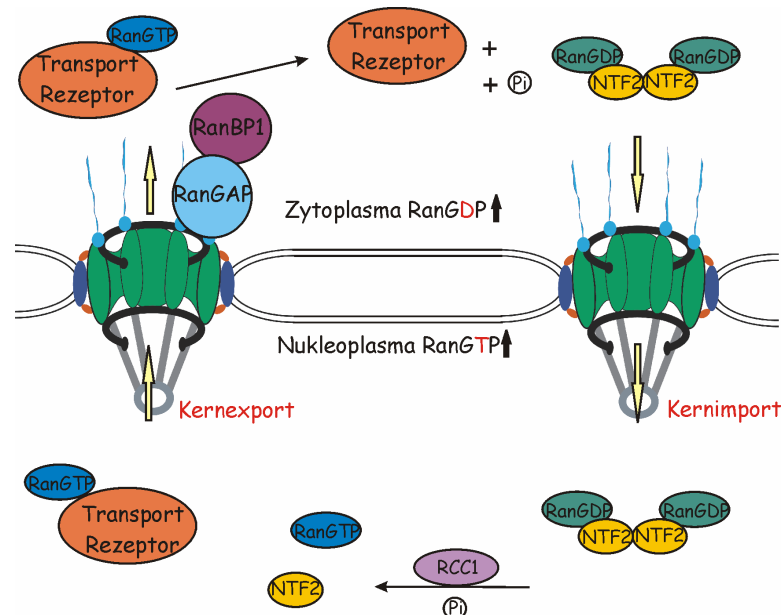


Abbildung 2: Ran-Zyklus. Dargestellt ist die Regulierung des Gleichgewichtes der GTPase Ran. Abkürzungen: *Ran-GTPase activating protein* (RanGAP); *Ran binding protein 1* (RanBP1); *Guanine nucleotide exchange factor* (RCC1); *Nuclear transport factor 2* (NTF2).

Die ungleiche Verteilung der zwei Ran-Formen bestimmt die Lokalisation der Transportfaktoren und ist notwendig und ausreichend für den gerichteten Transport durch die Kernpore. Importine binden ihre Transportsubstrate im Zytoplasma und setzen sie, nach erfolgtem Import, bei RanGTP-Bindung im Nukleus frei. Der substratfreie Importin-RanGTP Komplex verläßt den Nukleus und dissoziiert bei Dephosphorylierung von RanGDP. Im Gegensatz dazu binden Exportine ihre Transportsubstrate ausschließlich in Anwesenheit von RanGTP im Zellkern. Im Zytoplasma dissoziiert der Transportkomplex, sobald RanGTP dephosphoryliert wird (Abbildung 1).

Neben seiner entscheidenden Rolle im nukleozytoplasmatischen Transport wurden mehrere Funktionen der GTPase Ran während der Mitose, teilweise in Interaktion mit Importin β und beim Wiederaufbau der Kernmembran nach der Zellteilung gefunden (Carazo-Salas *et al.*, 1999; Gruss *et al.*, 2001; Hetzer & Mattaj, 2000; Kalab *et al.*, 1999; Wiese *et al.*, 2001; Zhang & Clarke, 2000).

1.2 Das Spleißosom und der Spleißvorgang

In eukaryotischen Zellen werden mRNAs als prä-mRNAs transkribiert, deren kodierende Exone durch nicht-kodierende Intronbereiche getrennt sind. Vor dem Export werden die Introns durch das Spleißosom, einem Ribonukleoprotein-Komplex, entfernt.

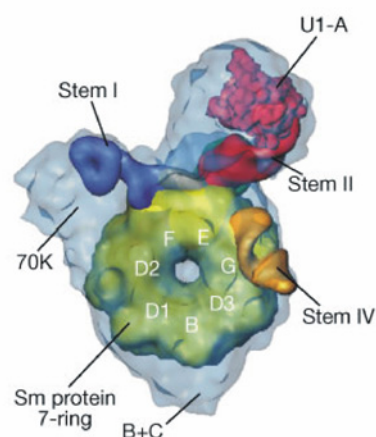


Abbildung 3: Aufbau des U1 snRNP-Partikels. Der Aufbau des U1 snRNPs wurde durch Elektronenmikroskopie näher untersucht. Sowohl die Anordnung der 4 *Stem-Loop* Regionen der snRNA, als auch der Sm-Protein-Ring und die assemblierten Proteine A, 70k, B und C sind gezeigt (Stark *et al.*, 2001).

Es wurden zwei verschiedene Formen des Spleißosoms entdeckt, das *major spliceosome* (Hauptspleißosom) und das *minor spliceosome* (Nebenspleißosom) (Burge *et al.*, 1999).

Ersteres ist für die Entfernung von Typ-U2 Introns zuständig, die in einem Großteil der prä-mRNAs enthalten sind und letzteres entfernt Typ-U12 Introns, die sehr selten in mRNAs vorkommen. Das *major spliceosome* setzt sich hauptsächlich aus fünf kleinen nukleären Ribonukleoproteinpartikeln, den U1, U2, U4, U5 und U6 snRNPs und etlichen nicht-spleißosomalen Proteinen zusammen (Hartmuth *et al.*, 2002). Jeder U snRNP-Partikel besteht aus einer U snRNA und je 7 sogenannten Sm-Proteinen (B/B', D1, D2, D3, E, F, G), wobei das U6 snRNP stark homologe Lsm-Proteine bindet. Darüberhinaus bindet jeder U snRNP-Partikel zusätzliche partikelspezifische Proteine (Will & Lüthmann, 2001)

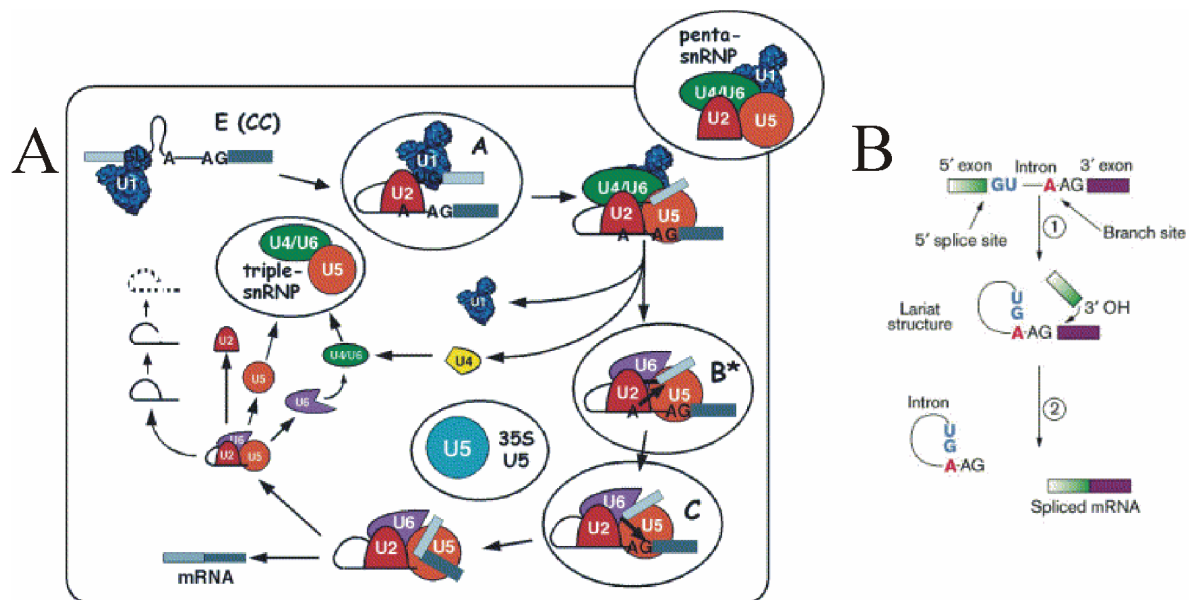


Abbildung 4: Spleißen von U2-Typ Introns durch das Hauptspleißosom. (A) Dargestellt ist die Assemblage der uridylreichen spleißosomalen Untereinheiten U1, U2, U4, U5, und U6 an ein Typ U2-Intron und deren Umlagerung während des Spleißens. Ebenso ist die Freisetzung der mRNA und einzelner Untereinheiten, sowie deren Wiedergewinnung gezeigt. (B) Umlagerung der mRNA während des Spleißprozesses und die Freisetzung sowohl der geschnittenen mRNA, als auch des Intron-Lariats (Jurica & Moore, 2003; Newman, 1998).

Der Struktur des U1 snRNP-Partikels wurde über Elektronenmikroskopie analysiert (Abbildung 3) (Stark *et al.*, 2001). Deutlich zu sehen sind die 4 *Stem-Loop* Regionen der snRNA, welche von der *four way junction* abzweigen, die Ringstruktur der 7 Sm-Proteine und die U1-spezifischen Proteine U1A, 70k und U1B/C. Die Assemblage des Spleißosoms wird durch die Interaktion des U1 snRNP mit der 5' Schnittstelle und des U2 snRNP mit der Verzweigungsstelle im Intron initiiert, wodurch der prä-spleißosomale

Komplex A entsteht (Abbildung 4) (Makarov *et al.*, 2002). An Komplex A bindet der zuvor assemblierte U4/U6/ U5 tri-snRNP Partikel. SnRNAs der Partikel U4 und U6 gehen in diesem tri-snRNP Basenpaarungen ein. Das gereifte Spleißosom, welches nun als Komplex B bezeichnet wird, enthält alle beteiligten U snRNPs und wandelt sich durch Umlagerungen der Partikel zum aktivierten Spleißosom um. Bei diesen Umlagerungen verlassen U1 und U4 snRNP das Spleißosom, wodurch die U6 snRNA Basenpaarungen mit der U2 snRNA und der 5' Schnittstelle eingehen kann.

Das aktivierte Spleißosom (Komplex B*) katalysiert daraufhin die erste Umesterung, wodurch der Komplex C entsteht. Nach dem zweiten Schneiden wird die intronlose mRNA in Form eines Lariats entlassen und das Spleißosom, welches das geschnittene Intron und U2, U5, und U6 snRNPs enthält, zerfällt. Die snRNPs werden daraufhin wiedergewonnen und nehmen an einer weiteren Reaktion teil. Geschnittene und prozessierte mRNAs werden ins Zytoplasma transportiert und translatiert.

1.3 Die Biogenese spleißosomaler U snRNPs

Während der Biogenese von U snRNAs zu gereiften U1, U2, U4 und U5 snRNPs müssen die U snRNAs ins Zytoplasma und die U snRNPs nach der Reifung zurück in den Zellkern transportiert werden, wo sie wahrscheinlich in *cajal bodies* funktionell assemblieren (Sleeman *et al.*, 2001; Sleeman & Lamond, 1999). Nach der Transkription, dem Transfer eines 5'-terminalen m⁷G-Cap und der Modifikation des 3'-Terminus werden die m⁷G-snRNAs ins Zytoplasma exportiert. Im Zytoplasma assemblieren 7 Sm-Proteine mit der snRNA und sowohl der 5'-, als auch der 3'-Terminus werden erneut modifiziert. Das 3'-Ende wird gekürzt und das monomethylierte m⁷G-Cap am 5'-Ende wird dimethyliert zu einem m₃G-Cap. Nach dem Reimport der snRNP-*Core*-Komplexe werden diese im Nukleus erneut modifiziert, um eine Anlagerung spezifischer Proteine zu gewährleisten. Während beider Transportprozesse übernimmt die Cap-Struktur der snRNAs eine Signalfunktion, wodurch der Transport vermittelt wird. Die Biogenese von U snRNPs aus höheren Eukaryoten wird in diesem Abschnitt näher erklärt.

1.3.1 m^7G -Cap abhängiger Export der snRNAs ins Zytoplasma

Die Transkription der U snRNAs findet im Nukleus statt. U1, U2, U4 und U5 snRNAs werden analog zu mRNAs durch die RNA-Polymerase II synthetisiert (Hernandez, 2001) und die primären Transkripte an beiden Enden modifiziert.

Zunächst wird ein 5'-terminales Guanodin-Cap über eine 5'-5'-Triphosphatbindung angehängt, wodurch ein GpppA/G-Cap entsteht (Coppola *et al.*, 1983; Shatkin, 1976).

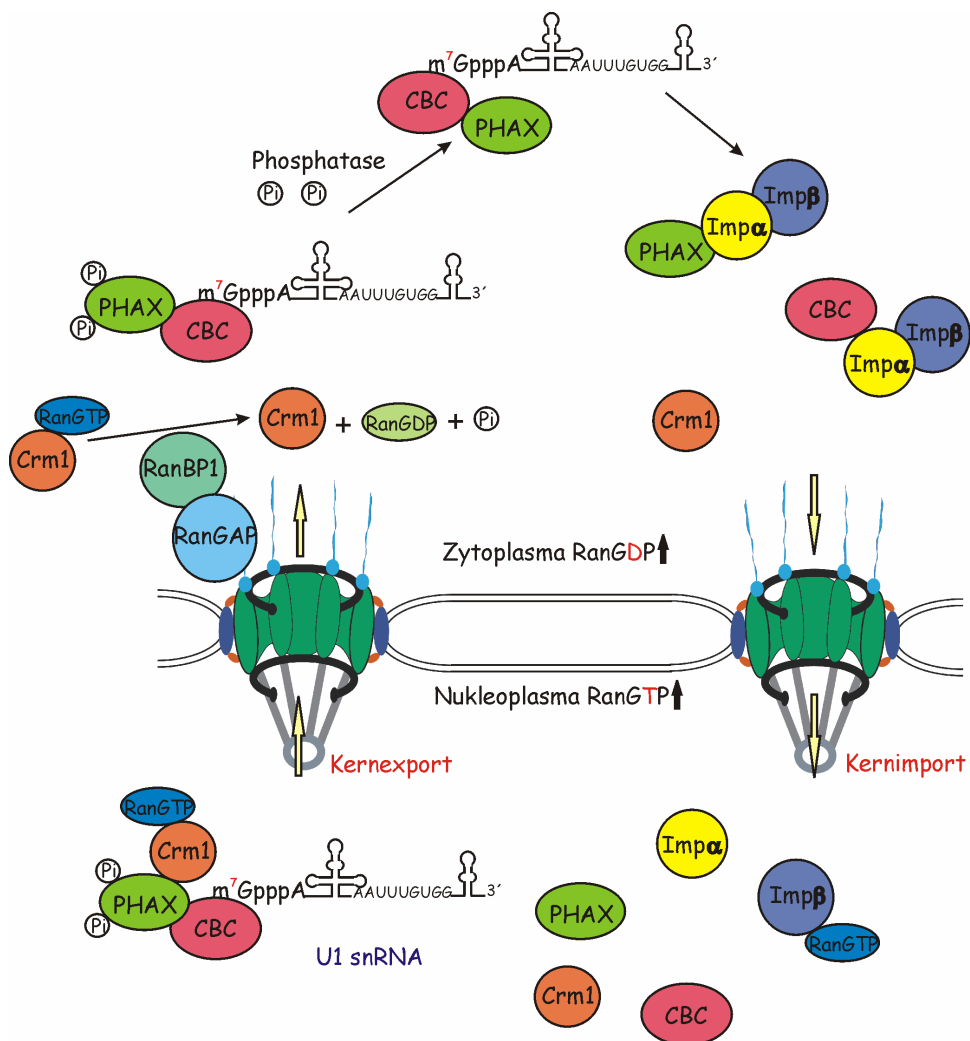


Abbildung 5: Kernexport m^7G -Cap tragender snRNAs am Beispiel von U1 snRNA. Dargestellt ist der Export der transkribierten und modifizierten snRNA und das Recycling der beteiligten Transportfaktoren. Abkürzungen: *Chromosome region maintenance 1* (Crm1); *Cap binding complex* (CBC); *Phosphorylated adapter for RNA export* (PHAX); *Importin α* (Imp α); *Importin β* (Imp β); *Ran-GTPase activating protein* (RanGAP); *Ran binding protein 1* (RanBP1).

Dieser Schritt wird durch eine Triphosphatase und eine Guanylyltransferase katalysiert. Nachfolgend wird durch eine Methyltransferase eine Methylgruppe an die Position N7 der 5'-terminalen Guaninbase angehängt (Shuman, 2002). Die drei genannten Enzyme sind Teil eines Proteinkomplexes, welcher das 5'-Ende aller RNA-Polymerase II Transkripte bereits während der Transkription modifiziert (Salditt-Georgieff *et al.*, 1980). Das m⁷G-Cap schützt die RNA vor 5'-terminalem Abbau durch Exonukleasen (Furuichi *et al.*, 1977) und ist wichtig für den U snRNA-Export (Shatkin, 1976).

Das m⁷G-Cap von U snRNAs und mRNAs wird durch den *Cap Binding Complex* (CBC) spezifisch erkannt (Ohno *et al.*, 1990). CBC ist ein Heterodimer aus *Cap Binding Protein 20* (CBP20) und 80 (CBP80), dessen Bildung wichtig für die Bindung des Cap an CBP20 an das m⁷G-Cap von mRNAs zu sein scheint (Izaurrealde *et al.*, 1995; Izaurrealde *et al.*, 1994). CBP20 ist Teil einer Proteinfamilie, die „RNP-Motive“ oder „RNA Erkennungsmotive“ enthält. Die Kristallstruktur des CBP20 mit gebundenem m⁷G-Cap zeigt eine stabile Interaktion zweier Tyrosinreste mit der methylierten Base (Calero *et al.*, 2002; Mazza *et al.*, 2002).

Die U snRNAs werden als prä-U snRNAs mit unterschiedlich langen 3'-Enden transkribiert. Deren Prozessierung am 3'-Ende findet sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma statt. Die 3'-Modifizierungen sind von einer 3'-Box, die 3'-terminal von der kodierenden Sequenz lokalisiert ist, abhängig. Die C-terminale Domäne der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II wird für diese Modifikationen benötigt (Jacobs *et al.*, 2004; Medlin *et al.*, 2003; Uguen & Murphy, 2003). Das 5'-Cap fördert die Modifikationen am 3'-Ende (Uguen & Murphy, 2004), wodurch die Vermutung erhärtet wird, daß der gebundene CBC wie auch bei mRNAs an der 3'-Prozessierung beteiligt ist (Flaherty *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zu den U1, U2, U4 und U5 snRNAs wird die U6 snRNA durch die RNA-Polymerase III transkribiert (Krol *et al.*, 1987; Kunkel *et al.*, 1986; Reddy *et al.*, 1987) und erhält ein γ -Monomethyltriphosphat-Cap an seinem 5'-Ende. Die Reifung der U6 snRNA findet ausschließlich im Nukleus statt. Die U6 snRNA assembliert mit einem heptameren Ring bestehend aus Sm-ähnlichen Proteinen, den LSm-Proteinen. Es wurden acht LSm-Proteine identifiziert, und die Lokalisation der U6 snRNP Partikel hängt von der Zusammensetzung des LSm-Ringes ab. Wenn die snRNA mit LSm 1-7 assembliert vorliegt, nimmt das reife U6 snRNP an der Spleißreaktion teil, während LSm 2-8 tragende snRNPs in zytoplasmatischen Ansammlungen gefunden wurden. Die zytoplasmatische Form des

U6 snRNP liegt dort neben dem *decapping enzyme* hDcP1/2 und der Exonuklease hXrn1 vor; beides sind Schlüsselfaktoren bei der mRNA-Degradation, wobei wahrscheinlich auch das U6 snRNP eine Rolle spielt (Ingelfinger *et al.*, 2002).

Zur weiteren Reifung der U1, U2, U4 und U5 snRNPs müssen diese ins Zytoplasma exportiert werden (Abbildung 5). Interessanterweise vermittelt CBC die Interaktion mit dem Exportfaktor Crm1/Xpo1 (*Chromosome region maintenance I/Exportin I*) nicht direkt. Phosphoryliertes PHAX (*Phosphorylated adapter for RNA export*) vermittelt die Bindung zwischen CBC-U snRNA und Crm1 (Ohno *et al.*, 2000; Segref *et al.*, 2001), indem es über eine Leucin-reiche NES durch Crm1/RanGTP (*Ras-related nuclear antigen*) gebunden wird. Crm1 gehört zur Importin β -Familie (Tabelle 1), deren Mitglieder alle NPC-, Ran- und Transportsubstratbindedomänen aufweisen (Chaillan-Huntington *et al.*, 2000; Fornerod *et al.*, 1997; Görlich *et al.*, 1997). Die Direktionalität des Transportes wird durch den Ran-Gradienten gewährleistet (1.1). Die Hydrolyse des GTP durch RanGAP im Komplex mit RanBP1 und RanBP2 (Nup358) führt zum Zerfall des hexameren Transportkomplexes (Abbildung 1 und Abbildung 2). Die Dephosphorylierung von PHAX fördert die Freisetzung der Exportfaktoren. Dennoch bleiben PHAX und CBC zunächst an der snRNA gebunden. Lediglich die Bindung des Importin α /Importin β -Heterodimers löst die Interaktionen, da sowohl PHAX als auch CBC durch den Importin α /Importin β -Komplex in den Zellkern transportiert werden (Görlich *et al.*, 1996; Segref *et al.*, 2001). Ran wird durch NTF2 in den Zellkern transportiert, während Crm1 ohne Importrezeptoren in den Nukleus gelangt (Abbildung 2 und Abbildung 5).

1.3.2 Aufbau der snRNP-Core-Struktur und Hypermethylierung des m⁷G-Cap

Im Zytoplasma assemblieren 7 Sm-Proteine spezifisch an der U snRNA. Alle Sm-Proteine haben zwei Sequenzmotive, Sm1 und Sm2, gemein (Abbildung 6). Die Sm-Proteine weisen eine homologe Struktur der „Sm-Motive“ bestehend aus β -Strängen auf, die für die Interaktion der Sm-Proteine miteinander und deren Bindung an die Sm-Bindestelle der snRNA wichtig sind (Kambach *et al.*, 1999; Stark *et al.*, 2001).

Drei der Sm-Proteine (B/B', D1 und D3) tragen an ihren C-terminalen Enden sogenannte „RG-Motive“, Arginin-Glycin-reiche Regionen, in denen spezifische Arginine symmetrisch dimethyliert sind (sDMAs; Abbildung 6) (Brahms *et al.*, 2000; Friesen *et al.*, 2001). Die sDMAs werden durch das Methylosom übertragen, einem Komplex der aus PICln (*Nucleotide sensitive component of chloride channels*), WD45/MEP50 (*WD repeat containing protein 45*) und PRMT5 oder JBP, der Methyltransferase, besteht (Abbildung 7) (Brahms *et al.*, 2001; Friesen *et al.*, 2001; Pu *et al.*, 1999; Friesen *et al.*, 2002; Meister *et al.*, 2001).

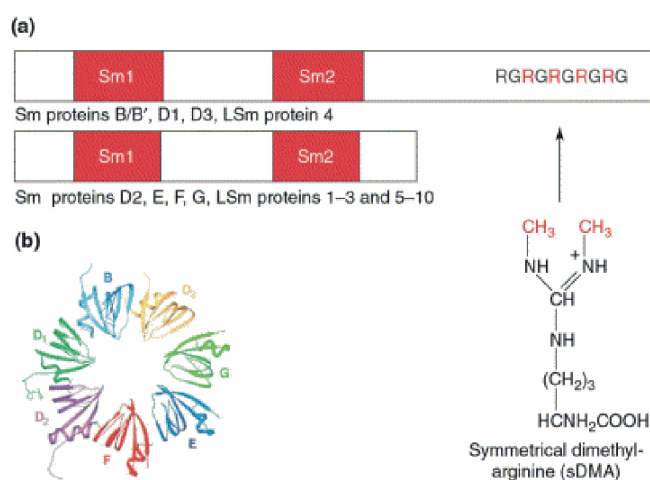


Abbildung 6: Tertiärstruktur des Sm-Ringes und Position der symmetrischen Dimethylarginine. (a) Schematische Darstellung der Sm-Proteine mit Sm1 und Sm2 Motiven, wobei die C-terminalen Arginin-Reste symmetrisch dimethyliert sind (sDMA). (b) Darstellung des Sm-Ringes anhand der Tertiärstrukturen einiger Sm-Proteine. Abkürzungen: Steven Miller (Sm); symmetrische Dimethylarginine (sDMA) (Meister *et al.*, 2002).

Die sDMAs sind für die Interaktion mit dem SMN (*Survival of Motor Neuron*)-Komplex und für die korrekte Bildung des Sm-snRNP Komplexes *in vivo* nötig (Fischer *et al.*, 1997). *In vitro* Experimente zeigen, daß die Sm-Proteine bereits Subkomplexe bilden und deren Anlagerung an die snRNA in geordneter Reihenfolge stattfindet. Zunächst binden die Subkomplexe E/F/G und D1/D2 an die Sm-Bindestelle der snRNA und formen eine stabile Substruktur, die bei der Interaktion mit D3/B (oder B') in den reifen Sm-Ring umgelagert wird (Raker *et al.*, 1996). Es wird vermutet, daß die Zusammenlagerung *in vivo* ähnlich abläuft, wobei die Anwesenheit von SMN-Komplex, U snRNA und Sm-Proteinen für die korrekte Bildung des Sm-Ringes unbedingt nötig ist (Fischer *et al.*, 1997; Meister *et al.*, 2001; Yong *et al.*, 2002).

Die Subkomplexe der Sm-Proteine werden vor deren Übertragung auf die snRNA am SMN-Komplex gebunden. Sobald die snRNA bindet, finden strukturelle Umlagerungen statt, die zur Ringschließung führen (Ellison & Stillman, 2001). Der SMN-Komplex (1 MDa) besteht aus oligomerisierten SMN-Proteinen und mindestens 18 weiteren Proteinen (Gubitz *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2001; Meister *et al.*, 2002; Paushkin *et al.*, 2002; Yong *et al.*, 2004). Die Freisetzung von Crm1 aufgrund der GTP-Hydrolyse durch Ran und der Dephosphorylierung von PHAX scheinen die Bindung des SMN-Komplex an den Komplex, bestehend aus U snRNA, CBC und PHAX, zu veranlassen. Nach der beschriebenen Formung der Sm-Core-Struktur werden PHAX und CBC aus dem Komplex entlassen; der SMN-Komplex bleibt jedoch gebunden. Die Bildung des snRNP ist offensichtlich eine Voraussetzung für die Hypermethylierung des m^7G -Cap zu dem $m^{2,2,7}G$ -Trimethylguanosin (m_3G) Cap (Massenet *et al.*, 2002; Mattaj, 1986).

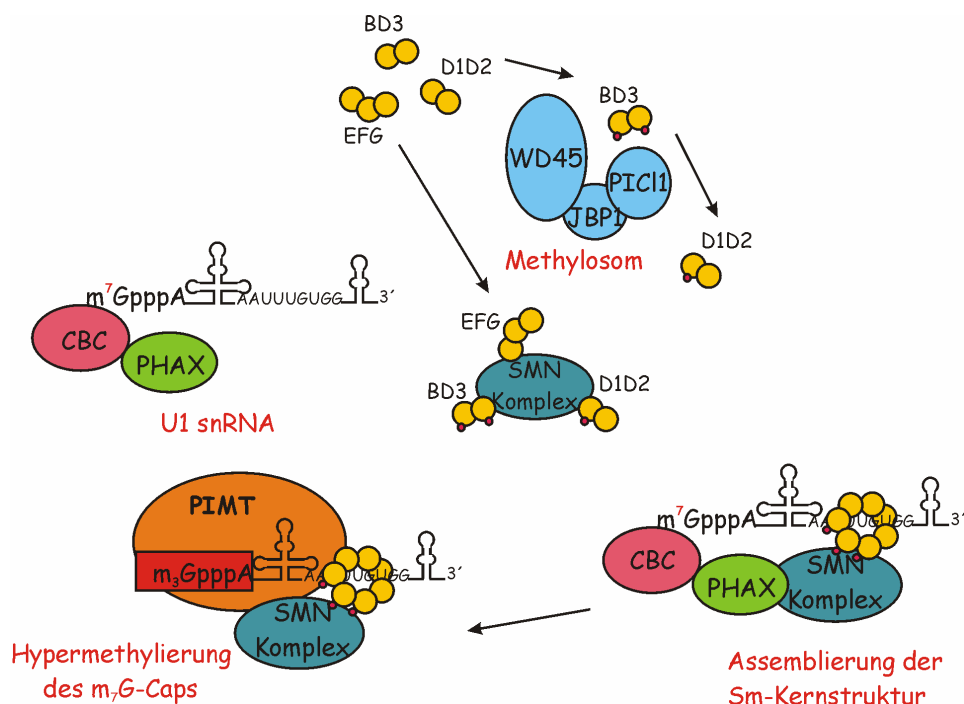


Abbildung 7: Assemblierung der snRNP-Core-Struktur und Hypermethylierung des m^7G -Cap. Die Sm-Proteine B/B', D1-3, E,F und G bilden den Sm-Core mit Hilfe des SMN-Komplexes, daraufhin wird das m^7G -Cap hypermethyliert. Der SMN-Komplex und die Dimethyltransferase PIMT binden an die C-terminalen Domänen von Sm B/B', D1 und D3 an welchen Arginine dimethyliert vorliegen. Abkürzungen: Cap binding complex (CBC); Phosphorylated adapter for RNA export (PHAX); Survival of motor neuron (SMN); PRIP-interacting methyltransferase (PIMT); WD repeat containing protein 45 (WD45); Nucleotide sensitive component of chloride channels (pICln); Methyltransferase (JBP1).

Die snRNA-(Guanosin-N²)-Methyltransferase ist ein zytoplasmatisches Enzym, das nicht dauerhaft stabil mit dem snRNPs assoziiert ist, aber an die SmB/B'-Proteine bindet (Plessel

et al., 1994). Die Existenz der SmB/B'-Proteine ist Voraussetzung für die Dimethylierung des m⁷G-Caps (Raker *et al.*, 1996). Die Dimethyltransferase wurde zunächst in *S. cerevisiae* entdeckt und Tgs1 (Trimethylguanosinsynthase 1) genannt (Mouaikel *et al.*, 2002). Tgs1 aus Hefe besteht aus 315 As und bindet S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor. Interessanterweise ist das Tgs1 aus höheren Eukaryoten, auch PIMT (*PRIP interacting protein with methyltransferase domain*) aufgrund seiner Interaktion mit PRIP (*peroxisome proliferator-activated receptor interacting protein*) genannt, ungefähr dreifach länger und enthält die Methyltransferasedomäne im C-terminalen Abschnitt (Zhu *et al.*, 2001). PIMT interagiert mit dem SMN-Protein, dem namensgebenden Teil des SMN-Komplexes, welcher die Bindung der Sm-Proteine an die snRNA vermittelt (Mouaikel *et al.*, 2003). Eine Mutation in der kodierenden Sequenz von SMN, die die vorherrschende Isoform des Proteins in Patienten mit *spinal muscular atrophy* darstellt, verhindert die Interaktion zwischen SMN und PIMT. Offensichtlich spielt SMN auch eine Rolle bei der Bindung des m⁷G-Caps durch Tgs1 und ist somit auch wichtig für die Hypermethylierung der Cap-Struktur. Durch die Übertragung einer CH₃-Gruppe auf die Position 7 der Guaninbase des Caps vor dem Export der snRNA aus dem Zellkern wird eine positive Ladung in das Ringsystem der Base eingefügt. Die Dimethylierung des m⁷G-Caps an N2 der Guaninbase durch Tgs1/PIMT (1.3.2) erfolgt unter Verwendung von S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppendonor (Abbildung 8). Es werden zwei Moleküle SAM für die Dimethylierung benötigt und S-Adenosylhomocystein (SAH) wird schließlich freigesetzt.

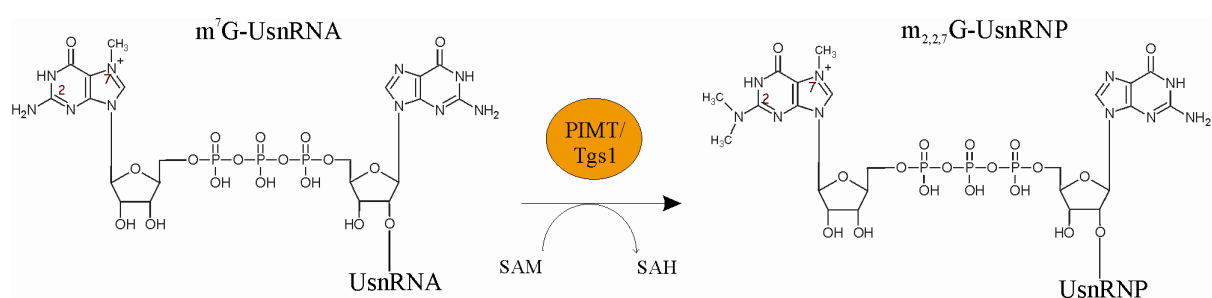


Abbildung 8: Hypermethylierung des m⁷G-Caps zu einem m^{2,2,7}G (m₃G)-Cap durch die Dimethyltransferase PIMT/Tgs1. Dargestellt sind das m⁷G-Cap und m₃G-Cap. Die Reaktion findet durch die Dimethyltransferase PIMT/Tgs1 statt, wobei S-Adenosylmethionin (SAM) zu Homocystein (SAH) umgesetzt wird. Die methylierten Positionen sind rot beziffert.

Nach der Dimethylierung folgt die Reifung des 3'-Endes des snRNP. Die zusätzlichen Nukleotide werden durch eine bis jetzt nicht identifizierte Exoribonuklease entfernt (Neuman de Vegvar & Dahlberg, 1990; van Hoof *et al.*, 2000).

1.3.3 Kernimport modifizierter spleißosomaler Untereinheiten

Das hypermethylierte m_3G -Cap und der Sm-Core-Komplex der snRNP-Partikel bilden ein bipartites, jeweils unabhängig voneinander funktionelles, Kernimportsignal (Fischer *et al.*, 1993; Hamm *et al.*, 1990; Mattaj & De Robertis, 1985).

Importin β ist an beiden Importwegen beteiligt, allerdings nicht ausreichend für den Import. Es werden weitere Transportadaptermoleküle für den Kernimport benötigt (Huber *et al.*, 1998; Palacios *et al.*, 1997). Für den m_3G -Cap abhängigen Import wird der Importadapter Snurportin 1 (SPN1) benötigt, der die Bindung zwischen den m_3G -snRNPs und Importin β vermittelt und zwischen mono- und trimethyliertem Cap unterscheidet (Huber *et al.*, 1998).

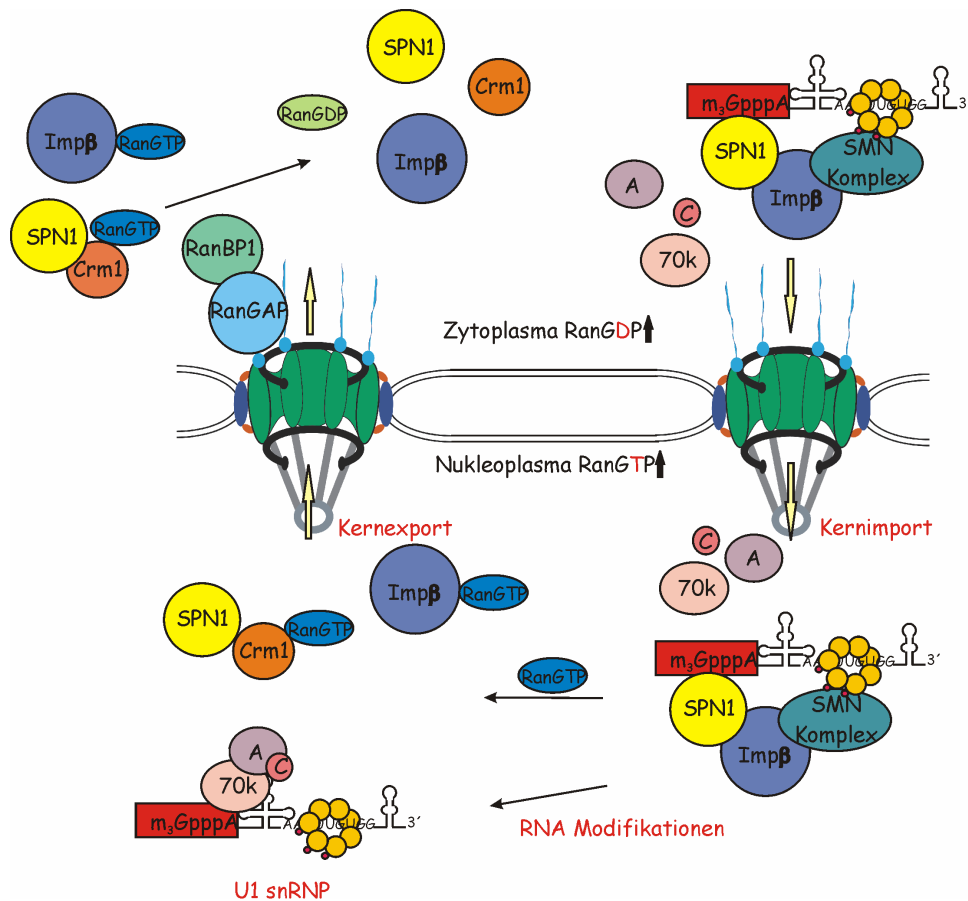


Abbildung 9: Kernimport assemblierter snRNP-Partikel am Beispiel von U1 snRNP. Dargestellt ist der Import modifizierter m_3G -tragender U1 snRNPs, die Wiedergewinnung der Transportfaktoren und die Bindung NLS-tragender U1-spezifischer Proteine im Zellkern. Abkürzungen: *Survival of motor neuron* (SMN); *Ran binding protein 1* (RanBP1); *Ran-GTPase activating protein* (RanGAP); Importin α (Imp α); Importin β (Imp β); *Chromosome region maintenance 1* (Crm1); Snurportin1 (SPN1).

Der Importkomplex transloziert in den Nukleus und dissoziiert bei Bindung von RanGTP an Importin β . Die Dissoziation findet allerdings nicht wie bei anderen Transportkomplexen (z. B. NLS-Importin α -Importin β) an der nukleären Seite des NPC statt, sondern im Nukleoplasma. Der Importin β -RanGTP Komplex gelangt ins zytoplasmatische Kompartiment, während SPN1 den Exportrezeptor Crm1 und RanGTP für den Kernexport benötigt (Paraskeva *et al.*, 1999). Die Bindung von Crm1 und des U snRNP schließen sich gegenseitig aus, so daß kein Transportsubstrat zurück ins Zytoplasma transportiert wird.

Sobald RanGTP durch RanGAP, RanBP1 und/oder RanBP2 dephosphoryliert wird, dissoziiert der trimere Komplex. Crm1 bleibt jedoch an SPN1 gebunden, bis U snRNPs an SPN1 binden und ein neuer Transportzyklus beginnt (Paraskeva *et al.*, 1999).

Die Funktion des Sm-Core-Komplexes der snRNPs beim Kernimport ist noch nicht genau geklärt. Die C-terminalen Regionen von SmB/B' und SmD1 scheinen jedoch in Hefen wichtig für den Import zu sein, da deren Deletionen den Import beeinträchtigen und Hefen, in denen beide Regionen zugleich deletiert wurden, nicht lebensfähig sind (Bordonne, 2000). Sequenzvergleiche der C-terminalen Bereiche von SmB, D1 und D3 zeigen, daß neben den dimethylierten RG-Wiederholungen weitere Lysin- und Arginin-Reste vorhanden sind, die ein NLS-Signal bilden könnten (Girard *et al.*, 2004; Jäkel & Görlich, 1998). Kristallstrukturen einiger Sm-Proteine (Abbildung 6) und die dreidimensionale elektronenmikroskopische Struktur des U1 snRNP-Partikels (Abbildung 3) zeigen, daß die Sm-Proteine B, D1 und D3 frei für Interaktionen mit einem Importrezeptor wären (Girard *et al.*, 2004). Der SMN-Komplex scheint neben seiner Funktion bei der Assemblierung der Sm-Proteine an der Sm-Bindestelle der snRNPs auch eine Rolle beim Import der reifen U snRNPs zu haben, da er Teil des Prä-Importkomplexes, bestehend aus SPN1 und Importin β ist (Massenet *et al.*, 2002; Narayanan *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, daß der SMN-Komplex als Importrezeptor fungiert und ebenfalls Importin β als Mediator zum NPC nutzt (Narayanan *et al.*, 2004). Inwieweit spezifische Proteine bereits im Zytoplasma an die snRNP-Partikel angelagert werden ist größtenteils unklar. U1 und U2 snRNP spezifische Proteine tragen eine NLS und werden unabhängig von den snRNPs in den Nukleus transportiert, wo sie mit den spleißosomalen snRNPs assemblieren (Hetzer & Mattaj, 2000; Kambach & Mattaj, 1992; Kambach & Mattaj, 1994; Romac *et al.*, 1994).

1.4 Importin β als multifunktionseller Kernimportrezeptor

Die funktionell bereits charakterisierten Mitglieder der Kap β -Familie wurden bereits in Abschnitt 1.1 (Tabelle 1) vorgestellt. Die Gruppe der Importin β -verwandten Transportrezeptoren beläuft sich in Säugern auf mindestens 20 Mitglieder mit hohem Molekulargewicht (90-150 kDa) und ähnlichem isoelektrischen Punkt (pH 4.0-5.0) (Chook & Blobel, 2001). Alle bereits strukturell analysierten Mitglieder zeigen eine superhelikale Struktur aus HEAT-Repeat Motiven und interagieren sowohl mit Transportsubstrat oder Transportadapteren, als auch mit Nukleoporinen des NPC.

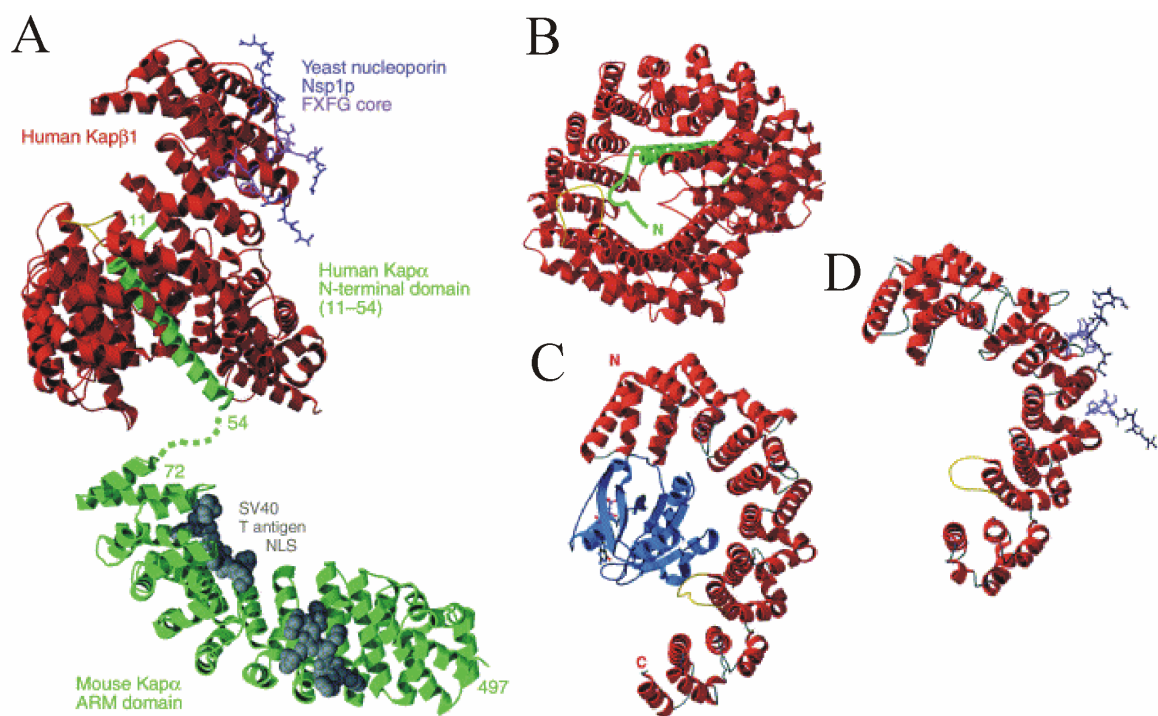


Abbildung 10: Transportkomplex für NLS tragende Proteine. (A) Modell der Interaktion zwischen humanem Karyopherin $\beta 1$ (rot, *Cartoon*), Importin α aus (*Mus musculus*) (grün, *Cartoon*), SV40 T-Antigen NLS (grau, Kalottenmodell) und FxFG-Repeats aus dem Hefe-Nukleoporin Nsp1p (blau, Stabmodell). (B) Kristallstruktur von Importin β und der Importin β -bindenden (IBB)-Domäne von Importin α (As 11-54). Die Proteine sind analog zu (A) gefärbt. (C) Kristallstruktur von Importin β (As 1-462) mit gebundenem RanGTP-Analogen RanGppNHp. Farben sind analog zu (A), wobei der saure Loop in HEAT-Repeat 8 gelb gefärbt ist. (D) Struktur von Importin β (As 1-442) mit zwei gebundenen FG-Repeats (FxFG). Proteine sind wie in (A) gefärbt und der saure Loop ist gelb (Chook & Blobel, 2001).

Von den bereits untersuchten Kap β -Komplexen seien genannt: Kap $\beta 1$ (Importin β) mit der IBB (Importin β bindenden)-Domäne von Importin α (IBB $_{\alpha}$), Importin β (As 1-462) mit dem nicht hydrolysierbaren RanGTP-Analogen RanGppNHp, Kap $\beta 2$ (Transportin1) mit

RanGpppNHp, Importin β (As 1-485) mit der NLS des Parathyroidhormonverwandten Proteins (PTHrP) und Importin β mit gebundenem FG-Repeat-reichen Proteinfragment (Abbildung 10) (Bayliss *et al.*, 2000; Chook & Blobel, 2001; Chook & Blobel, 1999; Cingolani *et al.*, 2002; Cingolani *et al.*, 1999; Vetter *et al.*, 1999). Die ausschließlich aus α -Helices aufgebauten, bogenförmigen Kap β Strukturen zeigen eine konkave und eine konvexe Seite.

Importin β interagiert sowohl direkt mit Transportsubstraten, als auch mit Transportadapteren. Direkte Transportsubstrat-Interaktionen finden mit HIV Rev, Cyclin B1 und PTHrP statt (Lam *et al.*, 1999). Ein Transportadapter, welcher die Bindung zwischen Proteinen, die eine klassische NLS tragen und Importin β herstellt ist Importin α . Die IBB $_{\alpha}$ -Domäne bindet sowohl an den HEAT-*Repeats* 7-11, als auch an dem sauren Loop in HEAT-*Repeat* 8, der allen Kap β s zueigen ist. Die Struktur des Importin β -Fragmentes mit der NLS von PTHrP stellt eine direkte Substrat-Rezeptor-Interaktion dar und PTHrP bindet im Gegensatz zu IBB $_{\alpha}$ die N-terminalen HEAT-*Repeats* von Kap β 1. Das Ran-Homologe RanGppNHp bindet die N-terminalen *Repeats* 1 und 2, sowie HEAT-*Repeats* 6-8. Da IBB $_{\alpha}$ und RanGTP überlappende Bindungsstellen in Importin β haben und somit nicht beide gleichzeitig binden können, müssen die Dissoziation des Transportkomplexes und die RanGTP-Bindung miteinander gekoppelt sein. Eine Konformationsänderung in Form einer Öffnung der superhelikalen Struktur von Kap β 1 findet offensichtlich auch bei der RanGTP-Bindung statt. Kap β 2 dagegen zeigt eine unterschiedliche Form der RanGTP-Bindung und es wird ein allosterischer Mechanismus der Substratfreisetzung durch RanGTP-Bindung angenommen.

Kap β 1/2 zeigen beide eine hohe Flexibilität, sowohl bei der Substratbindung, als auch bezüglich Änderungen in der Konformation beim Wechsel des Bindungspartners. Diese Flexibilität ist nötig, um die große Anzahl der zu transportierenden Substrate zu binden und darüber hinaus noch weitere Funktionen, beispielsweise während der Mitose, wahrnehmen zu können (Carazo-Salas *et al.*, 1999; Gruss *et al.*, 2001; Hetzer & Mattaj, 2000; Kalab *et al.*, 1999; Wiese *et al.*, 2001; Zhang & Clarke, 2000). Dennoch binden alle bisher untersuchten Transportsubstrate an der konkaven Seite der Superhelix und beeinflussen deren Krümmung und die Anordnung der einzelnen HEAT-*Repeats*. An der substratabgewandten konvexen Seite der helikalen Struktur wurde die Bindung der in vielen Nukleoporinen enthaltenen FG-*Repeats* (FxFG) nachgewiesen. Offensichtlich wechselwirkt die nicht substratbindende Seite

von Importin β während des Transportvorganges mit den Proteinen der Kernpore (Chook & Blobel, 2001).

Auch Snurportin1 (SPN1) fungiert, ähnlich wie Importin α , als Transportadaptor, indem es sowohl mit Importin β , als auch mit seinem Transportsubstrat den m_3G -snRNPs interagiert.

1.5 Der Kernimportadapter Snurportin 1

SPN1 hat ein Molekulargewicht von ca. 42 kDa (As 1-360) und besteht aus einer N-terminalen Importin β -bindenden (IBB)-Domäne (IBB_{SPN1}) und einer C-terminalen 2,2,7-Trimethyl (m_3G)-Cap Bindedomäne (Huber *et al.*, 1998).

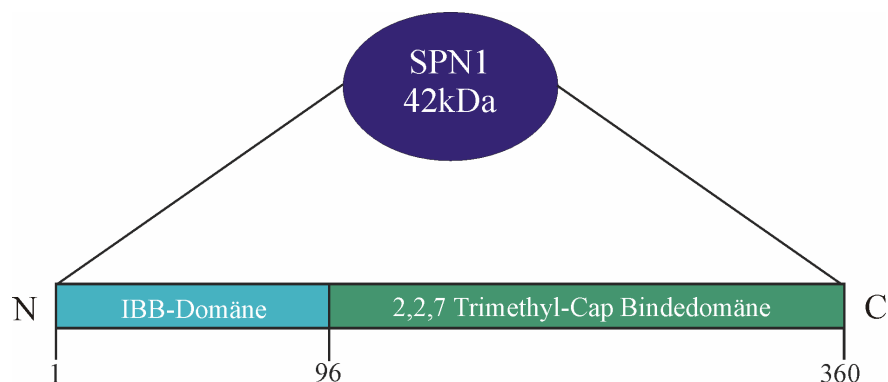


Abbildung 11: Domänenstruktur von SPN1.

Die minimale IBB_{SPN1}-Domäne erstreckt sich von As 1-65 und besteht, wie IBB-Domänen anderer Transportadaptern, welche Mitglieder der Karyopherin β -Familie als Vermittler zur Kernpore verwenden (z.B. IBB _{α}), hauptsächlich aus basischen Aminosäuren (Abbildung 48) (Cingolani *et al.*, 1999). Dennoch ist IBB_{SPN1} N-terminal um 14 As länger, als die bereits strukturell analysierte IBB _{α} . Die C-terminale m_3G -Cap Bindedomäne enthält eine ungewöhnlich hohe Anzahl von fünf Tryptophanresten, zeigt aber keinerlei Sequenzhomologien zu Proteinen in der Proteindatenbank (PDB; Abbildung 47). Sie formt auch keine *Armadillo (ARM)-Repeats*, wie die cNLS-Bindedomäne von Importin α .

SPN1 erkennt spezifisch das hypermethylierte m_3G -Cap mit seiner C-terminalen Domäne und bindet mit der N-terminalen IBB_{SPN1}-Domäne an Importin β , das den Import durch Bindung an die Kernpore vermittelt (Huber *et al.*, 1998). Die SPN1-Bindedomäne in

Importin β wurde auf die N-terminale Domäne zwischen As 1-618 begrenzt (Rollenhagen *et al.*, 2003). Die IBB-Domänen beeinflussen offenbar die Dissoziation des Transportsubstrates im Nukleus (Huber *et al.*, 2002; Rollenhagen *et al.*, 2003). Im Vergleich zum U snRNP-Importkomplex, der im Nukleoplasma bei der RanGTP-Bindung an Importin β zerfällt, scheint der Importin β -Importin α -cNLS Importkomplex bis zur Bindung von RanGTP an der nukleären Seite der Kernpore zu verweilen. Vermutlich sind die zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren der IBB_{SPN1}-Domäne für die Unterschiede in der nukleären Lokalisation des Transportkomplexes bis zur RanGTP-Bindung verantwortlich.

1.6 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war die strukturelle Analyse funktioneller Importkomplexe bestehend aus dem ternären Komplex von Importin β , SPN1 und m_3 GpppG, oder den Subkomplexen Importin β und SPN1 (IBB_{SPN1}) bzw. SPN1 und m_3 GpppG. Durch die Struktur des Komplexes der Transportrezeptoren können die Unterschiede zwischen dem Kernimport cNLS tragender Substrate und m_3 G-U snRNPs genauer analysiert werden, insbesondere die Unterschiede in der Energieabhängigkeit der Transportreaktion. Anhand der Struktur des Transportsubstrates mit dem Importadapter SPN1 kann die Spezifität für trimethyliertes m_3 G-Cap und der Diskriminierung von m^7 G-Cap genauer untersucht werden.

Des Weiteren sollte die Bindungsaffinität des m_3 G-Cap im Vergleich zum monomethylierten m^7 G-Cap aufgrund struktureller Daten genauer untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Großgeräte

ABIPrism 3100 DNA Sequencer

ÄKTA Prime

ÄKTA Purifier

Fluorimeter Fluoromax III

Frac900 Fraktionierer

Geldokumentationsgerät GelDoc

Microfluidizer 110 S

PCR-Cycler

Photometer Ultraspec2100pro

Röntgengenerator Micromax 007

Thermomixer Comfort

Tischzentrifuge 5415R

Tischzentrifuge Allegra 21R

Unitron Schüttelinkubatoren

Zentrifuge Avanti J-20 XPI

Zentrifuge Avanti J-30 I

Zentrifuge Avanti JA-20

Fluoreszenzmikroskop Axioskop 20

Applied Biosystems, Darmstadt

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Jobin Yvon, Grasbrunn

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

BioRad, München

Microfluidics, USA

Biometra, Göttingen

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Rigaku/MSK, Japan

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf, Hamburg

Beckmann Coulter, Krefeld

Infors, Einsbach

Beckman Coulter, Krefeld

Beckman Coulter, Krefeld

Beckman Coulter, Krefeld

Carl Zeiss, Jena

2.1.2 Chromatographiesäulen

GSH-Sepharose Säule (30ml)

Heparin *Chelating* Sepharose (5ml)

HiTrap Chelating Ni-NTA-Sepharose (5ml)

PRONTOSIL C18 4/125mm AQ

Superdex 75 (26/60)

Superdex 2000 (10/30)

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Bischoff Chromatography, Leonberg

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.3 Feinchemikalien

Alle Feinchemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Sigma-Aldrich, Applichem oder Fluka bezogen und besitzen den Reinheitsgrad *pro analysis*.

2.1.4 Enzyme und Inhibitoren

<i>Calf Intestine Phosphatase</i> (CIP)	New England Biolabs, Frankfurt
GluC-Protease (<i>Staphylococcus aureus</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pfu Polymerase	Stratagene, USA
Pfu-Turbo Polymerase	Stratagene, USA
<i>PreScission Protease</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protease Inhibitor Cocktail „EDTA free“	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsenzyme (<i>BamHI</i> , <i>NcoI</i> , <i>XhoI</i> , <i>DpnI</i>)	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Taq-DNA Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
TEV Protease	Invitrogen, USA

2.1.5 DNA Oligonukleotide

Oligonukleotide für Mutagenese-Experimente (SPN1_A107/276_s/as) wurden HPLC-gereinigt von IBA (Göttingen) bezogen. Alle übrigen Primer wurden lediglich HPSF gereinigt und über MWG Biotech (München) bestellt.

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - (675/N),$$

$$T_m = 81.5 + 0.41 (\%GC) - (675/N) - \% \text{ mismatch}, \text{ für Punktmutationen}$$

N = Anzahl der Nukleotide

Primer	Sequenz 5' → 3'	T _m [°C]
pETM-s	GGGAATTGTGAGCGGATAACAATT	59,3
pETM-as	TCAGCGGTGGCAGCAGCCAACCTCA	67,8
IBBSPN1 <i>NcoI</i>	CATGCCATGGAAGAGTTGAGTCAGGCCCTGGCT	73,2
IBBSPN1 <i>Xho65</i>	CCGCTCGAGCAGTCTTCTGGCATGGTTCACATA	72,0
IBBSPN1 <i>Xho95</i>	CCGCTCGAGTGGTAACTTCTTGACAGTGTCAAT	69,5
SPN1_W107A_s	GATGCTTTCTGAGGCGTTAATTGACGTTCCCTC	79,7
SPN1_W107A_as	GAAGGAACGTCAATTAACGCCTCAGAAAGCATC	79,7
SPN1_W276A_s	CCCTTGGTGGGCGCGCTGCGCCCCTACATGG	90,1
SPN1_W276A_as	CCATGTAGGGGCGCAGCGCGCCACCAAGGG	90,1
SPN1Ce_s	GGCGGATCCGATTTAGATTCGTTGACAGACCAGC	67,8
SPN1Ce_as	GGCGAATTCTTAATGCTCCATAGATCTATCGATTTTCG	63,8
CESNIF-GEX-Bf	GGCGGATCCGATTTAGATTCGTTGACAGACCAGC	83.4
CESNIF-GEX-b	GGCGAATTCTTAATGCTCCATAGATCTATCGATTTTCG	84.8
pGEX_s	GCTGGCAAGCCACGTTTGGT	72.4
pGEX_as	CGTCTCCGGGAGCTGCATGT	74.4

2.1.6 Modifizierte RNA Oligonukleotide

$m^{2,2,7}$ -G5'ppp5'A	KEDAR, Polen
$m^{2,2,7}$ -G5'ppp5'G	KEDAR, Polen
m^7 -G5'ppp5'A	KEDAR, Polen
$m^{2,2,7}$ -G5'ppp5'A _m pU _m pA	Mitsuo Sekine, Japan

2.1.7 Plasmide

pGEX6P1-SPN1 <i>human</i>	AG Prof. R. Ficner, Universität Göttingen
pQE60-Impβ <i>X. laevis</i>	AG Prof. D. Görlich, ZMBH Heidelberg
pGEX6P1-SPN1 A276 <i>human</i>	
pGEX6P1-SPN1 A107 <i>human</i>	
pGEX6P1-SPN1 A276/107 <i>human</i>	
pGEX6P1-SPN1 <i>C. elegans</i>	
pET28b IBBA _s 1-95 <i>human</i>	
pET28b IBBA _s 1-65 <i>human</i>	

2.1.8 Genbanken

<i>C. elegans</i> Lambda cDNA Library	Stratagene, USA
---------------------------------------	-----------------

2.1.9 Verwendete Organismen

Alle Organismen sind aus der Stammsammlung AG Prof. R. Ficner.

<i>E. coli</i> BL21(DE3)RIL	Novagen, Darmstadt
<i>E. coli</i> M15	QIAGEN, Hilden
<i>E. coli</i> SG13009	QIAGEN, Hilden
<i>E. coli</i> XL1 Blue	Novagen, Darmstadt

2.1.10 Verwendete Kit-Systeme

Big Dye Terminator v1.1 Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
QIAGEN Gelextraktionskit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN PCR Reinigungskit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Mini/Midi/Maxi	QIAGEN, Hilden

2.1.11 Kristallisationsscreens

Alle genannten *Screens* wurden innerhalb der Abteilung angesetzt.

<i>Crystal Screen 1+2/Lite/Cryo/PEGIon</i>	Hampton Research, USA
<i>JBScreens 1-10</i>	Jena Bioscience, Jena
<i>Magic Screen 1-4</i>	Biogenova, Kanada
<i>Footprint Screens 1-3</i>	Stura et al., 1999
<i>Structure Screens 1-3</i>	Molecular Dimensions, England
<i>Strategy Screens 1-3</i>	Brzozowski & Walton, 2001

2.1.12 Computerprogramme

<i>Automar</i>	Marresearch GmbH, Norderstedt
<i>CCP4 package</i>	Collaborative Computational Project Number 4, 1994
<i>CNS</i>	Brünger <i>et al.</i> , 1998
<i>DALI</i>	Holm & Sander, 1993
<i>DELPHI</i>	Accelrys, Cambridge, UK
<i>Denzo/Scalepack</i>	HKL Research, USA
<i>Lasergene (Protean, Seqman, Megalign)</i>	DNASTar, Madison, USA
<i>Dundee PRODRG Server</i>	Schüttelkopf & van Aalten, 2004
<i>Graphit 3.1</i>	Erithacus Software, UK
<i>HKL2000</i>	HKL Research, USA
<i>Ligplot 4.4.2</i>	Wallace <i>et al.</i> , 1995
<i>Lsqman</i>	Uppsala Software Factory (Kleywegt G.A.)
<i>Mosflm</i>	Leslie and Powell, UK
<i>O</i>	Jones <i>et al.</i> , 1991
<i>Procheck</i>	Laskowski <i>et al.</i> , 1993
<i>Pymol 0.97</i>	DeLano Scientific, San Carlos, USA
<i>Secondary Structure Definition Server</i>	http://www.mbfys.lu.se/Service/SecStr/
<i>SHARP 2.0</i>	Global Phasing, Cambridge, UK
<i>SigmaPlot 8.0</i>	SYSTAT Software, Erhrath
<i>SWIFT II</i>	Biochrom Ltd., England
<i>Clustal W</i>	EMBL-EBI, Pearson & Lipman, 1988
<i>ESPrpt 2.2</i>	Gouet <i>et al.</i> , 1999

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische und Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR werden zu klonierende Gensequenzen amplifiziert, indem spezifische Oligonukleotide eingesetzt werden, welche komplementär zur Sequenz der Matrizen-DNA sind und das zu amplifizierende Fragment in entgegengesetzter Orientierung begrenzen. Im Folgenden sind die allgemeinen Reaktionsbedingungen aufgeführt, Abweichungen werden im Ergebnisteil separat angegeben.

Reaktionszyklus:

- | | | |
|--------------------------|------------|-----------------------------|
| 1. Denaturierung | 96 °C/5' | |
| 2. Denaturierung | 96° C/30'' | |
| 3. Primer-Hybridisierung | x °C/30'' | 30-50 Zyklen (2.-4.) |
| 4. Elongation | 72 °C/y' | |
| 5. Abschlußelongation | 72°C/10' | |

x = Primer-Hybridisierung Temperatur, 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m)

y = 2'/kb des zu amplifizierenden Fragmentes

PCR-Ansätze:

1-50 ng DNA

1x PCR-Puffer

10 mM je dGTP, dATP, dCTP, dTTP

0-10 % DMSO

je 10 pmol Primer s/as

1.25 U Pfu Turbo-Polymerase /1 U Taq-Polymerase

ad 50 µl ddH₂O steril

2.2.1.2 Ortsgerichtete Mutagenese

Bei der ortsgerechten Mutagenese binden die Primer an der zu mutierenden DNA-Sequenz in 5' → 3' und 3' → 5' Richtung. Die einzufügende Punktmutation ist enthalten und der ganze Vektor wird amplifiziert. Die Parentalplasmide werden mit dem Restriktionsenzym *DpnI* verdaut, welches lediglich methylierte DNA abbaut. Die amplifizierten Plasmide werden in Bakterienstämmen vermehrt. Plasmide, welche die gewünschte Mutation enthalten, können nur über Sequenzierreaktionen (2.2.1.3) selektiert werden. Die Amplifikation wird, wie unter PCR-Reaktionen beschrieben, durchgeführt (2.2.1.1). Danach wird der Ansatz auf Eis abgekühlt und 5 U *DpnI* zugegeben. Der Verdau wird nach 1 h bei 37 °C für 10' bei 95 °C gestoppt, und der komplette Ansatz wird zur Selektion in XL1 Blue-Zellen transformiert.

2.2.1.3 DNA Sequenzierung

Bei der DNA-Sequenzierung werden Amplifikationen mit je nur einem Primer durchgeführt. Die Amplifikation wird bei Fragmenten unterschiedlicher Längen nach dem Zufallsprinzip durch den Einbau im Ansatz enthaltener, fluoreszenzmarkierte ddNTPs abgebrochen (Kettenabbruch). Die überschüssigen Nukleotide werden abgetrennt und die Fragmente auf einen Acrylamidgel aufgetrennt und analysiert. Der Gelauftrag und die Auswertung werden in der Abteilung von Prof. Pieler an einem ABI Prism 3100 DNA Sequencer durchgeführt.

Reaktionszyklus:

1. Denaturierung	96 °C/2'	
2. Denaturierung	96 °C/30''	25 Zyklen (2. -4.)
3. Primer-Hybridisierung	50 °C/20''	
4. Polymerisation	60 °C/4'	

Sequenzieransätze:

200 ng DNA
8 pmol Primer
1 µl Sequenziermix
1 µl Sequenzierpuffer
Ad 10 µl ddH₂O steril

Zur Präzipitation der fluoreszenzmarkierten Nukleotide werden dem PCR-Produkt 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3 M Natriumacetat und 50 µl 100 % Ethanol absolut zugegeben und der Ansatz nach vorsichtigem Mischen 5' auf Eis zugesetzt. Nach dem Pelletieren der DNA (16000 xg, 4 °C, 15') wird diese mit 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft trocknen gelassen. Die präzipitierte DNA wird in 30 µl sterilem ddH₂O aufgenommen und zur Analyse in die Abteilung Prof. Pieler gegeben.

2.2.1.4 DNA Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wird nach den Angaben des Herstellers (New England Biolabs) durchgeführt. Die Inkubationszeit beträgt 1 h bei 37 °C und der Verdau wird entweder durch Hitzeschock bei 95 °C für 10' oder Auftrennung der Reaktionsprodukte auf einem Agarosegel (2.2.1.7) gestoppt.

2.2.1.5 Dephosphorylierung von Plasmiden am 5'-Ende

Um Religationen von restringierten Plasmiden zu vermeiden, wird der 5'-Terminus mit der Phosphatase CIP (Calf Intestine Phosphatase) dephosphoryliert. Die Reaktion wird nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs) durchgeführt.

2.2.1.6 DNA Ligation

Amplifizierte und restringierte DNA-Fragmente mit überhängenden Enden werden mit linearisierter dephosphorylierter Plasmid-DNA religiert. Die Ligation erfolgt mit T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs) mit einem 3-5-fachen molaren Fragmentüberschuß in Relation zum Plasmid über Nacht bei 4-14 °C.

2.2.1.7 Agarosegelelektrophorese

Laufpuffer (1x TBE):

90 mM TrisBase

90 mM Borsäure

10 mM EDTA

auf pH 8.0 einstellen

6x DNA-Probenpuffer:

0.5 % (w/v) Bromphenolblau

0.5 % (w/v) Xylencyanol FF

60 % Glyzerin

Es werden ausschließlich Gele mit 1 % Agaroseanteil verwendet. Aufzutrennende Nukleinsäuren werden mit einer Endkonzentration von 1x Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgt mit einer konstanten Spannung von 5-15 V/cm Agarosegel. Die DNA wird nach Inkubation in einem Ethidiumbromid-Färbebad (1 µg/ml) für 10-30' im UV-Durchlicht bei 254 oder 365 nm (bei Gelelution) sichtbar gemacht. Die Archivierung erfolgt über ein Geldokumentationsgerät (BioRad, München).

2.2.1.8 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Die DNA-Isolierung aus Agarosegelen erfolgt nach Angaben des Herstellers (Qiagen). Isolierte DNA wird in 50 µl ddH₂O eluiert.

2.2.1.9 Plasmidpräparationen

LB-Medium:

1 % (w/v) Trypton

0.5 % (w/v) Hefeextrakt

1 % (w/v) NaCl

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgt mit QIAGEN Kit-Systemen durch alkalische Lyse von Plasmid-transformierten Bakterienzellen und anschließender Reinigung der Plasmide durch Bindung an Silica-Säulchen. Abhängig von der zu präparierenden DNA Menge werden 5 ml (Mini), 50 ml (Midi) bzw. 250 ml (Maxi) LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit dem transformierten Bakterienstamm inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Präparation wird nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt und die Plasmid-DNA abschließend in 50-200 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.1.10 Präparation chemisch kompetenter Bakterienstämme

TFB1:

30 mM Kaliumacetat pH7.0
50 mM MnCl₂
10 mM CaCl₂
100 mM RbCl
15 % (v/v) Glycerin
pH 5.8 mit 0.2 M Essigsäure einstellen

TFB2:

10 mM Na-MOPS
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15 % (v/v) Glycerin
pH 6.5 mit NaOH einstellen

Eine Kolonie des Stammes, welcher kompetent gemacht werden soll, wird in 5 ml LB-Medium (2.2.1.9) überimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Vorkultur wird in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 wachsen gelassen. Die Ernte erfolgt durch Zentrifugation bei 3000 xg und 4 °C für 10'. Nach dem Resuspendieren in 150 ml eiskaltem TFB1-Puffer wird die Suspension für 5' auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (3000 xg, 10', 4 °C) wird das Pellet in 5 ml eiskaltem TFB2-Puffer vorsichtig resuspendiert und aliquotiert (50µl). Die kompetenten Zellen werden in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.11 Transformation von Plasmid DNA

LB-Agar:

LB-Medium (s. 2.2.1.9)
1.2 % (w/v) Bacto-Agar

Zur Transformation wird ein 50 µl-Aliquot kompetenter Bakterienzellen auf Eis aufgetaut, Plasmid-DNA (10-100 ng) oder Ligationsansätze zugegeben und 30' auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschockbehandlung (90'' bei 42 °C) wird der Ansatz für 5–10' auf Eis abgekühlt, mit 200 µl LB-Medium versetzt und 30-45' bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wird der gesamte Ansatz auf Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Zellkultivierung und –aufschluß

2YT-Medium:

2.0 % (w/v) Trypton
1 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl

10xPBS:

1.36 M NaCl
26.8 mM KCl
100 mM Na₂HPO₄
17.6 mM KH₂PO₄
pH 7.4

Aufschlußpuffer 1:

1x PBS
2.5 mM MgCl₂
2 mM EDTA
2 mM DTT

Aufschlußpuffer 2:

100 mM NaCl
50 mM Tris/HCl pH7.5
2 mM β -Mercaptoethanol

Bakterien werden in 2YT-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. Eine Übernachtskultur des jeweiligen Bakterienstammes wird 1:10 mit 2YT-Medium verdünnt und bei 18 °C im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von ~1.0 inkubiert. Die Induktion der Expression wird unter Zugabe von 0.5 mM IPTG gestartet. 12-18 h nach Induktion werden die Bakterien zentrifugiert (3500 xg, 4 °C, 15'), die Zellen in 1x PBS resuspendiert, erneut zentrifugiert und in flüssigem N₂ tiefgefroren. Die Zellen werden bis zum Aufschluß bei -80 °C gelagert. Zellen, welche SPN1 überproduzieren, werden in Aufschlußpuffer 1 resuspendiert und Bakterien, welche Importin β oder die Importin- β -Bindedomänen (IBB) überproduzieren werden in Aufschlußpuffer 2 gelöst. Zu jedem Ansatz wird eine Tablette Protease-Inhibitor Cocktail „EDTA-free“ gegeben, anschließend wird die Zellsuspension unter Kühlung in einem *Microfluidizer* bei 90 Psi aufgeschlossen. Nach Ultrazentrifugation (100000 xg, 4 °C, 1 h) wird der Überstand zunächst über Affinitätsäulen gereinigt.

2.2.2.2 Affinitätschromatographie

Alle Reinigungen werden bei 20 °C an einer ÄKTA Prime oder ÄKTA Purifier Plattform durchgeführt. Sämtliche Säulen werden in 20 % Ethanol/ddH₂O gelagert.

2.2.2.2.1 Glutathion-S-transferase

Puffer A:

100 mM NaCl
20 mM Tris pH8.0
2.5 mM MgCl₂
2 mM EDTA
2 mM DTT

Puffer B:

Puffer A
+ 30 mM reduziertes Glutathion

Der Rohextrakt nach Zentrifugation wird nach Filtration (0.2 µm Porengröße) über eine in Puffer A äquilibrierte 30 ml GSH-Sepharose-Säule geleitet (1 ml/min). Nicht gebundene Proteine werden mit 2 CV Puffer A von der Säule gewaschen und das SPN1-GST-Fusionsprotein über einen Gradienten von 0-100 % Puffer B in 2 CV eluiert. Das Eluat wird in 5 ml Fraktionen gesammelt. Nach jedem Säulenlauf wird die Säule mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid gewaschen.

2.2.2.2.2 Heparin

Puffer A:

50 mM HEPES/NaOH pH7.5
2 mM EDTA
2 mM DTT

Puffer B:

Puffer A
+ 1 M NaCl

Die Heparinsäule (5 ml) wird zur Trennung von SPN1 und dem GST-Fusionsprotein nach Behandlung mit PreScission-Protease eingesetzt. Die Probe wird mit 1 ml/min auf die in Puffer A äquilibrierte Säule geleitet, nicht gebundene Proteine mit 2 CV Puffer A entfernt und SPN1 über einen Gradienten (0-100 % Puffer B über 4 CV) eluiert. Das Eluat wird in 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Säule wird nach jedem Lauf mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid gereinigt.

2.2.2.2.3 IMAC (Ni²⁺ NTA-Sepharose)

Puffer A:

100 mM NaCl
20 mM Tris/HCl pH 8.0
2 mM β-Mercaptoethanol

Puffer B:

Puffer A
+ 400 mM Imidazol

Metallaffinitätssäulen (Ni^{2+}) werden zur Reinigung von Hexahistidin-markierten Proteinen verwendet. Hierfür werden 5 ml *Chelating Sepharose* Fertigsäulen mit 3 ml 0.1 M $\text{Ni}(\text{II})\text{SO}_4$ beladen und mit je 5 CV ddH_2O und nachfolgend Puffer B gewaschen. Die Probe wird auf die in Puffer A äquilibrierte Säule geleitet und nicht gebundene Proteine zunächst mit 2 CV Puffer A und dann mit 1 CV 2 % Puffer B entfernt. Hexahistidin-markierte Proteine werden über einen linearen Gradienten von 2-100% Puffer B in 20-30 CV eluiert. Das Eluat wird in 1-2 ml Fraktionen gesammelt. Falls die Säule länger als zwei Wochen gelagert werden soll, wird das Säulenmaterial mit 0.1 M EDTA/NaOH pH 8.0 von den Metallionen befreit.

2.2.2.3 Ausschlußchromatographie

Puffer 1:

100 mM NaCl
50 mM Tris/HCl pH 7.5
2 mM EDTA
2 mM DTT

Puffer 2:

100 mM NaCl
50 mM HEPES/NaOH pH 7.5
2 mM EDTA
2 mM DTT

Die Größenauftrennung von Proteinen erfolgt über Superdex 75 bzw. 200 Medien (Säulenformat: 26/60; 10/30; d.h. je 26/10 cm Säulendurchmesser und 30/60 cm Säulenlänge). Die Proteinproben werden auf 5 ml, bzw. 100 μl konzentriert (VivaSpin *cut off* 10/30, Sartorius), auf die in Puffer 1 oder Puffer 2 äquilibrierte Gelfiltrationssäule geladen und mit 1-2 CV des jeweiligen Puffers eluiert. Die Säulen werden nach ca. 10 Läufen mit 0.1-0.5 M NaOH und/oder 20 % Acetonitril gewaschen und in 20 % Ethanol/ ddH_2O gelagert.

2.2.2.4 Umkehrphasenchromatographie

Puffer A:

100 mM Kaliumphosphat pH 6.5

Puffer B:

100 mM Kaliumphosphat pH 6.5
50 % (v/v) Acetonitril

Cap-Dinukleotide werden nach dem Einsatz in die Fluoreszenzmessungen über Umkehrphasenchromatographie regeneriert, nachdem das enthaltene Proteine mit Perchlorsäure gefällt wurde.

Die Trennung monomethylierter und trimethylierter Cap-Dinukleotide von Verunreinigungen nach der Perchlorsäurefällung von SPN1 (2.2.2.7) erfolgt an einer C_{18} -Umkehrphasensäule

(PRONTOSIL, C18 AQ, 4.0x125 mm², Flußrate 1 ml/min). Dinukleotide werden in einem Probenvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Elution erfolgt über einen linearen Gradienten 0-100 % Puffer B in 10 CV. Die Detektion erfolgt über die Absorption bei 260 nm. Fraktioniert wird in 0.5 ml Aliquots.

2.2.2.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel (10 oder 15 %):

10/15 % Acrylamid, 0.26/0.4 % Bisacrylamid
375 mM Tris/HCl pH 8.8
0.1 % (w/v) SDS
0.1 % (v/v) TEMED
0.05 % (w/v) Ammoniumpersulfat

Sammelgel (5 %):

5% Acrylamid, 0.13 % Bisacrylamid
125 mM Tris/HCl pH 6.8
0.1 % (w/v) SDS
0.1 % (v/v) TEMED
0.05 % (w/v) Ammoniumpersulfat

Laufpuffer:

192 mM Glycin
25 mM Tris/HCl pH8.3
0.1 % (w/v) SDS

2xSDS-Probenpuffer:

62.5 mM Tris/HCl pH6.8
70 mM SDS
50 % (v/v) Glyzerin
0.1 % (w/v) Bromphenolblau
5 % (v/v) β-Mercaptoethanol

Färbelösung:

10 % (v/v) Ethanol absolut
5 % (v/v) Essigsäure
0.002 % (w/v) Coomassie G/R250

Für die SDS-PAGE werden Gelsysteme der Firma Biometra verwendet. Die Proben werden 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt, während Induktionsproben zunächst abzentrifugiert werden (5', 16000 xg) und das Zellpellet in $0.2 * OD_{600} * \text{Probenvolumen} [\mu\text{l}]$ SDS-Probenpuffer aufgenommen wird. Die Auftrennung erfolgt bei 30 mA für 45'. Die Gele werden in 50 ml Färbelösung inkubiert und in H₂O entfärbt. Die Archivierung erfolgt über ein Geldokumentationssystem (BioRad, München).

2.2.2.6 Proteolytische Spaltungen

2.2.2.6.1 PreScission Protease

Die GST-Markierung wird nach der Affinitätsreinigung über GSH-Sepharose mittels PreScission Protease abgespalten. Hierfür wird zu den vereinigten Fraktionen ca. 0.1 mg PreScission Protease/mg Fusionsprotein gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.2.2.6.2 GluC Protease

Die GluC (V8)-Protease wird zur Generierung stabiler, kristallisierbarer SPN1-Fragmente herangezogen. GluC schneidet in Proteinsequenzen C-terminal von sauren Aminosäuren (Asp, Glu). Zu 5 ml gereinigtem SPN1 (0.5-2 mg/ml) werden 1 mM CaCl₂ und 1:50 GluC (1 µg/µl) bezogen auf die eingesetzte SPN1-Konzentration gegeben, der Ansatz 40' bei 23 °C inkubiert und der Verdau mit 1 mM PMSF/Isopropanol gestoppt. Die Probe wird direkt danach erneut über eine Superdex 75 (26/60) Gelfiltrationssäule gegeben.

2.2.2.7 Perchlorsäurefällung

Zur Präzipitation von SPN1 vor der Wiedergewinnung von Cap-Dinukleotiden über die Umkehrphasenchromatographie werden 10 µl Probe auf Eis mit 1 µl 1 M Perchlorsäure (HClO₄) gemischt und für 1' auf Eis belassen. Nach Zugabe von 20 µl 2M Kaliumacetat wird die Probe bei 16000 xg und 4 °C für 5' zentrifugiert und je Säulenlauf 10 µl der Probe aufgetragen.

2.2.3 *In vitro* Kernimportassay

Transportpuffer:

50 mM HEPES / KOH pH 7.5
110 mM Kaliumacetat / KOH pH 7.5
4 mM Magnesiumacetat
1 mM DTT
1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin

ATP-regenerierendes System pro Assay:

1 mM ATP
0.2 mM GTP
10 mM Kreatinphosphat
0.05 µg/µl Kreatinphosphatkinase

Transportfaktoren:

20 µM RanGDP
300 nM Snurportin 1
300 nM Importin β

Substrate:

60 nM Cy3 markierte U1 snRNP
60 nM BSA-NLS-Fluos

Transportreaktion:

20 µM RanGDP
300 nM Snurportin 1 (außer bei neg. K.)
300 nM Importin β (außer bei neg. K.)
ATP-regenerierendes System
Ad 20 µl mit Transportpuffer

Der von Adam und Gerace entwickelte *in vitro* Kernimportassay (Adam *et al.*, 1991) wird durchgeführt, um rekombinant hergestellte Transportfaktoren auf ihre Transportaktivität zu testen. Adhärent wachsende HeLa-Zellen werden auf Deckgläschen in Gewebekulturschalen mit sechs Vertiefungen ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70 % für den Assay verwendet. Nach dreimaligem Waschen in Transportpuffer werden die Zellen mit 50 µg/ml Digitonin in Transportpuffer für 5' bei RT permeabilisiert. Die Zellen werden erneut dreimal mit Transportpuffer gewaschen und anschliessend auf eine mit Parafilm beschichtete Schale überführt. Auf die gewaschenen Zellen werden jeweils 20 µl Transportpuffer mit 20 µM RanGDP und ATP-regenerierendem System gegeben und für 10' bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert, um membrangebundene, endogene, transportaktive Faktoren zu depletieren. Die Zellen werden dreimal mit Transportpuffer gewaschen und anschließend für 10' bei RT in einer feuchten Kammer mit 20 µl Transportlösung überschichtet. Die Transportreaktion wird durch dreimaliges Waschen mit Transportpuffer beendet und die Zellen für 10' mit 5 % Paraformaldehyd in 1x PBS fixiert. Die Zellen werden mit 1x PBS pH 7.4 dreimal kurz gewaschen und anschliessend eingedeckelt. Vor der Auswertung am Mikroskop werden die Objektträger für 1 h im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Transportassays werden in der Abteilung für Molekularbiologie (Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universität Göttingen) mit der Hilfe von Jörg Kahle

durchgeführt. Ebenso werden RanGDP, das energieregenerierende System und HeLa-Zellen zur Verfügung gestellt.

2.2.4 Röntgenkristallographische Methoden

2.2.4.1 Proteinkristallisation

Die Kristallisation findet in *sitting drop* Kristallisationsschalen (Cryschem, Hampton) durch Dampfdiffusion statt. Im Reservoir werden 500 µl Kristallisationspuffer vorgelegt. Es werden 7-12 mg/ml Protein eingesetzt und 1:1 mit Kristallisationspuffer gemischt. Die Ansätze werden mit durchsichtigem Klebeband abgedeckt und bei 4, 10 oder 20 °C inkubiert.

2.2.4.1.1 *Seeding* - Experimente

Seeding wird eingesetzt um erste kleine und/oder verwachsene Kristalle, welche nicht für Datensammlungen geeignet sind, zu verbessern. Man unterscheidet zwischen *Makro-* und *Mikro seeding*. Beim *Makro seeding* werden kleine Einkristalle in Kristallisationsansätze überführt welche frisches Protein enthalten, während beim *Mikro seeding* nur winzig kleine „Kristallkeime“ in frisch angesetzte Tropfen überführt werden. Kristalle der m₃G-Cap Bindedomäne mit gebundenem m₃GpppG-Cap-Dinukleotid konnten über *Mikro seeding* Experimente verbessert werden. Hierzu werden Kristalle in einen 2 µl Tropfen frischen Kristallisationspuffer überführt und zu unsichtbaren Kristallfragmenten, den *Seeds*, zerteilt. Von dieser Kristallsuspension wird eine Verdünnungsreihe angesetzt (1:200, 1:400, 1:800). Die Keime werden in die frisch präparierten Kristallisationsansätze nach 2 h Inkubation entweder durch Zugabe von 0.2 µl Suspension in 4 µl Tropfen, oder mittels eines Katzenschnurrhaares (PEDRO, 2003) aus der 1:200 Verdünnung überführt. Da die Anlagerung von Molekülen an einen bereits gebildeten Kristallen, im Gegensatz zur Neubildung, thermodynamisch begünstigt ist, wachsen die Kristallkeime schneller und unterdrücken die Kristallneubildung.

2.2.4.1.2 Kryo - Bedingungen

Die Wahl des Kryopuffers, in dem die Kristalle für Messungen vorbereitet werden, kann sehr großen Einfluß auf das Streuverhalten des Kristalles haben. Er muß von der Zusammensetzung her die Bildung von Wasserkristallen bei 100 K verhindern. Üblicherweise werden Kristalle direkt im *Loop* mit Kryopuffer benetzt und für die Messung im 100 K N₂-Strom auf dem Goniometerkopf montiert. Die direkte Überführung in Kryopuffer kann das Streuverhalten negativ beeinflussen, so daß eine schrittweise Erhöhung des Kryoprotektants nötig sein kann. Kristalle der m₃G-Cap Bindedomäne mit gebundenem m₃GpppG-Cap-Dinukleotid werden in Kristallisationspuffer plus 5 % Glycerin überführt (4 µl), das Reservoir (500 µl) enthält den Kristallisationspuffer plus 50 % Glycerin. Die Konzentration des Glycerin im Kristallisationstropfen erhöht sich durch Dampfdiffusion schrittweise. Der Kristall wird vor der Datensammlung darin über Nacht bei 20 °C inkubiert.

2.2.4.1.3 *Soaking* - Experimente

Zur Inkorporation von Schwermetallionen werden die Kristalle der m₃G-Cap Bindedomäne mit gebundenem m₃GpppG-Cap-Dinukleotid zunächst über Nacht in Kryopuffer überführt und nachfolgend in Kryopuffer mit 10-50 mM Schwermetallsalzen für 5-20' inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in Kryopuffer werden die Kristalle für die Datensammlung direkt auf dem Goniometerkopf montiert.

2.2.4.2 Datensammlung

Kristalle werden zur Datensammlung auf einem Goniometerkopf im Schnittpunkt des Röntgenstrahls mit der Rotationsachse montiert. Ein nativer Datensatz der Kristalle der m₃G-Cap Bindedomäne von SPN1 mit komplexiertem m₃GpppG-Cap wird am BL1-Strahl des Berliner Elektronensynchrotrons (BESSY) bei 100 K, einer Wellenlänge von 0.9184 Å und einem Kristall-Detektor Abstand von 18 cm mit einem CCD-Detektor (marccd, mar research, Hamburg) aufgenommen. Pro Aufnahme wird für einen hochauflösenden Datensatz 30'' und für einen niedrigauflösenden Datensatz 5'' belichtet. Der Kristall wird insgesamt um 90° bei

1°/Bild gedreht. Zur Indizierung, Integration und Datenreduktion wird das HKL2000 Programmpaket (HKL Research) verwendet.

Die Datensätze der Schwermetallderivat-Kristalle werden an einem Röntgendiffraktometer (Rigaku) aufgenommen, welches mit einer Kupferanode ($\lambda=1.54 \text{ \AA}$) und einem Phosphoreszenzdetektor mardtb (marresearch, Hamburg) ausgestattet ist. Datensätze werden bei 100 K und einem Kristall-Detektor-Abstand von 25 cm gesammelt. Bei einer Belichtungszeit von 20' wird der Kristall insgesamt um 90° (1°/Bild) gedreht. Für die Indizierung, Integration und Datenreduktion wird das Denzo/Scalepack Programmpaket (HKL Research) verwendet.

2.2.4.3 Phasenbestimmung und Berechnung der Elektronendichteverteilung

Die Phaseninformation zur Berechnung der Elektronendichteverteilung kann bei kleinen Molekülen (bis 100 Atomen) durch direkte Methoden, jedoch bei komplexeren Molekülen durch Anomale Dispersion (SAD/MAD), oder durch isomorphen Ersatz (SIR/MIR) erhalten werden. Kann bei den verwendeten Schwermetallionen auch anomale Dispersion bei der angewendeten Wellenlänge beobachtet werden, ist auch eine Kombination des isomorphen Ersatzes und der anomalen Dispersion möglich. Ist ein Molekül mit ähnlicher bekannter Struktur in der Datenbank verfügbar, kann die Methode des molekularen Ersatzes (MR) angewendet werden.

Die Phasen zur Bestimmung der Struktur der m₃G-Cap Bindedomäne von SPN1 mußten *de novo* bestimmt werden. Dies erfolgt durch **Multiples Isomorphen Ersatz** (MIR) aus der initialen Phaseninformation dreier Schwermetallderivate (Hg, U, Pt). Diese Methode setzt voraus, daß die Inkorporation von Schwermetallen die Einheitszelldimensionen und die Kristallsymmetrie nicht verändert (Isomorphismus). In diesem Fall stellen die Strukturfaktoren der Schwermetallderivate \vec{F}_{PH} die Vektorsumme aus den nativen Strukturfaktoren \vec{F}_P und denen der Schwermetall-Substruktur \vec{F}_H dar:

$$\vec{F}_{PH} = \vec{F}_P + \vec{F}_H$$

Es sind lediglich die Intensitäten $|F_P|$ und $|F_{PH}|$ aus einem Röntgenbeugungsexperiment ableitbar, gesucht ist daher zusätzlich ϕ_P . Der Strukturfaktor \bar{F}_H kann zwar nicht direkt gemessen werden, er läßt sich aber berechnen. $|F_H|^2$ kann aus den Vektorbeträgen $|F_P|$ und $|F_{PH}|$ abgeleitet werden, welche wiederum die Quadratwurzeln der gemessenen Intensitäten darstellen:

$$I_{hkl} = |F_{hkl}|^2$$

$$(\Delta F)^2 = |F_H|^2 = |F_P|^2 + |F_{PH}|^2 - 2|F_{PH}| \times |F_P| \times \cos(\phi_{PH} - \phi_P) \cong (|F_{PH}| - |F_P|)^2$$

Diese Kurzform gilt nur unter der Voraussetzung, daß die native und die Schwermetallerivat-Struktur sehr ähnlich sind (isomorph), womit der Cosinus-Term annähernd 1 ist. Durch Einsetzen der abgeleiteten Vektorbeträge der Schwermetall-Substruktur $|F_{hkl}|^2$ in die *Patterson-Funktion* können die Schwermetallatompositionen abgeleitet werden:

$$P(u, v, w) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F_{hkl}|^2 \times e^{-2\pi i(hu + kv + lw)}$$

Aus der Position der Schwermetallatome und deren Vektoramplituden lässt sich wiederum der Strukturfaktor \bar{F}_H und damit die Phaseninformation ϕ_H ableiten, welche zur Bestimmung der initialen Elektronendichtekarte durch die Fouriertransformation benötigt wird:

$$\bar{F}_{hkl} = |F_{hkl}| \times \exp(i\phi_{hkl})$$

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} (\bar{F}_{hkl}) \times e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$$

Die Position der Schwermetallatome und die Ableitung der Phaseninformation werden durch das Programm *AutoSHARP* durchgeführt. Die Strukturfaktoren \bar{F}_P werden in *DM (Density Modification)* eingegeben und nach Korrektur der Dichte außerhalb des Proteins (*solvent*

flattening) und Anpassen der Dichtegradienten (*histogram matching*) ein neuer Datensatz mit verbesserten Phasen berechnet, aus welchem die Elektronendichtekarten mit *FFT* (*Fast Fourier Transform*) berechnet werden.

2.2.4.4 Modellbau und Strukturverfeinerung

Das Modell der m₃G-cap bindenden Domäne von SPN1 mit gebundenem Cap wird im Graphikprogramm O gebaut und mit CNS verfeinert.

In die 2 F_{obs}-F_{calc} Elektronendichtekarte wird zunächst ein C_α-Gerüst eingepaßt, welches nach ersten Strukturverfeinerungen schrittweise in die Aminosäuresequenz überführt wird. Während der Strukturverfeinerung werden sowohl *Van-der-Waals*-Abstände, polare und ionische Wechselwirkungen und Temperaturfaktoren der einzelnen Atome (B_j) berücksichtigt, als auch versucht die beobachteten den berechneten Strukturfaktoren anzugleichen. Die Qualität des Angleichs wird durch Vergleich der beobachteten und der aus dem Modell berechneten Strukturfaktoramplituden abgeschätzt (R-Faktor). Der kristallographische R-Faktor R_{cryst} ist der aus diesem Vergleich berechnete Fehler und ist definiert als:

$$R_{cryst} = \frac{\sum ||F_{obs} - F_{calc}||}{\sum |F_{obs}|}$$

F_{obs} entspricht den beobachteten und F_{calc} den berechneten Strukturfaktoramplituden. Zur weiteren Kontrolle der Strukturverfeinerung wird der freie R-Faktor (R_{free}) herangezogen, der sich auf dieselbe Weise wie R_{cryst} berechnet, jedoch von nicht in die Verfeinerung einbezogenen Reflexen (5 %) Gebrauch macht. Dieses sogenannte „Testset“ wird nur zur Kreuzvalidierung eingesetzt, um die Konvergenz der Strukturverfeinerung zu kontrollieren. Zusätzlich wird die verfeinerte Elektronendichtekarte mit der ursprünglichen Dichte, berechnet aus der Phaseninformation der Schwermetallatome verglichen und eine F_{obs}-F_{calc} Elektronendichtekarte zum Abgleich verwendet. Das m₃GpppG-Cap wird, nachdem das Proteinmodell sich nicht mehr verfeinern läßt, in die Elektronendichtekarte eingefügt und ebenfalls mit CNS verfeinert.

Parameter- und Topologiedateien für das m₃GpppG-Cap Dinukleotid werden mit Hilfe des Dundee PRODRG Servers generiert und Zuckerkonformationen modifiziert (9.3). Wassermoleküle werden zuletzt manuell eingefügt und in die Strukturverfeinerung einbezogen.

2.2.5 Spektroskopische Methoden

2.2.5.1 Absorption

Alle Absorptionsmessungen werden an einem Ultraspec2100pro Spektrophotometer in 0.5 x 1 cm² Küvetten durchgeführt.

2.2.5.1.1 Berechnung nativer molarer Extinktionskoeffizienten

Extinktionskoeffizienten nativer Proteine bei 280 nm (ϵ_{280}) werden nach Gill & von Hippel (Gill & von Hippel, 1989) ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz errechnet.

$$A = \epsilon \times c \times d$$

Dabei entsprechen ϵ dem molaren Extinktionskoeffizienten [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$], c der Konzentration [M] und d der Schichtdicke [cm]. Der Extinktionskoeffizient eines denaturierten Proteins ($\epsilon_{280\text{denat}}$) lässt sich von der Aminosäuresequenz ableiten (DNAstar, Lasergene), während die Absorption bei 280 nm (A_{280}) einer nativen und einer denaturierten Proteinprobe gleicher Konzentration (c) in einer Küvette gleicher Schichtdicke (d) messbar sind.

$$\frac{A_{280\text{denat}}}{A_{280\text{nat}}} = \frac{\epsilon_{280\text{denat}} \times c \times d}{\epsilon_{280\text{nat}} \times c \times d}$$

$$\epsilon_{\text{nat}} = \frac{\epsilon_{\text{denat}} \times A_{\text{nat}}}{A_{\text{denat}}}$$

Es werden Proteinlösungen einer Konzentration von 2.5 μM in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6.5 eingesetzt, wobei die denaturierte Probe zusätzlich mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert wird. Die Messungen werden bei 20 °C durchgeführt.

2.2.5.1.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Nucleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung werden verdünnte Protein- bzw. Nucleinsäurelösungen eingesetzt und bei 280 bzw. 260 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgt anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes (2.2.5.1.1) nach drei unabhängigen Messungen.

Ausgehend von einem gemittelten Absorptionskoeffizienten für dsDNA, entspricht bei 1 cm Lichtweg eine OD_{260} von 1 in etwa einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, während bei ssDNA eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ entspricht. Die Konzentrationen der Cap-Di- und Oligonucleotide sind nur schwer festzustellen, da die Methylierungen an der Guaninbase keine Berechnung über das theoretische Absorptionsverhalten der Basen zulässt. Genaue Extinktionskoeffizienten sind aufgrund des hohen Materialverbrauches nur für wenige Varianten bekannt. Verwendete Dinucleotide wurden von der Firma „Kedar“ (Warschau) entweder eingewogen oder mittels der Extinktionskoeffizienten genaue Stoffmengen errechnet. Die Abweichungen betragen ca. 10-15 %. Die Konzentrationen der über Umkehrphasenchromatographie regenerierten Dinucleotide werden über die bekannten Koeffizienten errechnet.

Dinucleotid	pH-Wert	Temperatur [°C]	Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
$\text{m}^7\text{GpppG} / \text{Na}^+$	7.0	20	$\epsilon_{255} = 22600$
$\text{m}^7\text{GpppA} / \text{Na}^+$	7.0	20	$\epsilon_{255} = 21500$
$\text{m}_3\text{GpppG} / \text{Na}^+$	7.0	20	$\epsilon_{257} = 26200$

(Persönliche Mitteilung von E. Darzinkiewicz).

Konzentrationen von verdünnten Proteinlösungen werden über deren Absorption bei 280 nm bestimmt, wobei der verwendete molare Extinktionskoeffizient ($\epsilon_{280\text{nat}}$) zunächst nach der Methode von Gill & von Hippel bestimmt wird (2.2.5.1.1). Um Verunreinigungen mit Nucleinsäuren auszuschließen, werden von gereinigten Proteinen Absorptionsspektren angefertigt.

2.2.5.1.3 Absorptionsspektren

Vor deren Einsatz in der Fluoreszenzspektroskopie werden die Absorptionseigenschaften verwendeter Proteine und Cap-Oligonukleotide getestet. Absorptionsspektren von 220-350 nm werden von je 20 μ M Cap-Oligonukleotid und je 5 μ M Proteinen aufgenommen.

2.2.5.2 Fluoreszenz

Fluoreszenzmessungen werden an einem Spektrofluorimeter Fluoromax III (Jobin Yvon) bei 20 °C in 100 mM NaCl, 50 mM HEPES / NaOH pH7.5 in 0.5 x 1 cm² Küvetten durchgeführt.

2.2.5.2.1 Emissions- und Anregungsspektren

Emissionsspektren werden nach Anregung des Fluorophors bei 295 nm (Tryptophan) mit 1 nm Bandbreite (Anregung), einer Integrationszeit von 0.5'' und einer Schrittweite von 0.5 nm und 5 nm Bandbreite (Emission) aufgenommen. Alle Spektren werden um den Pufferbeitrag korrigiert. Zur Bestimmung des Bindungsverhaltens von m₃GpppG-Cap zu SPN1wt und verschiedenen Mutanten werden Emissionsspektren der Proteine alleine und mit 20-fachem molaren Überschuss an Cap aufgenommen. Zur Korrektur der Cap-Eigenfluoreszenz werden Spektren des Komplexes um den Fluoreszenzbeitrag des Caps korrigiert, wobei die Änderung der Cap-Eigenfluoreszenz bei Proteinbindung hier nicht berücksichtigt wird.

Fluoreszenzanregungsspektren werden unter Variation der Anregungswellenlänge (Bandbreite 1 nm) bei einer Emission von 315 nm, 340 nm oder 400 nm (5 nm Bandbreite, Integrationszeit 0.5'', Schrittweite 0.5 nm) gemessen. Auch hier werden die Spektren um den Pufferbeitrag korrigiert.

2.2.5.2.2 Gleichgewichtstitrationen zur Bestimmung von Bindungskonstanten

Bei Titrations von SPN1 wt human mit Cap-Oligonukleotiden wird nach Gleichgewichtseinstellung die Fluoreszenzabnahme bei 340 nm ($m_3\text{GpppA}_{mp}\text{U}_{mp}\text{A}$ und $m^7\text{GpppA}$) oder 315 nm ($m_3\text{GpppG}$ und $m_3\text{GpppA}$) bei 10 nm Bandbreite nach Anregung des Fluorophors (Tryptophan) bei 295 nm verfolgt. Die Messungen werden jeweils für 1' mit einer Schrittweite von 0.5 nm und einer Integrationszeit von 0.5'' durchgeführt. Alle Proben werden zuvor gemischt und bis zur Messung bei RT belassen. Jede Probe wird für ca. 5' im Küvettenhalter bei 20 °C vorinkubiert. Alle Messungen werden dreifach wiederholt und um den Beitrag des Puffers korrigiert. Dissoziationsgleichgewichtskonstanten werden durch Anpassen der Lösung einer quadratischen Funktion an die Daten errechnet, die die Komplexkonzentration unter Annahme einer 1:1 Stöchiometrie beschreibt. Da die Eigenfluoreszenz der Cap-Oligonukleotide durch eine lineare Regression beschrieben werden kann, ist es möglich die Steigung dieser Funktion in die Lösung der quadratischen Funktion additiv miteinzubeziehen (9.1):

$$F = F_0 + \Delta F_{\max} \times \frac{\frac{[E_0] + [L_0] + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[E_0] + [L_0] + K_d}{2}\right)^2 - [E_0] \times [L_0]}}{[E_0]} + m \times [L_0]$$

Die gemessene Bindungskurve ist Gesamtfluoreszenz F in Abhängigkeit der freien Ligandenkonzentration $[L_0]$, wobei $[E_0]$ die freie Proteinkonzentration, K_d die Dissoziationskonstante, F_0 die Grundfluoreszenz, ΔF_{\max} die maximale Fluoreszenzabnahme und m die Steigung der Funktion in Abhängigkeit von $[L_0]$ ist. Der Kurvenangleich erfolgt mit konstantem $[E_0]$ und F_0 , ΔF_{\max} , m und K_d als Anpassungsparameter und liefert die K_d des untersuchten Gleichgewichtes.

Die einzige Ausnahme stellt die Gleichgewichtstitration von SPN1 wt mit $m^7\text{GpppA}$ dar. Aufgrund des sehr hohen K_d -Wertes müssen sehr hohe Cap-Konzentrationen zu dessen Bestimmung eingesetzt werden. Das eingesetzte Cap verursacht ab einer Konzentration von ca. 250 μM einen *inner filter effect*. Das bedeutet, die Absorption des Caps bei der eingesetzten Anregungswelle ist grösser als 1, wodurch nur ein Teil des eingestreuerten Lichtes den Küvettenmittelpunkt erreicht und somit die beobachtete Fluoreszenz stark abnimmt. Der

inner-filter effect kann korrigiert werden, indem man die beobachtete Fluoreszenz mit $10^{-A/2}$ multipliziert, wobei A die Absorption bei eingesetzter Wellenlänge ist. Der Einfluß des *inner-filter effect* auf die Messung war jedoch zu groß für eine Korrektur. Um sich dem tatsächlichen K_d -Wert anzunähern wird in diesem Fall die Cap-Eigenfluoreszenz bei jedem Messpunkt von der Tryptophanfluoreszenz abgezogen und der Kurvenangleich ohne den Steigungsterm vorgenommen:

$$F = F_0 + \Delta F_{\max} \times \frac{\frac{[E_0] + [L_0] + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[E_0] + [L_0] + K_d}{2}\right)^2 - [E_0] \times [L_0]}}{[E_0]}$$

3 Ergebnisse

3.1 *Strukturbestimmung und -analyse der m₃G-cap-bindenden Domäne von Snurportin1 im Komplex mit m₃GpppG*

Da die m₃G-Cap-bindende Domäne von Snurportin1 (SPN1) weder eine Sequenzähnlichkeit zu bereits bekannten Proteinen zeigt, noch Erkenntnisse bezüglich der Diskriminierung von m⁷G-cap und m₃G-Cap durch SPN1 bekannt waren, war es sinnvoll eine strukturelle Aufklärung von SPN1 im Komplex mit m₃G-Cap in Angriff zu nehmen. Des Weiteren wurde gezeigt, daß der Import spleißosomaler UsnRNPs durch Snurportin1 und Importin β und die Dissoziation von der Kernpore (NPC) energieunabhängig möglich ist (Huber *et al.*, 2002), was eine strukturelle Analyse des Komplexes aus SPN1 und Importin β im Gegensatz zum Importkomplex bestehend aus Importin α und Importin β interessant gestaltet.

3.1.1 **Kristallisationsversuche von SPN1 alleine, im Komplex mit Importin β und / oder m₃G-Cap**

Die Präparation von SPN1 basierte auf bereits publizierten Daten (Schmidt, 2001; Strasser *et al.*, 2004). Die Reinigung von Importin β ist in Abschnitt (3.5.2) näher beschrieben. Für die Kristallisationsansätze von SPN1 wurde das Protein in einer Endkonzentration von ~7 mg/ml eingesetzt. Für die Kristallisation des Komplexes aus SPN1 und Importin β wurden beide Proteine in äquimolaren Verhältnissen gemischt, erneut über eine Superdex 200 (26/60) Gelfiltrationssäule gereinigt (2.2.2.3) und in einer Konzentration von 5-10 mg/ml für die Kristallisationsansätze verwendet. Für Kristallisationsansätze von SPN1 und m₃GpppG-Cap (m₃GpppA_{mp}U_{mp}A) oder SPN1, Importin β und m₃GpppG (m₃GpppA_{mp}U_{mp}A) wurden die jeweiligen Cap-Oligonukleotide in 5-10-fachem molaren Überschuß eingesetzt. Die genannten Komplexe wurden in allen bereits aufgeführten *Screens* (2.1.11) bei 4 °C und 20 °C eingesetzt. Bis jetzt konnte kein Kristallwachstum in den angesetzten Bedingungen beobachtet werden.

Da Vollängen-SPN1 in Kombination mit Importin β und / oder m_3G -Cap nicht kristallisiert werden konnte, sollten stabile Fragmente von SPN1 mit verbleibender Cap-Bindungsaktivität für die Kristallisation generiert werden.

3.1.2 Kristallisation der m_3G -Cap-bindenden Domäne von SPN1 mit m_3G -Cap Oligo und Kristallanalyse

Der Einsatz verschiedener Proteasen zur Generation stabiler, kristallisierbarer Fragmente von SPN1 human (GluC, Elastase, Plasmin, Thrombin, Trypsin, LysC) wurde bereits beschrieben (Schmidt, 2001). Lediglich der Verdau mit GluC (V8) führte zu stabilen Fragmenten mit Molekulargewichten von ~ 37 , 26 und 24 kDa (Abbildung 12A). Die Cap-Bindungsfähigkeit der Fragmente wurde durch UV-Quervernetzung mit radioaktiv markiertem $m_3GpppA_{mp}U_{mp}A[P^{32}]pCp$ -Oligo nachgewiesen und der N-Terminus durch Edman-Abbau bestimmt. Die Abschätzung des C-Terminus erfolgte anhand von SDS-Gelen und der potentiellen Proteaseschnittstellen C-terminal von sauren Aminosäuren (Glu, Asp). Auch der zeitliche Verlauf des Proteasenverdaus mit GluC in An- und Abwesenheit von $m_3GpppA_{mp}U_{mp}A$ wurde bereits gezeigt (Abbildung 12A) (Schmidt, 2001).

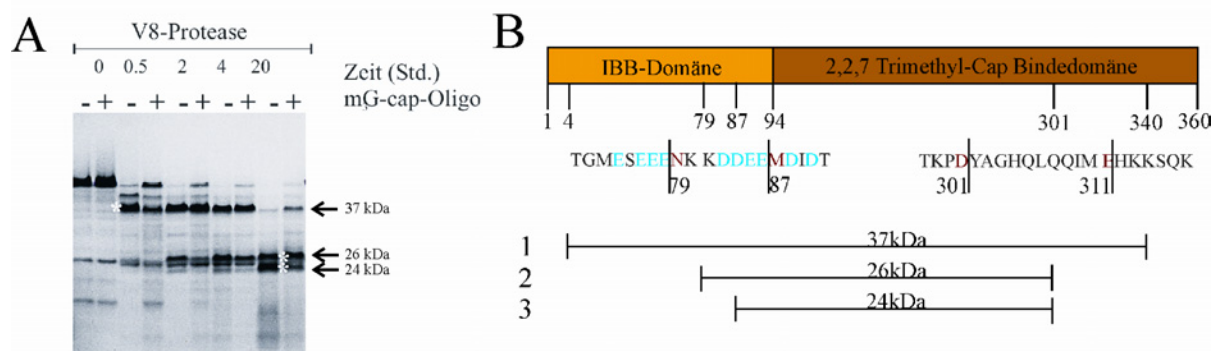


Abbildung 12: Snurportin1 Fragmente nach proteolytischem Verdau. (A) Zeitlicher Verlauf des GluC-Verdaus von SPN1 in An- und Abwesenheit von $m_3GpppA_{mp}U_{mp}A$ -Cap (Schmidt, 2001). Der Verdau wurde bei 23 °C für die angegebenen Zeiten durchgeführt. Die mit Sternchen markierten Banden sind in Graphik B näher beschrieben. (B) Snurportin1 setzt sich aus einer Importin β -bindenden (IBB) Domäne und einer 2,2,7 trimethyl (m_3G)-Cap-bindenden Domäne zusammen. Dargestellt sind das Vollängen-Protein (1) und die nach dem Verdau erhaltenen Fragmente (2-4). (1) Vollängen-SPN1 As 1-360, (2) 37 kDa Fragment As 4-301/311, (3) 26 kDa Fragment As 79-301/311, (4) 24 kDa Fragment As 87-301/311. Die entsprechenden N- bzw. C-terminalen Aminosäuren der Fragmente 3 und 4 sind rot dargestellt, während die sie umgebenden sauren Aminosäuren blau sind.

Das m_3G -Cap scheint kaum Einfluß auf den GluC-Verdau zu haben, wie in Abbildung 12A zu sehen ist. Korrespondierende Proteaseverdau mit (+) und ohne (-) m_3G -Cap Oligonukleotid zeigen kaum unterschiedliche Bandenmuster. Abbildung 12B zeigt mögliche Schnittstellen der Protease und die korrespondierenden Längen der entstandenen Fragmente. Für Kristallisationsversuche wurde Snurportin1 nach der Reinigung in 100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 2 mM DTT auf 5 ml mit ca. 0.5-2 mg/ml konzentriert und für 40' bei 23 °C mit 1 mM $CaCl_2$ und 1:50 1 $\mu g/\mu l$ GluC versetzt. Die Reaktion wurde mit 1 mM PMSF in Isopropanol gestoppt (2.2.2.6.2). Anschließend wurde der komplette Ansatz im gleichen Puffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 2 mM EDTA und 2 mM DTT) über eine Superdex 75 (26/60) Gelfiltrationssäule gegeben (Abbildung 13A), auf ~ 7 mg/ml konzentriert und für die Kristallisation mit einem 5-fachen molaren Überschuß m_3GpppG -Cap gemischt (2.2.4.1). Wie Abbildung 13B zeigt, konnten die Fragmente über Ausschlußchromatographie nicht voneinander getrennt werden. Der Gelfiltrationsschritt war aber zum Umpuffern des Ansatzes und zur Abtrennung der GluC-Protease notwendig. Der Ansatz einer Reinigung wurde innerhalb von maximal 2 d für Kristallisationsversuche eingesetzt (2.2.4.1).

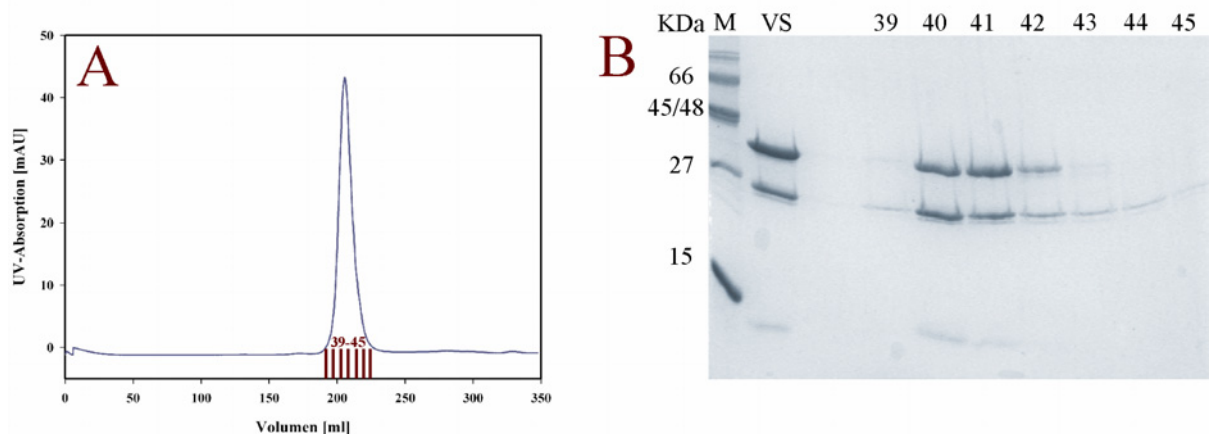


Abbildung 13: Ausschlußchromatographie nach GluC-Verdau des Vollängen-SPN1. (A) Elutionsprofil des Säulenaufes. Auf der x-Achse ist das Volumen [ml] und auf der y-Achse die UV-Absorption bei 280 nm in [mAU] aufgetragen. Dargestellt sind die Fraktionen (5 ml), welche auf ein SDS-Gel (B) aufgetragen wurden. (B) SDS-PAGE des Gelfiltrationlaufes. Neben dem Marker (M) wurde eine Probe vor dem Säulenauftrag genommen (VS) und alle Fraktionen (39-45) aufgetragen.

Erste nadelförmige Kristalle konnten nach 4 d bei 20 °C in Bedingung 44 des *Crystal Screen* PEG/ION (20 % PEG3350, 0.2 M di-Ammoniumhydrogenphosphat) beobachtet werden. Durch Variation der Bedingung konnten die nadelförmigen Kristalle lediglich optimiert

werden; größere dreidimensionale Kristalle entstanden nicht. Einzelne gleichmäßige Nadeln wuchsen in 8 % PEG10-20k und 100 mM MES pH 6.0 (Abbildung 14A) und wurden für *Mikroseeding*-Experimente (2.2.4.1.1) in Tropfen mit frisch präpariertem Protein und 8 % PEG 10k und 200 mM Natriumcitrat pH 5.5 eingesetzt. Hexagonale Kristalle (50 x 50 x 30 μm) entstanden aus den Kristallisationskeimen innerhalb von 3 d (Abbildung 14B), erreichten an einer Drehanode ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) allerdings nur eine Auflösung von $\sim 4 \text{ \AA}$. Dennoch konnten die Kristalle der Raumgruppe P3 mit Einheitszellängen von $a = b = 56.3 \text{ \AA}$, $c = 269.1 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 120^\circ$ und $\gamma = 90^\circ$ zugeordnet werden. Diese hexagonalen Kristalle wurden erneut für *Mikroseeding*-Versuche in den gleichen Puffer eingesetzt. Innerhalb von 3 d entstanden größere Kristalle (100 x 100 x 200 μm) mit besseren Streueigenschaften (Abbildung 14C). Vor der Datenaufnahme wurde ein geeigneter Kryopuffer ausgewählt, nachdem mehrere Kryopuffer getestet wurden (2.2.4.1.2).

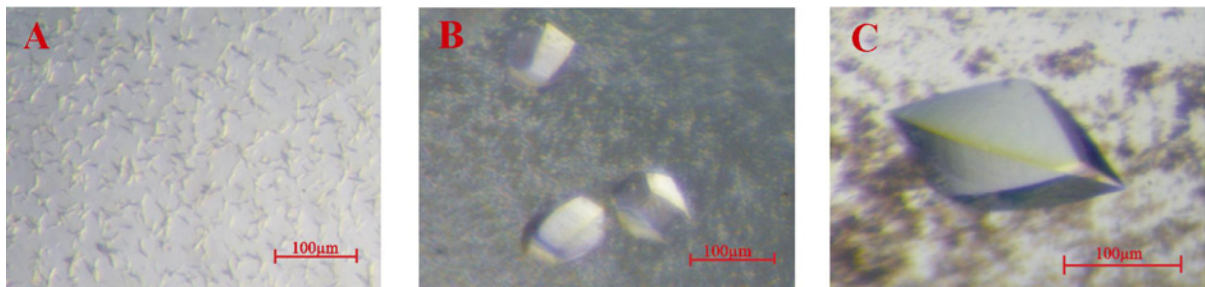


Abbildung 14: Optimierung des Kristallwachstums durch *Mikroseeding* Experimente. (A) Nadelartige Kristalle aus 8 % PEG 10k und 100 mM MES pH 6.0, die für *Mikroseeding* verwendet wurden. (B) Hexagonale Kristalle nach erstem *Seeding*-Schritt aus 8 % PEG10k und 200 mM Natriumcitrat pH 5.5. (C) Kristalle nach dem letzten *Seeding*-Schritt im selben Puffer.

Da die SPN1-Fragmente nach dem GluC-Verdau nur schlecht über Ausschlußchromatographie zu trennen waren und die Identität des kristallisierten Fragmentes damit nicht eindeutig war, wurden 5 Kristalle nach dem letzten *Seeding*-Schritt in ddH₂O gewaschen, in SDS-Probenpuffer gelöst und durch SDS-PAGE analysiert (2.2.2.5). Es stellte sich heraus, daß die Kristalle vermutlich aus dem bereits erwähnten 26 kDa Fragment bestehen, obwohl das 37 kDa-Fragment nach der Reinigung eindeutig im Überschuß vorlag (Abbildung 15).

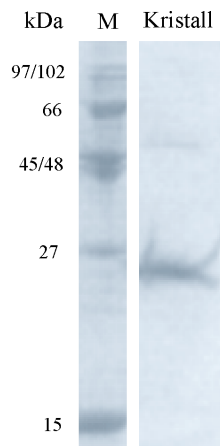


Abbildung 15: Kontrolle gelöster Kristalle (SDS-PAGE).

3.1.3 Datenaufnahme und -prozessierung

Von einem Kristall der m_3G -Cap-Bindedomäne mit gebundenem m_3GpppG aus 8 % PEG 10k und 200 mM Natriumcitrat pH 5.5 wurde nach dem zweiten *Seeding*-Versuch ein nativer Datensatz am Berliner Elektronensynchrotron (BESSY) bei 100 K und einer Wellenlänge von 0.98 Å aufgenommen. Die maximale Auflösung des Kristallgitters war 2.4 Å mit einer Verbesserung von 0.5 Å gegenüber der heimischen Drehanode. Nach Indizierung und Integration der gemessenen Reflexe mit Denzo/Scalepack konnte die Raumgruppe P422 mit einer vierzähligen und zwei darauf senkrecht stehenden zweizähligen Achsen zugeordnet werden. Das Vorliegen einer höher symmetrischen Raumgruppe als P422 konnte durch systematische Abwesenheit jedes vierten Reflexes auf der l-Achse und jedes zweiten Reflexes auf der h-Achse im reziproken Gitter geschlossen werden. Mit dieser Information ließ sich die Raumgruppe auf $P4_32_12$ oder $P4_12_12$ eingrenzen, da zu diesem Zeitpunkt nicht auszumachen war, ob es sich um eine links- oder rechtsgängige Schraubenachse handelt. Die Raumgruppe konnte erst anhand der Elektronendichtekarte auf $P4_12_12$ (Nr. 92) festgelegt werden. Zur Ermittlung der Phasen wurden Kristalle vor der Datenaufnahme in Schwermetallsalzlösungen (Hg, U, Pt) inkubiert und danach zweimal in Kryopuffer gewaschen (2.2.4.1.3; 2.2.4.1.2).

Zur Abschätzung der Anzahl an Molekülen in der asymmetrischen Einheit wurde das Volumen der Einheitszelle aus den Zelldimensionen zu 422370 \AA^3 errechnet. Die Division des Einheitszellenvolumens durch die Masse der enthaltenen Proteinatome liefert den Matthews-Parameter V_M (Matthews, 1968). Er liegt für Proteinkristalle im Bereich von 1.7-

3.0 Å³/Da. Da die tetragonale Raumgruppe durch acht Symmetrieoperatoren definiert ist, setzt sich die Einheitszelle aus acht asymmetrischen Einheiten zusammen. Somit ist die Einheitszelle bei einem Molekül pro asymmetrischer Einheit aus insgesamt acht Molekülen aufgebaut. Der Lösungsmittelgehalt ergibt sich entsprechend mit ca. 40 % bei einem Molekül in der asymmetrischen Einheit, was die einzige sinnvolle Lösung darstellt.

Tabelle 2: Datensammlung eines nativen Kristalls der m₃G-Cap-bindenden Domäne mit gebundenem m₃GpppG-Cap und derivatisierter Kristalle zur Phasenbestimmung.

Datensatz	Nativ	MIR		
		Hg	U	Pt
Wellenlänge [Å]	0.98	1.54	1.54	1.54
Auflösung [Å]	20-2.4	100-3.5	100-3.5	100-3.5
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2
Einheitszellendimensionen [Å/°]	a = b = 57.47	a = b = 57.43	a = b = 57.30	a = b = 57.12
	c = 130.09	c = 130.83	c = 131.39	c = 131.47
	α = β = γ = 90	α = β = γ = 90	α = β = γ = 90	α = β = γ = 90
Beobachtete Reflexe	249994 (8674)	57589 (3113)	141423 (3119)	109333 (3087)
Vollständigkeit der Reflexe [%]	95.4	100.0	99.9	99.7
Signal/Rauschverhältnis (I/δ)	18.7 (3.0)	18.1 (9.3)	17.7 (5.8)	16.2 (3.6)
R _{merge}	0.09	0.112	0.141	0.132
Redundanz [-fach]	11 (4.2)	10	11	13
Moleküle/asymmetrischer Einheit	1			
Einheitszellvolumen [Å ³]	422370			
V _M [Å ³ /Da]	2.03			

Werte in Klammern beziehen sich auf die äußere Schale.

$R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_{hkl}^i - \langle I_{hkl} \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle I_{hkl} \rangle}$, wobei die Summe i über alle Einzelmessungen des Reflexes hkl berechnet ist.

3.1.4 Multipler Isomorpher Ersatz (MIR)

Zur Abschätzung der Phaseninformation wurden Schwermetallderivat-Kristalle, die in UO_2Ac_2 , Hg (EMTS) und K_2PtCl_4 getränkt wurden verwendet (2.2.4.1.3). Derivatisierungen mit Xenongas und $\text{KAu}(\text{CN})_2$ waren nicht erfolgreich.

Die Datensätze konnten in der gleichen Raumgruppe mit ähnlichen Einheitszelldimensionen prozessiert werden, womit der Anspruch auf Isomorphie erfüllt war (Tabelle 2). Die Auflösung war nach der Inkubation mit Schwermetallsalzen zwar limitiert auf 3.5 Å, konnte nach Annäherung der initialen Phaseninformation aber auf die hochauflösenden Bereiche des nativen Datensatzes übertragen werden. Die Schwermetall-Strukturfaktoren lassen sich aus der Differenz der Strukturfaktoren aus den Schwermetallderivaten und der des nativen Proteins berechnen, wodurch klar wird, daß sowohl Datensätze des nativen Proteins, als auch der Derivat-Kristalle zur Phasenbestimmung durch MIR benötigt werden (2.2.4.3).

$$\vec{F}_{PH} - \vec{F}_P = \vec{F}_H$$

Bei isomorphen Kristallgittern können die Vektorbeträge der Schwermetall-Substruktur abgeleitet und damit Schwermetallpositionen im reziproken Raum über die Patterson-Funktion bestimmt werden (2.2.4.3).

Tabelle 3: Symmetrieeoperatoren der Raumgruppe P4₁2₁2.

x, y, z	-x, -y, 0.5+z	0.5-y, 0.5+x, 0.25+z	0.5+y, 0.5-x, 0.75+z
x, y, -z	-y, -x, 0.5-z	0.5-x, 0.5+y, 0.25-z	0.5+x, 0.5-y, 0.75-z

Eine Darstellung der Schwermetallatompositionen im realen Raum ist durch Anwendung der Raumgruppen-spezifischen Symmetrieeoperatoren möglich. Die Raumgruppe P4₁2₁2 ist durch acht Symmetrieeoperatoren definiert (Tabelle 3).

Mit Hilfe des Programmes *AutoSHARP* wurden die Schwermetallatompositionen der drei verwendeten Derivate gefunden (Tabelle 4). Aus den daraus abgeleiteten Strukturfaktoren des Proteins (2.2.4.3) wurde mit Hilfe des Programms *FFT*, welches die Fouriertransformation durchführt, eine Elektronendichtekarte errechnet.

Tabelle 4: Schwermetallatompositionen aus *AutoSHARP*

CRYST1	57.472	57.472	130.090	90.00	90.00	90.00	P41212
SCALE1	0.017400	0.000000	0.000000			0.000000	
SCALE2	0.000000	0.017400	0.000000			0.000000	
SCALE3	0.000000	0.000000	0.007687			0.000000	
	Atomtyp	x	y	z	Belegung der Position	Temperaturfaktor [\AA^3]	
ATOM	1 PT	24.100	3.629	11.648	1.20	161.07	
ATOM	2 PT	36.059	22.185	9.255	1.34	266.50	
ATOM	3 PT	27.112	54.361	0.742	0.98	213.78	
ATOM	4 PT	21.667	20.289	7.835	0.01	213.78	
ATOM	5 U	11.848	30.625	4.861	0.94	58.12	
ATOM	6 U	7.043	25.249	5.518	0.78	48.56	
ATOM	7 U	9.956	22.569	5.001	0.63	35.97	
ATOM	8 HG	21.667	20.289	7.835	0.86	63.51	
ATOM	9 HG	40.070	19.335	10.617	0.62	54.63	
ATOM	10 HG	54.733	26.528	129.844	0.40	80.12	
ATOM	11 HG	35.122	20.492	10.227	0.24	60.04	

In der ersten Zeile (CRYST1) sind die Einheitszelldimensionen und die Raumgruppe aufgeführt, während in der zweiten bis vierten Zeile (SCALE1-3) die angewandte Rotationsmatrix dargestellt ist. In der zweiten Spalte der Tabelle sind die identifizierten Schwermetalle benannt und durchnummeriert, während in der dritten bis fünften Spalte die Koordinaten dargestellt sind. Die folgenden Spalten sechs und sieben beschreiben die Belegung der Schwermetallposition und den B-Faktor in [\AA^3] (*AutoSHARP*).

3.1.5 Modellbau, Strukturverfeinerung und Qualität des Modells

Der Einbau von Aminosäuren erfolgte in eine $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte der asymmetrischen Einheit, in welcher die beobachteten Strukturfaktoren zweifach in die Berechnung miteinbezogen wurden. Die erste Elektronendichtekarte nach den Dichtemodifikationen (2.2.4.3) war noch sehr undeutlich. Es waren lediglich Sekundärstrukturelemente und ein durchgängiges C_{α} -Rückgrat des Proteins erkennbar (Abbildung 16).

Im Programm O konnte ein C_{α} -Gerüst eingebaut werden, wodurch sich die initiale Elektronendichte nach dem ersten Verfeinerungszyklus in *CNS* entscheidend verbessern ließ. Mittlerweile war es aufgrund dieser verfeinerten Elektronendichte auch möglich Aminosäureseitenketten zuzuordnen.

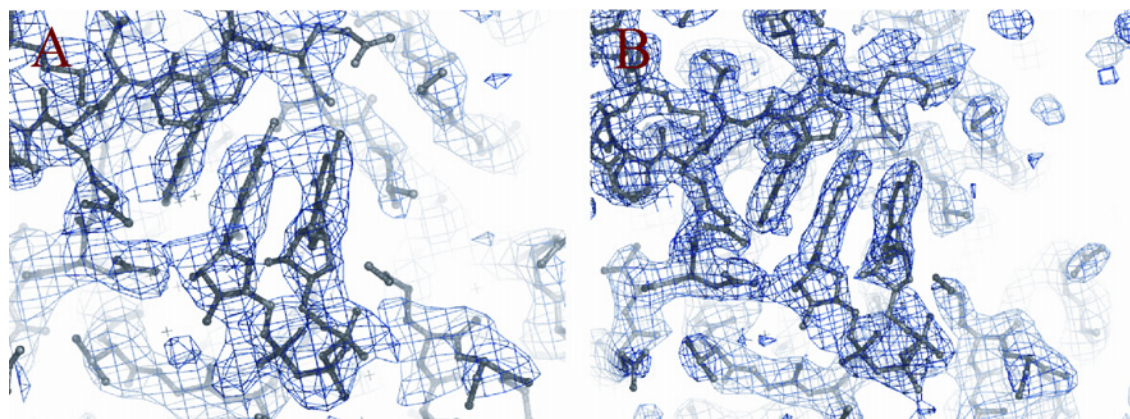


Abbildung 16: Vergleich der initialen und verfeinerten Elektronendichtekarte am Beispiel der Cap-Bindungstasche. Aminosäurereste und das m_3GpppG -Cap sind im Kugel-Stab-Modell in schwarz dargestellt, während die Elektronendichte (1σ) in blau gezeigt ist. **(A)** Initiale Elektronendichte nach Annäherung der Phasen mit MIR. **(B)** Elektronendichte nach der letzten Verfeinerung in CNS.

Unter Zuhilfenahme einer Sekundärstrukturvorhersage wurde schließlich die Aminosäuresequenz in die Elektronendichtekarte eingebaut. Bei allen nachfolgenden Modellen bis zum Einbau des Cap-Dinukleotides wurde neben der Positions- und Temperaturfaktorverfeinerung auch ein *simulated annealing* durchgeführt. Das Modell wurde anhand der neu berechneten Elektronendichtekarten solange korrigiert (ca. 20 Zyklen), bis die R-Faktoren (R_{cryst} , R_{free}) sich nicht mehr verringern ließen, aber nicht mehr als 5 Prozentpunkte voneinander entfernt waren (2.2.4.4). Anhand des Ramachandrandiagramms (Laskowski *et al.*, 1993; Ramachandran & Sasisekharan, 1968) wurde nachgeprüft, ob alle Bindungswinkel im Molekül (ϕ/ψ -Winkel) in sterisch erlaubten Bereichen liegen. Das m_3GpppG -Cap wurde anschließend in die verbliebene Elektronendichte eingebaut. Als Vorlage dienten die Koordinaten zweier GTP-Moleküle aus der Proteindatenbank (PDB). Topologie- und Parameterdateien für das Cap-Dinukleotid existierten noch nicht in der Kleinmolekül-Datenbank und wurden anhand der Atombindungen zueinander mit Hilfe des Dundee PRODRG Servers generiert. Lediglich die Zuckerkonformationen wurden anhand von Datenbankinformationen abgewandelt. Als Vorbild diente die C_3' *endo*-Konformation, welche üblicherweise in RNA vorkommt (9.2 und 9.3). Da die Position der beiden Guaninbasen anhand der Dichteverteilung gut definiert war, wurden diese zuerst eingebaut und das Zuckerphosphatrückgrat in die restliche Dichte eingepaßt.

Tabelle 5: Verfeinerungsstatistiken und stereochemische Parameter.

Auflösungsbereich [Å]:	20-2.4
R_{cryst} [%]:	22.5
R_{free} [%]:	27.6
Anzahl der Atome des Protein:	1629
Anzahl der Atome des Liganden ($m_3\text{GpppG}$):	54
Anzahl der Wassermoleküle:	82
Standardabweichung der Bindungslängen [Å]:	0.0063
Standardabweichung der Bindungswinkel [°]:	1.60
B-Faktor Protein [Å ³]:	46.7
B-Faktor Ligand ($m_3\text{GpppG}$) [Å ³]:	75.5

Das Cap-Dinukleotid wurde innerhalb von ca. 20 Zyklen, soweit es aufgrund der Auflösung möglich war, verfeinert. Anschließend wurde nach der Verfeinerung zusätzlich eine $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte berechnet und für die letzten Korrekturen verwendet. Die $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ Differenzdichtekarte zeigt nur noch über- oder unterbelegte Elektronendichten an.

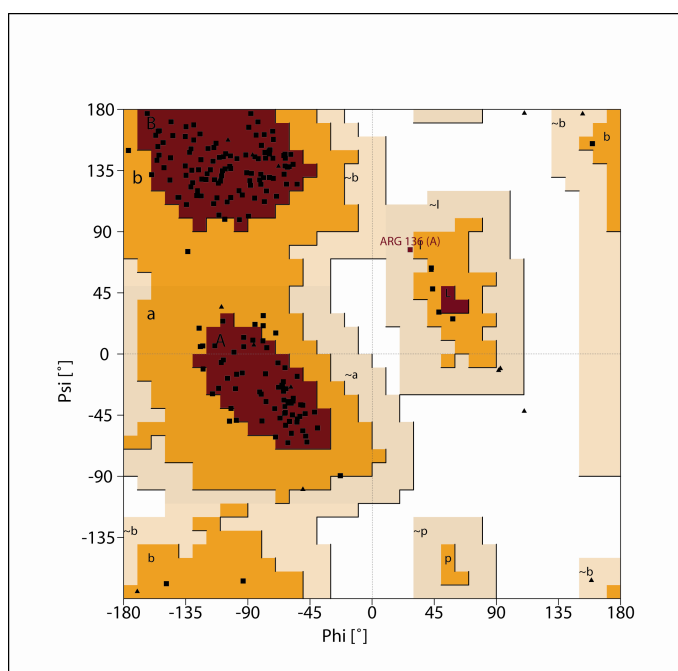


Abbildung 17: Ramachandrandiagramm der $m_3\text{GpppG}$ -Cap-bindenden Domäne von SPN1. Die roten und gelben Bereiche markieren favorisierte und erlaubte ϕ/ψ -Konformationen, während die hellgelben Bereiche zusätzlich erlaubte Konformationen anzeigen. Die möglichen Konformationen basieren auf einer Datenbank von hochaufgelösten Strukturen. (▲) zeigen Glycinreste an und die restlichen Aminosäuren sind durch (■) markiert. Aminosäuren (außer Glycin), die in tolerierbaren Bereichen liegen, sind im Diagramm benannt. A, B und L markieren favorisierte und erlaubte Bereiche für α -Helices, β -Faltblätter und linksgängige Helices, während a, b und l zusätzlich erlaubte und ~a, ~b und ~l tolerierbare Bereiche markieren (*Procheck*).

Anhand dieser Dichte wurden zusätzlich Wassermoleküle eingebaut und verfeinert. Nach der abschließenden Verfeinerung umfaßte das Modell die Aminosäurereste 97-300, wobei das kristallisierte Fragment vermutlich noch weitere Aminosäuren beinhaltet, die jedoch weitgehend ungeordnet bzw. flexibel sind und deshalb nicht in Form von Elektronendichte sichtbar sind. Die Struktur konnte bis zu einem R-Faktor von 22.5 % und einem freien R-Faktor von 27.6 % verfeinert werden (Tabelle 5).

Das Ramachandran-Diagramm (Abbildung 17) zeigt, daß 87.8 % aller Reste, die nicht Glycin sind, in erlaubten Bereichen, 11.6 % in zusätzlich erlaubten und 0.6% in tolerierbaren Bereichen liegen. Der mittlere Temperaturfaktor (B-Faktor) der m_3G -Cap-bindenden Domäne von SPN1 liegt bei ~ 47 %. Der B-Faktor des m_3GpppG -Caps ist mit 75.5 % hoch, was jedoch aufgrund der flexibleren Bereiche der Ribosen und des Phosphatrückgrates zu erwarten war.

3.1.6 Beschreibung der Struktur

Die Kristallstruktur der m_3G -Cap-bindenden Domäne von SPN1 (97-300) setzt sich aus fünf α -Helices und zehn β -Strängen zusammen. Die β -Stränge 2-9 bilden zwei nahezu koplanare β -Faltblätter, welche durch die kreuzenden β -Stränge 1 und 10 verbunden werden (Abbildung 18). Die Cap-Bindungstasche liegt zwischen diesen beiden β -Faltblättern.

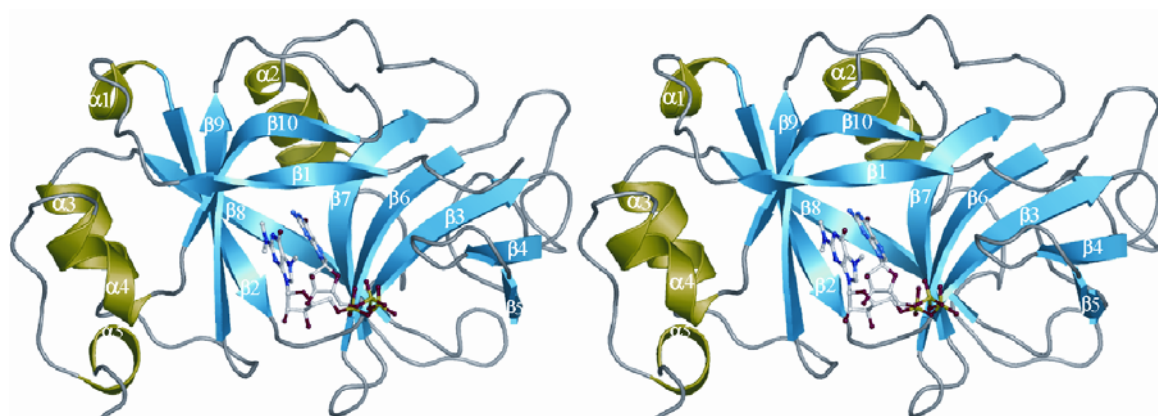


Abbildung 18: Kristallstruktur der m_3G -Cap-bindenden Domäne von SPN1 (As 97-300) mit gebundenem m_3GpppG . SPN1 ist als *Cartoon* in Stereo dargestellt mit blauen β -Faltblättern, grünen α -Helices und grauen Schleifen-Regionen. Sekundärstrukturmotive sind durchgehend vom N- bis zum C-Terminus nummeriert. Das m_3GpppG -Cap ist im Kugel-Stab Modus dargestellt, wobei Stickstoffatome in blau, Kohlenstoffatome in grau, Sauerstoffatome in rot und Phosphoratome in grün gezeigt sind (*Pymol*).

β -Stränge 3-6 bilden ein sogenanntes „Griechisches-Schlüssel-Motiv“, in welchem vier antiparallele β -Stränge durch Schleifen-Regionen in Form eines Griechischen Schlüssels verbunden sind (Abbildung 19). Diese Motive kommen häufig bei RNA-bindenden Proteinen vor. Reste des β -Stranges 3 dieses Motives sind an der Cap-Bindung beteiligt.

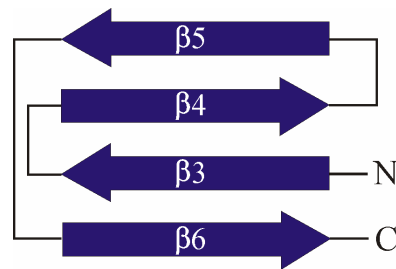


Abbildung 19: „Griechisches-Schlüssel-Motiv“. β -Stränge sind als blaue Pfeile dargestellt und in Bezug auf die Struktur der m_3 G-Cap-bindenden Domäne durchnummeriert. Die Schleifen-Bereiche verbinden in Form schwarzer Linien die β -Stränge.

3.1.6.1 Die Cap-Bindungsstelle

Die Cap-Bindungstasche liegt zwischen beiden β -Faltblättern und wird oben von β -Strang 1 begrenzt. Aminosäuren der β -Stränge 1, 3, 10 und angrenzender Schleifen-Bereiche sind an der Cap-Bindung beteiligt (Abbildung 20A und Abbildung 21). Die beiden Basen liegen fast parallel mit einem Abstand von 3.4-3.9 Å in der Bindungstasche, wobei beide Basen leicht gegeneinander verschoben sind (Abbildung 20B). Die unmethylierte Guaninbase des ersten Nukleotides der snRNA liegt fast genau über dem Dimethylamin der Cap-Base (Abbildung 20B). Die Basenstapelung des Dinukleotides wird auf der Seite der dimethylierten Cap-Base durch die Seitenkette des Trp 276 und auf der Seite des unmethylierten Guanins durch Leu 104 fortgeführt (Abbildung 20A). Zusätzlich geht die m_3 G-Cap-Base hydrophobe Kontakte mit den Seitenketten von Trp 107 und Glu 106 ein, wobei Trp 107 fast senkrecht über der Basenstapelung mit einem Abstand von ungefähr 4.3 Å liegt. Auffälligerweise geht SPN1 nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit der trimethylierten Guaninbase ein; die Hydroxylgruppe von Ser 105 interagiert mit O6 und N1 der Base. Die unmethylierte Base geht ebenfalls Wasserstoffbrückenbindungen mit Ser 105 ein. Hier wechselwirken die NH_2 Gruppe an Position 2 und N1 mit dem Carbonylsauerstoff von Ser 105, wobei O6 der Base mit der Aminogruppe von Ser 105 interagiert (Abbildung 21).

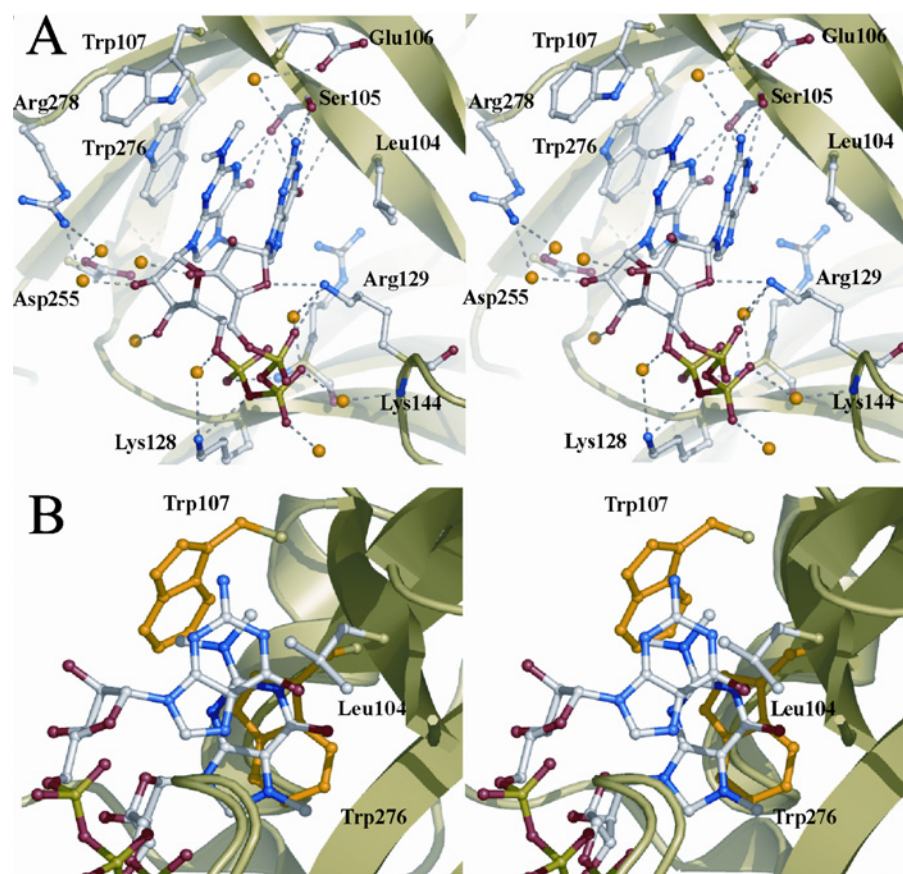


Abbildung 20: Stereodarstellung der Cap-Bindungstasche. Snurportin1 ist im *Cartoon*-Modus in grün dargestellt, wobei Aminosäuren die mit dem Cap-Dinukleotid interagieren, im Kugel-Stab-Modus gezeigt sind. Die Atome des m_3 GpppG-Cap Dinukleotids sind wie in Abbildung 18 gefärbt. (A) Seitenketten der Aminosäuren, die mit dem m_3 GpppG-Cap über Wasserstoffbrückenbindungen oder hydrophobe Kontakte interagieren sind wie das Cap-Dinukleotid gefärbt. Wasserstoffbrückenbindungen sind als gestrichelte Linien dargestellt und Sauerstoffatome der Wassermoleküle, die an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind, als gelbe Kugeln gezeigt. (B) Stereoansicht der Basenstapelung des m_3 GpppG-Caps und Trp 276. Trp 107 ist auch an der Cap-Bindung beteiligt. Tryptophan-Reste sind gelb dargestellt (*Pymol*).

Die Bindung des Cap-Dinukleotides ist zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen basischen Aminosäuren und den Phosphaten bzw. den Ribosen des *Caps* stabilisiert. Die Seitenketten von Lys 128 und Arg 129 wechselwirken mit den Sauerstoffatomen der Phosphatgruppen, und Lys 144 interagiert sowohl mit dem zyklischen Sauerstoff der Ribose der unmethylierten Guaninbase, als auch mit Sauerstoffatomen der Phosphate. Asp 255, Arg 278 und Arg 129 gehen zusätzlich zahlreiche über Wassermoleküle medierte Wasserstoffbrückenbindungen ein (Abbildung 20A).

Aufgrund der Elektronendichteverteilung des Cap-Dinukleotides wird deutlich, daß die Basen in der gestapelten Form sehr fixiert sind, während die Ribosen und das Phosphatrückgrat nicht so eindeutig positioniert sind (Abbildung 22).

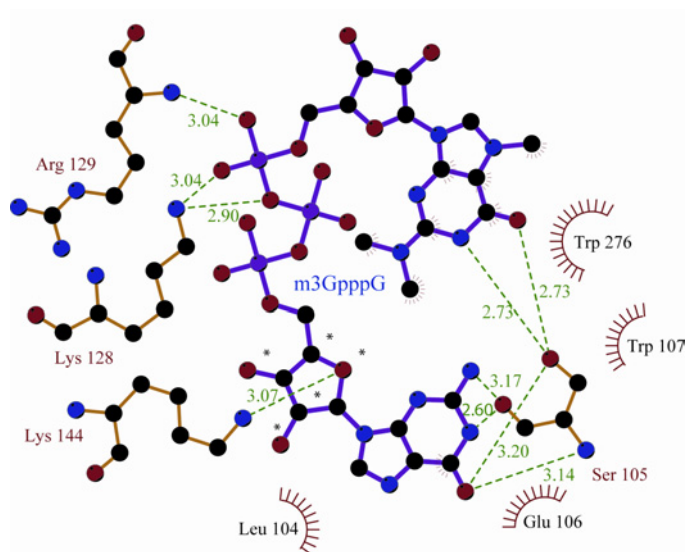


Abbildung 21: Planare Darstellung der m_3G -Cap-Bindungstasche. Dargestellt sind direkte Protein-Liganden-Interaktionen in zweidimensionaler Form. Kohlenstoffatome sind schwarz, Stickstoffatome blau, Sauerstoffatome rot und Phosphoratome lila gefärbt, während Proteinbindungen durch gelbe Striche und Ligandenbindungen durch lila Striche gezeigt sind. Wasserstoffbrückenbindungen werden durch gestrichelte grüne Linien mit Längenangaben [Å] und hydrophobe Interaktionen durch rote Halbkreise markiert (*Ligplot*).

Die methylierte und unmethylierte Guaninbase konnten eindeutig unterschieden werden, da die Position des Dimethylamins an Position N2 in der verfeinerten Elektronendichtekarte zu sehen war. In Abbildung 22 sind sowohl die Methylgruppe an N7, als auch das exozyklische Dimethylamin an N2 der Cap-Guaninbase deutlich von Elektronendichte umgeben.

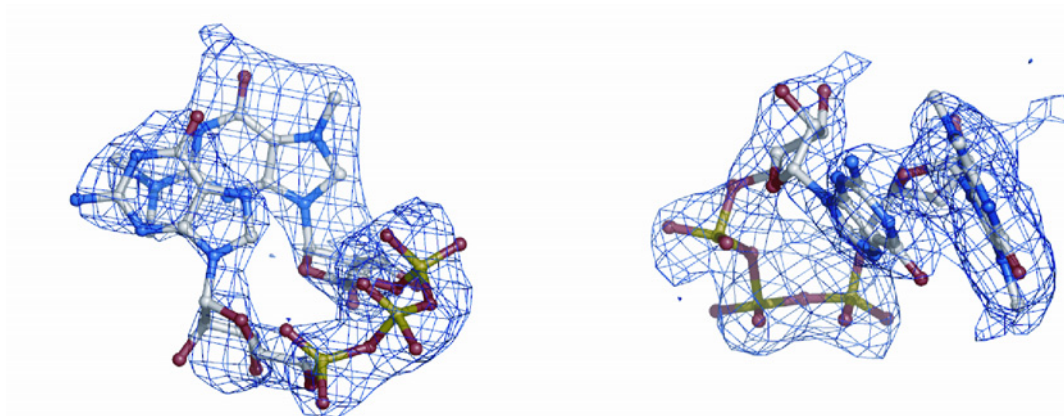


Abbildung 22: Elektronendichteverteilung am m_3GpppG -Cap Dinukleotid. Das Cap ist im Kugel-Stab-Modus dargestellt und Atome des Caps sind wie bei Abbildung 18 beschrieben gefärbt. Die Elektronendichte ist in blau gezeichnet (*Pymol*).

3.1.6.2 Oberflächenladungsverteilung

Um weitere Interaktionsstellen der snRNA mit SPN1 zu finden wurde eine Oberflächenladungsverteilung für Snurportin1 über das Programm *DELPHI* berechnet (Abbildung 23).

Putative RNA-Bindungsstellen zeigen im Bereich der Phosphate üblicherweise eine positive Ladungsverteilung an, da das Phosphatrückgrat oft mit basischen Aminosäuren an der Proteinoberfläche interagiert. Im Falle der m₃G-Cap Bindedomäne existieren nahe der Cap-Bindestelle keine positiv geladenen Areale, welche als Bindungsstelle für negative geladene Phosphatgruppen der snRNA dienen könnten. Da dem kristallisierten Fragment von SPN1 sowohl N- als auch C-terminale Bereiche fehlen, über deren Lokalisation nur spekuliert werden kann, dient die berechnete Oberflächenladungsverteilung nur als Annäherung.

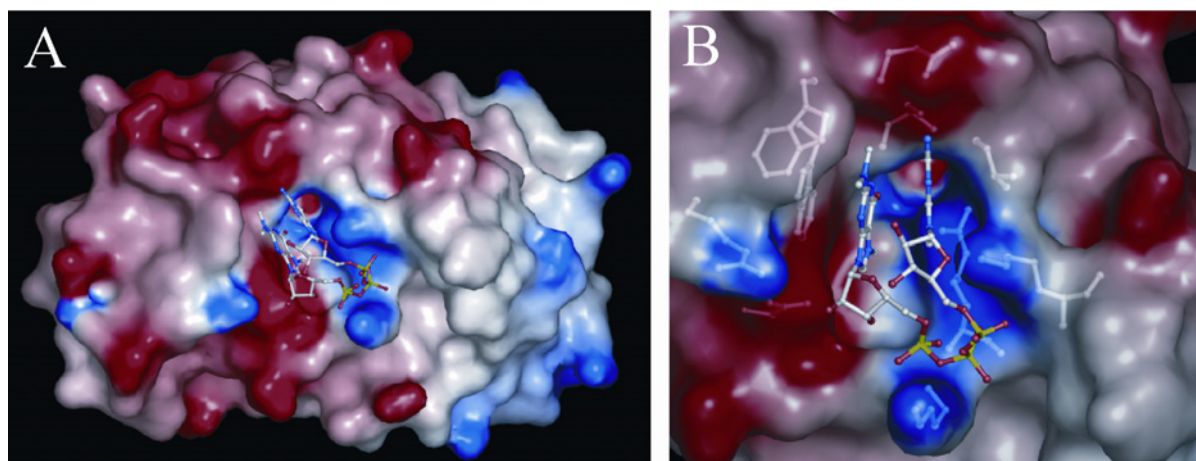


Abbildung 23: Oberflächenladungsverteilung der m₃G-Cap bindenden Domäne von SPN1. Dargestellt ist die Oberflächenladung der m₃G-Cap bindenden Domäne von SPN1, berechnet in *DELPHI*. Rote Regionen zeigen negativ geladene und blaue Areale positiv geladene Aminosäurereste auf der Oberfläche des Moleküls an. Das Cap-Dinukleotid ist im Kugel-Stab-Modell gezeigt, wobei die Einfärbung der Atome analog zu Abbildung 18 ist. **(A)** Darstellung des ganzen Proteins. **(B)** Vergrößerung der Cap-Bindungstasche, wobei die mit dem m₃GpppG interagierenden Aminosäureseitenketten unter der teilweise transparenten Oberfläche in Kugel-Stab-Modus zu sehen sind (*DELPHI*, *Pymol*).

3.2 Bindungsstudien verschiedener Cap-Varianten mit SPN1wt

Aufgrund der Kristallstruktur von SPN1 mit gebundenem m_3GpppG konnte keine Aussage bezüglich der Diskriminierung von m^7G -Caps gemacht werden, da ein m^7GpppG/A -Cap auch in die Cap-Bindungstasche von SPN1 passen würde. Die Cap-Bindungsart in gestapelter Form beider Basen ist zwar bisher einzigartig, aber dennoch konnte auch bei einfach methylierten Caps eine Basenstapelung in Lösung nachgewiesen werden (Nishimura *et al.*, 1980). Strukturen m^7G -Cap bindender Proteine zeigen jedoch keine interne Basenstapelung der Cap-RNA (Quioco *et al.*, 2000).

Zur näheren Untersuchung der Cap-Bindung und speziell der interagierenden Tryptophan-Reste 276 und 107 wurden Cap-Bindungsaffinitäten verschiedener mono- und trimethylierter Caps zu Wildtyp-SPN1 (SPN1wt) bestimmt und die Cap-Bindung bei SPN1wt im Vergleich zu Tryptophan-Mutanten analysiert.

3.2.1 Eigenfluoreszenz und Absorptionsverhalten von SPN1wt und der methylierten Cap-Varianten

Zur Charakterisierung von SPN1wt und der in den folgenden Messungen eingesetzten Cap-Varianten wurden deren Absorptions- und Fluoreszenzverhalten zuvor näher untersucht. Zur Bestimmung des Absorptionsverhaltens (2.2.5.1.3) wurden $5 \mu\text{M}$ SPN1wt und je $20 \mu\text{M}$ Cap eingesetzt, wobei die Konzentration von SPN1wt mit dem errechneten molaren Extinktionskoeffizienten nach der Methode von Gill & von Hippel bestimmt wurden (Tabelle 7) (Gill & von Hippel, 1989). Die Cap-Konzentrationen für m_3GpppG , m_3GpppA und m^7GpppA wurden ausgehend von den angegebenen Stoffmengen der Firma Kedar errechnet und durch Konzentrationsbestimmungen anhand angegebener Extinktionskoeffizienten validiert (2.2.5.1.2). Dasselbe gilt für die gezeigten Anregungs- und Emissionsspektren, wobei $1 \mu\text{M}$ SPN1wt und $20 \mu\text{M}$ Caps verwendet wurden. Anregungs- und Emissionsspektren wurden aufgenommen, um die geeigneten Anregungs- und Emissionswellenlängen für die folgenden Messungen festzulegen.

Für SPN1wt werden Anregungsspektren bei 315 und 340 nm Emission und ein Emissionsspektrum bei 295 nm Anregung gezeigt (Abbildung 25). Anregungsspektren für

die Cap-Analoga werden für die Emission bei 315, 340 und 400 nm und Emissionsspektren für eine Anregung bei 295 nm gezeigt (Abbildung 26).

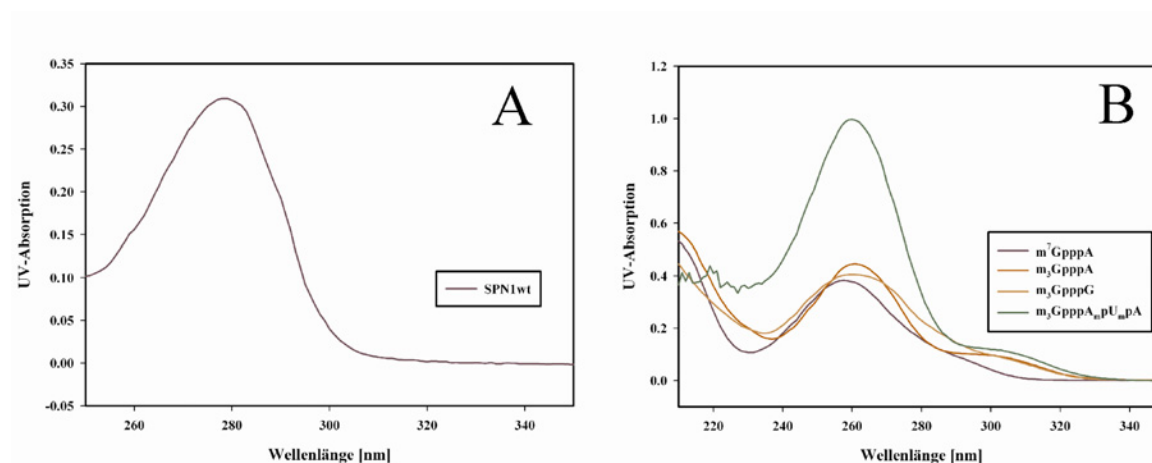


Abbildung 24: Absorptionsspektren von SPN1wt und verschiedener Cap-Varianten. Dargestellt sind Absorptionsspektren von 5 μM SPN1wt (A) und 20 μM $m^7\text{GpppA}$, $m_3\text{GpppA}$, $m_3\text{GpppG}$ und $m_3\text{GpppA}_m\text{pU}_m\text{pA}$ (B). Auf der x-Achse ist die Wellenlänge in [nm] aufgetragen, wobei auf der y-Achse die UV-Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge gezeigt wird (*SigmaPlot*).

Die Cap-Analoga zeigen ein Absorptionsmaximum bei ca. 260 nm, wobei das Cap-Oligo $m_3\text{GpppA}_m\text{pU}_m\text{pA}$ ein ca. 2,5-fach stärkeres Absorptionsverhalten bei gleicher Konzentration im Vergleich zu den Cap-Dinukleotiden zeigt. Es tritt ein zusätzliches Absorptionsmaximum (ca. 300 nm) bei allen Cap-Analoga auf (Abbildung 24B). SPN1wt zeigt ein Absorptionsmaximum bei 280 nm und anhand der Absorption bei 260 nm können Verunreinigungen durch Nukleinsäuren ausgeschlossen werden (Abbildung 24A). Die Anregungsspektren von SPN1wt zeigen bei einer Emission von 315 nm (Abbildung 25A) bzw. 340 nm (Abbildung 25B) ein Maximum bei 275-280 nm, wobei bei letzterem Spektrum eine Schulter des Maximums bei 295 nm zu sehen ist, was auf einen hohen Gehalt an Tryptophan-Resten hinweist.

Letztlich ist eine optimale Fluoreszenzanregung bei der lediglich die Tryptophan-Reste erfasst werden sollen, nur bei 295 nm möglich, da im Bereich 280-295 nm auch Tyrosinreste angeregt werden und im längerwelligen Bereich bis 300 nm nur noch eine sehr schwache Anregung möglich ist. Das Emissionsmaximum von SPN1wt bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm liegt bei 340 nm. Abbildung 26 zeigt, daß auch die Cap-Analoga durch UV-Licht anregbar sind. Bei einer Anregung mit 295 nm liegt bei allen trimethylierten Caps das Emissionsmaximum bei 400 nm, während $m^7\text{GpppA}$ ein Maximum bei ca. 380 nm zeigt (Abbildung 26D).

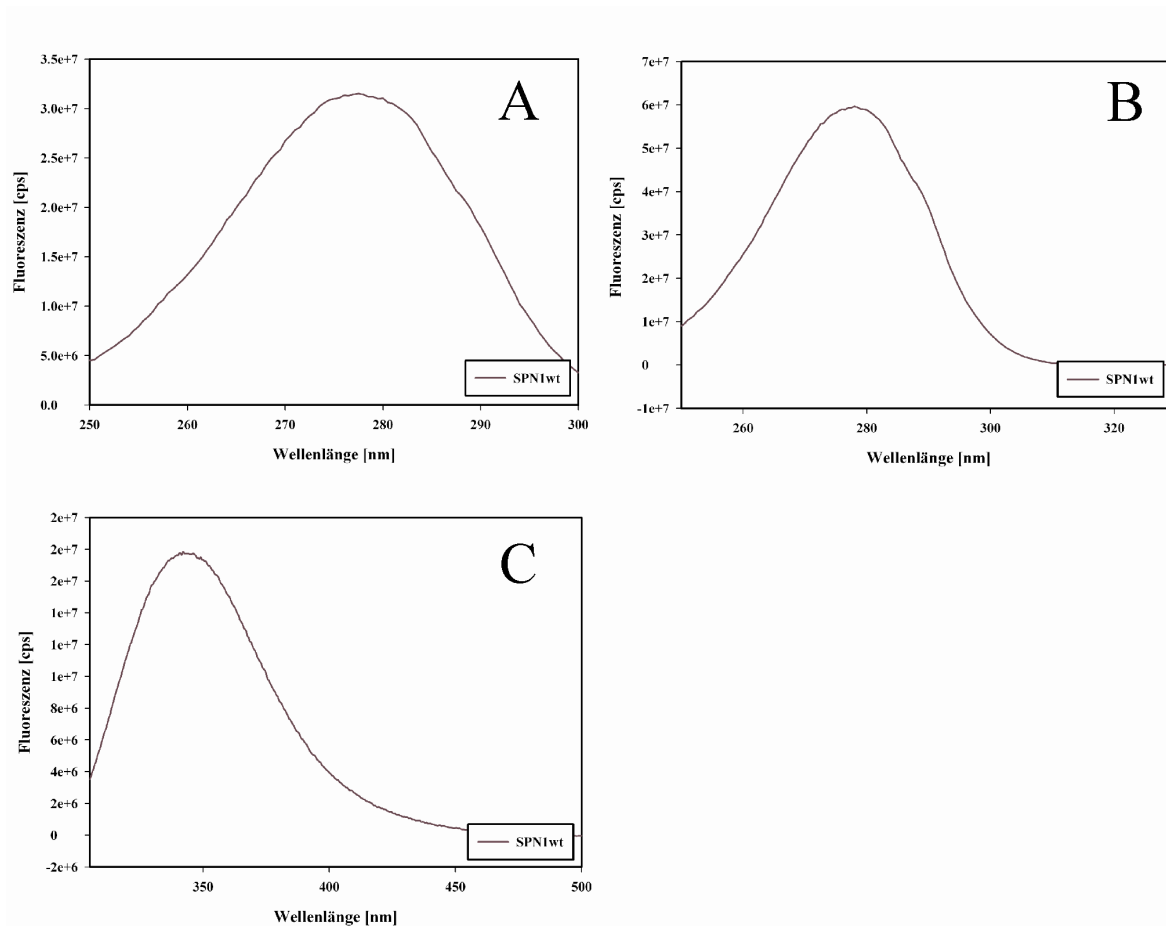


Abbildung 25: Anregungs- und Emissionsspektren für SPN1wt. Gezeigt sind Anregungsspektren bei 315 nm Emission (A), 340 nm Emission (B) und ein Emissionsspektrum bei 295 nm Anregung (C). Auf der x-Achse ist die Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge und auf der y-Achse die Fluoreszenz in [cps] aufgetragen (SigmaPlot).

Das hypermethylierte Cap-Oligonukleotid ($m_3GpppA_{mp}U_{mp}A$) zeigt eine 8-fach stärkere Fluoreszenz bei 400 nm nach Anregung bei 295 nm im Vergleich zu m^7GpppA und eine Verdoppelung der Fluoreszenz in Relation zu den trimethylierten Dinukleotiden.

Die m_3G -Cap Dinukleotide zeigen entsprechend eine 4-fach stärkere Fluoreszenz am Emissionsmaximum (340 nm) im Vergleich zum monomethylierten Dinukleotid. Die unterschiedlichen Eigenfluoreszenzen der Cap-Oligonukleotide weisen auf differierende Elektronenverteilungen in den methylierten Basen hin. Die Cap-Analoga zeigen beim Emissionsmaximum von SPN1wt (340 nm) noch Eigenfluoreszenz. Dies beeinträchtigt Messungen bei dieser Emissionswellenlänge, da die Cap-Eigenfluoreszenz zu jedem Meßpunkt bestimmt und von der Proteinfluoreszenz abgezogen werden müßte. Außerdem sind die Änderungen der Tryptophan-Fluoreszenz des Proteins und die Cap-Eigenfluoreszenz bei Bindung des Caps nicht mehr zu differenzieren. Messungen bei 315 nm

Fluoreszenzemission sind deshalb günstiger, da die Cap-Eigenfluoreszenz bei dieser Wellenlänge kaum noch meßbar ist (Abbildung 26A). Die Anregungsspektren der Cap-Analoga zeigen, daß alle verwendeten Caps neben dem Anregungsmaximum bei ca. 260-270 nm noch bei 280-320 nm anregbar sind (Abbildung 26B und C).

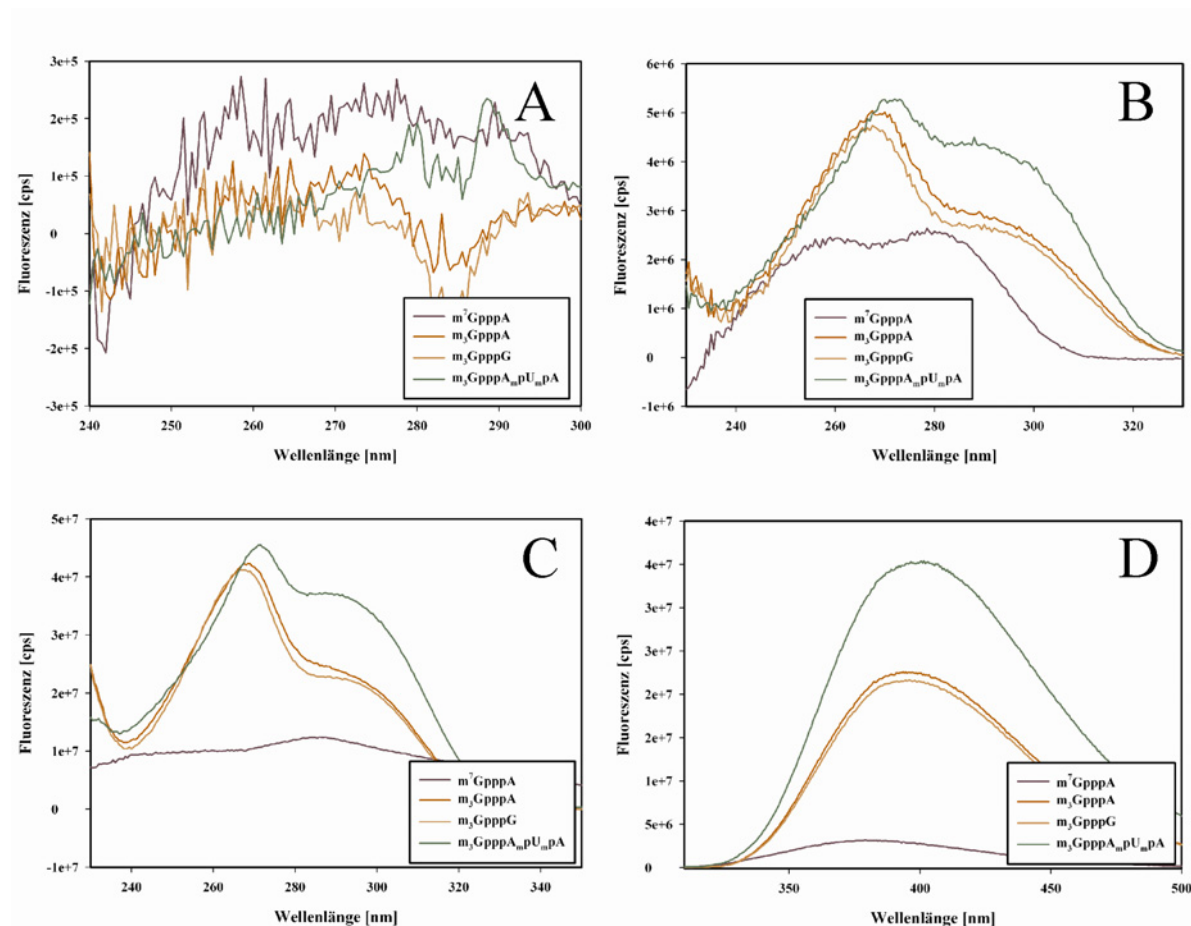


Abbildung 26: Anregungs- und Emissionsspektren für Cap-Varianten. Gezeigt sind Anregungsspektren von m⁷GpppA, m₃GpppA, m₃GpppG und m₃GpppA_mpU_mpA bei 315nm (A), 340 nm (B) und 400 nm (C) Emission. Ein Emissionsspektrum bei 295 nm Anregung ist unter (D) dargestellt. Aufgetragen sind auf der x-Achse die Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge und auf der y-Achse die Fluoreszenz in [cps] (*SigmaPlot*).

3.2.2 Bestimmung von Dissoziationskonstanten über Fluoreszenztitration

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten der Cap-Analoga zu SPN1wt werden je 500 nM (bei Titration mit m₃GpppA 1 µM) SPN1wt eingesetzt. Die Titration erfolgt bis in den Sättigungsbereich, um die halbmaximale Sättigung (K_d-Wert) durch einen

Kurvenangleich zu errechnen, wobei die Cap-Eigenfluoreszenz berücksichtigt wird (2.2.5.2.2; Abbildung 27).

Im Fall von $m_3GpppA_{mp}U_{mp}A$ wurde von 0-26.5 μM titriert, bei m_3GpppG von 0-25 μM , bei m_3GpppA von 0-100 μM und bei m^7GpppA von 0-2 mM. Zusätzlich wurde die Cap-Eigenfluoreszenz bei steigenden Cap-Konzentrationen untersucht und aufgetragen (Abbildung 28), um die Linearität der Funktion unter Beweis zu stellen.

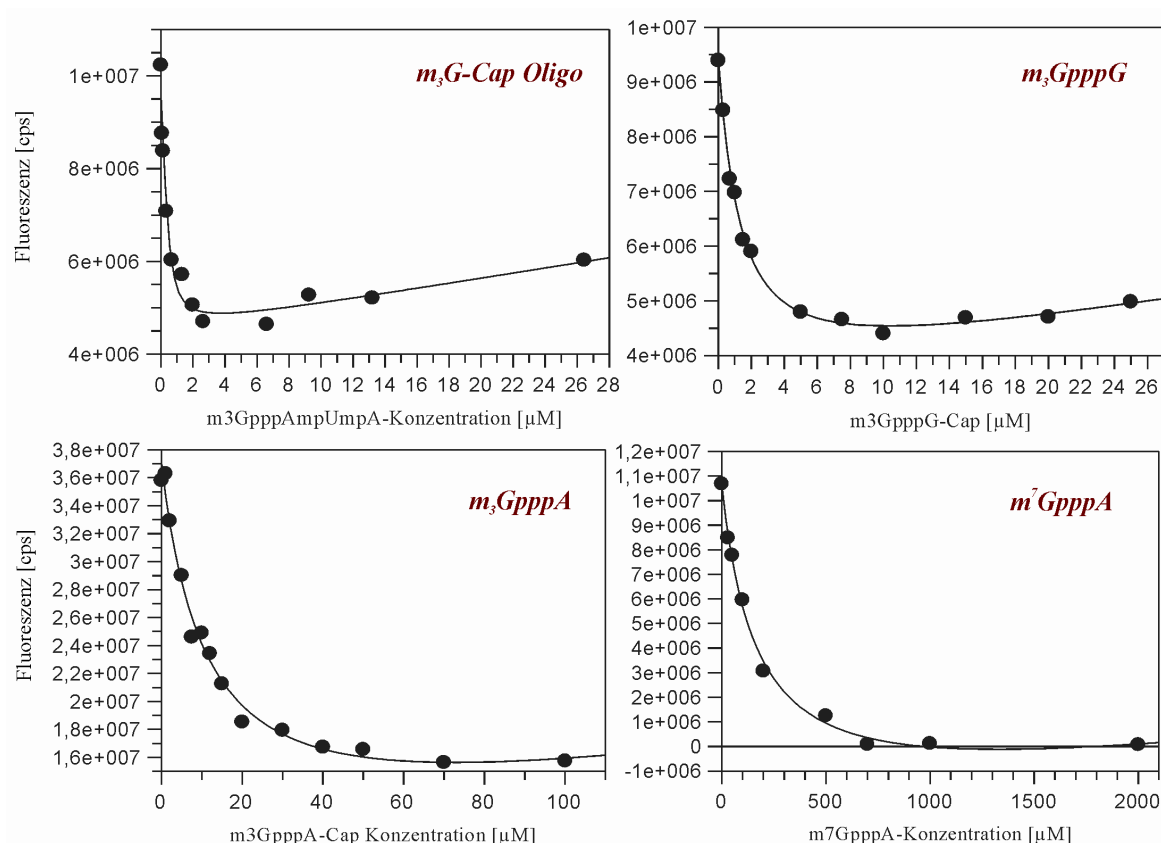


Abbildung 27: Kurvenangleich der Titrationsmeßpunkte von SPN1wt gegen verschiedene Cap-Varianten. Aufgetragen sind die eingesetzte Cap-Konzentration [μM] von $m_3GpppA_{mp}U_{mp}A$, m_3GpppG , m_3GpppA , m^7GpppA gegen die Fluoreszenz [cps] (*Graphit*).

Die über den Kurvenangleich errechneten K_d -Werte mit jeweiliger Standardabweichung wurden in Tabelle 6 dargestellt. Das zusammen mit der m_3G -Cap bindenden Domäne von SPN1 kristallisierte m_3GpppG zeigte einen K_d -Wert von 1 μM , während das nativ vorkommende Cap-Analog m_3GpppA mit 12.1 μM eine vergleichsweise niedrige Affinität besitzt. Wie in Abbildung 28 zu sehen ist, verändert sich die Eigenfluoreszenz des m^7GpppA -Caps im Vergleich zu den anderen Cap-Oligonukleotiden nicht linear, sie steigt zunächst linear an bis zu einer Cap-Konzentration von ca. 250 μM und fällt dann abrupt ab.

Tabelle 6: K_d -Werte für die Cap-Bindung an SPN1wt.

Cap-Oligo	K_d -Werte [μM]	Standard Abweichung des Kurvenangleiches [μM]
$m_3\text{GpppA}_{m\text{pU}_{m\text{pA}}}$	0.23 ± 0.02	0.08
$m_3\text{GpppG}$	1.00 ± 0.03	0.12
$m_3\text{GpppA}$	12.1 ± 0.55	2.72
$m^7\text{GpppA}$	$\geq 170 \pm 12.9$	17

Diese Entwicklung kann anhand des *inner filter effect* erklärt werden (4.3.2) und ermöglicht keine exakte Bestimmung des K_d -Wertes für die Bindung von $m^7\text{GpppA}$ an SPN1 (2.2.5.2.2). Der K_d -Wert der Bindung konnte mit $\geq 170 \mu\text{M}$ lediglich angenähert werden.

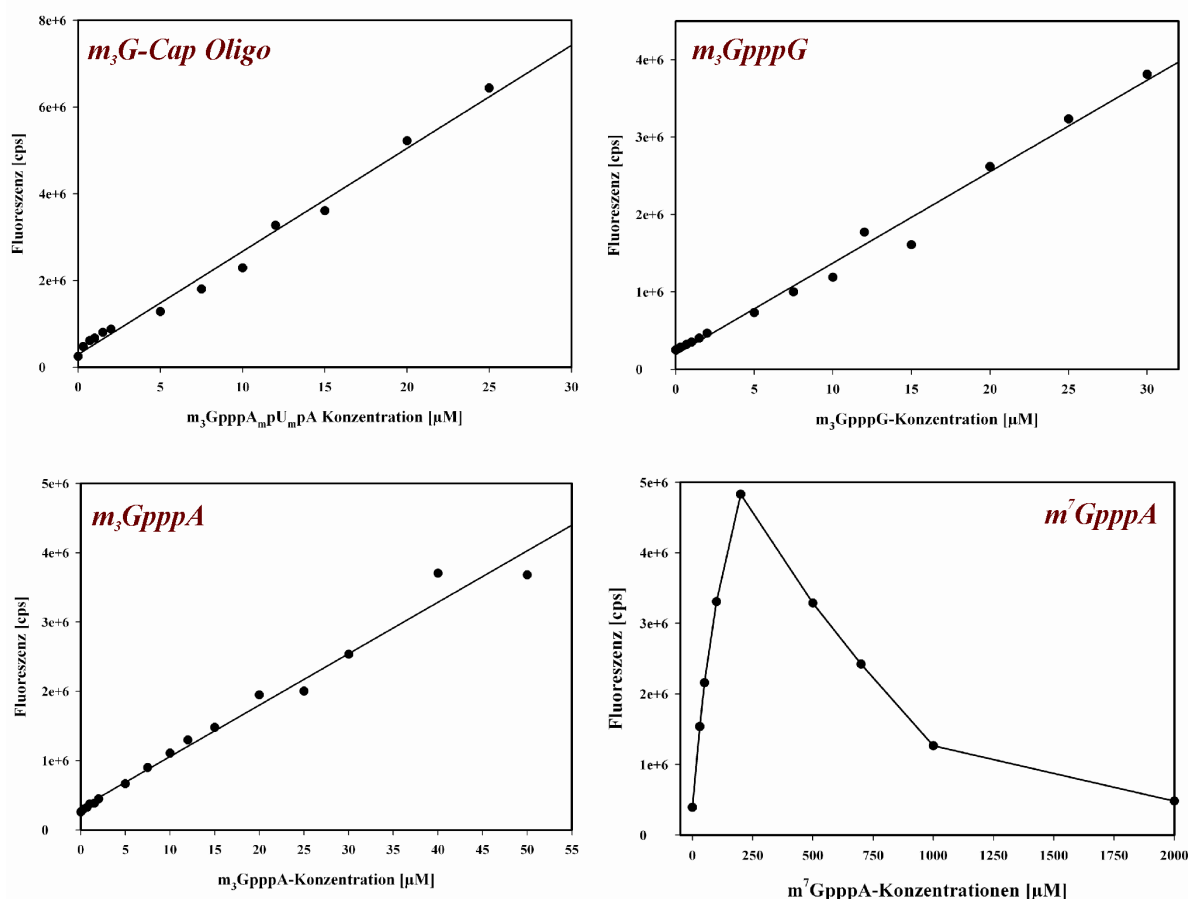


Abbildung 28: Eigenfluoreszenzänderung verschiedener Cap-Analoga bei steigenden Konzentrationen. Steigende Konzentrationen an $m_3\text{GpppA}_{m\text{pU}_{m\text{pA}}}$, $m_3\text{GpppG}$, $m_3\text{GpppA}$ und $m^7\text{GpppA}$ in [μM] sind gegen die Fluoreszenz [cps] aufgetragen. Bei $m_3\text{GpppG}$, $m_3\text{GpppA}$ und $m_3\text{GpppA}_{m\text{pU}_{m\text{pA}}}$ wurde eine lineare Funktion durch die Meßpunkte gelegt. Beim Auftrag der $m^7\text{GpppA}$ -Cap Konzentrationen gegen die Fluoreszenz wurde lediglich ein Graph durch die Meßpunkte gelegt (*SigmaPlot*).

3.2.3 Regeneration der verschiedenen Cap-Analoga über Umkehrphasenchromatographie

Da die in den Fluoreszenzmessungen verwendeten Cap-Dinukleotide sehr teuer in der Anschaffung waren, wurde versucht die Cap-Dinukleotide in reiner Form zurückzugewinnen. Alle verwendeten Cap-Dinukleotide konnten nach den Fluoreszenzmessungen gereinigt werden, indem das enthaltene SPN1 durch Perchlorsäure gefällt wurde (2.2.2.7) und die Cap-Dinukleotide über Umkehrphasenchromatographie getrennt wurden (2.2.2.4).

Die Proben wurden nach den Messungen vereinigt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

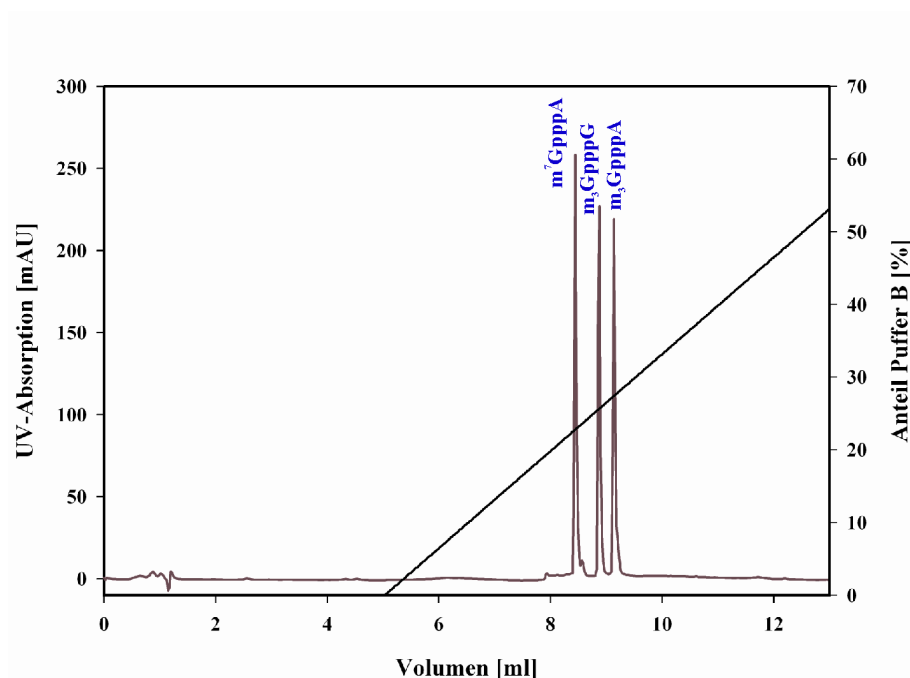


Abbildung 29: Trennung der Cap-Dinukleotide über Umkehrphasenchromatographie. Auf der x-Achse ist das Elutionsvolumen in [ml], auf der linken y-Achse die UV-Absorption bei 260 nm in [mAU] und auf der rechten y-Achse der Anteil des Puffer B in [%] dargestellt. Die UV-Absorption bei entsprechenden Volumina ist als rote Linie und der Gradient von 0-100 % Puffer B ist als schwarze Linie dargestellt. Die den Cap-Dinukleotiden zugeordneten Peaks sind benannt (*SigmaPlot*).

Vor der Trennung wurde das Volumen der Proben im Vakuumkonzentrator verringert und bei je 10 μl eine Perchlorsäurefällung durchgeführt. Mit den resultierenden 30 μl Probe wurden drei HPLC-Säulenläufe durchgeführt. Die Probe enthielt nach dem Konzentrieren im Vakuumkonzentrator noch 100 mM Kaliumphosphatpuffer, das enthaltene Acetonitril (10-20 %) war verdampft. Die Konzentrationen konnten über bekannte Extinktionskoeffizienten errechnet werden.

Dargestellt ist ein Kontrollsäulenlauf, bei dem gleiche Mengen aller Cap-Dinukleotide getrennt werden konnten. Das Elutionsverhalten der einzelnen Caps wurde zuvor getestet, um die Maxima eindeutig zuordnen zu können.

3.3 Bindungsbeitrag der Aminosäuren in der Bindungstasche

Zur besseren Charakterisierung der Cap-Bindung durch SPN1, speziell in Bezug auf die Interaktion der Tryptophan-Reste 276 und 107 mit den Cap-Basen, wurde die Cap-Bindung verschiedener Tryptophan-Mutanten von SPN1 im Vergleich zu SPN1wt untersucht.

Die Bindungsaffinitäten des m₃GpppG-Caps zu SPN1wt und den Tryptophan-Mutanten wurden über Differenzemissionsspektren bestimmt. Zusätzlich konnte die Kernimportaktivität des Wildtyp-SPN1 im Vergleich zu den Mutanten mit Hilfe eines *in vitro* Kernimportassays mit fluoreszenzmarkierten U1 snRNPs untersucht werden.

3.3.1 Klonierung und Reinigung verschiedener Tryptophan-Mutanten

Mutanten der Aminosäuren W276A, W107A und W276/107A wurden über ortsgerichtete Mutagenese generiert, wobei das Tryptophan (W) über eine Punktmutation in Alanin (A) umgewandelt wurde (2.2.1.2). Nach Amplifikation der pGEX6P1-Vektoren mit inseriertem SPN1 [(**PCR-Ansatz:** 50 ng SPN1wt in pGEX6P1, je 10 pmol SPN1_W276s / 10 pmol SPN1_W107s und 10 pmol SPN1_W276as / 10 pmol SPN1_W107as, 5 % DMSO), (**PCR-Programm:** Hybridisierung bei 52 °C, Elongation für 8', 50 Zyklen)] wurden die parentalen DNA-Stränge mit *DpnI* verdaut, die restlichen Plasmide in HB101-Zellen transformiert und auf LB-Agar (100 µg/ml Ampicillin) selektiert.

Einzelne Kolonien wurden in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin über Nacht inkubiert und daraus eine Mini-Plasmidpräparation durchgeführt. Aus der präparierten DNA wurde anschließend eine Sequenzierreaktion mit den Primern pGEX6 s/as angesetzt (2.1.5; 2.2.1.3). Die eingefügten Punktmutationen konnten mit Hilfe des Programms *SeqMan (Lasergene)* über Sequenzvergleich verifiziert werden und die mutierte DNA in BL21(DE3)RIL-Expressionszellen transformiert werden. Die Expression und Reinigung der Mutanten erfolgte analog zu SPN1wt (2.2.2.1).

3.3.2 Eigenfluoreszenz und Absorptionsverhalten der Tryptophan-Mutanten

Auch von den SPN1-Mutanten SPN1W276A, SPN1W107A und SPN1W276/107A wurde das Absorptions und Fluoreszenzverhalten näher untersucht.

Tabelle 7: Native Molare Extinktionskoeffizienten.

Protein	Denaturierter Extinktionskoeffizient	Nativer Extinktionskoeffizient
	$\epsilon_{\text{denat}} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$	$\epsilon_{\text{nat}} [\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$
SPN1wt	56860	65655 ± 2035
SPN1W276A	51170	61599 ± 2396
SPN1W107A	51170	67423 ± 2710
SPN1W276/107A	45480	57226 ± 1053

Zur Charakterisierung des Absorptionsverhaltens der SPN1-Mutanten im Vergleich zu SPN1wt wurden je 5 μM Protein (20 μM m_3GpppG) eingesetzt, während für Anregungs- und Emissionsspektren 1 μM Protein verwendet wurde.

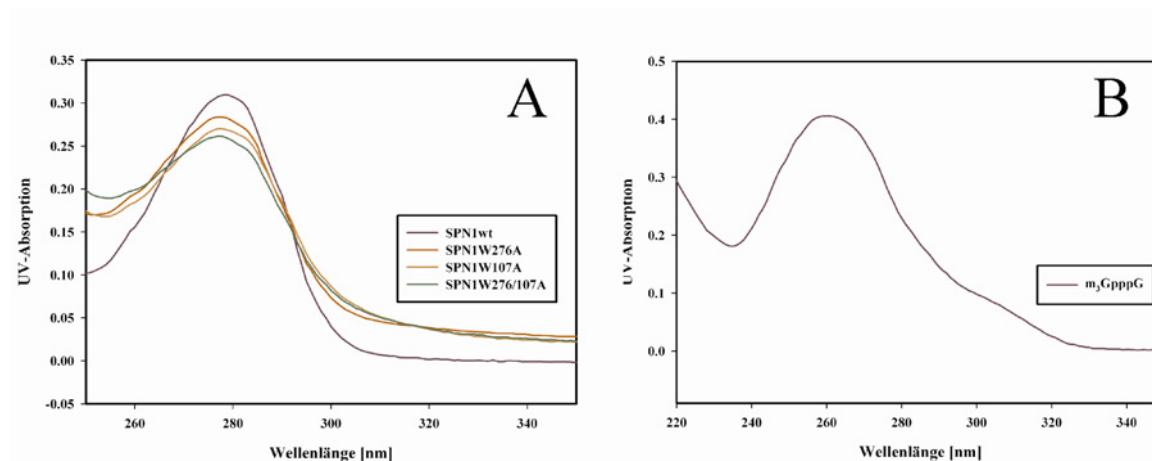


Abbildung 30: Absorptionsspektren von SPN1wt, allen SPN1-Mutanten und m_3GpppG . Dargestellt sind Absorptionsspektren von 5 μM SPN1wt, SPN1W276A, SPN1W107A, SPN1W276/107A (A) und 20 μM m_3GpppG (B). Auf der x-Achse ist die Wellenlänge in [nm] dargestellt, wobei auf der y-Achse die UV-Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge gezeigt wird (*SigmaPlot*).

Anhand der Absorptionsspektren von SPN1wt im Vergleich zu den Tryptophan-Mutanten konnte ein Rückgang der Absorption bei 280 nm beobachtet werden. Des Weiteren wurde eine Verunreinigung der Proteinprobe mit Nukleinsäuren ausgeschlossen, da das

Absorptionsmaximum der Probe bei 280 nm lag (Abbildung 30). Die nativen Extinktionskoeffizienten aller SPN1-Mutanten wurden analog zu SPN1wt bestimmt (2.2.5.1.1) (Gill & von Hippel, 1989), während die denaturierten Extinktionskoeffizienten mit *Protean* (*Lasergene*, *DNASTAR*) errechnet wurden (Tabelle 7). Obwohl die Standardabweichung der experimentellen, nativen Extinktionskoeffizienten ϵ_{nat} relativ hoch sind, ist die Änderung des Extinktionskoeffizienten im Vergleich zu ϵ_{denat} mit 10-20 % groß.

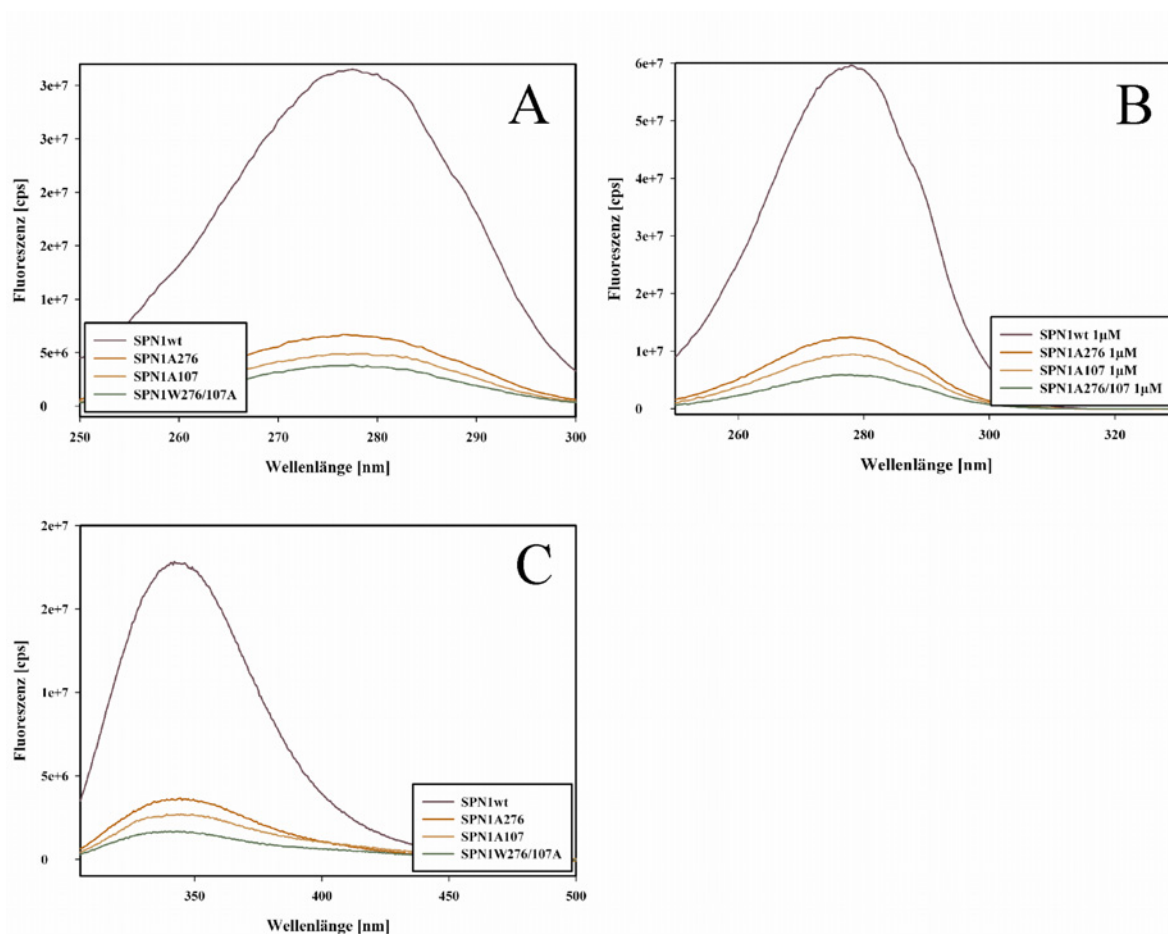


Abbildung 31: Anregungs- und Emissionsspektren für SPN1wt und Tryptophan-Mutanten. Gezeigt sind Anregungsspektren bei 315nm Emission (A), 340 nm Emission (B) und ein Emissionsspektrum bei 295 nm Anregung (C). Aufgetragen sind auf der x-Achse die Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge und auf der y-Achse die Fluoreszenz in [cps] (*SigmaPlot*).

Da die Extinktionskoeffizienten von Proteinen mit geringerer Anzahl absorbierender Aminosäuren (Trp, Tyr, Phe) geringer sind (Tabelle 7) und Tryptophane die Aminosäuren mit der höchsten Absorption bei 280 nm sind, ist ein Absorptionrückgang mit steigender Zahl mutierter Tryptophane zu erwarten.

Sowohl in den Anregungs-, als auch in den Emissionsspektren ist die Fluoreszenz der Mutanten im Vergleich zu SPN1wt um ein Vielfaches geringer, obwohl jeweils nur 1-2 Tryptophane von insgesamt 7 im Protein enthaltenen zu Alanin mutiert wurden (Abbildung 31). Alle Mutanten zeigen, wie zu erwarten, ein Fluoreszenzmaximum bei 340 nm analog zum Wildtyp-SPN1, aber einen 6-fachen Rückgang der Fluoreszenz in Relation zum Wildtyp-Protein.

3.3.3 Bindungsbeitrag von Trp 276 und Trp 107

3.3.3.1 Fluoreszenzemission

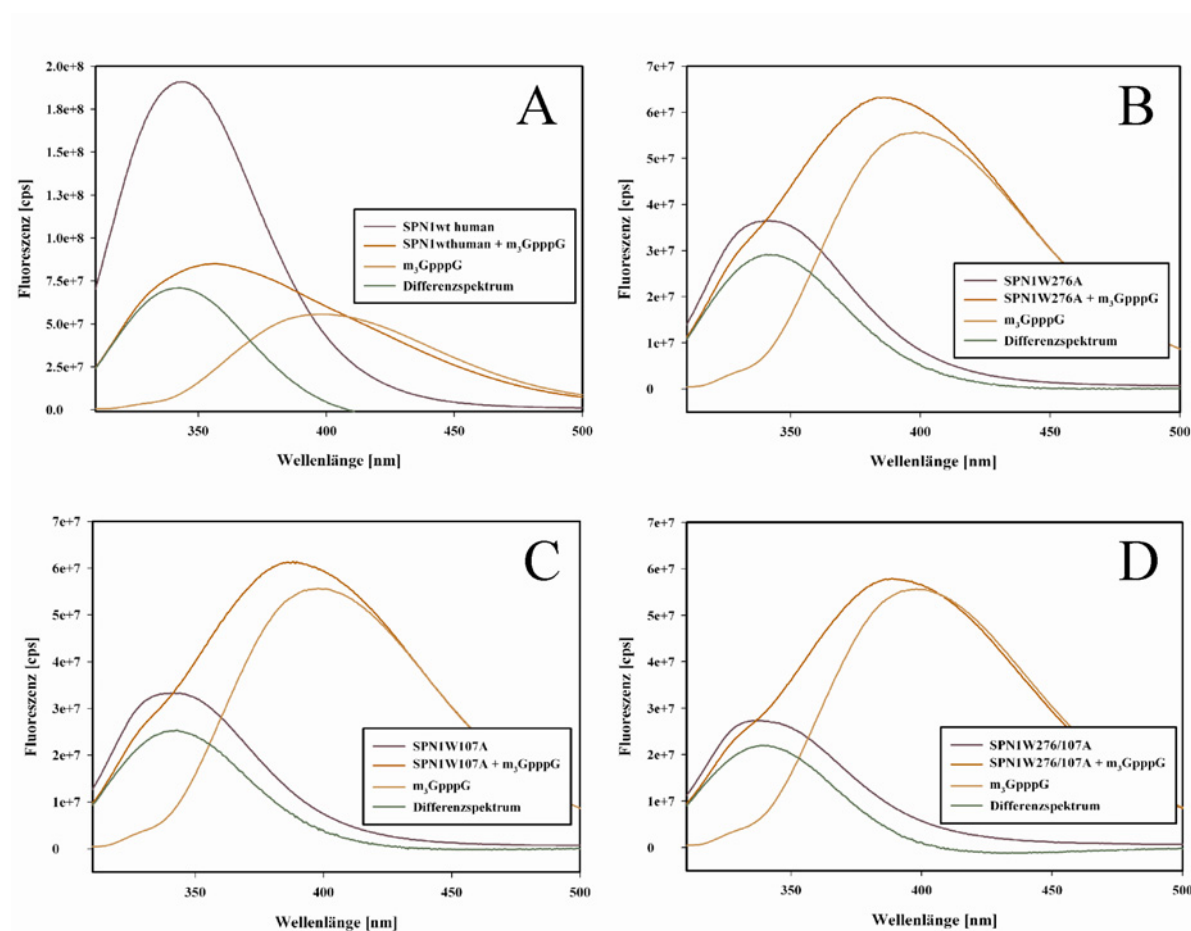


Abbildung 32: Bindungsaffinität von SPN1wt und Tryptophan-Mutanten im Vergleich. Dargestellt sind Spektren der Proteine (1 µM) in An- und Abwesenheit von 20 µM m₃GpppG, Spektren von 20 µM m₃GpppG-Cap und Differenzspektren von Protein in Anwesenheit von m₃GpppG und m₃GpppG. Aufgetragen sind die Wellenlänge in [nm] gegen die Fluoreszenzemission in [cps]. (A) SPN1wt human, (B) SPN1W276A human, (C) SPN1W107A human und (D) SPN1W276/107A human (*SigmaPlot*).

Um die Bindungsaffinität der Tryptophan-Mutanten W276A, W107A und W276/107A von SPN1 im Vergleich zu SPN1wt abschätzen zu können, wurden Fluoreszenzemissionsspektren von 1 μ M Protein in An- und Abwesenheit von 20 μ M m₃GpppG aufgenommen.

Tabelle 8: Cap-Bindungsaffinität der Tryptophan-Mutanten in Vergleich zu SPNwt.

Protein	Relative Fluoreszenzabnahme [%]	Bindungsaffinität relativ zu SPN1wt [%]
SPN1wt	62.7 \pm 3.9	100
SPN1W276A	20.0 \pm 6.1	32
SPN1W107A	25.0 \pm 6.3	40
SPN1W276/107A	15.8 \pm 4.2	25

Ein Differenzspektrum von SPN1 inkubiert mit m₃GpppG, und m₃GpppG alleine, zeigt einen Fluoreszenzrückgang, der im Vergleich zum jeweiligen Protein analysiert wird (Abbildung 32, Tabelle 8). Bindungsaffinitäten werden als relative Fluoreszenzabnahme in Relation zu SPN1wt angegeben, wobei die Bindungsaffinität von SPN1wt definitionsgemäß gleich 100 % gesetzt wird (Tabelle 8). Im Vergleich zum Wildtyp-SPN1 zeigt die W276A-Mutante, bei welcher das gestapelte Trp 276 zu Alanin mutiert wurde, nur noch etwa ein Drittel der Bindungsaffinität. Auch die W107A-Mutante zeigt nur noch 40 % Bindungsaffinität und entsprechend die Doppelmutante noch 25 %.

Die Bindungsaffinität aller Mutanten läßt im Vergleich zu SPN1wt signifikant nach, was für eine zentrale Rolle der Tryptophanreste 276 und 107 in der Cap-Bindungstasche spricht.

3.3.3.2 *In vitro* Importassay

Da die Trp-Mutanten von SPN1 (W276A, W107A, W276/107A) eine stark verminderte Bindung des trimethylierten m₃GpppG-Caps zeigen, sollte der Einfluß der reduzierten Bindungsaffinität auf die Transportaktivität der Mutanten in einem *in vitro* Kernimportassay mit fluoreszenzmarkierten Cy3-U1 snRNPs untersucht werden. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit Digitonin permeabilisiert und mit einem Transportansatz überschichtet, welcher alle benötigten Transportfaktoren enthielt (2.2.3). Neben einer Negativkontrolle ohne SPN1 wurden Ansätze mit SPN1wt human und allen Tryptophan-Mutanten untersucht.

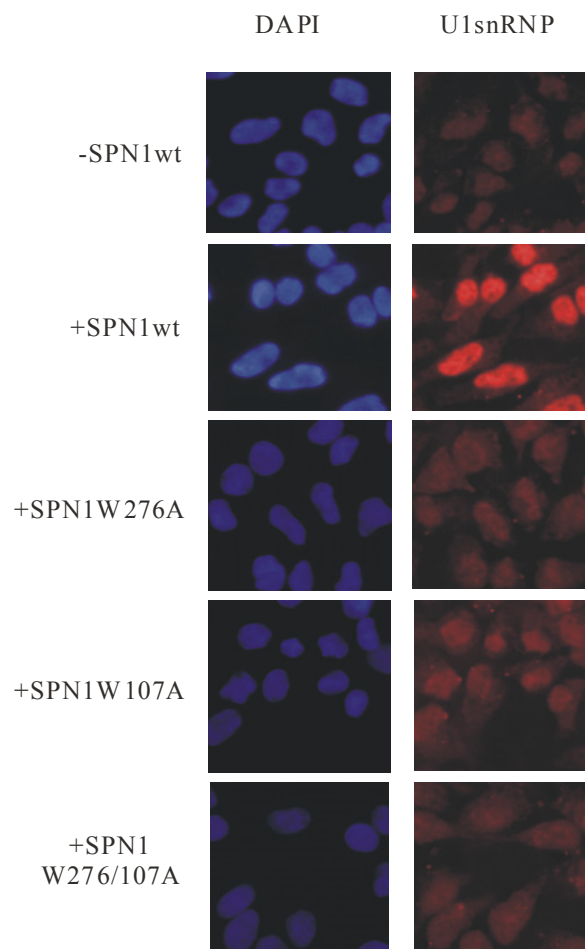


Abbildung 33: Transportaktivität von SPN1-Mutanten im Vergleich zu SPN1wt. Dargestellt ist der Kernimport fluoreszenzmarkierter U1snRNPs in Anwesenheit von Importin β , RanGDP, einem energieregenerierenden System und SPN1wt oder einer der SPN1-Mutanten (W276A, W107A und W276/107A). In der rechten Spalte sind die Zellkerne DAPI-gefärbter HeLa-Zellen zu sehen, während in der linken Spalte der Import Cy3-markierter U1snRNPs dargestellt ist. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden bei 400-facher Vergrößerung mit gleicher Belichtungszeit von 2'' (DAPI) oder 5'' (Cy3) aufgenommen.

Die Ergebnisse des *in vitro* Kernimportassays reflektieren die Ergebnisse der fluorimetrischen Daten, wobei die Unterschiede in der Importaktivität zwischen SPN1wt und den Tryptophan-Mutanten noch deutlicher sind. Das Wildtyp-SPN1 zeigt eine hohe Transporteffizienz, da nach bereits 10' fast das gesamte fluoreszenzmarkierte Substrat in den Zellkern transportiert wurde. Dagegen büßen sowohl die Einfach-, als auch die Doppelmutante einen Großteil Ihrer Transportaktivität ein. Um die Unterschiede in der Importaktivität zu quantifizieren wurde die Importrate abzüglich des Hintergrundes im Vergleich zur Negativkontrolle berechnet (Tabelle 9). Die Importaktivität wurde letztlich relativ zu SPN1wt angegeben, wobei die Importaktivität der Negativkontrolle gleich 0 % und die des Wildtyp-Proteins gleich 100 % gesetzt wurde. Die quantitative Auswertung des

Kernimportassays zeigt, daß die Mutation des gestapelten Trp 276 zu Alanin einen Rückgang auf 14 % der Importaktivität bewirkt. Die Mutation des parallel zur Basenstapelung liegenden Trp 107 bewirkt einen nicht ganz so starken Rückgang auf 26 % der Importaktivität; dies steht im Einklang zu der gemessenen Bindungsaffinität im Fluoreszenzbindungsassay. Die Doppelmutante (W276/107A) zeigt im Importassay kaum Unterschiede zu der W276A-Mutante.

Tabelle 9: Quantifizierung der Importassays über die Fluoreszenzintensität.

Importfaktoren	Fluoreszenzintensität/	Fluoreszenzintensität/	Importaktivität relativ zu SPN1wt [%]
	Pixel (Rohdaten)	Pixel ohne Hintergrund	
- SPN1wt (Neg. Kontrolle)	21 ± 3	0	0
+ SPN1wt	63 ± 7	42	100
+ SPN1W276A	27 ± 3	6	14
+ SPN1W107A	32 ± 3	11	26
+ SPN1W276/107A	26 ± 4	5	12

Es wird deutlich, daß sobald einer der beiden Tryptophan-Reste in der Cap-Bindungstasche zu einem nichtaromatischen Alanin mutiert wird, sowohl die Cap-Bindung als auch die Importrate des Importin β - SPN1 - m₃G - U1snRNP Komplexes stark abnimmt.

3.4 Funktionalität des orthologen *Snurportin1* aus *C. elegans*

Parallel zu Kristallisationsversuchen des humanen SPN1 in An- oder Abwesenheit von m₃G-Cap und/oder Importin β konnte das orthologe Protein aus *C. elegans* kloniert, exprimiert und gereinigt werden (3.4.1). Die Sequenzidentität zwischen humanem SPN1 und SPN1 aus *C. elegans* beträgt 34.2 %, und das homologe Protein aus *C. elegans* ist, im Vergleich zu humanem SPN1, um 30 Aminosäuren kürzer. Um die Transportaktivität und somit die Funktionalität des orthologen Proteins vor dessen Einsatz in die Kristallisation zu testen, wurden *in vitro* Kernimportassays durchgeführt (3.4.2).

3.4.1 Klonierung, Expression und Reinigung

SPN1 aus *C. elegans* wurde aus einer cDNA Phagenbank (2.1.8) amplifiziert und in den pGEX6P3-Vektor kloniert (2.2.1.1) [(**PCR-Ansatz**: 5 μ l Phagenbank, je 10 pmol CESNIF-GEX-Bf und CESNIF-GEX-b, 10 % DMSO), (**PCR-Programm**: Hybridisierung bei 57 °C, Elongation für 2', 40 Zyklen)]. Überschüssige Primer und Enzym des PCR-Ansatzes nach der Amplifikation wurden über PCR-Reinigungssäulchen entfernt und die gereinigten Fragmente in einen Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Eco*RI eingesetzt. 4 μ g des pGEX6P3-Vektors wurden ebenfalls restringiert, mit Hilfe der CIP am 5' Ende dephosphoryliert und zusammen mit dem geschnittenen Insert auf einem 1 %-igen Agarosegel analysiert. Fragment und geschnittener Vektor wurden aus dem Agarosegel eluiert und in die Ligation eingesetzt. Der komplette Ligationsansatz wurde in XL1 Blue-Zellen transformiert und auf Selektionsmedium (100 μ g/ml Ampicillin) ausgestrichen. Kolonien wurden in 5 ml LB-Medium überführt und anschließend die DNA isoliert. Positive Klone wurden über einen Kontroll-Restriktionsverdau selektiert. Die DNA wurde in eine Sequenzierreaktion mit Vektorprimern (pGEXs/as) eingesetzt und Vektoren mit korrektem fehlerfreiem Insert für die Expression in BL21(DE3)RIL-Zellen transformiert.

Die BL21(DE3)RIL-Zellen mit transformiertem pGEX6P3 SPN1 *C. elegans* wurden wie unter 2.2.2.1 beschrieben kultiviert und aufgeschlossen (Abbildung 34).

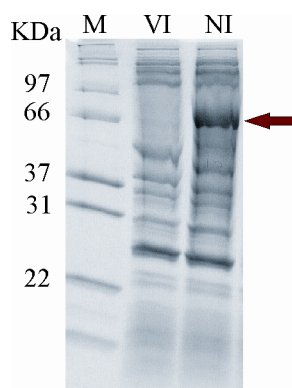


Abbildung 34: Überexpression von SPN1 *C. elegans*. Dargestellt ist der Gelauftrag vor Induktion (VI) und bei der Zellernte (NI). Die Markerproteine (M) sind mit ihren Molekulargewichten in [kDa] benannt. Das überexprimierte GST-SPN1 Fusionsprotein läuft bei ca. 66 kDa.

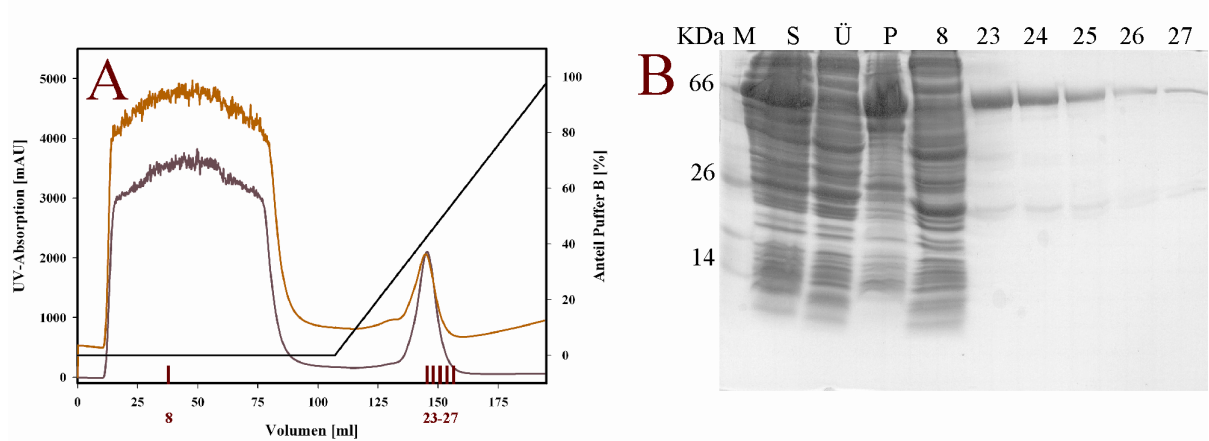


Abbildung 35: Reinigung des GST-SPN1 Fusionsproteins über GSH-Sepharose. (A) Elutionsprofil der Affinitätssäule, die x-Achse zeigt das Volumen in [ml], die linke y-Achse die UV-Absorption in [mAU] und die rechte y-Achse den Anteil des Puffer B in [%]. Die UV-Absorption bei 280 nm (rot) und die Absorption bei 260 nm (orange) sind gezeigt. Der Gradient des Puffer B von 0-100 % ist als schwarze Linie dargestellt. Die Fraktionen des Säulenlaufes (5 ml), welche auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden, sind gezeigt. (B) SDS-PAGE des Zellaufschlusses und des Säulenlaufes. Neben dem Marker (M) wurden die aufgeschlossenen Zellen (S), der Überstand (Ü) und das Pellet (P) nach Zentrifugation und die Fraktionen 8 und 23-27 aufgetragen.

Das exprimierte, lösliche GST-SPN1 Fusionsprotein wurde nach Zentrifugation über eine GSH-Sepharosesäule gereinigt und fraktionierte Proben auf einem SDS-Gel analysiert (Abbildung 35; 2.2.2.2.1).

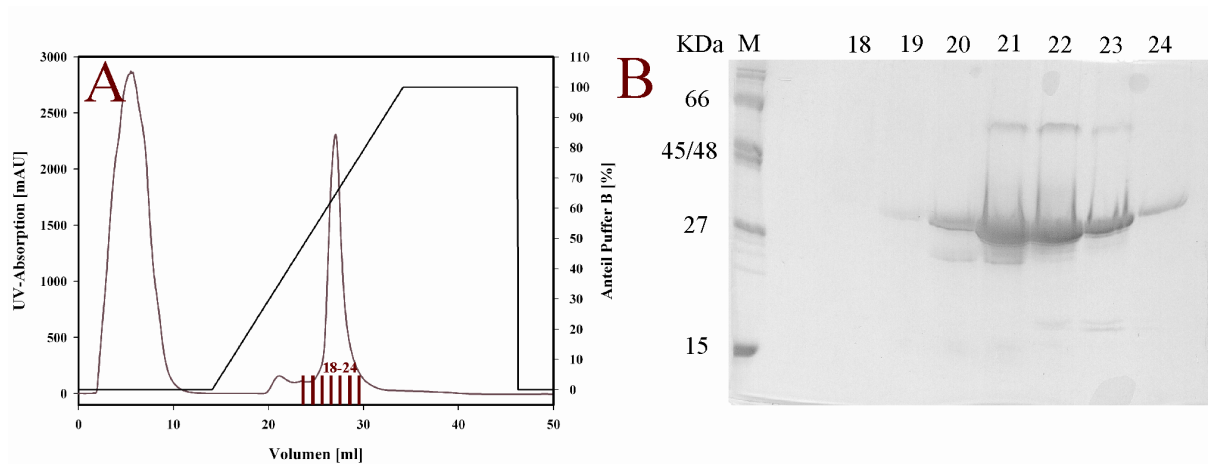


Abbildung 36: Separation von GST und SPN1 über eine Heparinsäule. (A) Elutionsprofil der Heparinsäule, wobei auf der x-Achse das Volumen in [ml], auf der linken y-Achse die UV-Absorption in [mAU] und auf der rechten y-Achse der Anteil des Puffer B in [%] dargestellt sind. Die UV-Absorption bei 280 nm ist in blau, und der Gradient des Puffer B von 0-100 % als schwarze Linie dargestellt ist. Die Fraktionen des Säulenlaufes (2 ml), welche auf eine SDS-PAGE aufgetragen wurden, sind gezeigt. (B) SDS-PAGE des Säulenlaufes. Neben dem Marker (M) wurden die Fraktionen 18-24 aufgetragen.

Fraktionierte Proben welche das GST-SPN1 Fusionsprotein enthalten wurden vereinigt und die GST-Markierung über Nacht bei 4 °C mit PreScission-Protease entfernt. Freies SPN1 C.

elegans wurde über eine Heparinsäule von GST getrennt (Abbildung 36; 2.2.2.2) und die Fraktionen, welche SPN1 enthalten nach der Gelkontrolle erneut vereinigt.

Ein letzter Reinigungsschritt über Ausschlußchromatographie (Superdex 75, Säulenformat 26/60) entfernte letzte Verunreinigungen und diente auch dazu SPN1 in 100 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7.5, 2 mM EDTA und 2 mM DTT zu überführen (Abbildung 37) (2.2.2.3).

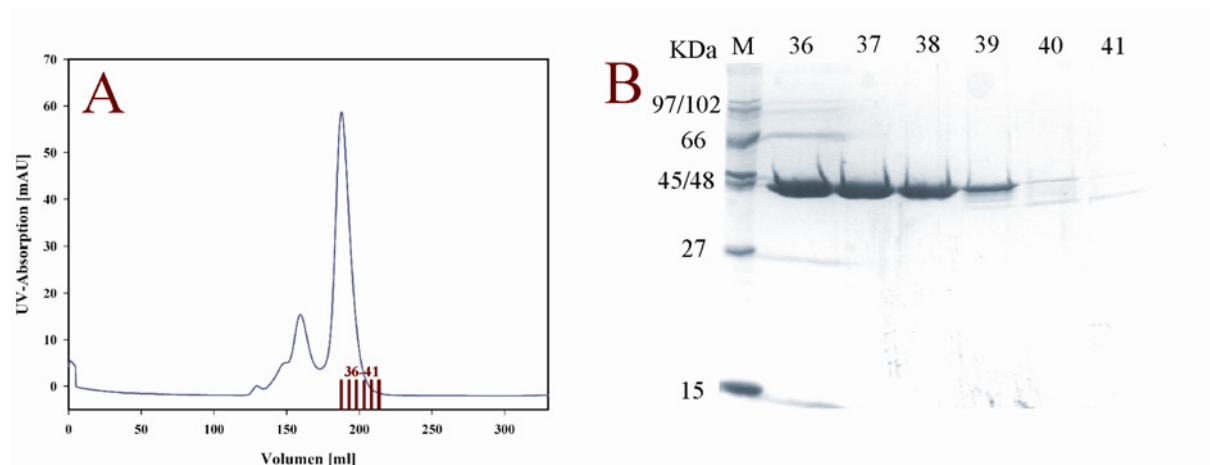


Abbildung 37: Reinigung von SPN1 *C. elegans* über Ausschlußchromatographie. (A) Elutionsprofil des Gelfiltrationslaufes. Auf der x-Achse ist das Volumen in [ml] und auf der y-Achse die UV-Absorption in [mAU] aufgetragen. Die UV-Absorption bei 280 nm ist als blaue Linie dargestellt. (B) SDS-PAGE der Ausschlußchromatographie. Die Markerproteine (M) sind mit ihrem Molekulargewicht in kDa benannt. Daneben sind die Fraktionen 36-41 aufgetragen.

Auch bei diesem Reinigungsschritt wurden die Fraktionen, welche SPN1 enthalten vereinigt und die Konzentration der Probe bestimmt.

3.4.2 Transportaktivität

Die Funktionalität des gereinigten SPN1 *C. elegans* wurde über *in vitro* Kernimportassays getestet (2.2.3), bevor Kristallisationsversuche unternommen wurden. Die Importaktivität wurde in An- und Abwesenheit eines energieregenerierenden Systems und RanGDP analog zu Abschnitt 3.3.3.2 durchgeführt. Da die Dissoziation des Transportkomplexes bestehend aus Importin β , Snurportin 1 und UsnRNP von der Kernpore auch ohne Energie in Form von GTP funktioniert, sollte auch Importaktivität ohne Energie möglich sein.

Wie erwartet, zeigt das gereinigte SPN1 aus *C. elegans* eine mit dem orthologen humanen SPN1 vergleichbare Importaktivität (vergleiche Abbildung 33 mit Abbildung 38). Ohne ein energieregenerierendes System und RanGDP wurde auch Importaktivität beobachtet, jedoch nicht so stark ausgeprägt wie in Anwesenheit von Energie.

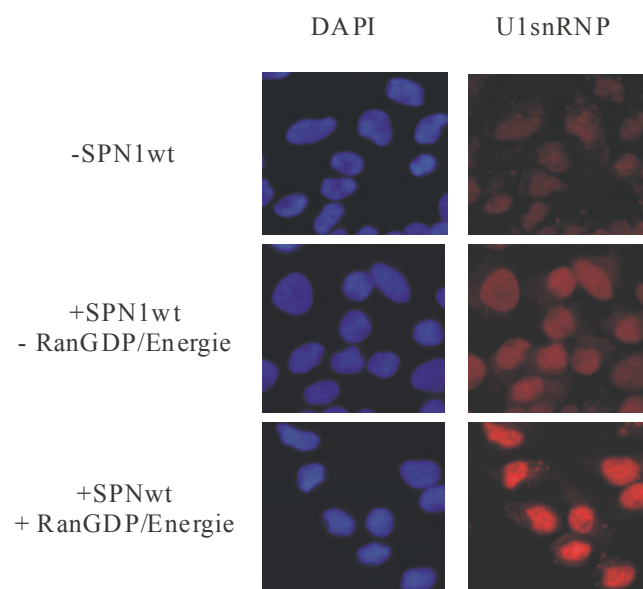


Abbildung 38: *In vitro* Kernimportassay mit SPN1 aus *C. elegans*. Dargestellt ist der Kernimport fluoreszenzmarkierter U1snRNPs in Anwesenheit von Importin β und SPN1wt. Der Assay wurde in An- oder Abwesenheit von RanGDP und energieregenerierendem System durchgeführt, während die Negativkontrolle ohne SPN1 durchgeführt worden ist. In der rechten Spalte sind die Zellkerne DAPI-gefärbter HeLa-Zellen zu sehen, während in der linken Spalte der Import Cy3-markierter U1snRNPs dargestellt ist. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden bei 400-facher Vergrößerung mit gleicher Belichtungszeit von 2'' (DAPI) oder 5'' (Cy3) aufgenommen.

3.4.3 Kristallisationsversuche in An- und Abwesenheit von m₃GpppG

Für Kristallisationsversuche wurde SPN1 *C. elegans* auf 7-10 mg/ml konzentriert und in An- oder Abwesenheit von 5-10 fachem molarem Überschuß an m₃GpppG eingesetzt. Alle Kristallisationsansätze der Firma Hampton und die JBScreens wurden bei 4°C und 20 °C getestet. Bis jetzt konnte kein Kristallwachstum in den angesetzten Bedingungen beobachtet werden.

3.5 Interaktionsstudien und Kristallisationsversuche der Importin β -bindenden (IBB) Domäne von SPN1 mit Importin β

Die Dissoziation des Importkomplexes, bestehend aus U snRNP, SPN1 und Importin β von der Kernpore ins Karyoplasma ist, wie bereits beschrieben, ohne energieregenerierendes System möglich (1.5). Wahrscheinlich gibt die Art der Interaktion zwischen der IBB-Domäne von SPN1 und Importin β Aufschluß darüber, warum die Loslösung des snRNP-Import-Komplexes im Vergleich zum Importkomplex NLS-tragender Proteine energieunabhängig ist. Der Komplex der IBB-Domäne von Importin α und Importin β wurde bereits kristallisiert und strukturell analysiert (Cingolani *et al.*, 1999) (1.4). Ein Vergleich beider Komplexe wäre aufschlussreich, da die Sequenzen beider IBB-Domänen sehr ähnlich sind. Lediglich der N-Terminus von SPN1 ist um 14 Aminosäuren länger (4.5).

3.5.1 Klonierung zweier Varianten der IBB-Domäne von SPN1

Anhand der kodierenden Sequenz von SPN1 in pGEX6P3 wurden die Bereiche der Aminosäuren (As) As -65 und As 1-95 in pET28b über die Schnittstellen *NcoI* und *XhoI* kloniert. Der Vorteil des pET28-Vektors ist die Möglichkeit einer C-terminalen Hexahistidinmarkierung. Da gerade die Interaktion zwischen dem N-terminalen Bereich der IBB_{SPN1}-Domäne und Importin β von Interesse ist, sollte dieser keine zusätzlichen Aminosäuren tragen, da diese bei der Kristallisation der IBB-Domänen mit Importin β stören könnten. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden über PCR amplifiziert (2.2.1.1)

[(**PCR-Ansatz:** 10 ng *SPN1 human pGEX6P1*, 10 pmol *IBBSPN1_NcoI* und *IBBSPN1_XhoI65* oder *IBBSPN1_XhoI95*, 10 % DMSO), (**PCR-Programm:** Hybridisierung bei 52 °C, Elongation für 1', 40 Zyklen)], die überschüssigen Primer und Enzyme über PCR-Reinigungssäulchen abgetrennt und die Fragmente in den Restriktionsverdau mit *NcoI* und *XhoI* eingesetzt. 3 µg des pET28b-Vektors wurden ebenfalls restringiert, durch die CIP am 5' Ende dephosphoryliert und zusammen mit dem geschnittenen Insert auf einem 1 % igen Agarosegel analysiert. Das Fragment und der geschnittene Vektor wurden aus dem Agarosegel eluiert und in die Ligation eingesetzt. Der komplette Ligationsansatz wurde in XL1Blue-Zellen transformiert und auf Selektionsmedium (50 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen. Die Kolonien wurden in 5 ml LB-Medium überführt und die DNA isoliert. Positive Klone wurden über einen Kontroll-Restriktionsverdau selektiert. Die DNA wurde in eine Sequenzierreaktion mit Vektorprimern (pETM70 s/as) (2.1.5; 2.2.1.3) eingesetzt und Vektoren mit korrektem, fehlerfreiem Insert für die Expression in BL21(DE3)RIL-Zellen transformiert (2.2.1.11).

3.5.2 Expression und Reinigung von Importin β und der IBB-Domänen

Importin β in pQE60 wurde in SG13009-Zellen und die IBB_{SPN1}-Domänen As 1-65 (IBB65) und As 1-95 (IBB95) pET28b in BL21(DE3)RIL-Zellen exprimiert (Abbildung 39; 2.2.2.1). Die Zellen wurden wie unter 2.2.2.1 beschrieben kultiviert und aufgeschlossen.

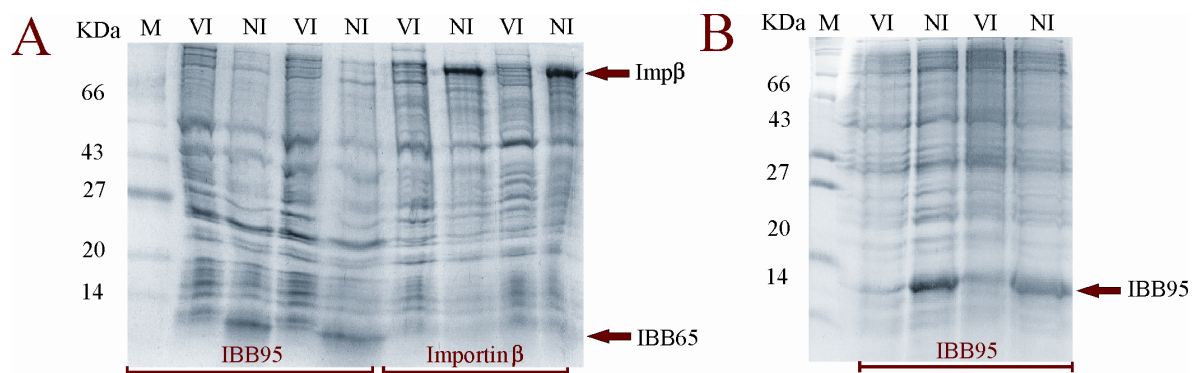


Abbildung 39: Überexpression von Importin β und IBB65/95. Dargestellt ist der Gelauftrag vor Induktion (VI) und bei der Zellernte (NI). Die Markerproteine (M) sind mit ihren Molekulargewichten in [kDa] benannt. Überexprimiertes Importin β migriert bei ca. 92 kDa, während IBB95 bei ca. 10 kDa und IBB65 bei ca. 7 kDa läuft.

Nach der Zentrifugation des Rohextraktes wurde der Überstand auf einer Ni^{2+} -NTA Sepharosesäule gereinigt (Abbildung 40A; 2.2.2.3). Nach einer Kontrolle der einzelnen Fraktionen über SDS-PAGE werden die Fraktionen, welche Importin β oder IBB65/95 enthalten vereinigt und konzentriert (Abbildung 40B). Die Konzentrate werden 2:1 (IBB: Importin β) gemischt und für 10' bei RT inkubiert. Der Komplex wird über Ausschlußchromatographie (Superdex 200) abschließend gereinigt und umgepuffert (2.2.2.3). Der Säulenlauf des Komplexes Importin β - IBB65 ist exemplarisch als Interaktionsnachweis in Abschnitt 3.5.3 (Abbildung 41) dargestellt.

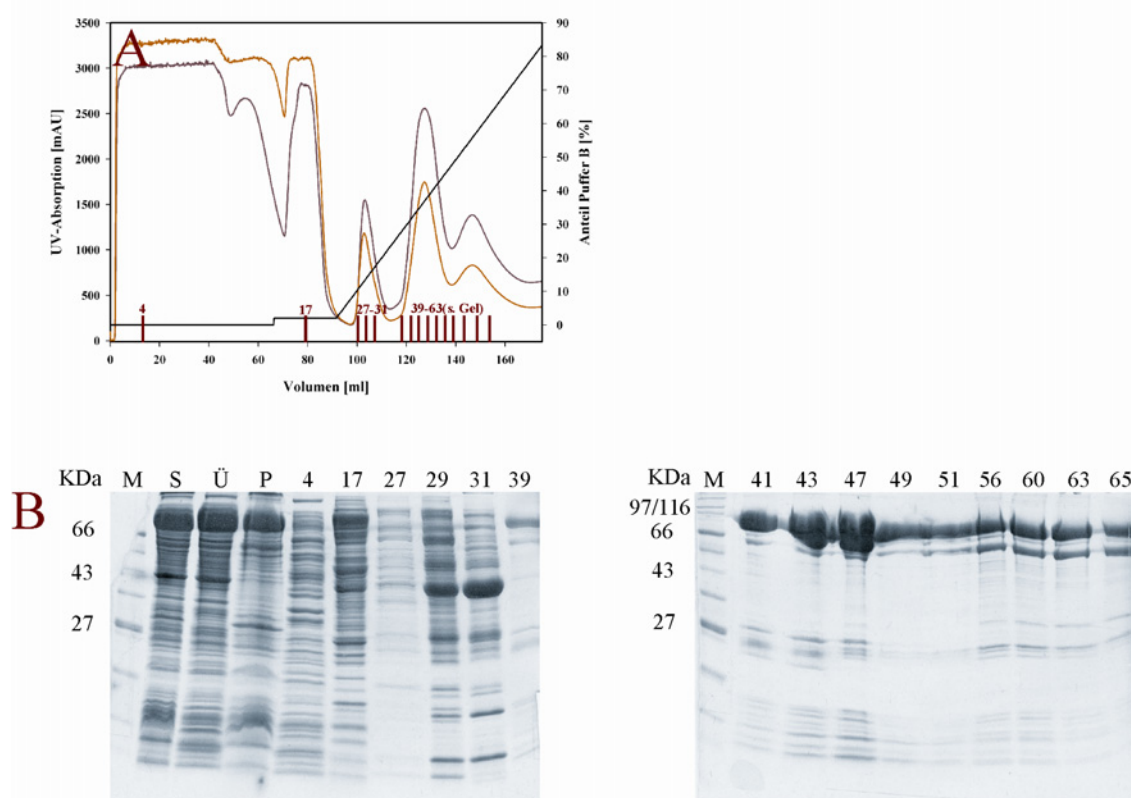


Abbildung 40: Reinigung von Importin β über Metallaffinitätssäule. (A) Elutionsprofil der IMAC-Säule, wobei auf der x-Achse das Volumen in [ml], auf der linken y-Achse die UV-Absorption in [mAU] und auf der rechten y-Achse der Anteil des Puffer B in [%] dargestellt sind. Die UV-Absorption bei 280 nm ist in rot und die UV-Absorption bei 260 nm ist in orange dargestellt, während der Gradient des Puffer B als schwarze Linie gezeigt ist. Die Fraktionen des Säulenlaufes (5 ml Durchfluß, 2 ml Elution), welche auf eine SDS-PAGE aufgetragen wurden, sind dargestellt. (B) SDS-PAGE des Zellaufschlusses und des Säulenlaufes. Neben dem Marker (M) wurden die aufgeschlossenen Zellen (S), der Zellüberstand (Ü) und das Pellet (P) nach Zentrifugation und einzelne Fraktionen des Säulenlaufes aufgetragen.

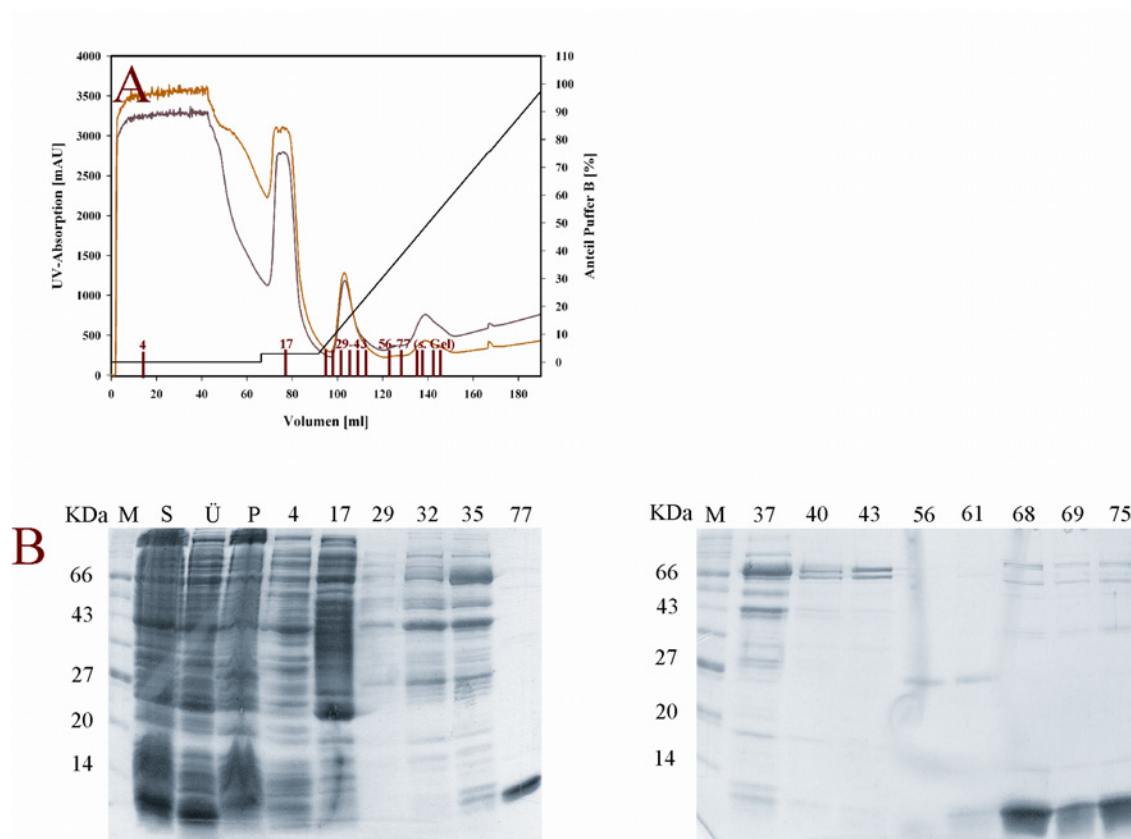


Abbildung 41: Reinigung der IBB-Domäne As 1-65 über eine Metallaffinitätssäule. (A) Elutionsprofil der IMAC-Säule, wobei auf der x-Achse das Volumen in [ml], auf der linken y-Achse die UV-Absorption in [mAU] und auf der rechten y-Achse der Anteil des Puffer B in [%] dargestellt sind. Die UV-Absorption bei 280 nm ist in rot und die UV-Absorption bei 260 nm ist in orange dargestellt, während der Gradient des Puffer B als schwarze Linie gezeigt ist. Die Fraktionen des Säulenlaufes (5 ml Durchfluß, 2 ml Elution), welche auf eine SDS-PAGE aufgetragen wurden, sind dargestellt. (B) SDS-PAGE des Zellaufschlusses und des Säulenlaufes. Neben dem Marker (M) wurden die aufgeschlossenen Zellen (S), der Zellüberstand (Ü) und das Pellet (P) nach Zentrifugation und einzelne Fraktionen des Säulenlaufes aufgetragen.

3.5.3 Interaktionsnachweis über Ausschlußchromatographie

Um die Funktionalität der IBB_{SPN1}-Domänen (As 1-65; As 1-95) und deren Interaktion mit Importin β zu testen, wurden beide Proteine vereinigt und vor dem Auftrag auf die Gelfiltrationssäule (Superdex 200) kurz bei RT inkubiert (3.5.2). Die Fraktionen der Ausschlußchromatographie wurden über SDS-PAGE analysiert und für Kristallisationsansätze vereinigt und konzentriert (Abbildung 42). Der Interaktionsnachweis wurde für beide IBB-Domänen durchgeführt, wird exemplarisch aber nur für die kürzere IBB_{SPN1} As 1-65 gezeigt.

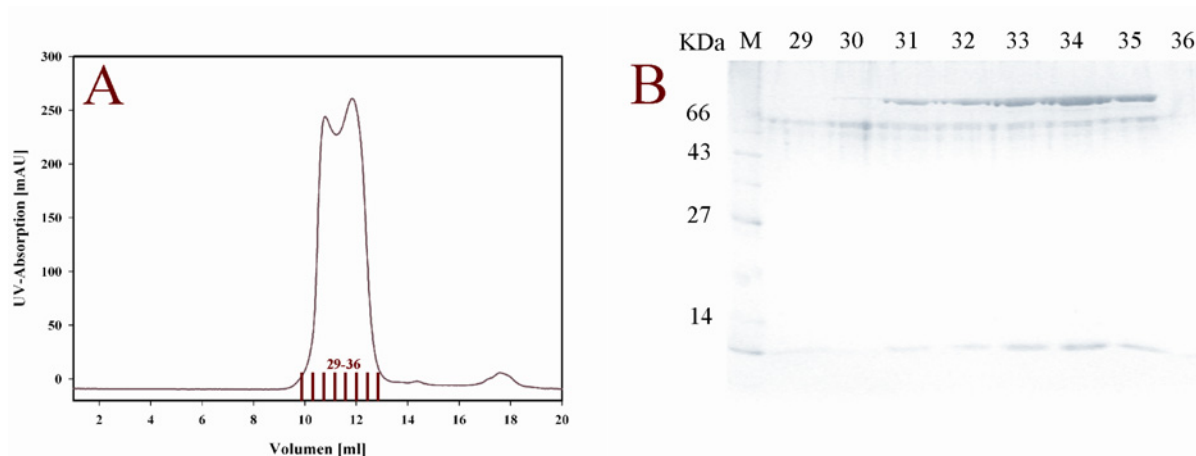


Abbildung 42: Ausschlußchromatographie des IBB65 – Importin β - Komplexes. (A) Elutionsprofil des Gelfiltrationslaufes. Auf der x-Achse ist das Volumen in [ml] und auf der y-Achse die UV-Absorption in [mAU] aufgetragen. Die UV-Absorption bei 280 nm ist als rote Linie und die gesammelten Fraktionen, welche auf einer SDS-PAGE analysiert wurden sind gezeigt. (B) SDS-PAGE der Ausschlußchromatographie. Die Markerproteine sind mit ihrem Molekulargewicht in kDa benannt und Fraktionen 29-36 sind aufgetragen worden.

Auf dem Chromatogramm sind zwei Maxima der UV-Absorption bei 280 nm zu sehen, wobei in beiden Maxima der Komplex nachzuweisen war. Berechnet man das Molekulargewicht (MW) des eluierten Komplexes in Abhängigkeit des Elutionsvolumens [$MW = 10^{(4.729 - 0.2273 * V_{el})}$] besteht das erste Maximum aller Wahrscheinlichkeit nach aus einem Dimer des Importin β - IBB - Komplexes. Das Komplex - Dimer tritt aber nur auf, wenn der Komplex vor der Auftrennung über Ausschlußchromatographie tiefgefroren war. Aufgrund möglicher Artefakte durch das Tieffrieren des Komplexes und der Beobachtung, daß Importin β in Abwesenheit der IBB-Domäne nach der Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ unlöslich ist, wurde das Komplex - Dimer nicht für die Kristallisation verwendet.

3.5.4 Kristallisationsversuche der IBB-Importin β Komplexe

Für Kristallisationsansätze wurde der Komplex nach der Ausschlußchromatographie auf 10-15 mg/ml konzentriert und längstens 4-5 d im Kühlschrank aufbewahrt. Der Komplex Importin β - IBB65 wurde zur Kristallisation in alle Hampton Screens und JBScreens bei $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingesetzt. Zusätzlich wurde versucht, um die Kristallisationsbedingungen des publizierten Importin β - IBB $_{\alpha}$ - Komplexes zu *screenen*, jedoch ohne Erfolg. Es konnten lediglich durchsichtige gelartige Strukturen in manchen Ansätzen beobachtet werden. Der

Importin β - IBB95 - Komplex wurde nur versucht mit Hilfe der Hampton Screens zu kristallisieren, bis jetzt ohne Erfolg. Weitere Kristallisationstests stehen noch aus.

4 Diskussion

Die m_3G -Cap-bindende Domäne des UsnRNP-Importadapters Snurportin1 wurde im Komplex mit dem m_3G -Cap-Analogon m_3GpppG kristallisiert und strukturell analysiert (3.1). Des Weiteren wurden Bindungskonstanten von SPN1wt für monomethylierte (m^7GpppA) sowie trimethylierte (m_3GpppG , m_3GpppA , $m_3GpppA_{mp}U_{mp}A$) Cap-Analoga bestimmt, um die selektive Bindung des hypermethylierten m_3G -Caps durch SPN1 zu zeigen (3.2.2). Es konnte gezeigt werden, daß die Bindungsaffinität sowohl vom Grad der Methylierung und der Natur der ersten Base der U snRNA, als auch von der Länge des Oligonukleotides abhängig ist.

Zusätzlich wurde die relative Bindungsaffinität des m_3GpppG -Cap Dinukleotides zu Einzel- und Doppelmутanten der Tryptophan-Reste W276A und W107A in der Bindungstasche bestimmt, um den Bindungsbeitrag der Basenstapelung und des senkrecht zur Stapelung liegenden Trp 107 näher zu untersuchen (3.3.3). Nachdem gezeigt werden konnte, daß beide Tryptophan-Reste entscheidend zur Cap-Bindung beitragen, wurde deren Einfluß auf den Kernimport assemblierter UsnRNPs in einem *in vitro* Kernimportassay analysiert (3.3.3.2). Im *in vitro* Assay zeigten die Tryptophan-Mutanten einen starken Einfluß auf den Import fluoreszenzmarkierter U1snRNPs. Sowohl der Rückgang der Bindungsaffinitäten zu hypermethylierten m_3G -Caps, als auch die verminderte Importaktivität belegen eine signifikante Rolle der Tryptophan-Reste bei der Cap-Bindung.

Zusätzlich wurde das orthologe SPN1 aus *C. elegans* auf seine Importaktivität geprüft und in die Kristallisation eingesetzt (3.4).

Die nicht in der Kristallstruktur enthaltene IBB_{SPN1} -Domäne konnte in zwei Längen (As 1-65 und As 1-95) kloniert und gereinigt werden. Beide Fragmente wurden mit Importin β komplexiert und deren Interaktion über Ausschlußchromatographie nachgewiesen. Auch die Komplexe Importin β - IBB_{SPN1} wurden in die Kristallisation eingesetzt (3.5).

4.1 Kristallisation der m_3G -Cap-bindenden Domäne von SPN1 mit gebundenem m_3GpppG

Nachdem humanes Vollängen-SPN1 weder alleine noch in Anwesenheit von m_3GpppG und/oder Importin β kristallisierte, wurden proteolytische Fragmente in die Kristallisation eingesetzt (3.1). Die Fragmente wurden, nachdem die Fähigkeit zur Cap-Bindung über Quervernetzung mit radioaktiv markierten m_3G -Cap-Oligonukleotiden bestätigt war (Schmidt, 2001), in der Kristallisation mit m_3GpppG verwendet (3.1.2). Alle drei Fragmente (37, 26 und 24 kDa) konnten weder über Ausschlußchromatographie noch über Ionenaustauschchromatographie voneinander getrennt werden und klonierte Fragmente konnten nicht löslich exprimiert und gereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Überraschenderweise wurde durch Analyse der Kristalle über SDS-PAGE festgestellt, daß sie das 26 kDa Fragment enthalten, obwohl das 37 kDa Fragment im Überschuß vorlag (Abbildung 15). Dies konnte auch über Massenspektroskopie an gelösten Kristallen bestätigt werden (persönliche Mitteilung von Dr. H. Urlaub). Vermutlich konnte die Serin-Protease GluC (V8) nicht komplett durch 1 mM PMSF/Isopropanol inhibiert werden und wurde auch bei der folgenden Ausschlußchromatographie nicht vollständig abgetrennt. Proben welche länger verdaut wurden, brachten keine Kristalle hervor, da eines der Fragmente innerhalb weniger Minuten im Kristallisationsansatz präzipitierte. Offensichtlich ist ein langsam voranschreitender Verdau im Kristallisationspuffer nötig, um einen störenden Einfluß des 24 kDa-Fragmentes während der Kristallisation auszuschließen. Zudem sind die Fragmente nach Abschluß der Reinigung ohne m_3GpppG -Cap sehr instabil und präzipitieren innerhalb eines Tages auf Eis. Die Instabilität der Fragmente in Lösung bestätigt auch die Reinigungsprobleme der klonierten Fragmente.

Die zunächst erhaltenen nadelförmigen Kristalle des 26 kDa-Fragmentes von SPN1 konnten nur durch *Seeding* vergrößert werden (2.2.4.1.1; 3.1.2). Weder Variation der Kristallisationsbedingung noch der Einsatz von Additiven führten zu größeren, dreidimensionalen Kristallen. Es wurden zwei aufeinanderfolgende *Seeding*-Experimente durchgeführt, um Kristalle mit ausreichenden Streueigenschaften zu erhalten. Da die Kristalle innerhalb von zwei bis drei Tagen entstanden, wurden die *Seeds* nach wenigen Stunden in Ansätze die frisch gereinigtes Protein enthielten überführt, um eine Kristallneubildung in diesen Ansätzen zu unterdrücken. Die Auflösung des Kristallgitters

war limitiert auf 4-7 Å, wenn die resultierenden Kristalle direkt in Kryopuffer überführt wurden. Daher wurde die Glycerinkonzentration durch Dampfdiffusion langsam erhöht (2.2.4.1.2). Vermutlich schrumpfen die Kristalle durch den Wasserentzug im Kryopuffer leicht und bei direkter Überführung veränderte sich die Kristallordnung plötzlich, was die Streueigenschaften negativ beeinflusste. Bei der Datensammlung wurden stets frisch präparierte Kristalle verwendet, da bereits tiefgefrorene Kristalle an Streuverhalten einbüßten. Die Phaseninformation konnte problemlos aus den Phasen dreier Schwermetallderivate angenähert und das Modell in die resultierende Elektronendichtekarte eingebaut werden.

4.2 Sekundärstrukturvergleich mit dem „mRNA Capping Enzyme“

Nach abschließender Verfeinerung des Modells der m₃G-Cap-bindenden Domäne von SPN1 mit gebundenem m₃GpppG wurden mit Hilfe des Programmes *DALI* strukturell ähnliche Proteine anhand der Koordinaten des Modells in der PDB gesucht.

Obwohl keinerlei Sequenzähnlichkeit von SPN1 zu anderen bekannten Proteinen gefunden wurde, zeigt die m₃G-Cap-bindende Domäne eine hohe strukturelle Ähnlichkeit zu der GTP-bindenden Domäne des *mRNA capping enzyme*, der mRNA-Guanylyltransferase (Tabelle 10) (Coppola *et al.*, 1983; Hakansson *et al.*, 1997; Shatkin, 1976). Die mRNA-Guanylyltransferase überträgt nach der Dephosphorylierung des ersten mRNA-Nukleotides zu NDP GMP auf das 5' Ende der mRNA. Das Guanosin-Cap ist mit der RNA folglich über eine 5'-5' Triphosphatbrücke verbunden und wird nachfolgend an der Position N7 der Cap-Base methyliert (Abbildung 8).

Tabelle 10: Strukturell verwandte Proteine (DALI).

Protein	Organismus	PDB-ID	Z-Wert	RMSD [Å]
mRNA-Guanylyltransferase	<i>Chlorella-Virus</i>	1ckm-A	15.6	2.6
ATP bindende Domäne der DNA-Ligase	<i>Chlorella-Virus</i>	1fvi-A	13.2	2.8

Der Z-Wert zeigt die relative Ähnlichkeit der Proteine an. RMSD (*root mean square deviation*) zeigt die Abweichung des C α -Rückgrates beider Strukturen in [Å] an.

In Eukaryoten werden snRNAs wie mRNAs mit einem 5'-Cap versehen, was der transkribierten RNA Stabilität verleiht und für den Kernexport nötig ist. In höheren Eukaryoten formen die Phosphatase, die Guanylyltransferase und die N7-Methyltransferase einen funktionellen Proteinkomplex (Salditt-Georgieff *et al.*, 1980).

Die m₃G-Cap-bindende Domäne von SPN1 zeigt zudem strukturelle Ähnlichkeit zur ATP-bindenden Domäne von DNA-Ligasen, wobei die DNA-Ligase eines *Chlorella*-Virus die höchste Übereinstimmung in der Sekundärstruktur zeigt (Tabelle 10) (Doherty & Suh, 2000; Odell *et al.*, 2003).

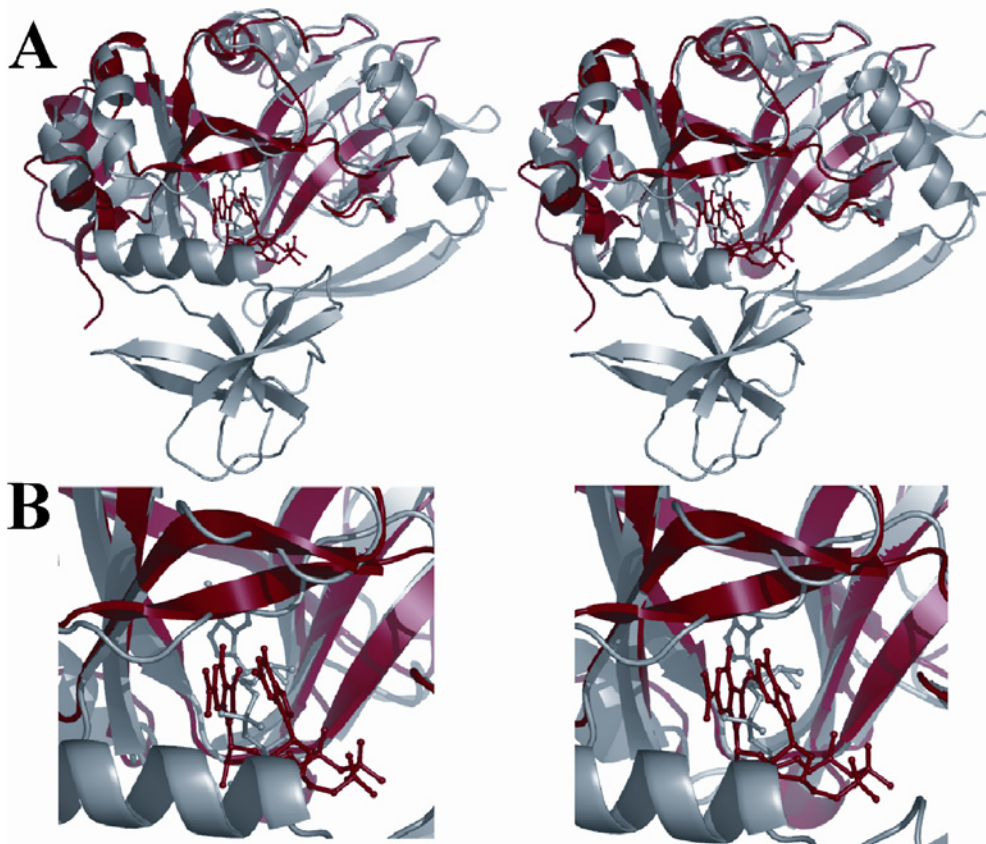


Abbildung 43: Überlagerung der m₃G-Cap-bindenden Domäne von SPN1 mit der mRNA-Guanylyltransferase. Beide Proteine sind im Cartoon-Modus mit gebundenem m₃GpppG bzw. GTP im Kugel-Stab Modus dargestellt. Die Guanylyltransferase mit gebundenem GTP ist grau gefärbt, während SPN1 mit gebundenem m₃GpppG in rot gezeigt ist. (A) Stereobild der Überlagerung. (B) Stereodarstellung der vergrößerten Nukleotidbindungstaschen (Lsqman, Pymol).

Die parallel angeordneten β -Faltblätter, welche bei SPN1 die Cap-Bindungstasche formen, sind in allen erwähnten Proteinen vorhanden. Eine Überlagerung der m₃G-Cap-bindenden Domäne von SPN1 mit der mRNA-Guanylyltransferase, welche die höchste strukturelle Ähnlichkeit aufweist, zeigt, daß die Cap-Bindungstasche von SPN1 und die GTP-

Bindungstasche des *capping enzyme* in ähnlichen Bereichen der Proteine zwischen den β -Faltblätter liegen (Abbildung 43). Die GTP-Bindungstasche der Guanylyltransferase liegt im Vergleich zur Cap-Bindungstasche von SPN1 allerdings weiter im Inneren des Proteins. Die genaue Anordnung der Nukleotide in der Bindungstasche und die mit ihnen interagierenden Aminosäurereste sind jedoch sehr unterschiedlich.

4.3 Basenstapelung als optimale Interaktionsform für Cap-bindende Proteine

4.3.1 Cap-Bindung über „Kationen- π -Interaktion“

Wechselwirkungen positiv geladener, kationischer Aminosäuren mit π -Elektronensystemen aromatischer Aminosäuren sind mehrfach gezeigt worden und unter dem Begriff Kationen- π -Interaktion bekannt (Abbildung 44) (Gallivan & Dougherty, 1999).

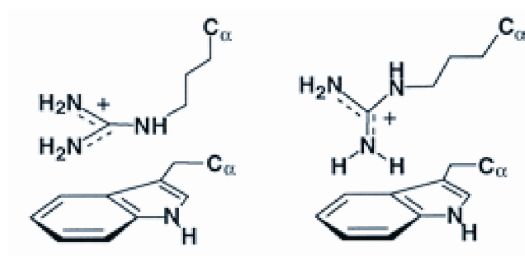


Abbildung 44: Kationen- π -Interaktion benachbarter Aminosäuren. Dargestellt sind die basischen Aminosäuren Lysin (links) und Arginin (rechts) in Interaktion mit den π -Elektronensystemen von Tryptophan (Gallivan & Dougherty, 1999).

Diese Form der Interaktion kationischer Aminosäuren mit dem π -Elektronensystem aromatischer Reste liefert neben anderen Sekundärstrukturelementen einen hohen Energiebeitrag zur Proteinfaltung. Bereits 1980 konnte über spektroskopische Methoden gezeigt werden, daß monomethylierte Cap-Basen in Lösung mit den π -Elektronensystemen benachbarter, über eine 5'-5'-Triphosphatbrücke verbundener, aromatischer Basen interagieren und eine interne Basenstapelung in Lösung eingehen (Nishimura *et al.*, 1980; Tazawa & Inoue, 1983). Des Weiteren konnte über NMR (*nuclear magnetic resonance*) und

ESP (*Electrochemical simulation package*) nachgewiesen werden, daß die positive Ladung der Cap-Base zu 80 % auf dem methylierten N7 zu liegen kommt, obwohl zunächst eine Delokalisierung der Ladung über N7, C8 und N9 angenommen wurde (Ruszczynska *et al.*, 2003). Ishida *et al.* konnten letztlich zeigen, daß Tryptophanreste aufgrund ihres elektronenreicheren Indolrings ideale Interaktionspartner für methylierte, protonierte Guaninbasen darstellen (Ishida *et al.*, 1988). Eine partielle Ladungsübertragung des elektronenreichen π -Elektronensystems auf die methylierte Guaninbase wurde nachgewiesen. Über Ladungsverteilungen innerhalb der trimethylierten m_3G -Cap-Base und deren Interaktion mit aromatischen Aminosäuren wurden bisher keine Untersuchungen durchgeführt.

Beide Basen des m_3GpppG -Cap werden im vorliegenden Modell der m_3G -Cap-bindenden Domäne von SPN1 in einer gestapelten Form zwischen den Aminosäureresten Trp 276 und Leu 104 gebunden. Trp 107 liegt parallel zu der Basenstapelung 4.3 Å über dem dimethylierten exozyklischen Amin der Cap-Guaninbase (Abbildung 45; 3.1.6.1). Die Stapelung der trimethylierten, positiv geladenen Cap-Base zwischen der unmethylierten Guaninbase und Trp 276 ist aufgrund beschriebener Erkenntnisse nicht verwunderlich. Die protonierte elektronenarme Cap-Base interagiert wahrscheinlich mit den π -Elektronensystemen der elektronenreicheren Ringsystemen der Guaninbase und des Trp 276 in Form einer Kationen- π -Interaktion.

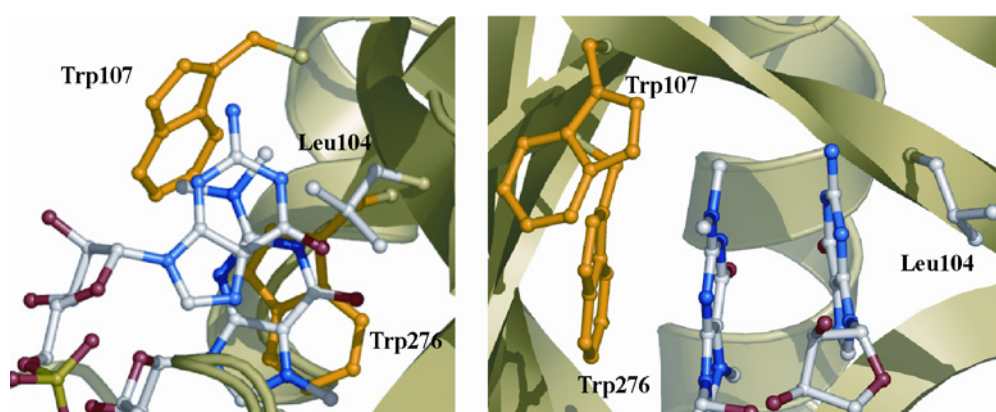


Abbildung 45: Kationen- π -Interaktion des m_3GpppG mit den Tryptophanresten in der Bindungstasche. Darstellung der Cap-Bindungstasche mit gebundenem m_3GpppG links von der Seite und rechts in der Aufsicht. Das Proteinrückgrat ist im *Cartoon*-Modus dargestellt und grün gefärbt. Die interagierenden Tryptophanreste und Leu 104 sind wie das gebundene m_3GpppG im Kugel-Stab-Modus gezeigt. Die Tryptophan-Reste sind orange dargestellt und die Atome des m_3GpppG -Cap und Leu 104 sind wie unter Abbildung 18 gefärbt (*Pymol*).

Durch die Dimethylierung des N2 vor dem Kernimport der U snRNPs könnte sich die positive Ladung auf das hypermethylierte Stickstoffatom verlagern. Diese Annahme wird durch die Form der Stapelung der unmethylierten Cap-Base über dem dimethylierten Amin unterstützt (Abbildung 45). Zusätzlich wird eine weitere Kationen- π -Interaktion des dimethylierten N2 mit Trp 107 vermutet, welches parallel zur Basenstapelung liegt. Trp 107 schirmt das weitgehend hydrophobe Dimethylamin gegen das umgebende Lösungsmittel ab.

4.3.2 Diskriminierung monomethylierter Cap-Oligonukleotide durch SPN1

Zur näheren Analyse der Cap-Bindung durch SPN1 wurden die Bindungsaffinitäten mono- und trimethylierter Oligonukleotide zu SPN1 untersucht (3.2.2).

Die Affinität mono- und trimethylierter Cap-Oligonukleotide zu SPN1 wurde bisher lediglich über UV-Quervernetzungsexperimente radioaktiv markierter Cap-Oligonukleotide zu SPN1 abgeschätzt (Huber *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden K_d -Werte verschiedener Cap-Oligonukleotide zu SPN1wt über Fluoreszenztitrationsexperimente bestimmt. Für das kokristallisierte m_3GpppG , das nativ vorkommende Analogon m_3GpppA und das hypermethylierte Tetraoligonukleotid $m_3GpppA_{mp}U_{mp}A$ konnten K_d -Werte bestimmt werden.

Die Fluoreszenztitrationen mit monomethyliertem m^7GpppA -Cap waren aufgrund eines *inner filter effect* unzureichend interpretierbar (3.2.2). Der Extinktionskoeffizient des m^7GpppA -Caps bei 295 nm läßt sich durch Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes aus der Absorption einer Lösung gleicher Cap-Konzentration bei 255 nm und 295 nm errechnen, da der Extinktionskoeffizient von m^7GpppA mit $\epsilon_{255} = 21500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bekannt ist (Tabelle 7). Der Extinktionskoeffizient des m^7GpppA -Cap bei 295 nm (ϵ_{295}) beträgt $3900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, womit sich die Absorption einer Lösung unterschiedlicher m^7GpppA -Konzentrationen errechnen läßt. Bei einer Konzentration von $270 \mu\text{M}$ absorbiert das m^7GpppA -Cap Licht einer Wellenlänge von 295 nm mit einer Absorption von $A_{295} = 1$. Bei einer Absorption von 1 gelangt nicht genügend Licht bis zum Küvettenmittelpunkt, um Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration zu erzeugen (Abbildung 28). Aufgrund dieser Probleme bei der Ermittlung einer Affinitätskonstanten für die Bindung von m^7GpppA an SPN1 konnte der K_d -Wert mit $\geq 170 \mu\text{M}$ lediglich angenähert werden (Tabelle

6). Dennoch ist die Bindung des monomethylierten Cap-Dinukleotides in Relation zu den hypermethylierten Analoga wesentlich schwächer.

Der Unterschied in der Bindungsaffinität zwischen den trimethylierten Dinukleotiden m_3GpppG und m_3GpppA mit $1 \mu M$ zu $12 \mu M$ ist zunächst überraschend (Tabelle 6). Da eukaryotische snRNAs in den meisten Fällen ein Adenin an zweiter Position tragen (Massenet *et al.*, 1998), sollte man erwarten, daß das m_3GpppA -Dinukleotid im Vergleich zu m_3GpppG affiner an den Importadapter SPN1 bindet. Anhand der Kristallstruktur der m_3G -Cap-bindenden Domäne von SPN1 im Komplex mit m_3GpppG kann die höhere Affinität von m_3GpppG an SPN1 aber erklärt werden (Abbildung 20). Das Adenin an zweiter Position paßt laut der Kristallstruktur auch in die Cap-Bindungstasche, geht aber vermutlich nicht so viele Wasserstoffbrückenbindungen wie die Guaninbase ein. Die Wasserstoffbrücken zwischen O6 der Base und der Aminogruppe von Ser105 und ebenso die Interaktion zwischen dem Carbonylsauerstoff von Ser105 und dem exozyklischen NH_2 der Guaninbase würden bei einem Adenin an zweiter Position der snRNA wegfallen (Abbildung 20). Dieser fehlende Energiebeitrag der beiden Wasserstoffbrücken könnte die Unterschiede in den Affinitäten der beiden Cap-Analoga erklären. Die ca. 50-fach höhere Affinität des längeren Cap-Oligos $m_3GpppA_m pU_m pA$ (230 nM) zu m_3GpppA ($12 \mu M$) bzw. 4-fach höhere Affinität zu m_3GpppG ($1 \mu M$) (Tabelle 6) deutet auf eine Interaktion der zusätzlichen Nukleotide der snRNA mit SPN1 oder eines zusätzlichen Bindungsbeitrages der Methylgruppe an Position O2' der Ribose, welche in den meisten snRNAs vorkommt, hin.

In der Oberflächenladungsverteilung der m_3G -Cap-bindenden Domäne von SPN1 sind keine positiv geladenen Reste nahe der Cap-Bindungstasche vorhanden, die mit dem Phosphatrückgrat des Oligonukleotides interagieren könnten (Abbildung 23). Mögliche hydrophobe Interaktionspartner für die Methylgruppe der Ribose sind ebensowenig in der Struktur erkennbar. Allerdings beinhaltet die Kristallstruktur nur die m_3G -Cap-bindende Domäne von SPN1, während die Fluoreszenztitrations mit Vollängen-SPN1 durchgeführt wurden. Möglicherweise liegen C- oder N-terminale Bereiche (As 1-96; As 301-360), welche in der Struktur fehlen oder ungeordnet sind, nahe der Bindungstasche und formen dort positiv geladene Bereiche, an welche das Phosphatrückgrat der snRNA binden kann (Abbildung 23).

4.3.3 Konformationen der Cap-Analoga im Zusammenhang mit Bindungsaffinitäten

Bei der Ermittlung der K_d -Werte wurde festgestellt, daß die methylierten Cap-Analoga eine Eigenfluoreszenz nach der Anregung bei 295 nm mit einem Maximum bei ca. 380 nm für m^7GpppA und ca. 400 nm für die trimethylierten Cap-Oligonukleotide zeigen (Abbildung 26). Ebenso konnte bei allen Cap-Oligonukleotiden ein ungewöhnliches Absorptionsmaximum bei ca. 300 nm (280 nm für m^7GpppA) beobachtet werden (Abbildung 24). Da gewöhnliche RNA weder Eigenfluoreszenz nach Anregung bei 295 nm noch eine Absorption bei 300 nm zeigt, sind die Fluoreszenzemission und das Absorptionsverhalten der Cap-Analoga vermutlich eine Folge der Methylierungen an der Guaninbase und der dadurch bedingten Basenstapelung in Lösung (Nishimura *et al.*, 1980). Nishimura *et al.* haben nachgewiesen, daß es protonierte und deprotonierte Formen des m^7G -Caps an N1 in Lösung gibt. Die protonierte, kationische Form liegt hauptsächlich in der gestapelten Form beider Basen vor, während die deprotonierte Form kaum Interaktionen der Basen in Lösung zeigt. Das Gleichgewicht beider Konformationen ist sowohl temperatur-, als auch pH-Wert-abhängig und bedingt die Existenz zweier Maxima in UV-Absorptionsspektren und in Anregungsspektren der Cap-Oligonukleotide. Die Anteile der gestapelten, protonierten und der deprotonierten Konformationen sind nicht über die Anregungsspektren quantifizierbar (Wieczorek *et al.*, 1995), da sich der Rückgang in der Fluoreszenz durch Basenstapelung bei trimethylierten Cap-Oligonukleotiden aus statischen und dynamischen Anteilen zusammensetzt, die nicht ohne Weiteres differenzierbar sind. Dennoch wurden Gleichgewichtskonstanten gestapelt *versus* ungestapelt von verschiedenen Arbeitsgruppen unter verschiedenen Bedingungen berechnet (Nishimura *et al.*, 1980; Wieczorek *et al.*, 1995). Die absoluten Werte sind nicht unmittelbar zu vergleichen, aber offensichtlich gehen die trimethylierten Cap-Dinukleotide in Lösung vermehrt Basenstapelung ein.

Zusätzlich steigt die Eigenfluoreszenz der Cap-Oligonukleotide bei einer Anregungswellenlänge von 295 nm mit zunehmendem Methylierungsgrad und Länge der Cap-Oligonukleotide, was auf eine Änderung der Ladungsverteilung im aromatischen Ringsystem der methylierten Cap-Base hinweist. Offensichtlich ist die positive Ladung an N7 delokalisiert. Die Lage des π -Elektronensystems der ersten snRNA-Base über dem dimethylierten Amin der Cap-Base könnte ein Zeichen für die hauptsächliche Lokalisation

der positiven Ladung auf N2 der methylierten Base sein. In jedem Fall wird sich die Form der Basenstapelung in Lösung durch die Dimethylierung an N2 ändern, wodurch die Cap-Bindung in der Bindungstasche von SPN1 beeinflusst wird.

Die Untersuchungen bezüglich der Basenstapelung wurden nur mit Dinukleotiden durchgeführt, weshalb das Fluoreszenzverhalten des Cap-Oligonukleotides nicht interpretierbar ist. Wahrscheinlich finden hier Wechselwirkungen der zusätzlichen Basen, möglicherweise auch aufgrund der 2'-O-methylierten Ribosen, statt.

Die Zunahme in der Fluoreszenzemission und die damit einhergehende vermehrte Basenstapelung in Abhängigkeit vom Methylierungsgrad der Caps und der Länge der Cap-Oligonukleotide stehen in direktem Zusammenhang zu der Bindungsaffinität getesteter Cap-Oligonukleotide zu SPN1. Offensichtlich scheinen jene Cap-Oligonukleotide besser mit SPN1 zu interagieren, die eine höhere Tendenz zur Basenstapelung in Lösung zeigen und bei denen die positive Ladung an N7 delokalisiert ist.

Wahrscheinlich ist die Diskriminierung monomethylierter Cap-Oligonukleotide durch SPN1 aber nicht ausschließlich von der Ladungsverteilung innerhalb der Cap-Base abhängig. In Lösung kann davon ausgegangen werden, daß die freie NH₂-Gruppe an Position N2 der monomethylierten Cap-Base mit den umgebenden Wassermolekülen zwei Wasserstoffbrückenbindungen eingeht. Da die NH₂-Gruppe bei der Cap-Bindung über dem Tryptophan-Rest 107 zu liegen kommen würde, müßten diese Wasserstoffbrückenbindungen bei der Bindung an SPN1 ersatzlos gebrochen werden. Zusätzlich könnten in der Bindungstasche keine van-der-Waals Interaktionen zwischen den Methylgruppen an N2 und Trp 107 stattfinden, was zu einem weiteren Verlust an Bindungsenergie führen würde.

Tabelle 11: Bindungsenergien der Cap-Analoga aufgrund berechneter K_d-Werte.

Cap-Oligo	K _d -Werte [μM]	ΔG ₀ [kJ/mol]
m ₃ GpppA _m pU _m pA	0.23 ± 0.02	-37.3
m ₃ GpppG	1.00 ± 0.03	-33.7
m ₃ GpppA	12.1 ± 0.55	-27.6
m ⁷ GpppA	≥ 170 ± 12.9	-21.2

ΔG₀=2.303*R*T*logK_d; ΔG₀=Änderung der freien Standardenthalpie, R=8.314[J/K*mol], T=293.25 [K], K_d=Dissoziationskonstante [M].

Die Bindungsenergien aller untersuchten Cap-Oligonukleotide wurden aufgrund der kalkulierten K_d -Werte berechnet und sind in Tabelle 11 aufgeführt. Die freien Standardenthalpien (ΔG_0) der trimethylierten Caps differieren um maximal 10 kJ/mol, was ungefähr der Bindungsenergie einer Wasserstoffbrückenbindung (5-20 kJ/mol) entspricht. Da die Bindungsenergie in Abhängigkeit des K_d -Wertes einer logarithmischen Funktion folgt, sind die Unterschiede in den Bindungsenergien kleiner, je höher die K_d -Werte sind. Selbst wenn der tatsächliche K_d -Wert für die Bindung des monomethylierten m^7GpppA an SPN1 im millimolaren Bereich (1-10 mM) angesiedelt wäre, würden die Bindungsenergien zwischen m_3GpppA und m^7GpppA nur um ca. 15 kJ/mol differieren. Die Unterschiede im Bindungsverhalten mono- und trimethylierter Cap-Dinukleotide an SPN1 könnten somit allein über das Fehlen der beiden Wasserstoffbrücken und der Bildung von van-der-Waals Interaktionen (ca. 5 kJ/mol) zwischen Trp 107 und den Methylgruppen an N2 erklärt werden. Die putativen Unterschiede in der Ladungsverteilung innerhalb der m_3G -Base im Vergleich zur m^7G -Base, die wahrscheinlich vermehrt zu gestapelten Cap-Dinukleotiden in Lösung führen, sowie die energetischen Unterschiede im Bindungsverhalten durch die fehlenden Wasserstoffbrückenbindungen an N2 der trimethylierten Base in Lösung und der Bildung von van-der-Waals Kontakten mit Trp 107 tragen vermutlich beide zu der bevorzugten Bindung trimethylierter snRNPs durch SPN1 bei.

Da mono- und trimethylierte Cap-Dinukleotide bereits in Lösung Konformationsunterschiede und wahrscheinlich auch unterschiedliche Ladungsverteilungen aufweisen, sollten m^7G -Cap-bindende Proteine unterschiedliche Interaktionsformen entwickelt haben, um m_3G -Caps zu diskriminieren.

4.3.4 Vergleich strukturell analysierter Cap-Bindungstaschen

Im Folgenden wird die Cap-Bindung bereits strukturell analysierter m^7G -Cap-bindender Proteine, namentlich das Cap-Bindungsprotein 20 (CBP20) (Calero *et al.*, 2002; Mazza *et al.*, 2002), der eukaryotische Initiations-Faktor 4E (eIF4E) (Marcotrigiano *et al.*, 1997; Matsuo *et al.*, 1997; Tomoo *et al.*, 2003) und die virale Nukleosid-2'-O-Methyltransferase (VP39) (Hodel *et al.*, 1998; Hodel *et al.*, 1997) im Vergleich zur m_3G -Cap-Bindung durch SPN1 näher beschrieben.

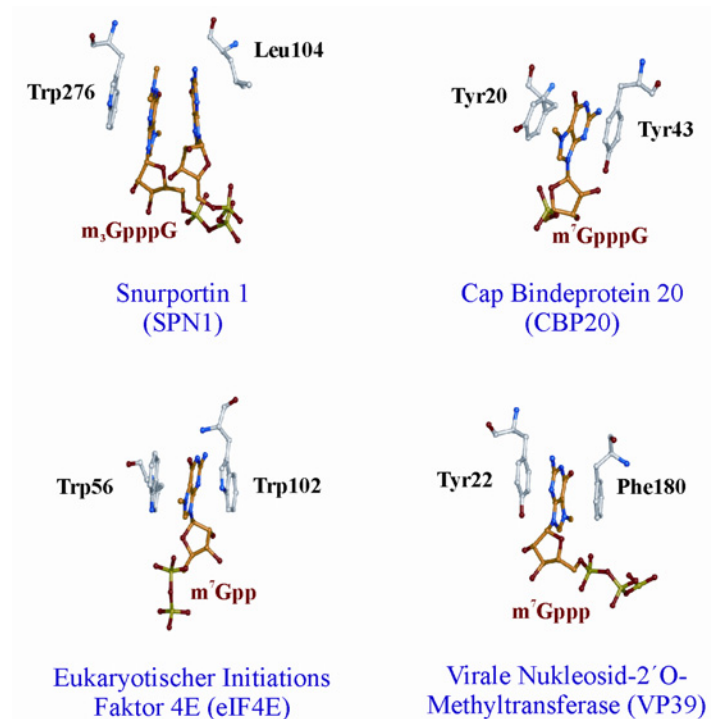


Abbildung 46: Vergleich der Basenstapelungen Cap-bindender Proteine. Dargestellt sind bezifferte Aminosäureseitenketten der Proteine CBP 20, eIF4E, VP 39 und SPN1 welche mit den gebundenen Cap-Analoga in gestapelter Form interagieren. Stickstoffatome sind blau, Sauerstoffatome rot und Phosphoratome grün gefärbt. Kohlenstoffatome gebundener Cap-Oligonukleotide sind orange und die interagierender Aminosäurereste grau dargestellt (*Pymol*).

Das CBP20 ist Teil des Cap-Bindungskomplexes (CBC), welcher das m^7G -Cap der mRNAs und snRNAs nach der N7-Methylierung bindet und mit den Kernexportfaktoren interagiert. Das CBP20 ist im Komplex mit m^7GpppG kristallisiert worden, wobei die zweite Base aus Übersichtsgründen nicht in Abbildung 46 dargestellt ist. Die methylierte Guanin-Base ist zwischen Tyr 20 und Tyr 43 gestapelt, geht zudem aber noch Wasserstoffbrücken mit benachbarten Aminosäureresten ein (nicht dargestellt). Genannt seien Wasserstoffbrücken zwischen Arg 112 und O6, Asp114 und N1, Asp 116 und N2, Trp 115 (O) und N2. Die unmethylierte Guaninbase interagiert mit dem π -Elektronensystem von Tyr 138 an der Proteinoberfläche. Der eukaryotische Initiations-Faktor 4E (eIF4E) ist Teil des Translationsinitiations-Komplexes eIF4F, welcher nach Erkennung der mRNA- m^7G -Cap-Struktur die ribosomalen Untereinheiten rekrutiert (Shatkin, 1976). eIF4E wurde im Komplex mit m^7GDP kristallisiert und stapelt die methylierte Base zwischen zwei Tryptophan-Resten (56 und 102). Folgende Wasserstoffbrückenbindungen der methylierten Guaninbase mit eIF4E wurden genannt: Glu 103 mit N1/N2 und Trp 102 mit O6. Anhand der 2'O-Methyltransferase aus *Vaccina Virus* wurden zahlreiche Cap-Bindungsstudien

beschrieben, die in (Quioco *et al.*, 2000) zusammengefaßt sind. Kristallisiert wurde die Methyltransferase zunächst im Komplex mit m^7GTP (Hodel *et al.*, 1997). Nachfolgend wurden zahlreiche Strukturen mit unterschiedlichen Cap-Analoga und biochemischen Analysen der Cap-Bindung am Beispiel von VP39 publiziert (Hodel *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 1999). In der ersten Struktur von VP39 mit m^7GTP wurde gezeigt, daß das methylierte Cap zwischen Tyr 22 und Phe 180 gestapelt ist und folgende Wasserstoffbrückenbindungen eingeht: Glu 233 mit N1/N2, Asp 182 mit N2 und Asn 240 mit O6.

Im Vergleich dazu ist das trimethylierte Cap bei SPN1 nicht zwischen zwei aromatischen Aminosäuren gestapelt. Beide Guaninbasen sind in gestapelter Form zwischen Trp 276 und Leu 104 gebunden. Offensichtlich ersetzt in diesem Fall die unmethylierte Guaninbase den zweiten aromatischen Aminosäurerest und Leu 104 trägt lediglich zur Positionierung und Stabilisierung des Basenstapels in der Bindungstasche bei. Zusätzlich liegt ein weiterer aromatischer Rest (Trp 107) senkrecht zum Basenstapel. Direkte Wasserstoffbrücken des Proteins mit der methylierten Cap-Base werden nur durch Ser 105 mit N1 und O6 der methylierten und N1, N2 und O6 der unmethylierten Base geformt. Zusätzlich geht Glu 106 eine indirekte Wasserstoffbrückenbindung mit N2 der unmethylierten Base ein.

Bei allen vorgestellten m^7G -Cap-bindenden Proteinen interagieren saure Aminosäurereste, meist Glutamat mit N1 und N2 der methylierten Base. Dies ist bei SPN1 nicht möglich, da N2 dimethyliert vorliegt. Stattdessen interagiert Glu 106 mit N2 der parallelen unmethylierten Base und Ser 105 interagiert mit beiden Basen. Trp 107 schirmt im Gegensatz zu den beschriebenen Strukturen das hydrophobe Dimethylamin an Position N2 gegen das Lösungsmittel ab.

Alle Strukturen m^7G -Cap-bindender Proteine im Komplex mit Cap-Oligonukleotiden zeigen im Gegensatz zu SPN1 lediglich eine Stapelung der m^7G -Cap-Base zwischen zwei aromatischen Aminosäureresten. Falls zusätzliche Nukleotide in der Struktur vorhanden sind, werden diese an der Oberfläche des Moleküls gebunden. Die Basenstapelung durch eine Kationen- π -Interaktion (4.3.1) und deren Wichtigkeit für die Bindungsaffinität der Cap-Oligonukleotide an das jeweilige Protein wurden durch zahlreiche Mutationsstudien und durch Beobachtung des Bindungsverhaltens modifizierter Cap-Analoga untersucht (Hodel *et al.*, 1998; Hsu *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 1999; Quioco *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2001). Generell ist die Form der Bindungstasche und die Orientierung der Aminosäurereste, sowie der Cap-Base wichtig. Die beschriebene Kationen- π -Interaktion der methylierten, positiv geladenen

Cap-Base mit zwei aromatischen Aminosäuren ist in allen bereits strukturell analysierten Cap-bindenden Proteinen konserviert, obwohl deren Sekundärstrukturen sehr unterschiedlich sind. Die beiden aromatischen Aminosäuren sind für die Bindung der Cap-Base oft unterschiedlich wichtig, aber deren Mutation zu nichtaromatischen Resten führt in allen Fällen zu einem starken Rückgang der Bindungsaffinität. Wenn beide gestapelten Reste mutiert werden, ist keine Cap-Bindung mehr möglich. Es wurde gezeigt, daß die Aminosäuren Trp, Tyr und Phe unterschiedlich starke Einflüsse auf die Bindung des Caps haben (Trp > Tyr > Phe). Einer der beiden Reste muß Trp oder Tyr sein; selbst wenn der zweite Rest dann zu einer nichtaromatischen Aminosäure mutiert wird, kann eine Cap-Bindung weiter möglich sein. Bei VP39 wurde gezeigt, daß die Lokalisation der positiven Ladung im Ringsystem der methylierten Cap-Base keinen großen Einfluß auf die Bindungsaffinität hat. Auch die Art der Purinbase (G oder A) ist in diesem Fall nicht entscheidend. Die Bindung von m^1G , m^3G , m^1A und m^3A durch VP39 wurde getestet (Quioco *et al.*, 2000), über den Einfluß zusätzlicher Methylgruppen am exozyklischen N2 ist jedoch nichts bekannt.

Die Glu-Reste in der Bindungstasche von eIF4E und VP39, welche mit N1 und N2 der methylierten Base interagieren, scheinen neben den gestapelten Resten auch eine wichtige Rolle bei der Bindung zu haben. Mutiert man die Reste zu Glutamin oder Aspartat, wird die Bindung empfindlich gestört, und die Bindungsaffinität läßt ungefähr um einen Faktor von 10 nach (Hsu *et al.*, 2000).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß alle strukturell analysierten m^7G -Cap-bindenden Proteine hauptsächlich über eine Stapelung der protonierten Cap-Base zwischen elektronenreichen aromatischen Resten mit der Cap-Struktur interagieren. Diese Form der Interaktion ist durch Wechselwirkung kationischer Aminosäuren mit aromatischen Aminosäuren in Proteinen bekannt geworden und wird als Kationen- π -Interaktion bezeichnet. SPN1 stapelt die methylierte Cap-Base und die erste snRNA-Base zwischen Trp 276 und Leu 104, beteiligt offensichtlich aber noch einen zweiten aromatischen Rest Trp 107, welcher über dem Stapel in 4.3 Å Abstand zum Dimethylamin an Position N2 liegt, an der Cap-Bindung. Aufgrund dargestellter Vergleiche mit anderen Cap-bindenden Proteinen stellt sich nun die Frage nach der Wichtigkeit von sowohl Trp 276 und der unmethylierten Base, als auch des Trp 107 für die m_3G -Cap-Bindung im Fall von SPN1.

4.4 Bindungsbeitrag von Trp 276 und Trp 107 und deren Rolle beim Kernimport spleißosomaler UsnRNPs

Die Wichtigkeit der an der m_3 GpppG-Cap Bindung beteiligten Tryptophanreste (276 und 107) konnte sowohl durch Abschätzung der Bindungsaffinität von Einfach- und Doppelmутanten zu SPN1, als auch durch Vergleich der Importaktivität der Mutanten in Relation zu Wildtyp-SPN1 bestätigt werden (3.3.3). Untersuchungen zur Bindung von m_3 GTP, um die Rolle der ersten snRNA-Base abzuschätzen zu können, wurden bisher nicht durchgeführt.

Dennoch war die Erkenntnis überraschend, daß Trp 107 bei der Cap-Bindung eine annähernd so wichtige Rolle wie das am Basenstapel beteiligte Trp 276 einnimmt. Die Bindungsaffinität von SPN1W276A läßt im Vergleich zu SPN1wt um 68 % auf 32 % nach, während bei SPN1W107A die Bindung des m_3 GpppG-Caps immerhin um 60 % auf 40 % verringert ist. Die Doppelmутante zeigt mit einem Rückgang der Bindungsaffinität um 75 % auf 25 % kaum noch Cap-Bindung. Ähnliche Ergebnisse beim *in vitro* Kernimport bestätigten die Ergebnisse des Fluoreszenzassays. Die Importaktivität relativ zu Wildtyp-SPN1 betrug bei SPN1W276A nur noch 14 %, bei SPN1W107A 26 % und bei der Doppelmутante W276/107A noch 12 %. Da alle Werte lediglich in Relation zu SPN1wt bestimmt wurden, können sie nicht als Absolutwerte gelten, sondern immer nur im Vergleich zu SPN1wt.

Eigentlich würde man bei der Doppelmутante weder eine Bindungsaffinität, noch eine Importaktivität erwarten, jedoch können Meßungenauigkeiten oder unspezifische Wechselwirkungen die Werte beeinflussen. Zum Beispiel könnte das m_3 GpppG-Cap Dinukleotid mit Tryptophanresten, die 10-20 Å von der Bindungstasche entfernt liegen, immer noch interagieren, oder es könnte unspezifisch mit an der Oberfläche des Moleküles gelegenen Tryptophanresten wechselwirken. Dennoch sind die gemessenen Unterschiede in der Bindungsaffinität und der Importrate signifikant genug, um einen großen Einfluß beider Tryptophanreste zu bestätigen.

Eine interessante Beobachtung ist der 6-fache Rückgang der Tryptophanfluoreszenz, sobald eines der beiden Tryptophane in der Bindungstasche zu Alanin mutiert wurde. Bei der Mutation des zweiten Restes sinkt die Fluoreszenz kaum merklich. Dies weist neben der SPN1-Struktur auf die räumliche Nähe der beiden Reste und deren Interaktion hin.

Im *in vitro* Importassay scheinen die Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten sogar noch signifikanter zu sein, als bei der Messung der Cap-Bindungsaffinität im Fluoreszenzassay. Da der Importassay mit rekonstituierten U1 snRNPs durchgeführt wurde, während die Bindungsaffinität *in vitro* mit dem m₃GpppG-Cap-Dinukleotid gemessen wurde sind die Ergebnisse beider Experimente jedoch nicht direkt vergleichbar. Bei der Bestimmung von Dissoziationskonstanten verschiedener Cap-Analoga und SPN1wt wurde gezeigt, daß ein modifiziertes m₃G-Cap-Tetranukleotid (m₃GpppA_mpU_mpA) eine höhere Affinität zu SPN1 hat. Allein aufgrund dieser Tatsache und der nicht auszuschließenden Wechselwirkung von SPN1 mit Proteinen des U1 snRNP-Partikels ist ein direkter Vergleich ausgeschlossen.

Das Trp 107 ist nicht direkt an der Stapelung der methylierten Base beteiligt und interagiert wahrscheinlich über van-der-Waals Kontakte mit den Methylgruppen an N2 und schirmt diese vom umgebenden Lösungsmittel ab. Im Hinblick auf die beschriebenen Löslichkeitsprobleme des kristallisierten SPN1-Fragmentes ohne gebundenes Cap-Dinukleotid, liegt das Trp 107 für einen hydrophoben aromatischen Rest sehr nah an der Oberfläche des Moleküls. Wenn man davon ausgeht, daß Trp 107 bei der Cap-Bindung weniger dem Lösungsmittel ausgesetzt ist und zuvor zur Präzipitation des Fragmentes beiträgt, so folgt daraus eine Bewegung des Restes bei der Bindung des trimethylierten snRNP-Caps. Zudem wäre der Vorgang der Cap-Bindung mit der Anordnung der Seitengruppen im Modell der m₃G-Cap-bindenden Domäne schwierig.

Man würde annehmen, daß das Cap in der protonierten, gestapelten Form zunächst durch Trp 276 und Leu 104 gebunden wird. Trp 107 könnte dann auf dem Basenstapel zu liegen kommen, indem es die dem Lösungsmittel zugewandte Position verläßt und eine Kationen- π -Interaktion oder eine hydrophobe Wechselwirkung mit dem Basenstapel eingeht. Diese Form der Cap-Bindung würde als *induced fit* bezeichnet werden, da eine Konformationsänderung des Proteins nötig wäre, um den Liganden zu binden.

Abschließend läßt sich sagen, daß der hohe Bindungsbeitrag des Trp 107 die Annahme, daß ihm eine wichtige Funktion bei der Diskriminierung m⁷G-Cap tragender RNAs zukommt, unterstützt.

4.5 Cap-Bindung und der snRNP-Import in höheren Eukaryoten

Nach der strukturellen Analyse der m₃G-Cap-Bindung durch humanes SPN1 stellte sich die Frage, ob orthologe SPN1-Moleküle höherer Eukaryoten speziell im Bereich der Cap-Bindungstasche konserviert sind. Anhand der Primärstruktur von humanem SPN1 wurden orthologe Proteine in der PDB gesucht und deren Sequenzen miteinander verglichen. Hierfür wurde ein Sequenzvergleich mit *ClustalW* durchgeführt und in *ESPrpt* graphisch dargestellt (Abbildung 49). Die Sekundärstrukturelemente der strukturell analysierten m₃G-Cap-Bindedomäne wurden in das *alignment* eingebaut, wobei lediglich α -Helices und β -Stränge oberhalb des Sequenzvergleich aufgeführt sind. Die m₃G-Cap-bindenden Domänen der verglichenen orthologen Proteine sind stark konserviert, wobei hauptsächlich die Regionen der β -Faltblätter eine sehr hohe Ähnlichkeit aufweisen.

Alle mit dem m₃GpppG-Cap interagierenden Reste (gelbe Dreiecke) sind bis auf einige, im Folgenden diskutierte Aminosäuren ebenfalls hochkonserviert.

Von den Aminosäureresten, welche direkt mit den Cap-Basen wechselwirken, ist lediglich das Ser 105 in *A. thaliana* durch ein Prolin ersetzt. Dies erscheint außergewöhnlich, da Ser 105 sehr viele Wasserstoffbrückenbindungen zu beiden Basen eingeht, die durch ein Prolin an dieser Position nicht mehr möglich wären. Dennoch paßt ein Prolinrest in die Cap-Bindungstasche im Modell der m₃G-Cap-bindenden Domäne von SPN1 und wahrscheinlich wäre eine Cap-Bindung auch möglich, die Bindungsaffinität würde aber wahrscheinlich zurückgehen. Das Prolin an Position 103 der Aminosäuresequenz könnte jedoch auch aufgrund eines Sequenzierfehlers falsch in die Datenbank eingetragen worden sein: Pro 103 wird durch das Triplet CCU und Serin durch UCU kodiert. Das stapelnde Trp 276 ist bei *A. thaliana* um eine Position verschoben.

Im Gegensatz zur m₃G-Cap-bindenden Domäne von SPN1 scheint die IBB-Domäne in den orthologen Proteinen nicht so stark konserviert zu sein. Die Ansammlungen basischer Aminosäuren, welche wie durch Cingolani *et al.* am Beispiel der IBB-Domäne von Importin α (IBB $_{\alpha}$) gezeigt wurde, wichtig für die Bindung in der sauren Bindungstasche von Importin β ist, ist jedoch in allen Orthologen vertreten (Abbildung 48) (Cingolani *et al.*, 1999). Selbst das Orthologe aus der Fruchtfliege, welchem N-terminal ca. 30 As fehlen, weist die konservierten Bereiche auf. Am Beispiel des humanen SPN1 erstrecken sich die basischen Bereiche von As 27 bis As 64 der IBB-Domäne.

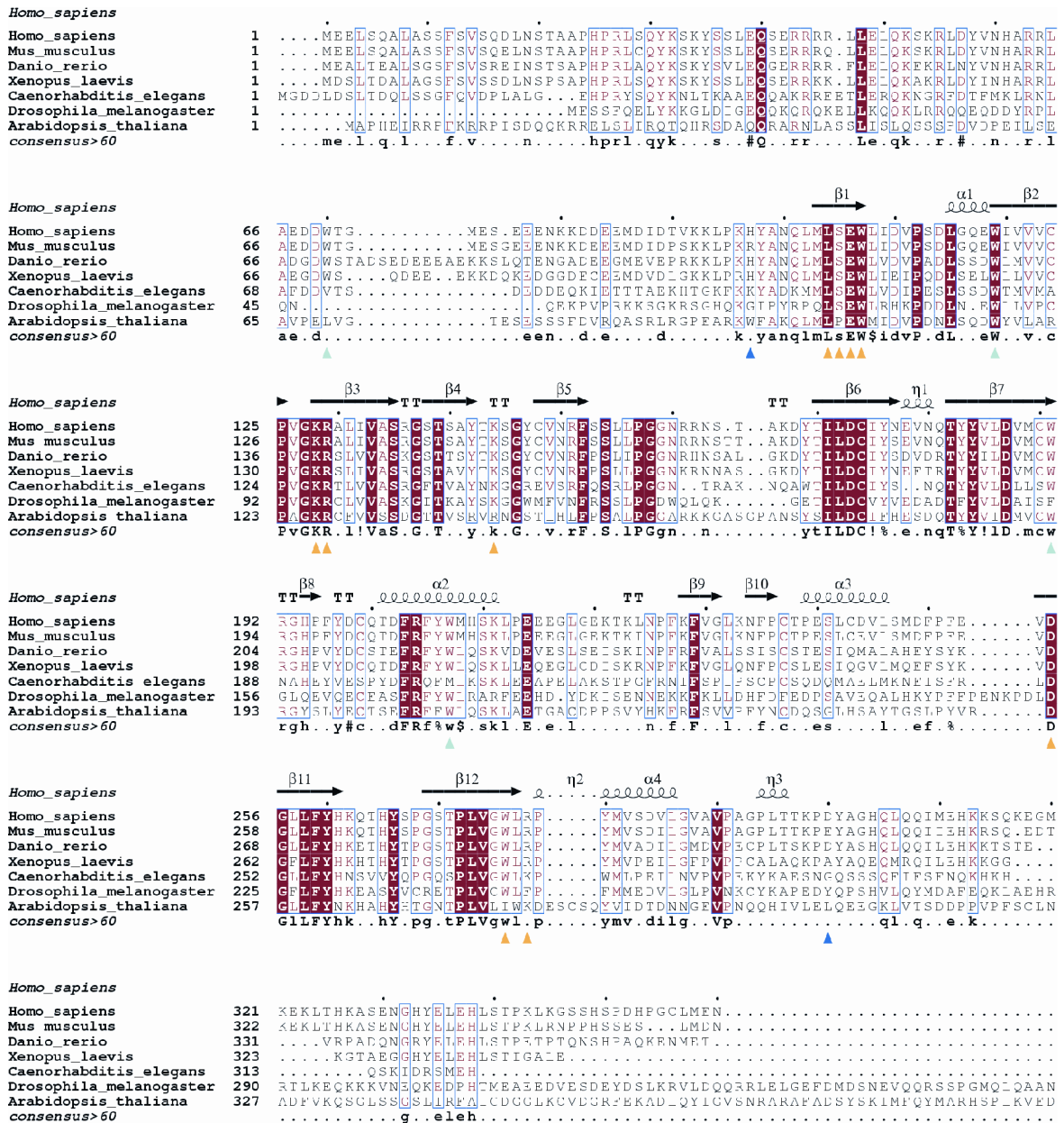


Abbildung 47: Sequenzvergleich des humanen SPN1 mit seinen Orthologen aus anderen Organismen. Alignment des humanen SPN1 (*Homo sapiens*) mit seinen Orthologen aus Maus (*Mus musculus*), Zebrafisch (*Danio rerio*), Krallenfrosch (*Xenopus laevis*), Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*), Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*) und Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*). Konservierte Reste sind blau umrandet, wobei ähnliche und teilweise konservierte Reste rot sind und Reste, die in allen homologen Proteinen vorkommen rot unterlegt sind. Sekundärstrukturelemente der m_3G -Cap-Bindedomäne sind über dem alignment gezeigt. Die Konsensussequenz ist als letzte Zeile des Sequenzvergleichs dargestellt. Der Anfang und das Ende der strukturell analysierten Sequenz aus Mensch sind mit dunkelblauen Dreiecken gekennzeichnet, während alle nicht an der Cap-Stapelung beteiligten Trp-Reste mit hellblauen Dreiecken markiert sind. Sämtliche an der Cap-Bindung beteiligten Reste wurden mit orangen Dreiecken hervorgehoben (ClustalW; ESPript 2.2).

Auffallend ist die Länge des orthologen Proteins aus der Fruchtfliege (*Drosophila melanogaster*). Mit 883 Aminosäuren ist es mehr als doppelt so lang, als die restlichen

Proteine mit ca. 350 As. Die Vermutung liegt nahe, daß der C-terminale Bereich des Proteins eine zusätzliche Funktion ausübt. Eine Datenbanksuche ergab eine Ähnlichkeit zum *terminal desoxynucleotidyltransferase interacting factor 1 (TdIF1)*, welcher mit *terminal desoxytidyltransferase 1 (TdT1)* interagiert, einer DNA-Polymerase die zu der Diversität von B- und T-Zellen beisteuert (Yamashita *et al.*, 2001).

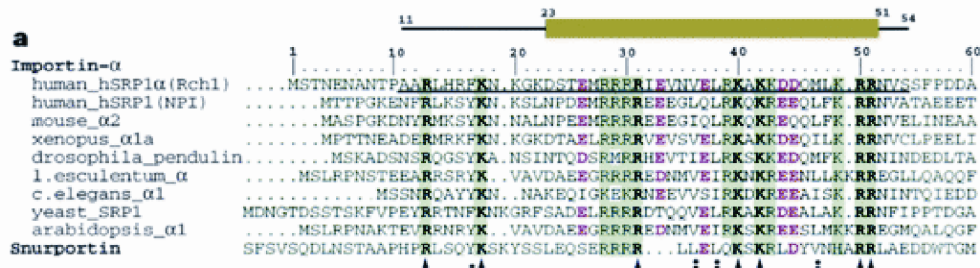


Abbildung 48: Alignment von IBB-Domänen verschiedener Importin β -bindender Proteine im Vergleich zu SPN1. Über dem Sequenzvergleich wird die Tertiärstruktur der IBB α -Domäne gezeigt. Basische Reste, welche wichtig für die Interaktion mit Importin β sind, wurden fett gedruckt. Saure Reste in deren Nachbarschaft sind rot dargestellt. Das im Komplex mit Importin β kristallisierte Fragment wurde unterstrichen (Cingolani *et al.*, 1999).

TdIF1 zeigt große Homologie zum Transkriptionsfaktor p65 und beinhaltet ssDNA- und dsDNA-Bindedomänen. Mögliche Funktionen der C-terminalen Domäne von SPN1 in *D. melanogaster* beim Kernimport modifizierter snRNPs sind fraglich. Ebenso fraglich ist die Funktion der letzten 30 Aminosäuren in humanem SPN1 und den meisten anderen Homologen, denn SPN1 aus *C. elegans* ist auch ohne die letzten 30 Reste voll funktionell (3.4.2).

4.6 Konkurrenz zwischen eIF4E und SPN1 um trimethylierte RNAs in *C. elegans*

Die Übertragung eines m⁷G-Cap auf transkribierte mRNAs und snRNAs findet schon während deren Transkription im Nukleus statt. Der CBC bindet die Cap-Struktur und vermittelt den Kernexport dieser RNA Polymerase II-Transkripte (1.3.1).

Im Zytoplasma werden die mRNAs anhand ihrer Cap-Struktur vom Translationsinitiationsfaktor eIF4E gebunden und der Translation zugeführt. Gereifte U snRNPs werden am N2 ihres m⁷G-Cap dimethyliert. Das trimethylierte m³G-Cap dient als

Kernimportsignal und wird durch den Importadapter SPN1 gebunden (1.3). Beide Cap-Varianten schützen die RNA-Moleküle vor Proteasenabbau.

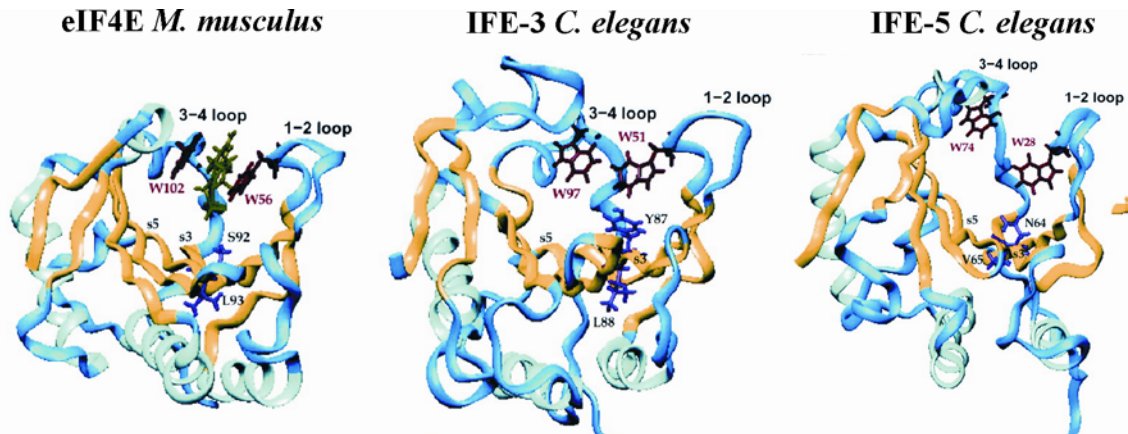


Abbildung 49: Strukturmodelle zweier eIF4E-Isoformen in *C. elegans* mit dem strukturell analysierten eIF4E aus Maus. β -Stränge der Schleifenmodelle sind orange, α -Helices hellblau und Loop-Regionen blau dargestellt. Loop 1-2 und Loop 3-4, in welchen funktionelle Mutationen durchgefuehrt wurden, sind ebenso benannt wie mit dem m^7G -Cap interagierende Tryptophanreste (rot) und Reste am Boden der Bindungstasche (blau), welche im Kugel-Stab-Modell gezeigt sind (Miyoshi *et al.*, 2002).

Im Jahr 1990 wurden in *Caenorhabditis elegans* trimethylierte mRNA-Moleküle im Zytoplasma entdeckt, die durch trans-Spleißen mit den ersten 22 Nukleotiden einer sogenannte SL (*spliced-leader*)-RNA verknüpft werden und daraufhin das m_3G -Cap tragen (Liou & Blumenthal, 1990). Überraschenderweise werden diese m_3G -Cap-tragenden mRNAs translatiert; sie machen in *C. elegans* ungefähr 70 % der gesamten mRNA aus. Man fand daraufhin fünf Isoformen des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF4E mit unterschiedlichen Affinitäten zu mono- und trimethylierten Cap-Varianten (Keiper *et al.*, 2000). Miyoshi *et al.* verwendeten die Struktur des eIF4E aus Maus als Vorlage für Strukturmodelle der fünf Isoformen in *C. elegans* (Miyoshi *et al.*, 2002) (Abbildung 49). Dargestellt sind Strukturmodelle der ausschließlich m^7G -Cap-bindenden Isoform IFE-3 und der hauptsächlich m_3G -Cap-bindenden Isoform IFE-5 aus *C. elegans* im Vergleich mit eIF4E aus Maus. Durch Mutation verschiedener Reste in den Schleifen-Regionen (1-2/3-4) und am Boden der Bindungstasche bzw. Änderungen in den Redoxbedingungen wurden die Cap-Interaktionen beider Isoformen aus *C. elegans* im Vergleich mit eIF4E aus Maus analysiert. Anhand der Strukturmodelle und *Molecular Dynamics Simulations* (MDS) wurden die Dimensionen der Cap-Bindungstasche bei den Mutanten, sowie bei IFE-3 und IFE-5

bestimmt. Es stellte sich heraus, daß Isoformen, welche vermehrt mit dem m₃G-Cap interagieren, eine breitere und tiefere Bindungstasche haben. Die Abstände zwischen den beiden Tryptophanresten, die mit dem Cap interagieren, sind zudem bei der m₃G-Cap-bindenden Variante IFE-5 weiter voneinander entfernt, als bei der m⁷G-Cap-bindenden Isoform.

Daraus leiten sich im Vergleich mit der Struktur der m₃G-Cap-bindenden Domäne von SPN1 im Wesentlichen zwei Fragen ab: Bindet die m₃G-Cap-bindende Isoform IFE-5 in *C. elegans* aufgrund der breiteren und tieferen Bindungstasche auch die ersten beiden Reste der m₃G-mRNA in einer gestapelten Form? Und wenn dies der Fall ist, wie unterscheiden m₃G-Cap-bindende Proteine im Zytoplasma zwischen zu translatierender mRNA und UsnRNA, die wieder in den Kern transportiert werden soll?

Die Bindung der beiden ersten Basen in der gestapelten Form durch IFE-5 ist wahrscheinlich, da m₃G-Cap-tragende RNAs wahrscheinlich hauptsächlich in der gestapelten Form in Lösung vorliegen (4.3.3). Letztere Frage kann vermutlich nur durch den direkten Vergleich der Cap-Bindungstasche von Strukturen m₃G-Cap-bindender Proteine aus *C. elegans* beantwortet werden.

5 Zusammenfassung

Während der Biogenese spleißosomaler Untereinheiten (U snRNPs) wird die U snRNA nach der Transkription ins Zytoplasma exportiert, wo die Zusammenlagerung mit sieben Sm-Proteinen erfolgt und nachfolgend das 7-Methyl-Guanosin (m^7G)-Cap zu einem 2,2,7-Trimethyl-Guanosin (m_3G)-Cap umgewandelt wird. Das hypermethylierte m_3G -Cap stellt ein Kernimportsignal der snRNPs U1, U2, U4 und U5 dar. Snurportin1 (SPN1) vermittelt als Importadaptor die Interaktion zwischen den m_3G -Cap-tragenden snRNPs und dem Kernimportrezeptor Importin β , der die Kernporenpassage mediiert. SPN1 besteht aus einer N-terminalen Importin β -bindenden (IBB)-Domäne und einer C-terminalen m_3G -Cap-bindenden Domäne, die keinerlei Sequenzähnlichkeit zu anderen Proteinen aufweist.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Struktur der m_3G -Cap-bindende Domäne von SPN1 im Komplex mit m_3GpppG aufgeklärt. SPN1 bindet das hypermethylierte m_3GpppG -Cap mit gestapelten Basen zwischen Trp 276 und Leu 104. Diese Form der Wechselwirkung der positiv geladenen Cap-Base mit den π -Elektronensystemen des benachbarten Trp 276 und der unmethylierten snRNA-Base nennt sich Kationen- π -Interaktion. Trp 107 liegt senkrecht über dem Basenstapel und geht zusätzlich van-der-Waals Interaktionen mit den Methylgruppen an Position N2 der Cap-Base ein. In allen strukturell analysierten m^7G -Cap-bindenden Proteinen wird lediglich die methylierte Cap-Base zwischen zwei aromatischen Aminosäureresten gestapelt und ein aromatischer Rest senkrecht zum Basenstapel fehlt. Zur funktionellen Analyse der Cap-Bindung durch SPN1 wurden sowohl Dissoziationskonstanten mono- und trimethylierter Cap-Analoga bestimmt, als auch das Bindungsverhalten von Tryptophan-Mutanten (W276A und W107A) über Fluoreszenzbindungsassays und deren Importaktivität über einen *in vitro* Kernimportassay untersucht.

Durch die strukturelle Analyse der m_3G -Cap-bindenden Domäne von SPN1 konnte eine neue Form der Cap-Bindung im Vergleich zu strukturell untersuchten m^7G -Cap-bindenden Proteinen (CBC, eIF4E und VP39) gezeigt werden. Des Weiteren wurden Unterschiede in den Bindungsaffinitäten von SPN1 zu mono- und trimethylierten Cap-Analoga gefunden und der Bindungsbeitrag der mit dem m_3GpppG -Cap interagierenden Tryptophan-Reste von SPN1 wurde quantifiziert.

6 Summary

During snRNP biogenesis the snRNAs are exported into the cytoplasm, where the assembly with the common Sm proteins occurs and the 5' cap nucleotide is modified from an 7-methyl-guanosine (m^7G -) to a 2,2,7-trimethyl-guanosine (m_3G -) cap. The hypermethylated m_3G -cap represents one of the nuclear localisation signals of the snRNPs U1, U2, U4 and U5. As an import adaptor snurportin1 bridges the interaction between the m_3G -cap containing snRNPs and the nuclear import receptor importin β , which mediates the passage through the nuclear pore complex. Snurportin1 contains a N-terminal importin β binding (IBB) domain and a C-terminal m_3G -cap-binding region, which shows no similarity to other import factors.

This work presents the crystal structure of the m_3G -cap binding domain of SPN1 in complex with an m_3GpppG cap dinucleotide. SPN1 binds both of the bases of the dinucleotide in a stacked conformation between Trp 276 and Leu 104. The methylated, positively charged guanine base interacts with the π -electron systems of Trp 276 and the nonmethylated base. This kind of interaction is called cation- π -interaction. Trp 107 is located perpendicular to the stack and forms van-der-Waals contacts to the methyl groups on N2. Stacking of both bases and an aromatic residue perpendicular to the stack were not observed in other m^7G -cap binding proteins. These proteins only bind the methylated cap base between two aromatic side chains in a stacked conformation. For the functional characterisation of cap-binding by SPN1, dissociation constants for mono- and trimethylated caps were defined and the binding affinities of tryptophane mutants for m_3GpppG were investigated by fluorescence assays and their import activity was quantified by an *in vitro* nuclear import assays.

The presented crystal structure of SPN1 in complex with m_3GpppG shows a novel cap-binding mode in contrast to m^7G -cap-binding proteins structurally investigated (CBC, eIF4E and VP39). Furthermore differences in cap-binding affinities of SPN1 for mono- and trimethylated cap-oligonucleotides were demonstrated and binding contributions of the interacting tryptophane residues were quantified.

7 Abkürzungsverzeichnis

ϕ	Phaseninformation einer Wellenfunktion
λ	Wellenlänge
$\rho(x,y,z)$	Elektronendichte
ΔF_{\max}	Maximale Fluoreszenzänderung
ΔG_0	Änderung der freien Standardenthalpie
'	Minute
''	Sekunde
A	Absorption
Å	Angström [1 Å = 0.1 nm]
As	Aminosäuren
AG	Arbeitsgemeinschaft
ARM-Repeats	<i>Armadillo-repeats</i>
as	<i>antisense</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B	Temperaturfaktor [Å ³]
BESSY	Berliner Elektronensynchrotron
Bj	Atomarer Temperaturfaktor
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration [M]
C	Cytosin
<i>C. e. und C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CBC	<i>Cap binding complex</i>
CBP	<i>Cap binding protein</i>
CBP 20	<i>Cap binding protein 20</i>
cDNA	Zur RNA komplementäre DNA
CIP	<i>Calf Intestine Phosphatase</i>
cps	<i>Counts Per Second</i>
Crm1	<i>Chromosome region maintenance 1</i>
CV	Säulenvolumen
Cy3	<i>Cytochrome 3</i>
d	Tage
Da	Dalton [g/mol]
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N, N, N', N' Ethylendiamintetraacetat
eIF4E	Eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
ESP	<i>Electrochemical simulation package</i>
F	Strukturfaktor in Kristallographie und Gesamtfluoreszenz in Fluorimetrie
F_{calc}	Kalkulierte Strukturfaktoren
FFT	<i>Fast Fourier Transform</i>
F_{obs}	Beobachtete Strukturfaktoren
G	Guanin
GSH	Reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden

HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonat
hnRNP	<i>Heterogenous nuclear ribonucleoprotein</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I	Intensität
IBB	Importin β -bindend
IBB _{SPN1}	IBB-Domäne von SPN1
IBB _{α}	IBB-Domäne von Importin α
IMAC	<i>Ion-Metal-Affinity-Chromatography</i>
Imp	Importin
IPTG	Isopropyl- β -D-isothiogalactosid
Kap	Karyopherin
kb	Kilobasen
K _d	Dissoziationskonstante [M]
LB	Luria Bertani
m	Steigung der Funktion
M	Molarität
m ₃ G, m ^{2,2,7} G	Guanin einmal an N7 und zweimal an N2 methyliert
m ⁷ G	Guanin einmal an N7 methyliert
MAD	<i>Multiple Anomalous Dispersion</i>
mAU	Milli-Absorptionseinheiten
MIR	<i>Multiple Isomorphous Replacement</i>
MOPS	γ -Morpholino-propansulfonsäure
MR	<i>Molecular Replacement</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht [g/mol]
N	Nukleotid
NES	<i>Nuclear export signal</i> , Kernexportsignal
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i> , Kernimportsignal
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NPC	<i>Nuclear pore complex</i> , Kernporenkomplex
NTF2	<i>Nuclear transport factor 2</i> , Kerntransportfaktor 2
OD	Optische Dichte
P(u,v,w)	Patterson-Funktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PHAX	<i>Phosphorylated adapter for RNA export</i>
PIMT	<i>PRIP-interacting protein with methyltransferase domain</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRIP	<i>peroxisome proliferator-activated receptor interacting protein</i>
PTHrP	<i>Parathyroid hormone related protein</i>
Ran	<i>Ras-related nuclear antigen</i>
RanBP	<i>Ran binding protein</i>
RanGAP	<i>Ran GTPase activating protein</i>
RanGEF	<i>Ran guanine nucleotide exchange factor</i>
rmsd	<i>Root mean square deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	<i>sense</i>
SAD	<i>Single Anomalous Dispersion</i>
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIR	<i>Single Isomorphous Replacement</i>
SL	<i>Spliced leader</i>
Sm	<i>Steven Miller</i>
SMN	<i>Survival of motor neuron</i>

snRNA	<i>Small nuclear RNA</i>
snRNP	<i>Small nuclear Ribonucleoprotein</i>
SPN1	Snurportin 1
SPN1wt	Wildtyp-SPN1
ssDNA	Einzelsträngige DNA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TdIF1	<i>Terminal desoxynucleotid transferase interacting faktor 1</i>
TdT1	<i>Terminal desoxynucleotid transferase 1</i>
TEMED	N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin
Tgs1	Trimethylguaninsynthase 1
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UsnRNP	<i>Uridinrich small nuclear ribonucleoprotein</i>
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v/v	Volumenprozent
Vel	Elutionsvolumen
V _M	Matthews-Parameter
VP39	Virale 2' O Methyltransferase (Virales Protein 39)
w/v	Gewichtsprozent
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung (g = 9.81 m/s ²)
Xpo1	Exportin 1
ε	Molarer Extinktionskoeffizient [M ⁻¹ cm ⁻¹]

Nicht angegebene Abkürzungen für physikalische Größen und deren Einheiten entsprechen dem SI-System.

8 Literaturverzeichnis

Adam, S. A., Sterne-Marr, R. and Gerace, L. **1991**. *In vitro* nuclear protein import using permeabilized mammalian cells. *Methods Cell Biol.* **35** 469-82.

Arts, G. J., Fornerod, M. and Mattaj, I. W. **1998**. Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr. Biol.* **8** (6): 305-14.

Bayliss, R., Kent, H. M., Corbett, A. H. and Stewart, M. **2000**. Crystallization and initial X-ray diffraction characterization of complexes of FxFG nucleoporin repeats with nuclear transport factors. *J. Struct. Biol.* **131** (3): 240-7.

Bednenko, J., Cingolani, G. and Gerace, L. **2003**. Nucleocytoplasmic transport: navigating the channel. *Traffic* **4** (3): 127-35.

Bordonne, R. **2000**. Functional characterization of nuclear localization signals in yeast Sm proteins. *Mol. Cell. Biol.* **20** (21): 7943-54.

Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U. and Lührmann, R. **2001**. Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein. *RNA* **7** (11): 1531-42.

Brahms, H., Raymackers, J., Union, A., de Keyser, F., Meheus, L. and Lührmann, R. **2000**. The C-terminal RG dipeptide repeats of the spliceosomal Sm proteins D1 and D3 contain symmetrical dimethylarginines, which form a major B-cell epitope for anti-Sm autoantibodies. *J. Biol. Chem.* **275** (22): 17122-9.

Braslavsky, C., Nowak, C., Görlich, D., Wittinghofer, A. and Kuhlmann, J. **2000**. Different structural and kinetic requirements for the interaction of Ran with the Ran-binding domains from RanBP2 and importin-beta. *Biochemistry* **39** (38): 11629-39.

Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. and Warren, G. L. **1998**. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D* **54** (5) 905-21.

Burge, C. B., Tuschl, T. and Sharp, P. A. **1999**. Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. *The RNA World* 525-560.

Calero, G., Wilson, K. F., Ly, T., Rios-Steiner, J. L., Clardy, J. C. and Cerione, R. A. **2002**. Structural basis of m7GpppG binding to the nuclear cap-binding protein complex. *Nat. Struct. Biol.* **9** (12): 912-7.

Carazo-Salas, R. E., Guarguaglini, G., Gruss, O. J., Segref, A., Karsenti, E. and Mattaj, I. W. **1999**. Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature* **400** (6740): 178-81.

Chaillan-Huntington, C., Braslavsky, C. V., Kuhlmann, J. and Stewart, M. **2000**. Dissecting the interactions between NTF2, RanGDP, and the nucleoporin XFXFG repeats. *J. Biol. Chem.* **275** (8): 5874-9.

Chook, Y. and Blobel, G. **2001**. Karyopherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11** (6): 703-15.

Chook, Y. M. and Blobel, G. **1999**. Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature* **399** (6733): 230-7.

- Cingolani, G., Bednenko, J., Gillespie, M. and Gerace, L. **2002**. Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta. *Mol. Cell* **19** (6): 1345-53.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. and Müller, C. W. **1999**. Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* **399** (6733): 221-9.
- Conti, E. and Izaurralde, E. **2001**. Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **13** (4): 310-19.
- Coppola, J. A., Field, A. S. and Luse, D. S. **1983**. Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II *in vitro*: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80** (5): 1251-5.
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T. and Matunis, M. J. **2002**. Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **158** (5): 915-27.
- Doherty, A. and Suh, S. **2000**. Structural and mechanistic conservation in DNA ligases. *Nucleic Acids Res.* **28** (21): 4051-58.
- Ellison, V. and Stillman, B. **2001**. Opening of the clamp: an intimate view of an ATP-driven biological machine. *Cell* **106** (6): 655-60.
- Fahrenkrog, B., Stoffler, D. and Aebi, U. **2001**. Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **259** 95-117.
- Fassati, A., Görlich, D., Harrison, I., Zaytseva, L. and Mingot, J. **2003**. Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7. *EMBO J.* **22** (14): 3675-85.
- Fischer, U., Liu, Q. and Dreyfuss, G. **1997**. The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* **90** (6): 1023-9.
- Fischer, U., Sumpter, V., Sekine, M., Satoh, T. and Lührmann, R. **1993**. Nucleo-cytoplasmic 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 J.* **12** (2): 573-83.
- Flaherty, S. M., Fortes, P., Izaurralde, E., Mattaj, I. W. and Gilmartin, G. M. **1997**. Participation of the nuclear cap binding complex in pre-mRNA 3' processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** (22): 11893-8.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I. W. **1997**. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90** (6): 1051-60.
- Friesen, W. J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A. and Dreyfuss, G. **2001**. SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol. Cell* **7** (5): 1111-7.
- Friesen, W. J., Paushkin, S., Wyce, A., Massenet, S., Pesiridis, G. S., Van Duyne, G., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. **2001**. The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins. *Mol. Cell. Biol.* **21** (24): 8289-300.
- Friesen, W. J., Wyce, A., Paushkin, S., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. **2002**. A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins. *J. Biol. Chem.* **277** (10): 8243-7.
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nishida, E. **1997**. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* **390** (6657): 308-11.
- Furuichi, Y., LaFiandra, A. and Shatkin, A. J. **1977**. 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature* **266** (5599): 235-9.

- Gallivan, J. P. and Dougherty, D. A. **1999**. Cation-pi interactions in structural biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (17): 9459-64.
- Gill, S. C. and von Hippel, P. H. **1989**. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182** (2): 319-26.
- Girard, C., Mouaikel, J., Neel, H., Bertrand, E. and Bordonne, R. **2004**. Nuclear localization properties of a conserved protuberance in the Sm core complex. *Exp. Cell Res.* **299** (1): 199-208.
- Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F. R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S. and Izaurralde, E. **1997**. A novel class of RanGTP binding proteins. *J. Cell. Biol.* **138** (1): 65-80.
- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A. and Hartmann, E. **1996**. A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin- beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J.* **15** (8): 1810-7.
- Görlich, D. and Kutay, U. **1999**. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15** 607-60.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. and Metz, F. **1999**. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15** (4): 305-8.
- Gruss, O., Carazo-Salas, R., Schatz, C., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E. and Mattaj, I. W. **2001**. Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell* **104** (1): 83-93.
- Gubitz, A. K., Feng, W. and Dreyfuss, G. **2004**. The SMN complex. *Exp. Cell Res.* **296** (1): 51-6.
- Hakansson, K., Doherty, A., Shuman, S. and Wigley, D. **1997**. X-ray crystallography reveals a large conformational change during guanyl transfer by mRNA capping enzymes. *Cell* **89** (4): 545-53.
- Hakata, Y., Umemoto, T., Matsushita, S. and Shida, H. **1998**. Involvement of human CRM1 (exportin 1) in the export and multimerization of the Rex protein of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.* **72** (8): 6602-7.
- Hamm, J., Darzynkiewicz, E., Tahara, S. M. and Mattaj, I. W. **1990**. The trimethylguanosine cap structure of U1 snRNA is a component of a bipartite nuclear targeting signal. *Cell* **62** (3): 569-77.
- Hartmuth, K., Urlaub, H., Vornlocher, H. P., Will, C. L., Gentzel, M., Wilm, M. and Lührmann, R. **2002**. Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99** (26): 16719-24.
- Hellmuth, K., Lau, D. M., Bischoff, F. R., Kunzler, M., Hurt, E. and Simos, G. **1998**. Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol. Cell. Biol.* **18** (11): 6374-86.
- Hernandez, N. **2001**. Small nuclear RNA genes: a model system to study fundamental mechanisms of transcription. *J. Biol. Chem.* **276** (29): 26733-6.
- Hetzer, M. and Mattaj, I. W. **2000**. An ATP-dependent, Ran-independent mechanism for nuclear import of the U1A and U2B spliceosome proteins. *J. Cell. Biol.* **148** (2): 293-303.
- Hodel, A. E., Gershon, P. D. and Quioco, F. A. **1998**. Structural basis for sequence-nonspecific recognition of 5'-capped mRNA by a cap-modifying enzyme. *Mol. Cell* **1** (3): 443-7.
- Hodel, A. E., Gershon, P. D., Shi, X., Wang, S. M. and Quioco, F. A. **1997**. Specific protein recognition of an mRNA cap through its alkylated base. *Nat. Struct. Biol.* **4** (5): 350-4.
- Holm, L. and Sander, C. **1993**. Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **233** (1): 123-38.

- Hood, J. K. and Silver, P. A. **1998**. Cse1p is required for export of Srp1p/importin-alpha from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273** (52): 35142-6.
- Hsu, P. C., Hodel, M. R., Thomas, J. W., Taylor, L. J., Hagedorn, C. H. and Hodel, A. E. **2000**. Structural requirements for the specific recognition of an m7G mRNA cap. *Biochemistry* **39** (45): 13730-6.
- Hu, G., Gershon, P. D., Hodel, A. E. and Quijcho, F. A. **1999**. mRNA cap recognition: dominant role of enhanced stacking interactions between methylated bases and protein aromatic side chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (13): 7149-54.
- Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M. and Lührmann, R. **1998**. Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J.* **17** (14): 4114-26.
- Huber, J., Dickmanns, A. and Lührmann, R. **2002**. The importin-beta binding domain of snurportin1 is responsible for the Ran- and energy-independent nuclear import of spliceosomal U snRNPs in vitro. *J. Cell Biol.* **156** (3): 467-79.
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D. J., Lührmann, R. and Achsel, T. **2002**. The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA* **8** (12): 1489-501.
- Ishida, T., Doi, M., Ueda, H., Inoue, W. and Sheldrick, G. M. **1988**. Specific Ring Stacking Interactions on the Tryptophan-7-Methylguanine System: Comparative Crystallographic Studies of Indole Derivatives 7-Methylguanine Base, Nucleoside, and Nucleotide Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **110** 2286-2294.
- Izaurralde, E., Lewis, J., Gamberi, C., Jarmolowski, A., McGuigan, C. and Mattaj, I. W. **1995**. A cap-binding protein complex mediating U snRNA export. *Nature* **376** (6542): 709-12.
- Izaurralde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Darzynkiewicz, E. and Mattaj, I. W. **1994**. A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* **78** (4): 657-68.
- Jacobs, E. Y., Ogiwara, I. and Weiner, A. M. **2004**. Role of the C-terminal domain of RNA polymerase II in U2 snRNA transcription and 3' processing. *Mol. Cell. Biol.* **24** (2): 846-55.
- Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F. R., Schwamborn, K., Doenecke, D. and Görlich, D. **1999**. The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J.* **18** (9): 2411-23.
- Jäkel, S. and Görlich, D. **1998**. Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J.* **17** (15): 4491-502.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. and Kjeldgaard. **1991**. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. A* **47**: 110-9.
- Jullien, D., Görlich, D., Laemmli, U. K. and Adachi, Y. **1999**. Nuclear import of RPA in *Xenopus* egg extracts requires a novel protein XRIPalpha but not importin alpha. *EMBO J.* **18** (15): 4348-58.
- Jurica, M. and Moore, M. **2003**. Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell* **12** (1): 5-14.
- Kalab, P., Pu, R. T. and Dasso, M. **1999**. The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr. Biol.* **9** (9): 481-4.
- Kambach, C. and Mattaj, I. W. **1992**. Intracellular distribution of the U1A protein depends on active transport and nuclear binding to U1 snRNA. *J. Cell Biol.* **118** (1): 11-21.
- Kambach, C. and Mattaj, I. W. **1994**. Nuclear transport of the U2 snRNP-specific U2B" protein is mediated by both direct and indirect signalling mechanisms. *J. Cell Sci.* **107** (7): 1807-16.

- Kambach, C., Walke, S. and Nagai, K. **1999**. Structure and assembly of the spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particles. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9** (2): 222-30.
- Kataoka, N., Bachorik, J. L. and Dreyfuss, G. **1999**. Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J. Cell Biol.* **145** (6): 1145-52.
- Keiper, B. D., Lamphear, B. J., Deshpande, A. M., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E. J., Blumenthal, T. and Rhoads, R. E. **2000**. Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **275** (14): 10590-6.
- Krol, A., Carbon, P., Ebel, J. P. and Appel, B. **1987**. *Xenopus tropicalis* U6 snRNA genes transcribed by Pol III contain the upstream promoter elements used by Pol II dependent U snRNA genes. *Nucleic Acids Res.* **15** (6): 2463-78.
- Kunkel, G. R., Maser, R. L., Calvet, J. P. and Pederson, T. **1986**. U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (22): 8575-9.
- Kunzler, M. and Hurt, E. C. **1998**. Cse1p functions as the nuclear export receptor for importin alpha in yeast. *FEBS Lett.* **433** (3): 185-90.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R. and Görlich, D. **1997**. Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90** (6): 1061-71.
- Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Schwarzmaier, P., Hartmann, E. and Görlich, D. **1998**. Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol. Cell* **1** (3): 359-69.
- Lai, M., Lin, R., Huang, S., Tsai, C. and Tarn, W. **2000**. A human importin-beta family protein, Transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J. Biol. Chem.* **275** (11): 7950-7.
- Lam, M. H., Briggs, L. J., Hu, W., Martin, T. J., Gillespie, M. T. and Jans, D. A. **1999**. Importin beta recognizes parathyroid hormone-related protein with high affinity and mediates its nuclear import in the absence of importin alpha. *J. Biol. Chem.* **274** (11): 7391-8.
- Laskowski, R. A., Moss, D. S. and Thornton, J. M. **1993**. Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* **231** (4): 1049-67.
- Lei, E. and Silver, P. **2002**. Protein and RNA export from the Nucleus. *Developmental Cell* **2** 261-72.
- Liou, R. F. and Blumenthal, T. **1990**. trans-spliced *Caenorhabditis elegans* mRNAs retain trimethylguanosine caps. *Mol. Cell. Biol.* **10** (4): 1764-8.
- Lipowsky, G., Bischoff, F., Schwarzmaier, P., Kraft, R., Kostka, S., Hartmann, E., Kutay, U. and Görlich, D. **2000**. Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J.* **19** (16): 4362-71.
- Macara, I. G. **2001**. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65** (4): 570-94.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L. and Melchior, F. **1997**. A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell* **88** (1): 97-107.
- Makarov, E. M., Makarova, O. V., Urlaub, H., Gentzel, M., Will, C. L., Wilm, M. and Lührmann, R. **2002**. Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* **298** (5601): 2205-8.
- Marcotrigiano, J., Gingras, A. C., Sonenberg, N. and Burley, S. K. **1997**. Cocystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89** (6): 951-61.

- Massenet, S., Mouglin, A. and Branlant, C. **1998**. Posttranscriptional Modifications in the U Small Nuclear RNAs. *Modification and Editing of RNA*
- Massenet, S., Pellizzoni, L., Paushkin, S., Mattaj, I. W. and Dreyfuss, G. **2002**. The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22** (18): 6533-41.
- Matsuo, H., Li, H., McGuire, A. M., Fletcher, C. M., Gingras, A. C., Sonenberg, N. and Wagner, G. **1997**. Structure of translation factor eIF4E bound to m7GDP and interaction with 4E-binding protein. *Nat. Struct. Biol.* **4** (9): 717-24.
- Mattaj, I. W. **1986**. Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding. *Cell* **46** (6): 905-11.
- Mattaj, I. W. and De Robertis, E. M. **1985**. Nuclear segregation of U2 snRNA requires binding of specific snRNP proteins. *Cell* **40** (1): 111-8.
- Mattaj, I. W. and Englmeier, L. **1998**. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* **67** 265-306.
- Matthews, B. W. **1968**. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* **33** (2): 491-7.
- Matunis, M. J., Coutavas, E. and Blobel, G. **1996**. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **135** (6): 1457-70.
- Mazza, C., Segref, A., Mattaj, I. W. and Cusack, S. **2002**. Co-crystallization of the human nuclear cap-binding complex with a m7GpppG cap analogue using protein engineering. *Acta Crystallogr. D* **58** (12): 2194-7.
- Medlin, J. E., Uguen, P., Taylor, A., Bentley, D. L. and Murphy, S. **2003**. The C-terminal domain of pol II and a DRB-sensitive kinase are required for 3' processing of U2 snRNA. *EMBO J.* **22** (4): 925-34.
- Meister, G., Buhler, D., Pillai, R., Lottspeich, F. and Fischer, U. **2001**. A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat. Cell. Biol.* **3** (11): 945-9.
- Meister, G., Eggert, C., Buhler, D., Brahms, H., Kambach, C. and Fischer, U. **2001**. Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln. *Curr. Biol.* **11** (24): 1990-4.
- Meister, G., Eggert, C. and Fischer, U. **2002**. SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol.* **12** (10): 472-8.
- Meister, G., Hannus, S., Plotzner, O., Baars, T., Hartmann, E., Fakan, S., Lagerbauer, B. and Fischer, U. **2001**. SMNrp is an essential pre-mRNA splicing factor required for the formation of the mature spliceosome. *EMBO J.* **20** (9): 2304-14.
- Mingot, J., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E. and Görlich, D. **2001**. Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J.* **20** (14): 3685-94.
- Miyoshi, H., Dwyer, D. S., Keiper, B. D., Jankowska-Anyszka, M., Darzynkiewicz, E. and Rhoads, R. E. **2002**. Discrimination between mono- and trimethylated cap structures by two isoforms of *Caenorhabditis elegans* eIF4E. *EMBO J.* **21** (17): 4680-90.
- Moore, J. D., Yang, J., Truant, R. and Kornbluth, S. **1999**. Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *J. Cell Biol.* **144** (2): 213-24.
- Mouaikel, J., Narayanan, U., Verheggen, C., Matera, A. G., Bertrand, E., Tazi, J. and Bordonne, R. **2003**. Interaction between the small-nuclear-RNA cap hypermethylase and the spinal muscular atrophy protein, survival of motor neuron. *EMBO Rep.* **4** (6): 616-22.

- Mouaikel, J., Verheggen, C., Bertrand, E., Tazi, J. and Bordonne, R. **2002**. Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Mol. Cell* **9** (4): 891-901.
- Narayanan, U., Achsel, T., Lührmann, R. and Matera, A. G. **2004**. Coupled in vitro import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Mol. Cell* **16** (2): 223-34.
- Narayanan, U., Ospina, J. K., Frey, M. R., Hebert, M. D. and Matera, A. G. **2002**. SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Hum. Mol. Genet.* **11** (15): 1785-95.
- Nemergut, M., Mizzen, C., Stukenberg, T., Allis, C. and Macara, I. G. **2001**. Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science* **292** (5521): 1540-3.
- Neuman de Vegvar, H. E. and Dahlberg, J. E. **1990**. Nucleocytoplasmic transport and processing of small nuclear RNA precursors. *Mol. Cell. Biol.* **10** (7): 3365-75.
- Newman, A. **1998**. RNA splicing. *Curr. Biol.* **8** (25): R903-5.
- Nishimura, Y., Takahashi, S., Yamamoto, T., Tsuboi, M., Hattori, M., Miura, K., Yamaguchi, K., Ohtani, S. and Hata, T. **1980**. On the base-stacking in the 5'-terminal cap structure of mRNA: a fluorescence study. *Nucleic Acids Res.* **8** (5): 1107-19.
- Odell, M., Malinina, L., Sriskanda, V., Teplova, M. and Shuman, S. **2003**. Analysis of the DNA joining repertoire of Chlorella virus DNA ligase and a new crystal structure of the ligase-adenylate intermediate. *Nucleic Acids Res.* **31** (17): 5090-100.
- Ohno, M., Kataoka, N. and Shimura, Y. **1990**. A nuclear cap binding protein from HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* **18** (23): 6989-95.
- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M. and Mattaj, I. W. **2000**. PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* **101** (2): 187-98.
- Ossareh-Nazari, B., Bachelier, F. and Dargemont, C. **1997**. Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* **278** (5335): 141-4.
- Palacios, I., Hetzer, M., Adam, S. A. and Mattaj, I. W. **1997**. Nuclear import of U snRNPs requires importin beta. *EMBO J.* **16** (22): 6783-92.
- Paraskeva, E., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Huber, J., Kutay, U., Hartmann, E., Lührmann, R. and Görlich, D. **1999**. CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J. Cell. Biol.* **145** (2): 255-64.
- Paushkin, S., Gubitz, A. K., Massenet, S. and Dreyfuss, G. **2002**. The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14** (3): 305-12.
- Pearson, W. R. and Lipman, D. J. **1988**. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (8): 2444-8.
- Plafker, S. M. and Macara, I. G. **2000**. Importin-11, a nuclear import receptor for the ubiquitin-conjugating enzyme, UbcM2. *EMBO J.* **19** (20): 5502-13.
- Plessel, G., Fischer, U. and Lührmann, R. **1994**. m3G cap hypermethylation of U1 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) in vitro: evidence that the U1 small nuclear RNA-(guanosine-N2)-methyltransferase is a non-snRNP cytoplasmic protein that requires a binding site on the Sm core domain. *Mol. Cell. Biol.* **14** (6): 4160-72.
- Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielny, S., Siomi, M. C., Wang, F. and Dreyfuss, G. **1996**. A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86** (6): 985-94.

- Pu, W. T., Krapivinsky, G. B., Krapivinsky, L. and Clapham, D. E. **1999**. pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins. *Mol. Cell. Biol.* **19** (6): 4113-20.
- Quioco, F. A., Hu, G. and Gershon, P. D. **2000**. Structural basis of mRNA cap recognition by proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10** (1): 78-86.
- Raker, V. A., Plessel, G. and Lührmann, R. **1996**. The snRNP core assembly pathway: identification of stable core protein heteromeric complexes and an snRNP subcore particle in vitro. *EMBO J.* **15** (9): 2256-69.
- Ramachandran, G. N. and Sasisekharan, V. **1968**. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **23** 283-438.
- Reddy, R., Henning, D., Das, G., Harless, M. and Wright, D. **1987**. The capped U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* **262** (1): 75-81.
- Reed, R. and Hurt, E. **2002**. A conserved mRNA export machinery coupled to pre-mRNA splicing. *Cell* **108** (4): 523-31.
- Ribbeck, K. and Görlich, D. **2001**. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* **20** (6): 1320-30.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M. and Görlich, D. **1998**. NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J.* **17** (22): 6587-98.
- Rollenhagen, C., Mühlhauser, P., Kutay, U. and Pante, N. **2003**. Importin beta-depending nuclear import pathways: role of the adaptor proteins in the docking and releasing steps. *Mol. Biol. Cell.* **14** (5): 2104-15.
- Romac, J. M., Graff, D. H. and Keene, J. D. **1994**. The U1 small nuclear ribonucleoprotein (snRNP) 70K protein is transported independently of U1 snRNP particles via a nuclear localization signal in the RNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* **14** (7): 4662-70.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. and Chait, B. T. **2000**. The Yeast Nuclear Pore Complex. Composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.* **148** (4): 635-652.
- Ruszczynska, K., Kamienska-Trela, K., Wojcik, J., Stepinski, J., Darzynkiewicz, E. and Stolarski, R. **2003**. Charge distribution in 7-methylguanine regarding cation-pi interaction with protein factor eIF4E. *Biophys. J.* **85** (3): 1450-6.
- Sachdev, S., Bagchi, S., Zhang, D., Mings, A. and Hannink, M. **2000**. Nuclear import of IkappaBalpha is accomplished by ran-independent transport pathways. *Mol. Cell. Biol.* **20** (5): 1571-82.
- Salditt-Georgieff, M., Harpold, M., Chen-Kiang, S. and Darnell, J. E., Jr. **1980**. The addition of 5' cap structures occurs early in hnRNA synthesis and prematurely terminated molecules are capped. *Cell* **19** (1): 69-78.
- Schmidt, U. **2001**. Untersuchungen zur Biogenese von U-snRNPs.
- Schüttelkopf, A. W. and van Aalten, D. M. **2004**. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D* **60** (8): 1355-63.
- Segref, A., Mattaj, I. W. and Ohno, M. **2001**. The evolutionarily conserved region of the U snRNA export mediator PHAX is a novel RNA-binding domain that is essential for U snRNA export. *RNA* **7** (3): 351-60.
- Shatkin, A. J. **1976**. Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* **9** (4 PT 2): 645-53.
- Shen, X., Tomoo, K., Uchiyama, S., Kobayashi, Y. and Ishida, T. **2001**. Structural and thermodynamic behavior of eukaryotic initiation factor 4E in supramolecular formation with 4E-binding protein 1 and mRNA cap analogue, studied by spectroscopic methods. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **49** (10): 1299-303.

- Shuman, S. **2002**. What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3** (8): 619-25.
- Siomi, M. C., Eder, P. S., Kataoka, N., Wan, L., Liu, Q. and Dreyfuss, G. **1997**. Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *J. Cell Biol.* **138** (6): 1181-92.
- Sleeman, J. E., Ajuh, P. and Lamond, A. I. **2001**. snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. *J. Cell Sci.* **114** (24): 4407-19.
- Sleeman, J. E. and Lamond, A. I. **1999**. Nuclear organization of pre-mRNA splicing factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11** (3): 372-7.
- Smith, A., Brownawell, A. and Macara, I. G. **1998**. Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2. *Curr. Biol.* **8** (25): 1403-6.
- Solsbacher, J., Maurer, P., Bischoff, F. R. and Schlenstedt, G. **1998**. Cse1p is involved in export of yeast importin alpha from the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* **18** (11): 6805-15.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. and Weis, K. **1997**. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90** (6): 1041-50.
- Stark, H., Dube, P., Lührmann, R. and Kastner, B. **2001**. Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature* **409** (6819): 539-42.
- Strasser, A., Dickmanns, A., Schmidt, U., Penka, E., Urlaub, H., Sekine, M., Lührmann, R. and Ficner, R. **2004**. Purification, crystallization and preliminary crystallographic data of the m(3)G cap-binding domain of human snRNP import factor snurportin 1. *Acta Crystallogr. D* **60** 1628-31.
- Ström, A. and Weis, K. **2001**. Importin-beta-like nuclear transport receptors. *Genome Biol.* **2** (6): REVIEWS3008.
- Takizawa, C., Weis, K. and Morgan, D. **1999**. Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (14): 7938-43.
- Tazawa, I. and Inoue, Y. **1983**. Intramolecular stacking association and conformation properties of a 'cap' structure, m7G5'pppUm, and the related model compounds. *Nucleic Acids Res.* **11** (9): 2907-15.
- Tiganis, T., Flint, A., Adam, S. A. and Tonks, N. **1997**. Association of the T-cell protein tyrosine phosphatase with nuclear import factor p97. *J. Biol. Chem.* **272** (34): 21548-57.
- Tomoo, K., Shen, X., Okabe, K., Nozoe, Y., Fukuhara, S., Morino, S., Sasaki, M., Taniguchi, T., Miyagawa, H., Kitamura, K., Miura, K. and Ishida, T. **2003**. Structural features of human initiation factor 4E, studied by X-ray crystal analyses and molecular dynamics simulations. *J. Mol. Biol.* **328** (2): 365-83.
- Truant, R. and Cullen, B. R. **1999**. The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol. Cell. Biol.* **19** (2): 1210-7.
- Uguen, P. and Murphy, S. **2003**. The 3' ends of human pre-snRNAs are produced by RNA polymerase II CTD-dependent RNA processing. *EMBO J.* **22** (17): 4544-54.
- Uguen, P. and Murphy, S. **2004**. 3'-box-dependent processing of human pre-U1 snRNA requires a combination of RNA and protein co-factors. *Nucleic Acids Res.* **32** (10): 2987-94.
- van Hoof, A., Lennertz, P. and Parker, R. **2000**. Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J.* **19** (6): 1357-65.

- Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D. and Wittinghofer, A. **1999**. Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* **97** (5): 635-46.
- Wallace, A. C., Laskowski, R. A. and Thornton, J. M. **1995**. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng.* **8** (2): 127-34.
- Weis, K. **2002**. Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **14** (3): 328-35.
- Weis, K. **2003**. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell* **112** (4): 441-51.
- Wieczorek, Z., Stepinski, J., Jankowska, M. and Lonnberg, H. **1995**. Fluorescence and absorption spectroscopic properties of RNA 5'-cap analogues derived from 7-methyl-, N2,7-dimethyl- and N2,N2,7-trimethyl-guanosines. *J. Photochem. Photobiol. B* **28** (1): 57-63.
- Wiese, C., Wilde, A., Moore, M., Adam, S. A., Merdes, A. and Zheng, Y. **2001**. Role of importin beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science* **291** (5504): 653-6.
- Will, C. L. and Lührmann, R. **2001**. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13** (3): 290-301.
- Xiao, Z., Liu, X. and Lodish, H. F. **2000**. Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J. Biol. Chem.* **275** (31): 23425-8.
- Yamashita, N., Shimazaki, N., Ibe, S., Kaneko, R., Tanabe, A., Toyomoto, T., Fujita, K., Hasegawa, T., Toji, S., Tamai, K., Yamamoto, H. and Koiwai, O. **2001**. Terminal deoxynucleotidyltransferase directly interacts with a novel nuclear protein that is homologous to p65. *Genes Cells* **6** (7): 641-52.
- Yang, J., Bardes, E. S., Moore, J. D., Brennan, J., Powers, M. A. and Kornbluth, S. **1998**. Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1. *Genes Dev.* **12** (14): 2131-43.
- Yong, J., Golembe, T. J., Battle, D. J., Pellizzoni, L. and Dreyfuss, G. **2004**. snRNAs contain specific SMN-binding domains that are essential for snRNP assembly. *Mol. Cell. Biol.* **24** (7): 2747-56.
- Yong, J., Pellizzoni, L. and Dreyfuss, G. **2002**. Sequence-specific interaction of U1 snRNA with the SMN complex. *EMBO J.* **21** (5): 1188-96.
- Zhang, C. and Clarke, P. **2000**. Chromatin-independent nuclear envelope assembly induced by Ran GTPase in *Xenopus* egg extracts. *Science* **288** (5470): 1429-32.
- Zhu, J. and McKeon, F. **1999**. NF-AT activation requires suppression of Crm1-dependent export by calcineurin. *Nature* **398** (6724): 256-60.
- Zhu, Y., Qi, C., Cao, W. Q., Yeldandi, A. V., Rao, M. S. and Reddy, J. K. **2001**. Cloning and characterization of PIMT, a protein with a methyltransferase domain, which interacts with and enhances nuclear receptor coactivator PRIP function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (18): 10380-5.

9 Anhang

9.1 Herleitung der Funktion zum Kurvenangleich der Titrationsmeßpunkte

$[E]$ = freies Enzym/Protein

$[E]_0$ = Gesamtkonzentration an Enzym/Protein

$[L]$ = freier Ligand/Substrat

$[L]_0$ = Gesamtkonzentration an Ligand/Substrat

$[EL]$ = Konzentration des Protein-Liganden-Komplexes

K_d = Dissoziationsgleichgewichtskonstante

F = Gesamtfluoreszenz

F_0 = Grundfluoreszenz

ΔF_{\max} = maximale Fluoreszenzänderung bei vollständiger Sättigung

$m \times [L]_0$ = Steigung der Fluoreszenz des des Liganden in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration

Gleichgewicht der Enzym-Ligandenkonzentration bei einer 1:1 Stöchiometrie:



Nach dem Massenerhaltungsgesetz setzt sich die Gesamtkonzentration an Enzym und Ligand aus dem freien und dem komplexgebundenen Anteil zusammen:

$$[E]_0 = [E] + [EL] \text{ und } [L]_0 = [L] + [EL]$$

Die Gleichgewichtsdissoziationskonstante K_d ergibt sich wie folgt:

$$K_d = \frac{([E]_0 - [EL]) \times ([L]_0 - [EL])}{[EL]}$$

Löst man die Gleichung nach der Enzym-Liganden-Konzentration [EL] auf, ergibt sich:

$$[EL] = \frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [E]_0 \times [L]_0}$$

Die Gesamtfluoreszenz F setzt sich aus der Grundfluoreszenz und der Fluoreszenzänderung bei jedem Titrationsschritt zusammen. Die Fluoreszenzänderung ergibt sich aus dem Bindungsgrad pro Titrationsschritt multipliziert mit der maximalen Fluoreszenzänderung bei Sättigung des Systems:

$$F = F_0 + \Delta F_{\max} \times \frac{[EL]}{[E]_0}$$

Setzt man die nach der Enzym-Liganden-Konzentration [EL] gelöste Gleichung in die obige ein, erhält man die folgende Beziehung:

$$F = F_0 + \Delta F_{\max} \times \frac{\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [E]_0 \times [L]_0}}{[E]_0}$$

Diese Funktion kann zum Kurvenvergleich eingesetzt werden, wenn der Ligand selbst keine Eigenfluoreszenz aufweist. Sobald der Ligand Eigenfluoreszenz zeigt, und diese linear in Abhängigkeit der Gesamtkonzentration an Ligand ansteigt, kann die Eigenfluoreszenz additiv mit in den Kurvenvergleich eingesetzt werden. Die Steigung m der Funktion wird neben ΔF_{\max} und K_d als Fitparameter definiert, während $[E]_0$ und $[F]_0$ konstant gehalten werden:

$$F = F_0 + \Delta F_{\max} \times \frac{\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2} - \sqrt{\left(\frac{[E]_0 + [L]_0 + K_d}{2}\right)^2 - [E]_0 \times [L]_0}}{[E]_0} + m \times [L]_0$$

9.2 Koordinaten des m_3 GpppG-Cap Dinukleotides

Die Koordinaten der Struktur der m_3 G-Cap Bindedomäne mit gebundenem m_3 GpppG sind in der PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) unter der *accession number* **1XK5** hinterlegt. Die Einheitszelldimensionen, die Rotationsmatrix und die Koordinaten der Atome des m_3 GpppG-Cap (DRG) sind, in Hinblick auf die Interpretation der Parameter- und Topologiedateien dargestellt (2. Reihe: Atomnummer, 3. Reihe: Atomname, 4. Reihe: Molekülname, 5./6. Reihe: Bezeichnung des Moleküls, 7-9. Reihe: Koordinaten, 11. Reihe: B-Faktoren).

```

CRYST1    57.470    57.470   130.090    90.00    90.00    90.00 P 41 21 2
ORIGX1      1.000000    0.000000    0.000000                0.000000
ORIGX2      0.000000    1.000000    0.000000                0.000000
ORIGX3      0.000000    0.000000    0.000000                1.000000
SCALE1      0.017400    0.000000    0.000000                0.000000
SCALE2      0.000000    0.017400    0.000000                0.000000
SCALE3      0.000000    0.000000    0.007687                0.000000
ATOM  1714  OBB DRG B 400      13.343   40.165   11.728   1.00  54.16   B
ATOM  1715  CBF DRG B 400      13.120   38.960   11.831   1.00  57.50   B
ATOM  1716  NBE DRG B 400      13.660   38.236   12.903   1.00  57.24   B
ATOM  1717  CBM DRG B 400      13.402   36.863   13.007   1.00  56.27   B
ATOM  1718  NBV DRG B 400      13.938   36.146   13.993   1.00  57.49   B
ATOM  1719  CBZ DRG B 400      13.670   34.704   14.094   1.00  56.80   B
ATOM  1720  CBW DRG B 400      14.811   36.787   14.987   1.00  54.93   B
ATOM  1721  NBN DRG B 400      12.636   36.268   12.080   1.00  55.52   B
ATOM  1722  CBO DRG B 400      12.105   36.940   11.045   1.00  59.69   B
ATOM  1723  CBG DRG B 400      12.332   38.306   10.888   1.00  58.09   B
ATOM  1724  NBH DRG B 400      11.796   38.701    9.736   1.00  56.41   B
ATOM  1725  CBC DRG B 400      11.941   40.044    9.131   1.00  54.66   B
ATOM  1726  CBI DRG B 400      11.018   37.607    9.142   1.00  59.48   B
ATOM  1727  NBP DRG B 400      11.409   36.484   10.006   1.00  62.09   B
ATOM  1728  CBQ DRG B 400      11.064   35.068    9.738   1.00  67.39   B
ATOM  1729  OBR DRG B 400      12.135   34.523    8.945   1.00  71.67   B
ATOM  1730  CBX DRG B 400         9.799   34.877    8.898   1.00  69.39   B
ATOM  1731  OCA DRG B 400         9.336   33.530    9.029   1.00  68.62   B
ATOM  1732  CBY DRG B 400      10.363   35.140    7.505   1.00  72.93   B
ATOM  1733  OCB DRG B 400         9.489   34.600    6.510   1.00  74.66   B
ATOM  1734  CBS DRG B 400      11.648   34.321    7.607   1.00  74.46   B
ATOM  1735  CBT DRG B 400      12.665   34.735    6.543   1.00  79.44   B
ATOM  1736  OBU DRG B 400      12.089   34.611    5.241   1.00  86.14   B
ATOM  1737  PBK DRG B 400      12.635   35.519    4.030   1.00  89.63   B
ATOM  1738  OBL DRG B 400      13.873   36.369    4.613   1.00  87.98   B
ATOM  1739  OBJ DRG B 400      11.577   36.403    3.492   1.00  90.47   B
ATOM  1740  OBD DRG B 400      13.231   34.495    2.939   1.00  90.77   B
ATOM  1741  PAZ DRG B 400      14.794   34.107    2.933   1.00  91.52   B
ATOM  1742  OBA DRG B 400      15.179   33.205    1.655   1.00  92.95   B
ATOM  1743  OAY DRG B 400      15.807   34.894    3.671   1.00  91.20   B
ATOM  1744  OAX DRG B 400      14.610   32.854    3.929   1.00  91.57   B
ATOM  1745  PAT DRG B 400      15.878   32.212    4.689   1.00  91.70   B
ATOM  1746  OAU DRG B 400      16.500   30.965    3.880   1.00  89.52   B
ATOM  1747  OAS DRG B 400      16.657   32.962    5.698   1.00  91.83   B
ATOM  1748  O5* DRG B 400      14.985   31.281    5.653   1.00  90.22   B
ATOM  1749  C5* DRG B 400      14.158   31.834    6.682   1.00  87.04   B
ATOM  1750  C4* DRG B 400      14.854   31.847    8.045   1.00  85.44   B
ATOM  1751  O4* DRG B 400      15.877   32.851    8.153   1.00  84.70   B
ATOM  1752  C3* DRG B 400      13.883   32.243    9.156   1.00  84.33   B
ATOM  1753  O3* DRG B 400      13.026   31.137    9.452   1.00  82.81   B
ATOM  1754  C2* DRG B 400      14.908   32.400   10.276   1.00  83.24   B
ATOM  1755  O2* DRG B 400      15.403   31.115   10.662   1.00  84.30   B
ATOM  1756  C1* DRG B 400      16.009   33.179    9.551   1.00  82.15   B
ATOM  1757  N9  DRG B 400      15.823   34.640    9.718   1.00  78.82   B
ATOM  1758  C8  DRG B 400      15.274   35.468    8.832   1.00  76.77   B
ATOM  1759  N7  DRG B 400      15.352   36.718    9.283   1.00  75.63   B
ATOM  1760  C5  DRG B 400      15.950   36.689   10.470   1.00  75.73   B

```


ATOM	1761	C4	DRG B 400	16.244	35.360	10.755	1.00	77.01	B
ATOM	1762	N3	DRG B 400	16.847	35.020	11.905	1.00	75.45	B
ATOM	1763	C2	DRG B 400	17.193	35.938	12.820	1.00	73.73	B
ATOM	1764	N2	DRG B 400	17.778	35.563	13.954	1.00	71.98	B
ATOM	1765	N1	DRG B 400	16.927	37.293	12.583	1.00	73.36	B
ATOM	1766	C6	DRG B 400	16.298	37.671	11.390	1.00	74.26	B
ATOM	1767	O6	DRG B 400	16.079	38.858	11.153	1.00	72.78	B
END									

9.3 Parameter- und Topologiedateien

Parameter- und Topologiedateien (*.param/*.topo) wurden mit Hilfe des Dundee PRODRG-Servers generiert (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrpg/prodrpg.html>), da das m₃GpppG nicht in den Kleinmoleküldatenbank vorhanden war. Hierfür wurden die Koordinaten des im Graphikprogramm O generierten m₃GpppG-Dinukleotides nach ersten Verfeinerungen der Geometrie mit CNS verwendet. Die Dihedralwinkel der Ribosen wurden analog zu Ribosen aus der Datenbank verändert

Parameterdatei

```
!           This file was generated by PRODRG version 040320.0550
!           PRODRG written/copyrighted by Daan van Aalten
!
!           Questions/comments to dava@davapc1.bioch.dundee.ac.uk
!
set echo=off message=on end
checkversion 1.1

evaluate ($pd_x = 1.0)

eval ($pd_v=$pd_x* 24000.0) BOND O_BB C_BF $pd_v 1.230
eval ($pd_v=$pd_x* 16000.0) BOND C_BF N_BE $pd_v 1.400
eval ($pd_v=$pd_x* 20000.0) BOND C_BF C_BG $pd_v 1.390
eval ($pd_v=$pd_x* 17900.0) BOND N_BE H_AF $pd_v 1.000
eval ($pd_v=$pd_x* 16000.0) BOND N_BE C_BM $pd_v 1.400
eval ($pd_v=$pd_x* 18000.0) BOND C_BM N_BV $pd_v 1.330
eval ($pd_v=$pd_x* 20000.0) BOND C_BM N_BN $pd_v 1.340
eval ($pd_v=$pd_x* 18000.0) BOND N_BV C_BZ $pd_v 1.470
eval ($pd_v=$pd_x* 18000.0) BOND N_BV C_BW $pd_v 1.470
eval ($pd_v=$pd_x* 20000.0) BOND N_BN C_BO $pd_v 1.340
eval ($pd_v=$pd_x* 20000.0) BOND C_BO C_BG $pd_v 1.390
eval ($pd_v=$pd_x* 20000.0) BOND C_BO N_BP $pd_v 1.330
eval ($pd_v=$pd_x* 20000.0) BOND C_BG N_BH $pd_v 1.330
eval ($pd_v=$pd_x* 12000.0) BOND N_BH C_BC $pd_v 1.480
eval ($pd_v=$pd_x* 18000.0) BOND N_BH C_BI $pd_v 1.470
eval ($pd_v=$pd_x* 18000.0) BOND C_BI N_BP $pd_v 1.470
eval ($pd_v=$pd_x* 12000.0) BOND N_BP C_BQ $pd_v 1.480
eval ($pd_v=$pd_x* 12000.0) BOND C_BQ O_BR $pd_v 1.435
eval ($pd_v=$pd_x* 16000.0) BOND C_BQ C_BX $pd_v 1.530
eval ($pd_v=$pd_x* 12000.0) BOND O_BR C_BS $pd_v 1.435
eval ($pd_v=$pd_x* 16000.0) BOND C_BX O_CA $pd_v 1.430
eval ($pd_v=$pd_x* 16000.0) BOND C_BX C_BY $pd_v 1.530
eval ($pd_v=$pd_x* 15000.0) BOND O_CA H_AC $pd_v 1.000
eval ($pd_v=$pd_x* 16000.0) BOND C_BY O_CB $pd_v 1.430
eval ($pd_v=$pd_x* 16000.0) BOND C_BY C_BS $pd_v 1.530
eval ($pd_v=$pd_x* 15000.0) BOND O_CB H_AD $pd_v 1.000
eval ($pd_v=$pd_x* 12000.0) BOND C_BS C_BT $pd_v 1.530
eval ($pd_v=$pd_x* 12000.0) BOND C_BT O_BU $pd_v 1.430
```

eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	O_BU	P_BK	\$pd_v	1.610
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	P_BK	O_BL	\$pd_v	1.610
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	18000.0)	BOND	P_BK	O_BJ	\$pd_v	1.480
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	P_BK	O_BD	\$pd_v	1.610
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	O_BD	P_AZ	\$pd_v	1.610
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	P_AZ	O_BA	\$pd_v	1.610
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	18000.0)	BOND	P_AZ	O_AY	\$pd_v	1.480
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	P_AZ	O_AX	\$pd_v	1.610
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	O_AX	P_AT	\$pd_v	1.610
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	P_AT	O_AU	\$pd_v	1.610
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	18000.0)	BOND	P_AT	O_AS	\$pd_v	1.480
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	P_AT	O_5*	\$pd_v	1.610
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	O_5*	C_5*	\$pd_v	1.430
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	C_5*	C_4*	\$pd_v	1.530
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	C_4*	O_4*	\$pd_v	1.435
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	16000.0)	BOND	C_4*	C_3*	\$pd_v	1.530
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	O_4*	C_1*	\$pd_v	1.435
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	16000.0)	BOND	C_3*	O_3*	\$pd_v	1.430
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	16000.0)	BOND	C_3*	C_2*	\$pd_v	1.530
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	15000.0)	BOND	O_3*	H_AB	\$pd_v	1.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	16000.0)	BOND	C_2*	O_2*	\$pd_v	1.430
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	16000.0)	BOND	C_2*	C_1*	\$pd_v	1.530
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	15000.0)	BOND	O_2*	H_AA	\$pd_v	1.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	12000.0)	BOND	C_1*	N_9	\$pd_v	1.480
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	20000.0)	BOND	N_9	C_8	\$pd_v	1.330
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	20000.0)	BOND	N_9	C_4	\$pd_v	1.330
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	20000.0)	BOND	C_8	N_7	\$pd_v	1.330
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	20000.0)	BOND	N_7	C_5	\$pd_v	1.330
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	20000.0)	BOND	C_5	C_4	\$pd_v	1.390
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	20000.0)	BOND	C_5	C_6	\$pd_v	1.390
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	20000.0)	BOND	C_4	N_3	\$pd_v	1.340
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	20000.0)	BOND	N_3	C_2	\$pd_v	1.340
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	18000.0)	BOND	C_2	N_2	\$pd_v	1.330
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	16000.0)	BOND	C_2	N_1	\$pd_v	1.400
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	17900.0)	BOND	N_2	H_AH	\$pd_v	1.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	17900.0)	BOND	N_2	H_AG	\$pd_v	1.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	17900.0)	BOND	N_1	H_AE	\$pd_v	1.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	16000.0)	BOND	N_1	C_6	\$pd_v	1.400
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	24000.0)	BOND	C_6	O_6	\$pd_v	1.230
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	O_BB	C_BF	N_BE	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	O_BB	C_BF	C_BG	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_BE	C_BF	C_BG	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	720.0)	ANGLE	C_BF	N_BE	H_AF	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BF	N_BE	C_BM	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	720.0)	ANGLE	H_AF	N_BE	C_BM	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_BE	C_BM	N_BV	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_BE	C_BM	N_BN	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_BV	C_BM	N_BN	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BM	N_BV	C_BZ	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BM	N_BV	C_BW	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BZ	N_BV	C_BO	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BM	N_BN	C_BO	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_BN	C_BO	C_BG	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_BN	C_BO	N_BP	\$pd_v 132.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BG	C_BO	N_BP	\$pd_v 108.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BF	C_BG	C_BO	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BF	C_BG	N_BH	\$pd_v 132.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BO	C_BG	N_BH	\$pd_v 108.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BG	N_BH	C_BC	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BG	N_BH	C_BI	\$pd_v 108.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BC	N_BH	C_BI	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	N_BH	C_BI	N_BP	\$pd_v 104.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BO	N_BP	C_BI	\$pd_v 108.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BO	N_BP	C_BQ	\$pd_v 126.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_BI	N_BP	C_BQ	\$pd_v 120.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	544.0)	ANGLE	N_BP	C_BQ	O_BR	\$pd_v 109.500
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	544.0)	ANGLE	N_BP	C_BQ	C_BX	\$pd_v 109.500
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	O_BR	C_BQ	C_BX	\$pd_v 104.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	C_BQ	O_BR	C_BS	\$pd_v 104.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	C_BQ	C_BX	O_CA	\$pd_v 109.500
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	C_BQ	C_BX	C_BY	\$pd_v 104.000
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	O_CA	C_BX	C_BY	\$pd_v 109.500
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	C_BX	O_CA	H_AC	\$pd_v 109.500
eval	(\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	C_BX	C_BY	O_CB	\$pd_v 109.500

eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	C_BX	C_BY	C_BS	\$pd_v	104.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	O_CB	C_BY	C_BS	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	C_BY	O_CB	H_AD	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	O_BR	C_BS	C_BY	\$pd_v	104.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	544.0)	ANGLE	O_BR	C_BS	C_BT	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	480.0)	ANGLE	C_BY	C_BS	C_BT	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	C_BS	C_BT	O_BU	\$pd_v	111.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	C_BT	O_BU	P_BK	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_BU	P_BK	O_BL	\$pd_v	103.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_BU	P_BK	O_BJ	\$pd_v	109.600	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_BL	P_BK	O_BJ	\$pd_v	109.600	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_BU	P_BK	O_BD	\$pd_v	103.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_BL	P_BK	O_BD	\$pd_v	103.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_BJ	P_BK	O_BD	\$pd_v	109.600	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	P_BK	O_BD	P_AZ	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_BD	P_AZ	O_BA	\$pd_v	103.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_BD	P_AZ	O_AY	\$pd_v	109.600	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_BA	P_AZ	O_AY	\$pd_v	109.600	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_BD	P_AZ	O_AX	\$pd_v	103.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_BA	P_AZ	O_AX	\$pd_v	103.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_AY	P_AZ	O_AX	\$pd_v	109.600	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	P_AZ	O_AX	P_AT	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_AX	P_AT	O_AU	\$pd_v	103.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_AX	P_AT	O_AS	\$pd_v	109.600	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_AU	P_AT	O_AS	\$pd_v	109.600	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_AX	P_AT	O_5*	\$pd_v	103.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_AU	P_AT	O_5*	\$pd_v	103.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	O_AS	P_AT	O_5*	\$pd_v	109.600	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	P_AT	O_5*	C_5*	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	O_5*	C_5*	C_4*	\$pd_v	111.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	544.0)	ANGLE	C_5*	C_4*	O_4*	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	480.0)	ANGLE	C_5*	C_4*	C_3*	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	O_4*	C_4*	C_3*	\$pd_v	104.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	C_4*	O_4*	C_1*	\$pd_v	104.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	C_4*	C_3*	O_3*	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	C_4*	C_3*	C_2*	\$pd_v	104.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	O_3*	C_3*	C_2*	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	C_3*	O_3*	H_AB	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	C_3*	C_2*	O_2*	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	C_3*	C_2*	C_1*	\$pd_v	104.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	O_2*	C_2*	C_1*	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	760.0)	ANGLE	C_2*	O_2*	H_AA	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	880.0)	ANGLE	O_4*	C_1*	C_2*	\$pd_v	104.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	544.0)	ANGLE	O_4*	C_1*	N_9	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	544.0)	ANGLE	C_2*	C_1*	N_9	\$pd_v	109.500	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_1*	N_9	C_8	\$pd_v	126.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_1*	N_9	C_4	\$pd_v	126.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_8	N_9	C_4	\$pd_v	108.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_9	C_8	N_7	\$pd_v	108.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_8	N_7	C_5	\$pd_v	108.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_7	C_5	C_4	\$pd_v	108.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_7	C_5	C_6	\$pd_v	132.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_4	C_5	C_6	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_9	C_4	C_5	\$pd_v	108.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_9	C_4	N_3	\$pd_v	132.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_5	C_4	N_3	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_4	N_3	C_2	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_3	C_2	N_2	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_3	C_2	N_1	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_2	C_2	N_1	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	560.0)	ANGLE	C_2	N_2	H_AH	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	560.0)	ANGLE	C_2	N_2	H_AG	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	640.0)	ANGLE	H_AH	N_2	H_AG	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	720.0)	ANGLE	C_2	N_1	H_AE	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_2	N_1	C_6	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	720.0)	ANGLE	H_AE	N_1	C_6	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_5	C_6	N_1	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	C_5	C_6	O_6	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	ANGLE	N_1	C_6	O_6	\$pd_v	120.000	
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_BF	C_BG	N_BE	O_BB	\$pd_v	0 0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_BE	C_BM	H_AF	C_BF	\$pd_v	0 0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_BM	N_BE	N_BV	N_BN	\$pd_v	0 0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_BV	C_BM	C_BZ	C_BW	\$pd_v	0 0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_BO	N_BN	C_BG	N_BP	\$pd_v	0 0.000

eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_BG	C_BF	C_BO	N_BH	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_BH	C_BG	C_BC	C_BI	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_BP	C_BO	C_BI	C_BQ	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_9	C_1*	C_8	C_4	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_5	C_6	C_4	N_7	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_4	N_3	C_5	N_9	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_2	N_3	N_1	N_2	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_2	C_2	H_AH	H_AG	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_1	C_6	H_AE	C_2	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_6	C_5	N_1	O_6	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	400.0)	IMPR	C_BQ	N_BP	O_BR	C_BX	\$pd_v	0	35.264
eval (\$pd_v=\$pd_x*	400.0)	IMPR	C_BX	C_BQ	O_CA	C_BY	\$pd_v	0	35.264
eval (\$pd_v=\$pd_x*	400.0)	IMPR	C_BY	C_BX	O_CB	C_BS	\$pd_v	0	35.264
eval (\$pd_v=\$pd_x*	400.0)	IMPR	C_BS	O_BR	C_BT	C_BY	\$pd_v	0	35.264
eval (\$pd_v=\$pd_x*	400.0)	IMPR	P_BK	O_BU	O_BL	O_BJ	\$pd_v	0	35.264
eval (\$pd_v=\$pd_x*	400.0)	IMPR	P_AZ	O_BD	O_BA	O_AY	\$pd_v	0	35.264
eval (\$pd_v=\$pd_x*	400.0)	IMPR	P_AT	O_AX	O_AU	O_AS	\$pd_v	0	35.264
eval (\$pd_v=\$pd_x*	400.0)	IMPR	C_4*	C_5*	C_3*	O_4*	\$pd_v	0	35.264
eval (\$pd_v=\$pd_x*	400.0)	IMPR	C_3*	C_4*	C_2*	O_3*	\$pd_v	0	35.264
eval (\$pd_v=\$pd_x*	400.0)	IMPR	C_2*	C_3*	C_1*	O_2*	\$pd_v	0	35.264
eval (\$pd_v=\$pd_x*	400.0)	IMPR	C_1*	O_4*	C_2*	N_9	\$pd_v	0	35.264
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_9	C_8	N_7	C_5	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_8	N_7	C_5	C_4	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_7	C_5	C_4	N_9	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_5	C_4	N_9	C_8	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_4	N_9	C_8	N_7	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_BF	N_BE	C_BM	N_BN	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_BE	C_BM	N_BN	C_BO	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_BM	N_BN	C_BO	C_BG	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_BN	C_BO	C_BG	C_BF	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_BO	C_BG	C_BF	N_BE	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_BG	C_BF	N_BE	C_BM	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_5	C_4	N_3	C_2	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_4	N_3	C_2	N_1	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_3	C_2	N_1	C_6	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_2	N_1	C_6	C_5	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	N_1	C_6	C_5	C_4	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	800.0)	IMPR	C_6	C_5	C_4	N_3	\$pd_v	0	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	640.0)	DIHE	N_BE	C_BM	N_BV	C_BW	\$pd_v	2	180.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	640.0)	DIHE	N_BN	C_BO	N_BP	C_BQ	\$pd_v	2	180.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	640.0)	DIHE	C_BF	C_BG	N_BH	C_BI	\$pd_v	2	180.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	8.1)	DIHE	C_BG	N_BH	C_BI	N_BP	\$pd_v	6	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	8.1)	DIHE	N_BH	C_BI	N_BP	C_BQ	\$pd_v	6	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	0.0)	DIHE	C_BX	C_BQ	N_BP	C_BO	\$pd_v	2	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	8.1)	DIHE	N_BP	C_BQ	O_BR	C_BS	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	19.6)	DIHE	N_BP	C_BQ	C_BX	C_BY	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	8.1)	DIHE	C_BT	C_BS	O_BR	C_BQ	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	0.9)	DIHE	C_BQ	C_BX	O_CA	H_AC	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	19.6)	DIHE	C_BS	C_BY	C_BX	C_BQ	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	0.9)	DIHE	C_BX	C_BY	O_CB	H_AD	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	19.6)	DIHE	C_BX	C_BY	C_BS	C_BT	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	19.6)	DIHE	O_BR	C_BS	C_BT	O_BU	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	8.1)	DIHE	P_BK	O_BU	C_BT	C_BS	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	0.6)	DIHE	C_BT	O_BU	P_BK	O_BD	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	5.6)	DIHE	C_BT	O_BU	P_BK	O_BD	\$pd_v	2	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	0.6)	DIHE	P_AZ	O_BD	P_BK	O_BU	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	5.6)	DIHE	P_AZ	O_BD	P_BK	O_BU	\$pd_v	2	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	0.6)	DIHE	P_BK	O_BD	P_AZ	O_AX	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	5.6)	DIHE	P_BK	O_BD	P_AZ	O_AX	\$pd_v	2	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	0.6)	DIHE	P_AT	O_AX	P_AZ	O_BD	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	5.6)	DIHE	P_AT	O_AX	P_AZ	O_BD	\$pd_v	2	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	0.6)	DIHE	P_AZ	O_AX	P_AT	O_5*	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	5.6)	DIHE	P_AZ	O_AX	P_AT	O_5*	\$pd_v	2	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	0.6)	DIHE	C_5*	O_5*	P_AT	O_AX	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	5.6)	DIHE	C_5*	O_5*	P_AT	O_AX	\$pd_v	2	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	8.1)	DIHE	P_AT	O_5*	C_5*	C_4*	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	19.6)	DIHE	C_3*	C_4*	C_5*	O_5*	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	8.1)	DIHE	C_5*	C_4*	O_4*	C_1*	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	19.6)	DIHE	C_5*	C_4*	C_3*	C_2*	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	8.1)	DIHE	N_9	C_1*	O_4*	C_4*	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	0.9)	DIHE	C_4*	C_3*	O_3*	H_AB	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	19.6)	DIHE	C_1*	C_2*	C_3*	C_4*	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	0.9)	DIHE	C_3*	C_2*	O_2*	H_AA	\$pd_v	3	0.000
eval (\$pd_v=\$pd_x*	19.6)	DIHE	C_3*	C_2*	C_1*	N_9	\$pd_v	3	0.000

```
eval ($pd_v=$pd_x*      0.0) DIHE O_4* C_1* N_9 C_4 $pd_v 2 0.000
eval ($pd_v=$pd_x*    640.0) DIHE N_3 C_2 N_2 H_AG $pd_v 2 180.000
```

NBONds

```
CUTNB=7.0 WMIN=1.5
REPEL=1.0 REXPONENT=4
IREXPONENT=1 RCONST=16.0
TOLERANCE=0.5 NBXMOD=5
CTONNB=5.5 CTOFNB=6.0
END
```

```
NONBONDED O_BB 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED C_BF 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED N_BE 0.10000 2.67270 0.10000 2.73273
NONBONDED H_AF 0.10000 2.13816 0.10000 2.13273
NONBONDED C_BM 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED N_BV 0.10000 2.67270 0.10000 2.73273
NONBONDED C_BZ 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED C_BW 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED N_BN 0.10000 2.67270 0.10000 2.73273
NONBONDED C_BO 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED C_BG 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED N_BH 0.10000 2.67270 0.10000 2.73273
NONBONDED C_BC 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED C_BI 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED N_BP 0.10000 2.67270 0.10000 2.73273
NONBONDED C_BQ 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED O_BR 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED C_BX 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED O_CA 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED H_AC 0.10000 2.13816 0.10000 2.13273
NONBONDED C_BY 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED O_CB 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED H_AD 0.10000 2.13816 0.10000 2.13273
NONBONDED C_BS 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED C_BT 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED O_BU 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED P_BK 0.10000 3.38542 0.10000 3.53273
NONBONDED O_BL 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED O_BJ 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED O_BD 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED P_AZ 0.10000 3.38542 0.10000 3.53273
NONBONDED O_BA 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED O_AY 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED O_AX 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED P_AT 0.10000 3.38542 0.10000 3.53273
NONBONDED O_AU 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED O_AS 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED O_5* 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED C_5* 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED C_4* 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED O_4* 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED C_3* 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED O_3* 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED H_AB 0.10000 2.13816 0.10000 2.13273
NONBONDED C_2* 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED O_2* 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
NONBONDED H_AA 0.10000 2.13816 0.10000 2.13273
NONBONDED C_1* 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED N_9 0.10000 2.67270 0.10000 2.73273
NONBONDED C_8 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED N_7 0.10000 2.67270 0.10000 2.73273
NONBONDED C_5 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED C_4 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED N_3 0.10000 2.67270 0.10000 2.73273
NONBONDED C_2 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED N_2 0.10000 2.67270 0.10000 2.73273
NONBONDED H_AH 0.10000 2.13816 0.10000 2.13273
NONBONDED H_AG 0.10000 2.13816 0.10000 2.13273
NONBONDED N_1 0.10000 2.67270 0.10000 2.73273
NONBONDED H_AE 0.10000 2.13816 0.10000 2.13273
NONBONDED C_6 0.10000 3.29633 0.10000 3.43273
NONBONDED O_6 0.10000 2.58361 0.10000 2.63273
```

```
set echo=on message=on end
```

Topologiedatei

```
!           This file was generated by PRODRG version 040320.0550
!           PRODRG written/copyrighted by Daan van Aalten
!
set echo=false end
checkversion 1.1
AUTOGENERATE ANGLES=FALSE END
MASS O_BB 15.9994 ! equivalent to O
MASS C_BF 12.0110 ! equivalent to CB
MASS N_BE 14.0067 ! equivalent to NR6*
MASS H_AF 1.0080 ! equivalent to H
MASS C_BM 12.0110 ! equivalent to CB
MASS N_BV 14.0067 ! equivalent to N
MASS C_BZ 15.0350 ! equivalent to CH3
MASS C_BW 15.0350 ! equivalent to CH3
MASS N_BN 14.0067 ! equivalent to NR6
MASS C_BO 12.0110 ! equivalent to CB
MASS C_BG 12.0110 ! equivalent to CB
MASS N_BH 14.0067 ! equivalent to NR5*
MASS C_BC 15.0350 ! equivalent to CH3
MASS C_BI 14.0270 ! equivalent to CH2
MASS N_BP 14.0067 ! equivalent to NR5*
MASS C_BQ 13.0190 ! equivalent to CS1
MASS O_BR 15.9994 ! equivalent to OS
MASS C_BX 13.0190 ! equivalent to CH1
MASS O_CA 15.9994 ! equivalent to OA
MASS H_AC 1.0080 ! equivalent to HO
MASS C_BY 13.0190 ! equivalent to CH1
MASS O_CB 15.9994 ! equivalent to OA
MASS H_AD 1.0080 ! equivalent to HO
MASS C_BS 13.0190 ! equivalent to CS1
MASS C_BT 14.0270 ! equivalent to CH2
MASS O_BU 15.9994 ! equivalent to OS
MASS P_BK 30.9738 ! equivalent to P
MASS O_BL 15.9994 ! equivalent to OA
MASS O_BJ 15.9994 ! equivalent to OM
MASS O_BD 15.9994 ! equivalent to OS
MASS P_AZ 30.9738 ! equivalent to P
MASS O_BA 15.9994 ! equivalent to OA
MASS O_AY 15.9994 ! equivalent to OM
MASS O_AX 15.9994 ! equivalent to OS
MASS P_AT 30.9738 ! equivalent to P
MASS O_AU 15.9994 ! equivalent to OA
MASS O_AS 15.9994 ! equivalent to OM
MASS O_5* 15.9994 ! equivalent to OS
MASS C_5* 14.0270 ! equivalent to CH2
MASS C_4* 13.0190 ! equivalent to CS1
MASS O_4* 15.9994 ! equivalent to OS
MASS C_3* 13.0190 ! equivalent to CH1
MASS O_3* 15.9994 ! equivalent to OA
MASS H_AB 1.0080 ! equivalent to HO
MASS C_2* 13.0190 ! equivalent to CH1
MASS O_2* 15.9994 ! equivalent to OA
MASS H_AA 1.0080 ! equivalent to HO
MASS C_1* 13.0190 ! equivalent to CS1
MASS N_9 14.0067 ! equivalent to NR5*
MASS C_8 13.0190 ! equivalent to CR51
MASS N_7 14.0067 ! equivalent to NR5
MASS C_5 12.0110 ! equivalent to CB
MASS C_4 12.0110 ! equivalent to CB
MASS N_3 14.0067 ! equivalent to NR6
MASS C_2 12.0110 ! equivalent to CB
MASS N_2 14.0067 ! equivalent to NT
MASS H_AH 1.0080 ! equivalent to H
MASS H_AG 1.0080 ! equivalent to H
MASS N_1 14.0067 ! equivalent to NR6*
MASS H_AE 1.0080 ! equivalent to H
MASS C_6 12.0110 ! equivalent to CB
MASS O_6 15.9994 ! equivalent to O

Residue DRG
GROUP
```

```
ATOM OBB TYPE=O_BB CHARGE=-0.368 END
ATOM CBF TYPE=C_BF CHARGE= 0.171 END
ATOM NBE TYPE=N_BE CHARGE= 0.004 END
ATOM HAF TYPE=H_AF CHARGE=-0.014 END
ATOM CBM TYPE=C_BM CHARGE= 0.244 END
ATOM NBV TYPE=N_BV CHARGE= 0.074 END
ATOM CBZ TYPE=C_BZ CHARGE=-0.002 END
ATOM CBW TYPE=C_BW CHARGE=-0.002 END
ATOM NBN TYPE=N_BN CHARGE=-0.276 END
ATOM CBO TYPE=C_BO CHARGE= 0.171 END
ATOM CBG TYPE=C_BG CHARGE= 0.074 END
ATOM NBH TYPE=N_BH CHARGE= 0.007 END
ATOM CBC TYPE=C_BC CHARGE=-0.002 END
ATOM CBI TYPE=C_BI CHARGE= 0.023 END
ATOM NBP TYPE=N_BP CHARGE= 0.007 END
ATOM CBQ TYPE=C_BQ CHARGE= 0.131 END
ATOM OBR TYPE=O_BR CHARGE=-0.106 END
ATOM CBX TYPE=C_BX CHARGE= 0.069 END
ATOM OCA TYPE=O_CA CHARGE=-0.111 END
ATOM HAC TYPE=H_AC CHARGE= 0.013 END
ATOM CBY TYPE=C_BY CHARGE= 0.069 END
ATOM OCB TYPE=O_CB CHARGE=-0.110 END
ATOM HAD TYPE=H_AD CHARGE= 0.013 END
ATOM CBS TYPE=C_BS CHARGE= 0.131 END
ATOM CBT TYPE=C_BT CHARGE= 0.023 END
ATOM OBU TYPE=O_BU CHARGE=-0.106 END
ATOM PBK TYPE=P_BK CHARGE= 0.850 END
ATOM OBL TYPE=O_BL CHARGE=-0.460 END
ATOM OBJ TYPE=O_BJ CHARGE=-0.313 END
ATOM OBD TYPE=O_BD CHARGE=-0.106 END
ATOM PAZ TYPE=P_AZ CHARGE= 0.850 END
ATOM OBA TYPE=O_BA CHARGE=-0.460 END
ATOM OAY TYPE=O_AY CHARGE=-0.313 END
ATOM OAX TYPE=O_AX CHARGE=-0.107 END
ATOM PAT TYPE=P_AT CHARGE= 0.850 END
ATOM OAU TYPE=O_AU CHARGE=-0.460 END
ATOM OAS TYPE=O_AS CHARGE=-0.313 END
ATOM O5* TYPE=O_5* CHARGE=-0.106 END
ATOM C5* TYPE=C_5* CHARGE= 0.023 END
ATOM C4* TYPE=C_4* CHARGE= 0.131 END
ATOM O4* TYPE=O_4* CHARGE=-0.106 END
ATOM C3* TYPE=C_3* CHARGE= 0.069 END
ATOM O3* TYPE=O_3* CHARGE=-0.110 END
ATOM HAB TYPE=H_AB CHARGE= 0.012 END
ATOM C2* TYPE=C_2* CHARGE= 0.069 END
ATOM O2* TYPE=O_2* CHARGE=-0.110 END
ATOM HAA TYPE=H_AA CHARGE= 0.013 END
ATOM C1* TYPE=C_1* CHARGE= 0.131 END
ATOM N9 TYPE=N_9 CHARGE= 0.146 END
ATOM C8 TYPE=C_8 CHARGE=-0.036 END
ATOM N7 TYPE=N_7 CHARGE=-0.269 END
ATOM C5 TYPE=C_5 CHARGE= 0.074 END
ATOM C4 TYPE=C_4 CHARGE= 0.171 END
ATOM N3 TYPE=N_3 CHARGE=-0.276 END
ATOM C2 TYPE=C_2 CHARGE= 0.245 END
ATOM N2 TYPE=N_2 CHARGE= 0.019 END
ATOM HAH TYPE=H_AH CHARGE=-0.014 END
ATOM HAG TYPE=H_AG CHARGE=-0.014 END
ATOM N1 TYPE=N_1 CHARGE= 0.004 END
ATOM HAE TYPE=H_AE CHARGE=-0.014 END
ATOM C6 TYPE=C_6 CHARGE= 0.171 END
ATOM O6 TYPE=O_6 CHARGE=-0.368 END
```

```
BOND OBB CBF
BOND CBF NBE
BOND CBF CBG
BOND NBE HAF
BOND NBE CBM
BOND CBM NBV
BOND CBM NBN
BOND NBV CBZ
BOND NBV CBW
BOND NBN CBO
BOND CBO CBG
BOND CBO NBP
```

BOND CBG NBH
BOND NBH CBC
BOND NBH CBI
BOND CBI NBP
BOND NBP CBQ
BOND CBQ OBR
BOND CBQ CBX
BOND OBR CBS
BOND CBX OCA
BOND CBX CBY
BOND OCA HAC
BOND CBY OCB
BOND CBY CBS
BOND OCB HAD
BOND CBS CBT
BOND CBT OBU
BOND OBU PBK
BOND PBK OBL
BOND PBK OBJ
BOND PBK OBD
BOND OBD PAZ
BOND PAZ OBA
BOND PAZ OAY
BOND PAZ OAX
BOND OAX PAT
BOND PAT OAU
BOND PAT OAS
BOND PAT O5*
BOND O5* C5*
BOND C5* C4*
BOND C4* O4*
BOND C4* C3*
BOND O4* C1*
BOND C3* O3*
BOND C3* C2*
BOND O3* HAB
BOND C2* O2*
BOND C2* C1*
BOND O2* HAA
BOND C1* N9
BOND N9 C8
BOND N9 C4
BOND C8 N7
BOND N7 C5
BOND C5 C4
BOND C5 C6
BOND C4 N3
BOND N3 C2
BOND C2 N2
BOND C2 N1
BOND N2 HAH
BOND N2 HAG
BOND N1 HAE
BOND N1 C6
BOND C6 O6

ANGLE OBB CBF NBE
ANGLE OBB CBF CBG
ANGLE NBE CBF CBG
ANGLE CBF NBE HAF
ANGLE CBF NBE CBM
ANGLE HAF NBE CBM
ANGLE NBE CBM NEV
ANGLE NBE CBM NBN
ANGLE NEV CBM NBN
ANGLE CBM NEV CBZ
ANGLE CBM NEV CBW
ANGLE CBZ NEV CBW
ANGLE CBM NBN CBO
ANGLE NBN CBO CBG
ANGLE NBN CBO NBP
ANGLE CBG CBO NBP
ANGLE CBF CBG CBO
ANGLE CBF CBG NBH
ANGLE CBO CBG NBH

ANGLE CBG NBH CBC
ANGLE CBG NBH CBI
ANGLE CBC NBH CBI
ANGLE NBH CBI NBP
ANGLE CBO NBP CBI
ANGLE CBO NBP CBQ
ANGLE CBI NBP CBQ
ANGLE NBP CBQ OBR
ANGLE NBP CBQ CBX
ANGLE OBR CBQ CBX
ANGLE CBQ OBR CBS
ANGLE CBQ CBX OCA
ANGLE CBQ CBX CBY
ANGLE OCA CBX CBY
ANGLE CBX OCA HAC
ANGLE CBX CBY OCB
ANGLE CBX CBY CBS
ANGLE OCB CBY CBS
ANGLE CBY OCB HAD
ANGLE OBR CBS CBY
ANGLE OBR CBS CBT
ANGLE CBY CBS CBT
ANGLE CBS CBT OBU
ANGLE CBT OBU PBK
ANGLE OBU PBK OBL
ANGLE OBU PBK OBJ
ANGLE OBL PBK OBJ
ANGLE OBU PBK OBD
ANGLE OBL PBK OBD
ANGLE OBJ PBK OBD
ANGLE PBK OBD PAZ
ANGLE OBD PAZ OBA
ANGLE OBD PAZ OAY
ANGLE OBA PAZ OAY
ANGLE OBD PAZ OAX
ANGLE OBA PAZ OAX
ANGLE OAY PAZ OAX
ANGLE PAZ OAX PAT
ANGLE OAX PAT OAU
ANGLE OAX PAT OAS
ANGLE OAU PAT OAS
ANGLE OAX PAT O5*
ANGLE OAU PAT O5*
ANGLE OAS PAT O5*
ANGLE PAT O5* C5*
ANGLE O5* C5* C4*
ANGLE C5* C4* O4*
ANGLE C5* C4* C3*
ANGLE O4* C4* C3*
ANGLE C4* O4* C1*
ANGLE C4* C3* O3*
ANGLE C4* C3* C2*
ANGLE O3* C3* C2*
ANGLE C3* O3* HAB
ANGLE C3* C2* O2*
ANGLE C3* C2* C1*
ANGLE O2* C2* C1*
ANGLE C2* O2* HAA
ANGLE O4* C1* C2*
ANGLE O4* C1* N9
ANGLE C2* C1* N9
ANGLE C1* N9 C8
ANGLE C1* N9 C4
ANGLE C8 N9 C4
ANGLE N9 C8 N7
ANGLE C8 N7 C5
ANGLE N7 C5 C4
ANGLE N7 C5 C6
ANGLE C4 C5 C6
ANGLE N9 C4 C5
ANGLE N9 C4 N3
ANGLE C5 C4 N3
ANGLE C4 N3 C2
ANGLE N3 C2 N2
ANGLE N3 C2 N1

```
ANGLE N2 C2 N1
ANGLE C2 N2 HAH
ANGLE C2 N2 HAG
ANGLE HAH N2 HAG
ANGLE C2 N1 HAE
ANGLE C2 N1 C6
ANGLE HAE N1 C6
ANGLE C5 C6 N1
ANGLE C5 C6 O6
ANGLE N1 C6 O6

IMPROPER CBF CBG NBE OBB
IMPROPER NBE CBM HAF CBF
IMPROPER CBM NBE NBV NBN
IMPROPER NBV CBM CBZ CBW
IMPROPER CBO NBN CBG NBP
IMPROPER CBG CBF CBO NBH
IMPROPER NBH CBG CBC CBI
IMPROPER NBP CBO CBI CBQ
IMPROPER N9 C1* C8 C4
IMPROPER C5 C6 C4 N7
IMPROPER C4 N3 C5 N9
IMPROPER C2 N3 N1 N2
IMPROPER N2 C2 HAH HAG
IMPROPER N1 C6 HAE C2
IMPROPER C6 C5 N1 O6
IMPROPER CBQ NBP OBR CBX
IMPROPER CBX CBQ OCA CBY
IMPROPER CBY CBX OCB CBS
IMPROPER CBS OBR CBT CBY
IMPROPER PBK OBU OBL OBJ
IMPROPER PAZ OBD OBA OAY
IMPROPER PAT OAX OAU OAS
IMPROPER C4* C5* C3* O4*
IMPROPER C3* C4* C2* O3*
IMPROPER C2* C3* C1* O2*
IMPROPER C1* O4* C2* N9
IMPROPER N9 C8 N7 C5
IMPROPER C8 N7 C5 C4
IMPROPER N7 C5 C4 N9
IMPROPER C5 C4 N9 C8
IMPROPER C4 N9 C8 N7
IMPROPER CBF NBE CBM NBN
IMPROPER NBE CBM NBN CBO
IMPROPER CBM NBN CBO CBG
IMPROPER NBN CBO CBG CBF
IMPROPER CBO CBG CBF NBE
IMPROPER CBG CBF NBE CBM
IMPROPER C5 C4 N3 C2
IMPROPER C4 N3 C2 N1
IMPROPER N3 C2 N1 C6
IMPROPER C2 N1 C6 C5
IMPROPER N1 C6 C5 C4
IMPROPER C6 C5 C4 N3

DIHEDRAL NBE CBM NBV CBW
DIHEDRAL NBN CBO NBP CBQ
DIHEDRAL CBF CBG NBH CBI
DIHEDRAL CBG NBH CBI NBP
DIHEDRAL NBH CBI NBP CBQ
DIHEDRAL CBX CBQ NBP CBO
DIHEDRAL NBP CBQ OBR CBS
DIHEDRAL NBP CBQ CBX CBY
DIHEDRAL CBT CBS OBR CBQ
DIHEDRAL CBQ CBX OCA HAC
DIHEDRAL CBS CBY CBX CBQ
DIHEDRAL CBX CBY OCB HAD
DIHEDRAL CBX CBY CBS CBT
DIHEDRAL OBR CBS CBT OBU
DIHEDRAL PBK OBU CBT CBS
DIHEDRAL CBT OBU PBK OBD
DIHEDRAL CBT OBU PBK OBD
DIHEDRAL PAZ OBD PBK OBU
DIHEDRAL PAZ OBD PBK OBU
DIHEDRAL PBK OBD PAZ OAX
```

```
DIHEDRAL PBK OBD PAZ OAX
DIHEDRAL PAT OAX PAZ OBD
DIHEDRAL PAT OAX PAZ OBD
DIHEDRAL PAZ OAX PAT O5*
DIHEDRAL PAZ OAX PAT O5*
DIHEDRAL C5* O5* PAT OAX
DIHEDRAL C5* O5* PAT OAX
DIHEDRAL PAT O5* C5* C4*
DIHEDRAL C3* C4* C5* O5*
DIHEDRAL C5* C4* O4* C1*
DIHEDRAL C5* C4* C3* C2*
DIHEDRAL N9 C1* O4* C4*
DIHEDRAL C4* C3* O3* HAB
DIHEDRAL C1* C2* C3* C4*
DIHEDRAL C3* C2* O2* HAA
DIHEDRAL C3* C2* C1* N9
DIHEDRAL O4* C1* N9 C4
DIHEDRAL N3 C2 N2 HAG
END
set echo=true end
```

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde vom September 2001 bis Januar 2005 zunächst in der Abteilung für Zelluläre Biochemie (AG. Strukturbiologie) am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie und anschließend in der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie der Georg-August-Universität Göttingen angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Ralf Ficner danke ich für die interessante Aufgabenstellung, die Begeisterung und den Optimismus die er dem Projekt entgegenbrachte und für die Hilfe bei allen auftretenden „kristallographischen Problemen“.

Herrn Prof. Dr. S. Irninger danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Dr. Achim Dickmanns danke ich sehr herzlich für die hervorragende Betreuung der Arbeit inklusive der Diskussionsbereitschaft zur „Erweiterung des Horizonts“, die Unterstützung in hoffnungslosen Momenten und seine allseits gute Laune (besonders am frühen Morgen).

Dr. Markus Rudolph danke ich für die Einweisung in die Fluoreszenzspektroskopie und wertvolle Hilfe beim Auswerten der Daten.

Dem „Transport-Labor“ danke ich für die sehr gute und herzliche Arbeitsatmosphäre im Labor und besonders Daniel Wohlwend und Thomas Monecke für das „Korrekturlesen“ der Arbeit, auch wenn der Geräuschpegel im Labor (bedingt durch Rock-Musik oder lautstarken Meinungsaustausch) oft hoch war.

Prof. Dr. A. Doenecke danke ich für die Möglichkeit, die Kernimportassays in seiner Abteilung (Molekulare Zellbiologie) durchführen zu dürfen, und Jörg Kahle danke ich für die Unterstützung bei deren Durchführung.

Johanna Arnorsdottir und Tine Kragh Nielsen danke ich für die angenehme und oft auch lustige „multikulturelle“ Atmosphäre im Schreibraum und kristallographische Diskussionen.

Ute Schmidt bin ich für die Vorarbeiten und die Übergabe des Projektes sehr dankbar.

Des Weiteren möchte ich mich bei Annette Bernd und Winfried Lendeckel für die technische Unterstützung bedanken.

Nicht zuletzt bin ich meiner Familie, meinen Freunden und Oliver für viel Geduld und stete Unterstützung während meiner Promotionszeit sehr dankbar.

Lebenslauf

Anja Strasser
Am Menzelberg 16a
37077 Göttingen
Tel.: 0551-2054745
Email: astrass@gwdg.de

Geboren am 17.08.1976 in Ludwigshafen/Rhein

Staatsangehörigkeit: deutsch

1987-1996	Allgemeine Hochschulreife an der Integrierten Gesamtschule Ludwigshafen-Oggersheim
1996-2001	Studium Diplom Biologie an der Universität Kaiserslautern
2001	Diplom in der Abteilung für Zelluläre Biochemie am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg (DKFZ) unter der Leitung von Prof. Dr. W. Pyerin mit dem Titel: Wachstumsverhalten menschlicher osteoblastärer Zellen (SaOS-2) im Kontext Proteinkinase-CK2-verknüpfter Prozesse
1999	Praktikum im Pathologischen Institut Prof. Dr. Schäfer in Kaiserslautern
2001-2002	Doktorand Biologie in der Abteilung für Zelluläre Biochemie am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen (AG Prof. Dr. R. Ficner)
2002-2005	Doktorand Biologie in der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie an der Georg-August-Universität Göttingen unter der Anleitung von Prof. Dr. Ficner