Strukturelle Charakterisierung der C-terminalen Domäne des spleißosomalen DExD/H-Box Proteins hPrp22

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Denis Kudlinzki

aus Mühlhausen/Thüringen

Göttingen 2007

D7

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

Koreferent: Herr Prof. Dr. Oliver Einsle
Institut für Mikrobiologie & Genetik
Abteilung für Molekulare Strukturbiologie
Georg-August-Universität Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2008

für Marion und Til.

"Es ist nicht wenig Zeit, die wir haben, sondern es ist viel Zeit, die wir nicht nützen."

Lucius Annaeus Seneca (4 v.Chr. - 65)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Spleißosom	2
1.2 Intronklassen und Intronerkennung.....	3
1.3 Der Reaktionsmechanismus des Spleißens	4
1.4 Der Reaktionszyklus des Spleißens	5
1.5 DExD/H-Box RNA-Helikasen	8
1.6 Die DEAH-Box RNA-Helikasen hPRP2 und hPRP22.....	12
1.7 Zielsetzung.....	14
2. Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Großgeräte.....	15
2.1.2 Chromatographiesäulen	16
2.1.3 Feinchemikalien	16
2.1.4 Kitsysteme.....	16
2.1.5 Enzyme und Inhibitoren	16
2.1.6 Zellstämme	17
2.1.7 DNA-Oligonukleotide	17
2.1.8 Vektoren	20
2.1.9 Kristallisationsscreens	20
2.1.10 Computersoftware	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	22
2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.2.1.2 DNA-Restriktionsverdau.....	23
2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese.....	23

2.2.1.4 DNA-Ligation.....	23
2.2.1.5 Plasmidpräparation	24
2.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	24
2.2.2.1 Medien für die Aufzucht von E.coli	24
2.2.2.2 Transformation chemisch kompetenter E.coli-Zellen	26
2.2.2.3 Induktion der Proteinexpression in E.coli	26
2.2.2.4 Zellaufschluss	27
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	28
2.2.3.1 Affinitätschromatographie über Strep-Tactin-Sepharose	28
2.2.3.2 Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose.....	28
2.2.3.3 Proteolytische Spaltung von GST-Fusionsproteinen mit PreScission Protease.....	29
2.2.3.4 Größenausschlusschromatographie	29
2.2.3.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
2.2.4 Reinigungsprotokolle der verwendeten Proteine	30
2.2.4.1 hPrp22-H12 (AS 264-351) in pGEX-6P-1	31
2.2.4.2 hPrp22-H13 (AS 564-1183) in pPR-IBA1	31
2.2.4.3 hPrp22-H15 (AS 564-904) in pPR-IBA1	31
2.2.4.4 hPrp22-H20 (AS 950-1055) in pPR-IBA1	31
2.2.4.5 hPrp22-H20 (AS 950-1055) in pPR-IBA1 Selenomethionin-Derivat	32
2.2.5 Spektroskopische Methoden.....	32
2.2.5.1 Bestimmung nativer molarer Extinktionskoeffizienten	32
2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Nukleinsäuren	33
2.2.5.3 Enzymgekoppelter ATPase-Test.....	33
2.2.6.1 Proteinkristallisation	35
2.2.6.2 Seeding-Experimente	35
2.2.6.3 Kryo-Kristallographie.....	36
2.2.6.4 Datensammlung.....	36
2.2.6.5 Phasenbestimmung und Kalkulation der Elektronendichteverteilung	37
2.2.6.6 Modellbau und Verfeinerung der Struktur	39

3. Ergebnisse	40
3.1 Klonierung und Reinigung des hPrp2 Volllängenproteins	40
3.2 Klonierung und Reinigung des hPrp22 Volllängenproteins	42
3.3 Design und Klonierung von Deletionsmutanten von hPrp22 und hPrp2	43
3.4 Reinigung und Kristallisation einiger Verkürzungen von hPrp22	46
3.4.1 Reinigung und Kristallisation der hPrp22-Deletionsmutante H12	46
3.4.2 Reinigung der hPrp22-Deletionsmutante H13	48
3.4.3 Reinigung der hPrp22-Deletionsmutante H15	49
3.4.4 Reinigung und Kristallisation der hPrp22-Deletionsmutante H20	50
3.5 Strukturelle Charakterisierung des C-Terminus von hPrp22 (H20).....	52
3.5.1 Datenaufnahme und -prozessierung.....	52
3.5.2 Bestimmung der Phasen durch SAD und MAD	54
3.5.3 Modellbau, Strukturverfeinerung und Qualität des Modells	55
3.5.4 Beschreibung der Struktur	59
3.6 Biochemische Untersuchungen der ATPase-Aktivität	60
4. Diskussion.....	63
4.1 Klonierung und Reinigung der Volllängenproteine und Deletionsmutanten von hPrp2 und hPrp22	63
4.2 Strukturaufklärung der Deletionsmutante H20 von hPrp22	64
4.3 Modellierung homologer C-terminaler Domänen	68
4.4 Einfluss der C-terminalen Domäne von hPrp22 auf die ATPase-Aktivität	70
5. Zusammenfassung	72
6. Summary	73
7. Abkürzungsverzeichnis.....	74
8. Literaturverzeichnis.....	76
9. Anhang	86
10. Danksagung.....	93

1. Einleitung

Die genetische Information eukaryotischer Organismen liegt als doppelsträngige chromosomale DNA im Zellkern vor. Die Nukleinsäuresequenz dieser DNA enthält den Schlüssel für die Synthese von Proteinen. Die Erbinformation wird Gen für Gen von RNA-Polymerasen abgelesen und so auf einzelsträngige RNAs übertragen. Bei diesem Vorgang, der Transkription, wird eine Vorstufe der Boten-RNA (prä-messenger-RNA) synthetisiert. Diese *prä-mRNA* wird anschließend durch verschiedene Prozesse zur reifen mRNA modifiziert, die aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert wird. Ihre Nukleinsäureabfolge wird während der Proteinbiosynthese an den Ribosomen in die Aminosäuresequenz translatiert. Die Primärstruktur der Aminosäuren bestimmt maßgeblich die Gestalt und damit die biologische Funktion des synthetisierten Polypeptids. Der gesamte Prozess kann auch als Fluss der genetischen Information bezeichnet werden (Abb.1).

[Abb.1] Fluss der genetischen Information in Eukaryoten. Transkription der DNA in prä-mRNA, Modifikation der prä-mRNA, Spleißen der prä-mRNA, Export der reifen mRNA ins Zytoplasma, Translation an den Ribosomen, Faltung der translatierten Proteine. Alternatives Spleißen führt zu veränderten Proteinen (nach Lührmann, 2006).

Neben der Anheftung einer 5'-Guanosin-Kappe (5'-cap) und dem Anhängen von zahlreichen Adeninen (*Poly-A*), kommt es auch zu spezifischen Veränderungen der Länge der prä-mRNA. Die genetische Information der DNA ist diskontinuierlich, das heißt sie enthält kodierende (*Exons*) und nicht kodierende (*Introns*, engl. intervening sequences) Sequenzabschnitte (Berget *et al.*, 1977; Chow *et al.*, 1977). Der Grad dieser Diskontinuität und Anzahl der Introns nimmt mit der Komplexität der Organismen zu. Prokaryotische DNA besitzt keine Introns.

Einfache Eukaryoten (z.B. Hefe) besitzen nur wenige Mosaikgene mit wenigen Introns und höhere Eukaryoten (z.B. Mensch) haben kaum Gene ohne Introns. Die meisten Gene besitzen zahlreiche nicht-kodierende Sequenzabschnitte größerer Länge.

Da Introns nicht für Proteine kodieren, werden sie aus der mRNA entfernt. Gleichzeitig müssen die Exons miteinander verknüpft werden, um eine kontinuierliche genetische Information zu gewährleisten. Dieser Schritt der RNA-Prozessierung wird Spleißen genannt und wird durch das Spleißosom katalysiert. Ein Vorteil von Introns in den Genen eukaryotischer Organismen liegt in der Möglichkeit des alternativen Spleißens. Dabei werden aus einer prä-mRNA nur ganz bestimmte Exons für die mRNA verknüpft, die je nach Funktion des Proteins unterschiedlich kombiniert werden können. Dieser modulare Aufbau der Gene erhöht die Anzahl möglicher Proteinprodukte pro Gen und stellt eine Möglichkeit dar, die Sequenzen des Genoms vielfältiger zu nutzen. Des Weiteren sinkt die Mutagenesewahrscheinlichkeit in den Exons.

1.1 Das Spleißosom

Das Spleißosom ist ein hochdynamischer Protein-RNA Komplex mit einer Masse von bis zu 2 MDa (Übersicht in Burge *et al.*, 1999; Hastings *et al.*, 2001; Brow, 2002; Will *et al.*, 2006). Es katalysiert Reaktionen, die das präzise Entfernen der Introns und das Ligieren der Exons zur Folge haben. Eukaryoten haben mit zunehmendem Evolutionsgrad komplexere Spleißosomen mit zahlreicheren interagierenden Proteinen ausgebildet.

Der spleißosomale Protein-RNA-Komplex wird nach und nach aus fünf Ribonukleoproteinkomplexen (*small nuclear ribonucleoprotein particles*, snRNPs) um das prä-mRNA Substrat herum aufgebaut. Beim Menschen wurden zwei Spleißosomformen gefunden, das Hauptspleißosom (*major spliceosome*) und das Nebenspleißosom (*minor spliceosome*) (Übersicht in Burge *et al.*, 1999). Durch das Hauptspleißosom (Abb.2) werden Introns des Typs U2 entfernt, während das Nebenspleißosom seltenere Introns vom Typ U12 entfernt (Tarn *et al.*, 1996; Staley *et al.*, 1998; Jurica *et al.*, 2003; Will *et al.*, 2005).

[Abb.2] EM-Aufnahme des menschlichen Hauptspleißosoms mit gebundener mRNA (<http://web.uconn.edu/mcb201/lecture23.html>).

Das Hauptspleißosom besteht aus den snRNPs U1, U2, U4, U5 und U6, sowie assoziierten nicht-spleißosomalen Proteinen (Hartmuth *et al.*, 2002). U snRNPs bestehen jeweils aus 100-200 Nukleotide langen, uridinreichen UsnRNAs (Guthrie *et al.*, 1988) und den 7 Sm Proteinen B, D1, D2, D3, E, F, G (bei U6 sind es die zu den Sm-Proteinen homologen Lsm Proteine) (Übersicht in Will *et al.*, 2001, 2006) sowie assoziierten, U snRNP-spezifischen Proteinen (Abb.3).

Des Weiteren gibt es noch zahlreiche nicht-snRNP Proteine, die für das Spleißen von großer Bedeutung sind. Beim Menschen mehr als 100 spleißosomale Proteine beschrieben (Jurica *et al.*, 2002; Makarov *et al.*, 2002; Mougin *et al.*, 2002; Rappsilber *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002). In *Saccharomyces cerevisiae* wurden viele dieser Proteine mit *Prp* bezeichnet, um ihre Funktion in der prä-mRNA-Prozessierung (*pre-mRNA processing*) zu kennzeichnen. Alle beteiligten Proteine wurden in drei Klassen eingeteilt. Die Sm und Lsm Proteine werden als *core snRNP Proteine*, die U snRNP spezifischen Proteine als *integrale snRNP Proteine* und die nicht-snRNP Proteine als *externe snRNP Proteine* bezeichnet (Übersicht in Will *et al.*, 2006).

[Abb.3] Aufstellung der U UsnRNAs des Menschen mit ihren zugehörigen Protein-Komponenten, die zusammen im Komplex die U snRNPs formen und das Spleißosom bilden (nach Lührmann, 2006).

1.2 Intronklassen und Intronerkennung

Es gibt verschiedene Intronklassen, die Unterschiede in ihrer Sequenz, Sekundärstruktur und hinsichtlich des Mechanismus durch den sie gespleißt werden aufweisen. Die bekannten Klassen sind die Gruppen I und II der selbst-spleißenden Introns (*self-splicing introns*), t-RNA Introns und spleißosomale Introns.

Selbst-spleißenden Introns der Gruppen I und II wurden in Protozoen rRNAs, in Mitochondrien und Chloroplasten von Pilzen und Pflanzen und in Eubakterien gefunden (Übersicht in Cech,

1993; Zaug *et al.*, 1983). Diese beiden Intronklassen unterscheiden sich in ihren Reaktionsmechanismen (Peebles *et al.*, 1986; van der Veen *et al.*, 1986; Madhani *et al.*, 1992) und können ohne katalytischen Einfluss von Proteinen die Spleißreaktion selbst durchzuführen. Der Reaktionsmechanismus ähnelt dem Spleißen durch das Spleißosom (1.3) (Übersicht in Moore *et al.*, 1993; Nilsen, 1998). Spleißosomale Introns sind am häufigsten und sind charakteristisch für Eukaryoten.

Die Erkennung dieser Introns erfolgt durch hochkonservierte Sequenzabschnitte in bestimmten Bereichen dieser. Untereinheiten des Spleißosoms erkennen bestimmte Konsensussequenzen (Abb.4) und binden daran (Padgett *et al.*, 1986). Die 5'-Schnittstelle markiert den Anfang, die 3'-Schnittstelle das Ende des Introns. Die konservierten Sequenzabschnitte erstrecken sich über den Bereich der Exon-Intron-Grenze hinaus. Der für die Spleißreaktion wichtige Verzweigungspunkt (*branchpoint*) liegt 100-18 Nukleotide aufwärts der 3'-Schnittstelle und unterscheidet sich stark zwischen höheren und niederen Eukaryoten. Ein zentrales Adenosin ist Mittelpunkt der Spleißreaktion. In höheren Eukaryoten gibt es eine pyrimidinreiche Region, die zwischen dem *branchpoint* und der 3'-Schnittstelle liegt (Senapathy *et al.*, 1990; Lopez *et al.*, 1999).

[Abb.4] Intron-Konsensussequenzen von *Homo sapiens*. Konsensussequenzen der 5'-Schnittstelle (5'SS), des *branchpoints* (BP) und der 3'-Schnittstelle (3'SS), A=Adenin, C=Cytosin, G=Guanin, U=Uracil, R=Purin, Y=Pyrimidin, pyrimidinreiche Region (Py)_n, N kann A, U, G, C oder sein (nach Burge *et al.*, 1998).

1.3 Der Reaktionsmechanismus des Spleißens

Der Reaktionsmechanismus des Spleißens basiert auf zwei aufeinander folgenden Umesterungen. In der ersten chemischen Reaktion erfolgt ein nukleophiler Angriff der 2'-Hydroxylgruppe des *branchpoint* Adenins auf das Phosphat der Base an der 5'-Schnittstelle. Durch diese Reaktion entsteht ein freies 5'-Exon mit einer freien 3'-Hydroxylgruppe und eine lassoförmige RNA-Struktur (Lariat-Zwischenprodukt), das durch die 2'-5'-Phosphodiesterbindung des *branchpoint*-Adenins und dem Guanin der 5'-Schnittstelle gebildet wird (Abb.5, nach der ersten Umesterung). Bei der zweiten Reaktion findet ein nukleophiler Angriff der freien 3'-Hydroxylgruppe des Exons 1 auf das Phosphat der 3'-Schnittstelle statt (Abb.5, nach der zweiten Umesterung). Die beiden Exons werden durch eine Phosphodiesterbindung verknüpft und es entsteht ein freies Intron-Lariat (Grabowski *et al.*, 1984; Ruskin *et al.*, 1984; Padgett *et al.*, 1984).

Dieser Mechanismus des Spleißens findet sowohl in Menschen als auch in niederen Eukaryoten statt (Ng *et al.*, 1980). Diese Reaktionsfolge benötigt keine zusätzliche Energie, da die

Phosphodiesterbindungen nur umgelagert werden. Der beschriebene Mechanismus wird Cis-Spleißen genannt, da dasselbe RNA-Molekül sowohl Donor als auch Akzeptor für die Reaktion ist. Es gibt noch eine weitere Art des Spleißens (Trans-Spleißen), in der zwei getrennte prä-mRNA Moleküle verbunden werden (Übersicht in Nilsen, 1997).

[Abb.5] Die zweimalige Umesterungen beim Spleißen führt zur Entfernung des Introns und der Ligation der Exons (Lodish *et al.*, 1995).

1.4 Der Reaktionszyklus des Spleißens

Die U snRNPs spielen die zentrale Rolle im Spleißzyklus (Tab.1). So werden von ihnen die Schnittstellen erkannt und die Grenzen von Introns und Exons festgelegt. Dafür ist ein komplexes Netzwerk wechselnder Interaktionen der snRNPs untereinander und mit der prä-mRNA in einer definierten Reihenfolge notwendig. Diese Interaktionen werden meist in Form von Basenpaarungen der RNAs oder durch Protein-RNA Wechselwirkungen zwischen den beteiligten Komponenten verwirklicht. Acht ATP-abhängige DExD/H-Box RNA-Helikasen (1.5, Tab.2) werden benötigt, um den Zyklus anzutreiben. Sie induzieren die strukturellen Umordnungen von RNA-RNA- und Protein-RNA Interaktionen während des Spleißens von prä-mRNA (Madhani *et al.*, 1994; Ares *et al.*, 1995; Nilsen, 1998; Staley *et al.*, 1998; Brow, 2002). ATP wird ausschließlich für die Umlagerungen verbraucht, nicht für die Umesterungsreaktionen.

U snRNP	Funktion
U1	5'-Schnittstellen Erkennung
U2	Bildung des katalytischen Zentrums mit U6, <i>branchpoint</i> Erkennung
U4	Chaperon für U6
U5	5'-und 3'-Schnittstellen Erkennung
U6	Bildung des katalytischen Zentrums mit U2

[Tab.1] Übersicht der Funktionen der U snRNPs während des Spleißzyklus

Die Assemblierung des Spleißosoms (Abb.6) wird durch die Bindung des U1 snRNPs an die 5'-Schnittstelle der prä-mRNA initiiert. Dieser Schritt ist ATP-unabhängig und geschieht durch RNA-Basenpaarung der U1 RNA mit der Sequenz der Schnittstelle (Seraphin *et al.*, 1989). Sie bilden den E-Komplex (Du *et al.*, 2001, 2002). Die *branchpoint* Sequenz wird erst durch das *branchpoint*-bindende Protein (BBP) erkannt (Berglund *et al.*, 1997) und im darauf folgenden Schritt bindet das U2 snRNP am *branchpoint* innerhalb des Introns und ersetzt das BBP (Das *et al.*, 2000). Die notwendige Aktivierung der U2 RNA geschieht durch eine intramolekulare Umordnung, die in einer Konformationsänderung resultiert (Zavanelli *et al.*, 1994). Die Bindung des U2 snRNPs an den *branchpoint* benötigt ATP. Zwei DExD/H-Box Helikasen, UAP56 und Prp5 sind daran beteiligt. U2 interagiert mit U1 und der prä-mRNA und formt den prä-spleißosomalen Komplex A (Makarov *et al.* 2002; Hartmuth *et al.*, 2002).

Das bereits zuvor assemblierte tri-snRNP U4/U5/U6 wird anschließend in diesen Komplex integriert und bildet kurzzeitig den penta-snRNP Komplex (Komplex B) (Stevens *et al.*, 2002; Malca *et al.*, 2003), dessen Existenz jedoch bisher noch nicht vollständig bewiesen ist. Anschließend wird dieser Komplex B in das aktive Spleißosom, den Komplex B*, umgewandelt (Pikielny *et al.*, 1986; Konarska *et al.*, 1987; Cheng *et al.*, 1987). Die U6 RNA interagiert dabei mit der 5'-Schnittstelle und verdrängt U1, das vor der ersten Katalyse aus dem Komplex verdrängt wird (Tarn *et al.*, 1994; Lesser *et al.*, 1993). Dieser Prozess wird durch die integrale DExD/H-Box Helikase Prp28 hervorgerufen (Staley *et al.*, 1998). U6 ist im tri-snRNP mit U4 über zwei stabile RNA-Helices verbunden, wird aber durch einige Umlagerungen während der Bindung von U6 an die prä-mRNA abgelöst und verlässt das Spleißosom (Yean *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1996). Für die Trennung der Basenpaarungen von U4 und U6 ist die integrale DExD/H-Box Helikase Brr2 essentiell (Kim *et al.*, 1999; Laggerbauer *et al.*, 1998; Raghunathan *et al.*, 1998). Im nun aktiven Spleißosom interagiert U6 mit der für die erste Umesterung wichtigen 5'-Schnittstelle und U2 bindet am *branchpoint*. Eine weitere essentielle ATP-abhängige DExD/H-Box Helikase, Prp2, ordnet den Komplex vor dem ersten katalytischen Schritt nochmals um (Cheng *et al.*, 1987; Yean *et al.*, 1991).

Die für die Katalyse notwendigen Nukleotide befinden sich nun in unmittelbarer Nähe zueinander, da die prä-mRNA durch die Umlagerung des Spleißosoms verbogen wird (King *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1993; Plumpton *et al.*, 1994). Das aktive Spleißosom, bestehend aus U2/U5/U6 und der prä-mRNA, katalysiert nun die erste Umesterung (Madhani *et al.*, 1992; Übersicht in Brow, 2002). Nach der ersten Umesterung findet eine weitere Umordnung im Spleißosom statt und Komplex C wird generiert, damit die 3'-Schnittstelle und die 5'-Schnittstelle dicht genug für die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zusammen liegen (Übersicht in Staley *et al.*, 1998). Der Zusammenhalt der beiden Schnittstellen erfolgt dabei vermutlich über die gleichzeitige Interaktion mit einer Schleife der U5 snRNA (Stevens *et al.*, 2002), woran die DExD/H-Box Helikase Prp16 ist beteiligt (Schwer *et al.*, 1991; Kim *et al.*, 1996). Nach dieser Umlagerung wird die zweite Umesterung katalysiert.

Abschließend wird der post-spleißosomale Komplex aufgelöst und die einzelnen U snRNPs werden für weitere Spleißzyklen regeneriert. Die DExD/H-Box Helikase Prp22 löst dabei die Interaktionen zwischen der mRNA und dem Spleißosom (Schwer *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1998). Die reife mRNA wird nun freigesetzt. Im letzten Schritt löst Prp43 das Intron als Lariat vom Spleißosom ab (Arenas *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 2002) und der Komplex zerfällt in die U snRNPs, die in einen neuen Zyklus eintreten können. Das Lariat wird anschließend abgebaut. Die reife mRNA wird dann aus dem Zellkern transportiert und kann an den Ribosomen translatiert werden (Übersicht in Jurica *et al.*, 2003).

[Abb.6] Der Spleißzyklus. Assemblierung der spleißosomalen Untereinheiten U1, U2, U4, U5 und U6 an ein Intron und Freisetzung der mRNA, des gespleißten Introns-Lariats und der Untereinheiten unter Mitwirkung der DExD/H-Box RNA-Helikasen (nach Lührmann, 2005).

1.5 DExD/H-Box RNA-Helikasen

Wie beschrieben, benötigt die eigentliche Spleißreaktion keine zusätzliche Energie. Zur Ausbildung oder Auflösung von RNA-RNA oder Protein-RNA Interaktionen zwischen U snRNPs und/oder der mRNA wird jedoch Energie benötigt. Für diese Umlagerungsprozesse sind DExD/H-Box RNA-Helikasen notwendig. Betrachtet man die RNA-Umordnungen genauer, ähnelt die Strategie des Spleißosoms einer allosterischen Kaskade. Die frühen Erkennungsschritte (U1 snRNP an der 5'-Schnittstelle) lösen Konformationsänderungen aus, die für darauf folgende Erkennungsschritte notwendig sind (U4/U5/U6 snRNPs bindet an die prä-mRNA). Diese wiederum sind Voraussetzung für die katalytische Aktivität des Spleißosoms. Die Katalyse wird also nur erreicht, wenn das Intron die richtigen Merkmale besitzt und in die richtige Position gebracht wird. Die DExD/H-Box RNA-Helikasen liefern durch ATP-Hydrolyse die Energie für die notwendigen Konformationsänderungen. Proteine dieses Typs besitzen konservierte Aminosäuremotive (Abb.7), die für RNA-Interaktionen und ATP-Hydrolyse notwendig sind. Sind diese Motive in räumlicher Nähe zueinander, können die Helikasen doppelsträngige RNA-Regionen (dsRNA) unter ATP-Verbrauch entwinden (Silverman *et al.*, 2003).

Das zentrale DExD/H Aminosäuremotiv, welches auch als Walker II Motiv bezeichnet wird, ist für die ATPase-Aktivität essentiell und namensgebend für diese Proteinklasse. Des Weiteren sind auch die Motive I (Walker I Motiv) und VI für die ATP-Hydrolyse essentiell. Die Aminosäuremotive Ia und V sind an der Bindung der prä-mRNA oder snRNA beteiligt, während die Motive Ib, III und IV für intramolekulare Interaktionen essentiell sind.

[Abb.7] Die 7 konservierten Aminosäuremotive von DExD/H-Box RNA-Helikasen. Die Motive I, II und VI sind essentiell für die ATP-Hydrolyse, Motiv Ia und V sind an der RNA-Interaktion beteiligt und Motiv Ib, III und IV sind für intramolekulare Interaktionen notwendig (nach Linder, 2003).

Acht verschiedene DExD/H-Box RNA-Helikasen sind am Spleißen beteiligt (Tab.2). Sie erkennen verschiedene Substrate und erfüllen somit spezifische Funktionen, die zur zielgerichteten Umordnungen des Spleißosoms führen. Trotzdem katalysieren sie die gleiche Reaktion. Die strukturelle Organisation der Motive (Abb.7) in der Tertiärstruktur des Proteins ist entscheidend für das Verständnis ihrer Interaktion und katalytischen Funktion.

DExD/H-Box Protein	Helikasemotiv	Putative Funktion
UAP56	DECD	U2 Addition
hPrp5	DEAD	U2 Addition
hPrp28 (U5-100k)	DEAD	tri-snRNP Addition
Brr2 (U5-200k)	DEIH	Entwinden von U4/U6
hPrp2 (DBP2)	DEAH	Katalytische Aktivierung
hPrp16	DEAH	Umordnung für zweite Umesterung
hPrp22 (HRH1)	DEAH	mRNA Freisetzung
hPrp43 (mDEAH9)	DEAH	Lariat Freisetzung

[Tab.2] Spleißosomale DExD/H-Box RNA-Helikasen und ihre möglichen Funktion

Es wurden bereits Strukturen unterschiedlicher DExD/H-Box Helikasen der SF II publiziert, darunter Kristallstrukturen von: dem DNA-Reparaturenzym UvrB (Theis *et al.*, 1999), der Helikase NS3 aus dem Hepatitis C Virus (Yao *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998), dem funktionell unbeschriebenen MjDEAD aus *Methanococcus jannashii* (Story *et al.*, 2001), dem humanen Spleißfaktor UAP56 (Shi *et al.*, 2004), dem Translations-Initiationsfaktor eIF4A aus *Saccharomyces cerevisiae* (Caruthers *et al.*, 2000), dem funktionell unbeschriebenen BstDEAD aus *Bacillus stearothermophilus* (Carmel *et al.*, 2004), der RNA-Helikase Vasa aus *Drosophila melanogaster* (Sengoku *et al.*, 2006) und dem am mRNA *decapping* beteiligten Enzym Dhh1p aus *Saccharomyces cerevisiae* (Cheng *et al.*, 2005). Von all diesen Proteinen wurde im Wesentlichen nur die Helikasedomäne kristallisiert, während N- und C-terminale Erweiterungen fehlen. Einigen der Strukturen wurden mit gebundener RNA oder ATP gelöst (Übersicht in Cordin *et al.*, 2006).

Bei allen Kristallstrukturen der SF II RNA-Helikasen ist klar erkennbar, dass die Helikasedomäne aus zwei kovalent verbundenen, globulären Subdomänen besteht, die jeweils aus fünf G-Faltblättern aufgebaut sind, die von 5 V-Helices umgeben sind (Abb.8).

[Abb.8] Räumliche Orientierung der Helikasemotive (eingefärbt) von Vasa. Struktur mit gebunden RNA und ATP. Alle Motive sind in unmittelbarer Nähe zueinander, woraus die katalytische Aktivität resultiert (Sengoku *et al.*, 2006).

Die Anordnung der Strukturmodule entspricht der einer RecA ATPase (Cordin *et al.*, 2006). Die Domänen 1 und 2 von Vasa bilden den Helikasekern und sind durch einen Spalt voneinander getrennt. Dort ist das ATP gebunden (Abb.8). Die sieben konservierten Motive der Helikasedomäne liegen im Innenraum dieser Spalte. Das Enzym ist katalytisch aktiv und hydrolysiert ATP. Die ATP-bindenden Motive befinden sich oberhalb des Zentrums des Proteins (ATP-Bindungstasche) (Sengoku *et al.*, 2006). Die RNA-Bindungsmotive liegen im unteren Bereich des Proteins. Eine Überlagerung mehrerer Strukturen unterschiedlicher DEAD-Box Helikasen (Abb.9) zeigt, dass sich die Abstände und die Orientierungen der Domänen und einzelnen Motive zueinander deutlich unterscheiden können. Diese Mobilität zueinander hat direkten Einfluss auf die katalytische Aktivität. Ist der relative Abstand der Subdomänen zueinander zu groß, geht die Aktivität verloren. Vasa hat die kompakteste Orientierung der Subdomänen zueinander, während eIF4A die gestreckteste Konformation aufweist und somit katalytisch inaktiv ist. Diese Flexibilität der Subdomänen zueinander kann durch andere Proteine genutzt werden, um die Aktivität der RNA-Helikase zu steuern. Beispiel für diese Art der Regulation ist der *exon junction complex* (EJC), bei dem Mago und Y14 die Konformation der RNA-Helikase eIF4AIII von einer gestreckten in eine geschlossene Form konvertieren und so die Aktivität des Proteins induzieren (Bono *et al.*, 2006).

[Abb.9] Überlagerung der Strukturen von Vasa, eIF4A, MjDEAD, UAP56 und Dhh1p. Alle Proteine wurden nach der 1. Helikase-Subdomäne ausgerichtet. In gestreckter Form (eIF4A) sind die Proteine inaktiv, geschlossen (Vasa) sind sie aktiv. Mischformen (UAP56) weisen teilweise reduzierte ATPase-Aktivität auf. (Sengoku *et al.*, 2006)

Die Helikasedomänen zeigen bei allen DExD/H-Box Proteinen große Homologien, jedoch können sich die flankierenden N- und C-terminalen Regionen stark in Länge und Sequenz unterscheiden. Sie dienen wahrscheinlich der Interaktion mit Substraten oder Kofaktoren, stabilisieren die jeweilige Konformation oder sie zeigen zusätzliche enzymatische Aktivitäten.

Wie erwähnt besitzen zahlreiche RNA-Helikasen der DExD/H-Box Protein-Familie eine ATPase-Aktivität. Sie ist teilweise von Einzelstrang-RNA (ssRNA) abhängig oder wird durch ssRNA stimuliert. *In vitro* ist die RNA-Spezifität gering. Es gibt nur eine Unterscheidung, ob es sich beim Substrat um RNA oder DNA handelt (Tanner *et al.*, 2001; Rocak *et al.*, 2004; Cordin *et al.*, 2006). Die ATPase-Aktivität kann in einigen Fällen stark durch spezifische RNA-Sequenzen oder Strukturen gesteigert werden, die möglicherweise außerhalb der Helikasedomäne gebunden wird (Cordin *et al.*, 2006). *In vivo*, beim Spleißen, wurde jedoch eine starke Substratspezifität beobachtet. Während des Spleißens befinden sich die Helikasen mit vielen anderen Proteinen und RNAs Teil eines großen Komplexes. Einige dieser Proteine binden an die Helikasen und erhöhen die Affinität für ein spezifisches Substrat (Tanner *et al.*, 2001).

Einige RNA-Helikasen können dsRNA unter ATP-Verbrauch entwinden (Rogers *et al.*, 2001; Bizebard *et al.*, 2004). Es wurden unterschiedliche Direktionalitäten, entweder in 5'-3' oder 3'-5'-Richtung, beschrieben. DEAD-Box RNA-Helikasen haben jedoch keine Richtungsspezifität beim Entwinden dsRNA (Cordin *et al.*, 2006). Es werden 8-10 Basenpaare der RNA-Helix von der RNA-Helikasedomäne gebunden (Tanner *et al.*, 2001) und vermutlich 5-6 bp in einem Schritt entwunden (Rogers *et al.*, 1999). RNA-Helikasen haben im Vergleich zu DNA-Helikasen eine sehr viel geringere Prozessivität. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass RNA-Helikasen nicht nur RNA-Doppelstränge trennen, sondern auch Protein-RNA-Interaktionen lösen können (Tanner *et al.*, 2001). Der genaue Ablauf der Trennung von RNA-RNA- oder Protein-RNA-Interaktionen ist noch nicht geklärt.

Es gibt verschiedene Modelle, die den Reaktionsablauf des Entwindens von dsRNA zu erklären versuchen (Soultanas *et al.*, 2000, 2001, Tanner *et al.*, 2001; Caruthers *et al.*, 2002; Rocak *et al.*, 2004; Tuteja *et al.*, 2004). Anerkannte Modelle sind das *inchworm* Modell (engl. für Spannerraupe) und das *active rolling* Modell. Das *active rolling* Modell setzt ein Helikase-Dimer voraus, während das *inchworm* Modell auch mit monomeren RNA-Helikasen funktionell ist. Im *active rolling* Modell liegen die Helikase-Dimere in unterschiedlichen Konformationen vor. Eine Konformation hat eine hohe Affinität zu Einzelstrang-RNA, während die andere Konformation an dsRNA bindet. Bindung und Hydrolyse von ATP führen jeweils zu einer Konformationsänderung der einzelnen Moleküle. Das Helikase-Dimer bewegt sich an der RNA entlang und entwindet doppelsträngige Regionen.

Beim *inchworm* Modell ändert sich die Konformation der Helikase durch Bindung und Hydrolyse von ATP. Die beiden Helikase-Subdomänen bewegen sich aufeinander zu oder voneinander weg. Die Subdomänen müssten sich abwechselnd kurz von der RNA lösen und an einer neuen Position binden (Tanner *et al.*, 2001; Cordin *et al.*, 2006). Dabei wird die dsRNA entwunden. Voraussetzung beider Modelle ist eine Konformationsänderung des Monomers oder Dimers. Die Modelle stimmen mit verschiedenen experimentellen Beobachtungen überein, aber keines der

beiden genügt zur vollständigen Erklärung. Biochemische und strukturelle Analysen haben gezeigt, dass die Proteine während der ATP-Bindung und -Hydrolyse tatsächlich verschiedene Konformationen einnehmen können. Diese werden durch Bindung von ATP und RNA kontrolliert (Übersicht in Cordin *et al.*, 2006). Die Induktion der Aktivität und Regulation der DExD/H-Box RNA-Helikasen wurden noch nicht näher beschrieben. Die Aufklärung der Proteinstrukturen mit und ohne gebundene Substrate oder Nukleotide, in verschiedenen Stadien der Katalyse, spielt eine wichtige Rolle zur Verbesserung des Verständnisses der Funktionsweise dieser Proteine.

1.6 Die DEAH-Box RNA-Helikasen hPRP2 und hPRP22

Funktionelle Untersuchungen der DExD/H-Box RNA-Helikasen wurden bisher ausschließlich am Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Daten der homologen und funktionell äquivalenten Helikasen aus *Homo sapiens* existieren noch nicht. Die folgenden Funktionsbeschreibungen basieren auf den biochemischen Charakterisierungen in Bäckerhefe.

Das Protein hPrp2 (accession number: NP_003578, Swissprot: spO60231, DHX16, DBP2) aus *Homo sapiens* ist eine DEAH-Box RNA-Helikase (Imamura *et al.*, 1998), die für den ersten Umesterungsschritt beim Spleißen von prä-mRNA notwendig ist (Kim *et al.*, 1996) (1.4). Die Helikase besteht aus 1041 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 119,2 kDa und einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 6,31.

Auch das Protein hPrp22 (accession number: NP_004932, Swissprot: spQ14562, DHX8, HRH1) ist eine DEAH-Box RNA-Helikase (Ono *et al.*, 1994; Ohno *et al.*, 1996). Sie ist an der Ablösung der reifen mRNA vom Spleißosom beteiligt (Schwer *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 1998) (1.4). Die Helikase hat eine Länge von 1220 Aminosäuren, ein Molekulargewicht von 139,3 kDa und ihr theoretischer isoelektrischer Punkt liegt bei 8,54. Beide Proteine besitzen einen sehr ähnlichen modularen Aufbau (Abb.10) und haben, speziell am C-Terminus, hohe Sequenzhomologien (Abb.30). Ihre Funktionen, das Aufbrechen von RNA-RNA-Interaktionen, sind ähnlich, jedoch sind ihre Substrate, Aktivitäten und Eintrittszeitpunkte in den Spleißzyklus unterschiedlich. Beide Helikasen haben am N-Terminus (~ ab AS 170) eine Lys₄-Kernimporterkennungssequenz (NLS) und am C-Terminus 4 homologe Domänen (Abb.10), eine DEXDc- (*DEXH-box delicat*es), eine HELICc (*helicase superfamily c-terminal domain*), eine HA2 (*helicase associated domain*) und eine DUF1605-Domäne (*domain of unknown function*). Sie sind sehr ähnlich angeordnet. Ein solcher, gut konservierter C-Terminus findet sich auch bei den spleißosomalen DEAH-Box Helikasen Prp16 und Prp43. Die DEXDc- und die HELICc-Domäne bilden bei beiden Proteinen die zentralen Helikasedomäne. Die 7 typischen Sequenzmotive für ATPase-Aktivität und RNA-Bindung (1.5) sind auf diesen beiden Subdomänen verteilt. HA2 und DUF1605 sind weder funktionell, noch strukturell untersucht. Prp2 und Prp22 unterscheiden sich stark am N-Terminus.

Während Prp2 keine weiteren Strukturmodule aufweist, sind bei Prp22 noch eine RS-Domäne (AS 180-230) und eine S1-Domäne (AS 260-350) lokalisiert. RS-Domänen, die gehäuft über Arginin-Serin Motive verfügen, können phosphoryliert werden und so direkten Einfluss auf die Aktivität des Proteins oder Interaktion mit anderen Proteinen nehmen. S1-Domänen (*ribosomal protein S1-like RNA-binding domain*) können Oligonukleotide, wie RNA, binden (*OB-fold*, *CSD*). Die Struktur einer homologen Domänen der RNase E wurde bereits aufgeklärt (Schubert *et al.*, 2004).

[Abb.10] Voraussage der Domänenanordnung von Prp2 (oben) und Prp22 (unten) (smart.embl-heidelberg.de).

Prp2 ist essentiell für den ersten Umesterungsschritt im Spleißzyklus. Die genaue Funktion ist aber noch nicht völlig geklärt (Lustig *et al.*, 1986; King *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 1993; Plumpton *et al.*, 1994). Auch das Substrat und die RNA-Erkennungssequenz von Prp2 im Spleißosom sind bisher noch nicht beschrieben. Es gibt Hinweise, dass es eine Bindung an die prä-mRNA gibt (Teigelkamp *et al.*, 1994). Das Protein bindet an das Spleißosom in Anwesenheit von ATP und wird nach dessen Hydrolyse wieder freigesetzt (Edwards-Gilbert *et al.*, 2000). Prp2 zeigt *in vitro* eine RNA-abhängige NTPase-Aktivität (Kim *et al.*, 1992). Dabei wird ATP, als auch dATP im gleichen Maße hydrolysiert. Die Hydrolyseaktivität für GTP, CTP und UTP liegt zwischen 30% und 70% (Kim *et al.*, 1993). Die Stimulation der NTPase Aktivität von Prp2 erfolgt durch Poly-U, Poly-A oder Poly-C RNA-Oligomere. Gereinigtes Prp2 zeigt *in vitro* keine Helikaseaktivität an dsRNA. Wahrscheinlich müssen weitere Proteine mit Prp2 interagieren, um zu einem bestimmten Zeitpunkt während des Spleißens Helikaseaktivität zu induzieren. Es wurde weiterhin festgestellt, dass neben der DEAH-Box Helikasedomäne auch der C-Terminus die Aktivität des Proteins während des Spleißens beeinflusst. Hefezellen mit Deletionen im C-Terminus waren nicht lebensfähig (Edwards-Gilbert *et al.*, 2000, 2004). Wahrscheinlich vermittelt der C-Terminus die Bindung an das Spleißosom. Das Fehlen des N-Terminus hat offenbar keine Auswirkungen auf die Aktivität von Prp2.

Prp22 ist ein essentielles Protein (Schwer *et al.*, 2000). Wie erwähnt, spielt es eine wichtige Rolle während der zweiten Umesterung und katalysiert das Ablösen der reifen mRNA vom Spleißosom (Company *et al.*, 1991). Dabei werden Basenpaarungen zwischen der U5 snRNA und der gespleißten mRNA entwunden. Die Erkennungssequenz ist jedoch noch nicht untersucht worden. Das Protein zeigt *in vitro* ATPase-Aktivität, die durch RNA (Poly-A) stimuliert wird und kann

dsRNA entwinden (Schwer *et al.*, 1998). Prp22 führt auch eine Lesekorrektur der Exon-Ligation durch. Das Protein prüft, ob die Verknüpfung der genetischen Information korrekt ist, um unerwünschte oder gar schädliche Zwischenprodukte der mRNA zu vermeiden (Mayas *et al.*, 2006). Wie bei Prp2, hat auch bei Prp22 eine Verkürzung des N-Terminus keinen Einfluss auf die Aktivität (Schneider *et al.*, 2001). Das Fehlen des C-Terminus führt zu einem Verlust an der ATPase-Aktivität und reduziert die RNA-Bindungskapazität (Tanaka *et al.*, 2005).

1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der strukturellen und funktionellen Charakterisierung der DEAH-Box RNA-Helikasen hPrp2 und hPrp22 aus *Homo sapiens*. Es sollten Erkenntnisse über ihre dreidimensionalen Strukturen, Funktionsweisen, Aktivitäten und mögliche Interaktionen sollten gewonnen werden. Die Klonierung der Gene, Etablierung reproduzierbarer Expressionssysteme und die Generierung geeigneter Reinigungsprotokolle, um das Volllängenprotein und verkürzte Formen hochrein und in ausreichender Menge zu gewinnen, waren dazu notwendig. Dies war eine Voraussetzung für die Kristallisation und anschließende röntgenkristallographische Strukturaufklärung der Proteine. Mit Hilfe der Strukturen der Proteine können ihre Funktionsweisen im Spleißprozeß und Interaktionen mit anderen Proteinen genauer untersucht werden.

Da die Proteine eine ähnliche modulare Domänenanordnung besitzen, lagen weitere Schwerpunkte der Arbeit auf der Analyse verschiedener Fragmente der Proteine. Unterschiedlichste Verkürzungen mussten generiert und spezifische Reinigungsprotokolle entwickelt werden. Die Strukturen dieser Domänen sollten aufgeklärt und miteinander oder mit homologen Domänen, soweit verfügbar, verglichen werden. Zentrales Augenmerk lag dabei auf der Strukturaufklärung des C-Terminus der Proteine, da weder Faltung noch Funktion bekannt waren.

Des Weiteren sollte ein nicht-radioaktiver, reproduzierbarer ATPase-Test entwickelt werden, um biochemische Erkenntnisse über unterschiedliche Fragmente zu gewinnen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Großgeräte

<i>ABI Prism 3100 DNA Sequencer</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
Agarose Gelelektrophoresekammer	BioRad, München
<i>Äkta Prime & Purifier</i>	GE Healthcare, München
Binokulare	Leica, Solms
<i>Frac900</i> Fraktionierer	GE Healthcare, München
Geldokumentationsgerät <i>GelDoc</i>	BioRad, München
Inkubationsschrank <i>Mytron</i>	Schütt, Göttingen
<i>Microfluidizer 110S</i>	Microfluidics, USA
PCR Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Beckman Coulter, Krefeld
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Röntgendiffraktometer <i>Micromax 007</i>	Rigaku/MSK, Japan
Röntgendiffraktometer <i>RU-H3R</i>	Rigaku/MSK, Japan
Röntgendetektor <i>mar345</i>	Marresearch, Norderstedt
Rotoren <i>JA-20, JA-30.50 Ti, JLA-8.1000</i>	Beckman Coulter, Krefeld
SDS-PAGE Elektrophoresekammer	GE Healthcare, München
Spektrofotometer Ultrospec 2100	GE Healthcare, München
Synchrotron Strahlrohre <i>BL14.1, BL14.2</i>	<i>BESSY</i> , Berlin
Synchrotron Strahlrohre <i>BW7A, BW7B, X11</i>	<i>DESY</i> , Hamburg
Taumelrollenmischer <i>RM5</i>	Schütt, Göttingen
Thermomixer <i>Comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Unitron Schüttelinkubatoren	Infors, Einsbach
Vortexer	Schütt, Göttingen
Zentrifugen	
Tischzentrifuge <i>5415R</i>	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge <i>Allegra 21R</i>	Beckman Coulter, Krefeld
Ultrazentrifuge <i>J-30 I</i>	Beckman Coulter, Krefeld
Vakuumzentrifuge <i>Speedvac 5301</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge <i>J-20 XPI</i>	Beckman Coulter, Krefeld

2.1.2 Chromatographiesäulen

Strep-Tactin-Sepharose XK 16/20	IBA, Göttingen
GSH-Sepharose FF XK 16/20	GE Healthcare, München
HiPrep Desalting 26/10	GE Healthcare, München
HisTrap Ni-NTA-Sepharose 5ml	GE Healthcare, München
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare, München
Superdex 75 XK 16/60	GE Healthcare, München
Superdex 75 XK 26/60	GE Healthcare, München
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, München
Superdex 200 XK 16/60	GE Healthcare, München
Superdex 200 XK 26/60	GE Healthcare, München

2.1.3 Feinchemikalien

Alle verwendeten Feinchemikalien wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt), BioRad (München), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Mettler-Toledo (Steinbach), Oxoid (Basingstoke, GB), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen und besitzen den Reinheitsgrad *pro analysis*. Dabei wurde in der Regel der günstigste Anbieter gewählt.

2.1.4 Kitsysteme

<i>Big Dye Terminator v1.1 Mix</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>Nucleospin Extract</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>Nucleospin Plasmid</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>Qiagen Plasmid Maxi Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Qiagen Plasmid Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Qiaquick Gel Extraction Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Qiaquick PCR Purification Kit</i>	QIAGEN, Hilden

2.1.5 Enzyme und Inhibitoren

Aprotinin	Applichem, Darmstadt
<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)</i>	New England Biolabs, Frankfurt
Leupeptin	Applichem, Darmstadt
Pepstatin	Applichem, Darmstadt
<i>Pfu Turbo Polymerase</i>	Stratagene, USA
<i>Phusion Polymerase</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>PreScission Protease</i>	GE Healthcare, München

Protease Inhibitor Cocktail “EDTA free”	Roche Diagnostics, Mannheim
RestriktionsendoNukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Zellstämme

BL21	Stammsammlung der AG Ficner
BL21 (DE3)	
B834 (DE3)	
HMS174 (DE3)	
Rosetta (DE3)	
Rosetta 2 (DE3)	
XL1-Blue	

2.1.7 DNA-Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Primer) wurden HPSF-gereinigt von MWG-Biotech (München), Purimex (Gebenstein) oder IBA (Göttingen) bezogen und gemäß den Herstellerangaben gelöst und eingesetzt. Die Berechnung der Schmelztemperaturen T_m für die verwendeten DNA-Oligonukleotide erfolgte gemäß der unten angegebenen Formel.

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - (675/N) \quad \text{mit } N = \text{Anzahl der Nukleotide}$$

Primer hPRP22	Sequenz 5'→3'	T_m [°C]
H27F - BamHI	ATAGGATCCTACCTGTCTTTGGTGTC	63,4
H264F – BamHI	ATAGGATCCATTGGTGACATTTATAATGGC	62,7
H564F – BamHI	ATAGGATCCAGCCTGCCCATCTACAA	64,8
H782F – BamHI	ATAGGATCCGGTCAGGAAGAAATTGATAC	63,9
H950F – BamHI	TATGGATCCCCTATGGAACTTTGATCAC	63,9
H1068F – BamHI	ATAGGATCCCAGGCTCGTTCCTG	66,1
H351R - XhoI	ATACTCGAGCCGTCTATTTGGGTTTAG	63,4
H561R – XhoI	ATACTCGAGCTGCTCAAGGATTGACAT	63,4
H750R – XhoI	ATACTCGAGCTTTGTGTACAGTATTTCCA	62,4
H904R – XhoI	ATACTCGAGTGTGTACAACCTGTAACAC	63,7
H1055R – XhoI	ATACTCGAGGTGTCTCTCCAGGAGTT	63,4
H1183R - XhoI	ATACTCGAGGACCTTGAAGAAGGCTG	64,8
HRH1-Eco-F	TAGAATTCCGCTGTGGCTGTAGCCATGGCGGGAGCC	76,3

HRH1-Not-R	TAGCGGCCGCGCGCCGTCGGAAAGCTCGAGATATT	76,5
HRH-Eag	TACGGCCGGCTGTGGCTGTAGCCATGGCGGGA	77,2
H1_BAMECOF_ATG	AAAGGATCCGAATTCATGGCTGTGGCTGTAGCC	70,7
H1_NOTSAL_R	AAAGCGGCCGCGTCGACGCGCCGTCGGAAAGCTCG	80,0
H1P21_HIND_R	ATTAAGCTTCCGTCGGAAAGCTCGAGATATTC	66,9
H1P21_NOT_R	ATTGCGGCCGCCGTCGGAAAGCTCGAGATATTC	74,3
H1P21_SAL_R	ATTGTCGACCCCGTCGGAAAGCTCGAGATATTC	70,7
H642P21_BAM_F	CCAGGATCCAATAAAGTGAAGTCTAGATATCG	65,6
H642P22B_BAM_F	CAAGGATCCGAATAAAGTGAAGTCTAGATATCG	65,8
H1P22B_BAM_F	AAAGGATCCGATGGCTGTGGCTGTAGCCATG	70,8
HRH1-1051-C EcoRI_FOR	CCGAATTCACGGCGAAATCTTGTCGGGGAGACCAATGAGG	75,6
HRH1-2760-C EcoRI_FOR	CCGAATTCGCAGAGAACCAACTTAGCAAGCACAGTGC	72,8
HRH1-N-1050 NotI_REV	TGCGGCCGCCCCTAGCTCTTGCGGCCGCA	78,0
HRH1-V EcoRI_FOR	GAATTCGCTGTGGCTGTAGCCATGGCGGGAGCCTTAATC	75,8
HRH1-V NotI+Strep_REV	GCGGCCGCTTATTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCATCCAATTCCGCG CCGTCGGAAAGCTCGAGA	83,9
MU_HRH1_SE	TGGTGCTATGAGAACTTTATCCAGGCTCGTTCCTGCGCCGGG	70,4
MU_HRH1_ANSE	CCCGGCGCAGGGAACGAGCCTGGATAAAGTTCTCATAGCACCA	70,4

Sequenzierprimer hPRP22		Tm [°C]
SP_HRH1_523	GATCGAAACCGAGATCGAGA	57,3
SP_HRH1_1020	TCTAAACCCAAATAGACGGCG	57,9
SP_HRH1_1524	TGCCTGATGCGGAAGGCA	58,2
SP_HRH1_2023	CGCGATCATCATGTTGGAC	56,7
SP_HRH1_2524	TGACTATTGATGGTATCTACTATGT	56,4
SP_H1_255r	CATGGTTTGTATGAGACGCAG	57,9

Primer hPRP2	Sequenz 5'→3'	Tm [°C]
D9F - EcoRI	ATAGAATTCCGCTGGGTTCAGGACGA	64,8
D385F - EcoRI	ATAGAATTCCAGGCCCAGCAGAAAGA	63,2
D617F - EcoRI	ATAGAATTCGGACAGGAGGAGATTGAG	63,4
D785F - EcoRI	ATAGAATTCCTATGAGACACTGCTG	61,9
D905F - EcoRI	ATAGAATTCCTCAGATCGATGCGCCGA	63,4

D371R - XhoI	TATCTCGAGGAGCTGAGTGGCCCCGA	69,5
D585R - XhoI	ATACTCGAGCTTGGTGTAGAAGATGTC	63,4
D745R - XhoI	ATACTCGAGGTGCTGATAGGCCAGG	68,0
D891R - XhoI	ATACTCGAGACTCTCAGCCACTGTG	66,4
D1019R – XhoI	ATACTCGAGCTTGGCCTTATAATAATGGG	63,9
p22vhs_SacII_f	AATACCGCGGTGCGACGCCGGCGGGTCTGGAGCGCT	80,9
p22dhs_SacII_f	AATACCGCGGTGCCCAGCAGAAAGAGTCCATCCAGG	75,2
p22vhs_SalI_r	CATAGTCGACCCCTAGCTCTTCTCGTGTTTTGCCTATTTTTTG	72,2
p22vhs_NcoI_r	CATGCCATGGCCCCCTAGCTCTTCTCGTGTTTTGCCTATTTTT	74,2
p22vhs_SalI_r	ATTGTGACCCCTAGCTCTTCTCGTGTTTTGCCTATTTTTGGG	73,3
p22vhs_SacII_f	ATTAAACCGCGGTGCGACGCCGGCGGGT	73,9
p22dhs_SacII_f	GTCTCCGCGGTGCCCAGCAGAAAGAGTCCAT	73,5
p22_1155_SalI_r	ATTGTGACCTGAGTTGAAGTGGGTGGAGCTGACG	73,0
D2_XBAECO_F_ATG	AAATCTAGATGAATTCATGGCGACGCCGGCGGGT	71,9
DBP2-C NcoI_FOR	ACGTACCCATGGCCCAGCAGAAAGAGTCCATCCAGGCC	77,0
DBP2-N SalI_REV	AAAAGTCGACAGCTCCACCCACTTCAAC	66,6
DBP2-V EcoRI_REV	CGCGAATTCTTACCCTAGCTCTTCTCGTGTTTTGCC	71,7
DBP2-V Esp3I_FOR	ACGTACCGTCTCCCATGGCGACGCCGGCGGGTCTGGAG	81,3
DBP2-V KpnI_REV	ACGTACGGTACCTTACCCTAGCTCTTCTCGTGTTTTGCC	73,7
DBP2-V SacII_FOR	AAAACCGCGGACGCCGGCGGGTCTGGAG	75,4
DBP2-V-EcoRI_FOR	GAATTTCGCGACGCCGGCGGGTCTGGAGCGCTGGGTTCAG	81,0
DBP2-V-NotI+Strep_R	GCGGCCGCTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCATCCAATTCCCCCT AGCTCTTCTCGTGTTTT	81,4
P2_NOT_R	TGCGGCCGCCCTAGCTCTTCTCGTGTTTTGCCTATTTTTTTGGGCATT	77,6
MU_DBP2_SE	ATGCTAAGAAAATGCCAAAATAGGCAAAACACGAGAAGAGC	70,4
MU_DBP2_ANSE	GCTCTTCTCGTGTTTTGCCTATTTTGGGCATTTTCTTAGCAT	70,4

Sequenzierprimer hPRP2		Tm [°C]
p22vhs_110_f	AGCCAGCTCGGGCAGCA	60,0
p22vhs_220_f	GGGACAAGGATCGGACTC	58,2
p22vhs_330_f	ACCACATGCCCAAGGAAA	53,7
p22vhs_550_f	TGGTGGATGAGGCACACG	58,2
p22vhs_660_f	TCCAGGATCCCTGCCGC	60,0
p22vhs_770_f	ATACCGCCTGGGCCTATC	58,2
p22vhs_880_f	CTGTCAACAACTCCATCT	51,4
P22_0002_FOR	AAAACCGCGGACGCCGGCGGGTCTGGAG	75,4
P22_1155_REV	AAAAGTCCAGAGCTCCACCCACTTCAAC	66,6
SP_D2_255r	CAGCAGGGCCCCGGGCCTC	67,4

Vektorprimer		T _m [°C]
pETM11_for	AGAGGATCGAGATCTCGAT	54,5
pETM11_rev	GGATATAGTTCCTCCTTTC	52,4
pETM_rev	TCAGCGGTGGCAGCAGCCAACTCA	67,8
VP_M30_f	AAAACGTATTGAAGCTATCCCACAAATT	59,3
pPR-IBA1_f	TAATACGACTCACTATAGGGA	54,0
pPR-IBA1_r	CTAGTTATTGCTCAGCGGTG	57,3
pQETS1_f	TGGTTATTGTGCTGTCTCATCAT	57,1
pQETS1_r	GATCGATCTCAGTGGTATTTGTG	58,9
pQETriSys2_f	CAATCAAAGGAGATATAACC	50,2
pQETriSys2_r	GGTGCTCGAGATCCTCGG	60,5
pGEX_f	GCTGGCAAGCCACGTTTGGT	61,4
pGEX_r	CGTCTCCGGGAGCTGCATGT	63,5

2.1.8 Vektoren

pPR-IBA1	IBA, Göttingen
pASK-IBA3	IBA, Göttingen
pGEX-6P1	GE Healthcare, München
pET-21a	Novagen, Darmstadt
pET-22b	Novagen, Darmstadt
pET-MZZ	EMBL, Heidelberg
pET-M11	EMBL, Heidelberg
pET-M30	EMBL, Heidelberg
pQE-TriSystem1	Qiagen, Hilden
pEG(KT)	Grabowski <i>et al.</i> , 1997
pYX	Novagen (Ingenius), Darmstadt

2.1.9 Kristallisationsscreens

Crystal Screen I / II / Lite / Cryo / PEG/ION

Hampton Research, USA

Footprint Screens 1-3

Stura *et al.*, 1992

JB Screens 1-10

Jena Bioscience, Jena

Magic Screens 1-4

Biogenova, Kanada

Structure Screens 1-3

Molecular Dimensions, UK

Additive Screens 1-4

Hampton Research, USA

The Classics/The Cryos/The PEGs/pHclear/The
AmSO₄/The Anions/The Cations/MPD/Opti-
Salts/PACT/JCSG+/MbClass

Qiagen (Nextal), Hilden

2.1.10 Computersoftware

AUTOMAR

Marresearch, Norderstedt

AUTOSHARP

Globalphasing (Vonrhein *et al.*, 2007)

BUSTER/TNT

Globalphasing (Bricogne, 1993)

CCP4 Package

Collaborative Computational Project

(ARP/wARP, REFMAC5)

Number 4, 1994

ClustalW

EMBL-EBI (Pearson *et al.*, 1988)

COOT

Emsley *et al.*, 2004

ESPrpt 2.2

Gouet *et al.*, 1999

ExPASy Proteomics Server

SIB, Schweiz (<http://expasy.org/>)

HKL2000 - Denzo/Scalepack

HKL Research, USA

HKL2MAP

Pape *et al.*, 2004

Mar-Imaging Software am *DESY*, *BESSY*

Marresearch, Norderstedt

ProCheck

Laskowski *et al.*, 1993

PSIPRED

Jones, 1999 (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)

PYMOL 0.99

DeLano Scientific, USA

SMART

Schultz *et al.*, 1998 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)

SOLVE / RESOLVE

Los Alamos National Laboratory, USA
(Terwilliger, 2000)

SWISSMODEL

SIB, Schweiz (Peitsch, 1996;
<http://swissmodel.expasy.org/>)

XPEP, *X2SAD*, *SADABS*

Sheldrick *et al.*, 1997

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mittels der PCR können Gensequenzen zielgerichtet amplifiziert werden, indem spezifische Oligonukleotide (Primer) eingesetzt werden, welche komplementär zu jenen Sequenzen der Matrizen-DNA sind, welche die zu amplifizierende Gensequenz flankieren (Mullis *et al.*, 1986). Dadurch wird das PCR-Produkt sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende in seiner Länge durch die Anlagerungsposition der Primer an die Matrizen-DNA begrenzt. Im Folgenden werden die allgemeinen Reaktionsbedingungen für eine typische PCR aufgeführt:

Reaktionszyklus	Temperatur	Dauer	
1. Initiale Denaturierung	94 °C bis 96 °C *	5'	
2. Denaturierung	94 °C bis 96 °C *	10-30'' *	30-45 Zyklen (2.-4.)
3. Primer-Anlagerung	Tm-5 °C bis Tm / 15-30'' *	15-30'' *	
4. Elongation	68 °C bis 72 °C *	30''/ kb bis 2'/ kb *	
5. Terminale Elongation	68 °C bis 72 °C *	10'	
6. Stop	8 °C	∞	

*Die Zeit- und Temperaturoptima variieren je nach verwendeter Polymerase. Die entsprechenden Optima sind im Folgenden aufgeführt:

Polymerase	Quellorganismus	Zeit- und Temperaturoptima		
		Denaturierung	Primer-Anlagerung	Elongation
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	94 °C/30''	Tm – 5 °C/30''	1'/1kb
Pfu Turbo	<i>Pyrococcus furiosus</i>	94 °C/30''	Tm – 5 °C/30''	2'/1kb
Phusion	<i>Pyrococcus furiosus</i>	96 °C/10''	Tm/15''	30''/1kb

Ein standardisierter PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

5 µl	10x PCR-Puffer
je 200 µM	dNTPs
10 pmol	<i>forward</i> -Primer
10 pmol	<i>reverse</i> -Primer
10-100 ng	Matrizen-DNA
1-2 U	DNA-Polymerase
ad 50 µl	ddH ₂ O

Für die Reinigung von PCR-Produkten wurden die Kit-Systeme *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) oder *Nucleospin Extract* (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Dabei wurde nach den Angaben des jeweiligen Herstellers verfahren.

2.2.1.2 DNA-Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von DNA wird nach den Angaben des Herstellers der Restriktionsendonukleasen (Fermentas, St. Leon-Roth) durchgeführt. Die Inkubationszeit beträgt 1h und die Reaktion wird entweder durch Hitzeschock bei 95 °C für 10' oder durch Auftrennung der Reaktionsprodukte in einem Agarosegel (2.2.1.3) gestoppt.

2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Laufpuffer (1x TAE)	Probenpuffer 6x
40 mM Tris	0,5 % (w/v) Bromphenolblau
20 mM Essigsäure	0,5 % (w/v) Xylencyanol FF
1 mM EDTA pH 8,0	60 % Glycerin

Es werden ausschließlich Gele mit einem Agaroseanteil von 1 % (w/v) verwendet. Die aufzutrennenden Nukleinsäureproben werden mit Probenpuffer versetzt und anschließend bei einer konstanten Spannung von 8-12 V/cm Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgt eine 30-minütigen Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromid-Färbebad (0,1 %). Schließlich wird die DNA im UV-Durchlicht bei 280 nm oder 365 nm (bei folgender Gelelution) detektiert. Die Archivierung erfolgt über ein Geldokumentationsgerät (*GelDoc*, BioRad, München). Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden die Kit-Systeme *Nucleospin Extract* (Macherey-Nagel, Düren) oder *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Dabei wurde nach den Angaben des jeweiligen Herstellers verfahren.

2.2.1.4 DNA-Ligation

Restringierte doppelsträngige DNA mit überhängenden Enden kann mit linearisierter Plasmid-DNA, welche mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut worden ist, ligiert werden. Die Ligation erfolgt mit T4-DNA-Ligase nach den Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Roth) unter Zusatz von 1 mM ATP bei 4 °C über Nacht. Dabei wird ein 3-5-facher molarer Überschuss des zu inserierenden DNA-Fragments in Relation zum restringierten Plasmid eingesetzt.

2.2.1.5 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgt mit Kit-Systemen (Qiagen, Hilden) durch alkalische Lyse von Bakterienzellen (XL1-Blue), welche mit dem gewünschten Plasmid transformiert worden sind (2.2.2.2) und anschließende Reinigung der Plasmid-DNA über Silica-Säulchen. In Abhängigkeit von der zu präparierenden DNA-Menge werden 5 ml (Mini), 50 ml (Midi) oder 250 ml (Maxi) LB-Medium (2.2.2.1) mit einem Selektionsantibiotikum versetzt, mit dem transformierten Bakterienstamm inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgt nach den Angaben des Herstellers und die DNA wird schließlich in 50 - 250 µl 100 mM Tris pH 8 aufgenommen.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Medien für die Aufzucht von *E.coli*

LB-Agar	LB-Medium	2YT-Medium	10x PBS
5 g Trypton	10 g Trypton	16 g Trypton	1,36 M NaCl
2,5 g Hefeextrakt	5 g Hefeextrakt	10 g Hefeextrakt	26,8 mM KCl
5 g NaCl	10 g NaCl	5 g NaCl	100 mM Na ₂ HPO ₄
7,5 g Agar-Agar ad 500 ml dH ₂ O	ad 1 l dH ₂ O	ad 1 l dH ₂ O	17,6 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4

Komponenten für ZYM-5052 (autoinduzierendes Medium) – nach Studier, 2005

1 x ZY (autoklaviert)					1	l
1	%	N-Z-Amin (Trypton)		w/v	10	g
0,5	%	Hefeextrakt		w/v	5	g
50 x M (autoklaviert)					M (g/mol)	1 l
1,25	M	K ₂ HPO ₄		174,18	217,725	g
1,25	M	NaH ₂ PO ₄	x H ₂ O	137,99	172,488	g
2,5	M	NH ₄ Cl		53,49	133,725	g
0,25	M	Na ₂ SO ₄	x 10 H ₂ O	322,19	80,548	g
50 x 5052 (autoklaviert)					1	l
25	%	Glycerin (100%)		v/v	250	ml
2,5	%	Glucose		w/v	25	g
10	%	α-Lactose		w/v	100	g

5000 x Spurenelementelösung (steril filtriert)				M ($\frac{g}{mol}$)	0,1 l
50 mM	FeCl ₃	x 6 H ₂ O		270,32	1351,60 mg
20 mM	CaCl ₂	x 2 H ₂ O		147,02	294,04 mg
10 mM	MnCl ₂	x 4 H ₂ O		197,91	197,91 mg
10 mM	ZnSO ₄	x 7 H ₂ O		287,54	287,54 mg
2 mM	CoCl ₂	x 6 H ₂ O		237,93	47,59 mg
2 mM	CuCl ₂	x 2 H ₂ O		170,48	34,10 mg
2 mM	NiSO ₄	x 6 H ₂ O		262,86	52,57 mg
2 mM	Na ₂ MoO ₄	x 2 H ₂ O		241,95	48,39 mg
2 mM	Na ₂ SeO ₃			172,94	34,59 mg
2 mM	H ₃ BO ₃			61,83	12,37 mg
1000 x Mg²⁺ (autoklaviert)				M ($\frac{g}{mol}$)	1 l
2 M	MgSO ₄	x 7 H ₂ O		246,48	492,96 g

LB-Agar-Platten werden benutzt, um *E.coli*-Stämme für einen Zeitraum von etwa 3 Monaten aufzubewahren. Die Flüssigmedien werden entweder zur Plasmidpräparation (LB-Medium) oder zur Proteinexpression (ZYM-5052, LB-Medium, 2YT-Medium) verwendet. Zur Selektion auf plasmidvermittelte Antibiotikaresistenzen können alle Medien mit entsprechenden Antibiotika versetzt werden. Die Komponenten des ZYM-5052-Mediums müssen stets frisch und in steriler Umgebung auf ein Zielvolumen von je 300 ml verdünnt werden. PBS wird zum Waschen von Bakterienzellen nach der Zellernte verwendet.

2.2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Stämme

TFB1	TFB2
30 mM Kaliumacetat pH 7,0	10 mM NaMOPS
50 mM MnCl ₂	75 mM CaCl ₂
10 mM CaCl ₂	10 mM RbCl
100 mM RbCl	15 % (v/v) Glycerin
15 % (v/v) Glycerin	pH 6,5 mit NaOH einstellen
pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen	

Eine Kolonie des *E.coli*-Stammes, welcher chemisch kompetent für eine Transformation gemacht werden soll, wird in 5 ml LB-Medium überimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur wird anschließend in 495 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen. Die Ernte der Zellen erfolgt durch Zentrifugation (3000 x g, 4 °C, 10'). Nach dem Resuspendieren des Pellets in 150 ml eiskaltem TFB1-Puffer werden die Zellen für 5' auf Eis inkubiert.

Nach einer weiteren Zentrifugation (3000 x g, 4 °C, 10') werden die Zellen in 5 ml eiskaltem TFB2-Puffer vorsichtig resuspendiert, aliquotiert und zügig in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die kompetenten Zellen können nun bei -80 °C gelagert werden.

2.2.2.2 Transformation chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

Zur Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente XL-1 blue *E.coli*-Zellen wird ein 50 µl-Aliquot des entsprechenden Stammes auf Eis unter Zugabe von 10-100 ng Plasmid-DNA oder eines kompletten Ligationsansatzes aufgetaut und 20' auf Eis inkubiert. Nun werden die Zellen einem Hitzeschock bei 42 °C für 60'' ausgesetzt und anschließend 2' auf Eis abgekühlt. Schließlich werden 450 µl LB-Medium (2.2.2.1) zugesetzt und der Transformationsansatz für 30' bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 100 µl des Transformationsansatzes (entsprechend 2 - 20 ng Plasmid-DNA) werden auf einer Agarplatte mit dem nötigen Selektionsantibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.2.3 Induktion der Proteinexpression in *E.coli*

Alle verwendeten Vektoren enthalten ein *lac*-Operon, welches die spezifische Induktion der Expression des Zielgens über das Lactose-Analogon Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) oder α-Lactose ermöglicht.

Für die Autoinduktion der Proteinexpression werden die mit dem entsprechenden Vektor transformierte *E.coli*-Expressionszellen in eine 3 ml-LB-Vorkultur überführt und das zur Selektion notwendige Antibiotikum wird zugegeben (Ampicillin). Nach der Schüttelinkubation der Zellen für 12 - 16 h bei 37 °C wird die Vorkultur auf 300 ml Gesamtvolumen des ZYM-5052-Mediums verdünnt. Das vergleichsweise geringe Volumen in den 2L-Erlmeyerkolben (300 ml sind etabliert) bewirkt in Verbindung mit einer hohen Schüttelrate eine optimale Durchlüftung der Zellkultur und stimuliert so das Zellwachstum. Die Zellen werden bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wird die Temperatur auf 18 °C reduziert und die Zellen 15 - 30 h unter Schütteln inkubiert. Nachdem die Glucose im Medium verbraucht ist (bei OD₆₀₀ 6 - 8), verstoffwechselt *E.coli* anschließend die Lactose. Durch diesen verstärkten Lactoseimport wird der Repressor von *lac*-Operon gelöst und das Zielgen wird exprimiert. Nach der Inkubation und dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 10 - 20 werden die Zellen durch Zentrifugation (4800 x g, 4 °C, 20') geerntet. Sie werden anschließend mit einem Schaber aus dem Zentrifugenbecher entnommen, in Lysepuffer resuspendiert (2 ml Puffer pro g Zellen) und direkt aufgeschlossen.

Bei einer IPTG-induzierten Expression wird die Vorkultur mit 800 ml LB- oder 2YT-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 - 0,3 angezogen. Anschließend werden die Zellen in einem auf 16 - 20 °C vorgekühlten Inkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 - 0,8 inkubiert.

Durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration 100 - 500 μM wird die Expression des Zielgens induziert. Nach 15 - 18 h Schüttelinkubation werden die Zellen geerntet. Die pelletierten Zellen werden in 1x PBS gewaschen, erneut durch Zentrifugation (4800 x g, 4 °C, 20') sedimentiert. Die Bakterienpellets werden anschließend immer frisch verarbeitet.

2.2.2.4 Zellaufschluss

Frische Bakterienpellets werden als Vorbereitung für den Zellaufschluss in 20-50 ml Lysepuffer resuspendiert, der mit 2M LiCl versetzt wurde, um RNA-Interaktionen aufzubrechen. Dieser Puffer richtet sich in seiner Zusammensetzung in der Regel nach dem Puffer des ersten Reinigungsschrittes. Zusätzlich enthält er noch Proteaseinhibitoren, und zwar entweder ½ Tablette Protease Inhibitor Cocktail „*Edta free*“ (Roche Diagnostics, München) oder 500 μl einer

Proteaseinhibitorlösung folgender Zusammensetzung pro 10 g Zellen:

Komponente A	Komponente B
10 mM PMSF in ddH ₂ O	80 μM Aprotinin
	2 mM Leupeptin
	1 mM Pepstatin A
	in DMSO
fertige Proteaseinhibitorlösung	
Komponente A	125 μl
Komponente B	400 μl

Nach dem Resuspendieren werden die Zellen in einem pneumatischen Zelldesintegrator (*Fluidizer* 110S, Microfluidics, USA) unter Kühlung und hohem Druck (80 psi) mit 5 Zyklen aufgeschlossen und die Zelltrümmer sowie unlösliche Bestandteile des Zelllysats durch Zentrifugation entfernt (30000 x g, 4 °C, 40'). Der klare Überstand wird nun dem ersten Reinigungsschritt zugeführt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Affinitätschromatographie über Strep-Tactin-Sepharose

Strep A	Strep B
50 mM Tris/HCl pH 7-9	Strep A
200 – 300 mM NaCl	2-5 mM D-Desthiobiotin
2 mM DTT	
2 mM EDTA	

Affinitätssäulen mit gebundenen Streptavidin oder Strep-Tactin werden zur Reinigung von Proteinen mit einer *Strep-Tag*-Affinitätssequenz (WSHPQFEK) verwendet. Das Säulenmaterial ist in einem speziellen Regenerationspuffer, bestehend aus 100 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl und 1 mM HABA (2-[4'-Hydroxy-Benzenazo]Benzoessäure), gelagert. Dieser Puffer muss vor der Benutzung durch Strep A ersetzt werden. Das Zielprotein mit Strep-Markierung wird hochspezifisch gebunden. Proteine ohne diese Affinitätssequenz werden von der Säule gewaschen. Nach dem Laden der Probe wird die Säule mit 5 Volumina Puffer gespült und das gebundene Zielprotein bei einer Flussgeschwindigkeit (Äkta Prime) von 0,2 ml/min mit dem Elutionspuffer Strep B konzentriert eluiert. Das enthaltene D-Desthiobiotin bindet an Strep-Tactin und verdrängt so den *Strep-Tag* des Zielproteins. Dieses System funktioniert ausschließlich bei pH-Werten von über 7. Es darf kein Biotin verwendet werden, da es kovalent am Strep-Tactin bindet. Nach jeder Nutzung wird die Säule mit Regenerationspuffer gewaschen und bei 4 °C gelagert. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Strep-Tactin-Säulen (IBA, Göttingen) verwendet.

2.2.3.2 Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose

GSH A	GSH B
50 mM Tris/HCl pH 7 – 9	GSH A
100 – 300 mM NaCl	+ 25 mM reduziertes Glutathion
2 mM DTT	
2 mM EDTA	

Zielproteine, die N-terminal mit einer Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert sind, können über eine Säule mit kovalent gebundenem Glutathion (GSH) gereinigt werden. Nach der Äquilibration der 30 ml GSH-Sepharose-Säule XK 16/20 (GE Healthcare, München), wird die Probe darüber geleitet. Das GST-Fusionsprotein wird spezifisch immobilisiert und kann nach dem Waschen mit mindestens 3 Säulenvolumina Ladepuffer GSH A in konzentrierter Form mit 25 mM reduziertem Glutathion im Elutionspuffer GSH B von der Säule eluiert werden. Die Säule wird danach mit 6 M Guanidinium-Hydrochlorid gewaschen und in 20 % EtOH gelagert.

2.2.3.3 Proteolytische Spaltung von GST-Fusionsproteinen mit *PreScission* Protease

Die Vektorserie pGEX-6P codiert für GST-Fusionsproteine, die eine spezifische Erkennungssequenz für die *PreScission* Protease besitzen. Diese Sequenz wird von der Protease erkannt und gespalten. Dabei wird die GST-Komponente des Fusionsproteins vom Zielprotein entfernt. Die Stoffmenge der hierfür benötigten *PreScission* Protease beträgt etwa 1 % der Stoffmenge des zu verdauenden GST-Fusionsproteins. Der proteolytische Verdau wird über Nacht bei 4°C auf einem Rollenmischer inkubiert.

2.2.3.4 Größenausschlusschromatographie

Gelfiltrationspuffer 1

10 mM Tris/HCl pH 7,5-8,5

100 - 150 mM NaCl

2 mM DTT

2 mM EDTA

Bei der Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration) werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt.

Für die analytische Gelfiltration werden, je nach zu trennender Molekülgröße, Superdex 75 10/300 GL Säulen und Superdex 200 10/300 GL Säulen verwendet. Hierfür werden 100 - 500 µl Probe aufgetragen und im Gelfiltrationspuffer aufgetrennt.

Für die präparative Gelfiltration werden Superdex 75 XK 26/60 und Superdex 200 XK 26/60 Säulen verwendet. Es können bis zu 7 ml Probe aufgetragen werden. Die Wahl des Puffers ist abhängig vom pI des Proteins (1 pH Einheit Unterschied). Das Konzentrieren der Proteinlösung vor der Gelfiltration wird mit Vivaspin Konzentratoren (Sartorius, Göttingen) durchgeführt. Die Ausschlussgröße der Membranen, angegeben als Molekulargewicht, wird dabei so gewählt, dass sie unter der Hälfte des Molekulargewichts des zu konzentrierenden Proteins liegt. Nach der Gelfiltration werden die Präparate auf eine Konzentration von 5 - 25 mg/ml eingeeengt und direkt weiterverarbeitet. Eine kurzzeitige Lagerung (max. 5 Tage) bei 4 °C ist möglich.

2.2.3.5 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel 15%	Sammelgel 5 %
15 % Acrylamid / 0,4 % Bisacrylamid	5 % Acrylamid / 0,13 % Bisacrylamid
375 mM Tris/HCl pH 8,8	125 mM Tris/HCl pH 6,8
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
0,03 % (v/v) TEMED	0,03 % (v/v) TEMED
Laufpuffer	2x SDS-Probenpuffer
192 mM Glycin	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8
25 mM Tris/HCl pH 8,3	70 mM SDS
0,1 % (w/v) SDS	50 % (v/v) Glycerin
	0,1 % (w/v) Bromphenolblau
	5 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Färbelösung

10 % (v/v) Ethanol
 5 % (v/v) Essigsäure
 0.003 % (w/v) Coomassie G/R 250 in EtOH

Die SDS-PAGE wird mit ein Gelelektrophoresesystem der Firma Hoefer/GE Healthcare (München) durchgeführt. Die zu analysierenden Proben werden 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt, mit Ausnahme von Proben aus *E.coli*-Kulturen. Diese werden zunächst zentrifugiert (16.100 x g, 4 °C, 2') und das Zellpellet in 0.2 x OD₆₀₀ ml SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Auftrennung in der SDS-PAGE erfolgt bei 30 mA für 65'. Die Gele werden in 50 ml Färbelösung inkubiert und in H₂O entfärbt. Die Archivierung erfolgt über ein Geldokumentationssystem (BioRad, München).

2.2.4 Reinigungsprotokolle der verwendeten Proteine

Die etablierten Reinigungsprotokolle der hPrp22-Deletionsmutanten sind im Folgenden aufgeführt. Alle Aufreinigungen sind bei 4 °C durchzuführen, um die Stabilität der Proteine zu gewährleisten und Degradationserscheinungen zu verhindern. Auf die Auflistung der Protokolle anderer Fragmente und der Volllängenproteine wird in diesem Rahmen verzichtet, da sie entweder noch in der Optimierungsphase sind oder keine verlässliche Reproduzierbarkeit zeigten.

2.2.4.1 hPrp22-H12 (AS 264-351) in pGEX-6P-1

Die IPTG-induzierte Expression von GST-hPrp22-H12 erfolgt in *E.coli* Rosetta 2 (DE3) mit 2YT-Medium und wird nach den angegebenen Methoden durchgeführt (2.2.2.1 - 2.2.2.3). Nach dem Zellaufschluss (2.2.2.4) in Lysepuffer (100 mM Tris/HCl pH 8, 2 M LiCl, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 2 mM EDTA) erfolgt eine GSH-Affinitätschromatographie (2.2.3.2). Die Fraktionen des Fluats werden vereinigt, an konzentriert und bei 4 °C 12 - 16 h proteolytisch verdaut (2.2.3.3). Es folgt eine Gelfiltration über eine Superdex 75 XK 26/60 Säule (2.2.3.4). Dabei kann beim Puffer auf jegliches Reduktionsmittel verzichtet werden (10 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl). Das fertige Präparat wird eingeeengt, direkt verarbeitet oder bei -80 °C gelagert.

2.2.4.2 hPrp22-H13 (AS 564-1183) in pPR-IBA1

Das Fragment hPrp22-H13 in pPR-IBA1 wird in *E.coli* BL21 (DE3) oder Rosetta (DE3) nach den angegebenen Protokollen autoinduktiv in ZYM-5052 exprimiert (2.2.2.1 - 2.2.2.3). Zudem wurde nach 20 h Inkubationszeit zusätzlich 500 µM IPTG zugeführt. Nach dem Zellaufschluss (2.2.2.4) in Lysepuffer (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 M LiCl, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 10% Glycerin) erfolgt eine Strep-Tactin-Affinitätschromatographie (2.2.3.1). H13 wird dann ankonzentriert und mittels Gelfiltration über eine Superdex 200 XK 26/60 Säule gereinigt (2.2.3.4 - 10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT). Das fertige Präparat wird eingeeengt, direkt verarbeitet oder kurzzeitig bei 4 °C gelagert.

2.2.4.3 hPrp22-H15 (AS 564-904) in pPR-IBA1

Die Expression und Reinigung von hPrp22-H15 verläuft analog zu hPrp22-H13 (2.2.4.2). Die Expression dieses Fragments in HMS174 (DE3) ist ebenfalls möglich. Auf Glycerin im Lysepuffer kann verzichtet werden und die Gelfiltration erfolgt über eine Superdex 75 XK 26/60. Die Probe muss frisch verarbeitet werden.

2.2.4.4 hPrp22-H20 (AS 950-1055) in pPR-IBA1

Diese Deletionsmutante von hPrp22 wird als *Strep-Tag*-Fusionsprotein in *E.coli* BL21 (DE3) nach den angegebenen Protokollen exprimiert (2.2.2.1 - 2.2.2.3) und nach dem Zellaufschluss (2.2.2.4 - 100 mM Tris/HCl pH 8,5, 2 M LiCl, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 2 mM EDTA) über eine Strep-Tactin-Sepharose-Säule (2.2.3.1) gereinigt. Danach folgt eine Gelfiltration über eine S75 XK 26/60 Säule (2.2.3.4 - 10 mM Tris pH 8,5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 2 mM EDTA). Das fertige Präparat wird eingeeengt, direkt verarbeitet oder kurzzeitig bei 4 °C gelagert. Das Protein ist relativ stabil, kristallisiert nach 3-tägiger Lagerung aber nur noch mäßig.

2.2.4.5 hPrp22-H20 (AS 950-1055) in pPR-IBA1 Selenomethionin-Derivat

Die Expression des hPrp22-H20 Selenomethionin-Derivats erfolgt im autoinduktiven PASM-5052-Medium (Studier, 1995). Es setzt sich wie folgt zusammen: 50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM KH_2PO_4 , 25 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM MgSO_4 , 0,5 % Glycerin, 0,05 % Glucose, 0,2 % Lactose, 0,2x Spurenelementlösung (2.2.2.1), 125 mg/l Selenomethionin, 100 nM Vitamin B12, 1 mg/l Thiamin, 0,5 mM CaCl_2 , je 200 mg/l Aminosäuren (kein C, Y oder M) und Ampicillin (steril filtrieren). Der verwendete methionin-auxotrophe *E.coli*-Expressionsstamm war B834 (DE3). Nach der Verdünnung der 3ml-LB-Vorkultur mit 300 ml frisch angesetzttem Medium folgt eine 24 stündige Schüttelinkubation bei 18 °C. Die Aufreinigung erfolgt analog zu 2.2.4.4, jedoch müssen stets 5 mM DTT zugegeben werden. Die Lagerzeiten müssen kurz gehalten werden, da das Protein schnell oxidiert.

2.2.5 Spektroskopische Methoden

2.2.5.1 Bestimmung nativer molarer Extinktionskoeffizienten

Der Extinktionskoeffizient nativer Proteine bei 280 nm (ϵ_{280}) wird nach Gill & von Hippel (Gill *et al.*, 1989) ausgehend vom Lambert-Beer'schen Gesetz errechnet:

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

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]
 c = Konzentration [M]
 d = Schichtdicke der Küvette

Der Extinktionskoeffizient eines denaturierten Proteins ($\epsilon_{280\text{denat}}$) lässt sich von der Aminosäuresequenz ableiten (Software DNASTar, Lasergene). Der native Extinktionskoeffizient lässt sich schließlich aus dem Vergleich der Absorption einer nativen und einer denaturierten Proteinprobe gleicher Konzentration (c) bei 280 nm (A_{280}) in einer Küvette gleicher Schichtdicke (d) bestimmen.

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

Dazu wird die Absorption zweier Proteinlösungen identischer Konzentration in je 20 mM Kaliumphosphat pH 6,5 bei 280 nm und 20 °C gemessen, wobei die eine Lösung natives Protein enthält, während die zweite Probe zuvor zusätzlich mit 6 M Guanidinium-Hydrochlorid versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert worden ist. Sie stellt die denaturierte Probe dar.

2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Nukleinsäuren

Die Konzentration von Proteinlösungen wird entweder mittels Bradford-Reagens oder durch den nativen Extinktionskoeffizienten bei 280 nm bestimmt.

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wird photometrisch bei 260 nm ermittelt. Ausgehend von einem gemittelten Absorptionskoeffizienten für dsDNA, entspricht bei 1 cm Lichtweg eine OD_{260} von 1 in etwa einer Konzentration von $50 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, während bei ssDNA eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von $33 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ entspricht.

2.2.5.3 Enzymgekoppelter ATPase-Test

Zum Nachweis der ATPase-Aktivität von hPrp22 und einigen seiner Deletionsmutanten wurde ein enzymgekoppelter photometrischer Test adaptiert (Porter, 1998). Dieser Enzymkinetik-Assay basiert auf der Abnahme der Absorption und somit auch der Konzentration von NADH bei 340 nm über die Zeit. Die Reaktionsabfolge ist in Abb.11 dargestellt. Die ATPase (hPrp22) hydrolysiert ATP zu ADP und Phosphat. In der Gegenreaktion phosphoryliert die Pyruvatkinase (PK) ADP zu ATP, indem sie ein Phosphat von Phosphoenolpyruvat auf ADP überträgt. ATPasen katalysieren die ATP-Hydrolyse sehr viel langsamer, als PK die Phosphorylierung katalysiert. Somit verläuft die Gegenreaktion schneller und die Substratkonzentration bleibt konstant, was eine gleichbleibende Reaktionsgeschwindigkeit zu Folge hat. In einem weiteren Reaktionsschritt wird das aus PEP entstandene Pyruvat durch die Lactat-Dehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert. Dabei wird NADH verbraucht und NAD gebildet. Die Reaktionsgeschwindigkeit entspricht der, der Phosphorylierung von ADP. PK und LDH haben eine Wechselzahl von ca. 600 s^{-1} . Die Konzentrationsabnahme von NADH kann bei 340 nm photometrisch bestimmt werden. Aufgrund der hohen Reaktionsgeschwindigkeiten der Hilfsreaktionen entspricht die Konzentrationsabnahme von NADH direkt der Konzentrationsabnahme von ATP bei der Hydrolyse durch die ATPase.

[Abb.11] Schema der Reaktionsabfolge des enzymgekoppelten ATPase-Tests.

Die Konzentration kann nun durch das Lambert-Beer'sche-Gesetz berechnet werden. Die Konzentration von NADH (c) ist direkt zur Extinktions- bzw. Absorptionsänderung (ΔE) und indirekt zum Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 34000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und der Schichtdicke der Küvette (d) proportional. Somit erhält man auch die ATP-Konzentration.

Lambert-Beer'sches-Gesetz:

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon d}$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit (v_0) lässt sich mittels der Michaelis-Menten-Gleichung berechnen. Sie ist direkt proportional zur maximalen Reaktionsgeschwindigkeit ($v_{\max}$) und der Substratkonzentration ($[S]$) und indirekt proportional zur Summe aus Substratkonzentration und der Michaelis-Menten-Konstante (K_m).

Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Da K_m und $v_{\max}$ unbekannt sind, werden beide Gleichungen kombiniert. auf diese Weise kann die Anfangsgeschwindigkeit berechnet werden. Die Abnahme der Substratkonzentration gegen die Zeit ergibt die Reaktionsgeschwindigkeit.

$$v_0 = \frac{\Delta c}{\Delta t}$$

Durch die Linearisierungen der Michaelis-Menten-Gleichung mittels Auftragungen nach Lineweaver-Burk oder Eadie-Hofstee lassen sich dann K_m und $v_{\max}$ berechnen.

Zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante mussten verschiedene ATP-Konzentrationen verwendet werden (0,1 - 20 mM), da mit steigender Substratkonzentration auch die Reaktionsgeschwindigkeit asymptotisch anwächst (Annäherung an $v_{\max}$). MOPS/KOH-Puffer stabilisiert den pH-Wert bei 7,5. Für die Katalyse der ATP-Hydrolyse werden Magnesiumionen (MgCl_2) benötigt. Es wurde jedoch verglichen mit der Konzentration des ATPs nur die Hälfte eingesetzt, um die Autohydrolyse zu minimieren. Die Endkonzentration der getesteten Deletionsmutanten (hPrp22-H13, hPrp22-H15, hPrp22-H20) lag bei ca. 1 μM . Je 500 μl Reaktionsansatz wurden angesetzt. Das ATP wurde erst zum Schluss zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde dieser in UV-Kristallküvetten überführt und die Reaktion im Spektrophotometer bei 20 °C 1 - 2 h dokumentiert (3.6).

Substrat	M	Endkonzentration
MOPS/KOH pH 7,5	209,27 g/mol	200 mM
MgCl ₂	203,3 g/mol	0,1 - 10 mM
ATP	551,1 g/mol	0,1 - 20 mM
(ADP	427,2 g/mol	0,1 - 20 mM)
NADH	741,6 g/mol	0,4 mM
PEP	206,13 g/mol	2 mM
PK	166 U/mg	10 U/Ansatz
LDH	143 U/mg	10 U/Ansatz
H13	74215 Da	1,08 µM
H15	41962 Da	1,14 µM
H20	31166 Da	1,03 µM

2.2.6 Röntgenkristallographische Methoden

2.2.6.1 Proteinkristallisation

Die Proteine werden in *sitting drop* Kristallisationsschalen (Cryschem, Hampton Research, USA) mittels Dampfdiffusion kristallisiert. In das Reservoir werden 250 - 500 µl der Mutterlauge pipettiert. In die Kristallisationssenkung (*well*) werden 1-2 µl Proteinlösung mit einer Konzentration von 5-25 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ gegeben und 1:1 oder anderen Mischungsverhältnissen mit der Mutterlauge vermischt. Die Ansätze werden mit klarem Klebeband verschlossen und bei 4 oder 20 °C inkubiert.

2.2.6.2 Seeding-Experimente

Seeding kann eingesetzt werden, um das Wachstum und die Ordnung von Kristallen zu verbessern. Man unterscheidet zwischen *Makro-* und *Mikro seeding*. Beim *Makro seeding* werden kleine Einkristalle in Kristallisationsansätze überführt, die frisch präpariertes Protein enthalten. So soll die Wachstumsphase der Kristalle ausgedehnt werden, um größere Einkristalle zu züchten. In *Mikro seeding*-Experimenten werden zunächst Kristalle zerstört. Die resultierenden Kristallsplitter werden als Kristallisationskeime anschließend in frisch angesetzte Kristallisationsexperimente überführt. In dieser Arbeit wurde *Mikro seeding* erfolgreich eingesetzt, um die Kristalle von hPrp22-H20 verlässlich, in hoher Anzahl und schneller zu reproduzieren.

Einkristalle werden aus einer Kristallisationsbedingung entnommen, zerteilt und in 100 µl einer frischen Kristallisationsbedingung überführt. Diese Kristallsuspension wird kurz gevortext und

bei 200 x g zentrifugiert, um größere Partikel zu entfernen. Dann wird eine Verdünnungsreihe angesetzt (1:100, 1:200, 1:500). Die Keime werden nun in frisch präparierte Kristallisationsansätze überführt, welche zuvor 1 h vorinkubiert worden sind. Dies kann entweder durch Zugabe von 0.2 µl unterschiedlich verdünnter *Seedsuspension* in die Kristallisationsbedingungen geschehen (klassisches *Mikroseeding*), oder durch Überführung einzelner Kristallisationskeime in die frischen Kristallisationsexperimente mittels eines Katzenschnurrhaares (Wohlis Hauskater Pedro, 2003). Dabei spricht man von *Streak-Seeding*. Die Anlagerung von Molekülen an einen bereits gebildeten Kristall wird, im Gegensatz zur Kristallneubildung, thermodynamisch begünstigt. Das Wachstum der bestehenden Kristallisationskeime wird bevorzugt, während die Kristallneubildung unterdrückt wird.

2.2.6.3 Kryo-Kristallographie

Der Kryopuffer, in dem ein Kristall für die Kryo-Kristallographie inkubiert wird, hat einen großen Einfluss auf das Beugungsverhalten des Kristalls. Durch den Kryopuffer wird die Bildung von Eiskristallen bei 100 K verhindert. Eiskristalle können das Beugungsverhalten der Proteinkristalle beeinflussen oder sie gar zerstören. Weiterhin zeigen sich auf den Röntgenaufnahmen Eisringe, die die Datenauswertung erschweren. Reflexe unter und neben den Eisringen können nicht ausgewertet werden und reduzieren die Vollständigkeit der Daten in diesem Auflösungsbereich. In der Regel werden Kristalle mit einer kleinen Nylonschleife aus der Kristallisationsbedingung entnommen und kurz im Kryopuffer inkubiert. Anschließend werden sie für die Messung im 100 K kalten N₂-Strom auf dem Goniometerkopf montiert. Auch der Kryopuffer kann das Beugungsverhalten negativ beeinflussen, so dass eine schrittweise Erhöhung der Konzentration des Kryoprotektans erforderlich ist. Die Kristalle von hPrp22-H20 wurden nach der Entnahme aus der Kristallisationsbedingung für 1' in einer Lösung aus 1,5 M (NH₄)SO₄ und 25 % Glycerin inkubiert und dann direkt gemessen. Der Kryopuffer kann auch verwendet werden um Schweratome für die Phasenbestimmung in den Kristall einzubringen. Für die Phasierung von hPrp22-H20 wurde ein Kryopuffer mit 1 M KBr, 1,5 M (NH₄)SO₄ und 25 % Glycerin eingesetzt.

2.2.6.4 Datensammlung

Bei der Datensammlung werden die Kristalle auf einem Goniometerkopf im Schnittpunkt des Röntgenstrahls mit der Rotationsachse des Goniometers montiert. Ein nativer Datensatz eines Kristalls von hPrp22-H20 wurde am Strahlrohr der BW7B am Deutschen Elektronensynchrotron (DESY) in Hamburg bei einer Wellenlänge von 0,8423 Å aufgenommen. Der Abstand zum mar345-Detektor betrug 20 cm und der Kristall wurde um 91° bei 1° Rotation und 8" Belichtungszeit pro Bild gedreht. Ein Selenomethionin-Kristall wurde am Strahlrohr BL14.2 des Berliner Elektronensynchrotrons (BESSY) gemessen. Da ein MAD-Experiment durchgeführt

wurde, mussten vier Wellenlängen gemessen werden (0,97976 Å, 0,9799 Å, 1,0 Å, 0,95 Å). Der Kristall-Detektor Abstand betrug 28 cm und die Belichtungszeit war 6". Der Kristall wurde bei allen Wellenlängen beginnend mit dem gleichen Startwinkel um 100° bei 1° Rotation pro Bild gedreht. Zur Indizierung, Integration und Datenreduktion wurden das Programm HKL2000 verwendet. Die Raumgruppe wurde mit *XPREP* (Sheldrick *et al.*, 1997) bestimmt.

2.2.6.5 Phasenbestimmung und Kalkulation der Elektronendichteverteilung

Durchstrahlt Röntgenlicht einen Protein-Einkristall, so tritt aufgrund der Wechselwirkung der elektromagnetischen Strahlung mit der Elektronenhülle der Atome Beugung auf. Diese Beugung der Röntgenstrahlung wird durch konstruktive Interferenz zwischen den Teilstreuwellen benachbarter, um eine Translationsperiode verschobener Atome im Kristall verstärkt und kann als Lichtpunkt (*Spot*) detektiert werden. Für jeden Reflex gilt dabei die Bragg'sche Gleichung: $n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta$, wobei d_{hkl} der Abstand zwischen den reflektierenden imaginären Netzebenen, beschrieben durch die Miller Indizes hkl , λ die Wellenlänge des eingestrahnten Röntgenlichts, n die Beugungsordnung und θ der Reflexionswinkel ist. Die Lage jedes einzelnen Reflexes ist durch Amplitude und Phase charakterisiert und wird durch den als Strukturfaktor bezeichneten Wellenvektor $F_{hkl} = |F_{hkl}|e^{i\alpha(hkl)}$ beschrieben. F stellt die Amplitude ($F=|F|$) und α die Phase der gebeugten Röntgenwelle dar. Um aus den gemessenen Beugungsdaten eine Elektronendichteverteilung zu berechnen, wird eine Fourier-Transformation angewandt, welche die experimentellen Beugungsdaten im reziproken Raum mit der Elektronendichte im Realraum verbindet.

$$\rho(xyz) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l \vec{F}_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Für Strukturfaktoren $\vec{F}_{hkl}$ gilt:

$$\vec{F}_{hkl} = |F_{hkl}|e^{i\varphi(hkl)}.$$

Daraus wird ersichtlich, dass die Kenntnis der Phasen $\varphi(hkl)$ für die Berechnung der Elektronendichte zwingend notwendig ist:

$$\rho(xyz) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{-2\pi i(hx+ky+lz) + i\varphi(hkl)}$$

Mit den verfügbaren Röntgendetektoren lassen sich die Lage und Intensität der einzelnen Beugungsreflexe bestimmen. Diese sind zum Betrag des Strukturfaktors zum Quadrat proportional ($I(hkl) \sim |F_{hkl}|^2$). Die Phaseninformation jedoch geht verloren. Es gibt verschiedene Strategien zur Lösung dieses Phasenproblems. Es gibt direkte Methoden, die Patterson-Methode, molekularer Ersatz mittels eines Modells (MR), einfacher (SIR) oder multipler (MIR) isomorpher

Ersatz und die Messung der anomalen Dispersion bei einer einzelnen (SAD) oder mehreren Wellenlängen (MAD). Dabei kann die Messung der anomalen Dispersion als ein Spezialfall des isomorphen Ersatzes aufgefasst werden. Wird bei den Methoden des isomorphen Ersatzes zusätzlich das anomale Signal eines Schweratoms bei einer einzelnen Wellenlänge zur Bestimmung der Position dieses Schweratoms verwendet, so wird diese Methode als einfacher bzw. multipler isomorpher Ersatz mit anomaler Streuung (SIRAS/MIRAS) bezeichnet. Zur Bestimmung der Phaseninformation der Struktur von hPrp22-H20 wurden SAD (mit KBr) und MAD (SeMet) verwendet. Direkte Methoden kamen auf Grund der Größe des Proteins nicht in Frage. Es konnte auch kein Modell für den molekularen Ersatz gefunden werden. Isomorpher Ersatz konnte auch nicht verwendet werden, da die derivatisierten und nativen Kristalle nicht isomorph waren.

Trägt man den atomaren Röntgen-Absorptionskoeffizient eines Elements gegen die Wellenlänge der Röntgenstrahlung graphisch auf, erhält man eine Kurve mit einem oder mehreren scharfen Maxima. Im Wellenlängenbereich dieser Absorptionskanten wird das Phänomen der anomalen Streuung beobachtet. Ein Teil der Energie des Röntgenstrahls wird durch die Schwermetallatome absorbiert und mit einer anderen Phase wieder emittiert. Die Konsequenz daraus ist, dass das Friedel-Gesetz nicht mehr gilt. Die Intensitäten (I) der inversionssymmetrischen Reflexe hkl und $-h -k -l$ sind nicht mehr gleich. Aufgrund dieses Unterschieds haben die Friedel-Paare bei anomaler Streuung nicht mehr die gleiche Intensität und auch nicht mehr die genau entgegengesetzten Phasen. Durch diese Unterschiede zwischen den Friedel-Paaren kann die Phaseninformation gewonnen werden. Datensätze mit Schweratomen müssen bei Wellenlängen gemessen werden, bei denen das anomale Streuverhalten am höchsten ist, um maximale Signalausbeute zu gewährleisten. Die für die potentiellen Derivate aufgenommenen Datensätze wurden zunächst auf die Anwesenheit eines anomalen Signals überprüft, indem sie anomal skaliert (ohne Mitteln der Friedel Paare) und dann in *HKL2MAP* (Pape *et al.*, 2004) prozessiert wurden. Diese Software verbindet verschiedene Programme der *SHELX*-Suite, von der Analyse skalierten Beugungsdaten (*SHELXC*), über Substrukturlösung (*SHELXD*) bis hin zur Phasierung (*SHELXE*) Jede einzelne Auflösungsschale wird bei der Analyse der Daten in *SHELXC* nach der Qualität des anomalen Signals bewertet, die als d''/σ (Verhältnis aus Stärke des anomalen Signals und dem Fehler der Daten) Wert dargestellt wird. Ist dieser Wert größer als 0,8, kann vom Vorhandensein eines Schweratoms ausgegangen werden. Weitere grafische Ausgaben dokumentieren anomale Korrelationskoeffizienten mit steigender Auflösung oder zeigen die Belegungswahrscheinlichkeiten der Schwermetallpositionen.

Zur genauen Bestimmung der Schweratompositionen wurde *AUTOSHARP* (Vonrhein *et al.*, 2007) genutzt. Es bildet eine Bedienoberfläche, die Programme zur Suche von Schweratomen (*SHELX*) (Schneider *et al.*, 2002), Verfeinerung ihrer Positionen (*SHARP*) (Bricogne *et al.*, 2003;

Fortelle *et al.*, 1997) und Optimierung des Solvensgehaltes () (Matthews, 1968, Abrahams *et al.*, 1996) kombiniert. Für die Phasierung mittels Br-SAD wurde ein Datensatz nahe der Absorptionskante von Brom (0,9202 Å) bei einer Wellenlänge von 0,91164 Å am Strahlrohr der BW7A am *DESY* in Hamburg aufgenommen. Des Weiteren wurde ein Selenomethionin-MAD-Experiment durchgeführt, bei dem 4 Wellenlängen gemessen wurden (peak 0,97976 Å, inflection 0,9799 Å, high remote 1,0 Å, low remote 0,95 Å). Bei diesen Wellenlängen ist der Beitrag des anomalen Signals unterschiedlich groß. Die Daten können so verglichen und die Qualität des Signals verbessert werden.

2.2.6.6 Modellbau und Verfeinerung der Struktur

Mit den experimentellen Elektronendichtekarten (SAD/MAD) aus *AUTOSHARP* (Vonrhein *et al.*, 2007) wurden die ersten Modelle generiert. Dazu wurde *RESOLVE* (Terwilliger, 2000) verwendet (Skript siehe Anhang). Basierend auf diesen Modellen wurde die Struktur von hPrp22-H20 in *COOT* (Emsley *et al.*, 2004) gebaut und mit dem *CCP4* Softwarepaket (*REFMAC5*) verfeinert. Die Qualität der Elektronendichtekarten ließ ein direktes Einsetzen der passenden Aminosäuren zu. Mit wachsender Kettenlänge verbesserten sich die Modellphasen und die Elektronendichte flexibler Regionen konnte verbessert werden. Während der Strukturverfeinerung werden sowohl die van-der-Waals-Abstände, polare und ionische Wechselwirkungen und Temperaturfaktoren der einzelnen Atome (B-Faktoren) berücksichtigt, als auch die beobachteten den berechneten Strukturfaktoren angeglichen.

Die Qualität der Angleichung wird durch Vergleich der beobachteten und der aus dem Modell berechneten Strukturfaktoramplituden abgeschätzt. Als Maß für die Übereinstimmung wird der R-Faktor verwendet. Der kristallographische R-Faktor R_{cryst} ist der aus diesem Vergleich berechnete Fehler und ist definiert als:

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

F_{obs} entspricht den beobachteten und F_{calc} den berechneten Strukturfaktoramplituden. Zur weiteren Kontrolle der Strukturverfeinerung wird der freie R-Faktor (R_{free}) herangezogen (Brünger, 1992), der sich auf dieselbe Weise wie R_{cryst} berechnet, jedoch von nicht in die Verfeinerung einbezogenen Reflexen (5 %) Gebrauch macht. Dieser sogenannte Testsatz wird zur Kreuzvalidierung eingesetzt, um die Konvergenz der Strukturverfeinerung zu kontrollieren. Darüber hinaus wird die verfeinerte Elektronendichtekarte mit der ursprünglichen Dichte, berechnet aus der Phaseninformation des molekularen Ersatzes verglichen und die resultierende $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte zum Abgleich während des Modellbaus verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung und Reinigung des hPrp2 Volllängenproteins

Zu Beginn dieser Arbeit wurden Plasmide mit dem Gen von hPrp2 verwendet, die aus der Plasmidsammlung der Abteilung von R. Lührmann am Max-Planck Institut für Biophysikalische Chemie entstammten. Es standen zwei Expressionsvektoren mit dem Volllängenprotein zur Verfügung, pETMZZ-hPrp2 und pETM10-hPrp2. Leider enthielten die Gene vier schwerwiegende Mutationen. Es wurde versucht die Mutationen mittels Mutagenese-PCR zu entfernen, jedoch gelang dies nicht, da die Mutationen zu zahlreich waren. Dennoch wurde versucht eine Expression- und Aufreinigungsstrategie zu etablieren. Die Expression des Proteins in *E.coli* war möglich, jedoch war die Löslichkeit sehr schlecht. Die Optimierung der Expression blieb erfolglos.

Um alle störenden Einflüsse durch die Mutationen zu entfernen, wurde das Gen aus einer humanen cDNA-Bank (*MegaMan*, Stratagene) neu kloniert. Dies gestaltete sich anfangs kompliziert, da das Gen eine Länge von 3123 bp hat. Nach langwieriger Optimierung der PCR-Bedingungen, gelang es schließlich das Gen zu amplifizieren (Abb.12) und in den Expressionsvektor pETM30 zu ligieren. Als Restriktionsschnittstellen dienten *NcoI* und *EcoRI*. Die Sequenzierung bestätigte die Fehlerfreiheit des Gens von hPrp2.

[Abb.12] 1%iges Agarosegel mit dem Amplifikat der PCRs von hPrp22 (3663 bp) und hPrp2 (3123 bp). Markerangaben (links) in bp.

Der verwendete Expressionsvektor codierte für ein GST-Fusionsprotein, welches durch eine TEV-Proteaseschnittstelle mit dem Zielprotein verbunden war. Dieses Fusionsprotein hatte eine Masse von ca. 150 kDa. Die Optimierung Expressionsbedingungen war kompliziert, da die Bakterienzellen kein reproduzierbares Wachstum zeigten. Bei jeder dritten Expression kam es nach der Induktion durch IPTG zu einer verfrühten Zelllyse der Rosetta 2 (DE3) Zellen. Dennoch wurde versucht das Protein über eine GSH-Sepharose zu reinigen. Nach der schwachen Induktion

der Expression von GST-hPrp2 (Abb.13a) folgte die Zelllyse im Puffer GSH A (2.2.3.2). Die Löslichkeit war sehr hoch. Nach dem gründlichem Waschen der GSH-Sepharose wurde das Fusionsprotein eluiert (Abb.13a). Jedoch zeigte sich ein hoher Grad an Kontamination durch Fremdproteine. Durch Zugabe von TEV-Protease wurde die GST-Komponente des Fusionsproteins entfernt (Abb.13a). Die Effizienz des Verdaus lag bei 70 - 80%. Anschließend folgte eine Größenausschlusschromatographie mit einer S 200 XK 26/60. Dabei eluierte das Protein nicht bei einem für ein 120 kDa erwartetem Volumen, sondern im Ausschlussvolumen der Säule. Offenbar haben sich oligomere Strukturen gebildet, die eine Masse oberhalb der maximalen Trenngröße der Säule haben. Auch waren immer noch Kontaminationen erkennbar.

[Abb.13] SDS-PAGE der Aufreinigung von GST-hPrp2. **a)** Induktion der Expression in Rosetta 2 (DE3): vI = vor Induktion, nI = nach Induktion. Löslichkeit: P = Pellet, Ü = Überstand. Elution des Fusionsproteins von der GSH-Sepharose. Proteaseverdau: TEV. GST-hPrp2: 150 kDa, hPrp2: 120 kDa (Pfeil), GST: 29 kDa **b)** Gelfiltration S200 XK 26/60, Fraktionen des Ausschlussmaximums. starke Kontaminationen bei 70 kDa Markerangaben (links) in kDa.

Durch Erhöhung der Salzkonzentration wurde versucht dieser unspezifischen Oligomerisierung entgegenzuwirken. Eine mehrfache Veränderung der Puffer und das Einsetzen von Ionenaustauschchromatographie (DEAE-/ CM-Sepharose) änderte an diesem Ergebnis nichts. Das Volllängenprotein hatte zudem eine geringe Stabilität, so dass es beim Ankonzentrieren auf der Membran des Zentrifugals präzipitierte. Die Ausbeuten waren am Ende so gering, dass eine Weiterverarbeitung unmöglich war. Aus 10 l Expressionskultur konnten 100 µg hPrp2 gewonnen werden. Das Gen wurde noch in pET-21a kloniert. Bei Reinigungstests zeigte sich jedoch, dass hPrp2-His₆ unlöslich war. Des Weiteren wurde versucht das Gen in *Saccharomyces cerevisiae* zu exprimieren. Dazu wurde hPrp2 in den pYX Hefevektor kloniert. Expression war jedoch nicht erkennbar. Nach diesen Ergebnissen wurde die Arbeit mit dem Volllängenprotein von hPrp2 eingestellt.

3.2 Klonierung und Reinigung des hPrp22 Volllängenproteins

Da das eigentliche Projekt dieser Arbeit die Strukturaufklärung von hPrp22 war, musste das Volllängenprotein kloniert werden. Das Gen wurde aus einer humanen cDNA-Bank (MegaMan, Stratagene) heraus mittels PCR amplifiziert (Abb.12). Wie die Klonierung von hPrp2 bedurfte es auch hier einer intensiven Optimierung, da das Gen eine Länge von 3663 bp hatte. Es gelang das PCR-Produkt mit den Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NotI* in pGEX-6P1 zu ligieren. Die Sequenzierung bestätigte die Fehlerfreiheit des Gens von hPrp22. Der gewählte Expressionsvektor codierte für ein GST-Fusionsprotein, welches über eine *PreScission* Proteaseschnittstelle mit dem Zielprotein verbunden war. Das Fusionsprotein hatte eine Masse von ca. 170 kDa. Die Expression wurde in *E.coli* Rosetta 2 (DE3) durchgeführt. Die Induktion und die Reinigung über GSH-Sepharose unter Standardbedingungen (2.2.3.2) funktionierten reibungslos. Die proteolytische Abspaltung des GST funktionierte mit einer Effizienz von 50 - 70 %. Bei der Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 200 XK 26/60 eluierte das Protein jedoch wie hPrp2 im Ausschlussvolumen. Eine Erhöhung der Salzkonzentration im Gelfiltrationspuffer auf 300 mM NaCl, Lyse in einem Puffer mit 2 M LiCl und Zugabe von 5% Glycerin verbesserte das Laufverhalten des Proteins. Ein Teil von hPrp22 konnte in einen monomeren Zustand überführt werden (Abb.14a). Um der unspezifischen Oligomerisierung auf den Grund zu gehen, wurde das SDS-Gel nach der Proteinfärbung einer weiteren Nukleinsäurefärbung mit Ethidiumbromid unterzogen. Dabei zeigte sich, dass die Proben des Ausschlussmaximums (280 nm) stark mit DNA oder RNA kontaminiert waren (Abb.14b).

[Abb.14] SDS-PAGE der Gelfiltration von hPrp22 nach der Proteolyse. **a)** Gelfiltration S200 XK 26/60, Fraktionen des Ausschlussmaximums und des 2. Maximums. GST-hPrp22: 170 kDa, hPrp22: 140 kDa (grüner Pfeil), GST: 29 kDa **b)** Die Ethidiumbromidfärbung des gleichen SDS-Gels zeigt die Nukleinsäurekontaminationen auf (roter Pfeil) Markerangaben (links) in kDa.

Da hPrp22 zahlreiche RNA-Bindungsmotive aufweist, bindet es offensichtlich an langkettigen bakteriellen Nukleinsäuren. Diese Vernetzung führt zur Bildung großer Komplexe. Eine Behandlung der Proben mit RNase und DNase oder leichtes Denaturieren des Proteins mit CHAPS führte nicht zur Auflösung dieser Komplexe.

Der monomere Anteil nach Gelfiltration zeigte eine gute Stabilität und konnte bis auf 5 mg/ml ankonzentriert werden. Aus 10 l Expressionskultur konnten bis zu 2 mg hPrp22 gewonnen werden. Trotz der immer noch erkennbaren Kontaminationen wurde versucht das Protein zu kristallisieren. Alle verfügbaren Kristallisationsbedingungen wurden genutzt, jedoch präzipitierte hPrp22 in 99 % aller Ansätze direkt nach dem Pipettieren. Auch eine Verringerung der Proteinkonzentration auf 1 mg/ml veränderte dieses Verhalten nicht.

Um die Reinheit des Proteins zu verbessern und so störende Einflüsse zu minimieren, wurde versucht die Kontaminationen mittels Ionenaustauschchromatographie (Resource S, Resource Q) zu entfernen. Dies gelang jedoch nicht. Des Weiteren wurde die Expression mit einer zweiten, C-terminalen *Strep-Tag*-Affinitätssequenz etabliert. Nach Affinitätschromatographie über Strep-Tactin-Sepharose und Gelfiltration zeigte sich ein ähnliches Bild. Protein mit Hexahistidin-Affinitätssequenz (pET-21a und pET-22b) war vollständig unlöslich. Weiterhin wurde versucht hPrp22 in *Saccharomyces cerevisiae* zu exprimieren. Das Gen wurde in die Hefevektoren pYX und pEG(KT) (Grabowski *et al.*, 1997) kloniert. Wie auch bei hPrp2 war eine Induktion der Expression nicht detektierbar. Der Versuch einer Expression in Insektenzellen wurde begonnen, indem hPrp22 in den pQE-TriSystem1-Vektor, ein Hybridvektor für Bakterien-, Insekten- und Säugerzellen, kloniert wurde. Jedoch funktionierte die Generierung des Bacmids nicht und die Insektenzellen konnten nicht transfiziert werden. Nachdem keine weitere Optimierung erfolgreich war, wurde die weitere Arbeit mit dem Volllängenprotein von hPrp22 eingestellt.

3.3 Design und Klonierung von Deletionsmutanten von hPrp22 und hPrp2

Da die Kristallisation der Volllängenproteine nicht möglich war, lag es nah verkürzte Varianten zu generieren. Basis der Überlegungen des Designs der Deletionsmutanten war der modulare Domänenaufbau der Proteine. Fragmente, die eine oder mehrere der vorhergesagten Domänen enthalten wurden kreiert (Abb.14/15). Dabei wurden die Grenzen der Proteinfragmente mit Hilfe der Domänenvorhersage von SMART (Schultz *et al.*, 1998) bestimmt. Durch eine Sekundärstrukturvorhersage mit PSIPRED (Jones, 1999) wurde sichergestellt, dass keine Sekundärstrukturmotive (α -Helix, β -Faltblatt) unterbrochen wurden. Alle Deletionsmutanten beginnen vor und enden nach einer vorhergesagten α -Helix.

[Abb.15] Deletionsmutanten von hPrp22. Die vorhergesagten Domänen sind eingefärbt: orange: S1-Domäne, grün: DEXDc-Domäne, gelb: HelicC-Domäne, blau: HA2-Domäne, rot: DUF1605-Domäne. Oben: Vollständigkeitsprotein.

[Abb.16] Deletionsmutanten von hPrp2. Die vorhergesagten Domänen sind eingefärbt: grün: DEXDc-Domäne, gelb: HelicC-Domäne, blau: HA2-Domäne, rot: DUF1605-Domäne. Oben: Vollständigkeitsprotein.

Von hPrp22 wurden 22 verkürzte Varianten generiert (Abb.15). Sie wurden über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Xho*I in die Expressionsvektoren pET-21a, pGEX-6P1 und pPR-IBA1 ligiert. Weiterhin wurden 15 Fragmente von hPrp2 entworfen (Abb.16), die über *Eco*RI und *Xho*I in pET-21a, pGEX-6P1 und pPR-IBA1 inkloniert wurden. Die Sequenzen, Längen, Massen und isoelektrischen Punkte aller Deletionsmutanten sind im Anhang aufgelistet. Weiterhin sind dort die Polylinker der gewählten Vektoren abgebildet.

Die Amplifikation der Deletionsmutanten von hPrp22 und hPrp2 wurde mit einem einzigen PCR-Programm durchgeführt. Mit *Phusion* Polymerase konnten alle Fragmente beim ersten Versuch amplifiziert werden (Abb.17).

[Abb.17] 1%iges Agarosegel mit den PCR-Produkten aller Verkürzungen von hPrp22 (H1-H22) und hPrp2 (D1-D15) Markerangaben (links) in kb.

Die Deletionsmutanten von hPrp22, im Folgenden H1 - H22 benannt (nach HRH1), und hPrp2, D1 - D15 (nach DBP2), wurden in die Expressionsvektoren pET-21a, pGEX-6P1 (von Marion Lösing) und pPR-IBA1 (von Christian Nagel) ligiert. Insgesamt wurden 111 Vektorkonstrukte geschaffen.

Bei den anschließenden Expressions- und Löslichkeitstests wurde sich daher auf einige ausgewählte Konstrukte beschränkt. Neben den anschließend aufgeführten Reinigungen der Deletionsmutanten H12, H13, H15 und H20, konnten auch noch weitere Verkürzungen gewonnen werden, auf deren Dokumentation im Rahmen dieser Arbeit jedoch verzichtet wird. Es ließ sich keines der Fragmente von hPrp2 mit zufriedenstellender Reinheit und Stabilität gewinnen.

3.4 Reinigung und Kristallisation einiger Verkürzungen von hPrp22

3.4.1 Reinigung und Kristallisation der hPrp22-Deletionsmutante H12

S1

Die Deletionsmutante H12 enthielt die S1-Domäne von hPrp22 (AS 264 - 351). Das Fragment hatte eine Länge von 88 Aminosäuren, war 9,9 kDa schwer und hatte einem theoretischen isoelektrischen Punkt von 9,58. Es wurde als GST-Fusionsprotein (pGEX-6P1) exprimiert und gereinigt (2.2.4.1). Das Molekulargewicht des Fusionsproteins betrug 37,6 kDa und der pI lag bei 6,73.

Die Aufreinigung bei pH 8 resultierte in hoher Reinheit und großer Ausbeute des Proteins. Das Fusionsprotein eluierte mit geringen Kontaminationen von der GSH-Sepharose (Abb.18a). Der anschließende *PreScission* Proteaseverdau (PP) über 8 h hatte eine Effizienz von 80 - 100 %. Bei der Größenausschlusschromatographie mittels Superdex 75 XK 26/60 konnte man zwei scharfe Maxima in der UV-Absorption beobachten. Das hochreine H12 eluierte im zweiten Maximum bei ca. 240 ml. Bei einer Aufreinigung nach autoinduktiver Genexpression wurden 0,5 g H12 aus 1 l Expressionskultur gewonnen. Das Protein konnte bis auf 50 mg/ml ankonzentriert werden.

[Abb.18] SDS-PAGE der Aufreinigung von H12. **a)** Induktion der Expression in Rosetta 2 (DE3): vI = vor Induktion, nI = nach Induktion. Löslichkeit: P = Pellet, Ü = Überstand. D = Durchfluss, Elution des Fusionsproteins von der GSH-Sepharose. Proteaseverdau: 8h PP. GST-H12: 38 kDa, H12: 10 kDa, GST: 29 kDa. **b)** Gelfiltration S75 XK 26/60, Fraktionen des 1. und 2. UV-Maximums. Markerangaben (links) in kDa.

Nach der Reinigung wurde versucht H12 zu kristallisieren. Alle verfügbaren Kristallisationsbedingungen wurden pipettiert. Dabei wurden Proteinkonzentrationen von 7 - 25 mg/ml eingesetzt und die Kristallisationsbedingungen bei Temperaturen von 4 und 20 °C inkubiert. In einigen Kristallisationsbedingungen (Tab.3) zeigten sich nach kurzer Zeit kristalline Strukturen (Abb.19a).

Kristallisationsscreen	Zusammensetzung
Crystal Screen I #38	1,4 M NaCitrat, 0,1 M HEPES pH 7,5
Crystal Screen II #17	0,1 M NaCitrat pH 5,6, 35 % Butanol
Crystal Screen II #28	1,6 M NaCitrat pH 6,5
Footprint I #24	1,5 M NaCitrat, 10 mM Borat pH 8,5
JB 6 #19	0,1 M NaCitrat pH 5,6, 2,4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
JB 10 #13	1,5 M NaCitrat pH 6,5

[Tab.3] Initiale Kristallisationsbedingungen von H12

Die Optimierung der Kristallisationsbedingung führte zu ovalen Kristallen von 50 - 150 μM Größe (Abb.19b). Dabei wurde die NaCitrat-Konzentration auf 1,28 - 1,36 M, der pH Wert auf 6,5 - 6,8 und die Proteinkonzentration auf 15 mg/ml eingestellt. Die Bedingungen wurden bei 10 und 20 °C inkubiert. Die Optimierung der initialen Kristallisationsbedingungen Crystal Screen II #17 und JB 6 #19 führte zu keiner Verbesserung des Kristallwachstums.

[Abb.19] Proteinkristalle von H12. a) Sphärolithe in initialer Kristallisationsbedingung JB 10 #13 [1,5 M NaCitrat pH 6,5]. b) Optimierung des Kristallwachstums [1,3 M NaCitrat pH 6,5]. 100 μm Durchmesser.

Bei Beugungsexperimenten am Röntgendiffraktometer *Micromax 007* zeigte sich jedoch, dass die Proteinkristalle nicht streuten. Ihre innere Ordnung war so heterogen, dass es zu keiner ausreichenden konstruktiven Interferenz zwischen den Teilstruwellen der Röntgenstrahlung kam. Auf dem Detektor bildeten sich keine *Spots* ab. Eine weitere Optimierung des Kristallwachstums durch Modifikation der Kristallisationsbedingung und *Seeding*-Experimente (2.2.6.2) führte zu keiner Verbesserung des Streuverhaltens.

3.4.2 Reinigung der hPrp22-Deletionsmutante H13

Die Deletionsmutante H13 enthielt die für die ATPase- und Helikasefunktion notwendigen Domänen DEXDC und HELICc und die beiden vorhergesagten C-terminalen Domänen HA2 und DUF1605 von hPrp22 (AS 564 - 1183). Das Fragment hatte eine Länge von 620 Aminosäuren, war 70,2 kDa schwer und hatte einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 6,27. Es wurde als *Strep-Tag*-Fusionsprotein (pPR-IBA1) exprimiert und gereinigt (2.2.4.2). Das Molekulargewicht des Proteins mit *Strep-Tag*-Affinitätssequenz betrug 74,2 kDa und der pI lag bei 5,94. Diese Deletionsmutante von hPrp22 wurde im autoinduzierenden ZYM-5052-Medium exprimiert, da sowohl die Löslichkeit, als auch die Ausbeute pro Liter gegenüber IPTG-induzierter Expression im 2YT-Medium 20-fach höher war. Zusätzliche Induktion mit IPTG nach 12 - 18 h Inkubation erhöhte die Ausbeute nochmals. Das Protein wurde bei pH 7,5 aufgereinigt. Es war zwingend notwendig dem Lysepuffer 2 M LiCl zuzugeben, da das Protein andernfalls vollständig im Ausschlussvolumen der Superdex 200 XK 26/60 Gelfiltrationssäule eluierte und starke Kontaminationen durch RNA aufwies. Bei der Größenausschlusschromatographie (S200 XK 26/60) eluierte das Protein bei 185 ml (niedriges UV-Absorptionsmaximum). Das Protein ließ sich als Monomer von hoher Reinheit gewinnen (Abb.20). Die Ausbeute pro Liter Expressionskultur betrug 2 - 5 mg. Die Deletionsmutante H13 konnte bis auf 15 mg/ml ankonzentriert werden.

[Abb.20] SDS-PAGE. Reinheit von H13-Strep nach der Gelfiltration S200 XK 26/60, Fraktionen des UV-Maximums bei 185 ml. H13-Strep: 74 kDa. Markerangaben (links) in kDa.

Für die Kristallisation von H13 wurden alle verfügbaren Kristallisationsscreens verwendet. Dabei wurden das Protein in Konzentrationen von 5 - 10 mg/ml eingesetzt und bei 4 °C und 20 °C gelagert. In den meisten der Bedingungen präzipitierte H13 direkt nach der Zugabe. Trotz intensiver Bemühungen, konnte keine Bildung kristallähnlicher Strukturen der Deletionsmutante H13 beobachtet werden. Mit dem Protein, das nicht für die Kristallisation benötigt wurde, konnten ATPase-Test durchgeführt werden (3.6).

3.4.3 Reinigung der hPrp22-Deletionsmutante H15

Im Vergleich zu H13 enthielt die Deletionsmutante H15 ausschließlich die für die ATPase- und Helikasefunktion notwendigen Domänen DEXDC und HELICc. Sie hatte eine Länge von 341 Aminosäuren, war 38 kDa schwer und ihr theoretischer isoelektrischer Punkt lag bei 5,43. Das Proteinfragment wurde ebenfalls als *Strep-Tag*-Fusionsprotein (pPR-IBA1) exprimiert und gereinigt (2.2.4.3). Das Molekulargewicht des Proteins mit *Strep-Tag*-Affinitätssequenz betrug 42 kDa und der pI lag bei 5,25. Die Deletionsmutante H15 wurde analog zu H13 exprimiert und aufgereinigt. Wiederum war 2 M LiCl im Lysepuffer essentiell, um Oligomerisierung zu verhindern. Bei der Größenausschlusschromatographie eluierte das Protein mit einem UV-Absorptionsmaximum bei 160 ml (Monomer). Es gab aber auch ein UV-Maximum im Ausschlussvolumen der verwendeten S75 XK 26/60, bei dem ca. 30 % der Gesamtmenge von H15 eluierte (Oligomer). Neben geringfügigen Kontaminationen von ca. 18 kDa Masse war das Protein rein (Abb.21) und konnte für die Kristallisation verwendet werden. Die Ausbeute pro Liter Expressionskultur betrug 1 - 3 mg.

[Abb.21] SDS-PAGE der Gelfiltration (S75 XK 26/60) von H15-Strep. Fraktionen des 1. UV-Maximums kontaminiert durch Fremdproteine (oligomere Strukturen). Fraktionen des 2. UV-Maximums mit monomerem H15-Strep und leichten Kontaminationen bei 18 kDa. H15-Strep: 42 kDa. Markerangaben (links) in kDa.

Das Protein konnte bis auf 10 mg/ml ankonzentriert werden und wurde in allen verfügbaren Kristallisationsscreens verarbeitet. Dabei wurden eine Proteinkonzentration von 5 - 7 mg/ml eingesetzt und die Bedingungen wurden bei 4 °C und 20 °C inkubiert. Es kam jedoch nicht zu einer Kristallisation der Deletionsmutante H15. Nach erfolgloser Kristallisation wurde das Protein für ATPase-Tests verwendet (3.6).

3.4.4 Reinigung und Kristallisation der hPrp22-Deletionsmutante H20

Die letzte hier aufgeführte Deletionsmutante H20 beinhaltete die beiden vorhergesagten C-terminalen Domänen HA2 und DUF1605 von hPrp22 (AS 950-1183). Dieses Proteinfragment war von besonderem Interesse, da weder Struktur, noch Funktion der Domänen bekannt waren. Diese Verkürzung von hPrp22 hatte eine Länge von 234 Aminosäuren, war 27,2 kDa schwer und hatte einem theoretischen isoelektrischen Punkt von 8,93. Es wurde als *Strep-Tag*-Fusionsprotein (pPR-IBA1) in einer nativen und Selenomethionin-derivatisierten Form exprimiert und gereinigt (2.2.4.4, 2.2.4.5). Das Molekulargewicht des Proteins mit *Strep-Tag*-Affinitätssequenz betrug 31,2 kDa und der theoretische pI lag bei 7,68. Die Expression der nativen Variante von H20 erfolgte analog zu der von H13. Das Selenomethionin-Derivat von H20 wurde wie unter 2.4.4.5 beschrieben gewonnen. Die Löslichkeit von H20 lag trotz Optimierung bei nur 30 % (Abb.22a). LiCl im Lysepuffer verhinderte wiederum unspezifische Zusammenlagerungen des Proteins, was sich an dem geringen Kontaminationsgrad durch Fremdproteine bei der Elution von der Strep-Tactin-Säule zeigte (Abb.22a). Bei der Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 75 XK 26/60 eluierte mit einem UV-Maximum bei 170 ml. Das Laufverhalten und die Reinheit (Abb.22b) beider Varianten von H20 waren identisch. Pro Liter Expressionskultur konnten bis zu 5 mg reines Protein gewonnen werden.

[Abb.22] SDS-PAGE der Aufreinigung von H20-Strep. **a)** Löslichkeit ca. 30 %: P = Pellet, Ü = Überstand. E = Elution des Proteins von der Strep-Tactin-Sephrose. **b)** Gelfiltration S75 XK 26/60, Fraktionen des UV-Maximums bei 170 ml. H20-Strep: 31 kDa. Markerangaben in kDa.

Das Protein wurde auf 7 mg/ml ankonzentriert und in allen verfügbaren Kristallisationsscreens verarbeitet. Die Kristallisationsbedingungen wurden bei 4 °C und 20 °C gelagert.

Nach 2-3 Tagen waren in einigen Kristallisationsbedingungen (Tab.3) linsenförmige Kristalle erkennbar (Abb.23a).

Kristallisationsscreen	Zusammensetzung
Crystal Screen I #39	2 % PEG 400, 2M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M HEPES pH 7,5
JB 6 #10	1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,2 M NaCl, 0,1 M HEPES pH 7,5
JB 6 #16	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,5
Magic Screen #62	2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,2 M Li ₂ SO ₄ , 0,1 M CAPS pH 10,5

[Tab.4] Initiale Kristallisationsbedingungen von H20

[Abb.23] Proteinkristalle von H20. **a)** linsenförmige Kristalle in initialer Kristallisationsbedingung Crystal Screen I #39 [2 % PEG 400, 2M (NH₄)₂SO₄, 0,1 M HEPES pH 7,5]. **b)** Optimierung des Kristallwachstums [1,7 M (NH₄)₂SO₄, Tris/HCl pH 8,5, 20 °C].

Die Optimierung der Kristallisationsbedingung führte zu Kristallen mit einer Größe von bis 400 µm Durchmesser. Die optimierten Puffer- und Salzkonzentrationen sind in Tab.5 aufgelistet. *Mikroseeding* führte zu zahllosen halblinsenförmigen Kristallen von 50 µm Größe. Die Selenomethionin-Variante (SeMet) von H20 kristallisierte unter identischen Bedingungen.

4 °C	20 °C
1,4 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 7,5	1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 7,5
1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 8	1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 8
1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,5	1,7 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 8,5
1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 9	1,7 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 M Tris/HCl pH 9

[Tab.5] Optimierte Kristallisationsbedingungen von H20 in Abhängigkeit von der Temperatur

Beugungsexperimente am Röntgendiffraktometer *RU-H3R* zeigten, dass die Kristalle bis 3 Å streuten. Durch Messungen der Kristalle am *DESY* in Hamburg wurden Datensätze mit einer Auflösung von 2 Å aufgenommen. Dabei streuten die Kristalle, die bei 4 °C gewachsen am weitesten. Die SeMet-Kristalle wurden am *BESSY* in Berlin gemessen. Aus den gewonnenen Daten konnte die Kristallstruktur der C-terminalen Domäne (CTD) von hPrp22 gelöst.

3.5 Strukturelle Charakterisierung des C-Terminus von hPrp22 (H20)

3.5.1 Datenaufnahme und -prozessierung

Von Kristallen der Deletionsmutante H20 von hPrp22 (3.4.4) wurden mehrere native Datensätze am Deutschen Elektronensynchrotron (*DESY*, Hamburg) bei 100 K aufgenommen. Die maximale Auflösung betrug 2,03 Å (h20nat, Tab.6). Nach Indizierung, Integration und Skalierung der gemessenen Reflexe mit *HKL2000* (*DENZO/SCALEPACK*) konnten die Kristalle der Raumgruppe P4₂2 zugeordnet werden. Diese Symmetrie ist definiert durch eine vierzählige und zwei darauf senkrecht stehenden zweizähligen Achsen. Auf das Vorliegen einer höher-symmetrischen Raumgruppe (als P4₂2) konnte durch die systematische Abwesenheit jedes vierten Reflexes auf der l-Achse und jedes zweiten Reflexes auf der h-Achse im reziproken Gitter geschlossen werden. Mit *XPREP* (Sheldrick et al., 1997) konnten die möglichen Raumgruppen auf P4₃2₁2 oder P4₁2₁2 eingegrenzt werden. Jedoch war allein durch native Daten nicht erkennbar, ob es sich um eine links- oder rechtsgängige Schraubenachse handelt.

Da kein Homologiemodell zur Phasenbestimmung mittels Molekularen Ersatzes (MR) verfügbar war, mussten die Phasen *de novo* ermittelt werden. Dazu wurden in KBr-Lösung inkubierte Kristalle (2.2.6.3) gemessen, um mittels des anomalen Streuverhaltens der Bromidionen Informationen über die Phasen zu erhalten (SAD). Die maximale Auflösung KBr-derivatisierter Kristalle lag bei 2,1 Å (h20br, Tab.6). Die Raumgruppe konnte bei der Phasierung mit *HKL2MAP* (Pape *et al.*, 2004) auf P4₁2₁2 (Nr. 92) festgelegt werden. Eine tetragonale Raumgruppe ist durch acht Symmetrieoperatoren definiert und die Einheitszelle setzt sich aus acht asymmetrischen Einheiten zusammen. Bei einem Molekül pro asymmetrischer Einheit ist die Einheitszelle aus acht Molekülen aufgebaut. Bei einem Molekulargewicht von 30 kDa ergab sich ein Lösungsmittelgehalt von ca. 45 %. Ein Molekül pro asymmetrischer Einheit, stellte die sinnvollste Lösung dar.

Eine weitere Methode der Phasenbestimmung kam bei der Strukturaufklärung von H20 zum Einsatz. Selenomethionin-derivatisierte Kristalle (2.2.4.5) wurden am Berliner Elektronensynchrotron bei vier definierten Wellenlängen gemessen (2.2.6.4, Tab.6, smh20##). Da Selenomethionin anstatt Methionin bei der Synthese des Proteins in *E.coli* eingebaut wurde, hatte man proteininterne Aminosäuremarker bekannter Position. Dies erleichtert den Einbau der Peptidkette. Des Weiteren war das Phasierungspotential höher, da H20 12 Methionine in seiner Aminosäuresequenz aufweist. Die Statistiken der Datenauswertungen der jeweils hochauflösendsten Kristalle sind in Tab.6 aufgelistet.

Datensatz	h20nat	h20br	smh20pk	smh20ip	smh20lr	smh20hr
Schweratom	---	KBr	SeMet	SeMet	SeMet	SeMet
Wellenlänge (Å)	0,8423	0,91164	0,97976	0,9799	1	0,95
Drehwinkel (°)	91	208	100	100	100	100
Detektor	mar345	mar165ccd	mar225ccd	mar225ccd	mar225ccd	mar225ccd
Detektorabstand (mm)	200	140	280	280	280	280
Auflösung	50 - 2,03 (2,1 - 2,03)	50 - 2,1 (2,18 - 2,1)	50 - 2,6 (2,69 - 2,6)	50 - 2,6 (2,69 - 2,6)	50 - 2,6 (2,69 - 2,6)	50 - 2,7 (2,8 - 2,7)
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2
Einheitszell- dimensionen (Å)	a = b = 78,67 c = 88,41	a = b = 78,88 c = 88,89	a = b = 79,05 c = 88,59	a = b = 79,10 c = 88,64	a = b = 79,10 c = 88,66	a = b = 79,15 c = 88,71
Winkel der Einheitszelle (°)	$\alpha = \beta = \gamma =$ 90	$\alpha = \beta = \gamma =$ 90	$\alpha = \beta = \gamma =$ 90	$\alpha = \beta = \gamma =$ 90	$\alpha = \beta = \gamma =$ 90	$\alpha = \beta = \gamma =$ 90
Beobachtete Reflexe (einzigartige Reflexe)	315374 (18595)	557688 (31239)	180763 (8926)	177307 (8894)	168037 (8683)	184036 (7942)
Mosaizität (°)	0,50	0,28	0,97	0,96	0,96	0,93
R _{sym}	5,7 (59,9)	6,9 (55,7)	7,5 (50,2)	6,6 (51,6)	5,4 (47,2)	6,5 (48,5)
Signal/Rauschverhältnis (I/σ)	32,6 (3,3)	29,2 (4,1)	19,8 (3,5)	25,6 (3,5)	32,3 (3,5)	36,6 (4)
Redundanz (-fach)	7,2	9	7,5	7,6	7,5	7,7
Vollständigkeit der Reflexe (%)	99,9 (100)	99,7 (100)	97,7 (100)	97,1 (100)	94,8 (74,7)	96,6 (100)
Einheitszellvolumen [Å ³]	547232,4	552731,6	553624,1	554654,2	554689,4	555754,8
gemittelter B-Faktor (Å ²)	31,8	36,8	63,7	64	65,5	76,3
Moleküle pro asymmetrischer Einheit	1					

[Tab.6] Datensammlungsstatistik der jeweils hochauflösendsten Kristalle. h20nat = nativer Kristall, gemessen an der BW7B (*DESY*); h20br = KBr-derivatisierter Kristall, gemessen an der BW7A (*DESY*); smh20pk = SeMet-Kristall *peak* (*BESSY*); smh20ip = SeMet-Kristall *inflection point* (*BESSY*); smh20lr = SeMet-Kristall *low remote* (*BESSY*); smh20hr = SeMet-Kristall *high remote* (*BESSY*). (Werte in Klammern beziehen sich auf die äußere Auflösungsschale).

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

3.5.2 Bestimmung der Phasen durch SAD und MAD

Zur Bestimmung der Phasen mittels SAD und MAD wurde das Programm *AUTOSHARP* (Vonrhein *et al.*, 2007) genutzt. Es greift auf die SHELX-Programme zu, die aus den Differenzen der Friedel-Paare die Schweratompositionen und somit die Phasen berechnen können. Anschließend verfeinert *SHARP* (Bricogne *et al.*, 2003; Fortelle *et al.*, 1997) diese Positionen mehrfach. Ein nativer und ein bis vier anomale Datensätze wurden in das Programm geladen und durch zusätzliche Informationen über Wellenlängen, Schweratomtyp, Raumgruppe und Dimensionen der Einheitszelle ergänzt. Für die Phasierung durch Br-SAD wurden ein Datensatz nahe der Absorptionskante (*peak*) von Brom (h20br, 0,91164 Å) und ein nativer Datensatz (h20nat) verwendet. Der KBr-Datensatz wurde auf 180° beschnitten, um negative Effekte durch Strahlenschäden zu minimieren. Die wurden 13 Schwermetallatompositionen gefunden (Tab.7).

CRYST1 78.67 78.67 88.41 90.00 90.00 90.00 P41212

SCALE1 0.012711 0.000000 0.000000 0.000000

SCALE2 0.000000 0.012711 0.000000 0.000000

SCALE3 0.000000 0.000000 0.011311 0.000000

Atomtyp	x	y	z	Belegung der	
				Position	Temperaturfaktor B [Å ²]
1 Br	1.423	7.083	4.801	1.17	56.89
2 Br	-17.449	26.135	-14.353	0.64	252.99
3 Br	-21.538	25.882	4.473	0.46	80.66
4 Br	62.457	11.495	8.876	0.42	58.13
5 Br	26.201	68.567	6.781	0.35	48.74
6 Br	1.513	71.846	8.937	0.28	85.20
7 Br	17.816	20.982	5.066	0.31	68.17
8 Br	62.202	46.696	11.400	0.38	73.41
9 Br	18.804	9.241	3.992	0.23	60.85
10 Br	22.841	37.665	10.214	0.28	73.20
11 Br	47.564	34.812	9.513	0.21	78.71
12 Br	41.326	6.743	0.383	0.24	79.12
13 Br	4.437	26.504	6.153	0.24	82.68

[Tab.7] Brompositionen im Kristall. 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 ersten Spalte der Tabelle sind die identifizierten Schweratome benannt und durchnummeriert. In der zweiten bis vierten Spalte sind die Koordinaten dargestellt. Die folgenden Spalten fünf und sechs beschreiben die Belegung der Schwermetallposition und den B-Faktor.

Die Selenomethionin-MAD wurde mit vier Wellenlängen durchgeführt. Ein Datensatz des Absorptionsmaximums von SeMet (*peak* 0,97976 Å, smh20pk), einer des halbmaximalen Absorptionsmaximums (Wendepunkt, *inflection point* 0,9799 Å, smh20ip), zwei Datensätze, die bei höherer (*high remote* 1,0 Å, smh20hr) bzw. niedrigerer Wellenlänge gemessen wurden (*low*

remote 0,95 Å, smh20lr), und der native Datensatz h20nat wurden verwendet. Elf Schweratompositionen konnten verifiziert werden (Tab.8).

Die Auflösung der SeMet-Kristalle war limitiert auf 2,6 Å, konnte aber nach Kalkulation der initialen Phaseninformation auf die hochauflösenden Bereiche des nativen Datensatzes übertragen werden.

```
CRYST1      79.05  79.05  88.59  90.00  90.00  90.00  P41212
SCALE1      0.012650  0.000000  0.000000      0.00000
SCALE2      0.000000  0.012650  0.000000      0.00000
SCALE3      0.000000  0.000000  0.011288      0.00000
```

Atomtyp	Belegung der			Position	Temperaturfaktor B [Å ²]
	x	y	z		
1 Se	55.003	33.397	9.060	0.54	46.29
2 Se	52.717	29.347	1.922	0.46	41.28
3 Se	44.676	31.316	9.326	0.48	38.00
4 Se	57.735	18.019	-3.231	0.47	30.80
5 Se	72.318	67.692	8.701	0.44	52.41
6 Se	27.912	50.804	1.323	0.53	48.55
7 Se	42.496	23.066	0.844	0.37	50.71
8 Se	74.373	71.914	1.268	0.48	79.16
9 Se	47.865	19.221	5.286	0.38	51.05
10 Se	65.538	36.527	2.613	0.44	55.15
11 Se	43.738	35.221	1.200	0.47	86.33

[Tab.8] Selenpositionen im Kristall. 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 ersten Spalte der Tabelle sind die identifizierten Schweratome benannt und durchnummeriert. In der zweiten bis vierten Spalte sind die Koordinaten dargestellt. Die folgenden Spalten fünf und sechs beschreiben die Belegung der Schwermetallposition und den B-Faktor.

AUTOSHARP optimiert auch den Solvensgehalt, führt eine Dichtemodifikation durch (DM) und gibt eine Elektronendichtekarte ($2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$) aus. Der Solvensgehalt nach der Br-SAD lag bei 54,4 % und der nach der SeMet-MAD bei 36,2 %.

3.5.3 Modellbau, Strukturverfeinerung und Qualität des Modells

Das erste Modell wurde mittels automatischem Sequenzeinbaus erzeugt. Hierzu wurde *RESOLVE* (Terwilliger, 2000) genutzt (Skript siehe Anhang). In gut definierte Regionen der Elektronendichte baut das Programm die Aminosäuren gemäß der vorgegebenen Sequenz ein. Schlechter definierte Regionen versieht es mit Poly-Alanin Ketten. Des Weiteren wird ein freier R-Faktor erzeugt.

In der SAD-Elektronendichte konnten ca. 100 Reste (überwiegend Poly-Alanin) und in der MAD-Elektronendichte ca. 180 Reste (überwiegend sequenzspezifisch) platziert werden. Ausgehend von diesen partiellen Modellen konnte der Einbau weiterer Aminosäuren in die $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte der asymmetrischen Einheit, in welcher die beobachteten Strukturfaktoren zweifach in die Berechnung miteinbezogen wurden, erfolgen. Der Modellbau wurde in *COOT* (Emsley *et al.*, 2004) weitergeführt. Die erste Elektronendichtekarte war in einigen Bereichen schlecht definiert (Abb.24a, 25a). Durch sukzessive Verfeinerung in *REFMAC5* ließen sich diese Bereiche entscheidend verbessern und Aminosäureseitenketten zuzuordnen (Abb.24b, 25a).

[Abb.24] Vergleich der initialen und verfeinerten Elektronendichtekarte. **a)** Initiale Elektronendichte nach Annäherung der Phasen mit MAD. **b)** Elektronendichte nach der letzten Verfeinerung in *BUSTER/TNT*. Aminosäurereste orange, Elektronendichte (1σ) blau. (*COOT*).

[Abb.24] Vergleich eines Bereichs der initialen und verfeinerten Elektronendichtekarte am Beispiel von Tyrosin 26. **a)** Initiale Elektronendichte nach Annäherung der Phasen mit MAD. **b)** Elektronendichte nach der letzten Verfeinerung in *BUSTER/TNT*. Aminosäurereste orange, Elektronendichte (1σ) blau. (*COOT*).

Die Aminosäuresequenz konnte ohne Zuhilfenahme einer Sekundärstrukturvorhersage in die Elektronendichtekarte eingebaut werden. Bis auf lange Aminosäureseitenketten an der Oberfläche des Proteins konnten alle Reste der Deletionsmutante zugeordnet werden.

Bei allen Positions- und Temperaturfaktorverfeinerungen gegen die (nicht anomal skalierte) Elektronendichtekarte von h20br in *REFMAC5* wurde ein Gewichtungsfaktor (*weighting term*) von 0,05 eingestellt, um allzu große Verwindungen der Polypeptidkette zu verhindern. Das Modell wurde anhand der neu berechneten Elektronendichtekarten solange korrigiert, bis die R-Faktoren (R_{cryst} , R_{free}) sich nicht mehr verringern ließen. Anschließend wurden von *ARP/wARP* Wassermoleküle gebaut, die dann wiederum von Hand in *COOT* verfeinert wurden.

Sowohl bei der Verfeinerung des SAD-Modells, als auch bei der des MAD-Modells, die gegen dieselbe Elektronendichte (h20br) erfolgte, konvergierte R_{cryst} bei 27 % und R_{free} 33 %. Die Modelle aus SAD- und MAD-Phasierung waren weitestgehend identisch. Jedoch wurde nur das MAD-Modell verfeinert. Durch Beschneiden des Auflösungsbereichs auf 2,05 bis 13,6 Å (Markus Rudolph) und die Verfeinerung in *BUSTER/TNT* (Bricogne, 1993) konnte der kristallographische R-Faktor auf 19,8 % und der freie R-Faktor auf 25,8 % reduziert werden. Die Verfeinerungsstatistiken sind in Tab.9 aufgelistet. Nach der abschließenden Verfeinerung umfasste das Modell Aminosäurereste 950 - 1183 von hPrp22. Der Elektronendichte konnten 237 von 270 möglichen Resten zugeordnet werden. Von den 36 zusätzlichen Aminosäuren, die durch den Polylinker des Expressionsvektors codiert wurden, konnten nur zwei am N-Terminus und eine am C-Terminus lokalisiert werden. Die dem Vektor zugehörigen Reste waren weitgehend ungeordnet bzw. flexibel und deshalb nicht in Form von Elektronendichte sichtbar. Der mittlere Temperaturfaktor (B-Faktor) der C-terminalen Domäne von hPrp22 (CTD, H20) lag bei ca. 31 %.

Auflösungsbereich [Å]	13,6 - 2,05 (2,17 - 2,05)
R_{cryst} [%]	19,8
R_{free} [%]	25,8
Vollständigkeit der Daten (%)	98,7
Anzahl der Reflexe für die Verfeinerung	17870
Anzahl der Aminosäuren	237
Anzahl der Atome des Protein	1929
Anzahl der Wassermoleküle	287
Standardabweichung der Bindungslängen [Å]	0,009

Standardabweichung der Bindungswinkel [°]	1,114
B-Faktor Protein [$\text{\AA}^2$]	31

[Tab.9] Verfeinerungsstatistiken und stereochemische Parameter.

Anhand des Ramachandrandiagramms (Laskowski *et al.*, 1993; Ramachandran *et al.*, 1968) wurde nachgeprüft, ob alle Bindungswinkel im Molekül (ϕ/ψ -Winkel) in sterisch erlaubten Bereichen liegen (Abb.25). Bis auf Valin 249, dass zur translatierten *Xho*I-Restriktionsschnittstelle des pPR-IBA1-Vektors gehört, waren alle Aminosäuren in erlaubten Bereichen. Der Plot zeigt, dass 190 (88,4 %) der Aminosäurereste in favorisierten Regionen (rot) und 24 Reste in erlaubten Regionen liegen.

[Abb.24] Ramachandrandiagramm der C-terminalen Domäne von hPrp22. Rote und gelbe Bereiche: favorisierte und erlaubte ϕ/ψ -Konformationen, hellgelbe Bereiche: zusätzlich erlaubte Konformationen. 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).

3.5.4 Beschreibung der Struktur

Bei der Kristallstruktur der C-Terminus von hPrp22 (AS 950 - 1183) handelt es sich um eine einzelne globuläre Domäne, bestehend aus zehn α -Helices und sechs β -Strängen (Abb.25, 26a). Die β -Stränge bilden eine leicht verzerrte *OB-fold*-ähnliche Anordnung (*oligonucleotide binding*). Die β -Stränge 5 und 6 formen mit dem β -Strang 4 ein antiparalleles β -Faltblatt. Ferner formen die β -Stränge 1, 2 und 3 ein gebogenes, antiparalleles β -Faltblatt, welches um 90° zum anderen Faltblatt gedreht ist (Abb.26b). Die α -Helices liegen im unteren Teil des Proteins und bilden eine von den β -Strängen abgegrenzte Struktur. Ein Strukturvergleich mit der *Protein-Data-Bank* (www.rcsb.org/) durch *DALI* (www.ebi.ac.uk/dali/) führte zu keinen signifikanten Übereinstimmungen mit bekannten Faltungsmotiven.

[Abb.25] Struktur der hPrp22-CTD. Nummerierung der Sekundärstrukturmotive. α -Helix: blau, β -Faltblatt: gelb, Loop: grau. Cartoondarstellung. (PYMOL)

[Abb.26] Struktur der hPrp22-CTD. a) Frontansicht. b) Aufsicht auf gekreuzte β -Stränge (90° Drehung um x-Achse). Regenbogenansicht. blau = N-Terminus, rot = C-Terminus. Cartoondarstellung. (PYMOL)

3.6 Biochemische Untersuchungen der ATPase-Aktivität

Bei der biochemischen Untersuchung der ATPase-Aktivität mittels eines enzymatisch gekoppelten Assays, wurde die Abnahme der Extinktion von NADH bei 340 nm photometrisch aufgezeichnet (2.2.5.3). Es wurden Tests mit den Deletionsmutanten H13, H15 und H20 durchgeführt.

Die Deletionsmutante H20 zeigte, wie erwartet, keine ATPase-Aktivität, da sie nicht die dazu notwendigen Motive beinhaltet. Auch H15 zeigte keine signifikante ATPase-Aktivität, obwohl es über alle notwendigen Aminosäuren verfügt, um ATP zu hydrolysieren. H13 zeigte, nach einiger Optimierung der Reaktionsbedingungen, eine gute ATPase-Aktivität. Es konnten mehrere Messreihen mit ATP-Konzentrationen von 0 - 20 mM (0 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM) aufgezeichnet werden. Bei hohen ATP-Konzentrationen war der Abfall der Extinktion jedoch nicht linear und konnte auch nicht ausgewertet werden. Zwischen 0,1 und 2 mM war die Extinktionsabnahme gleichbleibend (Abb.27).

[Abb.27] Auftragung der Extinktionsabnahme (E) von NADH gegen die Zeit (t) eines ATPase-Tests von H13 bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen.

Anschließend wurden die gewonnenen Daten ausgewertet. Durch Umformung des Lambert-Beer'sches-Gesetzes und der Michaelis-Menten-Gleichung (2.2.5.3) konnte die Reaktionsgeschwindigkeit (v) berechnet werden.

$$c = \frac{\Delta E}{\epsilon d} \quad v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad v_0 = \frac{\Delta c}{\Delta t}$$

Der Anstieg der Extinktion (ΔE) wurde durch den Extinktionskoeffizienten (ϵ) geteilt und so die Konzentration des NADH bestimmt. Diese Substratkonzentration (c) wurde dann durch die Länge der Messzeit (Δt) geteilt, um die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (v_0) zu berechnen. Die jeweils eingesetzte ATP-Konzentration wurde gegen die Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen (Abb.28).

[Abb.28] Auftragung der ATP-Konzentration $[S]$ gegen die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (v_0). Asymptotische Annäherung der Reaktionsgeschwindigkeit an die max. Reaktionsgeschwindigkeit. Einheiten: $[S] = \mu\text{M}$, $v_0 = \mu\text{M}/\text{min}$.

Um die Reaktionskonstante (K_m) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) zu bestimmen, wurde die Michaelis-Menten-Gleichung nach Lineweaver-Burk doppelt-reziprok umgekehrt und linearisiert (Abb.29).

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{v_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{[S]}$$

[Abb.29] Doppelt reziproke Auftragung der ATP-Konzentration $[S]$ gegen die Anfangsreaktionsgeschwindigkeit (v_0). Schnittpunkt der Ordinate = $1/v_{\max}$, Schnittpunkt der Abszisse = $-1/K_m$. Einheiten: $[1/S] = \mu\text{M}$, $1/v_0 = \text{min}/\mu\text{M}$.

Die vorläufige Reaktionskonstante (K_m) der ATP-Hydrolyse von hPrp22-H13 beträgt **0,16 μM** .

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ($v_{\max}$) ist **0,65 $\mu\text{M}/\text{min}$** .

Diese Werte konnten bislang nicht durch weitere Messungen verifiziert werden.

Zwei Grundaussagen konnte dennoch getroffen werden. Das Enzym hydrolysiert ATP sehr langsam ($k_3 = 0,6 \text{ min}^{-1}$). Die Helikase-Domäne verliert durch die Abwesenheit des C-Terminus ihre ATPase-Aktivität.

4. Diskussion

4.1 Klonierung und Reinigung der Volllängenproteine und Deletionsmutanten von hPrp2 und hPrp22

Zu Beginn dieser Doktorarbeit sollte die strukturelle Untersuchung der DExD/H-Box RNA-Helikase hPrp22 im Vordergrund stehen. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu hPrp2 (Abb.30) wurde jedoch entschieden beide Proteine zu bearbeiten. Die Homologie ist in der Mitte und am C-Terminus der Proteine sehr hoch. In diesen Regionen befinden sich auch die vorhergesagten konservierten Domänen.

[Abb.30] Sequenzvergleich der DExD/H-Box Proteine hPrp2 und hPrp22 aus *Homo sapiens*. Die 7 Helikasemotive (1.5) sind blau umrandet und beschriftet. Identische Reste sind rot und konservierte Reste sind gelb unterlegt. (ClustalW; ESPrpt 2.2).

Im Rahmen dieser Doktorarbeit ist es leider nicht gelungen die Volllängenproteine von hPrp2 oder hPrp22 zu kristallisieren.

Dies scheiterte in Fall von hPrp2 schon bei der Reinigung. Die Gensequenz von hPrp2 enthält zahlreiche Arginin-Codons, die in Prokaryoten unüblich sind. Trotzdem, dass *E.coli* Rosetta 2 (DE3), durch Integration einiger seltener eukaryotischer t-RNAs, auf die Expression solcher Gene optimiert ist, konnte kein stabiles Protein gewonnen werden. Auf Grund der hohen Anzahl der seltenen Codons ist es möglich, dass es bei der Translation zum Fehleinbau falscher Aminosäuren gekommen ist, die die Löslichkeit und Stabilität des Proteins negativ beeinflusst haben. Abhilfe hätte die Expression in einem eukaryotischen System bringen können. Aber sowohl Expressionstests in *Saccharomyces cerevisiae*, als auch der Versuch Insektenzellen als Expressionssystem zu nutzen, versandeten im Nichts. Folglich stellte die Generierung von Deletionsmutanten ein probates Mittel dar an diesem Protein weiterzuarbeiten. Die Kalkulation von Stabilitätsindices zeigte, dass alle Fragmente theoretisch instabil waren. In der Praxis waren sie es ebenfalls. Die Reinigungen der Proteinfragmente verliefen nicht zufriedenstellend. Wurde eine lösliche Deletionsmutante durch Affinitätschromatographie gewonnen, eluierte sie entweder zusammen mit Fremdproteinen im Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule oder präzipitierte auf der Membran des Zentrifugalkontainers. Die Entwicklung einer Reinigungsstrategie war nicht möglich.

Das Volllängenprotein von hPrp22 war zwar löslich, konnte jedoch nicht in zufriedenstellender Reinheit gewonnen werden. Ähnlich verhielt es sich bei der Deletionsmutante H7, die neben der Helikasedomäne und der C-terminalen Domäne auch die S1-Domäne enthielt (Kombination aus H12 und H13). Auch dieses Fragment interagierte stark mit bakteriellen Nukleinsäuren und bildete oligomere Strukturen undefinierter Größe. Es gelang auch hier nicht diese unspezifischen Komplexe unter nativen Bedingungen aufzulösen. Man kann nur mutmaßen warum sich die S1-Domäne (H12) und die Helikasedomäne mit C-Terminus (H13), aber nicht die Kombination aus beiden Domänen (H7), reinigen ließ. Zwischen den Domänen liegt laut Vorhersage eine Region geringer Komplexität ohne Sekundärstruktur motive. Es ist vorstellbar, dass diese Region auf Grund ihrer Flexibilität und strukturellen Unordnung unspezifische, aber starke Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren oder Fremdproteinen eingehen kann.

Die Reinheit der anderen Deletionsmutanten war so hoch, dass sie für Aktivitätstests genutzt werden konnten. In Tests konnten auch Fragmente der einzelnen Subdomänen von hPrp22 gereinigt werden. Ihre Gewinnung wurde jedoch aus Zeitgründen nicht weiter vorangetrieben.

4.2 Strukturaufklärung der Deletionsmutante H20 von hPrp22

Bei der *de novo* Strukturaufklärung der C-terminalen Domäne (3.5.1) von hPrp22 gab es einige Probleme zu lösen. Im ersten Moment waren die Daten sehr gut auszuwerten. Die Auflösung lag bei 2,03 Å, die Daten waren vollständig und hatten eine hohe Redundanz, das Signal-/Rauschverhältnis (I/σ) lag bis in die letzte Auflösungsschale bei über 3 und die Mosaizität war gering. Jedoch gab es auf jedem Beugungsbild 20 - 50 *Overloads*.

Die Fehlerrate in den Auflösungsschalen stieg mit geringerer Auflösung unmerklich an. Es war möglich die korrekte Raumgruppe ($P4_12_12$) zu bestimmen und Phasen mittels Br-SAD zu gewinnen (3.5.2). Dabei mussten die Daten des anomalen Datensatzes auf 180° beschränkt werden, da das anomale Signal des Broms mit fortlaufendem Drehwinkel immer schwächer wurde.

Die erste experimentelle Elektronendichtekarte der Br-SAD Phasierung war in den Bereichen der α -Helices sehr gut definiert, jedoch konnten keine β -Stränge zugeordnet werden. Erst unter Verwendung eines *RESOLVE*-Skripts, das den automatischen Modellbau mit zyklischer Verfeinerung verknüpfte, konnten diese Regionen in der Elektronendichte besser definiert werden. Jedoch waren einige Bereiche weiterhin kaum zuzuordnen. Dort verzweigte sich die Elektronendichte mehrfach. Es konnte nur schwer eingeschätzt werden, ob die Aminosäurekette eine korrekte Konnektivität hatte. Das erste verfeinerte Modell aus der SAD-Phasierung beinhaltete 220 Reste. Die R-Faktoren waren gemessen an der guten Auflösung zu hoch (R / R_{free} 27 % / 33 %). Es mussten bessere Phaseninformationen gewonnen werden.

Hierzu wurde das SeMet-MAD-Experiment durchgeführt (3.5.2). Verglichen mit den nativen Daten, hatten die SeMet-Daten eine geringere Auflösung (2,6 Å) und eine etwas schlechtere Qualität. Die Phasierung war jedoch deutlich besser, denn die erste experimentelle Elektronendichte enthielt bereits die β -Stränge. Mit einem stark vereinfachten *RESOLVE*-Skript (siehe Anhang) wurden 180 Reste eingebaut. Betrachtet man einige Phasierungsstatistiken (Tab.10), erkennt man deutliche Unterschiede in der Qualität der Phasen. Trotzdem, dass bei Br-SAD doppelt so viele Reflexe in die Kalkulation eingingen, war der FOM (*figure-of-merit*), der die Qualität der Phasen bewertet (je höher desto besser) und die Phasierungsstärke (*phasing power*) nur weniger als halb so hoch. Basierend auf der experimentellen SeMet-MAD Elektronendichtekarte wurden 237 Reste eingebaut.

	Br-SAD	SeMet-MAD
Reflexe acentrisch/centrisch	15137 / 2660	7220 / 1667
figure-of-merit acentrisch/centrisch	0.26701 / 0.20404	0.58373 / 0.49452
phasing power acentrisch/centrisch	0.814 / 0.693	1.849 / 1.553
verwendeter Auflösungsbereich	25,14 - 2,05	47,27 - 2,60
optimierter Solvensgehalt	51,4	36,2

[Tab.10] Darstellung der Temperaturfaktoren (B-Faktoren).

Trotz der suboptimalen Klonierungsstrategie in pPR-IBA1, bei der 34 zusätzliche Reste hinzukamen, konnten nur drei Reste, die vom Polylinker des Vektors codiert wurden, zugeordnet

werden. AUTOSHARP konnte elf der zwölf Selenomethionine finden. Das Schweratom an Position eins der Aminosäuresequenz konnte auch nicht in der Elektronendichtekarte gefunden werden. Die ersten zwölf Reste (vom Polylinker des Plasmids codiert) führen in Richtung eines großen Solvenskanals und waren so flexibel, dass keine Rest-Elektronendichte für diesen Bereich des Proteins erkennbar war. Somit konnte die zwölfte Selenposition auch nicht gefunden werden. Des Weiteren konnten 19 C-terminale Reste, die ebenfalls vom Polylinker des Plasmids codiert wurden, mangels Elektronendichte nicht zugeordnet werden. Alle Reste der klonierten Deletionsmutante konnten der Elektronendichtekarte zugeordnet werden. Keine der vektorkodierten Aminosäuren bildete Kristallkontakte.

Die Verfeinerung der Kristallstruktur von H20 basierend auf SeMet-MAD konvergierte wiederum bei einem R-Faktor von 27 % und einem R_{free} von 33 %. Ein Vergleich der beiden gebauten Modelle zeigte, dass beide eine identische Konnektivität hatten. Die Daten wurden auf Verzwillingung überprüft, jedoch gab es kein Anzeichen dafür. Es war unklar warum die R-Faktoren auf so hohem Niveau konvergierten. Letztendlich wurde das Problem, mit der Hilfe von Markus Rudolph behoben, indem die Auflösung bei der Verfeinerung einen Bereich von 2,05 bis 13,6 Å begrenzt wurde (3.5.3). Die fehlerbehafteten Daten der Reflexe geringer Auflösungsbereiche wurden entfernt. Die R-Faktoren der letzten Verfeinerung lagen bei 19,8 % (R) und 25,8 % (R_{free}).

Neben der Tatsache, dass es sich bei der Kristallstruktur der C-terminalen Domäne um ein neues Faltungsmotiv handelt, gilt es weitere diskussionswürdige Aspekte zu betrachten. Die Darstellung der Temperaturfaktoren (Abb.31) gibt Hinweise auf flexible Regionen innerhalb des Proteins. In der Darstellung sind Bereiche mit niedrigen B-Faktoren blau und erhöhte sind grün/gelb eingefärbt. Das α -helikale Grundgerüst im unteren Teil des Proteins hat geringe B-Faktoren, was auf einen reduzierten Flexibilitätsgrad hinweist.

Im Bereich der β -Stränge sind die B-Faktoren erhöht. Da sie auch in der Elektronendichte mäßig definiert waren, könnte man vermuten, dass es sich hierbei um eine flexible Protein- oder RNA-Bindungsstelle handelt. Das Faltungsmotiv der β -Stränge ähnelt einem *OB-fold* (*oligonucleotide binding*).

[Abb.31] Darstellung der Temperaturfaktoren von hPrp22-CTD. blau: niedrige B-Faktoren, grün - gelb: erhöhte B-Faktoren. Cartoondarstellung. (*PYMOL*).

Vergleicht man die Domänenvorhersage (Abb.32, *SMART*) mit dem Faltungsmotiv der C-terminalen Domäne von hPrp22, ist klar ersichtlich, dass die Vorhersage falsch ist. Tatsächlich handelt es sich um eine globuläre Domäne und nicht um zwei Subdomänen. Die "HA2-Domäne" (blau) liegt nahezu planar zwischen der α -Helix 8 und den β -Strängen der "DUF1605-Domäne" (rot), verbunden durch α -Helix 7 (grau).

[Abb.32] Voraussage der Domänenanordnung von hPrp22 (smart.embl-heidelberg.de).

[Abb.33] Ineinandergreifende Strukturen der vorhergesagten Subdomänen von hPrp22-CTD. "HA2-Domäne": blau, "DUF1605-Domäne": rot, Verbindungshelix: grau. Cartoondarstellung. (*PYMOL*).

4.3 Modellierung homologer C-terminaler Domänen

Die C-terminale DUF-Domäne ist charakteristisch für DExD/H-Proteine in der zweiten Phase des Spleißzyklus, nach der Aktivierung des Spleißosoms. Es handelt sich um vier RNA-Helikasen, hPrp2, hPrp16, hPrp22 und hPrp43 (1.5). Vergleicht man die Sequenzen der C-terminalen Domänen dieser Proteine, erkennt man dass 24,6 % der Aminosäuren identisch und 62,5 % homolog sind (Abb.34). Auf Grund auf der hohen Sequenzähnlichkeit der C-terminalen Domänen konnten mit *SWISSMODEL* (Peitsch, 1996) Homologiemodelle generiert werden.

[Abb.34] Sequenzvergleich der C-terminalen Domänen von hPrp22, hPrp2, hPrp16 und hPrp43 aus *Homo sapiens*. Konservierte Reste sind blau umrandet, wobei ähnliche und teilweise konservierte Reste rot sind und Reste, die in allen homologen Domänen vorkommen rot unterlegt sind. Sekundärstrukturelemente der hPrp22-CTD sind über dem Alignment gezeigt. (ClustalW; ESPrpt 2.2).

Die Verteilung der Oberflächenladungen der Modelle wurden mit *PYMOLE* kalkuliert (Abb.35 a-d, 36 a-d).

Die Ladungsverteilungen auf der Vorderseite aller Domänen sind sehr ähnlich (Abb.35). Eine zentrale negativ geladene Region (rot) wird rechts und links von positiv geladenen Resten (blau) flankiert. Im oberen Bereich des Proteins, in dem die β -Stränge angeordnet sind, finden sich Unterschiede. Während in dieser Region bei hPrp2 hauptsächlich positive Ladungen überwiegen (Abb.35a), ist dieser Bereich bei hPrp22 negativ geladen (Abb.35c). Auf Grund dieser Gleichverteilung der Oberflächenladungen und der nahezu identischen Faltung, kann spekuliert werden, dass die C-terminalen Domänen mit denselben Proteinen des Spleißosoms interagieren. Welche das sind lässt sich ohne weitergehende Untersuchungen nicht sagen.

[Abb.35] Oberflächenladungen der Vorderseite der C-terminalen Domänen von a) hPrp2-CTD. b) hPrp16-CTD, c) hPrp22-CTD (H20). d) hPrp43-CTD. rot: negative Ladung, blau: positive Ladung (PYMOL).

Betrachtet man nun die Rückseite der Domäne ergibt sich ein völlig anderes Bild (Abb.36). Die Ladungsverteilungen an der Oberfläche der Domänen weisen keine Ähnlichkeiten miteinander auf. Die CTD von hPrp2 hat im oberen Bereich eine stark positiv geladene Region, während der Rest der Rückseite eher negativ geladen ist. Bei den C-terminalen Domänen von hPrp16 (Abb.36b) und hPrp43 (Abb.36d) ist eine zentrale, negativ geladene Tasche erkennbar. Diese dramatischen Unterschiede in den Ladungsverteilungen lassen darauf schließen, dass verschiedene Bindungspartner möglich sind. Diese Eigenschaft könnte die Spezifität der sehr homologen spleißosomalen DExD/H-Box RNA-Helikasen ausmachen. sie könnte dazu beitragen, dass das jeweilige Protein seine Funktion an vorgesehener Stelle im Spleißosom erfüllt. Ebenso ist es vorstellbar, dass durch definierte Interaktionen mit anderen Proteinen die Aktivität der Helikase reguliert wird.

[Abb.36] Oberflächenladungen der Rückseite der C-terminalen Domänen von a) hPrp2-CTD. b) hPrp16-CTD, c) hPrp22-CTD (H20). d) hPrp43-CTD. rot: negative Ladung, blau: positive Ladung (PYMOL).

4.4 Einfluss der C-terminalen Domäne von hPrp22 auf die ATPase-Aktivität

Die Ergebnisse der ATPase-Aktivitätstests weisen darauf hin, dass die Helikasedomäne ohne den C-Terminus kein ATP hydrolysieren kann. Vergleicht man die Kristallstrukturen (Abb.37) katalytisch aktiver RNA-Helikasen (Vasa) mit denen katalytisch inaktiver (hPrp28, blau), kann man zwei Konformationen beobachten. In der geschlossenen Konformation (Vasa, rot) können ATP (grün) und RNA (gelb) gebunden werden. Die ATP-Hydrolyse kann stattfinden, weil die Helikasemotive nah beieinander liegen und dsRNA kann entwunden werden. In der offenen oder gestreckten Konformation ist eine Subdomäne (HELICc) vom aktiven Zentrum weggedreht. Die zur ATP-Hydrolyse benötigten Reste sind so weit voneinander entfernt, dass die Dephosphorylierung des ATPs nicht erfolgen kann. Einige Proteine haben eine dauerhaft geschlossene, aktive Konformation, während andere durch Interaktion mit Hilfsproteinen aktiviert werden.

[Abb.37] Strukturvergleich der Helikasedomäne von hPrp28 (Sina Möhlmann) aus *Homo sapiens* (blau) und Vasa (Sengoku *et al.*, 2006) aus *Drosophila melanogaster* (rot). gelb: Poly-U, grün: ADPNP. Cartoondarstellung. (PVMOL).

Alle spleißosomalen DExD/H-Box RNA-Helikasen mit der C-terminalen Domäne haben *in vitro* ATPase-Aktivität. Es ist vorstellbar, dass die C-terminale Domäne ein intramolekularer Aktivator der ATPase-Aktivität ist. Durch Bindung an die erste Subdomäne des Helikasekerns wird eine geschlossene, katalytisch aktive Konformation erzeugt. Die vier modellierten CTDs haben auf der einen Seite eine nahezu identische Ladungsverteilung und die DEXDc-Domänen der zugehörigen Proteine sind sehr homolog zueinander. Denkbar ist, dass die Oberflächenladungen an einer Region der DEXDc-Domäne ebenfalls konserviert sind und die CTD binden kann.

a)

b)

[Abb.38] Modell einer intramolekularen Aktivierung von DExD/H-Box Proteinen. a) ohne C-terminale Domäne offene, inaktive Konformation. b) C-terminale Domäne bindet an DEXDc-Domäne: geschlossene, aktive Konformation

5. Zusammenfassung

Das Spleißen von prä-mRNA ist einer der dynamischsten Prozesse in der eukaryotischen Zelle. Neben den UsnRNAs ist eine Vielzahl von Proteinen am Spleißprozeß beteiligt. Einige dieser Proteine sind mobile Faktoren, während andere Komponenten integrale Bestandteile des spleißosomalen Komplexes sind. Die meisten dieser Proteine sind nicht direkt an der Entfernung der Introns und der Ligation der Exons beteiligt, sondern vermitteln Protein-Protein- bzw. Protein-RNA-Kontakte oder katalysieren Reaktionen, die zur internen Umlagerung des Spleißosoms führen. Eine am Spleißen beteiligte Proteinklasse sind die DExD/H-Box RNA-Helikasen. Sie können interne Basenpaarungen zwischen UsnRNAs oder UsnRNA-mRNA-Basenpaarungen entwinden.

Ein Protein dieser Klasse ist das DEAH-Box Protein Prp22. Es wurde gezeigt, dass das homologe Protein yPrp22 aus *Saccharomyces cerevisiae* ATP-abhängige RNA-Helikase Aktivität zeigt, die zur Entwindung von RNA-Interaktionen zwischen U5 snRNP und mRNA führt. Dies führt zum Ablösen der reifen mRNA vom post-spleißosomalen Komplex. Nur die vollständig prozessierte genetische Information kann denn Zellkern verlassen und wird an den Ribosomen translatiert.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die dreidimensionale Kristallstruktur der C-terminalen Domäne des spleißosomalen DExD/H-Box Proteins hPrp22 (Aminosäuren 950 - 1183) aus *Homo sapiens* charakterisiert. Hierzu wurden die Phasen *de novo* mittels anomaler Dispersion von Brom und Selen bestimmt. Die Kristallstruktur birgt ein neues Faltungsmotiv.

Basierend auf der Struktur der C-terminalen Domäne von hPrp22 wurden Modelle anderer homologer C-terminaler Domänen von hPrp2, hPrp16 und hPrp43 generiert. Durch diese Modelle konnten Aussagen über die Verteilung der Oberflächenladungen getroffen werden. Es zeigte sich, dass auf einer Seite der verschiedenen Domänen die Ladungsverteilung konserviert ist, während auf der gegenüberliegenden Seite signifikante Unterschiede erkennbar sind.

Weiterhin wurden zahlreiche Deletionsmutanten von hPrp22 und hPrp2, einem weiteren spleißosomalen DExD/H-Box Protein, entworfen. Einige dieser verkürzten Proteinfragmente wurden gereinigt und auf ATPase-Aktivität untersucht. Dazu wurde ein enzym-gekoppelter photometrischer ATPase-Test angepasst. Die Absorptionsabnahme durch NADH-Verbrauch wird dabei bestimmt. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Anwesenheit der C-terminalen Domäne die ATPase-Aktivität von hPrp22 stimuliert.

6. Summary

Splicing of pre-mRNA is one of the most dynamic processes in eukaryotic cells. In addition to the U snRNAs, there is a multitude of proteins involved in the splicing cycle. Some of them are mobile factors; others are integral parts of the spliceosomal complex. Most of these proteins are not directly involved in the excision of introns or the ligation of exons. Rather, they mediate protein-protein and protein-RNA contacts, respectively, or catalyze reactions, which result in internal rearrangements of the spliceosome. One class of splicing related proteins are the DExD/H-box RNA helicases. They are capable of unwinding internal base pairings between U snRNAs or unwinding U snRNA-mRNA duplexes.

A noteworthy member of this protein class is Prp22, a DEAH-box protein. It was shown, that the yeast homologue of this protein has an ATP-dependent RNA-helicase activity, which is used for unwinding RNA-interactions between U5 snRNP and mRNA. This leads to the release of mature mRNA from the post-spliceosomal complex after the second transesterification step. Only then the processed genetic information is allowed to leave the cytoplasm, where finally translation at the ribosomes takes place.

Within this Ph.D. thesis the three-dimensional crystal structure of the C-terminal domain of the human spliceosomal DExD/H-box protein hPrp22 (amino acids 950 - 1183) was solved. For this purpose *de novo* phases were determined by anomalous dispersion of bromine and selenium. The obtained crystal structure showed a new folding motif.

This structure of the C-terminus of hPrp22 was subsequently used to model the homologous C-terminal domains of hPrp2, hPrp16 and hPrp43. The calculation of the electrostatic surface potentials revealed, that the different domains share a well conserved charge distribution on one half of of their surfaces, whereas opposing surfaces differ significantly in their charge distribution with respect to each other.

Furthermore, numerous deletion mutants of hPrp22 and hPrp2, another spliceosomal DExD/H-box protein, were designed. Some of those protein fragments were purified and tested for ATPase activity. For this purpose a photometric enzyme linked ATPase assay was adapted, which allows for monitoring the absorption change caused by NADH decay. These experiments indicated, that the presence of the C-terminus stimulates the ATPase activity of hPrp22.

7. Abkürzungsverzeichnis

'	Minute
''	Sekunde
A	Absorption
Å	Angström [$1 \text{ Å} = 0.1 \text{ nm}$]
AS	Aminosäuren
AG	Arbeitsgemeinschaft
as	antisense
ATP	Adenosintriphosphat
B	Temperaturfaktor [Å^3]
BESSY	Berliner Elektronensynchrotron
bp	Basenpaare
c	Konzentration [M]
C	Cytosin
cDNA	Zur RNA komplementäre DNA
CIP	Calf Intestine Phosphatase
CV	Säulenvolumen
d	Tage
Da	Dalton [g/mol]
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	N, N, N', N' Ethylendiamintetraacetat
eIF4E	Eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
F	Strukturfaktor in Kristallographie
F_{calc}	Kalkulierte Strukturfaktoren
FFT	Fast Fourier Transform
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
I	Intensität
IPTG	Isopropyl-β-D-isothiogalactosid
kb	Kilobasen
LB	lysogenic broth (Luria Bertani)
m	Steigung der Funktion
M	Molarität
MAD	Multiple Anomalous Dispersion
mAU	Milli-Absorptionseinheiten
MIR	Multiple Isomorphous Replacement
MOPS	γ-Morpholino-propansulfonsäure
MR	Molecular Replacement

mRNA	Messenger RNA
MW	Molekulargewicht [g/mol]
N	Nukleotid
NES	Nuclear export signal, Kernexportsignal
NLS	Nuclear Localization Signal, Kernimportsignal
NMR	Nuclear magnetic resonance
NPC	Nuclear pore complex, Kernporenkomplex
NTF2	Nuclear transport factor 2, Kerntransportfaktor 2
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Proteindatenbank
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRIP	peroxisome proliferator-activated receptor interacting protein
rmsd	Root mean square deviation
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	sense
SAD	Single Anomalous Dispersion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIR	Single Isomorphous Replacement
SL	Spliced leader
Sm	Steven Miller
snRNA	Small nuclear RNA
snRNP	Small nuclear Ribonucleoprotein
ssDNA	Einzelsträngige DNA
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N' Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UsnRNP	Uridinrich small nuclear ribonucleoprotein
UV	Ultraviolett
V	Volumen
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung ($g = 9.81 \text{ m/s}^2$)
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

8. Literaturverzeichnis

- Abrahams J. P. & Leslie A. G. W. (1996): Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F₁ ATPase. *Acta Cryst.* **D52**: 30-42.
- Arenas J.E. & Abelson J.N. (1997): Prp43: An RNA helicase-like factor involved in spliceosome disassembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 11798-11802.
- Ares M.Jr. & Weiser B. (1995): Rearrangement of snRNA structure during assembly & function of the spliceosome. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **50**: 131-159.
- Berget S.M., Moore M., & Sharp P.A. (1977): Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 3171-3175.
- Berglund J.A., Chua K., Abovich N., Reed R., & Rosbash M. (1997): The splicing factor BBP interacts specifically with the pre-mRNA branchpoint sequence UACUACC. *Cell* **89**: 781-787.
- Bizebard T., Ferlenghi I., Iost I., & Dreyfus M. (2004): Studies on three E.coli DEAD-box helicases point to an unwinding mechanism different from that of model DNA helicases. *Biochemistry* **43**: 7857-7866.
- Bono F., Ebert J., Lorentzen E. & Conti E. (2006): The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. *Cell* **126**: 713-725.
- Bricogne G. (1993): Direct Phase Determination by Entropy Maximisation & Likelihood Ranking: Status Report & Perspectives. *Acta Cryst.* **D49**: 37-60.
- Bricogne G., Vonrhein C., Flensburg C., Schiltz M. & Paciorek W. (2003): Generation, representation and flow of phase information in structure determination: recent developments in and around SHARP 2.0. *Acta Cryst.* **D59**: 2023-2030.
- Brow D.A. (2002): Allosteric cascade of spliceosome activation. *Annu. Rev. Genet.* **36**: 333-360.
- Brünger A. T. (1992): The Free R value: a Novel Statistical Quantity for Assessing the Accuracy of Crystal Structures. *Nature* **355**: 472-474.
- Burge C.B., Padgett R.A., & Sharp P.A. (1998): Evolutionary fates & origins of U12-type introns. *Mol. Cell* **2**: 773-785.

- Burge C.B., Tuschl T., & Sharp P.A. (1999): Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes. In *The RNA world*, **2.Auflage**: 525-560. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Carmel A.B. & Matthews B.W. (2004): Crystal structure of the BstDEAD N-terminal domain: a novel DEAD protein from *Bacillus stearothermophilus*. *RNA* **10**: 66-74.
- Caruthers J.M., Johnson E.R., & McKay D.B. (2000): Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 3080-3085.
- Caruthers J.M. & McKay D.B. (2002): Helicase structure & mechanism. *Curr. Opin. in Struct. Biol.* **12**: 123-133.
- Cech T.R. (1993): Catalytic RNA: structure & mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* **2**: 33-36.
- Cheng S.-C. & Abelson J. (1987): Spliceosome assembly in yeast. *Genes Dev.* **1**: 1014-1027.
- Cheng Z., Collier J., Parker R. & Song H (2005): Crystal structure & functional analysis of DEAD-box protein Dhh1p. *RNA* **11**: 1258-1270.
- Chow L.T., Gelinas R.E, Broker T.R., & Roberts R.J (1977): An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**: 1-8.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994): The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst.* **D50**: 760-763.
- Company M, Arenas J, & Abelson J. (1991): Requirement of the RNA helicase-like protein PRP22 for release of messenger RNA from spliceosomes. *Nature* **349**: 463-464/487-493.
- Cordin O., Banroques J., Tanner N.K., & Linder P. (2006): The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* **367**: 17-37.
- Das R., Zhou Z., Reed R. (2000): Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E. *Mol. Cell.* **5**: 779-787.
- Du H. & Rosbash M. (2001): Yeast U1 snRNP-pre-mRNA complex formation without U1 snRNA-premRNA base pairing. *RNA* **7**: 133-142.
- Du H. & Rosbash M. (2002): The U1 snRNP protein U1C recognizes the 5' splice site in the absence of base pairing. *Nature* **419**: 86-90.

- Edwards-Gilbert G., Kim D.H., Kim S.H., Tseng Y.H., Yu Y., & Lin R.J. (2000): Dominant negative mutants of the yeast splicing factor Prp2 map to a putative cleft region in the helicase domain of DExD/H-box proteins. *RNA* **6**: 1106-1119.
- Edwards-Gilbert G., Kim D.H., Silverman E., & Lin R.J. (2004): Definition of a spliceosome interaction domain in yeast Prp2 ATPase. *RNA* **10**: 210-220.
- Emsley P. & Cowtan K. (2004): Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst.* **D60**: 2126-2132.
- Fortelle E. de la & Bricogne G. (1997). Maximum-Likelihood Heavy-Atom Parameter Refinement for Multiple Isomorphous Replacement and Multiwavelength Anomalous Diffraction Methods. In *Methods in Enzymology* **276**: 472-494. Macromolecular Crystallography Part A. C.W. Carter and R.M. Sweet ed. Academic Press, San Diego.
- Gill S. C. & von Hippel P. H. (1989): Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**: 319-326.
- Gouet P., Courcelle E., Stuart D.I. & Métoz F. (1999): ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15**: 305-308.
- Grabowski P.J., Padgett P.A., & Sharp P.A. (1984): Messenger RNA splicing in vitro: an excised intervening sequence and a potential intermediate. *Cell* **37**: 415-427.
- Grabowski R. & Gallwitz D. (1997): High-affinity binding of the yeast cis-Golgi t-SNARE, Sed5p, to wild-type & mutant Sly1p, a modulator of transport vesicle docking. *FEBS Lett.* **411**: 169-172
- Guthrie C. & Patterson B. (1988): Spliceosomal snRNAs. *Annu. Rev. Genet.* **22**: 387-419.
- Hartmuth K., Urlaub H., Vornlocher H.P., Will C.L., Gentzel M., Wilm M., & Lührmann R. (2002): Protein composition of human spliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 16719-16724.
- Hastings M.L. & Krainer A.R. (2001): Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Curr. Opin. in Cell Biol.* **13**: 302-309.
- Imamura O., Saiki K., Tani T., Ohshima Y., Sugawara M. & Furuichi Y. (1998): Cloning & characterization of a human DEAH-box RNA helicase, a functional homolog of fission yeast Cdc28/Prp8. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2063-2068.

- Jones D.T. (1999): Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**: 195-202.
- Jurica M.S. & Moore M.J. (2002): Capturing splicing complexes to study structure & mechanism. *Methods* **28**: 336-345.
- Jurica M.S. & Moore M.J. (2003): Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell.* **12**: 5-14.
- Kim S.H., Smith J., Claude A., & Lin R.J. (1992): The purified yeast pre-mRNA splicing factor PRP2 is an RNA-dependent NTPase. *EMBO J.* **11**: 2319-2326.
- Kim S.H. & Lin R.J. (1993): Pre-rRNA splicing within an assembled yeast spliceosome requires an RNA-dependent ATPase & ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 888-892.
- Kim S.H. & Lin R.J. (1996): Spliceosome Activation by PRP2 ATPase prior to the First Transesterification Reaction of Pre-mRNA Splicing. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 6810-6819.
- Kim J.L., Morgenstern K.A., Griffith J.P., Dwyer M.D., Thomson J.A., Murcko M.A., Lin C., & Caron P.R. (1998): Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* **6**: 89-100.
- Kim D-H & Rossi J.J. (1999): The first ATPase domain of the yeast 246-kDa protein is required for in vivo unwinding of the U4/U6 duplex. *RNA* **5**: 959-971.
- King D.S. & Beggs J.S. (1990): Interactions of PRP2 protein with pre-mRNA splicing complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Research* **18**: 6559-6564.
- Konarska M.M. & Sharp P.A. (1987): Interactions between small nuclear ribonucleoprotein particles in formation of spliceosome. *Cell* **49**: 763-774.
- Laggerbauer B., Achsel T., & Lührmann R. (1998): The human U5-200kD DEEXH-box protein unwinds U4/U6 RNA duplexes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 4188-4192.
- Laskowski R.A., Moss D.S. & Thornton J.M. (1993): Main-chain bond lengths & bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* **231**: 1049-1067.
- Lesser C.F. & Guthrie C. (1993): Mutations in U6 snRNP that alter splice site specificity: implications for the active site. *Science* **262**: 1982-1988.

- Linder P. (2003): Yeast RNA helicases of the DEAD-box family involved in translation initiation. *Biol. Cell.* **95**: 157-167.
- Lodish H., Baltimore D, Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P. & Darnell J. (1995): Molecular Cell Biology, W. H. Freeman & Company.
- Lopez P.J. & Séraphin B. (1999): Genomicscale quantitative analysis of yeast pre-mRNA splicing: implications for splice site recognition. *RNA* **5**: 1135-1137.
- Lustig A.J., Lin R.J. & Abelson J. (1986): The yeast RNA gene products are essential for mRNA splicing in vitro. *Cell* **47**: 953-963.
- Madhani H.D. & Guthrie C. (1992): A novel basepairing interaction between U2 & U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell* **71**: 803-817.
- Madhani H.D. & Guthrie C. (1994): Dynamic RNA-RNA interactions in the spliceosome. *Annu. Rev. Genet.* **28**: 1-26.
- Makarov E.M., Makarova O.V., Urlaub H., Gentzel M., Will C.L., Wilm M., & Lührmann R. (2002): Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* **298**: 2205-2208.
- Malca H., Shomron N., & Ast G. (2003): The U1 snRNP Base Pairs with the 5' Splice Site within a PentasnrNP Complex. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 3442-3455.
- Martin A., Schneider S., & Schwer B. (2002): Prp43 in an essential RNA-dependent ATPase required for release of lariat-intron from the spliceosome. *J. Biol. Chem.* **277**: 17743-17750.
- Matthews B.W. (1968): The Solvent Content of Protein Crystals. *J. Mol. Biol.* **33**: 491-497.
- Mayas R.M. & Staley J.P.(2006): DEAD on. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**: 954-955.
- Moore M., Query C.C., & Sharp P.A. (1993): Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome. In *The RNA world*, **1.Auflage**: 303-357. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mougin A., Gottschalk A., Fabrizio P., Lührmann R. & Branlant C. (2002): Direct probing of RNA structure & RNA-protein interactions in purified HeLa cell's & yeast spliceosomal U4/U6.U5 tri-snRNP particles. *J. Mol. Biol.* **317**: 631-49.

- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G. & Erlich H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51** Pt. 1:263-273.
- Murshudov G.N., Vagin A.A., Lebedev A., Wilson K.S. & Dodson E.J. (1999): Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. *Acta Cryst.* **D55**: 247-255.
- Ng R. & Abelson J. (1980): Isolation & sequence of the gene for actin in *Saccharomyces cervisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**: 3912-3916.
- Nilsen T.W. (1997): Trans-splicing. In *Eukaryotic mRNA processing* : 310-334. Oxford, IRL Press.
- Nilsen T.W. (1998): RNA-RNA interactions in nuclear pre-mRNA splicing. In *RNA Structure & Function*, ed.R.Simons, *M.Grunberg-Manago*: 279-307. Cold Spring Habor, NY, Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Ohno M. & Shimura Y. (1996): A human RNA helicase-like protein, HRH1, facilitates nuclear export of spliced mRNA by releasing the RNA from the spliceosome. *Genes Dev.* **10**: 997-1007.
- Ono Y., Ohno M. & Shimura Y. (1994): Identification of a putative RNA helicase (HRH1), a human homolog of yeast Prp22. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7611-7620.
- Padgett R.A., Konarska M.M., Grabowski P.J., Hardy P.J., & Sharp P.A. (1984): Lariat RNAs as intermediates & products in the splicing of messenger RNA precursors. *Science* **225**: 898-903.
- Padgett R.A., Grabowski P.J., Konarska M.M., Seiler S., & Sharp P.A. (1986): Splicing of messenger RNA procursors. *Annu. Rev. Biochem.* **55**: 1110-1150.
- Pape T. & Schneider T.R. (2004): HKL2MAP: a graphical user interface for phasing with SHELX programs. *J. Appl. Cryst.* **37**: 843-844.
- Pearson W.R. & Lipman D.J.(1988): Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 2444-2448.
- Peebles C.L., Perlman P.S., Mecklenburg K.L., Petrillo M.L., Tabour J.H., Jarrel K.A. & Cheng H.L. (1986): A self-splicing RNA excises an intron lariat. *Cell* **44**: 213-223.
- Peitsch M.C. (1996): ProMod & Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 274-279.

- Pikielny C.W. & Rosbash M. (1986): Specific small nuclear RNAs are associated with yeast spliceosomes. *Cell* **45**: 869-877.
- Plumpton M., McGarvey M., & Beggs J.D. (1994): Dominant negative mutation in the conserved RNA helicase motif 'SAT' causes splicing factor PRP2 to stall in spliceosomes. *EMBO J.* **13**: 879-887.
- Porter D.J. (1998): A Kinetic Analysis of the Oligonucleotide-modulated ATPase Activity of the Helicase Domain of the NS3 Protein from Hepatitis C Virus. *J. Biol. Chem.* **273**: 14247–14253.
- Raghuathan P.L. & Guthrie C. (1998): RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis & the DEIH-box splicing factor Brr2. *Curr. Biol.* **8**: 847-855.
- Ramachandran G.N. & Sasisekharan V. (1968): Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**: 283-438.
- Rappsilber J., Ryder U., Lamond A.I., & Mann M. (2002): Large-scale proteomic analyses of the human spliceosome. *Genome Res.* **12**: 1231-1245.
- Rocak S. & Linder P. (2004): DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**: 232-241.
- Rogers G.W., Richter N.J. & Merrick W.C. (1999): Biochemical & kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J. Biol. Chem.* **274**: 12236-12244.
- Rogers G.W., Lima W.F., & Merrick W.C. (2001): Further characterization of the helicase activity of eIF4A. Substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **276**: 12598-12608.
- Ruskin B., Krainer A.R., Maniatis T., & Green M.R. (1984): Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. *Cell* **38**: 317-331.
- Schneider S. & Schwer B. (2001): Functional domains of the yeast splicing factor Prp22p. *J. Biol. Chem.* **276**: 21184-21191.
- Schneider T. R. & Sheldrick G. M. (2002): Substructure solution with SHELXD. *Acta Cryst.* **D58**: 1772-1779.
- Schubert M., Edge R.E., Lario P., Cook M.A., Strynadka N.C., Mackie G.A. & McIntosh L.P. (2004): Structural Characterization of the RNase E S1 Domain & Identification of its Oligonucleotide-binding & Dimerization Interfaces *J. Mol. Biol.* **341**: 37–54.

- Schultz J., Milpetz F., Bork P. & Ponting C.P. (1998): SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 5857-5864.
- Schwer B. & Guthrie C. (1991): PRP16 is an RNA-dependent ATPase that interacts transiently with the spliceosome. *Nature* **349**: 494-499.
- Schwer B. & Gross C.H. (1998): Prp22, a DExH-box RNA helicase, plays two distinct roles in yeast premRNA splicing. *EMBO J.* **17**: 2086-2094.
- Schwer B. & Meszaros T. (2000): RNA helicase dynamics in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* **19**: 6582-6591.
- Senapathy P., Sharpiro M. B. & Harris N. L. (1990): Splice junctions, branch point sites & exons: sequence statistics, identification, & applications to genome project. *Meth. Enzymol.* **183**: 252-278.
- Sengoku T., Nureki O., Nakamura A., Kobayashi S. & Yokoyama S. (2006): Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein *Drosophila* Vasa. *Cell* **125**: 287-300.
- Sraphin B. & Rosbash M. (1989): Identification of functional U1 snRNA-pre-mRNA complexes committed to spliceosome assembly & splicing. *Cell* **59**: 349-358.
- Sheldrick G.M. & Schneider T.R. (1997): *Methods Enzymol.* **277**: 319-343.
- Shi H., Cordin O., Minder C.M., Linder P., & Xu R.M. (2004): Crystal structure of the human ATPdependent splicing & export factor UAP56. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 17628-17633.
- Silverman E., Edwalds-Gilbert G., & Lin R.J. (2003): DExD/H-box proteins & their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* **312**: 1-16.
- Soultanas P. & Wigley D.B. (2000): DNA helicase: "inching forward.". *Curr. Opin. in Struct. Biol.* **10**: 124-128.
- Soultanas P. & Wigley D.B. (2001): Unwinding the "Gordian knot" of helicase action. *Trends in Biochem. Sci.* **26**: 47-54.
- Staley J.P. & Guthrie C. (1998): Mechanical Devices of the Spliceosome: Motors, Clocks, Springs, & Things. *Cell* **92**: 315-326.

- Stevens S.W., Ryan D.E., Ge H.Y., Moore R.E., Young M.K., Lee T.D., & Abelson J.A. (2002): Composition & functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP. *Mol. Cell* **9**: 31-44.
- Story R.M., Li H., & Abelson J.N. (2001): Crystal structure of a DEAD box protein from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 1465-1470.
- Studier F.W. (2005): Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**: 207-34.
- Tanaka N, Schwer B. (2005): Characterization of the NTPase, RNA-binding, & RNA helicase activities of the DEAH-box splicing factor Prp22. *Biochem.* **44**: 9795-803.
- Tanner N.K. & Linder P. (2001): DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell* **8**: 251-262.
- Tarn W.Y. & Steitz J.A. (1994): SR proteins can compensate for the loss of U1 snRNP functions in vitro. *Genes Dev.* **8**: 2704-2717.
- Tarn W.Y. & Steitz J.A. (1996): A novel spliceosome containing U11, U12; & U5 snRNPs excises aminor class (AT-CT) intron in vitro. *Cell* **84**: 801-811.
- Teigelkamp S., McGarvey M., Plumpton M., & Beggs J.D. (1994): The splicing factor PRP2, a putative RNA helicase, interacts directly with pre-mRNA. *EMBO J.* **13**: 888-897.
- Terwilliger T. C. (2000): Maximum likelihood density modification. *Acta Cryst.* **D56**: 965-972.
- Theis K., Chen P.J., Skorvaga M., Van Houten B., & Kisker C. (1999): Crystal structure of UvrB, a DNA helicase adapted for nucleotide excision repair. *EMBO J.* **18**: 6899-6907.
- Tuteja N. & Tuteja R. (2004): Unraveling DNA helicases. Motif, structure mechanism & function. *Eur. J. Biochem.* **271**: 1849-1863.
- Van der Veen R., Arnberg A.C., van der Horst G., Bonen L., Tabak H.F., & Grivell L.A. (1986): Excised group II introns in yeast mitochondria are lariats & can be formed by self-splicing in vitro. *Cell* **44**: 225-234.
- Vonrhein C, Blanc E., Roversi P. & Bricogne G. (2007): Automated structure solution with autoSHARP. *Methods Mol. Biol.* **364**: 215-30.

- Wagner J.D., Jankowsky E., Company M., Pyle A.M., & Abelson J.N. (1998): The DEAH-box protein Prp22 is an ATPase that mediates ATP-dependent mRNA release from the spliceosome & unwinds RNA duplexes. *EMBO J.* **17**: 2926-2937.
- Will C.L. & Lührmann R. (2001): Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure & function. *Curr. Opin. in Cell Biol.* **13**: 290-301.
- Will C.L. & Lührmann R. (2005): Splicing of a rare class of introns by the U12-dependent spliceosome. *Biol. Chem.* **386**: 713-724.
- Will C.L. & Lührmann R. (2006): Spliceosome Structure & Funktion. In *The RNA world*, **3.Auflage**: 369-400. Cold Spring Habor, NY, Cold Spring Habor Laboratory Press.
- Yao N., Hesson T., Cable M., Hong Z., Kwong A.D., Le H.V., & Weber P.C. (1997): Structure of the hepatitis C virus RNA helicase domain. *Nature Struct.Biol.* **4**: 463-467.
- Yean S.L. & Lin R.J. (1991): U4 small nuclear RNA dissociates from yeast spliceosome & does not participate in the subsequent splicing reaction. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5571-5577.
- Zaug A.J., Grabowski P.J., & Cech T.R. (1983): Autocatalytic cyclization of an excised intervening sequence RNA is a cleavage-ligation reaction. *Nature* **301**: 578-583.
- Zavanelli M.I., Britton J.S., Igel A.H., Ares M. Jr. (1994): Mutations in an essential U2 small nuclear RNA structure causes cold-sensitiv U2 small nuclear ribonucleoprotein function by favoring competing alternative U2 RNA structures. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1689-1697.
- Zhou Z., Licklider L.J., Gygi S.P., & Reed R. (2002): Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* **419**: 182-185.

hPrp22 - H6 27-H-351 325 AS / 37,8 kDa / pI 10,06

YLSLVSKVCTELDNHLGINDKDLAEFVSLAEKNTTFTDFKASLVKNGAEFTDSLISNLLRLIQTMRPPAKPSTSKDPVVKPKTEKEKL
KELFPVLCPQDPNSVRMTLDEDDVKKVAVDVVKLEALMPASAAGQEKQDAEHRDRTKKKKRSRSDRNRDRDRERNRDRDHKRRHRS
RSRSRSRTRERNKVKSRYSRSRSQSPPKDRKDRDKYGERNLDRWRDKHVDPPPEEPTIGDIYNGKVTSIMQFGCFVQLEGLRKRWEGL
LVHISELRREGRVANADVSKGQVRVKVLSFTGKTSLSMKDQVDETGEDLNPNNR

hPrp22 - H7 264-H-1183 920 AS / 104,2 kDa / pI 5,70

IGDIYNGKVTSIMQFGCFVQLEGLRKRWEGLVHISELRREGRVANADVSKGQVRVKVLSFTGKTSLSMKDQVDETGEDLNPNNRR
NLVGETNEETSMRNPDRPTHLSLVSAPVEEDDSL ERKRLTRISDPEKWEIKQMIANVLSKEEFPDFDEETGILPKVDDEEDEDLEIEL
VEEEPPFLRGHTKQSMDSPIKIVKNPDGSLQAAMMQSALAKERRELKQAQREAEEMDSIPMGLNKHWDPLPDAEGRQIAANMRGIGM
MPNDIPEWKKHAFGGNKASYGKKTQMSILEQRESLPIYKLKEQLVQAVHDNQILIVIGETGSGKTTQITQYLAEGYTSRGKIGCTQPR
RVAAMSAKRVSEEFGCCLGQEVGYTIRFEDCTSPETVIKYM TDGMLLRECLIDPDLTQYAIIMLDEAHERTIHTDVLFGLLKKTQVQR
QDKMLIVTSATLDAVKFSQYFYEAPIFTIPGRTPVEILYTKPEPTYLDASLITVMQIHLTEPPGDILVFLTGQEEIDTACEILYERM
KSLGPDVPELIIILPVYSALPSEMOTRIFDPAPPGRKVVATNIAETSLTIDGIYVVDPGFVKQKVYNSKTGIDQLVVTPISSQAQAKQ
RAGRAGRTGPGKCYRLYTERAYRDEMLTTNVPEIQRTNLASTVLSLKAMGINDLLSDFMDAPPMETLITAMEQLYTLGALDDEGLLTR
LGRRMAEFPLEPMLCKMLIMSVHLGCSEEMLTIVSMLSVQNVFYRPKDKQALADQKKAKFHQTEGDHLLTLLAVYNSWKNKFSNPWCYE
NFIQARSLRRAQDIRKQMLGIMDRHKLDDVSCGKSTVRVQKAICSGFFRNAAKDPQEGYRTLIDQVVYIHPSSALFNRQPEWVVYHE
LVLTTKEYMREVTITDPRWLVEFAPAFFKV

hPrp22 - H8 264-H-1055 792 AS / 89,1 kDa / pI 5,26

IGDIYNGKVTSIMQFGCFVQLEGLRKRWEGLVHISELRREGRVANADVSKGQVRVKVLSFTGKTSLSMKDQVDETGEDLNPNNRR
NLVGETNEETSMRNPDRPTHLSLVSAPVEEDDSL ERKRLTRISDPEKWEIKQMIANVLSKEEFPDFDEETGILPKVDDEEDEDLEIEL
VEEEPPFLRGHTKQSMDSPIKIVKNPDGSLQAAMMQSALAKERRELKQAQREAEEMDSIPMGLNKHWDPLPDAEGRQIAANMRGIGM
MPNDIPEWKKHAFGGNKASYGKKTQMSILEQRESLPIYKLKEQLVQAVHDNQILIVIGETGSGKTTQITQYLAEGYTSRGKIGCTQPR
RVAAMSAKRVSEEFGCCLGQEVGYTIRFEDCTSPETVIKYM TDGMLLRECLIDPDLTQYAIIMLDEAHERTIHTDVLFGLLKKTQVQR
QDKMLIVTSATLDAVKFSQYFYEAPIFTIPGRTPVEILYTKPEPTYLDASLITVMQIHLTEPPGDILVFLTGQEEIDTACEILYERM
KSLGPDVPELIIILPVYSALPSEMOTRIFDPAPPGRKVVATNIAETSLTIDGIYVVDPGFVKQKVYNSKTGIDQLVVTPISSQAQAKQ
RAGRAGRTGPGKCYRLYTERAYRDEMLTTNVPEIQRTNLASTVLSLKAMGINDLLSDFMDAPPMETLITAMEQLYTLGALDDEGLLTR
LGRRMAEFPLEPMLCKMLIMSVHLGCSEEMLTIVSMLSVQNVFYRPKDKQALADQKKAKFHQTEGDHLLTLLAVYNSWKNK

hPrp22 - H9 264-H-904 641 AS / 72,0 kDa / pI 5,28

IGDIYNGKVTSIMQFGCFVQLEGLRKRWEGLVHISELRREGRVANADVSKGQVRVKVLSFTGKTSLSMKDQVDETGEDLNPNNRR
NLVGETNEETSMRNPDRPTHLSLVSAPVEEDDSL ERKRLTRISDPEKWEIKQMIANVLSKEEFPDFDEETGILPKVDDEEDEDLEIEL
VEEEPPFLRGHTKQSMDSPIKIVKNPDGSLQAAMMQSALAKERRELKQAQREAEEMDSIPMGLNKHWDPLPDAEGRQIAANMRGIGM
MPNDIPEWKKHAFGGNKASYGKKTQMSILEQRESLPIYKLKEQLVQAVHDNQILIVIGETGSGKTTQITQYLAEGYTSRGKIGCTQPR
RVAAMSAKRVSEEFGCCLGQEVGYTIRFEDCTSPETVIKYM TDGMLLRECLIDPDLTQYAIIMLDEAHERTIHTDVLFGLLKKTQVQR
QDKMLIVTSATLDAVKFSQYFYEAPIFTIPGRTPVEILYTKPEPTYLDASLITVMQIHLTEPPGDILVFLTGQEEIDTACEILYERM
KSLGPDVPELIIILPVYSALPSEMOTRIFDPAPPGRKVVATNIAETSLTIDGIYVVDPGFVKQKVYNSKTGIDQLVVTPISSQAQAKQ
RAGRAGRTGPGKCYRLYT

hPrp22 - H10 264-H-750 487 AS / 55,1 kDa / pI 5,42

IGDIYNGKVTSIMQFGCFVQLEGLRKRWEGLVHISELRREGRVANADVSKGQVRVKVLSFTGKTSLSMKDQVDETGEDLNPNNRR
NLVGETNEETSMRNPDRPTHLSLVSAPVEEDDSL ERKRLTRISDPEKWEIKQMIANVLSKEEFPDFDEETGILPKVDDEEDEDLEIEL
VEEEPPFLRGHTKQSMDSPIKIVKNPDGSLQAAMMQSALAKERRELKQAQREAEEMDSIPMGLNKHWDPLPDAEGRQIAANMRGIGM
MPNDIPEWKKHAFGGNKASYGKKTQMSILEQRESLPIYKLKEQLVQAVHDNQILIVIGETGSGKTTQITQYLAEGYTSRGKIGCTQPR
RVAAMSAKRVSEEFGCCLGQEVGYTIRFEDCTSPETVIKYM TDGMLLRECLIDPDLTQYAIIMLDEAHERTIHTDVLFGLLKKTQVQR
QDKMLIVTSATLDAVKFSQYFYEAPIFTIPGRTPVEILYTKPEPTYLDASLITVMQIHLTEPPGDILVFLTGQEEIDTACEILYERM
KSLGPDVPELIIILPVYSALPSEMOTRIFDPAPPGRKVVATNIAETSLTIDGIYVVDPGFVKQKVYNSKTGIDQLVVTPISSQAQAKQ
RAGRAGRTGPGKCYRLYT

hPrp22 - H11 264-H-561 298 AS / 33,7 kDa / pI 5,18

IGDIYNGKVTSIMQFGCFVQLEGLRKRWEGLVHISELRREGRVANADVSKGQVRVKVLSFTGKTSLSMKDQVDETGEDLNPNNRR
NLVGETNEETSMRNPDRPTHLSLVSAPVEEDDSL ERKRLTRISDPEKWEIKQMIANVLSKEEFPDFDEETGILPKVDDEEDEDLEIEL
VEEEPPFLRGHTKQSMDSPIKIVKNPDGSLQAAMMQSALAKERRELKQAQREAEEMDSIPMGLNKHWDPLPDAEGRQIAANMRGIGM
MPNDIPEWKKHAFGGNKASYGKKTQMSILEQ

hPrp22 - H12 264-H-351 88 AS / 9,9 kDa / pI 9,58

IGDIYNGKVTSIMQFGCFVQLEGLRKRWEGLVHISELRREGRVANADVSKGQVRVKVLSFTGKTSLSMKDQVDETGEDLNPNNR

hPrp22 - H13 564-H-1183 620 AS / 70,2 kDa / pI 6,27

SLPIYKLKEQLVQAVHDNQILIVIGETGSGKTTQITQYLAEGYTSRGKIGCTQPRRVAAMSAKRVSEEFGCCLGQEVGYTIRFEDCT
SPETVIKYM TDGMLLRECLIDPDLTQYAIIMLDEAHERTIHTDVLFGLLKKTQVQRQDKMLIVTSATLDAVKFSQYFYEAPIFTIPGR
TPVEILYTKPEPTYLDASLITVMQIHLTEPPGDILVFLTGQEEIDTACEILYERMKSLGPDVPELIIILPVYSALPSEMOTRIFDPAPP
GSRKVVATNIAETSLTIDGIYVVDPGFVKQKVYNSKTGIDQLVVTPISSQAQAKRAGRAGRTGPGKCYRLYTERAYRDEMLTTNVPE
IQRTNLASTVLSLKAMGINDLLSDFMDAPPMETLITAMEQLYTLGALDDEGLLTRLGRRMAEFPLEPMLCKMLIMSVHLGCSEEMLT
IVSMLSVQNVFYRPKDKQALADQKKAKFHQTEGDHLLTLLAVYNSWKNKFSNPWCYENFIQARSLRRAQDIRKQMLGIMDRHKLDDVSCG
KSTVRVQKAICSGFFRNAAKDPQEGYRTLIDQVVYIHPSSALFNRQPEWVVYHELVLTKEYMREVTITDPRWLVEFAPAFFKV

hPrp22 - H14 564-H-1055 492 AS / 55,2 kDa / pI 5,33

SLPIYKLKEQLVQAVHDNQILIVIGETGSGKTTQITQYLAEGYTSRGKIGCTQPRRVAAMSAKRVSEEFGCCLGQEVGYTIRFEDCT
SPETVIKYM TDGMLLRECLIDPDLTQYAIIMLDEAHERTIHTDVLFGLLKKTQVQRQDKMLIVTSATLDAVKFSQYFYEAPIFTIPGR
TPVEILYTKPEPTYLDASLITVMQIHLTEPPGDILVFLTGQEEIDTACEILYERMKSLGPDVPELIIILPVYSALPSEMOTRIFDPAPP
GSRKVVATNIAETSLTIDGIYVVDPGFVKQKVYNSKTGIDQLVVTPISSQAQAKRAGRAGRTGPGKCYRLYTERAYRDEMLTTNVPE
IQRTNLASTVLSLKAMGINDLLSDFMDAPPMETLITAMEQLYTLGALDDEGLLTRLGRRMAEFPLEPMLCKMLIMSVHLGCSEEMLT
IVSMLSVQNVFYRPKDKQALADQKKAKFHQTEGDHLLTLLAVYNSWKNK

hPrp22 - H15 564-H-904 341 AS / 38,0 kDa / pI 5,43

SLPIYKLKEQLVQAVHDNQILIVIGETGSGKTTQITQYLAEGYTSRGKIGCTQPRRVAAMSAKRVSEEFGCCLGQEVGYTIRFEDCT
SPETVIKYM TDGMLLRECLIDPDLTQYAIIMLDEAHERTIHTDVLFGLLKKTQVQRQDKMLIVTSATLDAVKFSQYFYEAPIFTIPGR
TPVEILYTKPEPTYLDASLITVMQIHLTEPPGDILVFLTGQEEIDTACEILYERMKSLGPDVPELIIILPVYSALPSEMOTRIFDPAPP
GSRKVVATNIAETSLTIDGIYVVDPGFVKQKVYNSKTGIDQLVVTPISSQAQAKRAGRAGRTGPGKCYRLYT

hPrp22 - H16 564-H-750 187 AS / 21,1 kDa / pI 6,30

SLPIYKLKEQLVQAVHDNQILIVIGETGSGKTTQITQYLAEGYTSRGKIGCTQPRRVAAMSAKRVSEEFGCCLGQEVGYTIRFEDCT
SPETVIKYM TDGMLLRECLIDPDLTQYAIIMLDEAHERTIHTDVLFGLLKKTQVQRQDKMLIVTSATLDAVKFSQYFYEAPIFTIPGR
TPVEILYTK

hPrp22 - H17 782-H-1183 402 AS / 45,7 kDa / pI 8,35

GQEEIDTACEILYERMKSLGPDVPELIIILPVYSALPSEMOTRIFDPAPPGRKVVATNIAETSLTIDGIYVVDPGFVKQKVYNSKTG
IDQLVVTPISSQAQAKRAGRAGRTGPGKCYRLYTERAYRDEMLTTNVPEIQRTNLASTVLSLKAMGINDLLSDFMDAPPMETLITAME
QLYTLGALDDEGLLTRLGRRMAEFPLEPMLCKMLIMSVHLGCSEEMLTIVSMLSVQNVFYRPKDKQALADQKKAKFHQTEGDHLLTLLAV

YNSWKNKFSNPWCYENFIQARSLRRAQDIRKQMLGIMDRHKLDDVSCGKSTVRVQKAICSGFFRNAAKKDPQEGYRTLIDQQVVYIHP
SSALFNRQPEWVVYHELVLTTKEYMREVTIDPRWLVEFAPAFFKV

hPrp22 - H18 782-H-1055 274 AS / 30,6 kDa / pI 5,54
GQEEIDTACEILYERMKSLGPDVPELIIIPVYSALPSEMQRIFDPAPPGRKVVIIATNIAETSLTIDGIYVVDPGFVKQKQVYNSKTG
IDQLVVTPISSQAQAKQAGRAGRTGPGKCYRLYTERAYRDEMLTTNVEIQRTNLASTVLSLKAMGINDLLSDFMDAPPMETLITAME
QLYTLGALDDEGLLTRLGRRMAEFPLEMPLCKMLIMSVHLGCSEEMLTIVSMLSVQNVFYRPDKQALADQKKAKFHQTEGDHLLTLLAV
YNSWKNK

hPrp22 - H19 782-H-904 123 AS / 13,5 kDa / pI 7,93
GQEEIDTACEILYERMKSLGPDVPELIIIPVYSALPSEMQRIFDPAPPGRKVVIIATNIAETSLTIDGIYVVDPGFVKQKQVYNSKTG
IDQLVVTPISSQAQAKQAGRAGRTGPGKCYRLYT

hPrp22 - H20 950-H-1183 234 AS / 27,2 kDa / pI 8,93
PMTLITAMEQLYTLGALDDEGLLTRLGRRMAEFPLEMPLCKMLIMSVHLGCSEEMLTIVSMLSVQNVFYRPDKQALADQKKAKFHQT
EGDHLTLLAVYNSWKNKFSNPWCYENFIQARSLRRAQDIRKQMLGIMDRHKLDDVSCGKSTVRVQKAICSGFFRNAAKKDPQEGYRTL
IDQQVVYIHPSSALFNRQPEWVVYHELVLTTKEYMREVTIDPRWLVEFAPAFFKV

hPrp22 - H21 950-H-1055 106 AS / 12,1 kDa / pI 5,89
PMTLITAMEQLYTLGALDDEGLLTRLGRRMAEFPLEMPLCKMLIMSVHLGCSEEMLTIVSMLSVQNVFYRPDKQALADQKKAKFHQT
EGDHLTLLAVYNSWKNK

hPrp22 - H22 1068-H-1183 116 AS / 13,6 kDa / pI 9,74
QVSLRRAQDIRKQMLGIMDRHKLDDVSCGKSTVRVQKAICSGFFRNAAKKDPQEGYRTLIDQQVVYIHPSSALFNRQPEWVVYHELVL
TTKEYMREVTIDPRWLVEFAPAFFKV

Sequenzübersicht aller klonierter Konstrukte von hPrp2

hPrp2 1041 AS / 119,2 kDa / pI 6,31
MATPAGLERWVQDELHSLVGLSERHVAQFLIGTAQRCTSAEEFVQRLRDTDTLDLSPARDFALRLWNKVPRKAVVEKPARAAEREARE
LLEKNRSYRLLEDSEESSEETVSRAGSSSLQKKRKKRHLRKKREEEEEASEKGKKKTGGSKQQTKEPSEDEWERTERERLQDLER
DFAERVRQRDKDRTRNVLEERSDKKAYEEAQKRLKMAEEDRKAMVPELRKKSREYLAKREREKLEDLEAELEDEEFLFGDVELSRHER
QELKYKRRVRDLAREYRAAGEQEKL EATNRYHMPKETRGQPARAVDLVEEESGAPGEEQRRWEEARLGAASLKFGARDAASQEPKYQLV
LEEEETIEFVRATQLQGDEEPSAPPTSTQAQKQESIQAVRRSLPVFPFREELAAIANHQVLIIEGETGSGKTTQIPQYLFEEGYTNKG
MKIACQPRRVAAMSVAARVAREMGVKGNEVGYSIRFEDCTSERTVLRMTDGMMLREFLSEPDLASYSVVMVDEAHERTLHTDILFG
LTKDVARFRPELKVVASATMDTARFSTFFDDAPVFRIPGRRFPVDIFYTKAPEADYLEACVSVLQIHVTQPPGDILVFLTGQEEIEA
ACEMLQDRCCRRLGSKIRELLVLPYANLPSDMQARIFQPTPPGARKVVATNIAETSLTIEGIIYVLDPGFCKQKQSYNPRGTMESLTVT
PCSKASANQRAGRAGRVAAGKCFRLYTAWAYQHELEETTVEIQRTSLGNVLLKSLGIHDLMHDFDLPDPYETLLALEQLYALGA
LNHLGELTTSGRKMAELPVPDMLSKMILASEKYSCEEILTVAAMLSVNNSIFYRPKDKVVHADNARVNFLLPGGDHLVLLNVTQWAE
SGYSSQWCYENFVQFRSMRRARDVREQLLEGLLERVEVGLSSCQGDYIRVRKAITAGFYHTARLTRSGYRTVKQQQTVFIHPNSSLFEQ
QPRWLLYHELVLTTKEFMRQVLEIESSWLLVAPHYKAKELEDHPHAKMPKKIGKTREELG

hPrp2 - D1 9-D-1019 1011 AS / 116,0 kDa / pI 6,37
RWVQDELHSLVGLSERHVAQFLIGTAQRCTSAEEFVQRLRDTDTLDLSPARDFALRLWNKVPRKAVVEKPARAAEREAREALLEKNRSY
RLLEDSEESSEETVSRAGSSSLQKKRKKRHLRKKREEEEEASEKGKKKTGGSKQQTKEPSEDEWERTERERLQDLERDFAERVR
QRDKDRTRNVLEERSDKKAYEEAQKRLKMAEEDRKAMVPELRKKSREYLAKREREKLEDLEAELEDEEFLFGDVELSRHERQELKYKRR
VRDLAREYRAAGEQEKL EATNRYHMPKETRGQPARAVDLVEEESGAPGEEQRRWEEARLGAASLKFGARDAASQEPKYQLVLEEEETIE
FVRATQLQGDEEPSAPPTSTQAQKQESIQAVRRSLPVFPFREELAAIANHQVLIIEGETGSGKTTQIPQYLFEEGYTNKGMIACQPR
RVAAMSVAARVAREMGVKGNEVGYSIRFEDCTSERTVLRMTDGMMLREFLSEPDLASYSVVMVDEAHERTLHTDILFGLIKDVARF
RPELKVVASATMDTARFSTFFDDAPVFRIPGRRFPVDIFYTKAPEADYLEACVSVLQIHVTQPPGDILVFLTGQEEIEAACEMLQDR
CCRRLGSKIRELLVLPYANLPSDMQARIFQPTPPGARKVVATNIAETSLTIEGIIYVLDPGFCKQKQSYNPRGTMESLTVTPCSKASAN
QRAGRAGRVAAGKCFRLYTAWAYQHELEETTVEIQRTSLGNVLLKSLGIHDLMHDFDLPDPYETLLALEQLYALGALNHLGELT
TSGRKMAELPVPDMLSKMILASEKYSCEEILTVAAMLSVNNSIFYRPKDKVVHADNARVNFLLPGGDHLVLLNVTQWAE
YENFVQFRSMRRARDVREQLLEGLLERVEVGLSSCQGDYIRVRKAITAGFYHTARLTRSGYRTVKQQQTVFIHPNSSLFEQPRWLLYH
ELVLTTKEFMRQVLEIESSWLLVAPHYKAKE

hPrp2 - D2 9-D-891 883 AS / 100,7 kDa / pI 5,92
RWVQDELHSLVGLSERHVAQFLIGTAQRCTSAEEFVQRLRDTDTLDLSPARDFALRLWNKVPRKAVVEKPARAAEREAREALLEKNRSY
RLLEDSEESSEETVSRAGSSSLQKKRKKRHLRKKREEEEEASEKGKKKTGGSKQQTKEPSEDEWERTERERLQDLERDFAERVR
QRDKDRTRNVLEERSDKKAYEEAQKRLKMAEEDRKAMVPELRKKSREYLAKREREKLEDLEAELEDEEFLFGDVELSRHERQELKYKRR
VRDLAREYRAAGEQEKL EATNRYHMPKETRGQPARAVDLVEEESGAPGEEQRRWEEARLGAASLKFGARDAASQEPKYQLVLEEEETIE
FVRATQLQGDEEPSAPPTSTQAQKQESIQAVRRSLPVFPFREELAAIANHQVLIIEGETGSGKTTQIPQYLFEEGYTNKGMIACQPR
RVAAMSVAARVAREMGVKGNEVGYSIRFEDCTSERTVLRMTDGMMLREFLSEPDLASYSVVMVDEAHERTLHTDILFGLIKDVARF
RPELKVVASATMDTARFSTFFDDAPVFRIPGRRFPVDIFYTKAPEADYLEACVSVLQIHVTQPPGDILVFLTGQEEIEAACEMLQDR
CCRRLGSKIRELLVLPYANLPSDMQARIFQPTPPGARKVVATNIAETSLTIEGIIYVLDPGFCKQKQSYNPRGTMESLTVTPCSKASAN
QRAGRAGRVAAGKCFRLYTAWAYQHELEETTVEIQRTSLGNVLLKSLGIHDLMHDFDLPDPYETLLALEQLYALGALNHLGELT
TSGRKMAELPVPDMLSKMILASEKYSCEEILTVAAMLSVNNSIFYRPKDKVVHADNARVNFLLPGGDHLVLLNVTQWAE

hPrp2 - D3 9-D-745 737 AS / 84,4 kDa / pI 6,52
RWVQDELHSLVGLSERHVAQFLIGTAQRCTSAEEFVQRLRDTDTLDLSPARDFALRLWNKVPRKAVVEKPARAAEREAREALLEKNRSY
RLLEDSEESSEETVSRAGSSSLQKKRKKRHLRKKREEEEEASEKGKKKTGGSKQQTKEPSEDEWERTERERLQDLERDFAERVR
QRDKDRTRNVLEERSDKKAYEEAQKRLKMAEEDRKAMVPELRKKSREYLAKREREKLEDLEAELEDEEFLFGDVELSRHERQELKYKRR
VRDLAREYRAAGEQEKL EATNRYHMPKETRGQPARAVDLVEEESGAPGEEQRRWEEARLGAASLKFGARDAASQEPKYQLVLEEEETIE
FVRATQLQGDEEPSAPPTSTQAQKQESIQAVRRSLPVFPFREELAAIANHQVLIIEGETGSGKTTQIPQYLFEEGYTNKGMIACQPR
RVAAMSVAARVAREMGVKGNEVGYSIRFEDCTSERTVLRMTDGMMLREFLSEPDLASYSVVMVDEAHERTLHTDILFGLIKDVARF
RPELKVVASATMDTARFSTFFDDAPVFRIPGRRFPVDIFYTKAPEADYLEACVSVLQIHVTQPPGDILVFLTGQEEIEAACEMLQDR
CCRRLGSKIRELLVLPYANLPSDMQARIFQPTPPGARKVVATNIAETSLTIEGIIYVLDPGFCKQKQSYNPRGTMESLTVTPCSKASAN
QRAGRAGRVAAGKCFRLYTAWAYQHELEETTVEIQRTSLGNVLLKSLGIHDLMHDFDLPDPYETLLALEQLYALGALNHLGELT
TSGRKMAELPVPDMLSKMILASEKYSCEEILTVAAMLSVNNSIFYRPKDKVVHADNARVNFLLPGGDHLVLLNVTQWAE

hPrp2 - D4 9-D-585 577 AS / 66,8 kDa / pI 6,16
RWVQDELHSLVGLSERHVAQFLIGTAQRCTSAEEFVQRLRDTDTLDLSPARDFALRLWNKVPRKAVVEKPARAAEREAREALLEKNRSY
RLLEDSEESSEETVSRAGSSSLQKKRKKRHLRKKREEEEEASEKGKKKTGGSKQQTKEPSEDEWERTERERLQDLERDFAERVR
QRDKDRTRNVLEERSDKKAYEEAQKRLKMAEEDRKAMVPELRKKSREYLAKREREKLEDLEAELEDEEFLFGDVELSRHERQELKYKRR
VRDLAREYRAAGEQEKL EATNRYHMPKETRGQPARAVDLVEEESGAPGEEQRRWEEARLGAASLKFGARDAASQEPKYQLVLEEEETIE
FVRATQLQGDEEPSAPPTSTQAQKQESIQAVRRSLPVFPFREELAAIANHQVLIIEGETGSGKTTQIPQYLFEEGYTNKGMIACQPR
RVAAMSVAARVAREMGVKGNEVGYSIRFEDCTSERTVLRMTDGMMLREFLSEPDLASYSVVMVDEAHERTLHTDILFGLIKDVARF
RPELKVVASATMDTARFSTFFDDAPVFRIPGRRFPVDIFYTK

hPrp2 - D5 9-D-371 363 AS / 42,8 kDa / pI 6,43
 RWVQDELHSLGLSERHVAQFLIGTAQRCTSAEEFVQRLRDTDTLDLSPARDFALRLWNKVPRKAVVEKPARAAEREARALLEKNRSY
 RLLLEDSEESSEETVSRAGSSLQKKRKKRHLRKKREEEEEEEASEKGKKKTGGSKQTEKPESEDEWERTERERLQDLEERDAFAERV
 QRDKDRTRNVLEERSDKKAYEEAQKRLKMAEEDRKAMVPELKKSRREYLAKREREKLEDEAELEADEEFLFGDVELSRHERQELKYKRR
 VRDLAREYRAAGEQEKLATNRYHMPKETRGQPARAVDLVEEESGAPGEEQRRWEEARLGAASLKFGARDAASQEPKYQLVLEEEETIE
 FVRATQL

hPrp2 - D6 385-D-1019 635 AS / 71,9 kDa / pI 6,77
 QAQQKESIQAVRRSLPVFPFREELLAIAIHQVLIIEGETGSGKTTQIPQYLFEEGYTNKGMIACQPRRVAAMSVAARVAREMGVKL
 GNEVGYSIRFEDCTSERVLRMTDGMLLREFLSEPDLASYSVMVDEAHERTLHTDILFGLIKDVARFRPELKVVASATMDTARFST
 FFDDAPVFRIPGRFRFPVDIFYTKAPEADYLEACVVSVLQIHVTQPPGDILVFLTGQEEIEAACEMLDQRCRRLGSKIRELLVLPYIYANL
 PSDMQARIFQPTPPGARKVVVATNIAETSLTIEGIIYVLDPGFCKQKSYNPRTGMEISLTVTPCSKASANQRAGRAGRVAAGKCFRLYTA
 WAYQHELEETTVEPIQRTSLGNVVLKSLGIHDLMHDFLDPPPYETLLALEQLYALGALNHLGELTTSGRKMAELPVDPMLSKMIL
 ASEKYSCEEILTVAAMLSVNNSIFYRPKDKVVHADNARVNFLLPGGDHLVLLNVYTQWAESEGYSSQWCYENFVQFRSMRRARDVREQL
 EGLLERVEVGLSSCQGDYIRVRKAITAGYFYHTARLTRSGYRTVKQQQTVFIHPNSSLFEQQPRWLLYHELVLTTKEFMRQVLEIESSW
 LLEVAPHYYAK

hPrp2 - D7 385-D-891 507 AS / 56,6 kDa / pI 5,90
 QAQQKESIQAVRRSLPVFPFREELLAIAIHQVLIIEGETGSGKTTQIPQYLFEEGYTNKGMIACQPRRVAAMSVAARVAREMGVKL
 GNEVGYSIRFEDCTSERVLRMTDGMLLREFLSEPDLASYSVMVDEAHERTLHTDILFGLIKDVARFRPELKVVASATMDTARFST
 FFDDAPVFRIPGRFRFPVDIFYTKAPEADYLEACVVSVLQIHVTQPPGDILVFLTGQEEIEAACEMLDQRCRRLGSKIRELLVLPYIYANL
 PSDMQARIFQPTPPGARKVVVATNIAETSLTIEGIIYVLDPGFCKQKSYNPRTGMEISLTVTPCSKASANQRAGRAGRVAAGKCFRLYTA
 WAYQHELEETTVEPIQRTSLGNVVLKSLGIHDLMHDFLDPPPYETLLALEQLYALGALNHLGELTTSGRKMAELPVDPMLSKMIL
 ASEKYSCEEILTVAAMLSVNNSIFYRPKDKVVHADNARVNFLLPGGDHLVLLNVYTQWAESEGYSSQWCYENFVQFRSMRRARDVREQL
 EGLLERVEVGLSSCQGDYIRVRKAITAGYFYHTARLTRSGYRTVKQQQTVFIHPNSSLFEQQPRWLLYHELVLTTKEFMRQVLEIESSW
 LLEVAPHYYAK

hPrp2 - D8 385-D-745 361 AS / 40,3 kDa / pI 8,11
 QAQQKESIQAVRRSLPVFPFREELLAIAIHQVLIIEGETGSGKTTQIPQYLFEEGYTNKGMIACQPRRVAAMSVAARVAREMGVKL
 GNEVGYSIRFEDCTSERVLRMTDGMLLREFLSEPDLASYSVMVDEAHERTLHTDILFGLIKDVARFRPELKVVASATMDTARFST
 FFDDAPVFRIPGRFRFPVDIFYTKAPEADYLEACVVSVLQIHVTQPPGDILVFLTGQEEIEAACEMLDQRCRRLGSKIRELLVLPYIYANL
 PSDMQARIFQPTPPGARKVVVATNIAETSLTIEGIIYVLDPGFCKQKSYNPRTGMEISLTVTPCSKASANQRAGRAGRVAAGKCFRLYTA
 WAYQH

hPrp2 - D9 385-D-585 201 AS / 22,8 kDa / pI 7,04
 QAQQKESIQAVRRSLPVFPFREELLAIAIHQVLIIEGETGSGKTTQIPQYLFEEGYTNKGMIACQPRRVAAMSVAARVAREMGVKL
 GNEVGYSIRFEDCTSERVLRMTDGMLLREFLSEPDLASYSVMVDEAHERTLHTDILFGLIKDVARFRPELKVVASATMDTARFST
 FFDDAPVFRIPGRFRFPVDIFYTK

hPrp2 - D10 617-D-1019 403 AS / 45,8 kDa / pI 8,08
 GQEEIEAACEMLDQRCRRLGSKIRELLVLPYIYANLPSDMQARIFQPTPPGARKVVVATNIAETSLTIEGIIYVLDPGFCKQKSYNPRTG
 MESLTVTPCSKASANQRAGRAGRVAAGKCFRLYTAWAYQHELEETTVEPIQRTSLGNVVLKSLGIHDLMHDFLDPPPYETLLALE
 QLYALGALNHLGELTTSGRKMAELPVDPMLSKMILASEKYSCEEILTVAAMLSVNNSIFYRPKDKVVHADNARVNFLLPGGDHLVLLN
 VYTQWAESEGYSSQWCYENFVQFRSMRRARDVREQLGGLLERVEVGLSSCQGDYIRVRKAITAGYFYHTARLTRSGYRTVKQQQTVFIHP
 NSSLFEQQPRWLLYHELVLTTKEFMRQVLEIESSWLEVAPHYYAK

hPrp2 - D11 617-D-891 275 AS / 30,5 kDa / pI 6,11
 GQEEIEAACEMLDQRCRRLGSKIRELLVLPYIYANLPSDMQARIFQPTPPGARKVVVATNIAETSLTIEGIIYVLDPGFCKQKSYNPRTG
 MESLTVTPCSKASANQRAGRAGRVAAGKCFRLYTAWAYQHELEETTVEPIQRTSLGNVVLKSLGIHDLMHDFLDPPPYETLLALE
 QLYALGALNHLGELTTSGRKMAELPVDPMLSKMILASEKYSCEEILTVAAMLSVNNSIFYRPKDKVVHADNARVNFLLPGGDHLVLLN
 VYTQWAESEGYSSQWCYENFVQFRSMRRARDVREQLGGLLERVEVGLSSCQGDYIRVRKAITAGYFYHTARLTRSGYRTVKQQQTVFIHP
 NSSLFEQQPRWLLYHELVLTTKEFMRQVLEIESSWLEVAPHYYAK

hPrp2 - D12 617-D-745 129 AS / 14,2 kDa / pI 9,27
 GQEEIEAACEMLDQRCRRLGSKIRELLVLPYIYANLPSDMQARIFQPTPPGARKVVVATNIAETSLTIEGIIYVLDPGFCKQKSYNPRTG
 MESLTVTPCSKASANQRAGRAGRVAAGKCFRLYTAWAYQH

hPrp2 - D13 785-D-1019 235 AS / 27,2 kDa / pI 8,13
 PYETLLALEQLYALGALNHLGELTTSGRKMAELPVDPMLSKMILASEKYSCEEILTVAAMLSVNNSIFYRPKDKVVHADNARVNFLL
 PGGDHLVLLNVYTQWAESEGYSSQWCYENFVQFRSMRRARDVREQLGGLLERVEVGLSSCQGDYIRVRKAITAGYFYHTARLTRSGYRTV
 KQQQTVFIHPNSSLFEQQPRWLLYHELVLTTKEFMRQVLEIESSWLEVAPHYYAK

hPrp2 - D14 785-D-891 107 AS / 11,9 kDa / pI 5,22
 PYETLLALEQLYALGALNHLGELTTSGRKMAELPVDPMLSKMILASEKYSCEEILTVAAMLSVNNSIFYRPKDKVVHADNARVNFLL
 PGGDHLVLLNVYTQWAESEGYSSQWCYENFVQFRSMRRARDVREQLGGLLERVEVGLSSCQGDYIRVRKAITAGYFYHTARLTRSGYRTV
 KQQQTVFIHPNSSLFEQQPRWLLYHELVLTTKEFMRQVLEIESSWLEVAPHYYAK

hPrp2 - D15 905-D-1019 115 AS / 13,7 kDa / pI 9,72
 FRSMRRARDVREQLGGLLERVEVGLSSCQGDYIRVRKAITAGYFYHTARLTRSGYRTVKQQQTVFIHPNSSLFEQQPRWLLYHELVLTT
 KEFMRQVLEIESSWLEVAPHYYAK

Polylinker (MCS) der gewählten Vektoren mit allen verwendeten Restriktionsschnittstellen (rot) und Affinitätssequenzen (blau)

pPR-IBA1-MCS

BamHI / XhoI
 ATGGGAGACCGGGTCCCGAATTCGAGCTCGGTACCCGGG**GATCC**...**CTCGAG**GTCGACCTGCAGGGGGACCATGGTCTCAGCGCT**TG**
GAGCCACCCGAGTTCGAAAAA

EcoRI / XhoI
 ATGGGAGACCGGGTCCCGAATTC...**CTCGAG**GTCGACCTGCAGGGGGACCATGGTCTCAGCGCT**TGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAA**

pGex-6P1-MCS**BamHI / XhoI**

ATGTCCCTATACTAGGTTATTGGAAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTTGGAAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGA
 GCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCTTTATTATATTG
 ATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTGTCCAAAAGAGCGT
 GCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAA
 AGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAAATGTTGGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAA
 CCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCAATGTGCCTGGATGCGTCCCAAAATAGTTTGT
 TTTAAAAAACGTATTGAAGCTATCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTCAGGGCTGGCAAGC
 CACGTTTGGTGGTGGCGACCATCTCCAAAATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCCGGAATTC...CTCGAGCGGCCGCATC
 GTGAC

EcoRI / XhoI

ATGTCCCTATACTAGGTTATTGGAAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACTTCTTTTGGAAATATCTTGAAGAAAAATATGAAGA
 GCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAAATGGCGAAACAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCTTTATTATATTG
 ATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTGTCCAAAAGAGCGT
 GCAGAGATTTCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGA TACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCAA
 AGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAAATGTTGGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAA
 CCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCAATGTGCCTGGATGCGTCCCAAAATAGTTTGT
 TTTAAAAAACGTATTGAAGCTATCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTCAGGGCTGGCAAGC
 CACGTTTGGTGGTGGCGACCATCTCCAAAATCGGATCTGGAAGTTCTGTTCCAGGGGCCCTGGGATCCCGGAATTC...CTCGAGC
 GGCCGCATCGTGAC

pET-21a-MCS**BamHI / XhoI**

ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGGATTC...CTCGAGCACCACCACCACCACCAC

EcoRI / XhoI

ATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGGGATCCGAATTC...CTCGAGCACCACCACCACCACCAC

Vektorabhängige Veränderung der Länge, der Masse und des pI

H1	27-H-1183	1157 aa - 132,2 kD - pI 8,25
H1-pET21	27-H-1183	1179 aa - 134,6 kD - pI 8,24
H1-pGEX	27-H-1183	1395 aa - 159,9 kD - pI 7,32
H1-IBA1	27-H-1183	1193 aa - 136,1 kD - pI 7,54
H2	27-H-1055	1029 aa - 117,1 kD - pI 6,87
H2-pET21	27-H-1055	1051 aa - 119,5 kD - pI 6,94
H2-pGEX	27-H-1055	1267 aa - 144,8 kD - pI 6,46
H2-IBA1	27-H-1055	1065 aa - 121,0 kD - pI 6,43
H3	27-H-904	878 aa - 99,9 kD - pI 8,11
H3-pET21	27-H-904	900 aa - 102,4 kD - pI 8,10
H3-pGEX	27-H-904	1116 aa - 127,7 kD - pI 6,91
H3-IBA1	27-H-904	914 aa - 103,9 kD - pI 7,00
H4	27-H-750	724 aa - 83,0 kD - pI 8,76
H4-pET21	27-H-750	746 aa - 85,5 kD - pI 8,76
H4-pGEX	27-H-750	962 aa - 110,7 kD - pI 8,02
H4-IBA1	27-H-750	760 aa - 87,0 kD - pI 8,34
H5	27-H-561	535 aa - 61,7 kD - pI 9,12
H5-pET21	27-H-561	557 aa - 64,1 kD - pI 9,12
H5-pGEX	27-H-561	773 aa - 89,4 kD - pI 8,33
H5-IBA1	27-H-561	571 aa - 65,6 kD - pI 8,75
H6	27-H-351	325 aa - 37,8 kD - pI 10,06
H6-pET21	27-H-351	347 aa - 40,3 kD - pI 10,06
H6-pGEX	27-H-351	563 aa - 65,6 kD - pI 9,35
H6-IBA1	27-H-351	361 aa - 41,8 kD - pI 9,86
H7	264-H-1183	920 aa - 104,2 kD - pI 5,70
H7-pET21	264-H-1183	942 aa - 106,7 kD - pI 5,89
H7-pGEX	264-H-1183	1158 aa - 132,0 kD - pI 5,74
H7-IBA1	264-H-1183	956 aa - 10,8 kD - pI 5,59
H8	264-H-1055	792 aa - 89,1 kD - pI 5,26
H8-pET21	264-H-1055	814 aa - 91,6 kD - pI 5,45
H8-pGEX	264-H-1055	1030 aa - 116,9 kD - pI 5,39
H8-IBA1	264-H-1055	828 aa - 93,1 kD - pI 5,21
H9	264-H-904	641 aa - 72,0 kD - pI 5,28
H9-pET21	264-H-904	663 aa - 74,4 kD - pI 5,52
H9-pGEX	264-H-904	879 aa - 99,7 kD - pI 5,43
H9-IBA1	264-H-904	677 aa - 75,6 kD - pI 5,22
H10	264-H-750	487 aa - 55,1 kD - pI 5,42
H10-pET21	264-H-750	509 aa - 57,5 kD - pI 5,72
H10-pGEX	264-H-750	725 aa - 82,8 kD - pI 5,56
H10-IBA1	264-H-750	523 aa - 59,0 kD - pI 5,32

H11	264-H-561	298 aa - 33,7 kD - pI 5,18
H11-pET21	264-H-561	320 aa - 36,2 kD - pI 5,56
H11-pGEX	264-H-561	536 aa - 61,5 kD - pI 5,42
H11-IBA1	264-H-561	334 aa - 37,7 kD - pI 5,10
H12	264-H-351	88 aa - 9,9 kD - pI 9,58
H12-pET21	264-H-351	110 aa - 12,3 kD - pI 9,57
H12-pGEX	264-H-351	326 aa - 37,6 kD - pI 6,73
H12-IBA1	264-H-351	124 aa - 13,9 kD - pI 6,84
H13	564-H-1183	620 aa - 70,2 kD - pI 6,27
H13-pET21	564-H-1183	642 aa - 72,7 kD - pI 6,49
H13-pGEX	564-H-1183	858 aa - 98,0 kD - pI 6,10
H13-IBA1	564-H-1183	656 aa - 74,2 kD - pI 5,94
H14	564-H-1055	492 aa - 55,2 kD - pI 5,33
H14-pET21	564-H-1055	514 aa - 57,6 kD - pI 5,69
H14-pGEX	564-H-1055	730 aa - 82,9 kD - pI 5,52
H14-IBA1	564-H-1055	528 aa - 59,1 kD - pI 5,22
H15	564-H-904	341 aa - 38,0 kD - pI 5,43
H15-pET21	564-H-904	363 aa - 40,4 kD - pI 5,96
H15-pGEX	564-H-904	579 aa - 65,7 kD - pI 5,64
H15-IBA1	564-H-904	377 aa - 42,0 kD - pI 5,25
H16	564-H-750	187 aa - 21,1 kD - pI 6,30
H16-pET21	564-H-750	209 aa - 23,5 kD - pI 6,75
H16-pGEX	564-H-750	425 aa - 48,8 kD - pI 6,00
H16-IBA1	564-H-750	223 aa - 25,1 kD - pI 5,59
H17	782-H-1183	402 aa - 45,7 kD - pI 8,35
H17-pET21	782-H-1183	424 aa - 48,2 kD - pI 8,34
H17-pGEX	782-H-1183	640 aa - 73,5 kD - pI 6,70
H17-IBA1	782-H-1183	438 aa - 49,7 kD - pI 6,73
H18	782-H-1055	274 aa - 30,6 kD - pI 5,54
H18-pET21	782-H-1055	296 aa - 33,1 kD - pI 6,15
H18-pGEX	782-H-1055	512 aa - 58,4 kD - pI 5,72
H18-IBA1	782-H-1055	310 aa - 34,6 kD - pI 5,28
H19	782-H-904	123 aa - 13,5 kD - pI 7,93
H19-pET21	782-H-904	145 aa - 15,9 kD - pI 7,83
H19-pGEX	782-H-904	361 aa - 41,2 kD - pI 6,05
H19-IBA1	782-H-904	159 aa - 17,4 kD - pI 5,42
H20	950-H-1183	234 aa - 27,2 kD - pI 8,93
H20-pET21	950-H-1183	256 aa - 29,6 kD - pI 8,91
H20-pGEX	950-H-1183	472 aa - 54,9 kD - pI 7,19
H20-IBA1	950-H-1183	270 aa - 31,2 kD - pI 7,68
H21	950-H-1055	106 aa - 12,1 kD - pI 5,89
H21-pET21	950-H-1055	128 aa - 14,5 kD - pI 6,49
H21-pGEX	950-H-1055	344 aa - 39,8 kD - pI 5,86
H21-IBA1	950-H-1055	142 aa - 16,1 kD - pI 5,31
H22	1068-H-1183	116 aa - 13,6 kD - pI 9,74
H22-pET21	1068-H-1183	138 aa - 16,0 kD - pI 9,74
H22-pGEX	1068-H-1183	354 aa - 41,3 kD - pI 8,07
H22-IBA1	1068-H-1183	152 aa - 17,6 kD - pI 8,95

D1	9-D-1019	1011 aa - 116,0 kD - pI 6,37
D1-pET21	9-D-1019	1035 aa - 118,7 kD - pI 6,41
D1-pGEX	9-D-1019	1251 aa - 144,0 kD - pI 6,17
D1-IBA1	9-D-1019	1040 aa - 119,2 kD - pI 6,15
D2	9-D-891	883 aa - 100,7 kD - pI 5,92
D2-pET21	9-D-891	907 aa - 103,4 kD - pI 6,03
D2-pGEX	9-D-891	1123 aa - 128,7 kD - pI 5,86
D2-IBA1	9-D-891	912 aa - 103,9 kD - pI 5,78
D3	9-D-745	737 aa - 84,4 kD - pI 6,52
D3-pET21	9-D-745	761 aa - 87,1 kD - pI 6,54
D3-pGEX	9-D-745	977 aa - 112,4 kD - pI 6,17
D3-IBA1	9-D-745	766 aa - 87,6 kD - pI 6,14
D4	9-D-585	577 aa - 66,8 kD - pI 6,16
D4-pET21	9-D-585	601 aa - 69,6 kD - pI 6,27
D4-pGEX	9-D-585	817 aa - 94,9 kD - pI 5,98
D4-IBA1	9-D-585	606 aa - 70,1 kD - pI 5,89

D5	9-D-371	363 aa -	42,8 kD -	pI 6,43
D5-pET21	9-D-371	387 aa -	45,5 kD -	pI 6,49
D5-IBA1	9-D-371	392 aa -	46,1 kD -	pI 5,94
D5-pGEX	9-D-371	603 aa -	70,8 kD -	pI 6,04
D6	385-D-1019	635 aa -	71,9 kD -	pI 6,77
D6-pET21	385-D-1019	659 aa -	74,6 kD -	pI 6,72
D6-pGEX	385-D-1019	875 aa -	99,9 kD -	pI 6,28
D6-IBA1	385-D-1019	664 aa -	75,2 kD -	pI 6,29
D7	385-D-891	507 aa -	56,6 kD -	pI 5,90
D7-pET21	385-D-891	531 aa -	59,3 kD -	pI 6,09
D7-pGEX	385-D-891	747 aa -	84,6 kD -	pI 5,82
D7-IBA1	385-D-891	536 aa -	59,8 kD -	pI 5,66
D8	385-D-745	361 aa -	40,3 kD -	pI 8,11
D8-pET21	385-D-745	385 aa -	43,0 kD -	pI 7,64
D8-pGEX	385-D-745	601 aa -	68,3 kD -	pI 6,36
D8-IBA1	385-D-745	390 aa -	43,6 kD -	pI 6,42
D9	385-D-585	201 aa -	22,8 kD -	pI 7,04
D9-pET21	385-D-585	225 aa -	25,5 kD -	pI 6,76
D9-pGEX	385-D-585	441 aa -	50,8 kD -	pI 6,01
D9-IBA1	385-D-585	230 aa -	26,0 kD -	pI 5,80
D10	617-D-1019	403 aa -	45,8 kD -	pI 8,08
D10-pET21	617-D-1019	427 aa -	48,5 kD -	pI 7,67
D10-pGEX	617-D-1019	643 aa -	73,8 kD -	pI 6,52
D10-IBA1	617-D-1019	432 aa -	49,1 kD -	pI 6,65
D11	617-D-891	275 aa -	30,5 kD -	pI 6,11
D11-pET21	617-D-891	299 aa -	33,2 kD -	pI 6,31
D11-pGEX	617-D-891	515 aa -	58,5 kD -	pI 5,88
D11-IBA1	617-D-891	304 aa -	33,8 kD -	pI 5,66
D12	617-D-745	129 aa -	14,2 kD -	pI 9,27
D12-pET21	617-D-745	153 aa -	17,0 kD -	pI 9,10
D12-pGEX	617-D-745	369 aa -	42,2 kD -	pI 7,07
D12-IBA1	617-D-745	158 aa -	17,5 kD -	pI 8,30
D13	785-D-1019	235 aa -	27,2 kD -	pI 8,13
D13-pET21	785-D-1019	259 aa -	29,9 kD -	pI 7,23
D13-pGEX	785-D-1019	475 aa -	55,2 kD -	pI 6,30
D13-IBA1	785-D-1019	264 aa -	30,5 kD -	pI 6,32
D14	785-D-891	107 aa -	11,9 kD -	pI 5,22
D14-pET21	785-D-891	131 aa -	14,6 kD -	pI 5,94
D14-pGEX	785-D-891	347 aa -	39,9 kD -	pI 5,55
D14-IBA1	785-D-891	136 aa -	15,2 kD -	pI 4,95
D15	905-D-1019	115 aa -	13,7 kD -	pI 9,72
D15-pET21	905-D-1019	139 aa -	16,5 kD -	pI 9,56
D15-pGEX	905-D-1019	355 aa -	41,7 kD -	pI 7,17
D15-IBA1	905-D-1019	144 aa -	17,0 kD -	pI 8,73

RESOLVE Skript für initialen, automatisierten Strukturbau in eine experimentelle Elektronendichtekarte

```
#!/bin/csh
setenv SYMOP /xtal/solve-2.11/lib/symop.lib
setenv SYMINFO /xtal/solve-2.11/lib/syminfo.lib
setenv CCP4_OPEN UNKNOWN
resolve <<EOD > ! resolve.log#
hklin #input.mtz
LABIN FP=FP PHIB=PHIC FOM=FOM SIGFP=SIGFP
hklout #output_resolve.mtz
build_only
no_find_ncs
solvent_content 0.##
seq_file ###.seq
EOD
# Now "resolve.mtz" has the output amplitudes, phases, and figure of merit
# in columns labelled: FP PHIM FOMM. A model of your structure is in resolve.pdb.
```

10. Danksagung

Abschließend möchte ich natürlich nicht auf ein paar warme Worte verzichten.

Mein Dank geht in erster Linie an Ralf Ficner, der die Anfertigung dieser Doktorarbeit erst ermöglicht hat. Er stand mir stets mit gutem Rat beiseite und hat meine Moral nach wissenschaftlichen Tiefschlägen immer wieder aufgebaut.

Desweiteren danke ich Oliver Einsle, der sich nie gegen Fragen aller Art gewehrt und hat stets darauf geachtet hat, dass das letzte Bier an ihn ging.

Auch Achim Dickmanns muss unbedingt gedankt werden. Sein unumstößlicher Optimismus und sein Wille die Abteilung zusammen zu halten, haben mich stets motiviert.

Besonderer Dank gebührt auch Thomas Monecke. Er war mein Begleiter über das komplette Studium und die Promotion. Dabei reichte das Repertoire vom kreativen fachlichen Rat über unglaubliche Böcke bis hin zum Händchenhalten nach privaten Katastrophen.

Auch Daniel Wohlwend sei gedankt, der er ein Intelligenzbolzen par excellence und ein guter Freund geworden ist.

Ich danke Jens Brinkmann für das verlässliche Nicht-Auslassen von friesischen Flachwitzen. Ich danke Eike Schulz für das infernale Lachen nach diesen Witzen.

Desweiteren danke ich den Familienmitgliedern unserer kleinen Helikasefamilie, Jana Schmitzova, Sina Möhlmann und Winni. Allen anderen Mitglieder und Ex-Mitgliedern des MSB wird an dieser Stelle natürlich auch gedankt, da sich niemand geweigert hat mit gutem Rat beiseite zu stehen oder ihn gar anzunehmen. Besonders hervorzuheben ist die selbstlose Hilfe von Markus Rudolph, ohne die die R-Faktoren der Struktur immer noch im roten Bereich drehen würden.

Meine Diplomandin Kristina Lakomek und meinen Praktikanten Marion Lösing und Christian "Schnitzel" Nagel haben ihre Leidenschaft unter meiner Führung stets unter Beweis gestellt. Ich danke ihnen, dass sie all das ohne Murren hingenommen haben. Gerd danke ich nicht.

Schlussendlich möchte ich Marion und Til danken, denen dieses Büchlein auch gewidmet ist. Ich danke ihnen für die außerdienstliche Betreuung und Zerstreuung innerhalb unserer kleinen kaputten Familie. Für Spaß, für Liebe, für Zorn und für Trauer. Auch wenn die Zeiten nicht einfach waren, kommen sie nicht wieder zurück. Ich vermisse jede Sekunde. Ich liebe euch und behalte euch für immer in meinem Herzen.

Lebenslauf

Denis Kudlinzki
Hauptstraße 2
99998 Volkenroda
E-Mail: dkudlin@yahoo.de

Geburtsdatum	18. 10. 1979
Geburtsort	Mühlhausen/Thüringen
Familienstand	ledig
Kinder	1
Staatsbürgerschaft	deutsch

Schulbildung

01. 09. 1986	Grundschule POS Körner
01. 10. 1991	Staatliche Gymnasium Schlotheim
09. 07. 1998	Abschluss der Schulausbildung mit dem Abitur

Wehrdienst

01. 09. 1998 - 25. 07. 1999	Wehrdienst beim 1. Panzergrenadierbataillon 381 Bad Frankenhausen
-----------------------------	---

Studium

23. 11. 1999 - 31. 08. 2004	Biologiestudium (Diplom) an der Universität Göttingen
-----------------------------	---

Promotion

seit dem 01. 09. 2004	an der Universität Göttingen Abt. Mol. Strukturbiologie
-----------------------	---

Göttingen, den 10. 12. 2007