

**Präparation und röntgenkristallographische
Untersuchungen an archaebakteriellen Box C/D
sRNPs und einer neuartigen Glukosyltransferase
aus *Thermotoga maritima* MSB8**

Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Carmen Steinke

aus Attendorn

Göttingen, 2004

D7

Referent: Prof. Dr. Ralf Ficner

Korreferent: Prof. Dr. Oliver Einsle

Tag der mündlichen Prüfung: 03 November 2004

Meinen Eltern

Die Natur ist unerbitterlich und unveränderlich, und es ist ihr gleichgültig, ob die verborgenen Gründe und Arten ihres Handelns dem Menschen verständlich sind oder nicht.

Galileo Galilei

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	1
1. EINLEITUNG.....	2
1.1 THERMOSTABILE MIKROORGANISMEN.....	2
1.2 DIE WELT DER RIBONUKLEINSÄUREN.....	2
1.2.1 KLEINE NUKLEOLÄRE RNAs.....	4
1.2.1.1 C/D-Box snoRNAs.....	5
1.2.1.2 H/ACA-Box snoRNAs.....	7
1.2.1.3 Die Endoribonukleasen RNase MRP und RNase P.....	8
1.2.1.4 Modifizierung zellulärer RNAs durch snoRNPs.....	9
1.3 AMYLOLYTISCHE ENZYME.....	10
1.3.1 Glykosyl-Hydrolase Familie 13.....	12
1.3.1.1 Sequenzeigenheiten und strukturelle Besonderheiten der GHF 13.....	13
1.3.1.2 Die Bindung von Ca ²⁺ an GHF 13 α -Amylasen.....	17
1.3.1.3 Thermostabile α -Amylasen: Strukturelle Voraussetzungen zum Überleben an extremen Standorten.....	17
1.3.2 Glykosyl-Hydrolase Familie 57.....	18
1.3.2.1 Glykosyl-Hydrolase Familien 13 und 57: Besitz eines gemeinsamen Ursprungs?.....	19
1.3.2.2 Amylase B aus <i>Thermotoga maritima</i> MSB8: ein Mitglied der GHF 57.....	19
1.4 ZIELSETZUNG.....	20
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 MATERIALIEN.....	22
2.1.1 Chemikalien.....	22
2.1.2 Kulturmedien, Antibiotika und Medienzusätze.....	22
2.1.3 Bakterienstämme.....	23
2.1.4 Plasmide.....	23
2.1.5 Oligonukleotide.....	24
2.1.6 Restriktionsenzyme.....	25
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	25
2.2.1 Isolierung von DNA aus Bakterien (Plasmidpräparation).....	25
2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	26
2.2.3 Restriktionsanalyse.....	26
2.2.4 Agarosegelelektrophorese.....	27
2.2.5 Herstellung kompetenter Zellen.....	28
2.2.6 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -Zellen.....	28
2.2.7 <i>In vitro</i> Transkription (<i>in vitro</i> -Synthese von RNA).....	29
2.3 BIOCHEMISCHE METHODEN.....	30
2.3.1 Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i>	30
2.3.2 Reinigung der exprimierten Proteine aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	31
2.3.2.1 Zellaufschluß und Hitzedenaturierung.....	31
2.3.2.2 Chromatographische Trennmethode.....	32
2.3.2.3 Ankonzentrierung einer Proteinlösung.....	35
2.3.3 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1979).....	37
2.3.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970).....	37
2.3.5 Protein-Färbemethoden.....	39
2.3.5.1 Coomassie-Proteinfärbung.....	39
2.3.5.2 Silberfärbung nach NESTERENKO et al. (1994).....	40
2.3.6 Band-Shift-Assay.....	41
2.3.7 Rekonstitution des sRNP-Komplexes.....	42
2.3.8 Autoradiographie.....	43
2.4 RÖNTGENKRISTALLOGRAPHISCHE METHODEN.....	43
2.4.1 Kristallisation biologischer Makromoleküle.....	44
2.4.2 Co-Kristallisation und Derivatisierung durch Diffusion (Soaking).....	45
2.4.2.1 Co-Kristallisation von RNA-Protein- und Protein-Protein-Komplexen.....	45
2.4.2.2 Co-Kristallisation und Soaking von AmyB mit verschiedenen Liganden.....	46
2.4.3 Kryo-Konservierung und Montage der Kristalle zur Datensammlung.....	47
2.4.4 Strahlungsquellen.....	48
2.4.4.1 Drehanode.....	49
2.4.4.2 Synchrotron.....	49

INHALTSVERZEICHNIS

2.4.5 Röntgenbeugung am Kristallgitter.....	50
2.4.6 Prozessierung der Meßdaten.....	51
2.4.7 Vergleich der AmyB-Struktur mit bekannten Strukturen	52
3. ERGEBNISSE.....	54
3.1 EXPRESSION UND REINIGUNG DER SRNP-PROTEINE AL7, ANOP56 UND AFIB	54
3.1.1 <i>aL7</i>	54
3.1.2 <i>aNop56</i>	56
3.1.3 <i>aFib</i>	57
3.2 BAND-SHIFT EXPERIMENTE	59
3.3 REKONSTITUTION DES SRNP-KOMPLEXES	60
3.4 KRISTALLISATION DER KOMPLEXE	61
3.4.1 <i>Optimierung der Kristallisationsbedingungen</i>	62
3.4.2 <i>Röntgenbeugungsexperimente</i>	63
3.4.3 <i>Analyse der Komplex-Kristalle</i>	64
3.5 CO-KRISTALLISATION UND SOAKING VON AMYB-KRISTALLEN	65
3.6 ERMITTLUNG VERWANDTER STRUKTUREN MIT HILFE DER DALI-SUCHE	69
3.6.1 <i>Vergleich von AmyB mit der 4-α-Glukanotransferase</i>	71
3.6.2 <i>Vergleich von AmyB mit 1UFA aus Thermus thermophilus Hb8</i>	75
4. DISKUSSION.....	76
4.1 REKONSTITUTION UND KRISTALLISATIONSVERSUCHE EINES SRNP-KOMPLEXES	76
4.2 AUSBLICK: SRNP-KOMPLEX	78
4.3 VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN VON AMYB MIT VERWANDTEN STRUKTUREN	79
4.3.1 <i>Charakteristische Sequenz- und Strukturelemente von AmyB, einem Mitglied der Glykosyl-Hydrolase Familie 57</i>	79
4.3.2 <i>Vergleich von AmyB mit anderen (β,α)₇-Strukturen</i>	81
4.3.2.1 <i>AmyB und die Thermococcus litoralis 4-α-Glukanotransferase</i>	81
4.3.2.2 <i>AmyB und 1UFA</i>	82
4.3.3 <i>Thermostabilität von AmyB und anderen GHF 57 Familienmitgliedern</i>	83
4.4 AUSBLICK: AMYB	84
LITERATURVERZEICHNIS	86
ANHANG	101
A.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	101
A.2 AMINOSÄUREN	103
A.3 PROTEIN-SEQUENZALIGNMENT: AMYB-1UFA	104
A.4 PROTEINSEQUENZEN DER SRNP PROTEINE AL7, ANOP56 UND AFIB	106
A.4.1 <i>aL7</i>	106
A.4.2 <i>aNop56</i>	106
A.4.3 <i>aL7</i>	106

ZUSAMMENFASSUNG

Ribosomale RNAs werden posttranskriptional durch kleine nukleoläre RNAs (snoRNAs) modifiziert. Dabei kommt es zum einen zur Umwandlung von Uridin in Pseudouridin durch die H/ACA-Box snoRNAs und zum anderen zur 2'-O-Methylierung von Ribose durch Box C/D snoRNAs, wobei beide snoRNA-Familien mit spezifischen Proteinen zu kleinen nukleolären Ribonukleoprotein Partikeln (snoRNPs) assembliert sind. In zellkernlosen Prokaryonten konnten homologe RNAs (sRNAs) und Proteine identifiziert werden, die ebenfalls an der Modifizierung von ribosomalen RNAs beteiligt sind.

Ein Komplex aus einer C/D-Box sRNA und den Proteinen aL7, aNop56 und aFibrillarin aus *Sulfolobus solfataricus* konnte rekonstituiert werden. Die Kristallisation des rekonstituierten Komplexes lieferte jedoch nur Kristalle, die aufgrund ihrer geringen Auflösung ($\sim 14 \text{ \AA}$) nicht für eine Strukturaufklärung verwertbar waren. Eine Analyse der Kristalle zeigte des weiteren, daß der rekonstituierte Komplex wieder dissoziierte und nur ein Komplex aus aFibrillarin und einem degradierten aNop56 gebildet worden war.

Das im Jahr 1998 identifizierte Enzym Amylase B aus *Thermotoga maritima* MSB8 wurde aufgrund seiner Fähigkeit, Stärke und deren Abbauprodukte Amylose und Amylopektin an den α -1,4-glykosidischen Bindungen zu spalten, als α -Amylase deklariert. Eine Einordnung der Amylase B in die Glykosyl-Hydrolase Familie 57 wird zum einen durch die fehlenden, für die Glykosyl-Hydrolase Familie 13 (typische α -Amylasen) charakteristischen Konsensus-Sequenzen in Amylase B und zum anderen durch geringe Sequenzähnlichkeiten und einem gleichen Hydrolysemuster zu einem Mitglied der Glykosyl-Hydrolase Familie 57 gestützt. Die Aufklärung der Amylase B-Struktur, in der das strukturell konservierte $(\beta, \alpha)_8$ -Barrel in einer verzerrten und verkürzten Variante das katalytische Zentrum bildet, festigen die Eingliederung. Ein struktureller Vergleich der katalytischen Domäne von Amylase B mit einer verwandten Struktur aus *Thermococcus litoralis*, der 4- α -Glukanotransferase, konnte eine Blockierung der Bindungsstelle durch mehrere Aminosäurereste in Amylase B zeigen.

1. EINLEITUNG

1.1 THERMOSTABILE MIKROORGANISMEN

Mikroorganismen haben sich im Laufe der Evolution perfekt an die verschiedensten Umweltbedingungen angepaßt. So wurden Mikroorganismen identifiziert, die an den extremsten Standorten, wie z.B. Salzlaken, schwefelhaltigen und/oder heißen Quellen, überleben. Dies ist den Mikroorganismen nur möglich, da ihr Stoffwechsel enorm anpassungsfähig und von aerober Autotrophie bis zur anaeroben Heterotrophie alles zu finden ist (DELONG, 2001).

Thermostabile Mikroorganismen, die unterteilt werden können in thermophil (55-80°C) und hyperthermophil (> 80°C), kommen dabei sowohl in den Eubakterien als auch in den Archaeobakterien (Archaea) vor (HOUGH & DANSON, 1999).

Interessanterweise finden sich sowohl bei Eubakterien als auch bei Archaeobakterien Proteine, die neben charakteristischen Sequenzmotiven auch in ihrer Wirkung zu Proteinen in höheren Organismen homolog sind. Da sich archae- und eubakterielle Proteine, im Gegensatz zu Proteinen aus höheren Organismen, leicht in dem gut untersuchten Organismus *Escherichia coli* heterolog exprimieren und anschließend gut und in ausreichender Menge reinigen lassen, wird dieses System häufig verwendet, um Proteine rekombinant herzustellen und anschließend z.B. durch Mutagenesestudien und enzymkinetischen Untersuchungen die funktionellen Mechanismen aufzuklären. Neben der Verwendung biochemischer und molekularbiologischer Methoden wird zur weiteren Klärung von Funktion und Auftreten eines Proteins in einer Zelle oft auch die Struktur der Proteine benötigt. Diese kann z.B. mit Hilfe der Röntgenkristallographie aufgeklärt werden.

1.2 DIE WELT DER RIBONUKLEINSÄUREN

Betrachtet man die heutigen Organismen, stellt man fest, daß sie aus Proteinen bestehen, die aus nur 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind. Die Information, die zum Bau und zur Vervielfältigung der Proteine benötigt wird, ist in den Nuklein-

säuren, die aus 4 Basen bestehen, codiert. Sowohl Proteine als auch Nukleinsäuren leben in einem gegenseitigen Abhängigkeitsverhältnis, d.h. Nukleinsäuren werden zum Aufbau der Proteine benötigt und die Nukleinsäuren werden mit Hilfe der Proteine synthetisiert.

Man ist sich heute jedoch einig, das zu Beginn Information und Funktion in einem Molekül entstanden ist (RNA-Welt Hypothese). Am Anfang war wahrscheinlich eine einfach strukturierte prä-RNA (Ribonukleinsäure; engl.: ribonucleic acid), die später in die heute bekannte, komplexere RNA-Struktur übergegangen ist, als Informationsträger aktiv. Dabei wird angenommen, daß einzelsträngige Nukleinsäure, bestehend aus ca. 50-100 Nukleotiden, in einer primitiven Zelle in der Lage ist, sich durch Ausbilden einer Sekundärstruktur selbst zu stabilisieren, zu replizieren und chemische Reaktionen zu katalysieren. Gestützt wird diese Annahme durch die heute noch existierenden tRNA (Transfer-RNA) Kleeblattstrukturen und durch die Entdeckung der Ribozyme, die eine Selbstreplikation der RNA vorstellbar machte.

Auf die RNA-Welt folgte die DNA-Welt, bei der es gelang, die Gene eines Organismus auf einer stabileren, doppelsträngigen DNA (Desoxyribonukleinsäure; engl.: desoxyribonucleic acid) unterzubringen. Die Replikation der DNA ist mit weniger Kopierfehlern behaftet und kann autonom reguliert werden. Ein vollständiger Übergang von der RNA-Welt zur DNA-Welt hat jedoch nie stattgefunden, da noch heute grundlegende Reaktionen von RNAs katalysiert werden (s. Abb. 1.1).

Während die DNA als Informationsträger im Organismus vorliegt, ist die RNA heute überwiegend in der Proteinbiosynthese von Bedeutung. Bei der Herstellung von Proteinen aus der genetischen Information werden hauptsächlich drei Arten von RNA benötigt. Dabei werden zuerst die Strukturgene, die auf der DNA liegen, auf einen komplementären Strang Messenger-RNA (mRNA) überschrieben. Anschließend wird die mRNA am Ribosom, das aus ribosomaler RNA (rRNA) und Proteinen aufgebaut ist, mit Hilfe der Transfer-RNA (tRNA) in Peptide übersetzt.

Bei ~80% der in der sich teilenden Zelle vorkommenden RNA handelt es sich um rRNA. Sie bilden den Kern des Ribosoms und werden im Unterschied zu mRNAs durch die im Nukleolus enthaltene Polymerase I und nicht durch die nukleoplasmatische Polymerase II in eukaryontischen Zellen synthetisiert. Der Unterschied besteht in einem Schwanz, den die Polymerase I im Gegensatz zur Polymerase II nicht besitzt, und daher

1. EINLEITUNG

weder ein Cap noch einen PolyA-Schwanz an die rRNA anhängt. Es existieren vier verschiedene Arten von rRNAs, wobei jede nur einmal im Ribosom vorhanden ist. Während die rRNAs 18S, 5,8S und 28S aus einem großen Vorläufer-rRNA-Molekül, der sogenannten 45S rRNA, hervorgehen, wird die 5S rRNA direkt durch die Polymerase III synthetisiert. Die ~13000 Nukleotide lange 45S rRNA wird an ca. 120 2'-OH-Gruppen der Nukleotidzucker methyliert und ca. 100 Uridine werden zu Pseudouridin isomerisiert (MADEN, 1990).

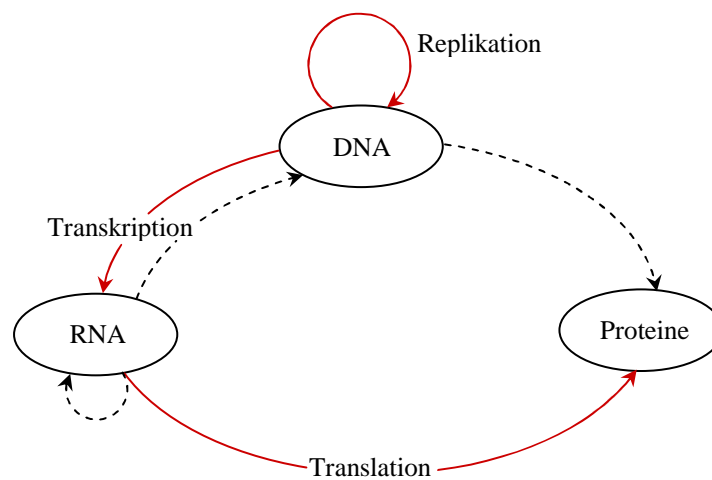


Abbildung 1.1: Dogma der Molekularbiologie. Durchgehende Pfeile zeigen den Transfer genetischer Informationen, wie sie in allen Zellen zu finden sind. Gestrichelte Pfeile stellen spezielle Übertragungen dar. Eine direkte Translation von DNA zu Protein ist bislang nicht bekannt, ist aber nicht unmöglich. Proteine hingegen können nur Empfänger genetischer Informationen sein (aus VOET & VOET, 1994: nach CRICK (1970))

1.2.1 KLEINE NUKLEOLÄRE RNAs

Bei der nukleolären Biogenese von cytoplasmatischen Ribosomen in eukaryontischen Zellen werden in komplexen Vorgängen die ribosomalen Ribonukleinsäuren (ribosomal ribonucleic acids: rRNAs) aus Vorläufer-RNAs (precursor-rRNAs: prä-rRNAs) prozessiert, indem innere (ITS1 und ITS2) und äußere (5' ETS und 3' ETS)

Spacer-Sequenzen endo- beziehungsweise exonukleolytisch entfernt werden. Daneben ist eine Vielzahl von kleinen metabolisch stabilen RNAs (small nucleolar ribonucleic acids: snoRNAs) bekannt, durch die die rRNAs posttranskriptional modifiziert werden, indem jede prä-rRNA mit ungefähr 150-200 verschiedenen snoRNAs während ihrer Entwicklung in Kontakt kommt.

Die beiden am häufigsten auftretenden Modifikationen durch snoRNAs sind die 2'-O-Methylierung bestimmter Ribose-Gruppen und die Umwandlung von Uridin in Pseudouridin. Von anderen snoRNAs ist bekannt, daß sie die korrekte Faltung oder das Spalten der prä-rRNA steuern. In der Zelle kommen die snoRNAs nur in mit nukleolären Proteinen (nucleolar proteins: Nop's) assoziierter Form als kleine nukleoläre Ribonukleoprotein Partikel (small nucleolar ribonucleoprotein particle: snoRNP) vor (FILIPOWICZ ET AL., 1999; WEINSTEIN & STEITZ, 1999). Durch konservierte Sequenzabschnitte, die als Bindungsstellen für die Proteine dienen, können die snoRNAs in drei große Klassen unterteilt werden. Es handelt sich dabei um die C/D-Box snoRNAs, die H/ACA-Box snoRNAs und die Endoribonukleasen RNase MRP und RNase P, die vielleicht als Ribozyme an der prä-rRNA Spaltung beteiligt sind.

1.2.1.1 C/D-Box snoRNAs

Die Mitglieder der C/D-Box snoRNA-Familie werden nach ihren zwei kurzen konservierten Sequenzmotiven, der C-Box (RUGAUGA, wobei das R für ein Purin steht) und der D-Box (CUGA) benannt (BALAKIN ET AL., 1994). Die beiden Enden der RNA sind durch eine kurze komplementäre Sequenz miteinander verbunden. Zwischen der C-Box am 5'-Ende und der D-Box am 3'-Ende der snoRNA liegt eine unstrukturierte Schleife, die homologe aber oft unvollständige Kopien der Boxen C und D (C'- und D'-Box) enthält (BALAKIN ET AL., 1994; BACHELLERIE ET AL., 1995). Der Abstand zwischen den Boxen C' und D' ist auf 3-9 Nukleotide beschränkt. Häufig werden dabei die beiden Boxen durch eine Stammbildung näher zusammen gebracht (KISS, 2001). Eine oder manchmal auch zwei 10-22 Nukleotid lange Sequenzen, die komplementär zu Abschnitten einer reifen rRNA sind, liegen in der Schleife stromaufwärts vor der D- oder D'-Box (Abb. 1.2 A) (BACHELLERIE ET AL., 1995). In der rRNA, die an dieser Sequenz bindet, wird das Nukleotid methyliert, das mit exakt dem fünften Nukleotid

vor dem Start des D- oder D'-Motives basenpaart (TYCOWSKI ET AL., 1996; KISS-LÁSZLÓ ET AL., 1998). Die Boxen C und D sind essentielle Stabilisierungsfaktoren bei der Prozessierung der prä-snoRNA und bei der Bindung des snoRNP-Komplexproteins Fibrillarin (BASERGA ET AL., 1991).

Um rRNAs methylieren zu können, binden die snoRNAs an nukleoläre Proteine und bilden snoRNPs. Als allgemein in humanen Box C/D snoRNPs vorkommende Proteine konnten dabei Fibrillarin (Ortholog in *Saccharomyces cerevisiae*: Nop1p), Nop56 (Nop56p), Nop58 (Nop58p) und 15,5 kDa (Snu13p) identifiziert werden (KISS-LÁSZLÓ ET AL., 1996; GAUTIER ET AL., 1997; WATKINS ET AL., 2000). In Fibrillarin wurde ein für Methyltransferasen charakteristisches S-Adenosylmethionin- (Adomet) bindendes Motiv entdeckt (TOLLERVEY ET AL., 1993; WANG ET AL., 2000; AITTALEB ET AL., 2003). Bei Versuchen, in denen eine Aminosäure dieses Motivs substituiert wurde, konnte gezeigt werden, daß es zu einem temperatur-sensitiven Defekt bei der rRNA Methylierung kommt. Eine Funktion der Paraloge Nop56 und Nop58 ist bislang nicht bekannt, sie sind jedoch für den gesamten Ablauf der Methylierung ebenso wichtig wie das Fibrillarin. Das 15,5 kDa Protein kommt sowohl in C/D-Box snoRNPs als auch in spleißosomalen U4/U6.U5 tri-snRNPs (small nuclear RNPs) vor und gehört zu einer Familie RNA-bindender Proteine (NOTTROT ET AL., 1999; WATKINS ET AL., 2000). Die Proteine binden an eine interne purinreiche 5+2 Schleife (s. Abb. 1.2 B), deren Faltung durch zwei Tandem G•A Basenpaare und einer Base, die aus der Schleife herausragt, charakterisiert wird (VIDOVIC ET AL., 2000). Die 5+2 Schleife findet sich auch in dem U3-spezifischen B/C-Box Motiv und bindet ebenfalls das 15,5 kDa Protein (WATKINS ET AL., 2000).

In dem Archaeobakterium *Sulfolobus solfataricus*, das als Prokaryont keinen Zellkern und somit auch keine snoRNAs besitzt, konnten sRNAs identifiziert werden, die zu den snoRNAs homolog sind. Die sRNAs formen mit den archaeobakteriellen Proteinen aL7 (Ortholog in *Homo sapiens*: 15,5 kDa), aNop56 (Nop56/Nop58) und aFibrillarin (Fibrillarin) einen sRNP-Komplex, der homolog zu den snoRNPs an der 2'-O-Methylierung der rRNAs beteiligt ist (OMER ET AL., 2002).

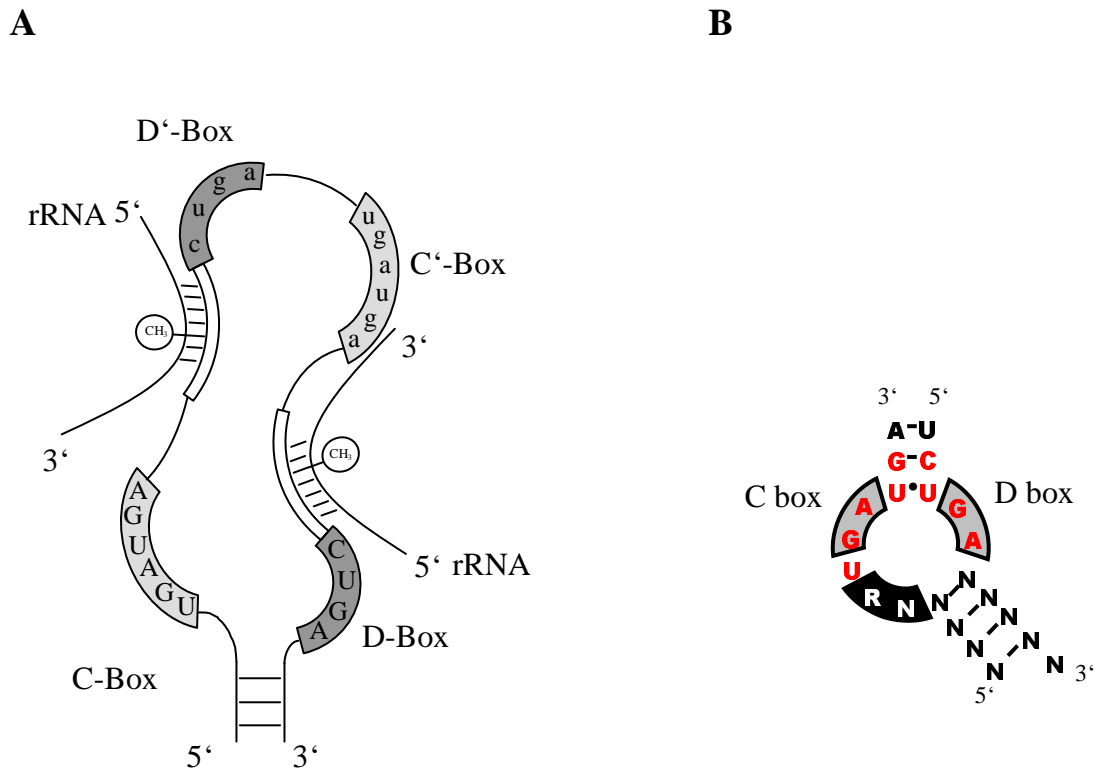


Abbildung 1.2: **A.** Schematische Struktur einer Box C/D snoRNA. Die kleinen Buchstaben in den C'- und D'-Boxen sollen darstellen, daß es sich um evtl. veränderte Kopien der Originalsequenzen handelt. **B.** 5+2 Schleife, die an die Proteine bindet

1.2.1.2 H/ACA-Box snoRNAs

Die evolutionär gut erhaltene H/ACA-Struktur besteht aus zwei Haarnadelschleifen, einer dazwischen liegenden H-Box-Sequenz (ANANNA) und einer konservierten ACA-Box (ACA) nahe des 3'-Endes (BALAKIN ET AL., 1996; GANOT ET AL., 1997a). Die Schleifen liegen in den Regionen der snoRNA, in der diese komplementär zu der zu modifizierenden rRNAs ist. In Hefe konnte gezeigt werden, daß viele der H/ACA snoRNAs an eine bestimmte Sequenz in der prä-rRNA binden und die Umwandlung von Uridin in Pseudouridin lenken. Die beiden Boxen H und ACA liegen ca. 14-16 Nucleotide in Richtung 3'-Ende hinter dem Uridin, das zu Pseudouridin umgewandelt wird (s. Abb. 1.3) (NI ET AL., 1997; BORTOLIN ET AL., 1999). Ebenso wie die C/D-Box snoRNAs binden auch die H/ACA-Box snoRNAs Proteine, die für die Pseudouridinilierung wichtig sind. Bisher konnten in Eukaryonten die vier Proteine,

Cbf5p (Nap57p in Säugern), Gar1p, Nhp2p und Nop10p, identifiziert werden, die an der Bildung von snoRNPs beteiligt sind (BALAKIN ET AL., 1996, GANOT ET AL., 1997b; HENRAS ET AL., 1998). Das zur *E. coli* tRNA:Ψ55 Pseudouridin Synthase homologe Cbf5p, stellt die Pseudouridin Synthase Aktivität für die snoRNA-gerichtete Pseudouridinylierungsreaktion bereit (LAFONTAINE ET AL., 1998, ZEBARJADIAN ET AL., 1999). Die Funktion der anderen Proteine ist weitestgehend unklar (BOUSQUET-ANTONELLI ET AL., 1997, HENRAS ET AL., 1998).

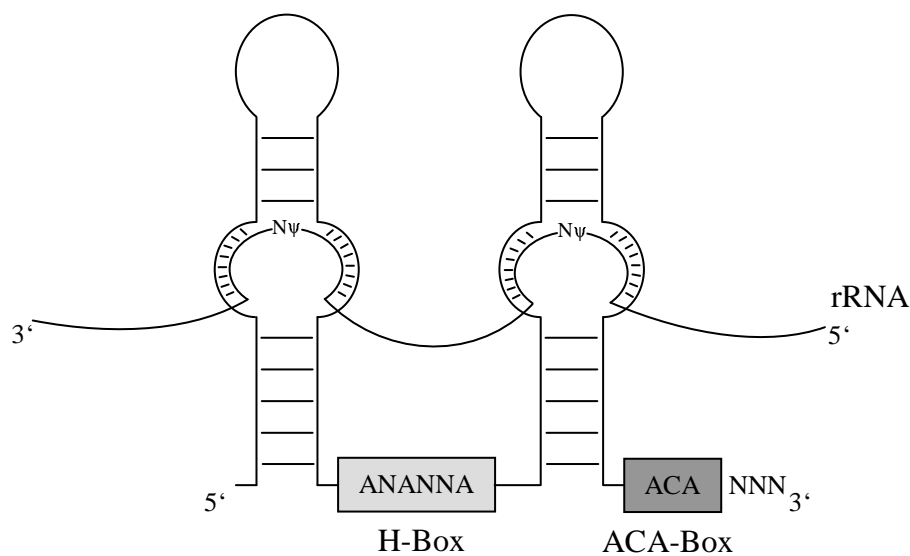


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau einer H/ACA-Box snoRNA

1.2.1.3 Die Endoribonukleasen RNase MRP und RNase P

Die RNase MRP (Mitochondrial RNA Processing) ist strukturell und funktionell mit der RNase P verwandt. Neben ähnlichen Sekundärstrukturvorhersagen, teilen sich die Endonukleasen in Hefe mindestens drei der Proteinuntereinheiten (Pop1p, Pop3p und Pop4p), die sowohl für die Stabilität als auch für die Funktion der Enzyme essentiell sind (LYGEROU ET AL., 1994, CHU ET AL., 1997; DICHTL & TOLLERVEY, 1997). RNase MRP spielt eine entscheidende Rolle bei der prä-rRNA Prozessierung, aber die Hauptfunktion ist noch immer ungeklärt. In eukaryontischen Zellen besitzen weder die RNAs der RNase P noch der RNase MRP in Abwesenheit der Proteine eine

enzymatische Aktivität, während in bakteriellen Zellen die RNA der RNase P in der Lage ist, prä-tRNA *in vitro* sequenzspezifisch zu spalten (GUERRIER-TAKADA ET AL., 1983).

1.2.1.4 Modifizierung zellulärer RNAs durch snoRNPs

Neben den erwähnten nukleolären Modifikationen sind die snoRNPs ferner in der Lage, sowohl spleißosomale Proteine (REDDY & BUSCH, 1988; TYCOWSKI ET AL., 1998) als auch tRNAs (OMER ET AL., 2000; KISS, 2001) zu modifizieren. So befinden sich z.B. in den fünf bedeutenden spleißosomalen snRNAs U1, U2, U4, U5 & U6 der Säugetiere 30 2'-O-Methylierungen und 24 Pseudouridine. Zehn Jahre nach dieser Entdeckung konnten die ersten C/D-Box snoRNAs beobachtet werden, die bei der Polymerase III-transkribierten U6 snRNA Modifizierung beteiligt sind und im Nukleolus vorkamen (TYCOWSKI ET AL., 1998; GANOT ET AL., 1999). Neben den bekannten C/D und H/ACA Boxen wurde 2001 U85 in humanen und *Drosophila* Zellen entdeckt, eine ‚Hybrid‘-snoRNA, die beide Boxen enthält (JÁDY & KISS, 2001). Diese U85 enthält nicht nur beide Modifizierungs-Boxen, sondern führt auch beide Reaktionen an der Polymerase II-transkribierten U5 snRNA durch.

Die posttranskriptionale Modifizierung von nukleoplasmatischen und cytoplasmatischen RNAs durch nukleoläre snoRNPs zeigte neue Wege des intrazellulären Transports von RNAs auf. Die Identifizierung von U6 snRNA-modifizierenden Faktoren im Nukleolus ließ darauf schließen, daß die U6 snRNAs vom Nukleoplasma in den Nukleolus transportiert werden, bevor sie dort methyliert beziehungsweise pseudouridinyliert werden (TYCOWSKI ET AL., 1998; GANOT ET AL., 1999). An *Xenopus* Oocyten-Kernen konnten LANGE & GERBI (2000) letztendlich das vorübergehende Auftreten von U6 snRNAs im Nukleolus nachweisen. Bei verschiedenen anderen RNAs konnte ein solches Wanderungsverhalten in den Nukleolus zu Modifikationszwecken ebenfalls beobachtet werden. Im Gegensatz zu den U6 snRNAs werden die U1, U2, U4 und U5 snRNAs temporär ins Cytoplasma transportiert, wo ihre 5'-Caps hypermethyliert werden. Zurück im Nukleoplasma werden die snRNAs in Cajal Körperchen (engl. cajal bodies) methyliert und pseudouridinyliert (CARVALHO ET AL., 1999). Mit *in situ*

Hybridisierungs-Experimenten wurde belegt, daß in HeLa-Zellen diese Cajal Körperchen mit snoRNAs assoziiert sind (KISS, 2001; DARZACQ ET AL., 2002).

1.3 AMYLOLYTISCHE ENZYME

Eine der wichtigsten Energiequellen neben Cellulose für alle Lebewesen, insbesondere für Mikroorganismen, ist Stärke (JANEČEK, 1997). Mit ihrer komplexen Struktur aus α -Amylose, einem ausschließlich α -1,4-glykosidisch verknüpften linearen Glukosepolymer, und Amylopektin, einem verzweigten Polymer, das ebenfalls aus α -1,4-glykosidisch verknüpften Glukoseresten besteht, aber alle 24-30 Glukose-Einheiten mit einer weiteren Glukosekette α -1,6-glykosidisch verbunden ist. Um diese komplex verzweigte Struktur in Glukose und kleine Oligosaccharide zu spalten, wird in den Zellen ein kompletter Satz hydrolysierender Enzyme benötigt (JANEČEK, 1997). Am besten untersucht sind das endo-spaltende Enzym α -Amylase und die exo-spaltenden Enzyme β -Amylase und Glukoamylase. Obwohl diese drei Enzyme ähnliche Funktionen besitzen, sind sie sowohl strukturell als auch evolutionär weit voneinander entfernt (JANEČEK, 1994). α -Amylase spaltet die Stärke an zufällig ausgewählten α -1,4-glykosidischen Verknüpfungen im Inneren der Zelle und es entstehen lineare und verzweigte Oligosaccharide mit α -konfigurierten Hydroxylgruppen. Die exo-spaltenden Enzyme hydrolysieren das nicht-reduzierende Ende der Stärke und setzen definierte Oligosaccharide und Glukose mit der anomeren β -Konfiguration frei (JANEČEK, 1997). Daneben werden die α -1,6-glykosidischen Bindungen in Amylopektin von Isoamylasen gespalten. Thermophile amylytische Enzyme, besonders α -Amylasen gewinnen in der Biotechnologie immer mehr an Bedeutung. So werden sie bei der Produktion von Sirup, Dextrose, der Brot- und Bierherstellung verwendet (COWAN, 1996; BERTOLDO & ANTRANIKIAN, 2001).

Stärke Hydrolasen und die mit ihnen verwandten Enzyme werden zusammen mit anderen O-Glykosyl-Hydrolasen in mittlerweile 95 Glykosyl-Hydrolase Familien (GHF) eingeteilt (HENRISSAT, 1991; HENRISSAT & BAIROCH, 1993 & 1996; COUTINHO & HENRISSAT, 1999). Aufgrund ihrer Aminosäure-Sequenz-Ähnlichkeit und ihrer Glykosyl-Hydrolase/Transferase Aktivität mit einigen Transferasen (z.B. Cyclodextrin Glykosyltransferasen: CGTasen) können alle α -Amylasen in die drei Glykosyl-

Hydrolase Familien 13 (typische α -Amylasen), 70 (Glykan Sucrase-Typ Glykosyltransferasen) und 77 (Amylomaltasen), die den Glykosyl-Hydrolase Stamm H (GH-H; COUTINHO & HENRISSAT, 1999: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>) bilden, eingeteilt werden (JANEČEK, 1997; HENRISSAT, 1998; ROUJEINIKOVA ET AL., 2002). Die β -Amylasen und die Glukoamylasen werden in die Familien 14 und 15 eingliedert. Das katalytische Zentrum aller α -Amylase Familien ist das $(\beta,\alpha)_8$ -Faß ($(\beta,\alpha)_8$ -Barrel), das einen konservierten Glutamat- und zwei konservierte Aspartat-Reste enthält. Das als Domäne A bezeichnete $(\beta,\alpha)_8$ -Faß wird bei den α -Amylasen durch die Domäne B zwischen dem dritten β -Strang und der dritten α -Helix unterbrochen (KLEIN & SCHULZ, 1991; QIAN ET AL., 1993; JANEČEK, 1997).

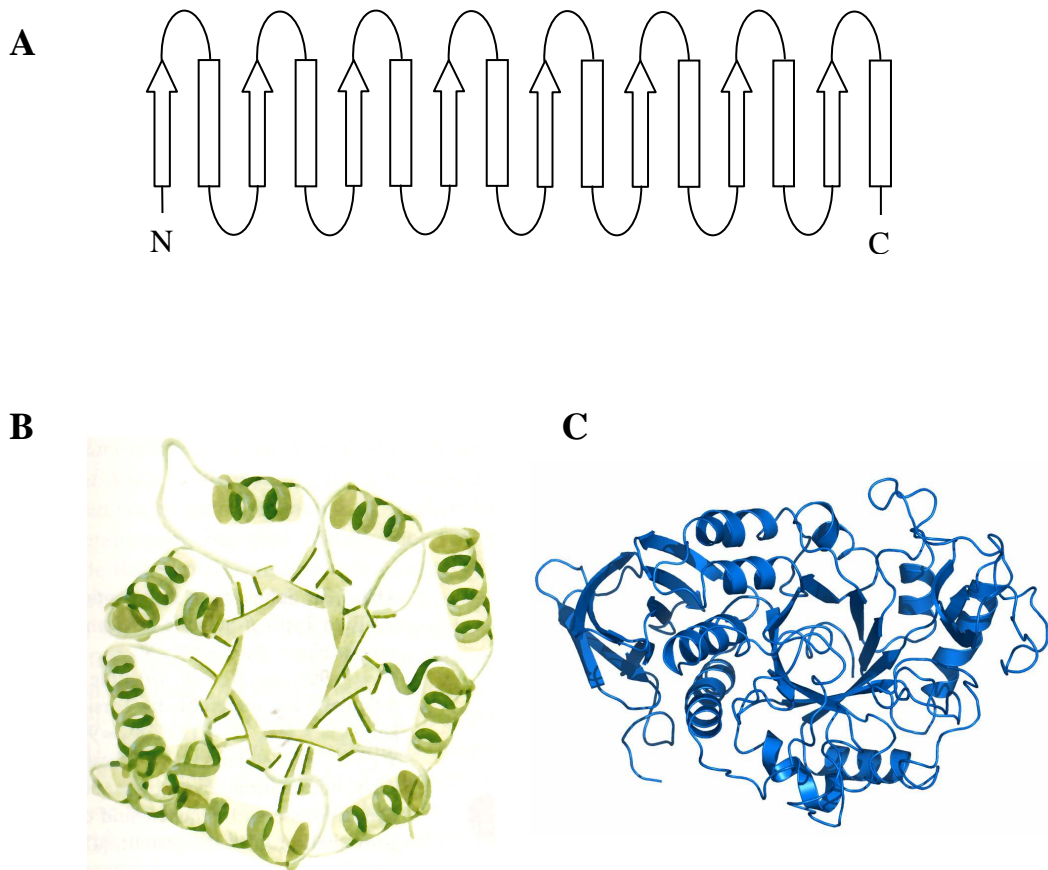


Abbildung 1.4: **A.** Topologisches Diagramm eines $(\beta,\alpha)_8$ -Fasses. **B.** Aufsicht auf die Struktur der Triosephosphatisomerase aus *Gallus gallus*. Die acht parallelen β -Faltblätter bilden eine zylindrische Struktur (β -Faß) (aus VOET & VOET, 1994). **C.** Typisches α -Amylase $(\beta,\alpha)_8$ -Faß der TAKA-Amylase A (PDB: 2TAA) (MATSUURA ET AL., 1984)

1.3.1 Glykosyl-Hydrolase Familie 13

Das markanteste Merkmal der Mitglieder der α -Amylase Familien ist das funktionell wichtige $(\beta,\alpha)_8$ -Faß, das zuerst bei der Struktur der Triosephosphatisomerase aus *Gallus gallus* beschrieben wurde und deshalb auch unter dem Namen TIM-Barrel bekannt ist (BANNER ET AL., 1975). Als $(\beta,\alpha)_8$ -Faß wird es aufgrund seiner alternierenden Folge von 8 β -Strängen und 8 α -Helices bezeichnet (vgl. Abb. 1.4 A), wobei die β -Stränge ein inneres Faß mit hydrophoben Kern und die α -Helices ein äußere Hülle bilden (vgl. Abb. 1.4 B). Es ist unter röntgenkristallographisch aufgeklärten Strukturen die variantenreichste Proteindomänenstruktur, die in über 10% aller Fälle auftritt. 1980 wurde bei einer α -Amylase (TAKA-Amylase A: TAA) aus *Aspergillus oryzae* zum erstenmal das $(\beta,\alpha)_8$ -Faß identifiziert (MATSUURA ET AL., 1980) (vgl. Abb. 1.4 C). Mittlerweile sind fast 30 verschiedene Enzyme mit einem $(\beta,\alpha)_8$ -Faß in den α -Amylase Familien mit Wirkungen als Hydrolasen, Transglukosidasen und Isomerasen, jedoch nicht als Ligase geläufig (MACGREGOR ET AL., 2001; JANEČEK ET AL., 2003).

Durch die geringen Gesamtsequenz-Ähnlichkeiten und den verschiedensten Funktionen der α -Amylase Familienmitgliedern ist immer wieder die Frage nach einer gemeinsamen Herkunft aufgeworfen worden. Eine eindeutige Antwort auf den Ursprung des $(\beta,\alpha)_8$ -Fasses konnte bisher nicht gefunden werden. Daher konnte bislang auch noch keine der zwei folgenden Evolutionstheorien völlig ausgeschlossen beziehungsweise bestätigt werden:

1. Konvergente Evolution

Entwicklung desselben Motivs mit einer hoch geordneten und stabilen Faltung aus unterschiedlichen Ursprüngen. Gegen diese Theorie spricht allerdings die Arbeit von BRÄNDÉN & TOOZE (1991), welche davon ausgeht, daß die $(\beta,\alpha)_8$ -Fässer miteinander verwandt sind.

2. Divergente Evolution

Alle $(\beta,\alpha)_8$ -Fässer sind aus einem gemeinsamen Ursprung hervorgegangen und haben sich im Laufe der Evolution in Sequenz und Form den jeweiligen Gegebenheiten angepaßt. Die funktionellen und strukturellen Ähnlichkeiten der α -Amylase Familienmitgliedern deuten darauf

hin, daß diese Entwicklungstheorie als die wahrscheinlichere angenommen wird (JANEČEK, 1997).

1.3.1.1 Sequenzeigenheiten und strukturelle Besonderheiten der GHF 13

Die in allen Bereichen von Tieren über höhere Pflanzen bis zu den Mikroorganismen vorkommenden Mitglieder der α -Amylase Familie besitzen in ihrer Gesamtsequenz nur eine Ähnlichkeit von ~10% (NAKAJIMA ET AL., 1986; JANEČEK, 1997; PUJADAS & PALAU, 2001), aber 10 hoch konservierte Aminosäure-Reste, die in allen α -Amylasen zu finden sind. Die Familienzugehörigkeit zur GHF 13 wird dennoch durch einige hoch konservierte Aminosäure-Sequenzmotive (I-VII) deutlich. In den zuerst beschriebenen Regionen II, IV, VI und V (FRIEDBERG, 1983; ROGERS, 1985; NAKAJIMA, 1986) konnten die drei Aminosäuren Aspartat 206 (Asp206), Glutamat 230 (Glu230) und Aspartat 297 (Asp297; diese und alle folgenden Numerierungen beziehen sich auf TAA) experimentell durch Röntgenkristallographie und Mutagenesestudien und theoretisch durch Sequenzhomologien als wichtige Reste bei der Katalyse identifiziert werden. Neben diesen drei katalytischen Aminosäure-Resten sind ein weiteres Aspartat (Asp117), zwei Histidine (His122 & His296) und ein Arginin (Arg204) in der katalytischen Region der Enzyme konserviert. Zwei weitere Aminosäuren, Glycin (Gly56) und Prolin (Pro64), schließen eine acht bis neun Aminosäuren lange Sequenz am C-terminalen Ende des zweiten β -Faltblattes ein. Als letzte konservierte Aminosäure ist das Glycin (Gly323) zu nennen, daß eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung des $(\beta,\alpha)_8$ -Fasses spielt (MACGREGOR, 1988; HOLM ET AL., 1990; JESPERSEN ET AL., 1993; JANEČEK, 1994, JANEČEK & TÓTH, 1994, SVENSSON, 1994). Von diesen zehn invariablen Aminosäuren sind sieben im aktiven Zentrum zu finden.

Alle Enzyme der α -Amylase Familien sind Multidomänen Proteine mit charakteristischen Bereichen (MACGREGOR ET AL., 2001). Die wichtigste und auffälligste Domäne ist das $(\beta,\alpha)_8$ -Faß, das auch als Domäne A bekannt ist. Das α -Amylase Faß unterscheidet sich vom klassischen Beispiel des TIM-Barrels hauptsächlich durch eine Schleife, die zwischen β -Faltblatt 3 und α -Helix 3 herausragt; diese Schleife wird als Domäne B bezeichnet (KLEIN & SCHULZ, 1991; QIAN ET AL., 1993, JESPERSEN ET AL.,

1993; JANEČEK ET AL., 1997). In ihrer Form, Länge und Sequenz variiert die Domäne stark, so ist z.B. die Schleife in dem in *E. coli* vorkommende Glucan Branching Enzyme nur 40 Aminosäuren lang (BAECKER ET AL, 1986) während sie in dem Glucan Debranching Enzyme aus dem Hasenmuskel aus etwa 250 Aminosäuren besteht (LIU ET AL, 1993). Diese Diskrepanz macht ein Alignment der verschiedenen B-Domänen Sequenzen unmöglich (JANEČEK ET AL., 1997). Einzig eine kurze konservierte Region (Region III) ist bei allen α -Amylasen am C-terminalen Ende zu erkennen (JANEČEK, 1992 & 1995).

An die Domäne A schließt sich die Domäne C an, deren Funktion wahrscheinlich die Stabilisierung des katalytischen Fasses ist, indem es die hydrophoben Reste schützt. Da die Domäne in manchen α -Amylase Enzymen fehlt, ist sie aber weder für die Aktivität noch für die Stabilität des Enzyms zwingend notwendig (PRZYLAS ET AL., 2000; MACGREGOR ET AL., 2001). Die Unklarheit über die Funktion wird durch das Fehlen der Domäne C in der Familie 77 und einer von dem typischen β -Sandwich abweichenden Struktur in Familie 70 weiter untermauert (JANEČEK, 1997). Einige Mitglieder der Familie 13 besitzen am N-terminalen Ende noch eine oder mehrere Domänen, die normalerweise als Domäne N bezeichnet werden, strukturell aber nicht miteinander verwandt sind. Andere Mitglieder der GHF 13 besitzen nur am C-terminalen Ende weitere Domänen. Die Domänen D und E bestehen ausschließlich aus β -Faltblättern (JANEČEK ET AL, 2003). Die Aufgabe von Domäne D ist noch ungeklärt (JESPERSEN ET AL., 1991; JANEČEK, 2002), es wird jedoch spekuliert, daß die Domäne D in die Carbohydrat-Bindung involviert sein könnte (BORK ET AL., 1994). Während die Domäne D nur im Zusammenhang mit der Domäne E auftritt, findet man die ansonsten als Stärke-bindende Domäne (SBD: Starch Binding Domain) bekannte Domäne E auch alleine vor.

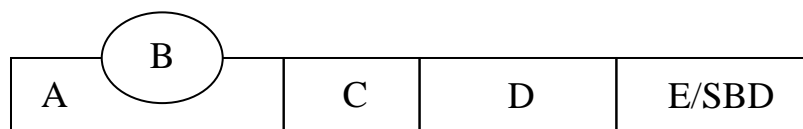


Abbildung 1.5: Domänenstruktur der α -Amylasen, wobei die Domänen C-E nicht in allen α -Amylasen auftreten. D.h. während der Evolution unterlag die katalytische N-terminale Seite deutlich weniger Veränderungen als die C-terminale Seite

1. EINLEITUNG

Das zentrale Element der α -Amylasen ist das katalytische $(\beta,\alpha)_8$ -Faß. Während die β -Faltblätter des Fasses in ihrer Länge und Sequenz konserviert sind, findet man bei den α -Helices eine große Variabilität (JESPERSEN ET AL., 1993). Sowohl die Variabilität der Aminosäuren in den α -Helices und den Schleifen und die nicht so stark konservierten Reste der β -Faltblätter, als auch die Geometrie und die Ausrichtung der Seitenketten bieten zum einen genügend Platz für die Bindung des Substrats und die Katalyse und zum anderen für die unterschiedlichsten Enzymaktivitäten (LESK ET AL., 1989; PICKETT ET AL., 1992; JESPERSEN ET AL., 1993).

Trotz der bereits erwähnten Unterschiede, z.B. der Domäne B, zwischen den α -Amylase $(\beta,\alpha)_8$ -Fässern und allen anderen bekannten $(\beta,\alpha)_8$ -Faß-Strukturen konnte gezeigt werden, daß das aktive Zentrum in allen Fällen am C-terminalen Ende des Fasses lokalisiert ist (FARBER & PETSKO, 1990; BRÄNDÉN & TOOZE, 1991). Im aktiven Zentrum konnten die Aminosäurereste Asp206 und Glu230 als die Reste identifiziert werden, die eine tragende Rolle als agierende Base und Säure tragen (QIAN ET AL., 1994; STROKOPYTOV ET AL., 1995). Während der Katalyse wird an der zu spaltenden glykosidischen Bindung der Sauerstoff von der allgemeinen Säure Glu230 protoniert und der Kohlenstoff C1 durch die Base Asp206 angegriffen (SVENSSON & SØRGAARD, 1993; SVENSSON, 1994). Aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen in Amylase-Äquivalenten zu TAA konnte das Asp297 als Säurerest ausgeschlossen werden (QIAN ET AL., 1994). Das Asp297 spielt indessen bei einigen Amylasen (z.B. *Bacillus circulans* Stamm 251) eine wichtige Rolle bei der Substratbindung und es schützt die protonierte Carboxylategruppe des Glu230 bei höheren pH-Werten (STROKOPYTOV ET AL., 1995).

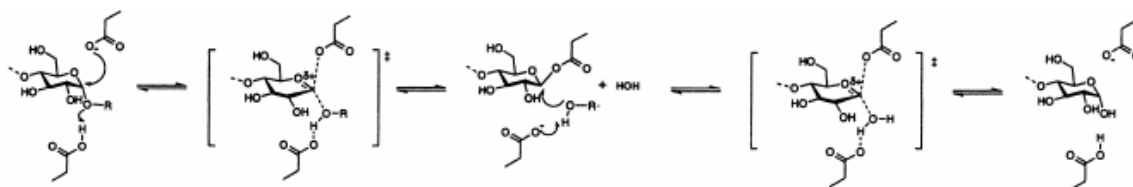


Abbildung 1.6: Katalytischer Reaktionsmechanismus einer glykosidischen Spaltung (aus MACGREGOR ET AL., 2003)

1. EINLEITUNG

Im aktiven Zentrum befinden sich weitere Aminosäure-Reste, die in ihrer Familie oder nur für eine bestimmte Enzymspezifität stark konserviert sind. So ist z.B. für die bereits erwähnten invariablen Histidine, His122 und His296, bekannt, daß sie z.B. der Substraterkennung (ISHIKAWA ET AL., 1992 & 1993) beziehungsweise zur Stabilisierung des Übergangszustandes (SØRGAARD ET AL., 1993) dienen. Auch alle anderen in Mutagenesestudien identifizierten, funktionell wichtigen Aminosäuren liegen in den bekannten konservierten Regionen (JANEČEK, 1997).

Das aktive Zentrum der α -Amylase Familienmitglieder besteht aus einer Reihe von Bindungstaschen, von denen jede in der Lage, ist einen Glukoserest des Substrates zu binden (MACGREGOR ET AL., 2001). Die Bindungstaschen bestehen aus Aminosäure Seitenketten, lokalisiert in den Schleifen, die das C-terminale Ende der β -Faltblätter mit den N-terminalen Enden der α -Helices verbinden. Es wird postuliert, daß die Bindungstasche -1 fünf der zehn hoch konservierten Aminosäuren enthält (SVENSSON, 1994; MACGREGOR ET AL., 1996; JANEČEK, 1997). Mit den Aminosäuren Asp206 und Glu230 enthält die Bindungstasche -1 die beiden katalytischen Reste, die für die Spaltung verantwortlich sind. Für alle Enzyme der α -Amylase Familie gilt, daß an Bindungstasche -1 immer eine Glukoseeinheit gebunden wird, während die Zuckerreste, die an die Bindungstaschen +1 und +2 binden, mit der Enzymspezifität variieren. Das inhibitorische Substrat Acarbose bindet im $(\beta,\alpha)_8$ -Faß an die Bindungstaschen -1 bis +3 (Bindungstaschen-Nomenklatur nach DAVIES ET AL., 1997), wobei die inhibitorische Disaccharid-Gruppe Acarviosin die Bindungstaschen -1 und +1 besetzt und somit eine Spaltung an den katalytischen Resten Asp206 und Glu230 blockiert.

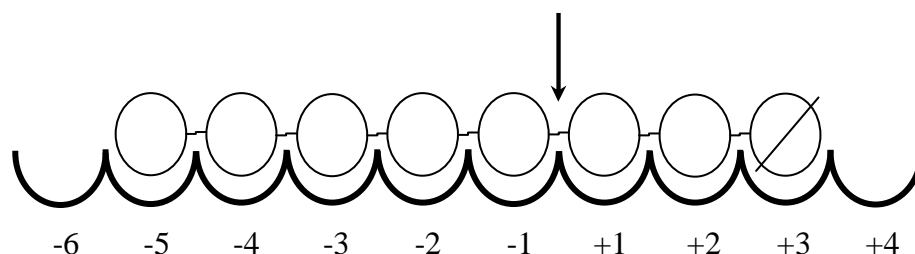


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der Bindungstaschen, wobei die Bindungstaschen -5 bis +3 von einem Oligosaccharid besetzt sind. Die Spaltstelle ist durch einen Pfeil zwischen -1 und +1 gekennzeichnet. Das reduzierende Ende des Zuckers ist an Bindungstasche +3 gebunden (nach MACGREGOR ET AL., 2001)

1.3.1.2 Die Bindung von Ca^{2+} an GHF 13 α -Amylasen

Bei vielen α -Amylasen können, unabhängig von ihrer Enzymspezifität, eine oder mehrere Kalziumionen gebunden werden. So postulierten BUISSON ET AL. (1987), daß das Ca^{2+} die Struktur des aktiven Zentrums durch die Verbindung der Domänen A und B stabilisiert. Im Jahr 1990 konnten BOEL ET AL. bei der α -Amylase aus *Aspergillus niger* zeigen, daß zwei Ca^{2+} -Bindungsstellen pro Proteinmolekül vorhanden sind. An der primären Bindungsstelle wird das Kalziumion fest gebunden und sorgt für die Erhaltung der korrekten Faltung des aktiven Zentrums, während bei der Bindung des zweiten Kalziumions an die sekundäre Bindungsstelle die katalytischen Reste Asp206 und Glu230 mit einbezogen werden, was eine inhibitorische Wirkung von hohen Kalziumkonzentrationen erklärt (BOEL ET AL., 1990).

1.3.1.3 Thermostabile α -Amylasen: Strukturelle Voraussetzungen zum Überleben an extremen Standorten

Die Thermostabilität von vielen α -Amylasen wird auf zwei strukturelle Begebenheiten zurückgeführt. WATANABE ET AL. (1991, 1994 & 1996) konnten anhand der Oligo-1,6-Glukosidasen verschiedener *Bacillus* Stämme die 1987 von SUZUKI ET AL. postulierte Protein-Regel zur Thermostabilisierung von Proteinen untermauern. Mit einer ansteigenden Anzahl von Prolin-Resten erhöhte sich die Thermostabilität, wobei Proline an der zweiten Stelle der β -Schleife und in der ersten Windung von α -Helices die größte Bedeutung für die Hitzestabilität besitzen (WATANABE ET AL., 1996).

Die Ausrichtung der Aminosäure-Reste ist ebenfalls für eine erhöhte Hitzestabilität verantwortlich. Dabei steigt die Thermostabilität, je höher der Anteil an hydrophoben Resten im Innern des Proteins oder respektive des $(\beta,\alpha)_8$ -Fasses und je höher der Anteil an hydrophilen Aminosäure-Resten auf der Außenseite ist (JANEČEK, 1993).

1.3.2 Glykosyl-Hydrolase Familie 57

Bei dem hyperthermophilen Bakterium *Dictyoglomus thermophilum* und bei dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* konnten als erstes zwei Enzyme identifiziert werden, die zwar eine α -Amylase-Aktivität aufwiesen, jedoch nicht in die Glykosyl-Hydrolase Familie 13 einzuordnen waren (FUKUSUMI ET AL., 1988; LADERMAN ET AL., 1993). Bei Sequenzvergleichen der neuen α -Amylasen mit den GHF 13 α -Amylasen wurden weder die charakteristischen Sequenzmotive noch die drei katalytischen Aminosäuren der GHF 13 gefunden. Aufgrund ihrer 40%-igen Sequenzähnlichkeiten untereinander, wurden die α -Amylasen aus *Dictyoglomus thermophilum* und *Pyrococcus furiosus* in einer neuen Glykosyl-Hydrolase Familie mit α -Amylase-Aktivität, der Familie 57, zusammengefaßt (HENRISSAT & BAIROCH, 1996). Trotz der α -amylolytischen Aktivität, die in beiden Glykosyl-Hydrolase Familien aufzufinden ist, konnte zunächst kein gemeinsamer Ursprung identifiziert werden. Erst durch die Entdeckung einer α -Amylase-Sequenz im *Methanococcus jannaschii* Genom (BULT ET AL., 1996) konnte von JANEČEK (1998) durch den Vergleich einiger charakteristischer α -Amylasen aus den Familien 13 und 57 mit Hilfe der Hydrophoben Cluster Analyse (HCA: Hydrophobic Cluster Analysis; GABORIAUD ET AL., 1987) gezeigt werden, daß eine Verwandtschaft zwischen beiden Familien besteht.

Mitglieder der Glykosyl-Hydrolase Familie 57 katalysieren ähnliche Reaktionen wie die α -Amylase Familien, sind in ihrer Sequenz-Ähnlichkeit jedoch weit von diesen entfernt (IMAMURA ET AL., 2003). Im Gegensatz zu den α -Amylase-Familien 13, 70 und 77 ist die GHF 57 bisher nur unzureichend untersucht (SVENSSON, 1994; JANEČEK, 1998; IMAMURA ET AL., 2003), die katalytische Domäne A der α -Amylasen, das $(\beta, \alpha)_8$ -Faß, kann verändert aber auch in den Strukturen der GHF 57 wiedergefunden werden.

1.3.2.1 Glykosyl-Hydrolase Familien 13 und 57: Besitz eines gemeinsamen Ursprungs?

Klassische Sequenz-Alignments (ClustalW; THOMPSON ET AL., 1994) der α -Amylasen aus *Methanococcus jannaschii* und *Pyrococcus furiosus* wiesen eine Sequenz-Identität unter Berücksichtigung mehrerer Lücken in beiden Sequenzen von 27,1% auf (nur 21,8% ohne Lücken mit der HCA-Methode) und ließen somit die α -Amylase von *Methanococcus jannaschii* eindeutig in die Glykosyl-Hydrolase Familie 57 einordnen (BULT ET AL., 1996).

Durch die Anwendung der HCA-Methode konnte von JANEČEK (1998) gezeigt werden, daß die α -Amylase aus *Methanococcus jannaschii* neben den Sequenz-Ähnlichkeiten zur GHF 57 auch einige der charakteristischen Merkmale der GHF 13 besitzt. So konnten zwei von den drei katalytischen Aminosäuren, die β -Stränge 2, 3, 4, 5 & 7 (leicht verändert) und die C-terminal konservierte Sequenz der Domäne B identifiziert werden.

Die eindeutige Zuordnung in die GHF 57 und das Vorkommen der Sequenz-Charakteristika der GHF 13 in der *Methanococcus jannaschii* α -Amylase, führte bei JANEČEK (1998) zu dem Schluß, daß beide Glykosyl-Hydrolase Familien einen gemeinsamen, wenn auch sehr entfernten Ursprung haben könnten. Neben dieser Theorie eines gemeinsamen Ursprungs, gibt JANEČEK aber noch eine weitere Erklärung für die Gemeinsamkeiten der *Methanococcus jannaschii* α -Amylase mit beiden Glykosyl-Hydrolase Familien. In dieser nimmt er an, daß die α -Amylase nur als ein Intermediat bei der Entwicklung von Familie 13 zu 57 beziehungsweise 57 zu 13 entstanden sein könnte.

1.3.2.2 Amylase B aus *Thermotoga maritima* MSB8: ein Mitglied der GHF 57

Das Enzym Amylase B (AmyB) konnte bei einer Genbank Analyse als drittes amylolytisches Enzym im *Thermotoga maritima* MSB8 Genom identifiziert werden (LIEBL, 1998). Es konnte gezeigt werden, daß AmyB, ebenso wie die α -Amylase A aus *Thermotoga maritima* MSB8, neben Stärke auch deren polymere Komponenten Amylose und Amylopektin als Substrate bevorzugt und diese zu Maltooligosacchariden

abbaut. Da in dünnenschichtchromatographischen Untersuchungen außer den α -1,4-glykosidischen Bindungen keine anderen glykosidischen Bindungen gespalten wurden, wurde das Enzym AmyB als α -Amylase klassifiziert.

Die in der Glykosyl-Hydrolase Familie 13 charakteristisch vorkommenden vier Konsensus-Sequenzen konnten in einer Datenbank-Analyse nicht in AmyB nachgewiesen werden, während geringe Sequenzähnlichkeiten zur GHF 57 zu beobachten sind, wie z.B. zur α -Amylase A aus *Dictyoglomus thermophilum* (FÜTTERER, 2001), bei der auch ein gleiches Hydrolysemuster bekannt ist (FUKUSUMI ET AL., 1988; FÜTTERER, 2001). Daneben spricht die Inhibition von AmyB durch geringe Konzentrationen (2 mM) zweiwertiger Metallionen (Ausnahme: Ca^{2+}) ebenfalls gegen eine Einordnung in die GHF 13, bei der im Gegensatz zu Mitgliedern der GHF 57 kein Aktivitätsverlust beobachtet werden konnte (LADERMAN ET AL., 1993; DONG ET AL., 1997; FÜTTERER, 2001). Trotz einer geringen Sequenzähnlichkeit von AmyB zu den Enzymen der GHF 57, wird sie aufgrund ihrer enzymatischen und physikochemischen Ähnlichkeiten in diese Familie eingeordnet (FÜTTERER, 2001).

1.4 ZIELSETZUNG

Von den Komponenten des sRNP-Komplexes in *Sulfolobus solfataricus* ist bekannt, daß aL7 benötigt wird, um die anderen Proteine an die sRNA zu binden. Daher sollte mit einer möglichst kurzen sRNA, die aber die zur Assemblierung wichtigen Boxen C und D enthält, und den notwendigen Proteinen aL7, aNop56 und aFib der sRNP-Komplex *in vitro* rekonstituiert werden. Zur näheren Verifizierung der RNA-Protein- und Protein-Protein-Bindungen sollte der Komplex dazu kristallisiert und strukturell aufgeklärt werden.

Die seit einigen Jahren bekannte intrazelluläre α -Amylase AmyB wurde unter enzymatischen und biochemischen Aspekten untersucht, eine eindeutige Aussage über die funktionelle Bedeutung des Enzyms im Kohlenhydratstoffwechsel konnte jedoch nicht getroffen werden (FÜTTERER, 2001). Darum sollte mit Hilfe der Kristallisation von AmyB mit bekannten Inhibitoren (z.B. Acarbose, ATP), Produkten (Glukose & Maltose) und Aktivatoren (z.B. Ca^{2+}) versucht werden, weitere Einblicke in die

1. EINLEITUNG

Funktion von AmyB im Stoffwechsel zu ermöglichen. Ein besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Kristallisation mit dem Pseudotetrasaccharid Acarbose gelegt. Bei Acarbose handelt es sich um eine Maltotetraose mit Maltose als reduzierendem Ende und Acarviosin, einem inhibitorischen Disaccharid, als nicht-reduzierendem Ende. Es ist bekannt, daß Acarbose die Aktivität von Enzymen der α -Amylase Familien, β -Amylasen und Glukoamylasen inhibiert (PARK ET AL., 2000; MACGREGOR ET AL., 2001; IMAMURA ET AL., 2003).

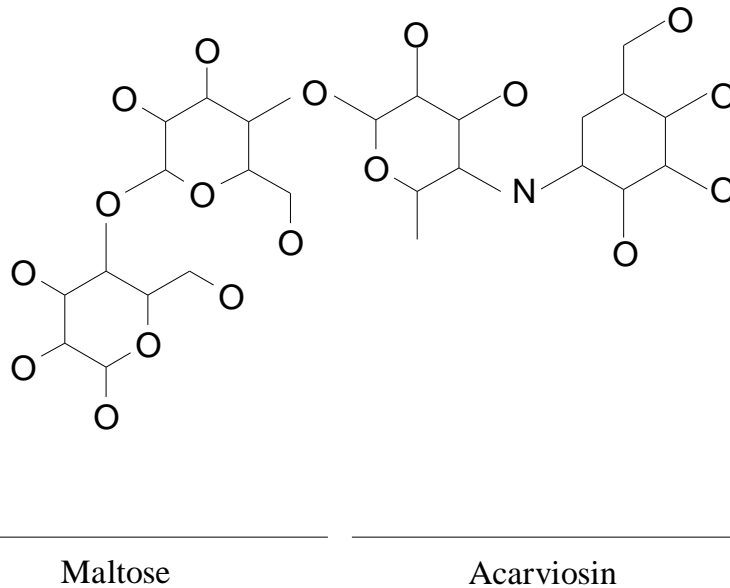


Abbildung 1.8: Acarbose = $C_{25}H_{43}NO_{18}$

O-4,6-dideoxy-4[[[(1S,4R,5S,6S)-4,5,6-trihydroxy-3-(hydroxymethyl)-2-cyclohexen-1-yl]- α -D-glukanopyranosyl-(1,4)-O- α -D-glukanopyranosyl-(1,4)-D-Glukose

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIALIEN

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „p. a.“ (zur Analyse). Die verwendeten Puffer wurden mit sterilem H₂O_{bidest} (SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel) angesetzt.

2.1.2 Kulturmedien, Antibiotika und Medienzusätze

- Luria Bertani (LB)-Medium: 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, ad 1 l H₂O, autoklaviert
- LB-Agar: 1% (w/v) Agar, ad 1 l LB-Medium, autoklaviert
- ECPM1 Medium: 0,4% (w/v) K₂HPO₄, 0,1% (w/v) KH₂PO₄, 0,1% (w/v) NH₄Cl, 0,24% (w/v) K₂SO₄, 0,0132% (w/v) CaCl₂×2H₂O, 10 ml Trace Elements Solution 1, 2% (w/v) Casein, 0,3% (w/v) Hefeextrakt, 4% (v/v) Glycerin, ad 1 l H₂O, autoklaviert, nach dem Abkühlen wurden 2 ml 1 M MgCl₂×6H₂O (sterilfiltriert) zugegeben (SAMBROOK ET AL., 1989)
- Trace Elements Solution: 0,5% (w/v) EDTA, 0,05% (w/v) FeCl₃×6H₂O, 0,005% (w/v) ZnO, 0,001% (w/v) CuCl₂×2H₂O, 0,001% (w/v) Co(NO₃)₂×6H₂O, 0,001% (w/v) (NH₄)₆Mo₇O₂₄×4H₂O; das EDTA wurde in 700 ml H₂O gelöst. Die anderen Komponenten wurden einzeln in möglichst wenig 10 N HCl gelöst und zur EDTA-Lösung gegeben. Der pH-Wert wurde mit konzentrierter NaOH auf 7,0 eingestellt. Die Lösung wurde mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilisiert (SAMBROOK ET AL., 1989)

- Ampicillin: 100 mg/ml in H₂O gelöst und sterilfiltriert, verwendete Arbeitskonzentration 100 µg/ml
- Kanamycin: 50 mg/ml in H₂O gelöst und sterilfiltriert, verwendete Arbeitskonzentration 50 µg/ml
- Chloramphenicol: 35 mg/ml in Ethanol gelöst und sterilfiltriert, verwendete Arbeitskonzentration 35 mg/ml

2.1.3 Bakterienstämme

Alle zur Transformation verwendeten kompetenten Bakterienstämme wurden bei Novagen (Schwalbach) erworben.

- *Escherichia coli* BL21(DE3)
- *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE
- *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS
- *Escherichia coli* XL-1 blue

2.1.4 Plasmide

Die Plasmide für die Proteinexpressionen von aL7, aNop56 und aFibrillarin wurden freundlicherweise von Arina D. Omer, Universität British Columbia, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Vancouver, Kanada zur Verfügung gestellt. Die verwendeten pET-Vektoren sind von der Firma Novagen. Die Gene, die für aL7 und aFib kodieren, waren als *NcoI/BamHI*-Fragmente in den Vektor pET3d, und das Gen für aNop56 war als *NcoI/EcoRI*-Fragment in den Vektor pET28a inkloniert worden (OMER ET AL., 2002).

- pET-3d-aL7
- pET-3d-aFib
- pET-28a-aNop56

2.1.5 Oligonukleotide

Die DNA-Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Da alle Oligonukleotide zur Synthese einzelsträngiger RNA mittels T7 *in vitro*-Transkription (s. 2.2.7) eingesetzt wurden, mußte am 3'-Ende die T7-Promotorsequenz ergänzt werden. Zur Kristallisation des rekonstituierten RNA-Protein-Komplexes wurde eine möglichst kurze synthetische RNA benötigt. Um diese zu finden, wurden als Ausgangssequenzen für die verkürzten RNAs die sRNA-Sequenzen sR1 und sR13 aus *Sulfolobus acidocaldarius* verwendet. Diese hatten in vorangegangenen Band-Shift-Experimenten am Besten mit den drei Proteinen (aL7, aNop56, aFib) interagiert (OMER ET AL., 2002).

sR1del1:

5' -GTTATCAGACCATGGGAGTAACTTCTCATCAACTGCC**CTATAGTGAGTCGTATTA**-3'

sR1del2:

5' -GTTATCAGACCATGGGAGTCTCATCAACTGCC**CTATAGTGAGTCGTATTA**-3'

sR1del3:

5' -GTTATCAGACCATGGTCATCAACTGCC**CTATAGTGAGTCGTATTA**-3'

sR13del1:

5' -TTGATCAGACTTTTTGGCGGCCGTCACCAGACATCATTTCAACC**CTATAGTGAGTCGTATTA**-3'

sR13del2:

5' -TTGATCAGACTTTTTGGTGACATCATTTCAACC**CTATAGTGAGTCGTATTA**-3'

sR13del3:

5' -TTGATCAGACTTTTTTCATCATTTCAACC**CTATAGTGAGTCGTATTA**-3'

2. MATERIAL UND METHODEN

Die RNA für die Kristallisationsansätze wurde von den Firmen Dharmacon Research (Lafayette, USA) und Purimex (Staufenberg) synthetisiert.

sR13-28a: 5' -GGCAGUUGAUGUCAAAAAGUCUGAUCAA-3'

sR13-28b: 5' -GGCAGUUGAUGUCAAAAAGUCUGAUGCC-3'

sR1/U4-22: 5' -GCAGUUGAUGUUUUUCUGAUGC-3'

2.1.6 Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt a. M.) bezogen.

Tabelle 2.1: Restriktionsenzyme und ihre Herkunft

Restriktionsenzym	Ursprungsorganismus	Erkennungssequenz
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	5' G↓GATC C 3' 3' C CATG↑G 5'
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i> RY13	5' G↓AATT C 3' 3' C TTAA↑G 5'
<i>Nco</i> I	<i>Nocardia corallina</i>	5' C↓CATG G 3' 3' G GTAC↑C 5'

2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1 Isolierung von DNA aus Bakterien (Plasmidpräparation)

Zur Plasmidpräparation wurden QIAGEN Plasmid Purification Kits (Qiagen, Hilden) verwendet. Das Prinzip, auf dem die Kits beruhen, ist die alkalische Lyse der Bakterienzellen (BIRNBOIM & DOLY, 1979). Anschließend wird die Plasmid-DNA unter Niedrig-Salz Konditionen an einen Anionenaustauscher gebunden. Verunreinigungen, wie z.B. RNA oder Proteine, werden durch mehrere Waschschriffe entfernt, und unter Hoch-

Salz wird die DNA eluiert. Um die DNA-Lösung zu entsalzen und anzukonzentrieren, wird sie zuletzt mit Isopropanol gefällt und in sterilem H₂O resuspendiert.

Die gewonnene Plasmid-DNA wurde zur Insert-Kontrolle und zur Transformation in *E. coli*-Zellen verwendet.

2.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden (SAMBROOK ET AL., 1989), da dort das Absorptionsmaximum aromatischer Basen liegt. Aus der gemessenen Absorption (optische Dichte: OD_{260 nm}), der Verdünnung (V) und einem spezifischen Multiplikationsfaktor (F) wurde die Konzentration berechnet.

$$c[\mu\text{g} / \text{ml}] = OD_{260\text{nm}} \times V \times F$$

Die Multiplikationsfaktoren hängen davon ab, ob es sich um einzelsträngige oder doppelsträngige DNA, RNA oder Oligonukleotide handelt.

2.2.3 Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen können anhand von spezifischen Methylierungsmustern die bakterieneigene DNA von fremder DNA unterscheiden. Die Enzyme schneiden spezifisch vier bis acht Basenpaare des DNA-Strangs. In den meisten Fällen werden Fragmente mit 5'-Phosphat- und 3'-OH-Enden erzeugt, was wichtig für die Ligation ist. Die Enden können entweder glatt (blunt ends) oder überhängend (sticky ends) geschnitten sein.

Zur Analyse wurde die bei der Plasmidpräparation erhaltene DNA durch Restriktionsenzyme verdaut. Die verwendeten Restriktionsenzyme schnitten vor und hinter dem Insert in der multiplen Klonierungskassette (Multiple Cloning Site) und dienten so zur Größenbestimmung der vorhandenen Fremdgene.

2. MATERIAL UND METHODEN

Die Ansätze (Tabelle 2.2) wurden bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren, wurden die Ansätze anschließend für 10 Minuten bei 65°C erhitzt. Die so geschnittenen Proben wurden auf ein 1%-iges Agarosegel geladen.

Tabelle 2.2: Restriktionsansatz

Komponenten	Eingesetzte Volumina [μl]
10X Puffer	2
steriles H ₂ O _{bidest}	15
Enzym 1 (5 Units)	1
Enzym 2 (5 Units)	1
DNA	1

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die negative Ladung des Zucker-Phosphat-Rückgrats läßt Nukleinsäuren im elektrischen Feld zum positiven Pol wandern. In einem bestimmten Größenbereich ist die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts.

Zur Analyse der Restriktionsfragmente wurde eine 1%-ige Agaroselösung mit 1X TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA) hergestellt (AUSUBEL ET AL., 1992). Die mit Probenpuffer vermischten Proben wurden auf das Gel geladen und mit einer Stromstärke von 12 mA/cm Gellänge aufgetrennt. Im Anschluß wurden die Gele in Ethidiumbromidlösung, die mit der DNA interkaliert, für ca. 30 min inkubiert, mit Wasser abgespült und unter UV-Licht (256 nm) ausgewertet und dokumentiert. Als Größenstandart wurde ein 1 kb Marker verwendet.

Benötigte Lösungen:

- 50X TAE-Puffer: 2 M Tris/HCl, 0,1 M EDTA, mit Eisessig auf pH 8.5 einstellen
- 10X Probenpuffer: 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 50% (v/v) Glycerin, 0,1% 1 M EDTA
- Ethidiumbromidlösung: 5% (v/v) Ethidiumbromid (10 mg/ml) in 1X TAE-Puffer
- Marker: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

2.2.5 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Zellen zeichnen sich dadurch aus, daß ihre Zellwand in der logarithmischen Wachstumsphase z.B. durch Chemikalien für DNA aufnahmefähig gemacht wird. Die fremde zirkuläre DNA kann dann von den kompetenten Zellen z.B. durch Hitzeschock aufgenommen werden.

Zur Herstellung von kompetenten Zellen wurde die Calciumchlorid-Methode verwendet:

400-500 ml LB-Medium, ohne Antibiotikum, wurden mit 1 ml frischer Übernachtskultur angeimpft, bei 37°C inkubiert und bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,4-0,5 abzentrifugiert (4000 g, 10 min). Das Pellet wurde in 100 ml eiskaltem 0,1 M $MgCl_2$ aufgenommen, 20 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (2500 g, 10 min). Der Schritt wurde mit 200 ml eiskaltem 0,1 M $CaCl_2$ wiederholt. Das Pellet wurde dann in 5 ml $CaCl_2$ -Lösung (85% 0,1 M $CaCl_2$, 15% (v/v) Glycerin) aufgenommen und aliquotiert. Die Zellen wurden anschließend direkt verwendet oder schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.6 Transformation von Plasmid-DNA in E. coli-Zellen

Bei der Transformation wird Fremd-DNA in Zellen eingeschleust. Zu diesem Zweck wurden 100 µl kompetente Zellen mit 1 ng Plasmid-DNA vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock (42°C, 45 s) wurden die Zellen

2. MATERIAL UND METHODEN

weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 30-60 min bei 37°C kultiviert. Um ausschließlich transformierte Bakterien, die eine plasmid-codierte Antibiotikaresistenz tragen, zu selektieren, wurden 100 µl des Ansatzes auf entsprechenden LB-Agarplatten ausgestrichen.

2.2.7 *In vitro* Transkription (*in vitro*-Synthese von RNA)

Bei der *in vitro* Transkription wird eine DNA-Matrize an einer bestimmten Erkennungs- und Bindungsstelle (Promotorsequenz) von RNA-Polymerasen (T3, T7 oder SP6) erkannt und in ihre komplementäre RNA-Sequenz umgeschrieben. Die Matrize wird durch PCR oder Klonierung mit anschließender Linearisierung erzeugt, wobei das 3'-Ende nicht überhängen sollte, da diese ebenfalls als Startpunkte für die RNA-Polymerase dienen können (SCHENBORN & MIERENDORF, 1985). Es handelt sich *in vitro* um eine *run-off* Transkription, da die RNA-Polymerase am 3'-Ende abdissoziiert.

Die Ansätze (Tabelle 2.3) wurden bei 37°C für 1-2 Stunden inkubiert. Als Templates für die Transkriptionsansätze dienten die synthetisierten Oligonukleotide. Um nach der Transkription ungebundene α^{32} -P-ATP's (Amersham Biosciences GmbH, Freiburg) zu entfernen, wurde die RNA mit Phenol-Chloroform gereinigt und zur Ankonzentrierung mit 5 M Ammoniumacetat (Endkonzentration 0,25 M) gefällt.

Tabelle 2.3: Transkriptionsansatz mit α^{32} -P-ATP

Komponenten	Eingesetzte Volumina [µl]
DNA-Template (Endkonz.: 5 pmol)	x
5X RNA Polymerase-Puffer	4
10X NTP-Mix (5 mM CTP, GTP, UTP, 130 µM ATP)	2
α^{32} -P-ATP	2
100 mM DTT	1
T7 RNA-Polymerase	1
steriles H ₂ O _{bidest} (RNase frei)	ad 20

2.3 BIOCHEMISCHE METHODEN

2.3.1 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Die Analyse von Genen kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Für Untersuchungen auf Ebene der finalen Genprodukte (= Proteine) ist es notwendig, größere Mengen mit Hilfe von sogenannten Expressionssystemen zu synthetisieren.

Die bei der Transformation in die *E. coli* Zellen eingebrachten Expressionsvektoren enthalten die Fremd-DNA und ein Antibiotikaresistenzgen. Die durch die Antibiotikaresistenz gegebene Selektivität verhindert Kontaminationen mit Bakterien, die nicht das gewünschte Plasmid tragen. Bei Verwendung des pET-Systems (plasmid for Expression by T7 RNA Polymerase; STUDIER ET AL., 1983) wird die Expression der rekombinanten Proteine durch den Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid (IPTG)-induzierbaren T7-Promotor kontrolliert.

Zur Herstellung einer Vorkultur wurde LB-Medium mit selektiven Antibiotika und einer einzelnen Bakterienkultur angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Mit den Vorkulturen wurden die Expressionskulturen 1:20 angeimpft. Das Anwachsen und Vermehren der Zellen geschah bei 20°C (aNop48) beziehungsweise 37°C (aL7 & aFib) bis zu einer OD_{600 nm} von ~0,6. Die Expression der Proteine wurde anschließend mit IPTG (Endkonzentration: 0,5-1 mM) induziert. Nach weiterem Wachstum bis zu einer OD_{600 nm} von ~1,2 wurden die Zellen bei 5000 g für 15 Minuten abzentrifugiert. Die Pellets wurden in einer proteinabhängigen Menge Aufschlußpuffer resuspendiert und direkt aufgeschlossen oder bei -20°C gelagert.

Neben der herkömmlichen LB-Schüttelkultur wurden die Zellen auch in einem 10 l Fermenter (Applikon, Knuellwald) mit LB-Medium oder ECPM1-Medium kultiviert. Da die Zellen in ECPM1-Medium bis zu einer OD_{600 nm} von ~10 vor und ~20 nach der Induktion heranwachsen und somit einen erhöhten Sauerstoffbedarf besitzen, war es notwendig die Zellen in diesem Medium im Fermenter zu kultivieren.

Die Expression der Proteine wurde mittels SDS-PAGE (s. 2.3.4) kontrolliert.

Kultivierungsbedingungen:

- pET3d-aL7 wurde in *E. coli* BL21(DE3)pLysE transformiert und bei 37°C in LB-Medium sowohl in Schüttelkolben als auch im Fermenter kultiviert. Als selektive Antibiotika wurden dem Medium Ampicillin und Chloramphenicol zugesetzt. Um zu vermeiden, daß das Protein als Einschlußkörperchen (inclusion bodies) exprimiert wird, wurden 2% Glukose zugegeben.
- Das in *E. coli* BL21(DE3) transformierte pET28a-aNop56-Plasmid wurde bei 20°C in kanamycinhaltiger LB-Schüttelkultur kultiviert.
- aFib wurde in *E. coli* BL21(DE3)pLysS-Zellen bei 37°C im Fermenter in EPCM1 überexprimiert. Ampicillin und Chloramphenicol wurden als Antibiotika zugegeben.

2.3.2 Reinigung der exprimierten Proteine aus *E. coli*-Zellen

Die überexprimierten, rekombinanten Proteine aL7, aNop56 und aFib wurden auf ähnliche Weise aus den Bakterienzellen isoliert. Im Anschluß an jeden Reinigungsschritt wurden die Proben mit einer SDS-PAGE (s. 2.3.4) überprüft.

2.3.2.1 Zellaufschluß und Hitzedenaturierung

Um Proteine aus Zellen isolieren zu können, müssen die Zellen zuerst aufgebrochen werden. Dazu können verschiedene Methoden angewandt werden, wie z.B. die chemische Lyse oder mechanisches Aufbrechen. Bei der Verwendung von Lysozym werden die Polysaccharide, die der Bakterienzellwand Stabilität verleihen und ein Platzen der Zelle durch einen zu hohen osmotischen Druck verhindern, gespalten. Zur Vermeidung eines Proteinabbaus durch Proteasen wurden beim Zellaufschluß noch Protease-Inhibitoren, z.B. Complete EDTA-free Tabletten (Roche, Mannheim) zugesetzt, die Serin- und Cystein-Proteasen vollständig hemmen.

Die Zellen wurden mit einer Kombination aus Lysozym und Ultraschall aufgeschlossen. Eine Zugabe von Lysozym zu den *E. coli* BL21(DE3)pLysE + S-Zellen war

jedoch nicht notwendig, da bei diesen Zellen ein Plasmid vorhanden ist, das für Lysozym codiert. Je nach Protein wurde ein 4 l Zellpellet (bei ECPM1-Medium nur 1 l) in 40-200 ml Aufschlußpuffer resuspendiert. Der Aufschlußpuffer enthielt eine Spatelspitze Lysozym und eine gelöste Tablette Complete EDTA-free Protease-Inhibitor-Cocktail. Die Zellsuspensionen wurden bei Raumtemperatur (RT) für einige Minuten inkubiert und anschließend, im Eisbad stehend, mit Ultraschall (Sonify, Branson, USA) 3×45 Sekunden aufgeschlossen. Um die Zelltrümmer von den Proteinen, die sich nach dem Zellaufschluß in Lösung befinden, zu trennen, wurden die Zellsuspensionen für 15 Minuten bei 20000 g zentrifugiert.

Zur weiteren einfachen Aufreinigung der rekombinanten, hitzestabilen Proteine wurde die Proteinlösung erhitzt. Die meisten der Proteine der mesophilen Wirtsorganismen wurden dabei denaturiert und konnten durch Zentrifugation aus der Lösung entfernt werden. Die Proteinlösung wurde im Wasserbad bei 65°C für 10-20 Minuten inkubiert und bei 20000 g für 15 Minuten zentrifugiert, um die denaturierten Proteine aus der Lösung zu entfernen.

Benötigte Lösungen:

- aL7-Aufschlußpuffer: 50 mM Bis-Tris, pH 6,5, 50 mM NaCl, 2 mM DTT
- aNop56-Aufschlußpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 200 mM NaCl, 2 mM DTT
- aFib-Aufschlußpuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 50 mM NaCl, 2 mM DTT

2.3.2.2 Chromatographische Trennmethode

Das Grundprinzip aller Chromatographiemethoden ist das Aufbringen einer flüssigen Probe auf eine stationäre Phase und das anschließende Auftrennen mittels einer flüssigen mobilen Phase. Einige der Trennmethode werden im folgenden näher erläutert.

Mit der Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ist es möglich das zu reinigende Protein schnell und einfach von den anderen störenden Proteinen abzutrennen. Ein weiterer Vorteil der FPLC ist die hohe Reproduzierbarkeit der Läufe. Die Reinigungsläufe wurden mit Äkta Systemen (ÄktaPrime und ÄktaPurifier) und Säulen

der Firma Amersham Biosciences GmbH (Freiburg) durchgeführt. Die Säulen wurden vor Gebrauch nach Angaben des Herstellers mit Auftragspuffer equilibriert. Alle Proben wurden vor dem Auftragen auf die Säulen sterilfiltriert (Minisart® 0,22 µm Porengröße, Sartorius, Göttingen), um eventuell vorhandene Schwebeteilchen aus den Lösungen zu entfernen.

a. Ionenaustauscherchromatographie

Proteine binden bei der Ionenaustauscherchromatographie durch elektrostatische Wechselwirkungen an positiv geladene (Anionenaustauscher) oder negativ geladene (Kationenaustauscher) Gruppen einer Matrix. Ob und wie stark ein Protein an die Ionenaustauschermatrix bindet, hängt vom isoelektrischen Punkt des Proteins, der Ionenstärke und dem pH-Wert des Puffers und der Ladungsdichte des Säulenmaterials ab.

Nach der Hitzedenaturierung wurden die Proteine aNop56 und aFib mittels Anionenaustauscherchromatographie (MonoQ HR 10/10) von weiteren störenden Proteinen abgetrennt. aFib wurde nicht an das Material gebunden und wurde im Durchfluß wieder von der Säule gewaschen. Die anderen Proteine wurden mit einem ansteigenden Salzgradienten eluiert.

Mit einem langsam steigenden NaCl-Gradienten wurde das an die MonoQ-Säule gebundene aNop56 zwischen 400 und 600 mM wieder eluiert.

Benötigte Lösungen:

- Niedrigsalz-Puffer aNop56: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 2 mM DTT
- Hochsalz-Puffer aNop56: 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 1 M NaCl, 2 mM DTT
- Niedrigsalz-Puffer aFib: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 2 mM DTT
- Hochsalz-Puffer aFib: 50 mM Tris/HCl, pH 8,5, 1 M NaCl, 2 mM DTT

b. Hydrophobe Chromatographie

Auf der Oberfläche besitzen viele Proteine hydrophobe Bereiche. Diese binden in wässriger Lösung an hydrophobe Oberflächen. Durch hohe Konzentrationen von bestimmten Salzen werden die hydrophoben Wechselwirkungen verstärkt, während diese durch chaotrope Salze verringert werden. Die Probe wird bei hoher Ionenstärke auf die hydrophobe Matrix (Phenyl Sepharose®) geladen. Die Säule wird gewaschen, und mit einem abnehmenden Salzgradienten kann das Protein wieder von der Säule eluiert werden.

Der hitzedenaturierte aL7-Proteinrohextrakt wurde mit Ammoniumsulfat (Endkonzentration in der Proteinlösung: 1 M) versetzt und auf die equilibrierte Phenyl Sepharose® HiLoad 16/10 geladen. Obwohl das aL7-Protein direkt von der Säule gewaschen wurde, konnte diese Methode angewendet werden, da alle *E. coli*-eigenen Proteine an die Säule gebunden und erst durch einen abnehmenden Salzgradienten entfernt wurden.

Benötigte Lösungen:

- Hochsalz-Puffer: 50 mM Bis-Tris, pH 6,5, 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 mM DTT
- Niedrigsalz-Puffer: 50 mM Bis-Tris, pH 6,5, 2 mM DTT

c. Gelfiltration

Bei der Gelfiltration werden Proteine nach Größenunterschieden getrennt. Deshalb wird sie auch als Größenausschlußchromatographie bezeichnet. Bei den verwendeten Superdex®-Säulen handelt es sich um Dextran Säulen mit extrem dicht gepackten, sehr kleinen, porösen und gleichmäßigen Teilchen. Je nach Größe dringen die Moleküle unterschiedlich weit in die Gelmatrix ein. Während kleine Moleküle in die Gelporen diffundieren und ihr Fluß verzögert wird, laufen größere Moleküle durch die Zwischenräume des Gelbettes und werden schneller von der Säule eluiert.

Alle drei Proteine wurden im letzten Reinigungsschritt auf eine mit Laufpuffer equilibrierte Säule (2 ml/min) aufgetragen, um die restlichen

Kontaminanten zu entfernen. Die Elutionsprofile wurden mit einer Eichgerade, die unter gleichen Bedingungen erstellt wurde, verglichen und die Größe der Proteine bestimmt.

Durch die ungenaue Konzentrationsbestimmung der Proteine durch das Bradford-Reagenz, können die einzelnen Komponenten nicht direkt in einem stöchiometrischen Verhältnis zueinander als Kristallisationsansätze pipettiert werden. Daher wurde die Gelfiltration auch zur Aufreinigung des rekonstituierten sRNP-Komplexes genutzt.

Benötigte Lösung:

- Laufpuffer: 20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM DTT

2.3.2.3 Ankonzentrierung einer Proteinlösung

Zur Kristallisation werden Proteinkonzentrationen von mehreren mg/ml benötigt, die normalerweise jedoch nicht nach dem letzten Aufreinigungsschritt vorhanden sind. Um die Konzentration zu erhöhen, werden Konzentratoren (Sartorius, Göttingen) eingesetzt. Hierbei wird die zu konzentrierende Proteinlösung auf einen Filter mit definierter Ausschlußgrenze (cut off) pipettiert und bei 3000-4000 g zentrifugiert. Das Konzentrat kann nach Abspülen der Filtermembran in ein Eppendorfgefäß zur weiteren Lagerung überführt werden.

Die Protein-enthaltenden Gelfiltrationsfraktionen wurden mit Konzentratoren (Sartorius, Göttingen) bis zu einer Konzentration von 8-10 mg/ml ankonzentriert.

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.4: Überblick über die Präparation und Rekonstitution des sRNP-Komplexes

	aL7	aNop56	aFib
Vektor	In pET3d <i>NcoI/BamHI</i> einkloniert	In pET28a <i>NcoI/EcoRI</i> einkloniert	In pET3d <i>NcoI/BamHI</i> einkloniert
Expressionsstamm	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysE; bei 37°C expriert	<i>E. coli</i> BL21(DE3); bei 20°C expriert	<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS; bei 37°C expriert
Aufschluß mit Ultraschall	3 × 45 s	3 × 45 s	3 × 45 s
Hitzedenaturierung	20 min bei 65°C	10 min bei 65°C	10 min bei 65°C
Anionenaustauscher	-	MonoQ HR 10/10	MonoQ HR 10/10
Hydrophobe Interaktions- Chromatographie	Phenyl Sepharose® HiLoad® 16/10	-	-
Gelfiltration	Superdex® 75 HR 26/60	Supertex® 200 HR 26/60	Superdex® 75 HR 26/60
Ankonzentrierung	Größenausschluß: 3 kDa	Größenausschluß: 30 kDa	Größenausschluß: 10 kDa
Komplex-Rekonstitution	Mix aus RNA und den 3 Proteinen für 1 h bei RT		
Gelfiltration	Superdex® 75 HR 10/30		
Ankonzentrierung	Größenausschluß: 30 kDa		

2.3.3 Proteinbestimmung nach BRADFORD (1979)

Der Bradford-Test basiert auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G250 von 465 nm auf 595 nm bei der Bildung eines Farbstoff-Protein-Komplexes. Ein Maß für die Proteinkonzentration in der zu untersuchenden Lösung ist die Absorptionzunahme.

980 µl einer 1:5 mit H₂O verdünnte Bradfordreagenzlösung (1 mg/ml Coomassie Brilliant Blau G250 in 85%iger H₃PO₄; BioRad, München) wurden mit 20 µl Proteinlösung vermischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm gegen einen Leerwert bestimmt und die Konzentration berechnet.

2.3.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach LAEMMLI (1970)

Bei der Elektrophorese wandern geladene Teilchen im elektrischen Feld. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit der geladenen Teilchen bei gleicher Feldstärke abhängig von Molekulargewicht, Gestalt und Ladung der Teilchen.

Um die Auftrennung von Proteinen nach ihren Molekulargewichten zu erreichen, muß die Eigenladung der Proteinmoleküle ausgeschaltet werden. Dies geschieht bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Hilfe des anionischen Detergenzes SDS (Natriumdodecylsulfat), das sich an die hydrophoben Regionen der Proteine anlagert, die Wasserstoffbrückenbindungen löst und somit die Zerstörung der Tertiär- und Quartärstruktur bewirkt. Eine weitere Denaturierung, d.h. Auflösen der Sekundärstruktur, der Proteine wird durch die Zugabe des starken Reduktionsmittels β-Mercaptoethanol, das Disulfidbrücken löst, erreicht.

Die Bindung der hydrophoben Reste der Aminosäureseitenketten mit dem SDS führt dazu, daß die Proteine in anionischer Form vorliegen und somit im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die native Ladung der Proteine wird überdeckt und die Auftrennung erfolgt ausschließlich über das Molekulargewicht.

Zur erfolgreichen Auftrennung von Proteinen eignen sich Polyacrylamidgele. Diese bestimmen durch ihre Gesamtkonzentration an Acrylamid und dem Verhältnis

2. MATERIAL UND METHODEN

Acrylamid zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid den Grad der Vernetzung und die Porengröße. Die Trennung beruht daher nur auf der Wanderungsgeschwindigkeit der SDS-Protein-Komplexe im Gel, die mit zunehmender Größe (Stokes-Radius) wegen des Molekularsiebeffektes abnimmt.

Abhängig von den Molekulargewichten der einzelnen Proteine wurden Trenngele mit Acrylamidkonzentrationen zwischen 10 und 17,5% und Sammelgele mit einer Konzentration von 5% verwendet.

Bevor die Proteinproben auf das Gel aufgetragen werden konnten, wurden sie zur Denaturierung 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Neben den Proben wurde ein Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen, um die Größen der aufgetrennten Proteine zu verifizieren. Im Sammelgel wurden die Proben bei einer geringen Stromstärke (~35 mA) zunächst fokussiert, damit eine exakte Trennung der einzelnen Proteine im Trenngel (~50 mA) gewährleistet war.

Benötigte Lösungen:

- 30% Acrylamid-Stammlösung (PAA₃₀; Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid von 37,5:1)
- Trenngelpuffer: 1,88 M Tris/HCl, pH 8,8
- Sammelgelpuffer: 0,625 M Tris/HCl, pH 6,8
- 0,5% (w/v) SDS-Lösung
- 100% N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)
- 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
- Laufpuffer: 25 mM Tris/HCl, pH 8,8, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS
- 2× SDS-Probenpuffer: 20% 0,625 M Tris/HCl, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 50% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 1% (v/v) Bromphenolblau (1%-ig in Ethanol)
- Molekulargewichtsstandard: Mark 12™ Unstained Standard, Invitrogen (Karlsruhe); Broad Range Protein Marker, New England Biolabs

Tabelle 2.5: Pipettierschema für denaturierende Polyacrylamidgele

Komponenten	10% iges Trenngel	12,5%iges Trenngel	17,5%iges Trenngel	5%iges Sammelgel
PAA ₃₀ [ml]	2,0	2,5	3,5	0,33
Trenngelpuffer [ml]	1,2	1,2	1,2	-
Sammelgelpuffer [ml]	-	-	-	0,4
SDS-Lösung [ml]	1,2	1,2	1,2	0,4
H ₂ O [ml]	1,6	1,1	0,1	0,87
TEMED [μ l]	5	5	5	6
APS [μ l]	30	30	30	25

2.3.5 Protein-Färbemethoden

Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die Gele entweder mit der Coomassie-Proteinfärbung oder der Silberfärbung fixiert.

2.3.5.1 Coomassie-Proteinfärbung

Die Coomassie-Färbung eignet sich ausschließlich zur Visualisierung von Proteinen und wurde daher zur Kontrolle der Aufreinigung der einzelnen Proteine eingesetzt. Sie ist einfach in ihrer Durchführung und gut reproduzierbar, jedoch zeitaufwendig und nicht besonders sensitiv (untere Grenze: 200-400 ng/Bande).

Zum Anfärben der Proteine wurden die Gele für 15 Minuten in einer erwärmten Coomassie-Färbelösung schüttelnd inkubiert. Nach dem Färben wurde der Überschuß an Farbstoff durch mehrmaliges Waschen mit Coomassie-Entfärbelösung beseitigt.

Benötigte Lösungen:

- Coomassie-Färbelösung: 25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Eisessig, 0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250
- Coomassie-Entfärbelösung: 45% (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig

2. MATERIAL UND METHODEN

2.3.5.2 Silberfärbung nach NESTERENKO et al. (1994)

Um geringere Mengen (untere Grenze: ca. 50-100 pg/Bande) an Proteinen auf Gelen nachweisen zu können, wurde die Silberfärbung verwendet. Bei dieser Reaktion bildet das Ag^+ -Ion Komplexe mit den Glutaminsäure-, Asparaginsäure- und Cystein-Resten der Proteine. Das nun in den Komplexen gebundene Ag^+ wird durch alkalisches Formaldehyd zu Ag reduziert. Bei der Silberfärbung handelt es sich nicht um eine Protein-spezifische Färbemethode, denn sie färbt z.B. auch Nukleinsäuren an. Durch diesen Mangel eignete sich die Silberfärbung zur Verifizierung der Komplexbildung von aL7, aNop48, aFib und sR13del3.

Benötigte Lösungen und Durchführung:

Fixierlösung:	60 ml	50% (v/v) Aceton	} 5 min
	1,5 ml	50% (w/v) Trichloressigsäure	
	25 μl	37% Formaldehyd	
Waschen:	60 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	$3 \times 5 \text{ s}$
Waschen:	60 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	5 min
Waschen:	60 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	$3 \times 5 \text{ s}$
Vorbereitungslösung I:	60 ml	50% (v/v) Aceton	5 min
Vorbereitungslösung II:	100 μl	10% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -Lösung	} 1 min
	60 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	
Waschen:	60 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	$3 \times 5 \text{ s}$
Silbernitratlösung:	800 μl	20% (w/v) AgNO_3 -Lösung	} 8 min
	600 μl	37% Formaldehyd	
	60 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	
Waschen:	60 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	
Entwickler:	1,2 g	Na_2CO_3	} 10-20 s
	25 μl	37% Formaldehyd	
	25 μl	10% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -Lösung	
	60 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	
Stopplösung:	60 ml	7% (v/v) Essigsäure	30 s
Waschen:	60 ml	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	10 s

2.3.6 Band-Shift-Assay

Nukleinsäuren wandern, je nach Größe, im elektrischen Feld unterschiedlich weit. Wenn die Nukleinsäure an ein Protein gebunden wird, verändert sich zwangsläufig ihre Größe und damit auch die Laufstrecke im Gel. Da der Nukleinsäure-Protein-Komplex größer als die freie Nukleinsäure ist, wandert er langsamer durch das vernetzte Gel. Nach Anfärbung oder Autoradiographie erkennt man eine Nukleinsäure-Bande und eine dazu verschobene Komplex-Bande (*band-shift*) im Gel.

Die bei der T7-Transkription synthetisierte RNA (s. 2.2.7) wurde mit unterschiedlichen aL7-Konzentrationen (0-400 nM) auf ihre Bindungsfähigkeit untersucht. Daneben wurde mit allen drei Proteinen und den RNA-Transkripten versucht, den sRNP-Komplex zu rekonstituieren.

Benötigte Lösungen:

- 5X RNA-Renaturierungspuffer: 125 mM Phosphatpuffer, pH 7, 500 mM NaCl
- 4X Band-Shift-Puffer: 100 mM Phosphatpuffer, pH 7, 400 mM NaCl, 4 mM MgCl₂
- RNA-Probenpuffer: 1% (v/v) Bromphenolblau (1%-ig in Ethanol), 10% (v/v) Glycerin
- RNA-Mix (für 6 Reaktionen): 6 µl RNA, 2 µl Renaturierungspuffer, 4 µl H₂O
- 30% Acrylamid-Stammlösung (Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid von 37,5:1)
- 100% N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)
- 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)
- 1 M Phosphatpuffer, pH 7
- Laufpuffer: 50 mM Phosphatpuffer, pH 7

Der RNA-Mix wurde für 1 Minute bei 95°C denaturiert und auf 55°C abgekühlt. Nach Zugabe von 2 µl RNA-Mix zum Reaktionsansatz wurde dieser für 10 Minuten bei 68°C inkubiert. Der Reaktions-Mix wurde mit 2 µl RNA-Probenpuffer versetzt und auf ein nicht denaturierendes Gel aufgetragen. Native Gelsysteme enthalten im Gegensatz zur SDS-PAGE keine denaturierenden Reagenzien, wie z.B. SDS oder β-Mercaptoethanol, d.h. die Proteine behalten ihre native Form und Aktivität.

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2.6: Reaktionsansatz aL7-RNA Band-Shift

Komponenten	Eingesetzte Volumina [μ l]
aL7	x
4X Band-Shift-Puffer	2,5
RNA-Mix	2
steriles H ₂ O (RNase frei)	ad 10

Tabelle 2.7: Ansätze für Komplex-Rekonstitutionen

Komponenten	Volumina [μ l] Komplex RNA-aL7-aNop56	Volumina [μ l] Komplex RNA-aL7-aNop56-aFib
aL7 [100 nM]	1	1
aNop56	1	1
aFib	-	1
4X Band-Shift-Puffer	2,5	2,5
steriles H ₂ O (RNase frei)	3,5	2,5
RNA-Mix	2	2

Tabelle 2.8: Pipettierschema für native Polyacrylamidgele

Komponenten	Volumina: 6%iges Gel	Volumina: 10%iges Gel
Polyacrylamidlösung [ml]	2	3,3
1 M Phosphatpuffer, pH 7 [ml]	1	1
H ₂ O [ml]	7	5,7
TEMED [μ l]	10	10
APS [μ l]	60	60

2.3.7 Rekonstitution des sRNP-Komplexes

Die gereinigten Proteine wurden mit der RNA gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungenauen Konzentrationsbestimmungen des Bradford-Tests ließen ein exaktes Berechnen der molaren Verhältnisse von Proteinen:RNA nicht zu, daher wurde die RNA mit den Proteinen in einem berechneten 1:1-Verhältnis gemischt und im Anschluß an die Inkubationszeit über eine Superdex® S200 HR10/30-Gelfiltrationssäule aufgereinigt. Während der Komplex bei der Elution intakt blieb und

2. MATERIAL UND METHODEN

nun in einem molaren Verhältnis vorlag, wurden die Protein-Überschüsse abgetrennt. Es wurden folgende Komplexe rekonstituiert:

- | | | |
|-----------------------------------|---|-------------------------|
| a. aL7 + sR1/U4-22 | } | RNA-Protein-Komplexe |
| b. aL7 + sR13-28a | | |
| c. aL7 + aNop56 + aFib + sR13-28a | | |
| d. aL7 + aNop56 + aFib + sR13-28b | | |
| e. aNop56 + aFib | | Protein-Protein-Komplex |

2.3.8 Autoradiographie

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von radioaktiv-markierten Nukleinsäuren können diese durch Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Die Gele wurden hierzu in Cellophanfolie eingeschlagen, auf einen Röntgenfilm (XAR-5; Kodak, Stuttgart) aufgelegt und in einer Filmkassette (Kodak, Stuttgart) für mehrere Stunden bei -80°C exponiert. Auf dem entwickelten Röntgenfilm wurden die radioaktiv-markierten Nukleinsäuren beziehungsweise Nukleinsäure-Protein-Komplexe durch Schwärzung visualisiert.

2.4 RÖNTGENKRISTALLOGRAPHISCHE METHODEN

Kristalle bestehen aus wiederkehrenden gleichartigen Bausteinen, die in ihren Raumdimensionen hoch geordnet vorliegen und Kristallgitter ausbilden. Dabei besetzen die Bausteine die Gitterpunkte in Form von Atomen, Ionen oder Molekülen. Die Translationsvektoren a , b und c sowie die Winkel α , β und γ , die sogenannten Gitterkonstanten, korrelieren mit den räumlich wiederkehrenden Gitterpunkten und bilden die Einheitszelle (= Elementarzelle). Die asymmetrische Einheit eines Kristalls erhält man durch die weitere Unterteilung der Einheitszelle durch Symmetrieelemente. Diese werden unterschieden in Punktsymmetrieelemente (z.B. Drehachse, Spiegelachse und Translation) und Struktursymmetrieelemente (z.B. Punktsymmetrie plus Translation).

Es kann zwischen sieben verschiedenen Achsensystemen unterschieden werden, die bestimmt werden durch die Symmetrie im Kristallgitter und möglichst kleiner Vektorbeträge für die Kanten der Einheitszelle. Aus diesen Achsensystemen können durch Translationen auf den drei Koordinatenachsen 14 Bravais-Gitter, die unterschieden werden in primitiv, flächen- und innenzentriert, gebildet werden. Die Kombination der 14 Bravais-Gitter mit den Punktsymmetrieelementen ergibt 32 Kristallklassen (Punktgruppen). In 230 verschiedenen Raumgruppen können Moleküle kristallisieren, wenn die Bravais-Gitter mit den Struktursymmetrieelementen kombiniert werden (KLEBER, 1961). Bei biologischen Molekülen verringert sich die Anzahl der Raumgruppen auf 65, da spiegelnde Symmetrieoperationen aufgrund des enantiomorphen Aufbaus von Proteinen aus L-Aminosäuren und D-Furanosen nicht erlaubt sind.

2.4.1 Kristallisation biologischer Makromoleküle

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

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

Die verwendete Dampfdiffusion, durchgeführt als hängender oder sitzender Tropfen, ist die häufigste Methode zur Herstellung von Kristallen. Zu Beginn der Experimente werden die Tropfen in einem 1:1-Verhältnis von Proteinlösung zu Kristal-

lutionslösung gemischt und in einem abgeschlossenen System durch die Plazierung auf einem Stempel oder unter dem Deckel von der Reservoirlösung räumlich getrennt. Ein Konzentrationsgradient wird aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen des Fällungsmittels in Tropfen und Reservoir aufgebaut. Das heißt, daß der Partialdruck des Wassers erhöht ist, da die Reservoirlösung im Tropfen durch die Proteinlösung verdünnt vorliegt. Daraufhin diffundiert das Wasser aus dem vergleichsweise kleinen Tropfenvolumen, und sowohl die Konzentration der Proteinlösung als auch des Fällungsmittels werden erhöht.

2.4.2 Co-Kristallisation und Derivatisierung durch Diffusion (Soaking)

Neben der Lösung des Phasenproblems durch Schwermetall-Derivate (s. 2.4.3 Multipler Isomorpher Ersatz) werden die Co-Kristallisation und die Derivatisierung durch Diffusion, dem sogenannten Soaking, auch zur funktionellen Aufklärung von Protein-Interaktionen mit anderen Molekülen eingesetzt. Bei den Molekülen kann es sich dabei um Proteine, Nukleinsäuren oder Liganden wie Inhibitoren, Substrat-Analoga oder Co-Faktoren handeln.

Bei der Co-Kristallisation von Proteinen und Liganden wird das Protein zunächst mit einem molaren Überschuß an Ligand versetzt und anschließend mit der Kristallisationslösung, die Proteinkristalle ohne Liganden hervorbringt, vermischt. Wenn Proteine mit anderen Proteinen und/oder Nukleinsäure kristallisiert werden sollen, ist die Co-Kristallisation die einzige Möglichkeit Kristalle zu produzieren.

Die Derivatisierung von bereits vorhandenen Proteinkristallen durch Diffusion mit Liganden ist möglich, da die Proteine ihre katalytischen Funktionen und Bindungseigenschaften auch im kristallinen Zustand behalten.

2.4.2.1 Co-Kristallisation von RNA-Protein- und Protein-Protein-Komplexen

Zur *in vitro* Rekonstitution der Komplexe wurden die RNA und die Proteine wie unter 2.3.7 beschrieben miteinander gemixt, bei Raumtemperatur inkubiert und über

eine Superdex® S200 HR10/30-Gelfiltrationssäule aufgereinigt. Folgende Komplexe standen anschließend zur Kristallisation zur Verfügung:

- | | | |
|-----------------------------------|---|-------------------------|
| a. aL7 + sR1/U4-22 | } | RNA-Protein-Komplexe |
| b. aL7 + sR13-28a | | |
| c. aL7 + aNop56 + aFib + sR13-28a | | |
| d. aL7 + aNop56 + aFib + sR13-28b | | |
| e. aNop56 + aFib | | Protein-Protein-Komplex |

Zur Kristallisierung der Komplexe wurden sowohl Linbro™-Platten (hängender Tropfen; Hampton Research, USA) als auch Cryschem™-Platten (sitzender Tropfen; Hampton Research, USA) verwendet. Im Reservoirbehälter befanden sich 500-1000 µl Kristallisationslösung, von der 1 µl mit 1 µl RNA-Protein-Komplex-Lösung vermischt wurde. Die Linbro™-Platten wurden an den Rändern der Reservoirbehälter mit viskoser Silikonpaste eingefettet und mit silanisierten Deckgläschen, auf deren Unterseite der Kristallisationstropfen hing, luftdicht verschlossen. Die Cryschem™-Platten, die einen Stempel pro Reservoirbehälter besitzen, auf dem die Tropfen plaziert wurden, wurden mit lösungsmittelbeständigem Klebeband abgedichtet. Kommerzielle Screens der Firma Hampton Research (Crystal Screen I + II, PEG/Ion-Screen, Natrix Screen) wurden für erste Kristallisationsversuche verwendet. Die Ansätze wurden bei 20°C aufbewahrt und mit Hilfe eines Leica MZ125-Stereomikroskops in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Kristalle wurden mit einer Nikon-Coolpix 4500 Digitalkamera dokumentiert.

2.4.2.2 Co-Kristallisation und Soaking von AmyB mit verschiedenen Liganden

Da für AmyB sowohl die Kristallisationsbedingungen bekannt sind als auch die Struktur weitestgehend gelöst war, die physiologische Funktion des Proteins aber noch völlig ungeklärt ist, sollte mit Hilfe von Co-Kristallisation und Soaking die Bindung verschiedener Liganden an das aktive Zentrum untersucht werden. Das zur Co-Kristallisation benötigte aufgereinigte Protein AmyB aus *Thermotoga maritima* MSB 8 wurde freundlicherweise von Meike Ballschmiter, Universität Göttingen, Institut für Mikrobiologie und Genetik, zur Verfügung gestellt. Als Co-Faktoren wurden ver-

schiedene Zucker (Acarbose, Maltose und Glucose) ausgesucht, da eine hohe Sequenzhomologie von AmyB zu Mitgliedern der Glycosyl Hydrolase Familie 57 festgestellt wurde. Aufgrund der Verfärbung nativer Kristalle von farblos zu rostrot wurden auch zwei- und dreiwertige Metallionen (Fe^{3+} , Mn^{2+} und Zn^{2+}) als Co-Faktoren untersucht. Des Weiteren wurde ATP, das AmyB reguliert, als Ligand geprüft. Alle Kristallisations- und Soakingversuche wurden mit Liganden-Konzentrationen von 0,1-10 mM durchgeführt. Aufbewahrung, Kontrolle und Dokumentation erfolgten wie in **2.4.2.1** beschrieben.

2.4.3 Kryo-Konservierung und Montage der Kristalle zur Datensammlung

Innerhalb makromolekularer Kristalle entstehen durch die Absorption von Röntgenstrahlen freie Hydroxylradikale, die zu Schäden im Kristallgitter führen und dadurch eine Verschlechterung der Diffraktionseigenschaften nach sich ziehen. Eine Diffusion der Radikale wird durch tiefe Temperaturen (100 K) während der Datensammlung stark eingeschränkt und eine längere Exposition der Kristalle im Röntgenstrahl ist möglich.

Daneben besitzen Kristalle einen Wassergehalt, der zwischen 30 und 90% variieren kann (CASPAR ET AL., 1969; COHEN ET AL., 1972) und der große Zwischenräume und Kanäle füllt. Ein Tiefkühlen (es kommt zu keiner Änderung des Aggregatzustandes) der Kristalle ohne Frostschutzmittel (Kryo-Protektant) würde somit in den meisten Fällen zu der Bildung von Eis im Kristallwasser und der umgebenden Flüssigkeit und daraus folgend zu einer mechanischen Zerstörung des Kristalls führen. Daher ist es notwendig die Kristalle in einem geeigneten Kryo-Puffer, der z.B. aus Paraton N oder der Mutterlösung mit Glycerin, PEG 400, MPD oder Kryo-Salzen als Frostschutzmittel besteht, zu äquilibrieren. Mit einer Nylonschleife (Größe: 0,05-1 mm), die auf einem Stab mit Magnetkappe befestigt ist, wird der Kristall aus dem Kryo-Puffer gefischt und auf den Goniometerkopf der Drehanode (s. **2.4.4**) montiert. Die Suche nach dem optimalen Kryo-Puffer erweist sich oft als langwierig und Kristalle verbrauchend. Bei Erfolg werden die Diffraktionseigenschaften des Kristalls aber verbessert.

Ist ein erfolgreiches Tiefkühlen des Kristalls jedoch nicht möglich, kann der Kristall mit einem Tropfen Mutterlösung in eine Glaskapillare überführt werden. Diese wird an beiden Enden verschlossen und mit Knete auf dem Goniometerkopf fixiert.

Größere Datenmengen eines einzelnen Kristalls durch Reduzierung der Strahlungsschäden, geringes Hintergrundrauschen durch Reduzierung der Streustrahlung und einfaches Lagern und Handhaben der Kristalle führten dazu, daß die Kryo-Kristallisierung in den meisten Fällen zu Anwendung kommt.

Für die AmyB Experimente wurden die Kristalle nur mit der Kryo-Kristallographie vermessen, während bei den sRNP-Kristallen auch die veraltete Kapillarmethode Anwendung fand. Kristalle, die mit der Kryo-Methode gemessen wurden, wurden während der Experimente durch ein Kryo-System im tiefgekühlten Zustand konserviert, indem sie mit 100 K kaltem Stickstoffgas umströmt wurden. Mit speziellen Geräten (CryoTong™, CryoWand™, Hampton Research, USA), die in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurden, wurden die Kristalle vom Goniometerkopf abmontiert und in einem Stickstoff gefüllten Lagerungsbehälter bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Auf diese Weise wurden die Kristalle an der Drehanode nach ihren Diffraktionseigenschaften vorselektiert, um die begrenzte Meßzeit am Synchrotron optimal nutzen zu können.

2.4.4 Strahlungsquellen

Um geeignete Beugungsbilder zur Strukturbestimmung eines Kristalls zu erhalten, wird Röntgenstrahlung benötigt, die auf unterschiedliche Weise erzeugt werden kann. Als geeignete Strahlungsquellen standen Drehanode und Synchrotron zur Verfügung.

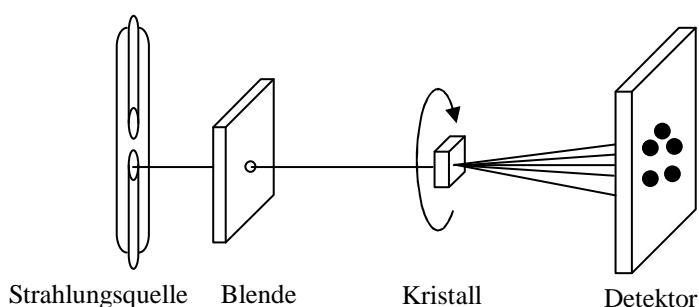


Abbildung 2.1: Schematischer Aufbau eines Röntgenbeugungsexperimentes

2.4.4.1 Drehanode

Die von einer Kathode gebildeten Elektronen werden durch eine Spannung beschleunigt und prallen auf eine sich drehende Anode (aus Molybdän, Kupfer oder Wolfram), an der sie abgebremst werden. Die Elektronen geben daraufhin ihre Energie ab und verwandeln sie in Strahlung und Wärme, weshalb die Anode gekühlt werden muß. Sehr kleine beziehungsweise schlecht streuende Kristalle und Experimente, zu deren Auswertung mehrere Datensätze mit verschiedenen Wellenlängen benötigt werden (s. 2.4.5 Multiple Anomale Dispersion), erfordern jedoch die intensivere, wellenlängenveränderbare Synchrotronstrahlung.

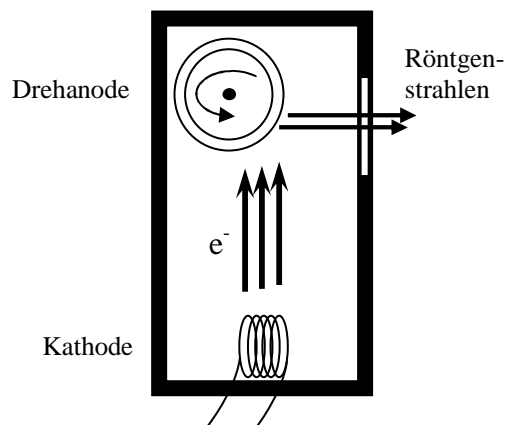


Abbildung 2.2: Schematischer Aufbau einer Drehanode

2.4.4.2 Synchrotron

Beim Synchrotron handelt es sich um einen Teilchenbeschleuniger, der ringförmig aufgebaut ist, und in dem die Elektronen Energien bis 100 MeV erreichen. Die Elektronen werden durch Magnetfelder auf ihrer Sollbahn geführt. Dabei wirkende Kräfte rufen eine Beschleunigung der Elektronen hervor, die elektromagnetische Strahlung aussenden. Die Synchrotronstrahlung, die bis in den Spektralbereich der Röntgenstrahlung reicht, tritt in den Krümmungsbereichen der Bahn stark gebündelt aus und kann für die Untersuchungen an Kristallen genutzt werden.

Datensätze der AmyB Kristalle wurden sowohl im Labor an Rigaku Drehanoden-Generatoren (Micromax 007 & RU-H3R, Rigaku MSC, USA) als auch am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg (DESY, Beamlines: BW7A & BW7B) und an der Europäischen Synchrotronstrahlungsquelle in Grenoble (ESRF, Beamline: ID14-1) gemessen. Die Reflexdaten wurden mit Image-Plate Systemen (mar345 dtb, MarResearch GmbH, Deutschland) und CCD Detektoren (ADSC Q4R, Area Detector Systems Corporation, USA) aufgenommen. Um die Vollständigkeit der gesammelten Datensätze zu gewährleisten, wurde der abzudeckende Winkelbereich aus der Anfangsorientierung des Kristalls zum Röntgenstrahl und der Kristallsymmetrie bestimmt.

2.4.5 Röntgenbeugung am Kristallgitter

Die im Kristall periodisch angeordneten Moleküle treten mit den elektromagnetischen Röntgenwellen in Wechselwirkung. Dabei kommt es zu konstruktiver Interferenz der gebeugten Strahlen, wenn der Gangunterschied zweier Wellen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge λ ist (Braggsches Gesetz).

$$2d \cdot \sin \theta = n\lambda \quad (n = 1, 2, 3, \dots) \quad \text{Braggsches Gesetz}$$

Im realen Raumgitter wird jeder Ebenenschar, die jeweils einem Reflex auf dem Beugungsbild entspricht, ein Strukturfaktor F mit der Raumlage h , k und l (Millersche Indizes) zugeordnet. Während die Wellenlänge der Röntgenstrahlung und die Intensität des Reflexes I_{hkl} (proportional zur Amplitude $|F_{hkl}|$) bekannt sind, muß die Phaseninformation der am Kristallgitter gebeugten Röntgenstrahlen indirekt ermittelt werden. Um das Phasenproblem makromolekularer Kristalle zu lösen, stehen drei verschiedene Ansätze zur Verfügung:

a. Molekularer Ersatz (MR: engl. Molecular Replacement)

Bei dieser Methode wird eine bekannte Struktur als Modell vorausgesetzt, die aufgrund ihrer Sequenz homolog zu dem gesuchten Protein ist. Das bekannte Strukturmodell muß dabei mittels Rotations- und Translations-

funktionen korrekt in die Einheitszelle der zu lösenden Struktur eingepaßt werden und kann dann zur Phasenberechnung dienen (HOPPE, 1957; ROSSMANN & BLOW, 1962; HUBER, 1965).

b. Multipler Isomorpher Ersatz (SIR oder MIR: engl. Single oder Multiple Isomorphous Replacement)

Der isomorphe Ersatz wird zur Aufklärung neuer Strukturen angewendet. Es handelt sich um eine Derivatisierung der Kristalle durch Diffusion mit Schwermetallatomen (s. 2.4.2). Ist die Einlagerung der Schwermetallatome gelungen, können bei der Röntgenbeugung Intensitätsänderungen beobachtet werden, welche zur Phasenbestimmung verwendet werden.

c. Multiple Anomale Dispersion (MAD)

Als Alternative zum Isomorphen Ersatz kann die Multiple Anomale Dispersion angesehen werden. Hierbei wird bereits bei der Expression des Proteins in *E. coli* statt des schwefelhaltigen Methionins das anomal streuende Selenomethionin eingebaut. Die entstandenen Kristalle werden bei verschiedenen Wellenlängen, den sogenannten Absorptionskanten, gemessen. Das Prinzip der Anomalen Streuung war schon lange bekannt, konnte aber erst durch die Kryo-Kristallographie und die hohe Synchrotron-Strahlung richtig eingesetzt werden. Durch die hohe Strahlungsintensität und die Kühlung können mehrere Datensätze mit unterschiedlichen Wellenlängen an einem einzelnen Kristall gemessen werden. Zu beobachtende Intensitätsänderungen können wie beim Isomorphen Ersatz zur Phasenbestimmung angewandt werden.

2.4.6 Prozessierung der Meßdaten

Die in den Diffraktionsexperimenten erhaltenden Datensätze wurden in mehreren Einzelschritten bearbeitet und ausgewertet. Dazu wurden zunächst die Reflexe des ersten Beugungsbildes mit den Programmen XDisplay und DENZO (OTWINOWSKI & MINOR, 1997) autoindiziert. Durch die Autoindizierung wurden die Raumgruppe und

die Zellkonstanten bestimmt. Nach Optimierung der Parameter (z.B. Zellkonstanten, Detektorentfernung, Strahlkoordinaten) wurden alle aufgenommenen Beugungsbilder indiziert und integriert. Dabei wurde jedem Reflex eine integrierte Reflexintensität, eine Standardabweichung der Integration und ein Miller'scher Index zugeteilt. Die mit DENZO ausgewerteten Beugungsbilder wurden danach mit dem Programm SCALEPACK (OTWINOWSKI & MINOR, 1997) skaliert und in einem File zusammengefügt. Reflexe, die auf mehreren Beugungsbildern indiziert wurden, wurden skaliert und die Werte anschließend gemittelt. Als Maß für die Qualität des Datensatzes dient der R_{sym} -Faktor. Er ist jedoch nur begrenzt geeignet, da er stark von der Redundanz der Messung abhängt. Beim R_{sym} -Faktor werden die Intensitäten der symmetrieverwandten Reflexe mit ihrer mittleren Intensität abgeschätzt.

$$R_{sym} = \frac{\sum_h \sum_i |I_{hi} - I_h|}{\sum_{hi} I_{hi}}$$

Dabei sind h die Indizes unabhängiger Reflexe mit der mittleren Intensität I_h , und I_{hi} sind die Intensitäten symmetrieverwandter Reflexe.

2.4.7 Vergleich der AmyB-Struktur mit bekannten Strukturen

Neben den bekannten Sequenzdatenbanken gibt es auch Strukturdatenbanken (www.ebi.ac.uk/dali/), in denen neue Proteinstrukturen mit bereits veröffentlichten Strukturen aus der Proteindatenbank (www.rcsb.org/pdb/) verglichen werden können. Ein solcher Vergleich wurde mit den Strukturkoordinaten des AmyB Enzyms durchgeführt. Aus dem erhaltenen Ergebnis wurden die Proteinstrukturen ausgewählt, deren Z-Faktor (Maß der strukturellen Ähnlichkeit) über einem Wert von 5 (Z-Faktoren über 2 werden als gute Treffer gewertet) lag und die gleichzeitig den Glykosyl-Hydrolase Familien 13 oder 57 angehörten. Um die so identifizierten Strukturen mit der AmyB-Struktur (Dr. A. Dickmanns, Veröffentlichung in Vorbereitung) vergleichen zu können, wurden die Strukturkoordinaten mit Hilfe des Programms CCP4 in die gleiche

2. MATERIAL UND METHODEN

Orientierung überführt. Die gleichgerichteten Koordinaten wurden mit dem Programm Pymol (www.pymol.org) in ihrer Sekundärstruktur visualisiert. Durch das Hervorheben einzelner katalytisch relevanter Aminosäuren konnte ihre Lage im Protein respektive im aktiven Zentrum bestimmt und eine Aussage über eine mögliche Bindungsfähigkeit getroffen werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 EXPRESSION UND REINIGUNG DER SRNP-PROTEINE *aL7*, *aNOP56* UND *aFIB*

Um mit der Methode der Röntgenkristallographie Strukturen aufzuklären, werden Proteinmengen im Milligrammmaßstab benötigt (DRENTH, 1994). Da solche Mengen jedoch normalerweise nicht in den Ursprungszellen exprimiert werden, ist es notwendig die Proteine heterolog in dafür entwickelten Expressionssystemen anzureichern und zu reinigen.

Zur *in vitro* Rekonstitution des sRNP-Komplexes wurden die drei Proteine *aL7*, *aNop56* und *aFibrillar* benötigt. Sie wurden in Abhängigkeit ihrer Stabilität gegenüber Degradationen nacheinander aufgereinigt. Es zeigte sich, daß *aFib* bei 4°C bis zu einem Jahr ohne erkennbare Degradation gelagert werden konnte, während *aL7* maximal 1½-2 Monate und *aNop56* nur 3-4 Wochen aufbewahrt werden konnten.

3.1.1 *aL7*

Das Protein *aL7* aus *Sulfolobus solfataricus* konnte in *E. coli* BL21(DE3)pLysE-Zellen rekombinant überexprimiert werden (Abb. 3.1). Nach Aufschluß der Zellen mit Ultraschall lag das Protein in löslicher Form im Überstand vor. Der Überstand wurde auf 150 ml mit Aufschlußpuffer aufgefüllt, um eine möglichst große Oberfläche für die Hitzedenaturierung zu schaffen. Durch das Aufteilen in 15-20 ml Portionen konnte die Oberfläche weiter vergrößert werden. Nur so war es möglich viele der mesophilen *E. coli* Proteine bei 65°C zu denaturieren (Abb. 3.1).

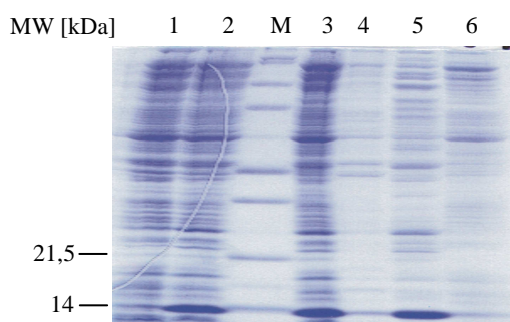


Abbildung 3.1:

Überexpression (Spur 1 + 2), Überstand und Pellet des Zellaufschlusses (Spur 3 + 4) und Überstand und Pellet der Hitzedenaturierung (Spur 5 + 6) von *aL7* (bei 14 kDa)

3. ERGEBNISSE

Fast alle restlichen *E. coli* Proteine, die bisher nicht denaturiert wurden, konnten durch hydrophobe Wechselwirkungen an eine Phenyl Sepharose®-Säule gebunden werden, gleichzeitig wurde das aL7 nicht an das Material angelagert. Beim Waschen der Säule wurde das zu reinigende Protein von der Säule gespült, während die störenden Proteine erst bei einer Konzentration von 600 mM Ammoniumsulfat eluiert wurden (Abb. 3.2 A + B). Um letzte Verunreinigungen zu entfernen, wurden die aL7-enthaltenden Fraktionen ankonzentriert und über eine Gelfiltrationssäule sauber von den letzten *E. coli* Proteinen abgetrennt (Abb. 3.2 C). Aus dem Verlauf der Elution ist ersichtlich, daß das aL7 als Monomer von der Säule eluiert wurde (Abb 3.2 D). Aus dem Pellet einer 4 l LB-Kultur konnten durchschnittlich 12-14 mg aL7 gewonnen werden.

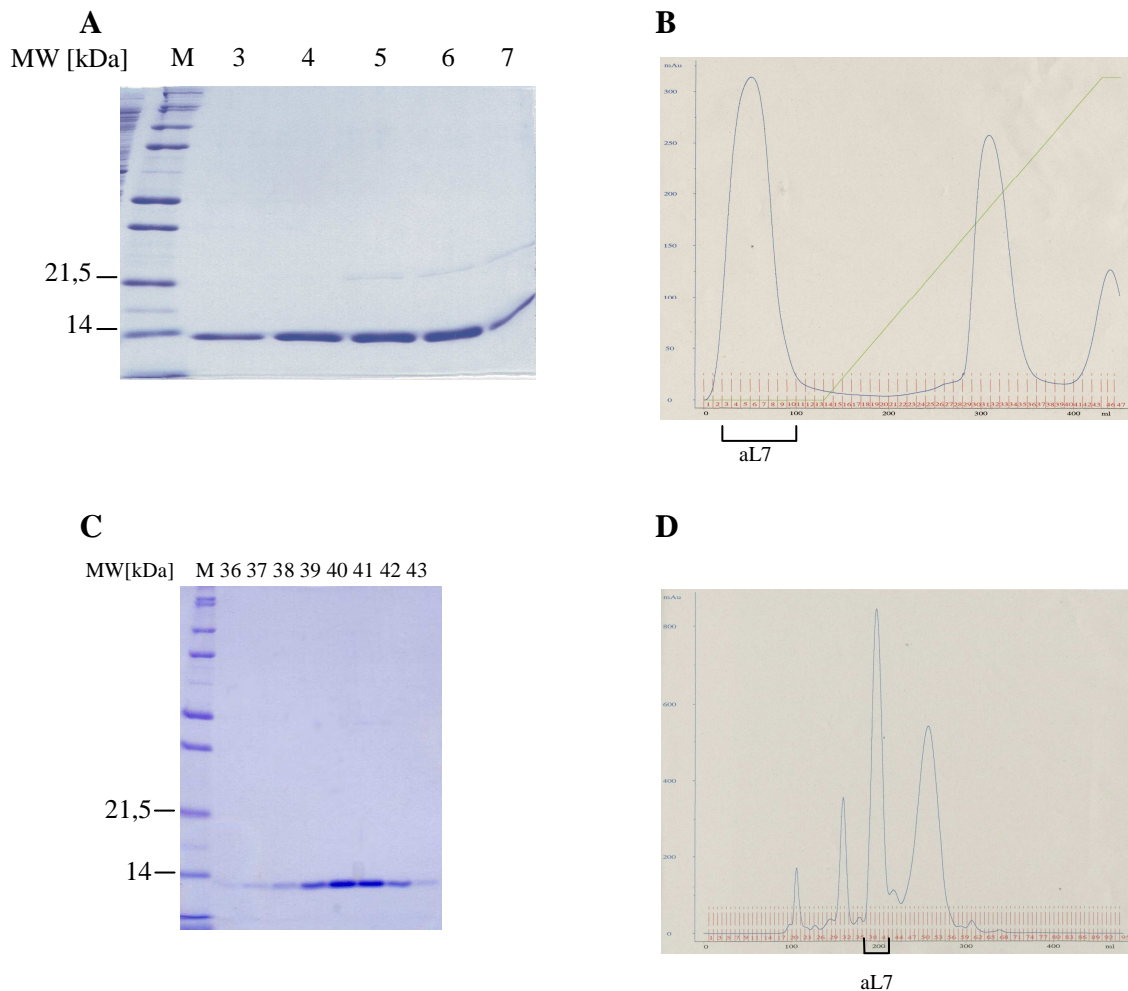


Abbildung 3.2: Aufreinigung von aL7 über eine Phenyl Sepharose®-Säule. Die auf das 17,5%-ige SDS-Gel geladenen Spuren (A) entsprechen dem markierten Bereich im Phenyl Sepharose®-Elutionsprofil (B). Bei der anschließenden Gelfiltration (Superdex® 75) wurden letzte Verunreinigungen entfernt (D) und mit einer 17,5%-igen SDS-PAGE überprüft (C)

3.1.2 aNop56

Im Gegensatz zu aL7 und aFib konnte aNop56 nur bei 20°C löslich in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert werden. Daneben war das rekombinante Protein bei der Reinigung anfällig gegenüber Proteasen und längeren Lagerzeiten bei Raumtemperatur. Diese Tatsache erklärt, warum bei dem Schritt der Hitzedenaturierung neben den *E. coli* Proteinen auch ein Teil (~20%) des thermostabilen Proteins denaturiert wurde (Abb. 3.3).

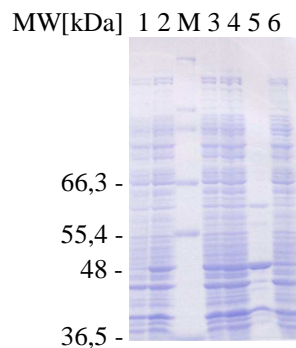


Abbildung 3.3: Kontrolle der Expression, Aufschluß und Hitzedenaturierung von aNop48 durch eine 10%-ige SDS-PAGE. Spur 1: vor Induktion; Spur 2: nach Induktion; Spur 3: Aufschluß Überstand; Spur 4: Aufschluß Pellet; Spur 5: Hitzedenaturierung Überstand; Spur 6: Hitzedenaturierung Pellet

Das aNop56 wurde in einem nächsten Reinigungsschritt an das starke Anionenaustauschermaterial MonoQ gebunden und konnte bei einer NaCl-Konzentration von 550 mM wieder von der Säule eluiert werden (Abb. 3.4 **A + B**). Die meisten nach der Hitzedenaturierung noch in der Probe enthaltenen *E. coli*-Proteine wurden zum größten Teil direkt von der Säule gewaschen oder bei anderen niedrigeren NaCl-Konzentrationen von der Säule eluiert. Als letzter Reinigungsschritt schloß sich ebenfalls eine Gelfiltration an, bei der das 48 kDa große aNop56 von den anderen Proteinen getrennt wurde (Abb. 3.4 **C + D**).

3. ERGEBNISSE

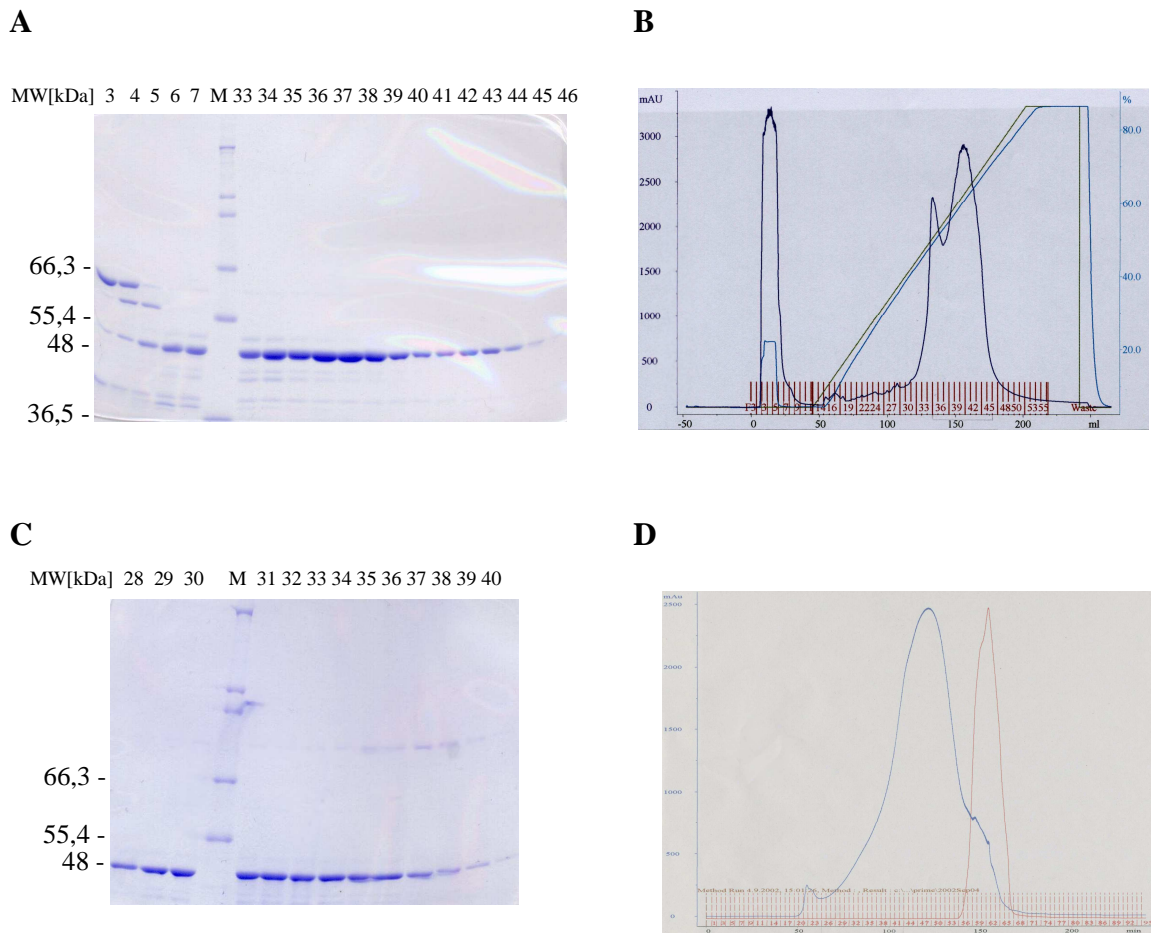


Abbildung 3.4: **A + B:** Anionenaustauscherchromatographie des aNop56 über MonoQ-Material. Die Kontrolle des Reinigungsschritts erfolgte per gelelektrophoretischer Auftrennung. **C + D:** Die Fraktionen 28-34 wurden nach der Gel-filtration eingengt

3.1.3 aFib

Das in *E. coli* BL21(DE3)pLysS rekombinant exprimierte aFib (27 kDa) war das einzige Protein, das in ECPM1 Medium kultiviert werden konnte. Aufgrund der Tatsache, daß die Zellen in diesem Medium bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 20 wachsen konnten, wurde etwa 18 mal mehr Protein produziert, als mit herkömmlichem LB-Medium. D.h. aus $\frac{1}{2}$ l ECPM1-Medium konnten ~ 40 - 45 mg aFib-Protein isoliert werden.

Das aFib wurde mit den gleichen Schritten wie aNop56 (s. **3.1.2**) isoliert. Der einzige Unterschied bei Aufreinigung bestand darin, daß das aFib aufgrund seines

3. ERGEBNISSE

kalkulierten isoelektischen Punktes nicht an das MonoQ-Material gebunden wurde, sondern direkt mit einigen *E. coli* Proteinen von der Säule gewaschen wurde (Abb. 3.5 **A + B**). Als Monomer konnte das aFib im letzten Reinigungsschritt von der Gel-filtrationssäule eluiert werden (Abb. 3.5 **C + D**).

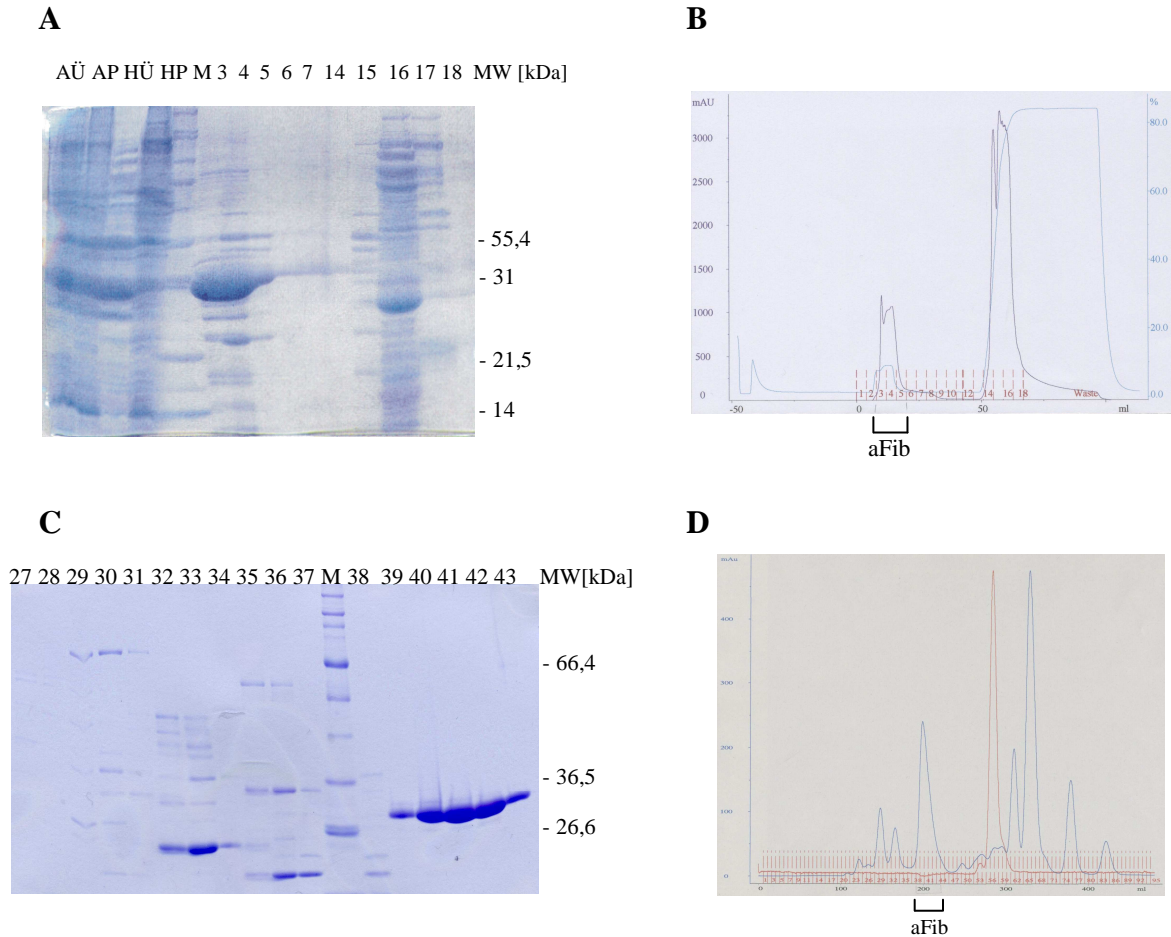


Abbildung 3.5: Die Isolierung von aFib wurde mit 12,5%-igen SDS-Gelen kontrolliert. **A:** Aufschluß (AÜ (Überstand) + AP (Pellet)), Hitzedenaturierung (HÜ (Überstand) + HP (Pellet)) und MonoQ-Lauf (Spurnummerierung entsprechen den Fraktionen in **B**). **C + D:** Gelfiltration von aFib; die Fraktionen sind über der jeweiligen Bahn des Gels angegeben

3.2 BAND-SHIFT EXPERIMENTE

Die bei der *in vitro* Transkription hergestellten RNAs wurden in den Band-Shift Experimenten auf ihre Fähigkeit der Komplexbildung mit den drei Proteinen getestet. Zunächst wurde dazu die Proteinkonzentration bestimmt, die für die folgenden Versuche benötigt wurde. Ab Konzentrationen von 100 nM aL7 war ein Band-Shift, also eine Komplex-Bildung von aL7 und RNA (1 pmol) zu erkennen (Abb. 3.6 **A**). Für die weiteren Versuche wurden Proteinkonzentrationen von 200 nM eingesetzt.

Zur Auffindung einer möglichst kurzen RNA für die Komplexbildung, wurden die *in vitro* hergestellten verkürzten RNAs im Band-Shift Experiment mit verschiedenen Protein-Kombinationen auf ihre Komplexbildung getestet. Für sR1del3 (Abb. 3.6 **B**) konnte ebenso wie für weitere vier verkürzte RNAs (sR1del1 + sR1del2, sR13del1 + sR13del2) keine Bindung mit den Proteinen gezeigt werden. Ausschließlich für die verkürzte Variante sR13del3 konnte eine Komplexbildung mit aL7, aNop56 und aFib festgestellt werden (Abb. 3.6 **B**).

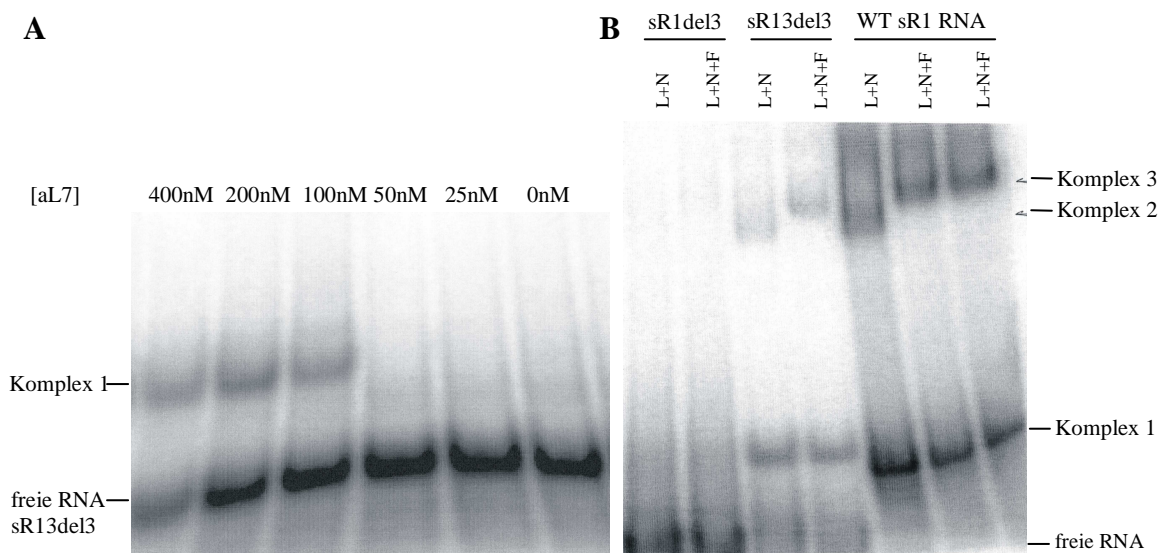


Abbildung 3.6: Band-Shift Experimente. Eine Bildung von Komplex 1 (sR13del3 RNA (1 pmol) + aL7) wird ab einer aL7-Konzentration von 100 nM erreicht (**A**). Eine Komplexbildung wie bei WT sR1 RNA mit den drei Proteinen aL7, aNop56 und aFib kann nur bei sR13del3 RNA beobachtet werden (**B**)

3.3 REKONSTITUTION DES sRNP-KOMPLEXES

Nach der Rekonstitution des sRNP-Komplexes aus sR13-28a, aL7, aNop56 und aFib, wurde dieser Ansatz nochmals über eine Gelfiltrationssäule gereinigt. Dadurch konnten die nicht im Komplex gebundenen Proteine und die überschüssige RNA aus dem Ansatz entfernt werden (Abb. 3.7). Fraktionen in denen alle drei Proteine und die RNA gut zu erkennen waren (Abb. 3.7 A; Fraktionen 19-24), wurden vereinigt, auf 8 mg/ml ankonzentriert und in Kristallisationsversuchen eingesetzt. Eine Quantifizierung der Banden ist im Silbergel nicht möglich, da verschiedene Proteine mit unterschiedlichen Intensitäten färben (POEHLING & NEUHOFF, 1981).

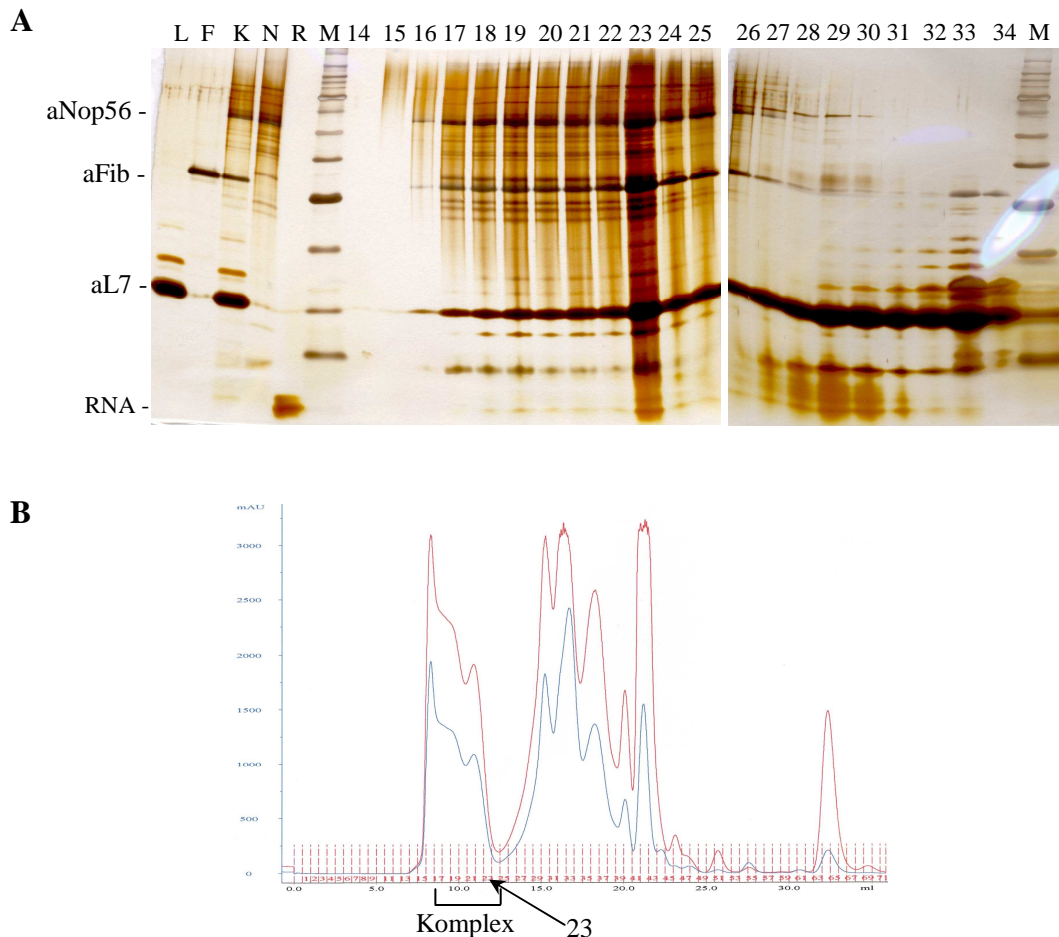


Abbildung 3.7: Aufreinigung des *in vitro* rekonstituierten Komplexes über eine S200-Gelfiltrationssäule. Neben den Kontrollspuren für die Proteine, der RNA und dem Komplex (L, N, F, R und K), korrespondieren die anderen Spuren auf dem 17,5%-igem Silbergel (A) mit den Fraktionen des Elutionsprofils (B)

3. ERGEBNISSE

Um zu untermauern, daß es sich bei den Ergebnissen der Gelfiltration tatsächlich um den erwarteten Komplex aus RNA, aL7, aNop56 und aFib handelte, wurde die Fraktion 23 des Gelfiltrationslaufs auf einen ResourceQ-Anionenaustauscher aufgetragen. Aufgrund der unterschiedlichen Ladungsverhältnisse wird aFib alleine nicht an die Säule gebunden, während aNop56 und aL7 gebunden und bei NaCl-Konzentrationen von 550 mM und 600 mM von der Säule eluiert werden.

Die Komplexfraktion 23 wurde vollständig an die Säule gebunden und bei einer NaCl-Konzentration von 500 mM in einem Peak von der Säule eluiert (Abb. 3.8).

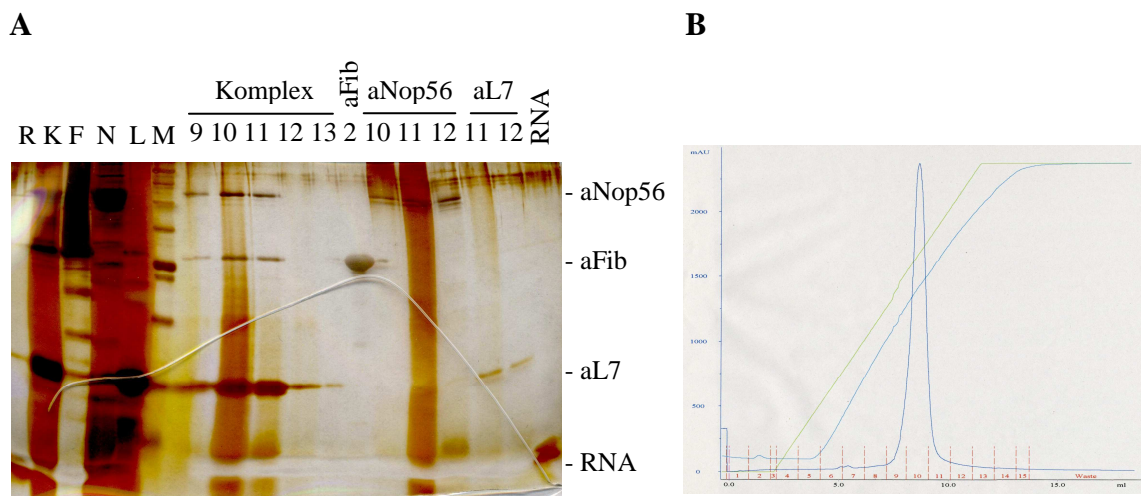


Abbildung 3.8: Anionenaustauscherchromatographie der Fraktion 23 des Gelfiltrationslaufs. Auf einem 17,5%-igen Gel wurden zur Kontrolle alle Proteine, die RNA und die Gelfiltrations-Fraktion 23 aufgetragen. Daneben korrespondieren die Fraktionen mit den jeweiligen darüber angegebenen Einzel-Läufen der Proteine (A). Im Teil B ist das Elutionsprofil des Komplexes dargestellt

3.4 KRISTALLISATION DER KOMPLEXE

Die Kristallisation von Proteinen ist ein von vielen Faktoren abhängiger Prozeß. So nehmen sowohl physikalische (z.B. Temperatur) als auch chemische Bedingungen (z.B. Konzentration von Protein und Fällungsmitteln) direkten Einfluß auf das Kristallwachstum. Die Kristallisationsversuche der verschiedenen Komplexansätze wurden mit den Hampton Research Screens: Crystal Screen I + II, dem PEG/Ion-Screen und dem

Natrix-Screen gestartet. Die eingesetzte Komplexkonzentration sollte 8 mg/ml nicht überschreiten, da sonst die Proteine in den meisten Bedingungen direkt ausfielen. Durch diese Versuche konnten erste Erkenntnisse über die Kristallisationsbedingungen erhalten werden. Bei Bedingungen mit PEG 12000 und PEG 20000 und einem im neutralen Bereich liegenden pH-Wert konnten erste kleine Kristalle des möglichen Komplexes aus aL7 + aNop56 + aFib + sR13-28a (Abb. 3.9 **A** und **B**) beobachtet werden. Da für alle anderen rekonstituierten Komplexe auf diese Weise keine Kristallisationsbedingungen gefunden werden konnten, wurde versucht, die Bedingungen für die beobachteten Kristalle zu optimieren.

3.4.1 Optimierung der Kristallisationsbedingungen

Um eine Stabilisierung der Methyltransferase (aFib) im Komplex zu erreichen, wurde nach der Komplex-Rekonstitution der Ansatz mit S-Adenosylmethionin (Endkonzentration: 2 mM) versetzt. Eine weitere Stabilisierung des RNA-Komplexes kann durch die Zugabe von MgCl₂ erreicht werden. Die Größe und Qualität der Kristalle konnte aber erst durch die Zugabe von ein- und zweiwertigen Alkoholen zur Kristallisationsbedingung verbessert werden.

Die Grundbedingung, die mit verschiedenen Additiven vermischt wurde, bestand aus: 10% PEG 12000, 10 mM MES, pH 6,5, 20 mM MgCl₂. Mit den Additiven 2-Butanol (Abb. 3.9 **C**; Endkonzentration: 0,7%) und 1,6-Hexandiol (Abb. 3.9 **D**; Endkonzentration: 3%) wurden die qualitativ besten Kristalle erhalten. Sie waren wie ein Meißel geformt und hatten eine Größe von ca. 550 µm × 100 µm.

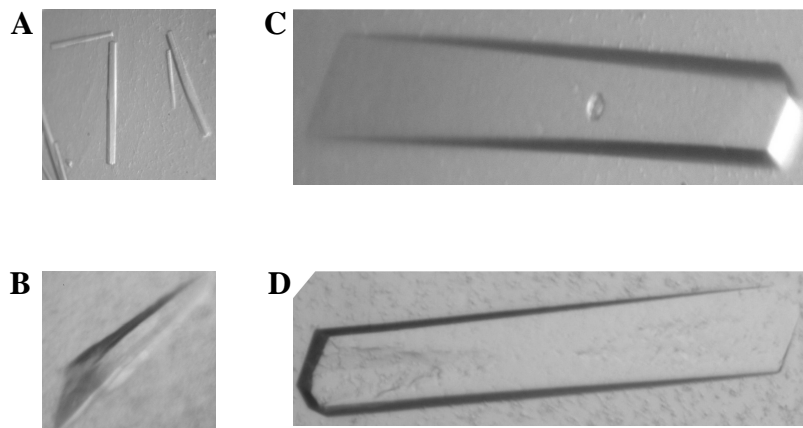


Abbildung 3.9: Kristalle der sRNP-Komplex (aL7 + aNop56 + aFib + sR13-28a) Ansätze. Erste Kristalle in 12 % PEG 12000 und 0,1 M HEPES, pH 7,4 (**A**) bzw. PEG 20000 und 0,1 M. MES, pH 6,5 (**B**). Verbesserte Kristalle in 10 % PEG 12000, 10 mM MES, pH 6,5, 20 mM MgCl₂ und 0,7% 2-Butanol (**C**) bzw. 3% 1,6-Hexandiol (**D**).

Die Reproduzierbarkeit von Kristallen, im besonderen von Komplex-Kristallen, ist generell schwierig. Die Ursache hierfür liegt meistens in der Präparation von Proteinen und Nukleinsäuren; selbst kleinste Abweichungen bei der Reinigung können dazu führen, daß keine Kristalle mehr gebildet werden.

3.4.2 Röntgenbeugungsexperimente

Ebenso schwierig wie das Auffinden einer Kristallisationsbedingung gestaltet sich oft auch die Suche nach einer geeigneten Bedingung, den Kristall vor der schädigenden Röntgenstrahlung zu schützen.

Erste Versuche, Kristalle mit verschiedenen herkömmlichen Kryo-Protectantien einzufrieren, scheiterten, da die Kristalle beim Überführen in das Kryo-Protectant sehr leicht zerbrachen. Eine hohe Fragilität bei Kristallen deutet auf einen hohen Wassergehalt hin, daher mußte den Kristallen zunächst kontrolliert ein Teil ihres Wassers entzogen werden. Um diesen Effekt zu erreichen, wurde der Kristallisationspuffer gegen einen MPD-enthaltenden Kristallisationspuffer ausgetauscht. Die MPD-Konzentration wurde dabei schrittweise über mehrere Stunden von 0 auf 20% erhöht. Die so

konservierten Kristalle zeigten im Röntgenstrahl trotz allem nur eine sehr schlechte Diffraktion ($\sim 14\text{\AA}$).

Ein weiterer Versuch, die Röntgenstrahlen besser an dem Kristallgitter zu beugen, war die Kapillarmethode. Der in seiner Mutterlösung in der Kapillare eingeschlossene Kristall konnte aber ebenfalls nicht zur Aufklärung der Struktur beitragen.

3.4.3 Analyse der *Komplex-Kristalle*

Um nachzuweisen, daß es sich bei den Kristallen um Komplexe mit alle drei Proteinen und der RNA (sR13-28a) handelte, wurden die Kristalle mit Reservoirlösung gewaschen und in SDS-Probenpuffer gelöst. Die gelösten Kristalle wurden durch denaturierende SDS-PAGE aufgetrennt und im Anschluß mit Silber gefärbt, um sowohl die Proteine als auch die RNA zu visualisieren. Zur Kontrolle ob alle Proteine und die RNA noch intakt in der Mutterlösung vorhanden sind, wurde diese ebenfalls mit auf das Gel aufgetragen.

Die Analyse des Gels (Abb. 3.10) zeigt eindeutig, daß die RNA und die Proteine aL7 und aFib in der Kristallisationslösung noch in ihrer ursprünglichen Größe vorhanden sind. Dagegen liegt aNop56 nur noch degradiert vor. Die aufgelösten Kristalle zeigten einen Komplex aus aFib und eines 36 kDa großen Fragments. Da es sich bei diesem Fragment um das um 12 kDa verkürzte aNop56 handelte, ließ sich sowohl durch einen Glu-C Verdau (Serin-Endoproteinase aus *Staphylococcus aureus* V8) als auch bei 4-6 Wochen aufbewahrttem aNop56 im SDS-Gel nachweisen.

3. ERGEBNISSE

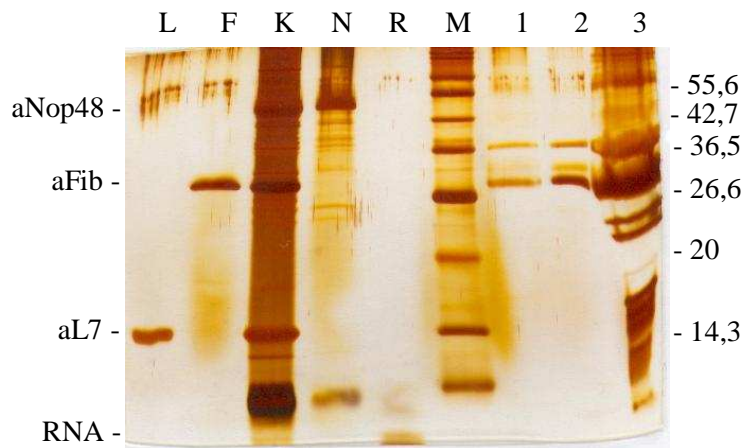


Abbildung 3.10: Kristallanalyse mit Hilfe der SDS-PAGE (17,5%-iges Gel) und der Silberfärbung. Zum Vergleich wurden alle Proteine (Spuren L, F und N), die RNA (sR13-28a; Spur R) und der Komplex (Spur K) nach der Gelfiltration mit aufgetragen. Die aufgelösten Kristalle wurden in den Spuren 1 und 2 und die Kristallisationslösung in Spur 3 aufgetragen

3.5 CO-KRISTALLISATION UND SOAKING VON AMYB-KRISTALLEN

Aufgrund ihrer starken inhibitorischen Wirkung auf AmyB sollten das Pseudotetrasaccharid Acarbose, das als Inhibitor vieler Glykosylhydrolasen bekannt ist, und ATP, einem Produkt der Glykolyse (FÜTTERER, 2001), als Komplex mit AmyB kristallisiert werden. Unter den bereits bekannten Kristallisationsbedingungen (3,78 M Natriumformiat, 5% Isopropanol, 2 mM DTT) wurde versucht das AmyB mit Acarbose und ATP sowohl direkt zu kristallisieren (Co-Kristallisation) als auch zunächst native AmyB-Kristalle herzustellen und dann mit verschiedenen Konzentrationen von Acarbose oder ATP zu versetzen (Soaking). Der überwiegende Teil dieser Versuche wurde mit inaktivem AmyB durchgeführt, für einen geringen Teil der Versuche stand jedoch isoliertes AmyB zur Verfügung, das nachweislich aktiv war. Bei der Strukturaufklärung der nativen Kristalle zeigte sich allerdings, daß kein Unterschied bei Zellkonstanten oder der Faltung nachgewiesen werden konnte (Dr. A. Dickmanns, unveröffentlichte Ergebnisse).

Auffällig bei mit ATP oder Acarbose co-kristallisierten und gesoakten Kristallen war die schlechte Beugung des Röntgenstrahls. Nur etwa jeder zwanzigste Kristall

3. ERGEBNISSE

lieferte Streudaten, die konservativ bis 3 Å auswertbar gewesen wären, während native Kristalle mit verwertbaren Daten von 2.6 Å keine Seltenheit waren. Das gleiche Phänomen ließ sich auch, sofern Kristalle entstanden waren, bei den anderen Co-Kristallisations- und Soaking-Versuchen (Fe^{3+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Glukose und Maltose) beobachten, wobei die Kristallisation von AmyB durch Mn^{2+} und Zn^{2+} vollkommen verhindert wurde.

Als Gemeinsamkeit aller gemessener Datensätze konnte bei der Auswertung festgestellt werden, daß keiner der getesteten Co-Faktoren in die AmyB-Kristalle eingelagert wurde. Mit der Differenzelektronendichte F_o-F_c können anhand negativer und positiver Elektronendichten Fehler beim Strukturbaue im AmyB-Modell aufgefunden werden. Wird ein Ligand an ein Protein gebunden, ist sowohl in der Differenzelektronendichte F_o-F_c als auch in der Differenzelektronendichte $2F_o-F_c$ eine positive Dichte zu erkennen. Da in keinem der ausgewerteten Datensätze eine zusätzliche positive Dichte zu erkennen war, kann die Aussage getroffen werden, daß keine Co-Faktoren an AmyB gebunden kristallisiert wurden.

Tabelle 3.1: Statistische Daten der gesammelten und ausgewerteten Datensätze von AmyB mit verschiedenen Co-Faktoren

Projekt	Wellenlänge Å	Auflösung Å	Reflexe _{total}	Reflexe _{unique}	Vollständig- keit%	R-Faktor linear	I/σ	Redundancy	Mosaicity
amyb/acarbose	1,5418	100-3,5	323007 (104579)	26819 (2659)	98,3 (99,1)	0,130 (0,428)	8,79 (2,63)	3,9 (3,83)	~0,5
amyb-desy- sep03/aca	0,8040	50-2,7	297156 (145841)	28174 (1415)	93,3 (95,2)	0,092	10,59 (1,05)	5,18 (5,06)	0,376
amyb-desy- sep03/atp2	0,8040	50-3,5	302863 (67648)	13783 (1363)	97,4 (99,3)	0,177 (0,758)	10,33 (2,63)	4,91 (4,95)	0,269
amyb-desy- sep03/atp_aca	0,8040	30-3,0	272370 (103414)	20783 (2026)	94,9 (95,2)	0,077 (0,334)	21,85 (3,63)	4,98 (5,31)	0,364
amyb-desy-sep03/atp	08040	50-3,5	299164 (67389)	13789 (688)	97,2 (99)	0,167 (0,623)	6,98 (2,3)	4,88 (4,89)	0,295
amyb-grenoble/aca2	0,9340	50-2,4	1886353 (292667)	42176 (4186)	98,9 (100)	0,084	27,68 (3,66)	6,94 (7,14)	0,43
amyb-grenoble/atp1	0,9340	50-2,0	1895686 (531773)	71695 (7225)	96,7 (99,1)	0,088	20,29 (1,11)	7,42 (7,89)	0,355
amyb-grenoble/atp2	0,9340	50-2,0	2189135 (412337)	73626 (7282)	99,3 (100)	0,092 (0,592)	8,92 (0,012)	5,6 (6,82)	0,491
amyb-grenoble/aca1	0,9340	50-2,5	1205288 (245389)	36567 (3651)	95,7 (98)	0,089 (0,413)	28,55 (4,5)	6,7 (6,8)	0,451
amyb-test/atp-test3	1,5418	50-2,7	543868 (184285)	29258 (2905)	96,9 (98,8)	0,109 (0,822)	17,24 (2,4)	6,3 (6,46)	0,35
amyb/atp-test2	1,5418	50-3,0	537651 (89753)	21816 (2188)	97,2 (99,9)	0,142 (0,967)	8,56 (0,91)	4,11 (4,43)	0,662
amyb/test/atp-test- aktiv/denzo	1,5418	50-2,9	622048 (175229)	24392 (2370)	99,8 (100)	0,112 (0,615)	15,7 (2,59)	7,18 (7,21)	0,325
amyb-bessy/amyb1	0,9195	50-2,4	767886 (192884)	39122 (2321)	91,2 (55,4)	0,065 (0,216)	22,3 (3,87)	2,7 (2,3)	0,312
amyb-bessy/amyb2	0,9195	50-2,81	419596 (126201)	25251 (1509)	93,7 (57,4)	0,062 (0,301)	23,3 (2,39)	5,0 (2,6)	0,324
amyb-bessy/amyb3	0,9785	100-2,33	1959551 (281305)	38457 (1238)	82,3 (26,9)	0,046 (0,233)	6,46 (3,07)	7,3 (5,1)	0,354

Tabelle 3.1: Fortsetzung: Statistische Daten der gesammelten und ausgewerteten Datensätze von AmyB mit verschiedenen Co-Faktoren

Projekt	Wellenlänge Å	Auflösung Å	Reflexe _{total}	Reflexe _{unique}	Vollständig- keit%	R-Faktor linear	I/σ	Redundancy	Mosaicity
amyb-bessy/amyb4	1,7391	50-2,98	288810 (146359)	39614 (2253)	93 (52,7)	0,079 (0,335)	15,83 (2,48)	3,7 (2,8)	0,327
amyb/glucose/denzo	1,5418	50-3,5	728334 (277271)	29302 (2971)	97,4 (100)	0,118 (0878)	15,02 (1,99)	9,5 (9,3)	0,385
amyb/glucose_3	1,5418	30-3,5	177793 (97814)	14042 (1363)	99,6 (100)	0,124 (0,516)	10,94 (2,38)	6,97 (6,97)	0,346
amyb/calcium/test5	1,5418	30-3,5	104585 (56269)	13649 (1364)	96,7 (99,7)	0,163 (0,617)	9,28 (2,49)	4,12 (4,9)	0,396
amyb-glucose	0,8500	30-2,8	1169644 (457630)	31088 (3051)	99,9 (100)	0,110 (0,687)	21,4 (2,96)	14,98 (15,1)	0,220
amyb-maltose	0,8500	30-2,6	762968 (330222)	34036 (3330)	99,9 (100)	0,104 (0,629)	22,29 (3,13)	9,45 (9,48)	0,286
amyb-calcium2	0,8500	30-2,8	513906 (205149)	27749 (2384)	98,3 (86,6)	0,085 (0,403)	22,2 (2,15)	7,57 (6,34)	0,529
amyb-eisen	0,8500	30-3,0	769983 (188622)	22370 (2191)	99,5 (99,6)	0,166 (0,812)	13,2 (2,5)	8,53 (8,18)	0,583

R-Faktor linear: $R_{\text{linear}} = \frac{\sum(Abs(I-\langle I \rangle))}{\sum(I)}$; bei einigen R-Faktoren n wurde keine äußere Schale angegeben, da diese einen Wert >1 besaßen und somit in der Statistik mit 0 auftau-
chen

Die Werte in Klammer geben jeweils die äußere Schale an

3.6 ERMITTLUNG VERWANDTER STRUKTUREN MIT HILFE DER DALI-SUCHE

Die bei der Strukturlösung von AmyB erhaltenen Atomkoordinaten wurden mit Hilfe des DALI-Servers (HOLM & SANDER, 1993; www.ebi.ac.uk/dali/) mit allen bekannten Proteinstrukturen verglichen.

Tabelle 3.2: Die ersten 11 Treffer mit einem Z-Faktor >5 der DALI-Suche

```

FSSP      FAMILIES OF STRUCTURALLY SIMILAR PROTEINS, VERSION 1.0 (Apr 1 1995)
CREATED   Thu Feb 19 16:50:21 GMT 2004 for dali on sputnik2-node2.ebi.ac.uk
METHOD    Dali ver. 2.0: Holm, L., Sander, C. (1993) J.Mol.Biol. 233,123-138
DATABASE  4322 protein chains
PDBID     6452-X
SEQLength 516
NALIGN    135
WARNING   pairs with Z<2.0 are structurally dissimilar

## SUMMARY: PDB/chain identifiers and structural alignment statistics
NR. STRID1 STRID2  Z   RMSD LALI LSEQ2 %IDE REVERS PERMUT NFRAG TOPO PROTEIN

  1: 6452-X 1ufa-A 41.5  1.9  458  501  35    0    0   21 S  tt1467 protein
  2: 6452-X 1klw-A 25.2  3.2  299  615  19    0    0   37 S  4- $\alpha$ -
glucanotransferase

  3: 6452-X 1ny1-A 10.5  3.2  182  231   7    0    0   22 S  probable polysac-
charide deacetylase pdaa fragment (targ
  4: 6452-X 1o7d-A  9.6  3.9  212  291  14    0    0   23 S  lysosomal alpha-
mannosidase (alpha-b mannosidase, lysos
  5: 6452-X 1hxx-A  8.3  3.8  320  1014 12    0    0   34 S  alpha-mannosidase
ii (golgi alpha-mannosidase ii)
  6: 6452-X 1hty-A  8.3  3.7  316  1014 11    0    0   35 S  alpha-mannosidase
ii (golgi alpha-mannosidase ii)
  7: 6452-X 1hww-A  8.2  3.7  316  1014 12    0    0   34 S  alpha-mannosidase
ii
(golgi alpha-mannosidase ii)
  8: 6452-X 1fpo-A  5.7 10.2   66  171   5    0    0    5 S  chaperone protein
hscb (hsc20) Mutant
  9: 6452-X 1i60-A  5.1  4.1  175  278   8    0    0   25 S  ioli protein
10: 6452-X 1b4k-A  5.1  4.2  180  326   8    0    0   24 S  5-aminolevulinic
acid dehydratase (porphobilinogen synt
11: 6452-X 1a49-A  5.1  4.2  179  519   4    0    0   31 S  pyruvate kinase
biological_unit

The following notation is used for data columns:
STRID1/STRID2  PDB identifiers of search structure and aligned structure with
chain identifier
Z              Z-score, i.e., strength of structural similarity in standard
deviations above expected. The matched structures are sorted
by Z-score. Only matches above a threshold of Z=2 are reported.
RMSD          positional root mean square deviation of superimposed CA atoms
in Angstroms
LALI          total number of equivalenced residues
LSEQ2         length of the entire chain of the equivalenced structure
%IDE          percentage of sequence identity over equivalenced positions
REVERS        number of fragments matching in reversed chain direction
PERMUT        number of topological permutations (loop reconnections between
query and matched structure)
NFRAG         total number of equivalenced fragments
TOPO          'S' sequential connectivity of equivalenced fragments
              'N' non-sequential alignment
PROTEIN COMPND record from the PDB file of the aligned structure
SeqNo, PDBNo, AA, STRUCTURE, BP1, BP2, ACC
sequential and PDB residue numbers, amino acid (lower case =
Cys),secondary structure, solvent exposure as in DSSP

```

Das erhaltene Ergebnis (Tab. 3.2) weist dabei z.B. Informationen über den Verwandtschaftsgrad (Z-Faktor) der gefundenen Strukturen zu AmyB und die Bereiche, in denen Elemente der jeweiligen Strukturen mit AmyB übereinstimmen, auf. Die größten Übereinstimmungen zeigten sich bei 1UFA, einem uncharakterisierten neuen Enzym aus *Thermus thermophilus* Hb8 (IDAKA ET AL., 2003) mit einem Z-Faktor von 37,2 (Tab. 3.2). Ein Vergleich zeigt bis auf kleinere Abweichungen zwei fast identische Strukturen (Abb. 3.11).

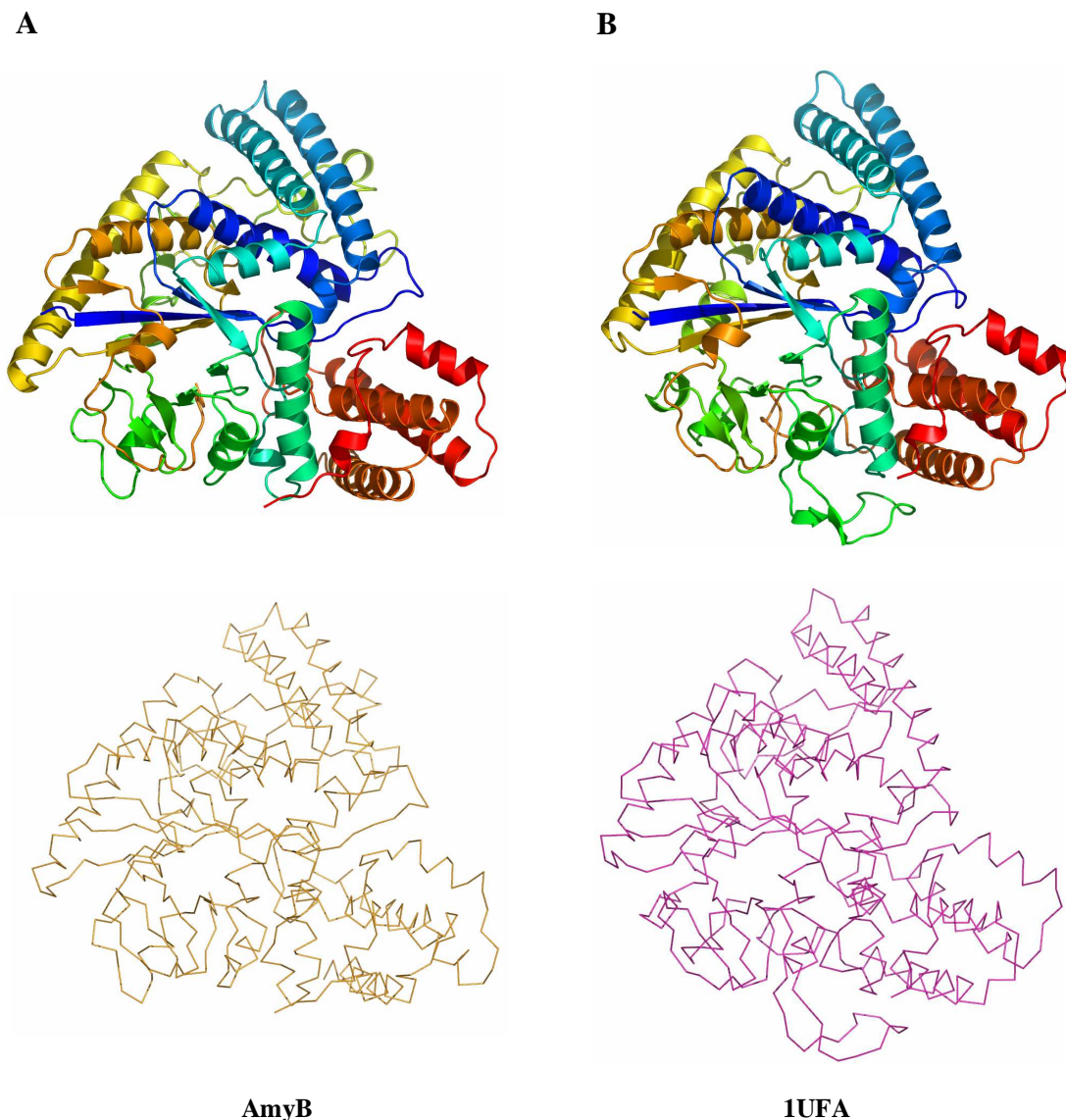


Abbildung 3.11: Struktur und C_{α} -Skelett der untersuchten α -Amylase AmyB (A) aus *Thermotoga maritima* MSB8 im Vergleich mit der Struktur und C_{α} -Skelett von 1UFA (B) aus *Thermus thermophilus* Hb8

Da bisher nur die Struktur aber keine Funktion von 1UFA bekannt ist, war der Treffer mit dem zweithöchsten Z-Faktor jedoch interessanter. Es handelte sich dabei um die 4- α -Glukanotransferase aus *Thermococcus litoralis*, einem näher beschriebenen Enzym, das der GHF 57 zugeordnet wird (IMAMURA ET AL., 2003). Aufgrund seiner biochemischen Eigenschaften wurde auch das untersuchte AmyB aus *Thermotoga maritima* MSB8 in diese Familie eingeordnet (FÜTTERER, 2001).

3.6.1 Vergleich von AmyB mit der 4- α -Glukanotransferase

Die beiden in die GHF 57 eingeordneten Proteine AmyB und 4- α -Glukanotransferase (1K1Y/1K1W: PDB-Kürzel mit beziehungsweise ohne Acarbose) weisen in großen Bereichen hohe strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Besonders auffällig sind die Übereinstimmungen im katalytischen Zentrum. Dieses besteht in beiden Fällen aus einem verzerrten und um ein β -Faltblatt und eine α -Helix verkürztes (β, α)₈-Faß. Das verkürzte (β, α)₇-Faß ist ein in der GHF 57 zu findendes Strukturelement (www.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html), das für diese Familie charakteristisch ist. Neben der katalytischen Domäne (Domäne A) besitzt die 4- α -Glukanotransferase noch eine β -Faltblatt-reiche Domäne (Domäne B), an die Ca²⁺ gebunden wird.

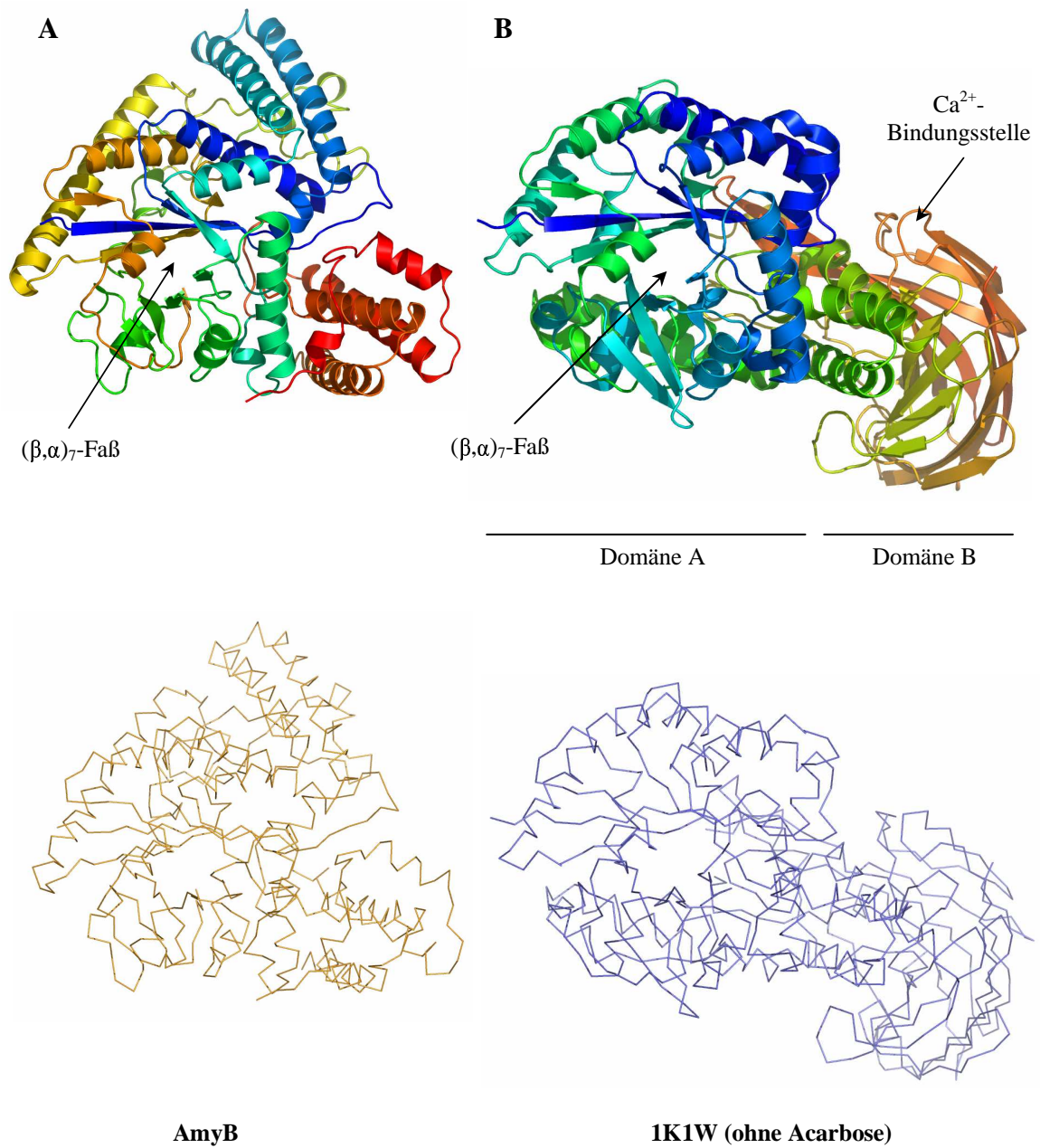


Abbildung 3.12: Vergleich der Strukturen AmyB (**A**) und 1K1W (4- α -Glukanotransferase) aus *Thermococcus litoralis*. Die Struktur 1K1W (**B**) weist neben der katalytischen Domäne A auch noch eine weitere Domäne B auf, die eine Kalziumbindungsstelle enthält. Beide Strukturen enthalten ein verzerrtes $(\beta, \alpha)_7$ -Faß

Ein Vergleich der Oberflächen-Potentiale zeigt, daß beide Proteine an der katalytischen Bindungsstelle stark negativ geladen sind. Die negativen Ladungen deuten auf optimale Voraussetzungen für eine Bindungsstelle hin.

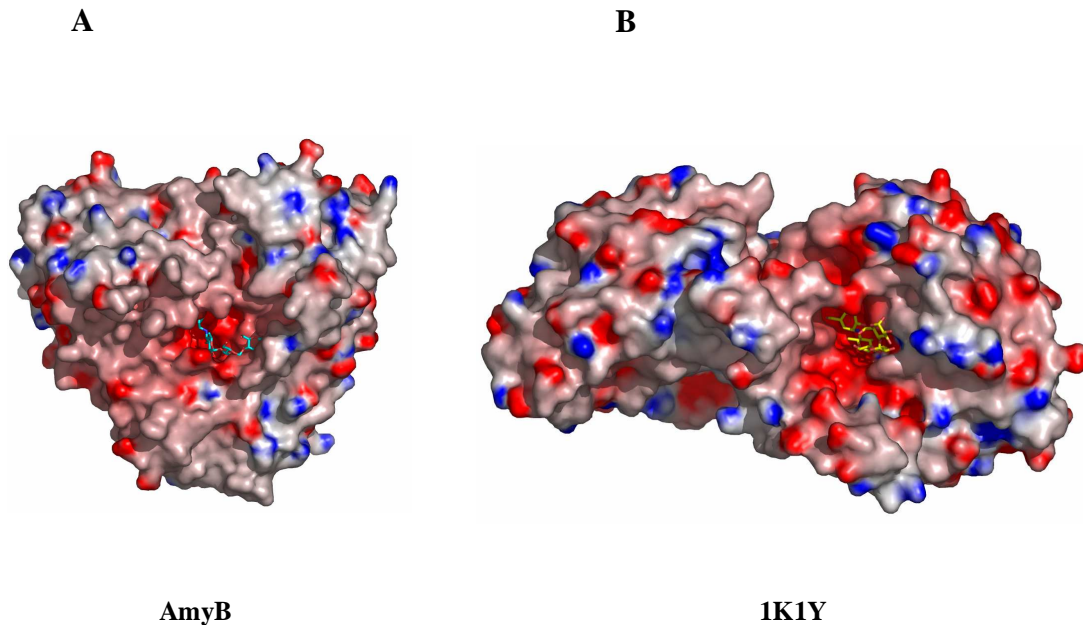


Abbildung 3.13: Oberflächen-Potentiale von AmyB mit theoretisch gebundener Acarbose (**A:** Acarbose in türkis) und 1K1Y mit gebundener Acarbose (**B:** Acarbose in gelb) in der Bindungstasche

Daß die Acarbose sich perfekt an die Bindungstasche von 1K1Y anpaßt und die beiden katalytisch notwendigen Aminosäurereste Asp214 und Glu123 durch das Stickstoffatom der Acarbose blockiert werden, konnte von IMAMURA ET AL. (2003) kristallographisch gezeigt werden.

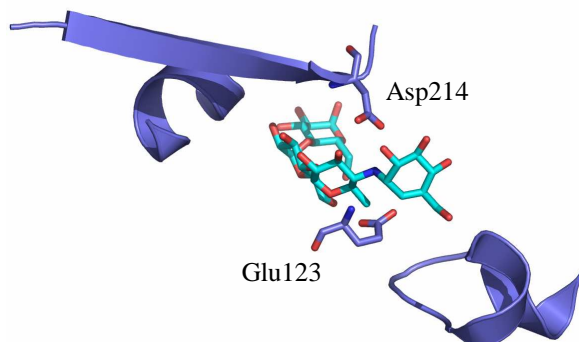


Abbildung 3.14:
Blockierung der Bindungsstelle
Glu123/Asp214 durch Acarbose in 1K1Y

Eine Bindung von Acarbose an die Bindungsstelle von AmyB konnte kristallographisch nicht beobachtet werden. Bei näherer Betrachtung der AmyB-Bindungstasche und einem Vergleich mit 1K1Y erkennt man die beiden, bei α -Amylasen konservierten Aminosäurereste Aspartat (AmyB: Asp349) und Glutamat (AmyB: Glu185). Daneben ist erkennbar, daß drei weitere Aminosäurereste (Glu243, Ser247 und Thr469) in die Bindungstasche hereinragen, die Platz für die Bindung eines Acarbosemoleküls blockieren.

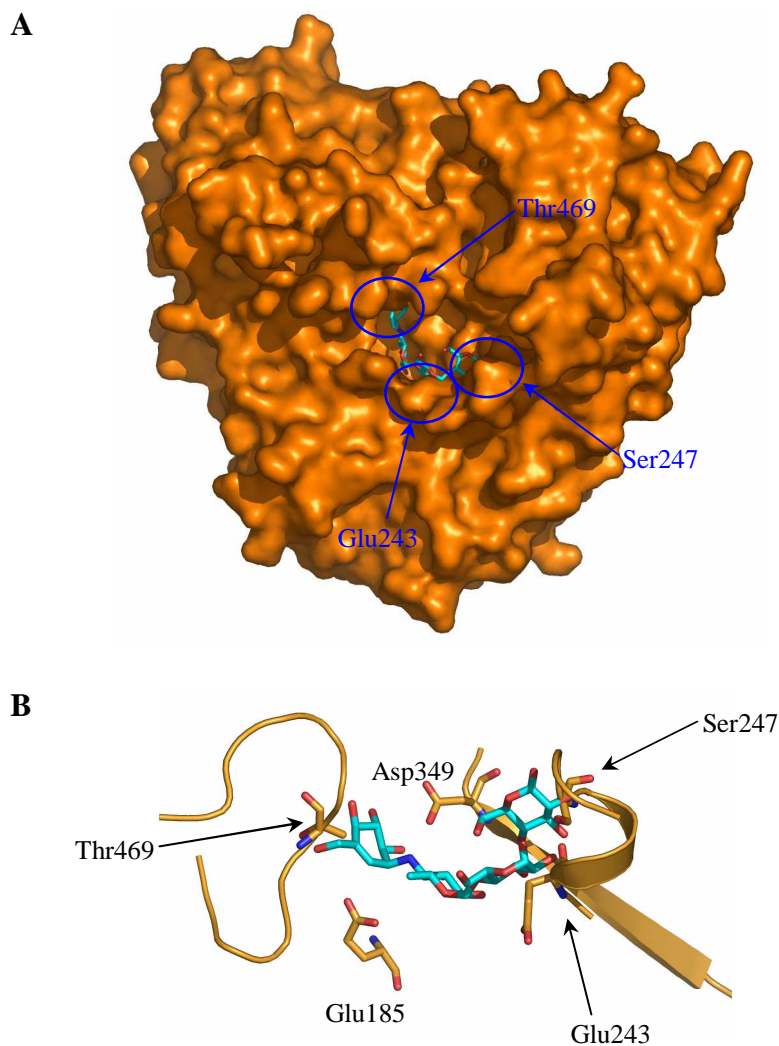


Abbildung 3.15: Bindungstasche von AmyB mit theoretisch eingefügter Acarbose. Die Aminosäurereste Glu243, Ser247 und Thr469 ragen in den Bereich der Acarbose hinein. Im Oberflächenmodell ist deutlich zu erkennen, daß die Bindungstasche für Acarbose keinen Platz zur Anlagerung an AmyB bietet (A). Detaildarstellung der beteiligten Aminosäureresten (B)

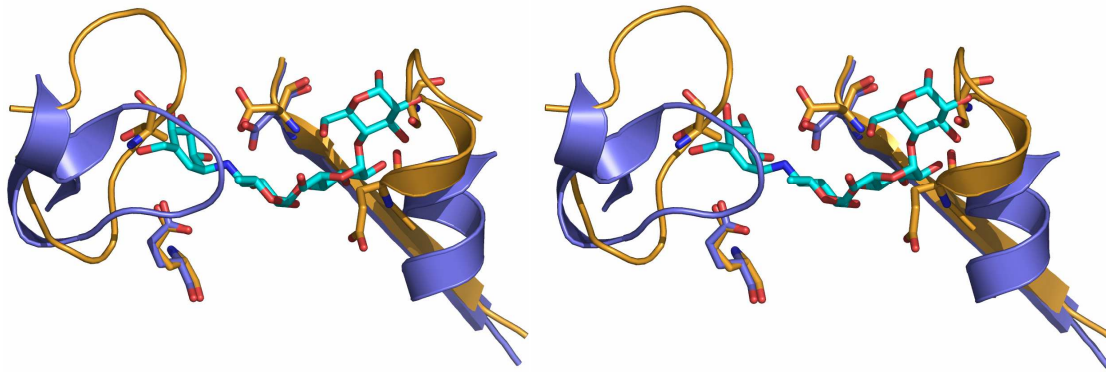


Abbildung 3.16: Stereoansicht der Bindungstaschen von AmyB (orange) und 1K1Y (blau) im Vergleich. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Acarbose in 1K1Y den entsprechenden Platz zum Binden finden kann, während bei Amy B Aminosäurereste in die Bindungsstelle hineinragen und damit eine Bindung verhindern

3.6.2 Vergleich von AmyB mit 1UFA aus *Thermus thermophilus* Hb8

Wie bereits in Abbildung 3.11 zu erkennen ist, sind sich die beiden Strukturen von AmyB und 1UFA sehr ähnlich. Bei einer näheren Betrachtung der möglichen Bindungsstelle wird deutlich, daß 1UFA ebenso wie das AmyB die Bindungsstelle auf ähnliche Weise blockiert (Abb. 3.17). Da eine Sequenzhomologie von ~30% zu beobachten ist (vgl. Anhang A.3), handelt es sich bei AmyB und 1UFA um strukturalomologe Proteine mit wahrscheinlich ähnlicher oder sogar gleicher Aufgabe.

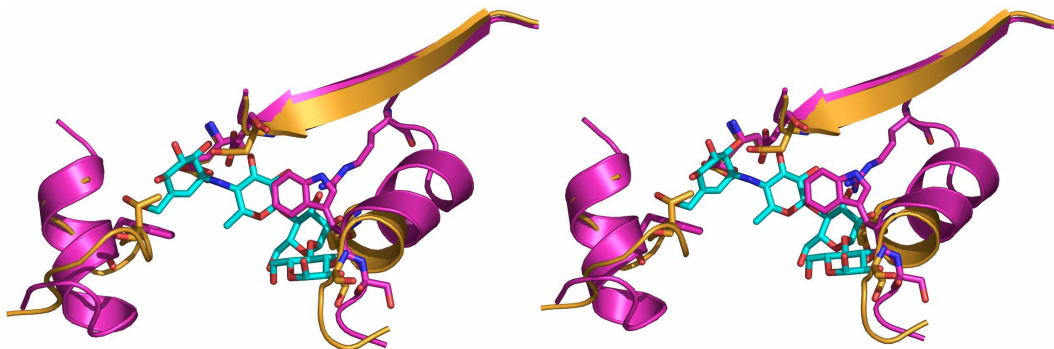


Abbildung 3.17: Stereodarstellung der Bindungsstellen von AmyB (orange) und 1UFA (magenta) mit einer theoretisch eingefügten Acarbose. In beiden Fällen wird die Bindung von Acarbose durch hereinragende Aminosäurereste verhindert

4. DISKUSSION

4.1 REKONSTITUTION UND KRISTALLISATIONSVERSUCHE EINES sRNP-KOMPLEXES

Nach ihrer Prozessierung werden die meisten RNAs posttranskriptional modifiziert. Neben der Umwandlung von Uridin in Pseudouridin ist die Methylierung der 2'-Hydroxylgruppe von Zuckerresten die am häufigsten auftretende Modifikation durch snoRNAs beziehungsweise sRNAs in Archaea. Bei den C/D-Box snoRNAs lagert sich die reife RNA an einen komplementären Abschnitt, der vor dem Beginn der D- oder D'-Box liegt (BACHALLERIE ET AL., 1995), an die snoRNA an und wird am fünften Nukleotid vor dem Start der D-Box methyliert (TYCOWSKI ET AL., 1996, KISS-LÁSZLÓ ET AL., 1998). Der Prozeß der Methylierung von rRNAs findet aber nicht allein an den snoRNAs statt, sondern benötigt nukleoläre Proteine, die zusammen mit der snoRNA einen snoRNP-Komplex bilden. Vergleicht man die Sequenzen von C/D-Box snoRNAs, die zwei hoch konservierte C- und D-Motive enthalten, und die U4 snRNA, stellt man fest, daß die snoRNA die gleiche Struktur wie die U4 snRNA ausbildet. Die dabei gebildete purinreiche 5+2 Schleife (vgl. Abb. 1.2), die von zwei Stämmen flankiert wird (WEINSTEIN & STEITZ, 1999; WATKINS ET AL., 2000), bindet z.B. an das humane 15,5 kDa Protein (NOTTROTT ET AL., 1999). Ohne die Bindung dieses Proteins an die snoRNA könnten die anderen, für die Methylierung benötigten Proteine nicht angelagert werden. An archaebakteriellen Homologen der Proteine und den sRNAs aus verschiedenen *Sulfolobus* Stämmen konnten die gleichen Beobachtungen gemacht werden (OMER ET AL., 2002). Um herauszufinden, wie kurz eine RNA sein darf, die nur die konservierten Motive C und D, die kurzen flankierenden Stämme und einen kurze zweite Schleife enthält, wurden *in vitro* transkribierte RNAs verschiedener Längen in Band-Shift Experimenten untersucht. Dabei konnte eine 28 Nukleotide lange RNA identifiziert werden, die sowohl einen Komplex mit aL7 (homolog zu 15,5 kDa) ausbildet als auch die anderen Proteine anschließend anlagert (Abb. 3.6). Ferner konnte beobachtet werden, daß die Proteine aNop56 und aFibrillarlin ohne aL7 keinen Komplex mit der RNA ausbilden können.

4. DISKUSSION

Nach Entfernung der nicht an den Gesamtkomplex gebundenen Komponenten aus dem *in vitro* rekonstituierten Komplex aus sR13-28a, aL7, aNop56 und aFib durch eine Gelfiltration wurde durch eine Anionenaustauscherchromatographie die Existenz des sRNP-Komplexes, der alle RNA- und Protein-Komponenten enthält, verifiziert (Abb. 3.8). Der entstandene sRNP-Komplex ist demnach für einige Zeit stabil, muß aber wieder dissoziiert werden, da die entstandenen Kristalle ausschließlich aus den Proteinen aFib und aNop56, das obendrein degradiert vorliegt, bestehen (Abb. 3.10). Eine Möglichkeit diese Beobachtung zu erklären, wären noch vorhandene Proteasen in der aNop56- oder der Komplexlösung. Diese Proteasen spalten das aNop56 in Fragmente auf, von denen eines eine Größe von 36 kDa besitzt und an aFib gebunden wird (Abb. 3.10). Daß der Spaltprozeß über einen Zeitraum von 4-6 Wochen abläuft, kann am aufgereinigten aNop56-Protein beobachtet werden, das in dieser Zeitspanne in ein 36 kDa großes und mehrere kleinere Fragmente aufgespalten wird. Aus diesem Umstand würde sich auch erklären lassen, warum die Kristalle des aFib-aNop56-Komplexes erst nach ~ 5 Wochen in einer für sie optimalen Bedingung gebildet wurden.

Daneben kann auch die Dissoziation des Komplexes mit der Degradierung des aNop56-Proteins einhergehen, indem das aNop56 im Bereich des abgespaltenen 12 kDa großen Fragments an den RNA-aL7-Komplex und im Bereich des 36 kDa großen Fragments an das aFib gebunden ist. Ob das aNop56 am N- oder C-terminalen Ende oder sogar an beiden Enden verkürzt wurde, müßte über eine Proteinsequenzierung geklärt werden, denn das homologe Nop5p aus *Archaeoglobus fulgidus*, das um 150 Aminosäuren kürzer ist, bindet sowohl in der C-terminalen als auch der N-terminalen Region, wobei den Aminosäure-Resten Arg169 und Lys235 eine besondere Bedeutung beigemessen wird (AITTALEB ET AL., 2003). Da die meisten Aminosäuren des gut konservierten C-Terminus nicht in Protein-Protein- oder Protein-Adomet-Interaktionen involviert sind, und das Oberflächen-Potential des Nop5p-Fibrillarin Komplexes in diesem Nop5p-Bereich eine hohe positive Ladung aufweist, gehen AITTALEB ET AL. (2003) davon aus, daß das Nop5p an die RNA bindet. Durch Band-Shift Experimente konnte diese Annahme untermauert werden. Trotz dieser Ergebnisse von AITTALEB ET AL. (2003) bleibt ein genauer Assemblierungsmechanismus weiterhin unklar. Sie unterstützen die Vermutung, daß zumindest das C-terminale Ende des aNop56 durch Proteasen verkürzt wird, und der sRNP-Komplex dissoziiert. In Kristallisationsansätzen mit aFib und einem GluC-verdauten, definierten 36 kDa großen aNop56 konnten keine Kristalle

erhalten werden, was zu der Annahme führt, daß auch das N-terminale Ende von aNop56 im Ansatz mit dem Volllängenprotein verkürzt wird.

4.2 AUSBLICK: SRNP-KOMPLEX

Bisher konnten nur Komplexe aus einer verkürzten RNA und dem archaeobakteriellen L7Ae-Protein aus *Archaeoglobus fulgidus* (MOORE ET AL., 2004) beziehungsweise dem humanen 15,5 kDa Protein (VIDOVIC ET AL., 2000) auf der einen Seite und den zwei Proteinen Fibrillarin und Nop5p (AITTALEB ET AL., 2003) auf der anderen Seite kristallisiert werden. Sowohl AITTALEB ET AL. (2003) als auch MOORE ET AL. (2004) postulieren, daß die verwendete RNA für einen Gesamtkomplex aus allen vier Komponenten sowohl die C/D-Box als auch die C'/D'-Box beinhalten muß, da die Proteine ein Heterodimer bilden, das durch die RNA und das Nop zusammen gehalten wird. Für weitere Kristallisationsversuche muß daher entweder eine neue RNA, die sowohl das C/D-Motiv als auch das C'/D'-Motiv enthält, konstruiert und synthetisiert werden, oder die Wildtyp-RNA sR1 in großem Maßstab vervielfältigt und gereinigt werden.

Der bei dem verwandten *Archaeoglobus fulgidus* kristallisierte strukturell aufgeklärte Komplex der C/D-Box Proteine Nop5p und Fibrillarin, konnte mit den orthologen Proteinen aNop56 und aFib aus *Sulfolobus solfataricus* ebenfalls kristallisiert werden, wobei das aNop56 im Kristall in degradiert Form vorlag. Da die erhaltenen Komplexkristalle extrem fragil waren und kaum erkennbar streuten, ist es möglich, daß entstehende Kristalle des Gesamtkomplexes mit RNA und allen drei Proteinen ebenfalls solche Eigenschaften aufweisen. Daher wird es nötig, ein geeignetes System zu etablieren, daß den Komplex schützt und die Streudaten verbessert. Daneben wäre es ebenfalls sinnvoll, daß degradierte aNop56 ansequenzieren zu lassen, um herauszufinden, wo eine Verkürzung stattfindet.

4.3 VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN VON AMYB MIT VERWANDTEN STRUKTUREN

4.3.1 Charakteristische Sequenz- und Strukturelemente von AmyB, einem Mitglied der Glykosyl-Hydrolase Familie 57

AmyB, ein Enzym mit α -Amylase Aktivität, wurde 2001 von FÜTTERER aufgrund seiner enzymatischen und chemischen Eigenschaften als Mitglied der Glykosyl-Hydrolase Familie 57 charakterisiert. Das hervorstechendste Kennzeichen der α -Amylase Familien, die katalytische Domäne in Form eines $(\beta,\alpha)_8$ -Fasses, das zum ersten Mal 1980 in der α -Amylase A aus *Aspergillus oryzae* identifiziert wurde (MATSUURA ET AL., 1980), kann auch in der Struktur des GHF Mitglieds AmyB aus *Thermotoga maritima* MSB8 wiedererkannt werden (Abb 3.11). Beim Übereinanderlegen der Strukturen eines typischen α -Amylase Fasses mit dem AmyB-Faß wird sowohl eine Verkürzung um ein β -Faltblatt und eine α -Helix als auch eine Verzerrung des Fasses deutlich. Daß es sich bei dem fehlenden Teil des katalytischen Fasses um das erste β -Faltblatt und die erste α -Helix handelt, wird durch einen Vergleich der Sequenzen sichtbar. Zwar sind sich die Familienmitglieder der α -Amylasen in ihrer Gesamtsequenz nur zu maximal 10% ähnlich (JANEČEK, 1997; PUJADAS & PALAU, 2001), aber sie besitzen charakteristische Aminosäure-Sequenzmotive (FRIEDBERG, 1983; ROGERS, 1985; NAKAJIMA, 1986) mit einigen hoch konservierten Aminosäuren. So sind zwei dieser konservierten Aminosäuren das Glycin 56 und das Prolin 64. Sie schließen am C-terminalen Ende des zweiten β -Faltblattes eine 7-9 Aminosäuren lange Sequenz ein und lassen in den meisten Fällen eine Unterscheidung zwischen α -Amylasen (7 Aminosäuren) und Cyclodextrin Glukanotransferasen (8 Aminosäuren) zu (JANEČEK ET AL., 1995; MACGREGOR ET AL., 2001). Und eben diese zwei Aminosäuren können im ersten Faltblatt von AmyB identifiziert werden, wobei allerdings das gesamte β -Faltblatt überspannt wird, und insgesamt 10 Aminosäuren eingeschlossen werden. Der Vergleich der konservierten Sequenz, die bei α -Amylasen eingeschlossen wird, und der AmyB-Sequenz zeigt, daß bei der AmyB-Sequenz überwiegend hydrophobe Reste auftreten,

4. DISKUSSION

während bei den α -Amylasen hydrophobe Reste und Reste, die sowohl hydrophob als auch hydrophil reagieren können, im gleichen Verhältnis vorkommen.

Das katalytische Zentrum des zentralen Strukturelements der α -Amylasen liegt in allen bekannten $(\beta,\alpha)_8$ -Faß-Strukturen am C-terminalen Ende (FARBER & PETSKO, 1990; BRÄNDÉN & TOOZE, 1991). Bei der Überprüfung verschiedener AmyB-Strukturmodelle (Oberfläche, Oberflächen-Potentiale und Ribbon-Modell) erkennt man auf der C-terminalen Seite des $(\beta,\alpha)_7$ -Fasses eine eindeutige Bindungstasche (Abb. 3.13 + 3.15).

Entsprechend den Aminosäuren Aspartat 206 und Glutamat 230 in der TAKA-Amylase A (QIAN ET AL., 1994), konnten in AmyB die Aminosäuren Glu185 und Asp349 als katalytische Reste identifiziert werden (Prof. Dr. W. Liebl, persönliche Mitteilung). Von den weiteren fünf konservierten Aminosäuren, die typischerweise bei α -Amylasen im aktiven Zentrum vorhanden sind, sind die Histidine 10 und 12 (TAA: His122 und His296) und das Arginin 471 (TAA: Arg204) im aktiven Zentrum von AmyB auffindbar.

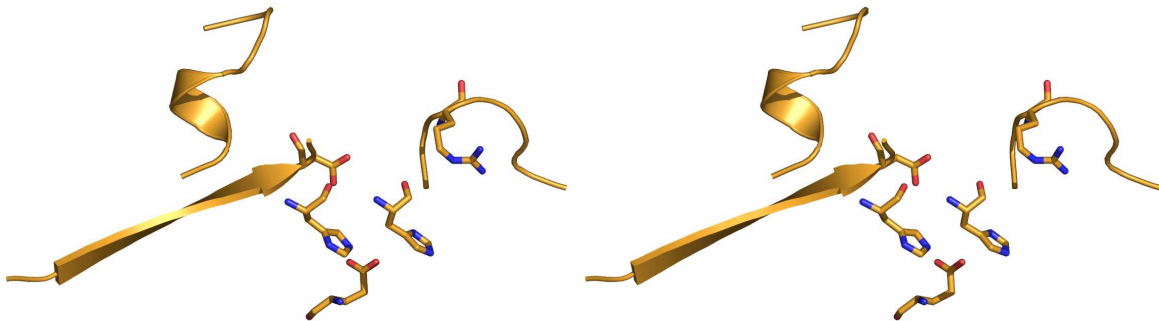


Abbildung 4.1: Stereodarstellung des aktiven Zentrums von AmyB. Das Zentrum enthält sowohl die katalytischen Aminosäuren Glu185 und Asp349 als auch die Aminosäuren His10, His12 und Arg471

D.h. in der Sequenz eines Mitglieds der GHF 57 konnten fünf der sieben in der GHF 13 hoch konservierten Reste im aktiven Zentrum wiedererkannt werden. Aus dieser Tatsache und der α -Amylase Aktivität läßt sich folgern, daß es sich bei der Amylase AmyB aus *Thermotoga maritima* MSB8, ebenso wie die α -Amylase aus

Methanococcus jannaschii (JANEČEK, 1998), um ein Intermediat zwischen der GHF 13 und der GHF 57 handeln könnte.

4.3.2 Vergleich von AmyB mit anderen $(\beta,\alpha)_7$ -Strukturen

Anhand der Atomkoordinaten von AmyB konnte mit Hilfe des DALI-Servers eine Reihe verwandter Strukturen ermittelt werden. Dabei wurden zwei Strukturen gefunden, die im Bereich des $(\beta,\alpha)_7$ -Fasses einen Verwandtschaftsgrad (Z-Faktor) von 37,2 (Gesamtsequenz: 41,5 für 1UFA aus *Thermus thermophilus* Hb8) und 21,4 (Gesamtsequenz: 25,2 für die 4- α -Glukanotransferase aus *Thermococcus litoralis*) aufweisen (Gesamtsequenz vgl. Tab. 3.2).

4.3.2.1 AmyB und die *Thermococcus litoralis* 4- α -Glukanotransferase

An der 4- α -Glukanotransferase aus *Thermococcus litoralis* wurde die erste Struktur eines Mitglieds der GHF 57 aufgeklärt (IMAMURA ET AL., 2003). Bis zu diesem Zeitpunkt war über Enzyme der GHF 57 nur wenig bekannt. So wußte man aus Cross-Link-Experimenten über die 4- α -Glukanotransferase ausschließlich, daß das Glutamat 123 als Nukleophil bei der katalytischen Reaktion fungiert (IMAMURA ET AL., 2001). Mit Aufklärung der Struktur der Acarbose-komplexierten 4- α -Glukanotransferase, konnte das aktive Zentrum in der N-terminalen Domäne A lokalisiert werden. Dabei besetzt Acarviosin, die inhibitorische Disaccharid-Einheit der Acarbose, die Bindungsstellen -1 und +1 und blockiert die Reaktion des Nukleophils. Auf diese Art und Weise wird in den meisten α -Amylasen das aktive Zentrum durch Acarbose blockiert (PRZYLAS ET AL., 2000). Durch seine Nähe zum C $_{\alpha}$ -Atom des Valienamin-Teils der Acarbose kann das Glu123 nur als katalytisches Nukleophil angreifen, während die einzige weitere saure Aminosäure, Asp214, durch seine Nähe zum Stickstoff nur als Säure/Base-Katalysator in Frage kommt (Abb. 3.14).

Der Vergleich der AmyB-Struktur mit der Acarbose-komplexierten 4- α -Glukanotransferase zeigt zwei Strukturen, die in großen Bereichen ihrer katalytischen Fässer übereinstimmen (Abb. 3.12). Geht man auf die Aminosäuren-Ebene der

katalytischen Zentren, kann man erkennen, daß das aktive Zentrum der 4- α -Glukanotransferase weiter aufgeklappt ist als das von AmyB, und somit die Möglichkeit besitzt, größere Saccharide aufzunehmen. Das Nukleophil Glu123 aus der 4- α -Glukanotransferase und das Glu185 aus AmyB liegen beide in der gleichen Orientierung vor, wodurch eine Funktion als Nukleophil des AmyB Glu185 durchaus sinnvoll erscheint (Abb. 3.16). Daneben sind die Aspartat-Reste zueinander verdreht (Abb. 3.16). Dies könnte neben einigen anderen Anhaltspunkten ein Hinweis darauf sein, daß die Konformation im aktiven Zentrum verändert wird, um Saccharide zu binden. Weitere Zeichen für eine benötigte Konformationsänderung sind die Aminosäure-Reste Glu243, Ser247 und Thr469, die alle in den Bereich ragen, wo sich Polysaccharide anlagern sollten, es aufgrund von Platzmangel jedoch nicht können (Abb. 3.15 **A + B**). Bei der 4- α -Glukanotransferase konnte ein Aufklappen des aktiven Zentrums bei der Bindung von Acarbose beobachtet werden (IMAMURA ET AL., 2003). Dies untermauert die Annahme, daß das aktive Zentrum der α -Amylase AmyB gleichfalls aufklappt, um ein Zuckermolekül zu binden. Auch am Oberflächen-Potential von AmyB lassen sich die optimalen Voraussetzungen für die Bindung von Zuckermolekülen durch eine stark negative Ladung der Bindungstasche ausmachen (Abb. 3.13).

Im Gegensatz zur 4- α -Glukanotransferase konnte in AmyB keine Bindung von einem Ca^{2+} -Ion beobachtet werden, was durch das Fehlen der Domäne B erklärt werden kann. An der Domäne B wird das Ca^{2+} -Ion entweder ganz gebunden oder zur Stabilisierung der katalytischen Domäne zum Teil an das aktive Zentrum und zum anderen Teil an die Domäne B gebunden, ein Phänomen, das ebenfalls in echten α -Amylasen auftritt (BOEL ET AL., 1990).

4.3.2.2 AmyB und IUFA

Den höchsten Verwandtschaftsgrad zu AmyB weist ein bisher uncharakterisiertes Enzym aus *Thermus thermophilus* Hb8 auf. Der Vergleich beider Strukturen zeigt zwei fast identische Strukturbilder, die nur durch kleinere Abweichungen, wie z.B. einer etwas längeren α -Helix oder kurzer β -Faltblätter in nur einer Struktur, unterschieden werden können (Abb. 3.11).

Stellt man die Sequenzen der beiden Enzyme gegenüber, ist trotz der strukturellen Homologie nur eine Ähnlichkeit der Sequenzen von ~30% zu erkennen. Trotz der fehlenden Sequenzhomologie sind sich die beiden Enzyme so ähnlich, daß sie die Bindungstasche für ihr Substrat unzugänglich machen, indem mehrere Aminosäurereste in die Bindungstasche hineinragen (Abb. 3.17), d.h. auch 1UFA muß seine geschützte Bindungstasche aufklappen, um ein Zuckermolekül binden zu können. Fehlende Sequenzhomologien der beiden Enzyme führen in diesem Fall zu der Annahme, daß bei der Entwicklung des $(\beta,\alpha)_7$ -Fasses auch die Theorie der konvergenten Evolution, sprich der Entwicklung desselben Motives aus unterschiedlichen Ursprüngen, nicht völlig ausgeschlossen werden kann.

4.3.3 Thermostabilität von *AmyB* und anderen GHF 57 Familienmitgliedern

Es gibt zwei Begründungen, warum die Thermostabilität bei Proteinen, also auch bei α -Amylasen, ansteigt. Zum einen gehen SUZUKI und Mitarbeiter davon aus, daß eine ansteigende Zahl von Prolinen an bestimmten Stellen im Protein von entscheidender Bedeutung sind (SUZUKI ET AL., 1987; SUZUKI, 1989). Diese Behauptung konnte durch Untersuchungen an Oligo-1,6-Glukosidasen aus drei unterschiedlich thermostabilen *Bacillus* Stämmen untermauert werden (WATANABE ET AL. 1991, 1994 & 1996). Sie konnten zeigen, daß die Thermostabilität der Oligo-1,6-Glukosidasen zunahm, je mehr Proline im Protein vorhanden waren. Einen besonderen Einfluß auf die Thermostabilität zeigten dabei Proline, die an zweiter Stelle in den β -Schleifen und am Anfang von α -Helices auftraten. Anhand dieser Gegebenheiten kann die Thermostabilität von *AmyB* jedoch nicht eindeutig begründet werden, denn bei einer genaueren Betrachtung der prozentualen Anteile an Prolinen in *AmyB* und den Oligo-1,6-Glukosidasen, stellt man fest, daß *AmyB* zwischen der thermolabilen und der leicht thermostabilen Glukosidase angesiedelt wäre. Für die Theorie der Stabilisierung durch Proline spricht dagegen die Tatsache, daß von den zwanzig in *AmyB* vorkommenden Prolinen sieben an Positionen in den β -Schleifen und α -Helices, die eine Bedeutung für die Thermostabilität haben, lokalisiert sind. Es befindet sich nur ein Prolin an der zweiten Stelle in einer β -Schleife, jedoch zwei weitere an der dritten Position. Die restlichen sechs der sieben Proline liegen in der ersten Windung der α -Helices.

Zum anderen wird die Thermostabilität von Proteinen dadurch erklärt, daß das Innere des Proteins möglichst viele hydrophobe Aminosäuren enthält, während die Aminosäuren auf der Oberfläche überwiegend hydrophil sein sollten. Im Besonderen beachtet man bei den α -Amylasen das $(\beta,\alpha)_7$ -Faß und seine Hydrophobie im Inneren des Fasses, respektive der β -Faltblätter, und die Hydrophilie auf der Außenseite der α -Helices. Bei der genaueren Betrachtung der β -Faltblätter im Inneren des $(\beta,\alpha)_7$ -Fasses von AmyB wird deutlich, daß die β -Faltblätter zu 62% aus hydrophoben Aminosäuren bestehen, während nur 16% der Aminosäuren hydrophil sind. Eine solch deutliche Verschiebung zu den hydrophoben Aminosäuren, wie sie in den β -Faltblättern stattfindet, läßt sich bei den α -Helices zur anderen, hydrophilen Seite hin nicht beobachten. Außer der sechsten Helix des $(\beta,\alpha)_7$ -Fasses (entspricht der siebten Helix in $(\beta,\alpha)_8$ -Fässern der GHF 13) bestehen alle anderen α -Helices aus einer ähnlichen Anzahl von hydrophilen und hydrophoben Aminosäuren. Die Hydrophilie der α -Helices wird nur durch Aminosäuren erreicht, die sowohl hydrophil als auch hydrophob reagieren können, überwiegend aber hydrophil agieren. Da die α -Helix 6 mehrheitlich aus hydrophoben Resten besteht, läßt sich durch das Vorliegen im Inneren des Proteins erklären und wird auch in anderen α -Amylase $(\beta,\alpha)_8$ -Fässern beobachtet (JANEČEK, 1993).

4.4 AUSBLICK: AMYB

Bei der Struktur von AmyB ist deutlich zu erkennen, daß die Bindungstasche mit den katalytischen Aminosäuren Asp349 und Glu185 nicht genügend Platz für die Spaltung langkettiger Saccharide beziehungsweise in umgekehrter Richtung den Aufbau solcher Saccharide bietet. Aufgrund dieser Beobachtungen wird deutlich, daß im aktiven Zentrum von AmyB eine Änderung der Konformation stattfinden muß, um eine Bindung von Sacchariden zu ermöglichen. Ob und wie anschließend Polysaccharide wahrscheinlich gespalten werden, ist ebenfalls noch zu untersuchen.

Unter den bisher gegebenen Hochsalz-Bedingungen, in denen native und auch Selenomethionin Kristalle gewachsen sind, ist es unmöglich Kristalle zu züchten, an die ein Co-Faktor durch Co-Kristallisation binden kann. Dies ist auf den Umstand zurückzuführen, daß Proteine ihre Konformation in hohen Salz-Konzentrationen ungern verändern. In weiterführenden Versuchen müßte nun geklärt werden, ob Kristalle unter

4. DISKUSSION

anderen Kristallisationsbedingungen, die deutlich weniger Salz enthalten, wachsen. Diese Kristalle sollten die gleiche Raumgruppe aufweisen, und sich neben der nativen Form auch in einer z.B. mit einem Zucker komplexierten Form produzieren lassen. Um eine konformelle Änderung des aktiven Zentrums nicht zu behindern, sollte das in diesen Versuchen eingesetzte Protein aktiv sein. Auch eine Anhebung der Temperatur beim Kristallisieren könnte die entstehenden Kristalle der thermophilen Amylase AmyB positiv beeinflussen. Komplexierte Kristalle können dann weiteren Aufschluß über die Funktion und den Katalyse-Mechanismus liefern, die dann unter biochemischen Gesichtspunkten verifiziert werden müssen.

LITERATURVERZEICHNIS

AITTALEB, M., RASHID, R., CHEN, Q., PALMER, J. R., DANIELS, C. J. & LI, H. (2003): Structure and function of archaeal box C/D sRNP core proteins. *Nat. Struct. Biol.* **10(4)**, 256-263.

AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. Z., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A. & STRUHL, K. (eds.) (1992): Current protocols in molecular biology. *Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience*, New York.

BACHELLERIE, J.-P., MICHOT, B., NICOLOSO, M., BALAKIN, A, NI, J & FOURNIER, M. J. (1995): Antisense snoRNAs: a family of nucleolar RNAs with long complementarity to rRNA. *Trends Biochem. Sci.* **20(7)**, 261-264.

BAECKER, P. A., GREENBERG, E. & PREISS, J. (1986): Biosynthesis of bacterial glycogen. Primary structure of *Escherichia coli* 1,4- α -D-glucan: 1,4- α -D-glucan 6- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferase as deduced from the nucleotide sequence of the glg B gene. *J. Biol. Chem.* **261(19)**, 8738-8743.

BALAKIN, A. G., LEMPICKI, R. A., HUANG, G. M. & FOURNIER, M. J. (1994): *Saccharomyces cerevisiae* U14 small nuclear RNA has little secondary structure and appears to be produced by post-transcriptional processing. *J. Biol. Chem.* **269(1)**, 739-746.

BALAKIN, A. G., SMITH, L. & FOURNIER, M. (1996): The RNA world of the nucleolus: Two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* **86**, 823-834.

BANNER, D. W., BLOOMER, A. C., PETSKO, G. A., PHILLIPS, D. C., POGSON, C. I., WILSON, I.A., CORRAN, P. H., FURTH, A. J., MILMAN, J. D., OFFORD, R. E., PRIDDLE, J. D. & WALEY, S. G. (1975): Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255(5510)**, 609-614.

BERTOLDO, C. & ANTRANIKIAN, G. (2001): Amylolytic enzymes from hyperthermophiles. *Methods Enzymol.* **330**, 269-289.

BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant Plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **56**, 779-826.

BOEL, E., BRADY, L., BRZOZOWSKI, A. M., DEREWENDA, Z., DODSON, G. G., JENSEN, V. J., PETERSON, S. B., SWIFT, H., THIM, L. & WOLDIKE, H. F. (1990): Calcium binding in α -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1 Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry* **29(26)**, 6244-6249.

BORK, P., HOLM, L. & SANDER, C. (1994): The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J. Mol. Biol.* **242(4)**, 309-320.

BORTOLIN, M.-L., GANOT, P. & KISS, T. (1999): Elements essential for accumulation and function of small nucleolar RNAs directing site-specific pseudouridylation of ribosomal RNAs. *EMBO J.* **18(2)**, 457-469.

BOUSQUET-ANTONELLI, C., HENRY, Y., GÉLUGNE, J.-P., CAIZERGUEZ-FERRER, M. & KISS, T. (1997): A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eucaryotic ribosomal RNAs. *EMBO J.* **16(15)**, 4770-4776.

BRADFORD, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analyt. Biochemistry* **72**, 248-254.

BRÄNDÉN, C. I. & TOOZE, J. (1991): Introduction to Protein Structure. Garland, New York.

BUISSON, G., DUÉE, E., HASER, R. & PAYAN, F. (1987): Three dimensional structure of porcine pancreatic alpha-amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *EMBO J.* **6(13)**, 3909-3916.

BULT, C. J., WHITE, O., OLSEN, G. J., ZHOU, L., FLEISCHMANN, R. D., SUTTON, G. G., BLAKE, J. A., FITZGERALD, L. M., CLAYTON, R. A., GOCAYNE, J. D., KERLAVAGE, A. R., DOUGHERTY, B. A., TOMB, J. F., ADAMS, M. D., REICH, C. I., OVERBEEK, R., KIRKNESS, E. F., WEINSTOCK, K. G., MERRICK, J. M., GLODEK, A., SCOTT, J. L., GEOHAGEN, N. S. M., WEIDMAN, J.F., FUHRMANN, J. L., PRESLEY, E. A., NGUYEN, D., UTTERBACK, T. R., KELLEY, J. M., PETERSON, J. D., SADOW, P. W., HANNA, M. C., COTTON, M. D., HURST, M. A., ROBERTS, K. M., KAINE, B. P., BORODOVSKY, M., KLENK, H. P., FRASER, C. M., SMITH, H. O., WOESE, C. R. & VENTER, J. C. (1996): Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**, 1058-1073.

CARVALHO, T., ALMEIDA, F., CALAPEZ, A., LAFARGA, M., BERCIANO, M. T. & CARMO-FONESECA, M. (1999): The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: a link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. *J. Cell Biol.* **147**, 715-727.

CASPAR, D. L., COHEN, C. & LONGLEY, W. (1969): Tropomyosin: crystal structure, polymorphism, and molecular interactions. *J. Mol. Biol.* **41(1)**, 87-107.

CHU, S., ZENGEL, J. M. & LINDAHL, L. (1997): A novel protein shared by RNase MRP and RNase P. *RNA* **3(4)**, 382-391.

COHEN, C., CASPAR, D. L., PARRY, D. A. & LUCAS, R. M. (1972): Tropomyosin crystal dynamics. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Bio.* **36**, 205-216.

COUTINHO, P. M. & HENRISSAT, B. (1999): Carbohydrate-active enzymes server. **URL:** www.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html

COWAN D. (1996): The outer reaches of life. *Tibtech* **13**, 177.

CRICK, F. (1970): Central dogma of molecular biology. *Nature* **227(258)**, 561-563.

DARZACQ, X., JÁDY, B.E., VERHEGGEN, C., KISS, A. M., BERTRAND, E. & KISS, T. (2002): Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. *EMBO J.* **21(11)**, 2746-56.

DAVIES, G. J., WILSON, K. S. & HENRISSAT, B. (1997): Nomenclature for sugar-binding subsites in glycosyl hydrolases. *Biochem J.* **321**, 557-559.

DELONG, E. F. (2001): A phylogenetic perspective on hyperthermophilic microorganisms. *Methods Enzymol.* **330**, 3-11.

DICHTL, B. & TOLLERVEY, D. (1997): Pop3p is essential for the activity of the RNase MRP and RNase P ribonucleoproteins *in vivo*. *EMBO J.* **16(2)**, 417-429.

DONG, G., VIEILLE, C., SAVCHENK, A. & ZEIKUS, J. G. (1997): Cloning, sequencing, and expression of the gene encoding extracellular alpha-amylase from *Pyrococcus furiosus* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(9)**, 3569-3576.

DRENTH, J. (1999): Principles of protein X-ray crystallography. Springer Verlag, 2nd Edition.

FARBER, G. K. & PETSKO, G. A. (1990): The evolution of α/β barrel enzymes. *Trends Biochem. Sci.* **15(6)**, 228-234.

FILIPOWICZ, W., PELCZAR, P., POGACIC, V. & DRAGON, F. (1999): Structure and biogenesis of small nucleolar RNAs acting as guides for ribosomal RNA modification. *Acta Biochim. Pol.* **46(2)**, 377-389.

FRIEDBERG, F. (1983): On the primary structure of amylases. *FEBS Lett.* **152(2)**, 139-140.

FÜTTERER, O. (2001): Vergleichende Untersuchung von drei Amylasen des hyperthermophilen Bakteriums *Thermotoga maritima* MSB8. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.

FUKUSUMI, S., KAMIZONO, A., HORINOUCHE, S. & BEPPU, T. (1988): Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable amylase gene from an anaerobic thermophile, *Dictyoglomus thermophilum*. *Eur. J. Biochem.* **174**(1), 15-21.

GABORIAUD, C., BISSERY, V., BENCHETRIT, T. & MORNON, J. P. (1987): Hydrophobic cluster analysis: an efficient new way to compare and analyse amino acid sequences. *FEBS Lett.* **224**(1), 149-155.

GANOT, P., BORTOLIN, M.-L. & KISS, T. (1997a): Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell* **89**, 799-809.

GANOT, P., CAIZERGUES-FERRER, M. & KISS, T. (1997b): The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation. *Genes Dev.* **11**, 941-956.

GANOT, P., JÁDY, B. E., BORTOLIN, M.-L., DARZACQ, X. & KISS, T. (1999): Nucleolar factors direct the 2'-O-methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA. *Mol. Cell Biol.* **19**(10), 6906-6917.

GAUTIER, T., BERGÈS, T., TOLLERVEY, D. & HURT, E. (1997): Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis. *Mol. Cell Biol.* **17**(12), 7088-7098.

GUERRIER-TAKADA, C., GARDINER, K., MARSH, T., PACE, N. & ALTMAN, S. (1983): The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**, 849-857.

HENRAS, A., HENRY, Y., BOUSQUET-ANTONELLI, C., NOAILLAC-DEPEYRE, J., GÉLUGNE, J.-P. & GAIZERGUES-FERRER, M. (1998): Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs. *EMBO J.* **17**(23), 7078-7090.

HENRISSAT, B. (1991): A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **280**, 309-316.

HENRISSAT, B. & BAIROCH, A. (1993): New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* **293**, 781-788.

HENRISSAT, B. & BAIROCH, A. (1996): Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.* **316(2)**, 695-696.

HENRISSAT, B. (1998): Glycosidase families. *Biochem. Soc. Trans.* **26(2)**, 153-156.

HOLM, L., KOIVULA, A. K., LEHTOVAARA, P. M., HEMMINKI, A. & KNOWLES, J. K. (1990): Random mutagenesis used to probe the structure and function of *Bacillus stearothermophilus* α -amylase. *Protein Eng.* **3(3)**, 181-191.

HOLM, L. & SANDER, C. (1993): Protein structure comparison by alignment of distance matrices. *J. Mol. Biol.* **233**, 123-138.

HOPPE, W. (1957): Die Faltmolekülmethode: eine neue Methode zur Bestimmung der Kristallstruktur bei ganz oder teilweise bekannten Molekülstrukturen. *Acta Cryst.* **10**, 750-751.

HUBER, R (1965): Die automatisierte Faltmolekülmethode. *Acta Cryst.* **19**, 353-356.

HOUGH, D. W. & DANSON, M. J. (1999): Extremozymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3(1)**, 39-46.

IDAKA, M., TERADA, T., MURAYAMA, K., YAMAGUCHI, H., NUREKI, O., ISHITANI, R., SHIROUZU, M. & YOKOYAMA, S. (2003): Crystal structure of Tt1467 from *Thermus thermophilus* Hb8, unpubliziert.

IMAMURA, H., FUSHINOBU, S., JEON, B. S., WAKAGI, T. & MATSUZAWA, H. (2001): Identification of the catalytic residue of *Thermococcus litoralis* 4- α -glucanotransferase through mechanism-based labelling. *Biochemistry* **40(41)**, 12400-12406.

IMAMURA, H., FUSHINOBU, S., YAMAMOTO, M., KUMASAKA, T., JEON, B.-S., WAKAGI, T. & MATSUZAWA, H. (2003): Crystal structures of 4- α -Glucanotransferase from *Thermococcus litoralis* and its complex with an inhibitor. *J. Biol. Chem.* **278(21)**, 19378-19386.

ISHIKAWA, K., MATSUI, I., HONDA, K. & NAKATANI, H (1992): Multi-functional roles of a histidine residue in human pancreatic α -amylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183(1)**, 286-291.

ISHIKAWA, K., MATSUI, I., KOBAYASHI, S., NAKATANI, H. & HONDA, K. (1993): Substrate recognition at the binding site in mammalian pancreatic α -amylases. *Biochemistry* **32(24)**, 6259-6265.

JÁDY, E. A. & KISS, T. (2001): A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. *EMBO J.* **20(3)**, 541-551.

JANEČEK, Š (1992): New conserved amino acid region of α -amylases in the third loop of their (β/α)₈-barrel domains. *Biochem. J.* **288(3)**, 1069-1070.

JANEČEK, Š (1993): Does the increased hydrophobicity of the interior and hydrophilicity of the exterior of an enzyme structure reflect its increased thermostability? *Int. J. Biol. Macromol.* **15(5)**, 317-318.

JANEČEK, Š (1994): Parallel β/α -barrels of α -amylase, cyclodextrin glycosyltransferase and oligo-1,6-glucosidase versus the barrel of β -amylase: evolutionary distance is a reflection of unrelated sequences. *FEBS Lett.* **353(2)**, 119-123.

JANEČEK, Š & TÓTH, D. (1994): Amino acid sequence alignment of microbial, plant and animal α -amylases. Some evolutionary implications. *Biologia* **49**, 301-306.

JANEČEK, Š (1994): Close evolutionary relatedness among functionally distantly related members of the $(\alpha/\beta)_8$ -barrel glycosyl hydrolases suggested by the similarity of their fifth conserved sequence region. *FEBS Lett.* **377(1)**, 6-8.

JANEČEK, Š, MACGREGOR, E. A. & SVENSSON, B (1995): Characteristic differences in the primary structure allow discrimination of cyclodextrin glucoamylases from α -amylases. *Biochem. J.* **305**, 685-686.

JANEČEK, Š., SVENSSON, B. & HENRISSAT, B. (1997): Domain evolution in the α -amylase family. *J. Mol. Evol.* **45**, 322-331.

JANEČEK, Š. (1997): α -Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **67**, 67-97.

JANEČEK, Š. (1998): Sequence of archaeal *Methanococcus jannaschii* α -amylase contains features of the families 13 and 57 of glycosyl hydrolases: a trace of their common ancestor? *Folia Microbiol.* **43**, 123-128.

JANEČEK, Š. (2002): A motif of microbial starch-binding domain found in human genethonin. *Bioinformatics* **18(11)**, 1534-1537.

JANEČEK, Š., SVENSSON, B. & MACGREGOR, E. A. (2003): Relation between domain evolution, specificity, and taxonomy of the α -amylase family members containing a C-terminal starch-binding domain. *Eur. J. Biochem.* **270(4)**, 635-645.

JESPERSEN, H. M., MACGREGOR, E. A., SIERKS, M. R. & SVENSSON, B. (1991): Comparison of the domain-level organisation of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem. J.* **280**, 51-55.

JESPERSEN, H. M., MACGREGOR, E. A., HENRISSAT, B., SIERKS, M. R. & SVENSSON, B. (1993): Starch- and glycogen-debranching and branching enzymes: prediction of structural feature of the catalytic $(\beta,\alpha)_8$ -barrel domain and evolutionary relationship to other Amylolytic enzymes. *J. Protein Chem.* **12(6)**, 791-805.

KISS-LÁSZLÓ, Z., HENRY, Y., BACHELLERIE, J.-P., CAIZERGUES-FERRER, M. & KISS, T. (1996): Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: A novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* **85**, 1077-1088.

KISS-LÁSZLÓ, Z., HENRY, Y. & KISS, T. (1998): Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose. *EMBO J.* **17(3)**, 797-807.

KISS, T. (2001): Small nucleolar RNA-guided post-transcriptional modification of cellular RNAs. *EMBO J.* **20(14)**, 3617-3622.

KLEBER, W. (1961): Einführung in die Kristallographie. Verlag Technik, Berlin.

KLEIN, C. & SCHULZ, G. E. (1991): Structure of cyclodextrin glycosyltransferase refined at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **217(4)**, 737-750.

LADERMAN, K. A., DAVIS, B. R., KRUTZSCH, H. C., LEWIS, M. S., GRIKO, Y. V., PRIVALOV, P. L. & ANFINSEN C. B. (1993): The purification and characterization of an extremely thermostable alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* **268(32)**, 24394-24401.

LÄMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227(259)**, 680-685.

LAFONTAINE, D. L. J., BOUSQUET-ANTONELLI, Y., HENRY, M., CAIZERGUES-FERRER, M. & TOLLERVEY, D. (1998): The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine Synthase. *Genes Dev.* **12**, 527-537.

LANGE, T. S. & GERBI, S. A. (2000): Transient nucleolar localization of U6 small nuclear RNA in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Biol. Cell* **11(7)**, 2419-2428.

LESK, A. M., BRÄNDÉN, C. I. & CHOTHIA, C. (1989): Structural principles of α/β barrel proteins: the packing of the interior of the sheet. *Proteins* **5(2)**, 139-148.

LIU, W., DE CASTRO, M. L., TAKRAMA, J., BILOUS, P. T., VINAYAGAMOORTHY, T., MADSEN, N. B. & BLEACKLEY, R. C. (1993): Molecular cloning, sequencing, and analysis of the cDNA for rabbit muscle glycogen debranching enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **306**(1), 232-239.

LYGEROU, Z., MITCHELL, P., PETFALSKI, E., SERAPHIN, B. & TOLLERVEY, D. (1994): The POP1 gene encodes a protein component common to the RNase MRP and RNase P ribonucleoproteins. *Genes Dev.* **8**(12), 1423-1433.

MACGREGOR, E. A. (1988): Alpha-amylase structure and activity. *J. Protein Chem.* **7**(4), 399-415.

MACGREGOR, A. W., JESPERSEN, H. M. & SVENSSON, B. (1996): A circularly permuted α -amylase-type α/β -barrel structure in glucan-synthesizing glucosyltransferases. *FEBS Lett.* **378**(3), 263-266.

MACGREGOR, A. W., JANEČEK, Š. & SVENSSON, B. (2001): Relationship of sequence and structure to specificity in the alpha-amylase family enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1546**, 1-20.

MADEN, B. E. H. (1990): The numerous modified nucleotides in eucaryotic ribosomal RNA. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **39**, 241-303.

MATSUURA, Y., KUSUNOKI, M., HARADA, W., TANAKA, N., IGA, Y., YASUOKA, N., TODA, H., NARITA, K. & KAKUDO, M. (1980): Molecular structure of taka-amylase A. Backbone chain folding at 3 Å resolution. *J. Biochem. (Tokyo)*. **87**(5), 1555-1558.

MATSUURA, Y., KUSUNOKI, M., HARADA, W. & KAKUDO, M. (1984): Structure and possible catalytic residues of Taka-amylase A. *J. Biochem.* **95**(3), 697-702.

MOORE, T., ZHANG, Y., FENLEY, M. O. & LI, H. (2004): Molecular basis of box C/D RNA-protein interactions; cocrystal structure of archaeal L7Ae and box C/D RNA. *Structure* **12**(5), 807-818.

NAKAJIMA, R., IMANAKA, T. & AIBA, S. (1986): Comparison of amino acid sequence of eleven different α -amylases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 355-360.

NESTERENKO, M. V., TILLEY, M. & UPTON, J. S. (1994): A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J. Biochem. Biophys. Methods* **28**, 239-242.

NI, J., TIEN, A. L. & FOURNIER, M. J. (1997): Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA. *Cell* **89**, 565-573.

NOTTROT, S., HARTMUTH, K., FABRIZIO, P., URLAUB, H., VIDOVIC, I., FICNER, R. & LÜHRMANN, R. (1999): Functional interaction of a novel 15.5kD [U4/U6.U5] tri-snRNP protein with the 5' stem-loop of the U4 snRNA. *EMBO J.* **18(21)**, 6119-6133.

OMER, A. D., LOWE, T. M., RUSSELL, A. G., EBHARDT, H., EDDY, S. R. & DENNIS, P. P. (2000): Homologs of small nucleolar RNAs in Archaea. *Science* **288**, 517-522.

OMER, A. D., ZIESCHE, S., EBHARDT, H. & DENNIS, P. P. (2002): *In vitro* reconstitution and activity of a C/D box methylation guide ribonucleoprotein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99(8)**, 5289-5294.

OTTWINOWSKI, Z. & MINOR, W. (1997): Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326

PARK, K. H., KIM, T. J., CHEONG, T. K., KIM, J. W., OH, B. H. & SVENSSON, B. (2000): Structure, specificity and function of cyclomaltodextrinase, a multispecific enzyme of the alpha-amylase family. *Biochim. Biophys. Acta* **1478**, 165-185.

PICKETT, S. D., SAQI, M. A. & STERNBERG, M. J. (1992): Evaluation of the sequence template method for protein structure prediction. Discrimination of the (β/α)₈-barrel fold. *J. Mol. Biol.* **228(1)**, 170-187.

PÖHLING, H. & NEUHOFF, V. (1981): Visualization of proteins with silver stain: a critical analysis. *Electrophoresis* **2**, 141-147.

PRZYLAS, I., TERADA, Y., FUJI, K., TAKAHA, T., SAENGER, W. & STRÄTER, N. (2000): X-ray structure of acarbose bound to amylomaltase from *Thermus aquaticus*. *Eur. J. Biochem.* **267(23)**, 6903-6913.

PUJADAS, G. & PALAU, J. (2001): Evolution of α -amylases: Architectural features an key residues in the stabilization of the $(\beta/\alpha)_8$ scaffold. *Mol. Biol. Evol.* **18(1)**, 38-54.

QIAN, M., HASER, R & PAYAN, F. (1993): Structure and molecular model refinement of pig pancreatic α -amylase a 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **231(3)**, 785-799.

QIAN, M., HASER, R., BUISSON, G., DUÉE, E. & PAYAN, F. (1994): The active center of a mammalian α -amylase. Structure of the complex of a pancreatic α -amylase with a carbohydrate inhibitor refined at 2.2 Å resolution. *Biochemistry* **33(20)**, 6284-6394.

REDDY, R. & BUSCH, H. (1988): Small nucleolar RNAs: RNA sequences, structure, and modifications. In BIRNSTIEL, M. L. (ed.): Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles. Springer Verlag, Berlin, Deutschland.

Rogers, J. C. (1985): Two barley α -amylase gene families are regulated differently in aleurone cells. *J. Biol. Chem.* **260(6)**, 3731-3738.

ROSSMANN, M. G. & BLOW, D. M. (1962): The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Cryst.* **15**, 24-31.

ROUJEINIKOVA, A., RAASCH, C., SEDELNIKOVA, S., LIEBL, W. & RICE, D. W. (2002): Crystal structure of *Thermotoga maritima* 4- α -glucanotransferase and its Acarbose complex: implications of substrate specificity and catalysis. *J. Mol. Biol.* **321(1)**, 149-162.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (eds.) (1989): Molecular cloning: A laboratory manual, second edition. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview, New York*.

SCHENBORN E. T. & MIERENDORF, R. C. (1985): A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res.* **13**, 6223-6236.

SØGAARD, M., KADZIOLA, A., HASER, R. SVENSSON, B. (1993): Site-directed mutagenesis of histidine 93, aspartic acid 180, glutamic acid 205, histidine 290, and aspartic acid 291 at the active site and tryptophan 279 at the raw starch binding site in barley α -amylase 1. *J. Biol. Chem.* **268(30)**, 22480-22484.

STROKOPYTOV, B., PENNINGA, D., ROZEBOOM, H. J., KALK, K. H. & DIJKSTRA, B. W. (1995): X-Ray structure of cyclodextrin glycosyltransferase complexed with acarbose. Implications for the catalytic mechanism of glycosidases. *Biochemistry* **34(7)**, 2234-2240.

SUZUKI, Y., OISHI, K., NAKANO, H. & NAGAYAMA, T. (1987): A strong correlation between the increase in number of proline residues and the rise in thermostability of five *Bacillus oligo-1,6-glucosidases*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 546-551.

SUZUKI, Y. (1989): A general principle of increasing protein thermostability. *Proc. Jpn. Acad.* **65B**, 146-148.

SVENSSON, B. (1994): Protein engineering in the alpha-amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity and stability. *Plant Mol. Biol.* **25**, 141-157.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. & GIBSON T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673-4680.

TOLLERVEY, D., LEHTONEN, H., JANSEN, R., KERN, H. & HURT, E. C. (1993): Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell* **72(3)**, 443-457.

TYCOWSKI, K. T., SMITH, C. M., SHU, M.-D. & STEITZ, J. A. (1996): A small nucleolar RNA requirement for site-specific ribose methylation of rRNA in *Xenopus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93(25)**, 14480-14485.

TYCOWSKI, K. T., YOU, Z.-H., GRAHAM, P. J. & STEITZ, J. A. (1998): Modification of U6 spliceosomal RNA is guided by other small RNAs. *Mol. Cell* **2**, 629-638.

VIDOVIC, I., NOTTROT, S., HARTMUTH, K., LÜHRMANN, R. & FICNER, R. (2000): Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment. *Mol. Cell* **6**, 1331-1342.

VOET, D & VOET, J. G. (1994): Biochemie. VCH, Weinheim , Deutschland.

WANG, H., BOISVERT, D., KIM, K. K., KIM, R. & KIM, S.-H. (2000): Crystal structure of a fibrillarin homologue from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6Å resolution. *EMBO J.* **19(3)**, 317-323.

WATANABE, K., CHISHIRO, K., KITAMURA, K. & SUZUKI, Y. (1991): Proline residues responsible for thermostability occur with high frequency in the loop regions of an extremely thermostable oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus thermoglucosidasius* KP1006. *J. Biol. Chem.* **266(36)**, 24287-24294.

WATANABE, K., MASUDA, T., OHASHI, H., MIHARA, H. & SUZUKI, Y. (1994): Multiple proline substitutions cumulatively thermostabilize *Bacillus cereus* ATCC7064 oligo-1,6-glucosidase. Irrefragable proof supporting the proline rule. *Eur. J. Biochem.* **226(2)**, 277-283.

WATANABE, K., KITAMURA, K. & SUZUKI, Y. (1996): Analysis of the critical sites for protein thermostabilization by proline substitution in oligo-1,6-glucosidase from *Bacillus coagulans* ATCC 7050 and the evolutionary consideration of proline residues. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(6)**, 2066-2073.

WATKINS, N. J., SÉGAULT, V., CHARPENTIER, B., NOTTROT, S., FABRIZIO, P., BACHI, A., WILM, M., ROSBASH, M., BRANLANT, C. & LÜHRMANN, R. (2000): A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP. *Cell* **103**, 457-466.

WEINSTEIN, L.B. & STEITZ, J.A. (1999): Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 378-384.

ZEBARJADIAN, Y., KING, T., FOURNIER, M. J., CLARKE, L. & CARBON, J. (1999): Point mutations in yeast *CBF5* can abolish *in vivo* pseudouridylation of rRNA. *Mol. Cell Biol.* **19(11)**, 7461-7472.

ANHANG

A.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AmyB	Amylase B
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl)methan
C	Cytosin
CTP	Cytosintriphosphat
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatographie
G	Guanin
GHF	Glykosyl-Hydrolase Familie
GH-H	Glykosyl-Hydrolase Familie Stamm H
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O _{bidest}	doppelt entsalztes Wasser
HR	High Resolution
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
K	Kelvin
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
MeV	Mega Elektronenvolt

min	Minute
mM	Millimolar
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
MRP	Mitochondrial RNA Processing
MW	Molekulargewicht
Nop	nucleolar protein (nukleoläres Protein)
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PDB	Protein Datenbank
PEG	Polyethylenglykol
pET	Plasmid zur Expression in T7
prä-RNA	precursor ribonucleic acid (Vorläufer Ribonukleinsäure)
prä-rRNA	precursor ribosomal ribonucleic acid (Vorläufer-ribosomale Ribonukleinsäure)
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
snRNA	small nuklear ribonucleic acid (kleine nukleäre Ribonukleinsäure)
snoRNA	small nucleolar ribonucleic acid (kleine nukleoläre Ribonukleinsäure)
snoRNP	small nucleolar ribonucleic particle (kleiner nukleolärer Ribonukleoprotein Partikel)
sRNA	small ribonucleic acid (kleine Ribonukleinsäure)
sRNP	small ribonucleic particle (kleiner Ribonukleoprotein Partikel)
TAE	Tris-Acetat- Ethylendiamintetraessigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TIM	Triosephosphatisomerase
Tris	Tris-(hydroxymethyl) aminomethan
tRNA	transfer ribonucleic acid (Transfer-Ribonukleinsäure)

U	Uridin
UTP	Uridintriphosphat
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsvolumenprozent

A.2 AMINOSÄUREN

Aminosäure	Drei-Buchstabencode	Ein-Buchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure/Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure/Glutamat	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

A.3 PROTEIN-SEQUENZALIGNMENT: AMYB-1UFA

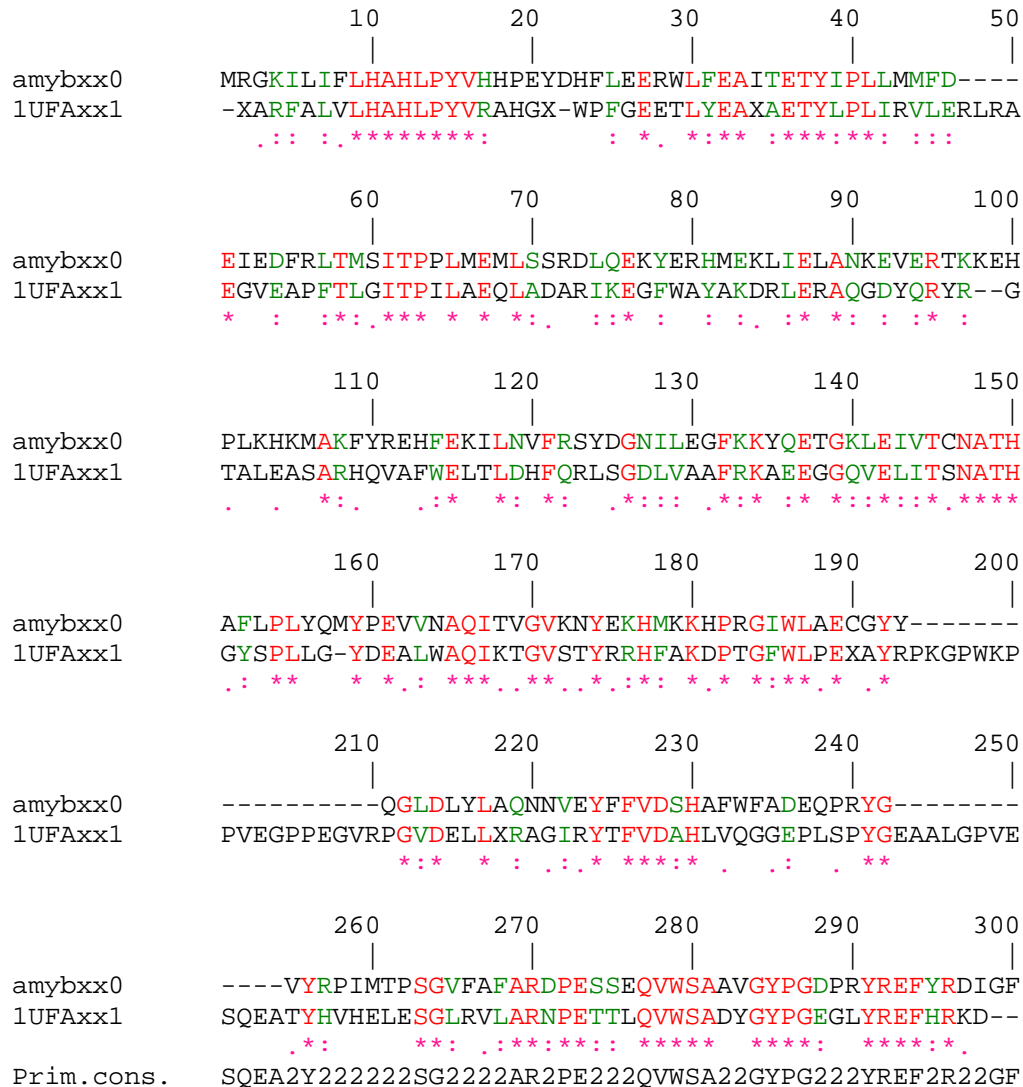


Abbildung A.1: Protein-Sequenz Alignment von AmyB und 1UFA

Alignment data : Alignment length : 561

Identity (*) : 168 is 29.95 %

Strongly similar (:) : 103 is 18.36 %

Weakly similar (.) : 54 is 9.63 %

Different : 236 is 42.07 %

Sequence 0001 : amybxx0 (528 residues)

Sequence 0002 : 1UFAxx1 (520 residues)

ANHANG

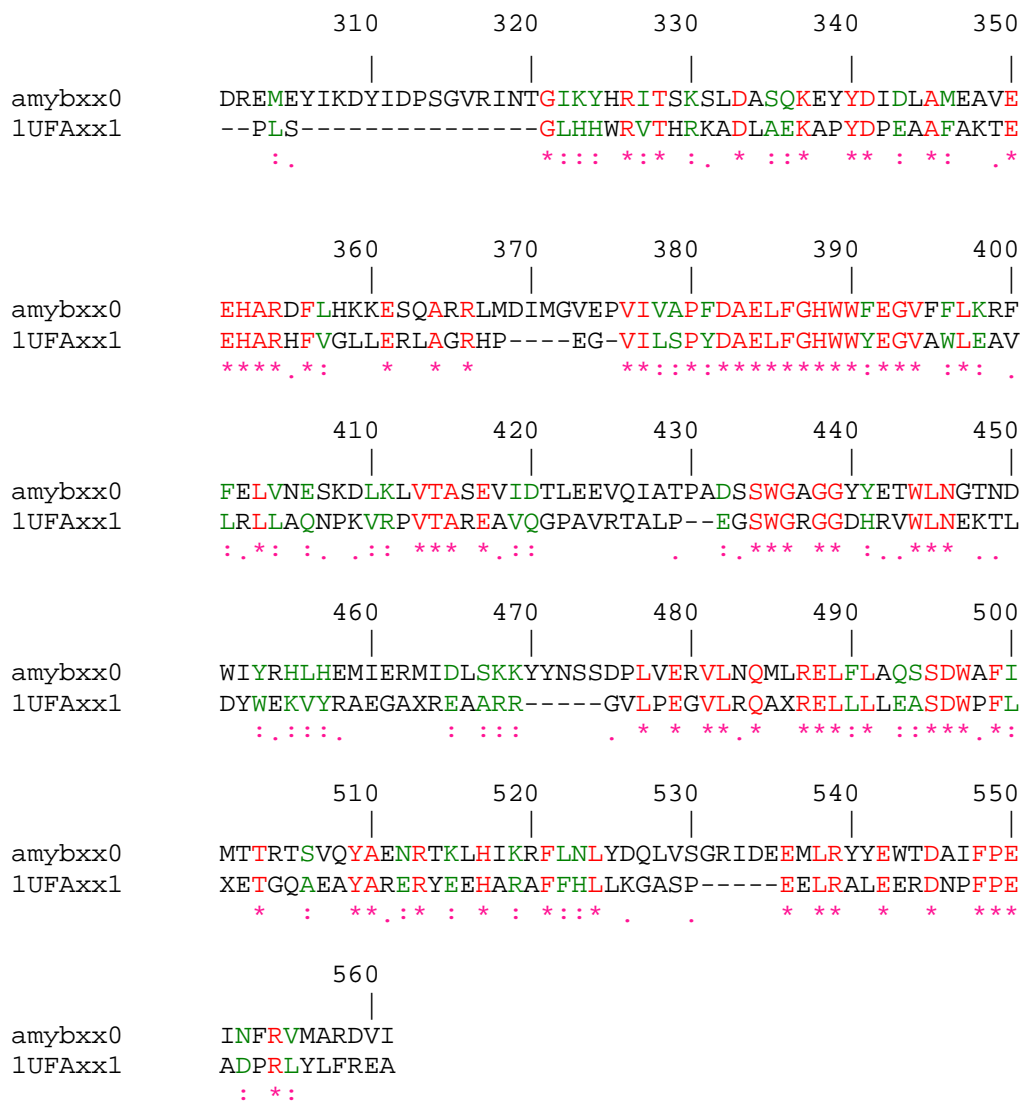


Abbildung A.1: Fortsetzung: Protein-Sequenz Alignment von AmyB und 1UFA

A.4 PROTEINSEQUENZEN DER SRNP PROTEINE AL7, ANOP56 UND AFIB

A.4.1 aL7 (GenBank Nr. S75397)

1 mnamskasyv kfevpqdlad kvleavrkak esgkikkgt n ettkavergg aklviiadv
61 qpeeivahlp llcdekkipy vyvsskalg eacglqvata saailepgea kdlvdeiikr
121 vneikgkts

A.4.2 aNop56 (GenBank Nr. AAK41215)

1 mmkiylichv igavaydeng nivdyitnpr dlkgiteell nnekgipfsa tvellkkvnp
61 qevvvenae vpkqlalgyr vsyepyskvs rifreslpkv aidikfasne edyynflhel
121 slelytrrklr saaqrddlla iqavramddi dktinlfser lrewysihfp eldkliedhe
181 eyativsrfg drgfltidsl kelgfnegri nrildaakks igadiseddl samrmianti
241 ldlynirrnlnnylegvmke vapnvtalvg palgarllsi agsladelakm pastiqvlga
301 ekalfraals ggrppkhgii fypaihtsp rwqrgkiara laaklaiaar vdafsgrfig
361 dqlneqlkkr ideikekfaq pppkppqqqk pppqkqqqk gkkggkrrgk rk

A.4.3 aFib (GenBank Nr. AAK41216)

1 msevitvkqt nmeniecef ndgsftrlctr nlvpfnvyg erlikyegve yrewnafnsk
61 lagailkglk tnpirkgtkv lylgaasgtt ishvsdiel ngkaygvefs prvvrelllv
121 aqrrpnifpl ladarfpqsy ksvvenvdvl yvdiaqpdqt diaiynakff lkvngdmllv
181 ikarsidvtk dpkeiyktev eklensnfet iqiinldpyd kdhaivlsky kg

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Ralf Ficner möchte ich sowohl für die Bereitstellung des Themas und die hervorragenden Arbeitsbedingungen als auch für den steten Gedankenaustausch danken.

Herrn Prof. Dr. Oliver Einsle danke ich für die Bereitschaft, meine Doktorarbeit als Zweitgutachter zu bewerten.

Für wertvolle Tips und Hilfestellungen mit Linux und den Programmen zur Strukturklärung gehört mein ganzer Dank Markus und Oliver. Für wichtige Kniffe im Wet-Lab-Alltag danke ich besonders Annette und Achim.

Angela, Annette, Christina, Christos und Peter Thomas danke ich für die lustigsten und diskussionsfreudigsten Momente im Labor und der Freizeit (P.S.: Wir könnten schon lange reich und berühmt sein!).

Für die wertvolle technische Unterstützung bei der Aufreinigung der snoRNP-Proteine möchte ich Winfried danken.

Allen anderen, hier nicht namentlich erwähnten Labormitgliedern der AGs Ficner und Lührmann möchte ich ebenfalls für die schöne Zeit danken.

Danken möchte ich auch meinen Geschwistern, die soviel Geduld haben, noch immer auf ein Exemplar meiner Diplomarbeit zu warten. Ich gelobe Besserung und werde mich beeilen.

Thorsten, einfach fürs da sein.

Der größte Dank gilt aber meinen Eltern. Euer Verständnis gegenüber meinem „sturen“ Kopf, den daraus resultierenden Ereignissen und eure Unterstützung während der langen Ausbildungszeit kann ich in keiner Weise wiedergutmachen.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name	Steinke
Vorname	Carmen
Geburtsdatum/-ort	27.11.1972 in Attendorn
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

08/1979-08/1983	Besuch der Grundschule Meinerzhagen-Valbert
08/1983-06/1993	Besuch des Ev. Gymnasiums Meinerzhagen
Juni 1993	Allgemeine Hochschulreife am Ev. Gymnasium Meinerzhagen

Studium

WS 1993/94	Immatrikulation an der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster; Fachrichtung Chemie/Diplom
WS 1994/95	Immatrikulation an der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster; Fachrichtung Biologie/Diplom
September 1996	Vordiplom im Fachbereich Biologie
Ende SS 1999	mündliche Diplomprüfungen im Fachbereich Biologie
10/1999-09/2000	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Molekulare Zoophysikologie von Prof. Dr. Walter Stöcker an der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster. Titel der Arbeit: Molekulare Analyse zur Verbreitung der Zinkprotease Meprin im Tierreich
01/2001-09/2002	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen; Arbeitsgruppe Zelluläre Biochemie von Prof. Dr. Reinhard Lührmann, Untergruppe von Dr. Ralf Ficner
seit 09/2002	Fortsetzung der Dissertation in der Arbeitsgruppe Molekulare Strukturbiologie von Prof. Dr. Ralf Ficner an der Georg-August-Universität Göttingen.

