

Mechanismus des pre-tRNA Spleißens: Struktur und Funktion pflanzlicher und animaler RNA Ligasen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Markus Englert

aus
Erlenbach a. Main

Würzburg 2005

Mechanismus des pre-tRNA Spleißens: Struktur und Funktion pflanzlicher und animaler RNA Ligasen

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Markus Englert

aus
Erlenbach a. Main

Würzburg 2005

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:.....

2. Gutachter:.....

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg von Februar 2002 bis Mai 2005 unter der Anleitung von Frau Prof. Dr. Hildburg Beier durchgeführt.

Mein herzlicher Dank geht an Frau Prof. Dr. Hildburg Beier für die interessante Themenstellung, für wertvolle Anregungen, geistige und materielle Unterstützung, für die sachdienlichen Diskussionen und für Ihre fortwährende Betreuung.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. H.J. Gross für die vielen Anregungen, für die Bereitstellung von Chromatographie Medien und die zahlreichen Diskussionen.

Danken möchte ich auch Priv. Dozentin Dr. Anita Marchfelder (Ulm) für die Unterstützung bei der Etablierung der tRNA-Sepharose Säule und für die Zusendung der genomischen *Methanocaldococcus jannaschii* DNA.

Bei Prof. William Lane (Harvard University, USA) möchte ich mich für die professionelle Proteinsequenzierung und Auswertung der Sequenzdaten bedanken.

Mein Dank gilt ebenso Jan Moebius (Rudolf-Virchow Zentrum, Würzburg) für die Proteinsequenzierung der Weizen 110 kDa tRNA Ligase.

Dem "Arabidopsis Biological Resource Center" (ABRC) möchte ich für die Zusendung von vier *Arabidopsis* cDNA Genbanken herzlich danken.

Prof. Kazuhito Akama (Matsue, Japan) möchte ich für die Zusammenarbeit bei dem tRNA Spleißendonuklease-Projekt und bei den Lokalisierungsstudien herzlich danken.

Meinen F-Praktikanten Angela Baljuls, Gerald Lackner und Lasse Reefschlaeger möchte ich für die schöne Zeit und für die gute Zusammenarbeit danken.

Bei Martha Felis möchte ich mich für die schöne Zeit im Labor 132 bedanken.

Darüberhinaus möchte ich allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern der Arbeitsgruppen von Prof. Fischer, Priv. Doz. Schön, Prof. Szalay für die freundliche Zusammenarbeit danken.

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „Mechanismus des pre-tRNA Spleißens: Struktur und Funktion pflanzlicher und animaler RNA Ligasen“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Liste der Publikationen, die aus der Doktorarbeit hervorgegangen sind:

Englert, M. and Beier, H. (2004) Efficient overexpression of functionally active yeast tRNA ligase in the RTS 100 wheat germ lysate. *Biochemica* **3**, 27 – 29.

Schiffer S., Rösch S., Späth B. Englert M., Beier H. and Marchfelder A. (2005) Use of RNA affinity matrices for the isolation of RNA-binding proteins. in: Hartmann, Bindereif, Schön, Westhof (Eds.): *Handbook of RNA Biochemistry* 667 – 675.

Englert, M. and Beier H. (2005) Plant tRNA ligases are multifunctional enzymes that have diverged in sequence and substrate specificity from RNA ligases of other phylogenetic origins. *Nucleic Acids Res.* **33**, 388 – 399.

Liste der Publikationen, die aus der Diplomarbeit hervorgegangen sind:

Englert, M., Felis, M., Junker, V. and Beier, H. (2004) Novel upstream and intragenic control elements for the RNA polymerase III-dependent transcription of human 7SL RNA genes. *Biochimie* **86**, 867 – 874.

Yukawa, Y., Felis, M., Englert, M., Stojanov, M., Matoušek, J., Beier, H. and Sugiura, M. (2005) Plant 7SL RNA genes belong to type 4 of RNA polymerase III-dependent genes that are composed of mixed promoters. *Plant J.* im Druck.

Liste der Vorträge und Posterbeiträge auf Kongressen und Workshops

Englert, M., Felis, M., Yukawa, Y. and Beier H. (2003) Plant and human 7SL RNA genes belong to type 4 of pol III-dependent genes composed of mixed promoters. Beim jährlichen Treffen der European Life Science Organisation (ELSO) in Dresden, Deutschland.

Englert, M., Akama, K. and Beier H. (2003) Characterization of plant tRNA splicing enzymes. Bei dem 20th tRNA Workshop in Banz, Deutschland.

Englert, M., Baljuls, A., Akama, K. and Beier, H. (2004) Structure and function of tRNA splicing enzymes from wheat germ. Bei dem 29th FEBS Kongress in Warschau, Polen und bei dem 3. Treffen der Studiengruppe "RNA-Biochemie", Blaubeuren, Deutschland.

Vortrag beim 3. Treffen der GBM Studiengruppe "RNA-Biochemie" (2004), Blaubeuren, Deutschland
"Characterization of the multifunctional plant tRNA ligase protein and its gene"

Akama, K., Englert, M. and Beier, H. (2005) Nuclear tRNA Splicing in plants: from discovery of tRNA introns to disclosure of the tRNA splicing machinery. Bei dem Kongress "New dimensions of RNA in cellular functions" in Sapporo, Japan.

Das Arbeiten mit rekombinanter DNA erfolgte entsprechend den Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch *in vitro*-neukombinierte Nukleinsäuren des BMFT und mit Genehmigung der Zentralen Kommission für die biologische Sicherheit beim Robert Koch Institut des Bundesgesundheitsamtes.

1.	Einleitung	1
1.1.	Klassifizierung von RNA Spleißen	1
1.2.	Reifung einer intronhaltigen Vorläufer-tRNA.....	1
1.3.	tRNA Spleißen	2
1.3.1.	intronhaltige pre-tRNAs	2
1.3.2.	tRNA Spleißmechanismus	4
1.3.3.	Eukaryontische tRNA Spleißendonuklease	6
1.3.4.	Archaea tRNA Spleißendonuklease.....	8
1.3.5.	Eukaryontische RNA Ligasen.....	9
1.3.6.	Archaea tRNA Ligase	12
1.3.7.	Bakteriophagen RNA Ligasen	12
1.3.8.	<i>Trypanosoma</i> RNA Editing Ligasen	13
1.4.	Problemstellung.....	14
2.	Materialien	15
2.1.	Chemikalien	15
2.2.	Nukleinsäuren und Nukleotide.....	16
2.3.	Proteinchromatographie	16
2.3.1.	Ausgangsmaterialien	16
2.3.2.	Säulenmaterialien.....	17
2.4.	Diagnose-Kits	17
2.5.	Geräte.....	17
2.6.	Sonstige Materialien	18
3.	Methoden.....	19
3.1.	Charakterisierung und Handhabung von Nukleinsäuren	19
3.1.1.	Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren	19
3.1.1.1.	Agarosegel-Elektrophorese.....	19
3.1.1.1.1.	Auftrennung von Deoxyribonukleinsäuren.....	19
3.1.1.1.2.	Denaturierende Auftrennung von Ribonukleinsäuren	20
3.1.2.	Polyacrylamid-Elektrophorese.....	21
3.1.3.	Elution und Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	22
3.1.4.	Elution und Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen	23
3.1.5.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	23
3.1.5.1.	Mittels UV-spektrometrischer Messung.....	23
3.1.5.2.	Mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid.....	23
3.1.6.	Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren	24
3.1.6.1.	Phenolextraktion.....	24
3.1.6.2.	Ethanol-fällung.....	24
3.1.6.3.	Isopropanolfällung	25
3.1.6.4.	Aufreinigung über eine Silica-Matrix.....	25
3.1.7.	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	25

Inhaltsverzeichnis

3.1.8.	Amplifizierung von Deoxynukleinsäuren mit der Polymerase-Kettenreaktion.....	25
3.1.9.	Sequenzanalyse von DNA	27
3.1.9.1.	mit dem Sequenase 2.0 Sequencing Kit	27
3.1.9.2.	mit dem ABI Prism BigDye Kit.....	27
3.1.10.	Deoxyoligonukleotid-gerichtete Mutagenese von DNA mittels PCR.....	28
3.1.10.1.	nach der QuikChange Prozedur (Stratagene).....	29
3.1.10.2.	mittels inverser PCR.....	29
3.2.	DNA Klonierung	30
3.2.1.	Präparation von Vektoren aus Plasmid DNA	30
3.2.1.1.	Direkter Einbau von PCR Fragmenten mit glatten Enden.....	30
3.2.1.2.	Gerichteter Einbau von DNA Fragmenten.....	31
3.2.2.	Ligation von DNA Fragmenten	31
3.2.3.	Transformation von Ligationsansätzen	31
3.2.3.1.	Herstellung elektrokompeter Bakterien	31
3.2.3.2.	Transformation elektrokompeter Bakterien	31
3.2.4.	Selektion von nicht-rekombinanter Plasmid DNA	32
3.2.4.1.	durch α -Komplementierung	32
3.2.4.2.	durch Restriktionsspaltung	32
3.2.5.	Aufreinigung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	32
3.2.5.1.	im analytischen Maßstab.....	33
3.2.5.2.	im präparativen Maßstab.....	33
3.2.6.	Amplifikation und Aufreinigung von λ DNA aus Bakteriophagen	33
3.3.	<i>In vitro</i> Transkription von tRNAs	34
3.3.1.	Transkription von pflanzlichen transfer Ribonukleinsäuren im HeLa Kernextrakt....	35
3.3.2.	Transkription von pflanzlichen transfer Ribonukleinsäuren mit der T7 RNA Polymerase.....	36
3.4.	<i>In vitro</i> Prozessierung von pre-tRNAs.....	37
3.4.1.	tRNA Spleißendonuklease-Nachweis	37
3.4.2.	tRNA Ligase-Nachweis.....	38
3.4.3.	Adenylyltransferase-Nachweis	38
3.5.	Analyse von pre-tRNAs	39
3.5.1.	Primer Extension Analyse	39
3.5.2.	Spezifische Hydrolyse von RNA mit Ribonukleasen.....	40
3.5.3.	Analyse der RNA Hydrolyseprodukte über Cellulose Dünnschicht-Chromatographie	40
3.6.	Charakterisierung von Proteinen	41
3.6.1.	Allgemeine Handhabung von Proteinen.....	41
3.6.1.1.	Dialyse.....	41
3.6.1.2.	Ultrafiltration	41
3.6.1.2.	Entsalzung mit Sephadex G25.....	41
3.6.1.3.	Präzipitation unter denaturierenden Bedingungen.....	42
3.6.2.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese.....	42
3.6.3.	Präparation von Proteinextrakten.....	47
3.6.4.	Allgemeine Handhabung von Enzympräparationen.....	48
3.6.5.	Chromatographische Enzymaufreinigung	48
3.6.6.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	53
3.7.	Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen.....	54
3.7.1.	Überexpression in dem <i>E. coli</i> RTS 100 Lysat.....	55
3.7.2.	Überexpression in dem Weizenkeim RTS 100 CECF Lysat.....	55
3.7.3.	Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit dem Histidin-Tag über Ni-NTA Agarose	55
3.8.	Datenbank-basierende Sequenzanalysen	56
3.8.1.	BLAST-basierende Sequenzhomologie-Suchen.....	56

3.8.2.	Alignment multipler Sequenzen.....	56
3.8.3.	Sequenzmotiv-Suche	57
3.8.4.	Computer-unterstützte Sequenzanalyse	57
4.	Ergebnisse	58
4.1.	Etablierung der Enzymnachweismethoden.....	58
4.1.1.	Synthese von tRNA Substraten für die Spleißreaktion	58
4.1.2.	Synthese von tRNA Hälften für den Ligase-Aktivitätsnachweis	60
4.1.3.	Rekombinante Expression und Aufreinigung der tRNA Ligase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
4.1.4.	Ligation von tRNA Hälften mit der Hefe tRNA Ligase	65
4.2.	Charakterisierung und Anreicherung der pflanzlichen tRNA Endonuklease	67
4.2.1.	Unterscheidung zwischen enzymatischer und autolytischer Spaltung von pre-tRNA	67
4.2.2.	Anreicherung der pflanzlichen tRNA Endonuklease Aktivität.....	69
4.2.3.	Immunologische Kreuzreaktion von Anti-AtSen Antikörpern mit pflanzlichen Proteinextrakten	73
4.3.	Charakterisierung der pflanzlichen tRNA Ligase	75
4.3.1.	Literaturrecherche für die Aufreinigung von RNA Ligasen.....	75
4.3.2.	Chromatographische Aufreinigung der tRNA Ligase aus Weizenkeimen.....	76
4.3.3.	Massenspektrometrische Proteinsequenzierung der 125 kDa tRNA Ligase	80
4.3.4.	Identifizierung des pflanzlichen tRNA Ligase Gens	81
4.3.5.	Rekombinante Expression der <i>Arabidopsis</i> tRNA Ligase	84
4.3.6.	Analyse der RNA Ligationsreaktion und der Ligationsprodukte.....	88
4.3.7.	Aufreinigung und Identifizierung einer 110 kDa tRNA Ligase aus Weizenkeimen ..	91
4.3.8.	Genannotation der <i>Arabidopsis</i> und der <i>Oryza</i> tRNA Ligase	96
4.3.9.	Lokalisierung der pflanzlichen tRNA Ligase in der Pflanzenzelle	99
4.4.	Charakterisierung der tRNA Ligase aus Säugern	103
4.4.1.	Literaturrecherche zu der Aufreinigung der tRNA Ligase aus Säugern.....	103
4.4.2.	Chromatographische Aufreinigung der tRNA Ligase aus Schweineleber.....	103
4.4.2.	Massenspektrometrische Proteinsequenzierung der tRNA Ligase aus Schweineleber	107
4.4.3.	Analyse der Ligationsprodukte	108
5.	Diskussion.....	110
6.	Zusammenfassung	124
	Summary	127
7.	Literatur	129

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

∞	unendliche Zeit
°C	Grad Celsius
^{32}P	Phosphorisotop mit der Massenzahl 32
A_{260}	Absorption bei der Wellenlänge von 260 nm
AA	Acrylamid
A	Adenosin
ABRC	"Arabidopsis Biological Resource Center" (Ohio State University)
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
BAA	N,N'-Methylen-bisarylamid
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
c	Zenti, 10^{-2}
C	Cytidin
cDNA	komplementäre DNA
CECF	"continuous exchange cell free"; kontinuierlicher Austausch an Puffer bei der zellfreien Proteineexpression
CIP	engl.: calf intestine phosphatase, Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
cpm	Zählwerte pro Minute
CSPD	Dinatrium 3-(4-methylspiro{1,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat
D	Dihydrouridin
Da	Dalton; Massenzahl
DEAE	Diethylaminoethyl
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxynukleinsäure
DNase	Deoxynukleinsäure-hydrolysierendes Enzym
dNTP	2'-Deoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dATP	Deoxyadenosin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	2',3'-Dideoxynukleotid-5'-triphosphat
E	Aktivitäts-Einheit bei Enzymen

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	“expressed sequence tag“ exprimierter Sequenzabschnitt
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f	femto, 10^{-15}
FF	“fast flow“ (Amersham, Freiburg)
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
g	Gramm
G	Guanosin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-hydroxyethyl-piperazin-N´-2-ethansulfonsäure
<i>I</i>	<i>Iso-</i>
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
K	Kilo 10^3
kb	Kilobasenpaare
λ	lambda
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	Milli, 10^{-3}
m	Meter
M	molar
m5C	5-Methylcytidin
MeOH	Methanol
Mg ²⁺	zweifach positiv geladene Magnesiumionen
min	Minute
mol	Stoffmenge
mRNA	(„messenger“) Ribonukleinsäure
n	nano, 10^{-9}
NAD ⁺	
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriaceto
Np	Nukleosid-3´-phosphat
NTP	Nukleosid-5´-triphosphat
OAc	Acetatgruppe
OH	Hydroxylgruppe
ORF	offenes Leseraster
P	Phosphatgruppe
p	pico
Ψ	Pseudouridin
PBE	Plaque bildende Einheit
PCR	Polymerasekettenreaktion

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pN	Nukleosid-5´-monophosphat
PP _i	Pyrophosphat
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PNK	Polynukleotidkinase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Purin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase P	Enzym, das die 5´-Flanke der Vorläufer tRNA endonukleolytisch hydrolysiert
RNase	RNA hydrolysierende Enzyme
RT	Raumtemperatur
RTS	„rapid translation system“ (Roche, Mannheim)
SDS	<i>engl.</i> : sodium dodecylsulfat
T	Ribothymidin
T	Thymidin
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0.1 % Tween 20
TEMED	N,N,N´,N´-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
tRNA _c	Gesamt-tRNA aus Kalbsleber
tRNA ^{XXX}	tRNA mit der Spezifität für die Aminosäure XXX
tRNA _{NNN}	tRNA mit dem Anticodon NNN
tRNase Z	Enzym, das die 3´-Flanke der Vorläufer tRNA enonukleolytisch hydrolysiert
TSR	<i>engl.</i> : template suppression reagent
U	Urindin
ün	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>engl.</i> : volume per volume
Vol	Volumen
W	Watt
WG	Weizenkeim
WK	Weizenkeim
w/v	<i>engl.</i> : weight per volume
XC	Xylencyanol
X-gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
Y	Pyrimidin
μ	mikro, 10 ⁻⁶

1. Einleitung

1.1. Klassifizierung von RNA Spleißen

Viele eukaryontische Gene verfügen über Introns, die auf der Stufe der RNA in einer Spleißreaktion entfernt werden. Dabei existieren bei den Eukaryonten mindestens vier verschiedene Spleißmechanismen. Das mRNA Spleißen wird über das Spleißosom katalysiert und beinhaltet zwei Umesterungsreaktionen. Mechanistisch verwandt findet das Gruppe I und Gruppe II autokatalytische Spleißen statt. Das tRNA Spleißen unterscheidet sich deutlich von den anderen Spleißmechanismen und wird über mindestens zwei Enzyme katalysiert, die jeweils für die Exzision des Introns und die Ligation der tRNA Hälften verantwortlich sind.

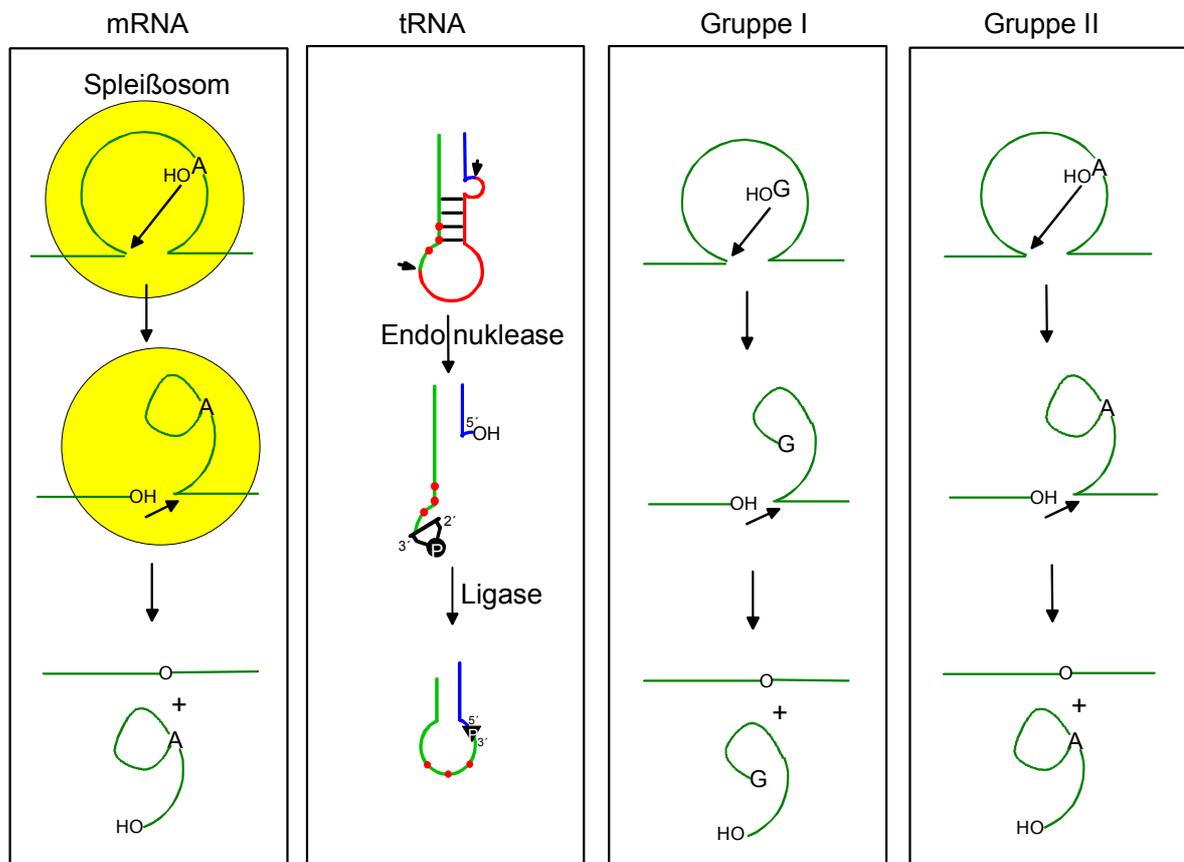


Abbildung 1. RNA Spleißmechanismen

Die vier unterschiedlichen RNA Spleißmechanismen sind schematisch wiedergegeben. Das mRNA Spleißen wird durch das Spleißosom vermittelt und beinhaltet zwei Umesterungsreaktionen. Mechanistisch verwandt findet das Gruppe I und Gruppe II Spleißen statt. Das tRNA Spleißen wird durch mindestens zwei Enzyme katalysiert. Eine Spleißendonuklease hydrolysiert an den Spleißstellen und eine RNA Ligase verknüpft die beiden tRNA Hälften.

1.2. Reifung einer intronhaltigen Vorläufer-tRNA

Eukaryontische tRNA Gene werden von der RNA Polymerase III mit einer 5'- und 3'-Flanke transkribiert und sind noch nicht funktionell. Es müssen eine Reihe von Reifungsprozessen durchlaufen werden, bevor die mature tRNA als Adapter für die Proteinbiosynthese verwendet werden kann.

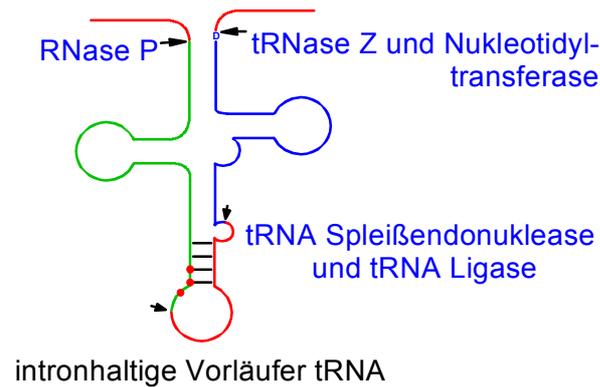


Abbildung 2. Schematische Darstellung einer eukaryontischen intronhaltigen Vorläufer tRNA

Die 5'-Flanke wird über die Riboendonuklease RNase P prozessiert (Altman *et al.*, 1995; Arends und Schön, 1997). Die 3'-Flanke kann sowohl von einer Reihe von Exoribonukleasen wie auch von Endoribonukleasen *in vitro* prozessiert werden (Papadimitriou und Gross, 1996). Es konnte jedoch aufgezeigt werden, dass *in vivo* die 3'-Flanke hauptsächlich durch eine Endoribonuklease hydrolysiert wird (Wolin *et al.*, 1997), die nach Identifizierung des codierenden Gens als tRNase Z bezeichnet wird (Schiffer *et al.*, 2001; Takuku *et al.*, 2003). Die eukaryontischen tRNA Gene codieren nicht für ein CCA-Ende, vielmehr wird von der tRNase Z direkt nach der Diskriminatorbase die 3' Flanke abgeschnitten. Die Nukleotidyltransferase überträgt die Nukleotide CCA an die Diskriminatorbase (Deutscher, 1970).

Eine für tRNA charakteristische Eigenschaft ist die große Anzahl modifizierter Basen, die post-transkriptional aus den Standardbasen erzeugt werden (Björk *et al.*, 1987). In allen tRNAs sind bestimmte Nukleotide konserviert, z.B. das Dihydrouridin (D) in der D-Schleife, oder das Ribothymidin (T) und Pseudouridin (Ψ) in der T Ψ C-Schleife. Manche Nukleotid-verändernden Enzyme benötigen die Anwesenheit eines Introns. Ein Beispiel hierfür ist die Maturation der amber Suppressor-tRNA^{Leu} aus *S. cerevisiae* mit der Bildung von 5-Methylcytidin an Position 34 (m⁵C₃₄). Zudem werden bei intronhaltiger tRNA^{Leu} die beiden Uridine an Position 34 und 36 zu Pseudouridin (Ψ ₃₄N Ψ ₃₆) enzymatisch gebildet (Strobel und Abelson, 1986; Szweykowska-Kulinska *et al.*, 1994). Ebenso benötigt die Pseudouridin-Syntase für die Umsetzung von Uridin an der Position 35 zu Pseudouridin (Ψ ₃₅) eine intronhaltige tRNA^{Tyr}. Diese Basenmodifizierung ist wichtig für die tRNA^{Tyr} Eigenschaft als Suppressor tRNA (Johnson und Abelson, 1983; Choffat *et al.*, 1988; van Tol und Beier, 1988).

1.3. tRNA Spleißen

1.3.1. intronhaltige pre-tRNAs

1.3.1.1. in Eukaryonten

Vertreter intronhaltiger tRNA Gene konnten erstmals in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* aufgefunden werden, die für eine Suppressor tRNA^{Tyr} (Goodman *et al.*, 1977) und für eine tRNA^{Phe} (Valenzuela *et al.*, 1978) codieren. Intronhaltige tRNAs konnten sehr bald in den Pflanzen (Akama *et*

al., 1997) für die tRNA^{Tyr} Genfamilie in *Nicotiana tabacum* (Stange und Beier, 1986; Fuchs *et al.*, 1992), *Arabidopsis thaliana* (Beier *et al.*, 1991), *Triticum aestivum* (Szweykowska-Kulinska und Beier, 1990; Arends *et al.*, 1996), wie auch für die Elongator tRNA^{Met} Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa* und weiteren niederen Eukaryonten der Rot- und Grünalgen (Akama und Kashihara, 1996) nachgewiesen werden. Zudem konnten für Säuger experimentell intronhaltige tRNA^{Tyr} und tRNA^{Leu}_{CAA} Gene aufgezeigt werden (van Tol und Beier, 1988; Green *et al.*, 1990).

Mit der Vielzahl der sequenzierten eukaryontischen Genome findet heutzutage die Annotation der tRNA Gene über den tRNA Scan SE Algorithmus (Lowe und Eddy, 1997) statt und wird in tRNA Datenbanken zusammengefasst (Sprinzl und Vasslenko, 2005). Bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind 275 tRNA Gene annotiert, von denen 59 (21 %) intronhaltig vorliegen. Bei höheren Eukaryonten liegt mit 4 – 13 % ein niedrigerer Anteil intronhaltiger tRNA Gene vor.

Die tRNA Introns sind mit einer Länge von ca. 11 – 60 Nukleotide relativ klein und befinden sich hochkonserviert ein Nukleotid nach dem Anticodon. Die typische Kleeblattstruktur bleibt mit der Anwesenheit des Introns, das 3 - 5 Basenpaare mit der Anticodonscheife eingeht, erhalten. Anhand Strukturuntersuchungen konnte ein Modell für die Tertiärstruktur einer intronhaltigen pre-tRNA aufgestellt werden (Swerdlow und Guthrie, 1984; Lee und Knapp, 1985). Die 5'-Spleißstelle befindet sich meistens in der verlängerten Anticodonschleife, die 3'-Spleißstelle in einer kleinen Schleife von 3 – 5 Nukleotiden Länge. Die Spleißstellen liegen von außen leicht zugänglich exponiert vor (Abbildung 3).

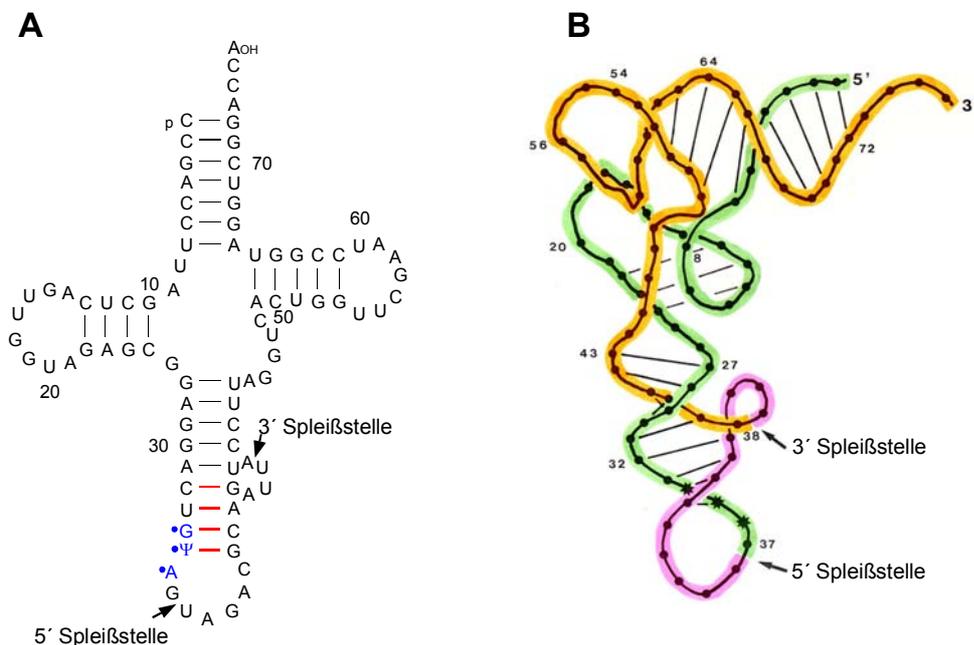


Abbildung 3. Sekundär- und Tertiärstruktur der intronhaltigen pre-tRNA^{Tyr} aus *Arabidopsis thaliana*

(A) Die Sekundärstruktur für die intronhaltige pre-tRNA^{Tyr} AtY3II aus *Arabidopsis thaliana* ist wiedergegeben. Das Anticodon mit dem modifizierten Pseudouridin Ψ ist in blauer Farbe hervorgehoben. Pfeile weisen auf die 5' und 3' Spleißstellen. Das Intron folgt ein Nukleotid nach dem Anticodon. Die Basenpaarungen des Introns mit dem Anticodonstamm sind in rot hervorgehoben.

(B) Semiempirisches Modell der Tertiärstruktur von der intronhaltigen pre-tRNA^{Tyr}. Die 5' tRNA Hälfte ist in grüner Farbe, die 3' tRNA Hälfte in orangener Farbe hinterlegt. Das Intron wird mit violetter Farbe hervorgehoben. Die 5' und 3' Spleißstellen liegen von außen gut zugänglich exponiert vor.

1.3.1.2. in Archaea

In der Klasse von Archaea besitzen eine Vielzahl von tRNA Genen Introns, die weder in der Länge noch in der Position innerhalb der tRNA konserviert sind. Am häufigsten befindet sich das Intron zwischen den Positionen 37/38 und unterbricht somit die tRNA ein Nukleotid nach dem Anticodon. Als charakteristisches Strukturelement konnte das sogenannte "Schleifen – Helix – Schleifen" ("bulge helix bulge") Motiv aufgezeigt werden: Die 5' und 3' Spleißstellen befinden sich jeweils in einer Schleife von 3 nt, die durch einen 4 bp langen helikalen Bereich getrennt vorliegen (Thompson *et al.*, 1989; Marck und Grosjean, 2003).

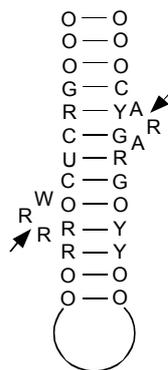


Abbildung 4. Konsensus-Sekundärstruktur des "Schleifen-Helix-Schleifen" Motivs

Die Konsensus-Sekundärstruktur des "Schleifen-Helix-Schleifen" Motivs ist aufgezeigt. Konservierte Basen sind als G, A, U, C abgebildet. Y steht für Pyrimidin-, R für Purinbasen. . Positionen, die stets mit Nucleotiden freier Wahl besetzt sind, sind mit O gekennzeichnet. Bereiche mit variabler Besetzung und Länge werden als Linie aufgezeigt. Pfeile geben die Spleißstellen wieder.

1.3.2. tRNA Spleißmechanismus

Sehr bald nach der Entdeckung der ersten intronhaltigen tRNA Gene ist das Augenmerk auf den Mechanismus zur Entfernung der intervenierenden Sequenz gelegt worden. Intronhaltige pre-tRNAs konnten anfänglich *in vivo* aus der Hefe *rna1-1* Mutante (Hopper *et al.*, 1978) gewonnen und für *in vitro* Spleißexperimente verwendet werden (Knapp *et al.*, 1978). Später konnten Substrate für die Hefe tRNA Endonuklease mittels der T7 RNA Polymerase synthetisiert werden. Die Substrate für die pflanzliche tRNA Endonuklease wurden im heterologen HeLa Kernextrakt (van Tol *et al.*, 1987), bzw. im homologen *Nicotiana* BY-2 Kernextrakt (Yukawa *et al.*, 2001) synthetisiert. Der tRNA Spleißmechanismus ist in der Hefe am besten untersucht. Für die Pflanzen konnte gezeigt werden, dass der gleiche Spleißmechanismus wie bei der Hefe anzutreffen ist.

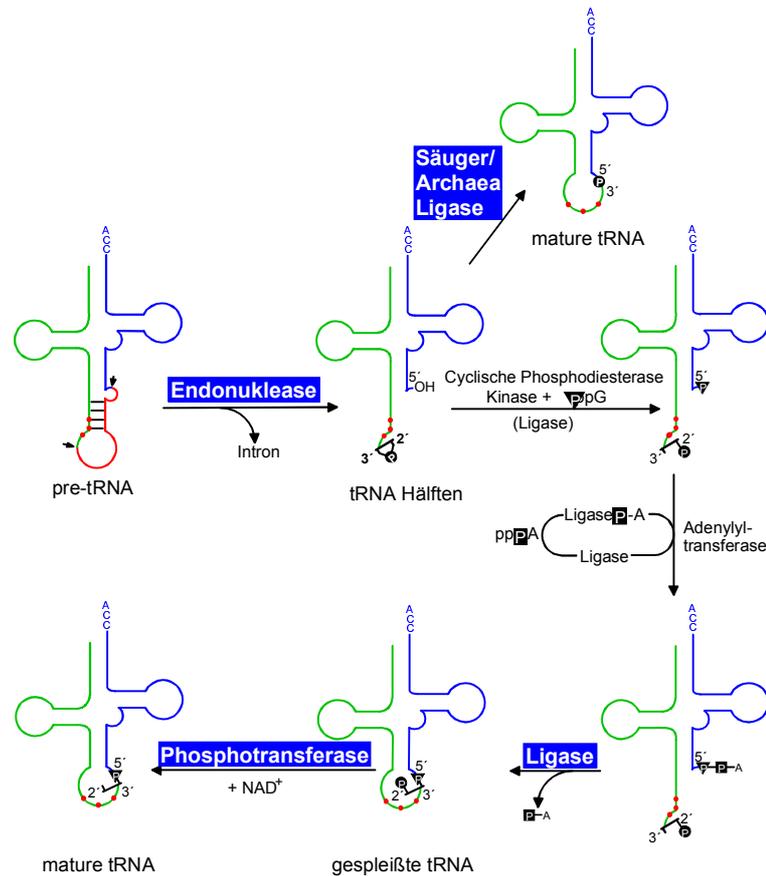


Abbildung 5. Spleißmechanismen bei der Hefe, Pflanze, sowie bei Säugern und Archaea

Eine intronhaltige pre-tRNA wird in einer ATP-unabhängigen Reaktion von einer tRNA Spleißendonuklease zu tRNA Hälften hydrolysiert. Die 5'-Spleißstelle befindet sich stets an Position 37 ein Nucleotid nach dem Anticodon und liegt in der Anticodonschleife. Die 3'-Spleißstelle befindet sich stets in einer Schleife von 3 – 5 Nucleotiden. Bei der Hefe und bei Pflanzen werden in einer komplexen Reaktionsfolge die tRNA Hälften durch die tRNA Ligase erst modifiziert und dann ligiert. Letztlich wird das verbliebene 2'-Phosphat durch eine Phosphotransferase auf NAD⁺ übertragen. Bei den Säugern und bei Archaea werden die tRNA Hälften mit dem 2',3'-Cyclophosphat und mit einer 5'-Hydroxylgruppe direkt ligiert. Dabei wird das Cyclophosphat in die neue 3',5'-Phosphodiesterbindung eingebaut.

Im ersten Schritt hydrolysiert eine membran-assoziierte tRNA Spleißendonuklease die intronhaltige pre-tRNA an der 5' und 3' Spleißstelle unter Ausbildung eines 2',3'-Cyclophosphats und einer 5'-Hydroxylgruppe (Peebles *et al.*, 1983; Thompson *et al.*, 1989). Das Intron wird dabei als lineares Molekül mit einem 2',3'-Cyclophosphat und einer 5'-Hydroxylgruppe freigesetzt.

Im zweiten Schritt verknüpft eine ATP-abhängige tRNA Ligase die beiden tRNA Hälften in einer komplexen Reaktionsfolge. Eine cyclische Phosphodiesteraseaktivität öffnet das 2',3'-Cyclophosphat zu einem 2'-Phosphat und einer 3'-Hydroxylgruppe. Die Polynucleotidkinaseaktivität phosphoryliert die 5'-Hydroxylgruppe zu einem 5'-Phosphat. Die tRNA Ligase reagiert mit ATP unter Bindung von AMP an die konservierte Lysinseitengruppe des Lig I Motivs (Abbildung 34) und überträgt sodann das AMP an das 5'-Phosphat unter Bildung einer 5'-5'-Phosphoanhydridbindung. Letztlich ermöglicht die tRNA Ligase den nukleophilen Angriff der 3'-Hydroxylgruppe an den 5'-aktivierten Terminus unter Ausbildung einer 2'-Phosphat,3',5'-Phosphodiesterbindung. Im dritten Schritt wird das 2'-Phosphat durch eine Phosphotransferase auf NAD⁺ unter Bildung von ADP-Ribose-1',2'-Cyclophosphat übertragen.

Bei den Säugern und bei Archaea ist vorwiegend ein anderer Ligationsmechanismus anzutreffen. Hier wird ausgehend von dem 2',3'-Cyclophosphat und von der 5'-Hydroxylgruppe eine neue 3',5'-

Phosphodiesterbindung unter Einbau des ursprünglichen Cyclophosphats gebildet (Laski *et al.*, 1983; Kjems und Garrett, 1988). Jedoch konnte für die Säuger gezeigt werden, dass ein gleicher Ligationsweg wie bei den Hefen und Pflanzen ebenfalls vorhanden ist (Zillman, 1991).

1.3.3. Eukaryontische tRNA Spleißendonuklease

Die tRNA Spleißendonuklease konnte zuerst in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* charakterisiert werden (Peebles *et al.*, 1983). Die tRNA Spleißendonuklease liegt in einer Hefe-Zelle nur in 100 facher Kopienzahl und zudem als integrales Membranprotein vor. In einer aufwendigen Aufreinigungsprozedur ausgehend von einer Hefe Membran Präparation wurde die Aktivität mit der Zugabe von Triton X-100 solubilisiert und mit einer 5000-fachen Anreicherung über sechs Chromatographiesäulen bis zur Homogenität aufgereinigt (Rauhut *et al.*, 1990). Nach einer anfänglichen Identifizierung von 3 Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 54 kD, 44 kD und 34 kD, konnte mit einer vereinfachten Aufreinigungsprozedur die vierte 15 kD Untereinheit aufgezeigt und die korrespondierenden Gene Sen54, Sen44, Sen34 und Sen15 identifiziert werden (Trotta *et al.*, 1997). Sen44 und Sen34 weisen zueinander einen homologen Bereich über 130 Aminosäuren auf und verfügen über die aktiven Zentren für die Hydrolyse an der 5' und 3' Spleißstelle. Bei der Untersuchung einer Genbank aus Hefe konnte eine temperatur-sensitive Mutante aufgefunden werden, bei der sich 2/3 tRNA Moleküle ohne hydrolysierte 5' Spleißstelle anreicherten. Das verantwortliche Gen Sen2 wurde mittels Komplementation kloniert, und Antikörper gegen das rekombinante Sen2 Protein erkannten die 44 kD Untereinheit (Winey und Culbertson, 1988). Bei "Zwei Hybrid" (yeast two hybrid) Analysen wurde eine starke Wechselwirkung zwischen Sen44 und Sen54, sowie zwischen Sen34 und Sen15 nachgewiesen. Zusammen mit den Kristallstrukturdaten für die *Methanocaldococcus* tRNA Endonuklease wurde ein mögliches Strukturmodell vorgeschlagen (Li *et al.*, 1998; Abbildung 6).

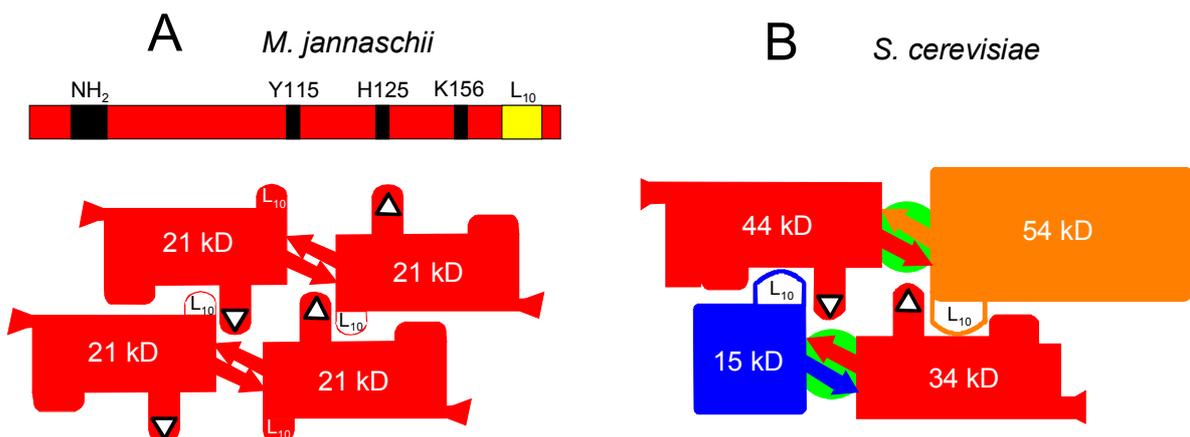


Abbildung 6. Modell der tRNA Spleißendonukleasen von *M. jannaschii* und *S. cerevisiae*

(A) Der schematische Aufbau der *Methanocaldococcus* tRNA Spleißendonuklease, die aus vier identischen Untereinheiten mit einer Größe von 21 kDa aufgebaut ist. Aminosäuren, die für die katalytische Aktivität am aktiven Zentrum wichtig sind, wurden in der eindimensionalen Darstellung explizit aufgeführt und bilden die sog. katalytische Triade. Die jeweiligen carboxyterminalen β -Faltblattstrukturen sind als Pfeile wiedergegeben. Die Schleife L10 ist explizit aufgeführt. In der schematischen Darstellung wird die katalytische Triade als gleichseitiges Dreieck aufgezeigt.

(B) Der schematische Aufbau der tRNA Spleißendonuklease aus *S. cerevisiae* mit den vier unterschiedlichen Untereinheiten ist wiedergegeben. Pfeile geben die β -Faltblatt analogen carboxyterminalen Bereiche wieder, mit Dreiecken sind die aktiven Zentren mit der Triade aufgezeigt.

Der Aufbau des tRNA Spleißendonuklease-Komplexes erfolgt zuerst über die Wechselwirkung der β -analogen carboxyterminalen Bereiche zwischen Sen44 – Sen54 und Sen34 – Sen15. Anschließend geht die L10 Schleife mit den sauren Aminosäuren eine Wechselwirkung mit der gegenüberliegenden Mulde ein, so dass die tetramere Struktur resultiert.

Über Datenbanksuche konnte ein zu Hefe Sen44/Sen34 homologes Protein im annotierten Kerngenom des Menschen aufgefunden werden, das für eine tandem-affinitätschromatographische Aufreinigung der aktiven humanen tRNA Spleißendonuklease verwendet wurde. Der humane tRNA Spleißkomplex besteht ebenfalls aus vier Untereinheiten, die in Analogie zu den Hefe Proteinen mit HsSen54, HsSen2, HsSen34 und HsSen15 annotiert wurden (Paushkin *et al.*, 2004).

Die eukaryontische tRNA Endonuklease erkennt ihre Substrate hauptsächlich über Erkennungsmerkmale innerhalb der maturen Domäne der tRNA. Weder die Sequenz nahe den Spleißstellen ist konserviert, noch verfügt das Intron über Strukturmerkmale (Johnson *et al.*, 1980; Strobel und Abelson, 1986; Reyes und Abelson, 1988). Aufgrund der Diversität der zu spleißenden intronhaltigen pre-tRNAs wurde vorgeschlagen, dass die Spleißendonuklease vorwiegend Erkennungsmerkmale in der maturen Domäne erkennt und vermutlich über die Sen54 Untereinheit (Trotta *et al.*, 1997) die Länge von Fixpunkten der maturen Domäne hin zu den Spleißstellen misst und so die richtige Positionierung der beiden katalytisch aktiven Untereinheiten Sen44 und Sen34 für die Hydrolyse an den 5'- und 3'-Spleißstellen vorgibt. Wird zum Beispiel ein weiteres Basenpaar in den Anticodonstamm eingefügt, so schneidet die Hefe tRNA Endonuklease je um 1 Nukleotid versetzt und es wird ein um 2 Basen verlängertes Intron freigestetzt (Greer *et al.*, 1987; Reyes und Abelson, 1988; Mattoccia *et al.*, 1988).

Lediglich für die *Xenopus* tRNA Endonuklease konnte ein konserviertes A-I Basenpaar innerhalb des Introns als Voraussetzung für die Hydrolyse an der 3' Spleißstelle aufgezeigt werden (Willis *et al.*, 1992; Baldi *et al.*, 1992). Für die *Xenopus* tRNA Endonuklease kann sogar eine enzymatische Umsetzung ohne die Anwesenheit der maturen tRNA nachgewiesen werden, wenn sich die Spleißstellen innerhalb des "bulge-helix-bulge" Motivs befinden (Fruscoloni *et al.*, 2001), so dass eine mögliche Schlussfolgerung in der teilweisen Konservierung des archealen "bulge-helix-bulge" Motivs innerhalb der eukaryontischen pre-tRNAs liegt (Segni *et al.*, 2005).

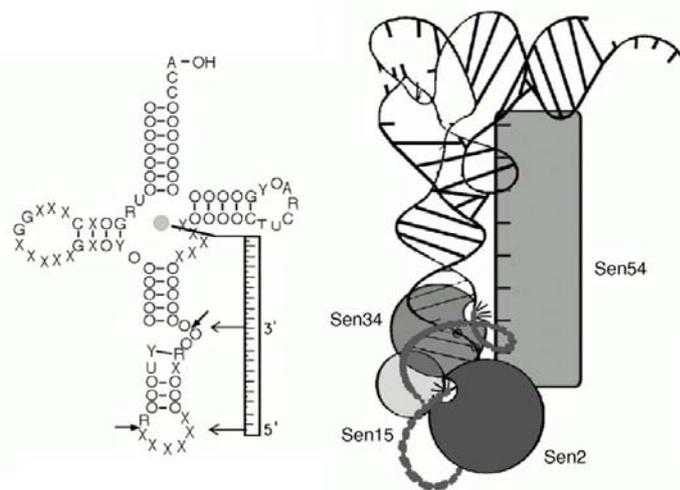


Abbildung 7. Modell der Hefe tRNA Spleißendonuklease gebunden an eine intronhaltige pre-tRNA

(A) Die Konsensus Sekundärstruktur der intronhaltigen pre-tRNA aus Hefe ist aufgezeigt, sowie der Längenmechanismus für die Hydrolyse an der 5'- und der 3'-Spleißstelle.

(B) Die Tertiärstruktur einer intronhaltigen pre-tRNA mit dem tRNA Spleißendonuklease-Komplex ist schematisch wiedergegeben. Die Sen54 Untereinheit geht nach diesem Modell über basische Aminosäuren eine Wechselwirkung mit der maturaen Domäne der tRNA ein und positioniert die katalytisch aktiven Untereinheiten Sen44 und Sen34 für die Hydrolyse an den 5'- und 3'-Spleißstellen (aus Li *et al.*, 1998).

Bei der eukarontischen tRNA Spleißendonuklease scheint der Mechanismus der Substraterkennung konserviert zu sein, da die Endonuklease aus Hefe, *Xenopus* und HeLa in der Lage ist, zahlreiche heterologe intronhaltige pre-tRNAs zu hydrolysieren. Die pflanzliche tRNA Spleißendonuklease jedoch weist eine hohe Spezifität für pflanzliche intronhaltige pre-tRNAs auf (Stange *et al.*, 1992).

1.3.4. Archaea tRNA Spleißendonuklease

B.P. Kaine fand bereits 1983 die ersten intronhaltigen tRNA Gene in dem Archeon *Sulfolobus solfataricus*, und die tRNA Spleißendonuklease Aktivität in Archaea konnte sehr bald nachgewiesen werden (Kjems und Garrett, 1988; Thompson und Daniels, 1988; Thompson *et al.*, 1989). Die Aufreinigung und Identifizierung der Spleißendonuklease aus *Haloferax volcanii* erwies sich als langwierig und schwierig und gelang mit der Kombination aus säulenchromatographischer und nativer gelelektrophoretischer Trennung durch die Proteinsequenzierung eines 37 kDa Proteins (Kleyman-Leyer *et al.*, 1997). Alle weiteren Untersuchungen wurden mit den rekombinanten Proteinen durchgeführt. Die tRNA Endonuklease aus *Haloferax volcanii* besteht aus einem Homodimer, wobei die Untereinheit aus der Duplizierung eines 130 Aminosäuren Sequenzmotivs entstanden ist, so dass eine pseudo-tetramere Struktur postuliert wurde, die für das homologe Enzym aus *Archaeoglobus fulgidus* durch Röntgenstrukturanalyse bestätigt worden ist (Li und Abelson, 2000). Die tRNA Spleißendonuklease aus *Methanocaldococcus jannaschii* besteht aus einem Homotetramer (Abbildung 6), wie durch "Crosslink"-Analyse, Gelfiltration und Röntgenstrukturanalyse (Abbildung 8) experimentell ermittelt wurde (Lykke-Andersen and Garrett, 1997; Li *et al.*, 1998).

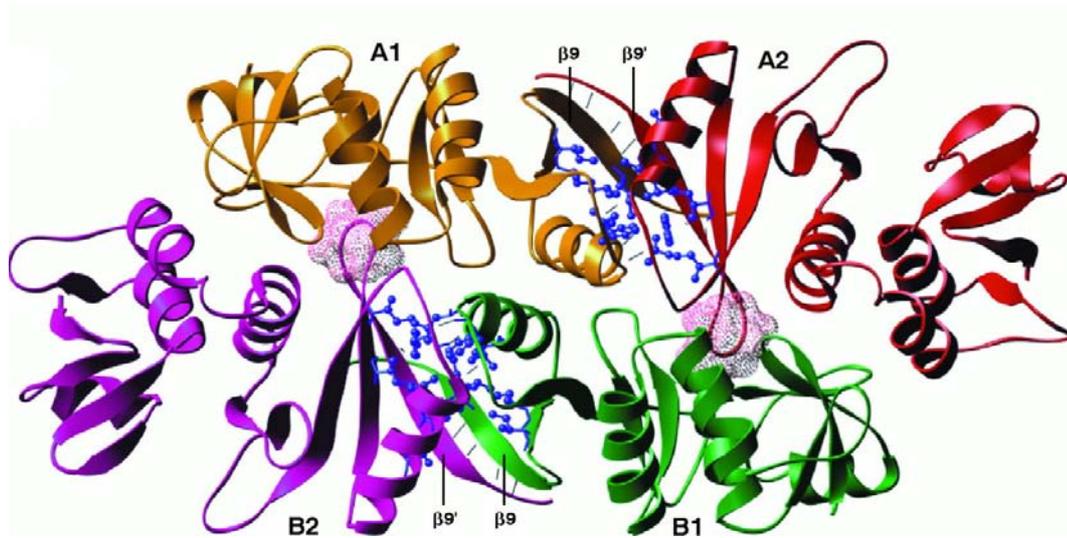


Abbildung 8. Schematische Darstellung der tetrameren Spleißendonuklease aus *Methanocaldococcus jannaschii*

Der Aufbau des Spleißkomplexes aus den vier Untereinheiten findet schrittweise statt. Zuerst interagieren zwei Untereinheiten (A1 und A2, bzw. B1 und B2) über das carboxyterminale β_9 -Faltblatt unter Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen. Je zwei der Dimere (A1/A2 und B1/B2) lagern sich hauptsächlich über polare Wechselwirkungen der sauren L10 Scheife mit einer Nische (Bereiche sind in obiger Darstellung violett gepunktet) in der gegenüberliegenden Untereinheit zusammen. Die an der Ausbildung der katalytischen Triade beteiligten Aminosäuren sind in blau wiedergegeben (aus Abelson *et al.*, 1998)

1.3.5. Eukaryontische RNA Ligasen

Eine eukaryontische RNA Ligase Aktivität konnte erstmals von Konarska *et al.* (1981) nachgewiesen werden. Das verwendete Substrat – das Ω -Fragment – wird aus der TMV RNA durch RNase T1 Hydrolyse gebildet und weist eine 5'-Hydroxylgruppe und ein 2',3'-Cyclophosphat auf. Bei der Inkubation des Ω -Fragments mit einem Translationsweizenkeimextrakt wird das Substrat zirkularisiert und weist in einem Polyacrylamidgel ein unterschiedliches Laufverhalten auf. Interessanterweise konnte die neu gebildete Phosphodiesterbindung nicht mehr mit RNase T1 hydrolysiert werden. Der Grund hierfür liegt in der Ausbildung einer 2'-Phosphomonoester-3',5'-Phosphodiesterbindung, wie durch dünnschichtchromatographische Analyse der RNase T2 und RNase P1 Hydrolysate nachgewiesen wurde (Konarska *et al.*, 1982).

Ebenfalls wurde in der Hefe und in *Xenopus* ein Mechanismus der Exzision und Religation für das tRNA Spleißen sehr bald postuliert, und beide Prozesse ließen sich über die Abwesenheit, bzw. Anwesenheit von ATP voneinander trennen (Peebles *et al.*, 1979; Nishikura und De Robertis, 1981). Die Zuordnung einer unabhängigen tRNA Ligase-Aktivität konnte über chromatographische Anreicherung für die Hefe (Greer *et al.*, 1983) und für die HeLa RNA Ligase (Filipowicz *et al.*, 1983; Laski *et al.*, 1983) rasch erfolgen. Ebenfalls konnte die Weizen RNA Ligaseaktivität sehr bald nach der Entdeckung (Konarska *et al.*, 1981) chromatographisch angereichert werden (Furneaux *et al.*, 1983; Gegenheimer *et al.*, 1983). Aufgrund der breiten Substratspezifität wurden zum einen artifizielle Substrate (Konarska *et al.*, 1981, 1982; Furneaux *et al.*, 1983; Pick und Hurwitz, 1986; Pick *et al.*, 1990) und zum anderen tRNA Hälften verwendet (Gegenheimer *et al.*, 1983; Schwartz *et al.*, 1983), die durch die Hydrolyse einer Hefe pre-tRNA mit einer stark angereicherten Hefe tRNA Endonukleasefraktion gewonnen wurden (Peebles *et al.*, 1979).

1.3.5.1. Hefe tRNA Ligase

Die Hefe tRNA Ligase ist in der Arbeitsgruppe von Prof. Abelson über fünf chromatographische Stufen bis zur Homogenität aufgereinigt worden und konnte aminoterminal ansequenziert werden. Über Hybridisierungsexperimente mit DNA-Sonden, die von der aminoterminalen Sequenz abgeleitet wurden, konnte der genomische Abschnitt für die Hefe tRNA Ligase identifiziert werden. (Phizicky *et al.*, 1986). Die Klonierung und Sequenzierung dieses genomischen Abschnitts ermöglichte die Ermittlung des offenen Leserasters der Hefe tRNA Ligase (Westaway *et al.*, 1988).

Die Hefe tRNA Ligase wurde rekombinant in *E. coli* überexprimiert und für erfolgreiche Ligaseaktivitätsnachweise verwendet. Das monomere Protein mit einer Größe von 95 kDa verfügt über drei enzymatische Aktivitäten, die allesamt für die Ligation von tRNA-Hälften erforderlich sind. Eine zyklische Phosphodiesterase öffnet das 2',3'-Cyclophosphat unter Ausbildung eines 2'-Phosphats. Die 5'-Hydroxylgruppe wird über einer Polynukleotidkinase bevorzugt von GTP phosphoryliert (Belford *et al.*, 1993). Die RNA Ligase-Domäne überträgt AMP auf das 5'-Phosphat unter Ausbildung einer 5',5'-Phosphoanhydridbindung und ermöglicht der mittlerweile freien 3'-Hydroxylgruppe den nukleophilen Angriff auf den aktivierten 5'-Terminus. Mit der Freisetzung von AMP wird eine 2'-Phosphat,3',5'-Phosphodiesterbindung gebildet. Diese so gespleißte tRNA ist jedoch noch nicht funktionell und das 2'-Phosphat wird von einer 2'-Phosphotransferase auf NAD⁺ unter Ausbildung von ADP-Ribose-1',2'-Cyclophosphat übertragen (McCraith und Phizicky, 1990; 1991; Culver *et al.*, 1997).

Die Hefe tRNA Ligase liegt in der Zelle als lösliches Protein in einer Kopienzahl von ca. 400 vor (Phizicky *et al.*, 1986). Die Inaktivierung des tRNA Ligasegens, das in nur einer Kopienzahl pro haploidem Genom vorliegt, ist für die Hefezelle letal. Es konnte aufgezeigt werden, dass ein Mangel an tRNA Ligase mit einer Anhäufung von tRNA-Hälften korreliert (Phizicky *et al.*, 1992). Komplementationsstudien mit tRNA Ligase-defizienten Hefezellen und einer Genbank aus *Candida albicans* führte zur Identifizierung eines neuen tRNA Ligasegens aus *Candida albicans* (Baymiller *et al.*, 1994). Zudem konnten Ligase-defiziente Hefezellen erfolgreich mit den beiden Enzymen T4 Polynukleotidkinase und T4 RNA Ligase 1 komplementiert werden (Schwer *et al.*, 2004).

Die Hefe tRNA-Ligase zeigt eine hohe Bindungsaffinität zu pre-tRNA Hälften auf, die 10⁴-fach effizienter ligiert werden als artifizielle Substrate und lineare Introns (Apostol und Greer, 1991). Erstaunlicherweise verfügt die Hefe tRNA Ligase ebenfalls über eine hohe Bindungsaffinität zu intronhaltigen pre-tRNAs, wobei Kontakte sowohl über die Domäne der maturen tRNA als auch über die 3'-Spleißstelle wichtig sind. Obwohl die Hefe tRNA Spleißendonuklease und die Hefe tRNA Ligase jeweils *in vitro* getrennt ihre enzymatische Aktivität aufzeigen können, gibt es Anzeichen für einen Spleißkomplex. So konnte die Hefe tRNA Spleißendonuklease-Aktivität durch die Zugabe von aktiver Hefe tRNA Ligase deutlich gesteigert werden (Culbertson und Winey, 1989). Bei den Competitionsexperimenten mit der Hefe tRNA Endonuklease, der Hefe tRNA Ligase und der Mischung von T4 Polynukleotidkinase und T4 RNA Ligase werden die *in situ* erzeugten tRNA Hälften vorwiegend von der Hefe tRNA Ligase ligiert (Greer, 1986). Dieser Befund legt nahe, dass die Hefe tRNA Spleißendonuklease und die Hefe tRNA Ligase kooperativ arbeiten und keine freien tRNA Hälften für die Bakteriophagen Enzyme zugänglich sind.

1.3.5.2. Pflanzliche tRNA Ligase

Die tRNA Ligaseaktivität aus Weizenkeimen konnte sehr bald chromatographisch angereichert werden (Furneaux *et al.*, 1983; Gegenheimer *et al.*, 1983). Mit der Ligaseaktivität korrelieren während der gesamten Aufreinigungsprozedur über 8 chromatographische Stufen eine zyklische Phosphodiesterase-, Polynukleotidkinase- und Adenylyltransferase-Aktivität. Bei der analytischen Auftrennung einer stark angereicherten Ligasepräparation im Glycerolgradienten sedimentiert die Ligase-, Cyclische Phosphodiesterase- und Polynukleotidkinaseaktivität mit 6.2 S und korreliert mit einem adenylierbaren Proteindublett von 110 kDa in einem Silber-gefärbten Proteingel (Pick und Hurwitz, 1986; Pick *et al.*, 1986b; 1990). Über die partielle Hydrolyse mit der Carboxypeptidase Y wird von den beiden adenylierbaren Proteinen jeweils ein gleiches Proteinfragment gebildet, das über keine Kinaseaktivität, jedoch weiterhin über Ligaseaktivität verfügt. Die Vermutung liegt nahe, dass die beiden adenylierbaren 110 kDa Proteine nahezu identisch sind (Pick *et al.*, 1986). Zudem kann man annehmen, dass die pflanzliche tRNA Ligase wie das Hefeenzym domänenartig aufgebaut ist (Pick *et al.*, 1986).

In einem ersten Schritt wird das Cyclophosphat zu einem 2'-Phosphat geöffnet. Diese Ringöffnung findet selbst in Abwesenheit von ATP statt, wird jedoch in der Anwesenheit eines geeigneten 5'-Hydroxyldonors stimuliert. Diese Reaktion ist mit keinem weiteren Reaktionsschritt gekoppelt, da 2'-Monoestersubstrate genauso effizient wie 2',3'-Cyclophosphatsubstrate von der pflanzlichen tRNA Ligase verknüpft werden. Im zweiten Schritt wird der 5'-Donor über die Polynukleotidkinaseaktivität phosphoryliert. Zwar findet in Abwesenheit eines Substrates eine leichte Hydrolyse von ATP zu ADP statt, jedoch wird die Polynukleotidkinaseaktivität deutlich mit der Zugabe von RNA mit 5'-Hydroxylgruppen stimuliert (Pick und Hurwitz, 1986). Inwieweit die pflanzliche tRNA Ligase die gleiche Präferenz wie die Hefe tRNA Ligase für GTP aufweist (Belford *et al.*, 1993), ist noch nicht geklärt. Die Adenylylierung der pflanzlichen tRNA Ligase findet nur in Anwesenheit von RNA Substraten statt (Pick und Hurwitz, 1986), ganz im Gegensatz zu der Hefe tRNA Ligase, die selbst in Abwesenheit eines Substrates adenylyliert werden kann (Greer *et al.*, 1983).

1.3.5.3. Säuger tRNA Ligase

Während der Ligationmechanismus zwischen Hefen und Pflanzen konserviert ist, findet bei Säugern die Verknüpfung der tRNA Hälften direkt über eine 3',5'-Phosphodiesterbindung in einer ATP-abhängigen Reaktion statt (Filipowicz und Shatkin, 1983, Filipowicz *et al.*, 1983). Das Phosphat der neuen Bindung entstammt hierbei aus dem 2',3'-Cyclophosphat, das eine Voraussetzung für die Ligation an eine 5'-Hydroxylgruppe darstellt. Die Säuger tRNA Ligase weist wie die Weizen tRNA Ligase ein großes Substratspektrum auf und ist in der Lage neben tRNA Hälften noch Virusoid RNA und Oligoribonukleotide zu verknüpfen. Die Säuger tRNA Ligase benötigt für die Ligation Energie in Form von ATP oder dATP und wird von einer hohen Konzentration an Pyrophosphat PP_i gehemmt. Die Ligaseaktivität aus HeLa Zellen erwies sich als relativ instabil und eine chromatographische Anreicherung der Aktivität konnte nur sehr eingeschränkt erfolgen. Dabei konnte das native Molekulargewicht über Sedimentation im Glycerolgradient (Perkins *et al.*, 1985) zu 160 kDa abgeschätzt werden.

1.3.6. Archaea tRNA Ligase

Bei dem RNA Spleißen von intronhaltiger ribosomaler und transfer RNA durch die Archaea Endonuklease entstehen Exongrenzen mit einem 2',3'-Cyclophosphat und einer 5'-Hydroxylgruppe, die über eine Ligaseaktivität (Kjems und Garret, 1988) unter Ausbildung einer 3',5'-Phosphodiesterbindung (Zofalova *et al.*, 2000) verknüpft werden. Das Phosphat der neuen Phosphodiesterbindung entstammt vermutlich aus dem 2',3'-Cyclophosphat, da in Anwesenheit von γ -³²P]GTP oder ATP keine Radioaktivität in die verknüpfte RNA eingebaut wird (Kjems und Garret, 1988). Ob überhaupt Energie in Form von ATP oder GTP für die Ligationsreaktion benötigt wird, konnte bisher noch nicht mit Sicherheit ermittelt werden (Gomes und Gupta, 1997). Interessanterweise konnten in den sequenzierten Archaea Genomen Proteine mit hoher Homologie zu der T4 RNA Ligase 1 und 2 (Ho und Shuman, 2003), sowie zu den bakteriellen RNA Ligasen (Arn und Abelson, 1996) aufgezeigt werden, die ein 2',3'-Cyclophosphat mit einer 5'-Hydroxylgruppe zu einer 2',5'-Phosphodiesterbindung verknüpfen. Die Identifizierung der Archaea Spleiß RNA Ligase steht jedoch noch aus.

1.3.7. Bakteriophagen RNA Ligasen

Die T4 RNA Ligase – der erste Vertreter der Enzymklasse der RNA Ligasen – konnte über die enzymatische Aktivität der Zirkularisierung von Poly-A mit 5'-[³²P]- und 3'-Hydroxyl-Enden nachgewiesen werden (Silber *et al.*, 1972). Als Ligationsprodukt ist eine 3'-5'-Phosphodiesterbindung unter Einbau des terminalen 5'-[³²P]-Phosphats entstanden. Die T4 RNA Ligase konnte sehr rasch aus mit T4 Phagen Partikel infizierten *E. coli* Bakterien chromatographisch aufgereinigt und charakterisiert werden (Silber *et al.*, 1972). Eine physiologische Rolle der T4 RNA Ligase konnte zusammen mit der T4 Polynukleotid Kinase aufgezeigt werden. In dem *E. coli* Stamm CTr5x wird mit der T4 Infektion eine Anticodon-Nuklease freigesetzt, die tRNA^{Lys} an der "Wooble" Position zu einem 2',3'-Cyclophosphat und einer 5'-Hydroxylgruppe hydrolysiert und so über den Suizidmechanismus eine weitere Ausbreitung der Phagen-Partikel zu unterdrücken versucht (Amitsur *et al.*, 1987; Kaufmann, 2000). In einem Zweistufenmechanismus werden die Enden zuerst von der Polynukleotidkinase/3'-phosphatase zu einer 2',3'-Hydroxylgruppe umgewandelt (Cameron und Uhlenbeck, 1977) und mit ATP zu einem 5'-Phosphat phosphoryliert. Diese Enden stellen sodann das Substrat für die T4 RNA Ligase dar, und die tRNA^{Lys} wird über die Ligation wieder funktionell. Kürzlich konnte die Röntgenkristallstruktur der T4 Polynukleotidkinase ermittelt werden (Gaburt *et al.*, 2002). Dabei konnte die konservierte P-Schleife als aktives Zentrum bestätigt werden.

In einer relativ neuen Arbeit konnten Ho und Shuman (2002) eine zweite RNA Ligase im T4 Phagengenom über Datenbanksuche auffinden und die enzymatische Aktivität des rekombinanten Proteins charakterisieren (Yin *et al.*, 2003). Interessanterweise weist die Proteinsequenz der T4 RNA Ligase 2 eine höhere Ähnlichkeit zu weiteren bekannten Vertretern von RNA Ligasen auf (Ho und Shuman, 2002). Die Kristallstruktur der T4 RNA Ligase 2 zeigt die Verwandtheit der verschiedenen Vertreter von RNA Ligasen, DNA Ligasen und mRNA "Capping" Enzymen auf (Ho *et al.*, 2004).

Seit der Entdeckung der T4 RNA Ligase vor über 20 Jahren ist der Ligationsmechanismus gründlich erforscht worden. Die Ligationsreaktion kann formal in drei Schritte unterteilt werden. Zuerst reagiert die T4 RNA Ligase mit ATP unter kovalenter Bindung von AMP und der Freisetzung von Pyrophosphat

(PP_i). Diese Reaktion findet unabhängig von dem RNA Substrat statt und kann bei einem Überschuss an PP_i umgekehrt werden (Cranston *et al.*, 1974). Über Proteolyse der T4 RNA Ligase und massenspektrometrischer Analyse der Fragmente konnte die Adenylylierungsstelle zu der ε-Aminogruppe von Lysin-99 bestimmt werden (Thogersen *et al.*, 1985; Wang *et al.*, 2003). Im zweiten Schritt wird die Adenylylgruppe von Lysin-99 auf das 5'-Phosphat unter Ausbildung einer 5'-5'-Phosphoranhydridbindung übertragen. Der zweite Schritt findet in Anwesenheit eines passenden Akzeptorsubstrates statt und verläuft reversibel (Sugino *et al.*, 1977; Krug und Uhlenbeck, 1982). Die Verwendung von bereits adenylylierter RNA in Abwesenheit von ATP beschleunigt die T4 RNA Ligase vermittelte Verknüpfung in signifikanter Weise. Daher kann die Adenylylierung als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der T4 RNA Ligase vermittelten Verknüpfung von RNA angesehen werden (Sugino *et al.*, 1977; Krug und Uhlenbeck, 1982). Im dritten Schritt ermöglicht die T4 RNA Ligase den nukleophilen Angriff der terminalen 3'-Hydroxylgruppe an die 5'-aktivierte Phosphoanhydridbindung unter Ausbildung einer 3'-5'-Phosphodiesterbindung und Freisetzung von AMP. Dieser nukleophile Angriff erfolgt direkt unter Inversion der Konfiguration an dem verknüpfenden Phosphor, so dass eine weitere kovalente Verknüpfung mit der T4 RNA Ligase ausgeschlossen werden kann (Bryant und Benkovic, 1982).

Interessanterweise befindet sich im dem Virusgenom *Autographa californica* ein offenes Leseraster für ein Protein, das eine hohe Homologie zu der T4 Polynukleotidkinase und zu der T4 RNA Ligase 1 aufweist (Durantel *et al.*, 1998).

1.3.8. *Trypanosoma* RNA Editing Ligasen

White und Borst (1987) konnten eine RNA Ligaseaktivität aus Zellextrakten von *Trypanosoma* nachweisen, die RNA mit 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden verknüpft. Die RNA Ligase benötigt für die Ausbildung einer 3'-5'-Phosphodiesterbindung Mg²⁺ und ATP als Cofaktoren (Huang und Van der Ploeg). Die physiologische Rolle der *Trypanosoma* RNA Ligase konnte für das RNA Editing von mRNA in den Mitochondrien aufgezeigt werden (Pollard *et al.*, 1992; Sabatini und Hajduk, 1995). Die RNA Ligase liegt dabei in zwei Editing Komplexen zusammengesetzt aus Endo-, Exonukleasen und Terminaler-Uridin-Transferase vor. Die chromatographische Aufreinigung der RNA Editing Komplexe gelang mit dem Adenylyltransferase-Nachweis, der die Detektion von RNA und DNA Ligasen des T4 Typs ermöglicht (Rusché *et al.*, 1997). Von der *Trypanosoma brucei* RNA Editing Ligase 1 ist die Kristallstruktur ermittelt worden (Deng *et al.*, 2004), mit deren Hilfe man Medikamente zur Inaktivierung der Editing Ligase für die Behandlung von tropischen Krankheiten, z.B. die Afrikanische Schlafkrankheit, Chagas Krankheit und Leishmaniase mittels Strukturdesign und funktioneller Analyse entwickeln möchte.

1.4. Problemstellung

Der Mechanismus des pre-tRNA Spleißens ist vorwiegend in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht worden. Intronhaltige tRNA Gene sind jedoch in allen bekannten eukaryontischen Kerngenomen vorhanden. Bisher konnte noch in keinem höheren Eukaryonten ein tRNA Ligase Gen identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird daher der Mechanismus des pre-tRNA Spleißens in höheren Eukaryonten untersucht und dabei der Schwerpunkt auf die Charakterisierung der tRNA Ligase gelegt. In dieser Arbeitsgruppe sind verschiedene molekularbiologische Ansätze zur Identifizierung des pflanzlichen tRNA Ligase Gens durchgeführt worden, wie z.B. DNA Hybridisierung, Expressions-„Screening“ und funktionelle Komplementation, die jedoch nicht zum Erfolg führten. Weiterhin haben Datenbanksuchen mit Hilfe der bekannten Hefe tRNA Ligase-Sequenz keine homologen Gene in irgendeinem animalen oder pflanzlichen Genom identifiziert.

Daher wird in dieser Arbeit der klassische Weg der biochemischen Aufreinigung der tRNA Ligase aus höheren Eukaryonten gewählt. Als Ausgangsmaterial für die pflanzliche tRNA Ligase werden Weizenkeime benutzt, da (I) die tRNA Spleißendonuklease- und tRNA Ligaseaktivitäten in diesem Gewebe bereits ausgiebig charakterisiert worden sind und (II) Weizenkeime relativ arm an RNasen und Proteasen sind. Für die animale tRNA Ligase wird von gut aufschließbarem tierischen Gewebe, d.h. Schweineleber ausgegangen. Das Ziel hierbei ist es, die tRNA Ligase bis zur Homogenität aufzureinigen und mittels Proteinsequenzierung das codierende Gen in den sequenzierten Kerngenomen von *Arabidopsis thaliana* und *Homo sapiens* zu identifizieren. Hierzu werden die in dieser Arbeitsgruppe etablierten Nachweismethoden für tRNA Endonuklease und tRNA Ligase in Hinblick auf die Durchführung einer chromatographischen Enzymbaufreinigung verwendet.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt in der säulenchromatographischen Aufreinigung der tRNA Ligasen. Hierfür werden Chromatographiemedien wie Ionenaustauscher-, Gruppen- und Ligand-spezifische Affinitätschromatographie, sowie die Gelfiltration benutzt. Durch geschickte Wahl der Reihenfolge wird schließlich eine Aufreinigungstrategie erarbeitet, die die Isolierung des tRNA Ligaseproteins zum Ziel hatte. Nach der Proteinsequenzierung des vermeintlichen tRNA Ligaseproteins verbleibt die Verifizierung, tatsächlich das tRNA Ligasegen identifiziert zu haben. Durch Klonierung und Überexpression in einem geeigneten Zellextrakt soll für das rekombinante tRNA Ligaseprotein ein Ligase Aktivitätsnachweis durchgeführt werden.

2. Materialien

2.1. Chemikalien

Acrylamid / Bisacrylamid (29 : 1) (40 %ige gebrauchsfertige Lösung)	Roth, Karlsruhe
Agarose MP	Roche Diagnostics, Mannheim
Agarose SeaKem® GTG	FMC BioProducts, Rockland (USA)
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>i</i> -Amylalkohol	Merck, Darmstadt
Bacto-Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Trypton	Difco, Detroit (USA)
Bacto-Yeast-Extrakt	Difco, Detroit (USA)
Borsäure	Grüssing, Filsum
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid	Roche Diagnostics, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Chloroform	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethanolamin	Sigma, München
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
86 % Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
1-Isopropyl- β -1-thiogalactopyranosid	Roche Diagnostics, Mannheim
Magnesiumchlorid	Riedel-deHaän, Seele
Magnesiumchlorid, ultrapur	Sigma, München
Methanol	
Mineralöl	Sigma, München
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Grüssing, Filsum
Phenol (gebrauchsfertige Lösung)	Roth, Karlsruhe
<i>i</i> -Propanol	Fluka, Neu-Ulm
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 32%	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan, Pufferan	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Xylenxyanol	Serva, Heidelberg

2.2. Nukleinsäuren und Nukleotide

Adenosin-5'-[α - ^{32}P]-triphosphat	Amersham, Freiburg (spez. Aktivität: 15 TBq/mmol)
Adenosin-5'-[γ - ^{32}P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig (spez. Aktivität: 15 TBq/mmol)
Guanosin-5'-[α - ^{32}P]-triphosphat	Hartmann, Braunschweig (spez. Aktivität: 15 TBq/mmol) (spez. Aktivität: 15 TBq/mmol)
Uridin-5'-[α - ^{32}P]-triphosphat	Amersham, Freiburg (spez. Aktivität: 150 TBq/mmol)
Adenosintriphosphat	Roche Diagnostics, Mannheim
Cytidintriphosphat	Roche Diagnostics, Mannheim
Guanosintriphosphat	Roche Diagnostics, Mannheim
Uridintriphosphat	Roche Diagnostics, Mannheim
Plasmid DNA	
Vektoren	
pUC19	Plasmid-DNA Sammlung des Instituts für Biochemie
pIVEX 2.4c	Roche Diagnostics, Mannheim
pIVEX WG 1.3	Roche Diagnostics, Mannheim
pIVEX WG 1.4	Roche Diagnostics, Mannheim
pTH-2	Prof. Akama, Matsue (Japan)
Plasmide	
pNtY1	Fuchs <i>et al.</i> , 1992
pNtY9	Fuchs <i>et al.</i> , 1992
pAtY5II	Beier <i>et al.</i> , 1991
pAtSen1	Akama <i>et al.</i> , 2000
pAtSen2	Akama <i>et al.</i> , 2000
pDAKC	Apostol <i>et al.</i> , 1991

2.3. Proteinchromatographie

2.3.1. Ausgangsmaterialien

Weizenkeime	Sigma, München (W-125)
Schweineleber	Süd-Fleisch, Veitshöchheim

2.3.2. Säulenmaterialien

DEAE-Cellulose	Whatman, Maidstone, England
Phospho-Cellulose	Whatman, Maidstone, England
Heparin-Sepharose (FF, HiTrap: 1ml, 5 ml)	Amersham, Freiburg
Cibacron Blau Trisacryl M	Serva, Heidelberg
Cibarcron Blau Sepharose (HiTrap: 5 ml)	Amersham, Freiburg
Source S15	Amersham, Freiburg
Superdex™ 200 (HiLoad®, in XK16/60 Säule)	Amersham, Freiburg
NHS-aktivierte Sepharose (HiTrap: 1 ml)	Amersham, Freiburg

Chromatographie-Systeme

Pericyclische Pumpe	
Pericyclische Pumpe	Amersham, Freiburg
LKB Bromma Fraktionssammler	Amersham, Freiburg
FPLC System bestehend aus:	Amersham, Freiburg
2x P500 Kolbenhubpumpen	
G250 Programm-Steuereinheit	
Mixer	
Superloop (10 ml)	
Ventil	
UviCord S UV-Meter	
Rec100 Schreiber	
Frac100 Fraktionssammler	

2.4. Diagnose-Kits

ABI Prism BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	
Versionen: 2.0, 3.0, 1.1	Applied Biosystems, Darmstadt
JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
JETquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
JETquick PCR Purification Spin Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Qiagen Plasmid Kit Tip100	Qiagen, Hilden
Qiagen Plant RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RiboMax T7-transcription Kit	Promega, Mannheim

2.5. Geräte

Inkubationsschrank	Infors, München
Elektrophorese-Apparatur GNA-100	Amersham, Freiburg
Flüssigkeits-Szintillationszähler LS3801	Beckman, München
Spektralphotometer Novaspec II	Amersham, Freiburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Beckman J-6B	Beckman, München

Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B
Kühlzentrifuge Biofuge 28 RS
Ultrazentrifuge Beckman L8-80M
Ultrazentrifuge Beckman XP8
Minifuge

Du Pont, Bad Homburg
Heraeus-Christ, Hanau
Beckman, München
Beckman, München
Hettich, Tuttlingen

2.6 Sonstige Materialien

DC-Platten, Cellulose
Röntgenfilme Retina CBD
Verstärkerfolie Cronex Lightning Plus
Sterilfilter (Porengröße 0.45 μm)
MicroconTM 30 bzw. 100-Mikrokonzentratoren
PVDF Membran
Miracloth

Merck, Darmstadt
Fotochemische Werke, Berlin
Du Pont, Bad Homburg
Schleicher & Schuell, Dassel
Millipore, Bad Schwabach
Millipore, Bad Schwabach
Calbiochem-Novabiochem Corporation,
La Jolla, USA

3. Methoden

3.1. Charakterisierung und Handhabung von Nukleinsäuren

3.1.1. Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

Die Gelelektrophorese ist für das molekularbiologische Arbeiten die Standardmethode, um Nukleinsäuren aufzutrennen, zu identifizieren und aufzureinigen. Nukleinsäuren sind bei neutralem pH über das Phosphatrückrat negativ geladen und wandern in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Elektrophorese von Nukleinsäuren wird standardmäßig in stabilisierenden Matrices durchgeführt. Am häufigsten verwendet werden Agarosegele und Polyacrylamidgele. Neben den äußeren Parametern – Wert der angelegten Spannung, Länge des separierenden Gels – ist die Wanderungsgeschwindigkeit von der Länge und der Konformation der Nukleinsäuren abhängig. Die Ribonukleinsäuren liegen normalerweise einzelsträngig vor und bilden unter nativen Bedingungen sehr stabile Sekundärstrukturen aus, die neben der Länge der Ribonukleinsäure einen deutlichen Einfluß auf die Wanderungsgeschwindigkeit einnehmen. Für analytische gelelektrophoretische Trennungen von Ribonukleinsäuren werden daher denaturierende Bedingungen gewählt, um die Sekundärstrukturen aufzulösen und die Wanderungsgeschwindigkeit in direkten Bezug zur Länge der Nukleinsäure setzen. Die zurückgelegte Wegstrecke ist umgekehrt proportional zu dem Logarithmus des Molekulargewichts der denaturierten Nukleinsäure.

Agarosegele werden standardmäßig für die Auftrennung hochmolekularer Nukleinsäuren, Polyacrylamidgele für die Auftrennung von niedermolekularer Nukleinsäuren verwendet.

3.1.1.1. Agarosegel-Elektrophorese

3.1.1.1.1. Auftrennung von Deoxyribonukleinsäuren

Agarose besteht aus einem linearen Polysaccharid aus D- und L-Galactose, die alternierend durch $\alpha(1\rightarrow3)$ - und $\beta(1\rightarrow4)$ -glykosidische Bindungen verknüpft sind. Die Agarosestränge von durchschnittlich 700 Galactosebausteinen Länge bilden α -Helices, die wiederum zusammengeknäult vorliegen und so eine dreidimensionale Gelmatrix mit einer Porengröße von 50 – 200 nm bilden.

Aufgrund der relativ hohen Porengröße eignen sich Agarosegele für die Auftrennung von doppelsträngigen Deoxynukleinsäuren in einem Bereich von 100 bp bis 20 kb. Für ein optimales Trennergebnis wird die Agarosekonzentration an die erwartete Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente angepaßt (Sambrook und Russel, 2001).

Tabelle 1: Trennbereiche von Agarosegelen

Gelkonzentration	Agarose MP	Seakem GTG Agarose
0.6 %	1 kb bis 30 kb	-
0.8 %	500 bp bis 15 kb	800 bp bis 10 kb
1.0 %	250 bp bis 12 kb	400 bp bis 8 kb
1.2 %	150 bp bis 6 kb	300 bp bis 7 kb
1.5 %	100 bp bis 4 kb	200 bp bis 4 kb
2.0 %	80 bp bis 3 kb	100 bp bis 3 kb

Für analytische Gele wird Agarose MP, für präparative Gele wird die SeaKem® GTG® Agarose verwendet, die eine niedrigere Schmelztemperatur und eine höhere Qualität in Bezug auf die Abwesenheit von DNasen und RNasen aufweist.

Bei dieser Arbeit werden Gelkammern mit der Länge von 10 cm und einer Breite von 7 cm verwendet. Die Agarose wird in 30 ml 1x TBE Elektrophoresepuffer aufgeschwemmt und durch dreimaliges Aufkochen in einem Mikrowellenofen gelöst. Die Gellösung wird auf 40 – 60 °C abkühlen lassen, mit Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0.5 µg/ml (15 µl einer 1 mg/ml Stammlösung) versetzt und in die mit Klebeband abgedichtete Elektrophoresekammer mit einem geeigneten Taschenformer gegossen. Nach ½ Stunde ist das Gel durch Abkühlung auf Raumtemperatur erstarrt. Das Klebeband kann jetzt entfernt und die Gelkammer in die horizontale Elektrophoreseapparatur eingesetzt werden, in die so lange 1x TBE Elektrophoresepuffer gegeben wird bis das Gel vollständig überschichtet ist. Der Taschenformer kann jetzt entfernt werden.

Die DNA-Proben werden mit 0.66 Vol 2.5x HSE Probenpuffer versetzt. Die enthaltenen Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau erleichtern nicht nur das Auftragen der Proben in die Geltaschen, sondern ermöglichen es, den Verlauf der elektrophoretischen Trennung zu verfolgen. Die elektrophoretische Trennung findet bei einer Spannung von 80 bis 120 V statt. Das Wanderungsverhalten von Xylencyanol entspricht der eines DNA-Fragments mit 3 bis 4 kb, von Bromphenolblau eines DNA-Fragments mit 200 bis 300 bp. Sobald der Bromphenolblau Farbstoff etwa die Hälfte der maximalen Wegstrecke zurückgelegt hat kann das Agarosegel ausgewertet werden. Der zugegebene Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basen von Nukleinsäuren ein. Ein DNA-Fragment kann so unter UV-Licht als Bande visualisiert werden. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 5 ng und durch Vergleich der Intensität des DNA-Fragments mit einem Standard kann die DNA-Menge beurteilt werden. Bei Verwendung eines geeigneten DNA-Längenstandards kann die Länge eines unbekanntes DNA-Fragments abgeschätzt werden. Für eine genauere Längenbestimmung wird von dem empirischen Zusammenhang zwischen zurückgelegter Wegstrecke und dem Logarithmus des Molekulargewichts Gebrauch gemacht und anhand des Längenstandards eine Kalibriergerade erstellt.

10x TBE Elektrophoresepuffer	890 mM	Tris-Base
	890 mM	Borsäure
	20 mM	Na ₂ EDTA
2.5x HSE Probenpuffer:	50 % (w/v)	Saccharose
	4 M	Harnstoff
	50 mM	Na ₂ EDTA
	0.1 % (w/v)	BPB und/oder XC

3.1.1.1.2. Denaturierende Auftrennung von Ribonukleinsäuren

Bei der Auftrennung hochmolekularer Ribonukleinsäuren über Agarosegele ist es erforderlich, die ausgebildeten Sekundärstrukturen aufzulösen und so eine elektrophoretische Trennung nach dem Molekulargewicht zu ermöglichen. Als denaturierendes Agens wird Formaldehyd im Elektrophoresepuffer verwendet. Zudem wird die RNA Probe in einem Formaldehyd- und Formamid-haltigen Probenpuffer denaturiert.

Die Vorgehensweise ist bis auf die veränderte Pufferzusammensetzung analog zur DNA Agarosegel Elektrophorese. Die Agarose wird in 30 ml 1x FA Gelpuffer aufgeschwemmt und der Elektrophoresepuffer enthält neben 1x FA Gelpuffer zusätzlich 0.74 % Formaldehyd.

10x FA Gelpuffer:	200 mM	3-[N-morpholino]propansulfonsäure (MOPS)
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	Na ₂ EDTA
		mit NaOH ad pH 7.0 einstellen.
1x FA Elektrophoresepuffer:	50 ml	10x FA Gelpuffer
	10 ml	37 % Formaldehyd
	440 ml	ddH ₂ O
5x RNA Probenpuffer:	4 ml	10x FA Gelpuffer
	3.1 ml	Formamid
	720 µl	Formaldehyd
	2.3 ml	86 % Glycerin
	80 µl	500 mM Na ₂ EDTA, pH 8.0
	0.2 %	BPB (w/v)

3.1.2. Polyacrylamid-Elektrophorese

Polyacrylamidgele eignen sich für die Auftrennung von niedermolekularen und insbesondere einzelsträngigen Nukleinsäuren und zeichnen sich durch ein sehr hohes Auflösungsvermögen aus. Soll die Auftrennung der Nukleinsäuren ausschließlich nach dem Molekulargewicht erfolgen, so wird die Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Die Anwesenheit von 8 M Harnstoff in der Gelmatix und die Elektrophorese bei 50 bis 60 °C unterbinden die Ausbildung von Basenpaarungen und die damit verbundenen Sekundärstrukturen. Die Polyacrylamid-Konzentration richtet sich nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren (Tabelle 2).

Tabelle 2. Trennbereiche für Polyacrylamidgele

Gelkonzentration	Trennbereich in bp
6 %	80 – 500
8 %	60 – 400
10 %	40 – 200
13 %	20 – 150
15 %	12 – 100
20 %	7 – 80

Polyacrylamidgele entstehen aus der Copolymerisation der monomeren Bausteine Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid in 1xTBE. Das Bisacrylamid quervernetzt die Polyacrylamidstränge, bildet so engmaschige Poren und verleiht dem Gel mechanische Festigkeit. Die Polymerisierungsreaktion findet unter radikalischen Bedingungen statt. Im Rahmen dieser Arbeit wird ein System aus Ammoniumperoxodisulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) verwendet. TEMED reagiert in einer Redoxreaktion mit dem APS und führt so zur Bildung von freien Sulfation-Radikalen, die die Polymerisierung initiieren.

Für die Analyse von Ribonukleinsäuren werden Polyacrylamidgele mit den Abmessungen 20 x 20 cm x 0.4 mm und 20 x 40 cm x 0.4 mm verwendet. Die Gellösung setzt sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Tabelle 3. Zusammensetzung der Polyacrylamidgel-Lösung

Komponenten	Menge	Endkonzentration
Harnstoff	9.6 g	8 M
40 % AA/BAA (29/1)	variabel	6 – 20 %
10x TBE	2 ml	1x TBE
ddH ₂ O	ad 20 ml	
2 min im Wasserstrahlvakuum evakuieren		
20 % APS	100 µl	
TEMED	8 µl	

Die Gellösung wird vorsichtig erwärmt bis sich der Harnstoff vollständig gelöst hat und sodann 2 min unter Wasserstrahlvakuum und vorsichtigem Schwenken entgast und somit von Sauerstoff, das als stabiles Diradikal die Polymerisierung behindern und von Kohlendioxid, das neben Sauerstoff während der Polymerisierung kleine Luftbläschen zwischen den Glasplatten bilden kann, entfernt.

Die Gellösung wird direkt nach der Zugabe von APS und TEMED zwischen zwei Glasplatten, die durch 0.4 mm Abstandhalter getrennt und abgedichtet sind, luftblasenfrei gegossen. Es wird ein Taschenformer eingesetzt, und das Gel in horizontaler Lage polymerisieren lassen. Die Gellösung sollte nach 5 bis 15 min erstarren und ist dann nach 1 Stunde vollständig auspolymerisiert.

Für die Elektrophorese wird das Gel mit den beiden Glasplatten vom Taschenformer und dem gegenüberliegenden Abstandhalter befreit, mit ddH₂O von entfloßener Gellösung gewaschen und in die vertikale Elektrophoreseapparatur mit 1x TBE Elektrophoresepuffer eingesetzt. Für eine gleichmäßige Verteilung der bei der Elektrophorese entstehenden Wärme wird eine 2 mm Aluminiumplatte an die hintere Glasplatte befestigt.

Die Nukleinsäureprobe wird in 8 bis 10 µl HE-Puffer gelöst und 5 min bei 90 °C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt. Vor dem Auftragen der Probe wird die Geltasche mit Elektrophoresepuffer gründlich gespült und so von aus der Gelmatrix diffundiertem Harnstoff befreit. Für einen gleichmäßigen Einlauf der Proben wird die Stromstärke zuerst bei 20 mA gehalten, während die elektrophoretische Trennung bei 25 W (20 x 20 cm x 0.4 mm) bzw. 50 W (20 x 40 cm x 0.4 mm) durchgeführt wird. Sobald BPB das untere Ende des Polyacrylamidgels erreicht hat, wird die Elektrophorese beendet. Das Gel mit den beiden Glasplatten wird aus der Apparatur entnommen und eine Glasplatte von dem Gel entfernt. Das Gel wird mit Haushaltsfolie abgedeckt und ein Röntgenfilm für die Autoradiographie aufgelegt.

HE Probenpuffer

8 M	Harnstoff
0.02 %	Bromphenolblau (w/v)
0.02 %	Xylencyanol (w/v)

3.1.3. Elution und Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Wird ein DNA-Gemisch präparativ über ein Agarosegel aufgereinigt, so kann nach erfolgter elektrophoretischer Trennung das gewünschte DNA-Fragment aus der Gelmatrix zurückgewonnen werden. Die DNA wird über Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte über den JETquick Gel Extraction Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) nach Herstellervorschrift. Die Gelmatrix wird unter Hochsalzbedingungen bei 50 °C aufgeschmolzen und die DNA an eine Silica-Matrix gebunden. Nach einem Waschschrift wird die gereinigte DNA mit 50 µl auf 70 °C erhitztes ddH₂O eluiert. Die Ausbeute beträgt 50 % und die

Reinheit und Ausbeute ist stark von der 5 minütigen Inkubation der Silica-Matrix mit der Waschlösung abhängig.

3.1.4. Elution und Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Bei der Handhabung von Ribonukleinsäuren sowie bei der Markierung von Oligodeoxynukleotiden kann es erforderlich sein, die Nukleinsäuren präparativ über ein Polyacrylamidgel aufzureinigen. Das über Autoradiographie identifizierte Nukleinsäure-Fragment wird mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten, das Gelstück in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß für 15 min bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und so die Gelmatrix durch die entstehenden Eiskristalle aufgebrochen. Das Gelstück wird anschließend mit 200 μl Elutionspuffer 1 h bei RT geschwenkt. Die eluierten Nukleinsäuren werden in einer Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und nach Zugabe von 5 μg tRNA_c bzw. 2 μg Glycogen mit 3 Vol Ethanol 1 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt.

Elutionspuffer: (Gross, 1982)

0.5 M	NH ₄ OAc
0.1 mM	Na ₂ EDTA
2 mM	MgCl ₂
0.04 %	SDS

3.1.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

3.1.5.1. Mittels UV-spektrometrischer Messung

Nukleinsäuren weisen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm auf und ermöglichen eine UV-spektrometrische Konzentrationsbestimmung nach dem Lambert-Beerschen Gesetz aus einer wässrigen Nukleinsäurelösung. Ungepaarte Basen weisen eine höhere Absorption als gepaarte Basen auf, eine Absorption A_{260} von 1 entspricht bei einer Küvettenlänge von 1 cm daher einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger Nukleinsäuren und 33 $\mu\text{g/ml}$ an Oligodeoxynukleotiden. Proteine weisen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf, das durch die aromatischen Aminosäuren hervorgerufen wird. Das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} ist daher ein guter Indikator, die Reinheit einer Nukleinsäurepräparation abzuschätzen. Da die Absorption von Nukleinsäuren bei 260 nm sehr hoch ist, ändert sich das Verhältnis A_{260}/A_{280} von 2.0 einer reinen Nukleinsäurelösung erst bei einer deutlichen Verunreinigung mit Proteinen.

3.1.5.2. Mittels des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid

Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basen von doppelsträngigen Nukleinsäuren ein. Wird ein Agarosegel mit Ethidiumbromid, das Nukleinsäuren enthält, unter UV-Licht betrachtet, so ist die Intensität der Fluoreszenz proportional zur DNA Menge. Die Konzentration einer Nukleinsäureprobe kann so durch den Vergleich mit der Intensität eines Standards abgeschätzt werden.

Bei der "Tüpfelmethode" wird 1 μl der Probe, sowie eine Reihe von 0 bis 100 ng eines DNA Standards auf eine 1 % Agaroseplatte mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid aufgetragen. Nach $\frac{1}{2}$ h ist die DNA mit dem Ethidiumbromid vollständig eingefärbt, und die Agaroseplatte kann unter UV-Licht ausgewertet werden. Die Nachweisbarkeitsgrenze liegt bei 1 – 5 ng DNA.

Insbesondere bei Plasmid DNA Präparationen kann die Anwesenheit von chromosomaler DNA und von Ribonukleinsäuren nicht grundsätzlich ausgeschlossen werden. Für eine

Konzentrationsbestimmung von Plasmid DNA Präparationen sollte neben der Absorptionsmessung A_{260} ein analytisches Agarosegel durchgeführt werden. Über das analytische Agarosegel kann so ein zweiter unabhängiger Wert für die Konzentration, die Bestätigung der Abwesenheit von Ribonukleinsäuren und chromosomaler DNA, sowie das Verhältnis von denaturierter zu „supercoiled“ Plasmid DNA erhalten werden.

3.1.6. Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren

Während der Handhabung von Nukleinsäuren ist es bei nahezu jedem Arbeitsschritt nötig, die Nukleinsäurelösung aufzureinigen, die Pufferzusammensetzung zu ändern, und die Nukleinsäuren zu konzentrieren. Die Entfernung von Proteinen und weiteren Verunreinigungen findet standardmäßig über eine Phenolextraktion statt. Die Nukleinsäuren werden anschließend mit Ethanol aus einer wässrigen Lösung ausgefällt und somit von Salzen befreit und konzentriert.

Eine Nukleinsäurelösung kann ferner durch Zugabe einer cheletropen Salzlösung an eine Silicamatrix gebunden werden, somit von Verunreinigungen aufgereinigt und in einem kleinen Volumen ddH₂O eluiert werden.

3.1.6.1. Phenolextraktion

Eine mit Proteinen und Kohlenhydraten verunreinigte Nukleinsäurelösung kann über eine Phenolextraktion aufgereinigt werden. Zu der wässrigen Nukleinsäurelösung wird 1 Vol Phenol, das zuvor gegen TE-Puffer equilibriert wurde, gegeben, 5 min auf dem Schüttler zur sehr feinen Emulsion durchmischt, und die beiden Phasen werden durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, RT, 12000 UpM, 5 min) aufgetrennt. Die wässrige Phase befindet sich oberhalb der Phenol- und der Interphase mit den denaturierten Proteinen und wird mit einer Mikropipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von gelöstem Phenol wird mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zur feinen Emulsion durchmischt und kurz zentrifugiert. Die untere Chloroformphase wird mit einer Mikropipette abgezogen. Geringe Rückstände an Chloroform nehmen keinen Einfluss auf die anschließende Ethanol-fällung der Nukleinsäuren aus der wässrigen Phase.

3.1.6.2. Ethanol-fällung

Bei der Zugabe von Ethanol zu einer wässrigen Nukleinsäurelösung werden die negativ geladenen Phosphatgruppen nicht mehr ausreichend solvatisiert und binden einwertige Kationen. Bei leicht saurem pH werden zudem ein Teil der Phosphatgruppen protoniert. Durch den Verlust an repulsiven Kräften – hervorgerufen durch die negativ geladenen Phosphatgruppen – konglomeriert die Nukleinsäure und fällt aus. Die Ethanol-fällung erfolgt sehr schnell für eine hochmolekulare und in hoher Konzentration vorliegende Nukleinsäurelösung. Geringe Mengen oder sehr kleine Nukleinsäuren erfordern sehr stringente Bedingungen für eine vollständige Ethanol-fällung. Unter diesen Bedingungen ist es vorteilhaft bei der Ethanol-fällung eine Fällhilfe Nukleinsäure, z.B. tRNA_V, zuzugeben, und so unter Standardbedingungen die geringen Mengen an der gewünschten Nukleinsäure oder den Oligodeoxynukleotiden vollständig zu fällen.

Zu einer wässrigen Nukleinsäurelösung werden 0.1 Vol 3 M NaOAc pH 4.6 oder wahlweise 0.1 Vol 2 M NaOAc pH 5.5 und 2.5 bis 3 Vol Ethanol gegeben, kurz durchmischt, und der Ansatz 30 bis

60 min bei -60 °C fällen lassen. Die Nukleinsäuren werden durch Zentrifugation (Biofuge, 4 °C, 17000 UpM, 20 min) sedimentiert, der Überstand mit einer Mikropipette abgehoben. Soweit erforderlich wird das Sediment mit 3 Vol 70 % Ethanol salzfrei gewaschen und erneut zentrifugiert (Biofuge, 4 °C, 17000 UpM, 10 min). Der Überstand wird mit einer Mikropipette abgehoben und der restliche Ethanol aus dem offenen Reaktionsgefäß verdampfen lassen. Alternativ kann das Sediment für 2 min im Rotationsverdampfer unter Vakuum getrocknet werden. Das Nukleinsäure-Sediment wird in einem geeigneten Volumen ddH₂O oder Gelladepuffer gelöst.

3.1.6.3. Isopropanolfällung

Soll das Volumen bei der Fällung von Nukleinsäuren das Volumen gering gehalten werden, kann eine Isopropanolfällung durchgeführt werden. Zu der wässrigen Nukleinsäurelösung werden 0.1 Vol 2 M NaOAc pH 5.5 und 1 Vol Isopropanol gegeben, kurz durchmischt und 15 min auf Eis inkubiert. Die Nukleinsäuren werden durch Zentrifugation sedimentiert (Biofuge, 4 °C, 17000 UpM, 20 min), und der Überstand wird mit einer Mikropipette abgehoben. Das schwer flüchtige Isopropanol wird durch Waschen mit 70 % Ethanol entfernt und wie unter 3.1.6.2 beschrieben aufgearbeitet.

3.1.6.4. Aufreinigung über eine Silica-Matrix

Der JETquick PCR Purification Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) kann neben der Aufreinigung von PCR-Ansätzen prinzipiell für die Aufreinigung von doppelsträngiger DNA im Bereich von 80 bp bis 10 kb aus wässrigen Lösungen verwendet werden. Die Durchführung der Aufreinigung erfolgte nach Hersteller-Angaben. Die DNA wurde mit 50 µl ddH₂O eluiert.

3.1.7. Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen des Typs II spalten doppelsträngige DNA inmitten oder unmittelbar neben einer spezifischen, palindromen Erkennungssequenz von 4 bis 8 Nukleotiden Länge. Wird in der Mitte der palindromen Erkennungssequenz gespalten, entstehen glatte Enden, wird versetzt gespalten, entstehen kurze überstehende Einzelstrangabschnitte, die als kohäsive Enden bezeichnet werden.

Die zu hydrolysierende DNA wird in 1x Restriktionspuffer mit 2 bis 5 E der Restriktionsendonuklease pro µg DNA bei der angegebenen Temperatur für 1 bis 4 h inkubiert. Das Gesamtvolumen sollte mindestens das Zehnfache des Enzymvolumens betragen, da sonst das in der Enzymlösung enthaltene Glycerin störend wirkt. Wird die hydrolysierte DNA für eine weitere Enzym-katalysierte Reaktion verwendet, wird der Ansatz über eine Phenol-Extraktion (3.1.6.1) und eine Ethanol-fällung (3.1.6.2) aufgereinigt.

3.1.8. Amplifizierung von Deoxynukleinsäuren mit der Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wird für die Vervielfältigung von DNA-Abschnitten mit basenspezifischen, flankierenden Oligodeoxynukleotiden verwendet. Die PCR kann in drei Elementarschritte eingeteilt werden, die einen Zyklus bilden:

1. Denaturierung: Die Matrizen-DNA wird beim Erhitzen auf 92 bis 98 °C in Einzelstränge aufgeschmolzen.

2. Hybridisierung: Zwei Startsequenzen in Form von Oligodeoxynukleotiden binden basenspezifisch an die Erkennungssequenz der jeweiligen komplementären Einzelstränge.
3. Synthese: Die thermostabile DNA-Polymerase verlängert an den freien 3'-Enden der Oligodeoxynukleotide Matrizen-abhängig die Startsequenzen und bildet so Tochterstränge.

Bei der Wiederholung dieses Zyklus dienen die soeben synthetisierten Tochterstränge ebenfalls als DNA-Matrize, so dass unter Korrektur der Effektivität der DNA-Polymerase und der Limitierung der Einzelkomponenten des PCR-Ansatzes über einen weiten Bereich der Zyklenwiederholungen eine exponentielle Vervielfältigung des durch die beiden Startsequenzen festgelegten DNA-Abschnitts erreicht wird.

Die beiden Oligodeoxynukleotide werden so gewählt, dass sie an die jeweiligen komplementären DNA-Stänge der Matrize binden und in ihrer 5'→3'-Orientierung zueinander gerichtet sind. Die Startsequenz sollte zum 3'-Ende mit mindestens 15 bis 25 Basen an die Matrize binden. Dieser Bereich bestimmt die Hybridisierungstemperatur und hängt von der Basenzusammensetzung ab. Die Hybridisierungstemperatur sollte bei 50 bis 60 °C und zudem 4 bis 8 °C unter der Schmelztemperatur T_m liegen, die am einfachsten nach der Regel von Wallace abgeschätzt werden kann:

$$T_M = (A+T) \cdot 2 \text{ °C} + (G+C) \cdot 4 \text{ °C}$$

Für (A+T) wird die Anzahl der Adenin- und Thymin- und für (G+C) die Anzahl der Guanin- und Cytosin-Basen für die Berechnung der Schmelztemperatur T_M verwendet. Die optimale Synthesetemperatur liegt für die *Taq* und die *Pfu* DNA-Polymerase bei 72 °C. Die Synthesezeit richtet sich nach der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts und sollte für die *Taq* DNA-Polymerase 1 min pro 2 kb und für die *Pfu* DNA-Polymerase 1 min pro 1 kb betragen.

Der PCR-Ansatz setzt sich standardmäßig aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponenten	Menge	Endkonzentration
ddH ₂ O	ad 50 µl	
10x PCR Puffer	5 µl	1x
10 mM dNTPs	1 µl	0.2 mM
10 µM Startsequenz A	1 µl	0.2 µM
10 µM Startsequenz B	1 µl	0.2 µM
Matrize	1 µl	0.05 – 1 ng/µl
PCR Polymerase	1 µl	0.05 – 0.1 U/µl
kurz durchmischen		
Mineralöl	40 µl	

Die PCR Reaktion wird in einem Thermozykler nach folgendem Programm durchgeführt:

Prozess	Temperatur	Dauer
Denaturierung	90 – 98 °C	2 – 10 min
Denaturierung	90 – 98 °C	1 min
Hybridisierung	45 – 60 °C	1 min
Synthese	68 – 72 °C	0.5 – 2 min / kb
Auffüllen	72 °C	10 min
Lagerung	4 °C	∞

20 – 35 Zyklen

Zur Kontrolle werden 2 bis 5 µl des PCR-Ansatzes über ein DNA-Agarosegel aufgetrennt. Ist die PCR-Reaktion erfolgreich und in hoher Spezifität verlaufen, wird der Ansatz über den JETquick PCR Purification Spin Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) aufgereinigt und so von den Einzelkomponenten

des PCR-Ansatzes befreit. Die aufgereinigte DNA wird in 50 µl ddH₂O eluiert. Sollten mehrere PCR-Produkte gebildet worden sein, so ist es erforderlich, den PCR-Ansatz präparativ über ein DNA-Agarosegel aufzureinigen. Das gewünschte DNA-Fragment wird aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA über den JETquick Gel Extraction Spin Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) zurückgewonnen.

3.1.9. Sequenzanalyse von DNA

Im Rahmen dieser Arbeit findet die Sequenzanalyse von DNA nach der Sanger Methode statt. Das Prinzip beruht auf dem Einbau von 2',3'-Dideoxynukleotiden und dem damit verbundenen Kettenabbruch der DNA Synthese. Bei der klassischen Durchführung werden die DNA-Stränge durch Einbau von ³²P-markiert. Die Sequenzierreaktion findet in 4 getrennten Ansätzen unter Verwendung je eines der Kettenabbruchnukleotiden statt. Bei der nicht radioaktiven Sangersequenzierung werden die Kettenabbruch-DNA-Stränge mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert.

3.1.9.1. mit dem Sequenase 2.0 Sequencing Kit

Die DNA Sequenzierung mit dem Sequenase 2.0 Sequencing Kit (Amersham, Freiburg) erfolgt nach Hersteller-Angaben. Für die Sequenzierung werden 5'-[³²P]-phosphorylierte Startsequenzen verwendet, so dass keine weitere Markierung der Kettenabbruchstränge über den Einbau von [α-³²P]dATP erforderlich ist. Die Sequenzierreaktion gliedert sich in mehrere Schritte:

Denaturierung der Plasmid DNA

4 µg Plasmid DNA werden in 10 µl 200 mM NaOH bei 37 °C für 10 min inkubiert, durch Zugabe von 2 µl Essigsäure, 40 µl 200 mM NaOAc, pH 5.2 und 150 µl Ethanol präzipitiert. Das mit 70 % Ethanol gewaschene Sediment wird in 7 µl ddH₂O gelöst.

Hybridisierung der Startsequenz

Zu 7 µl denaturierter Plasmid DNA Lösung werden 2 µl 5x T7 "Sequencing reaction buffer" und 1 µl (100.000 cpm) 5'-[³²P]-phosphorylierte Startsequenz gegeben, für 2 min auf 65 °C erhitzt und über einen Zeitraum von 30 min auf RT abkühlen lassen.

Sequenzierreaktion

In vier Ansätzen werden jeweils 2.5 µl der Terminationsmische A, C, G, T bei 37 °C vorgelegt. Der Hybridisierungsansatz wird mit 1 µl 100 mM DTT, 2 µl Markierlösung (1:5 Verdünnung) und 2 µl Sequenase 2.0 (1:8 Verdünnung) supplementiert und sofort zu Aliquoten von 3.5 µl jeweils zu den vier Terminationsmischen gegeben. Nach weiteren 5 min bei 37 °C wird die Sequenzierungsreaktion durch Zugabe von 4 µl Stopplösung beendet. Nach Denaturierung der Proben bei 90 °C für 5 min werden je 2 µl auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen.

3.1.9.2. mit dem ABI Prism BigDye Kit

Die DNA-Sequenzierreaktion wurde mit dem "ABI Prism[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" in den Versionen 2.0, 3.0 und 1.1 durchgeführt und anhand des ABI PRISM[®] Genetic Analyser 310 (Applied Biosystems, Darmstadt) ausgewertet. Bei dieser Methode handelt es sich um eine abgewandelte Form der Sanger-Sequenzierung, bei der an den vier Dideoxynukleotiden, die als Terminatoren der DNA Synthese dienen, jeweils ein unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoff

kovalent gekoppelt ist. Die so erhaltene basenspezifische Farbcodierung der terminierten DNA-Stränge ermöglicht die Durchführung der Sequenzierreaktion in einem Reaktionsansatz. Mit der Verwendung einer hitzestabilen, modifizierten *Taq* DNA Polymerase für die Sequenzierungsreaktion können die Einzelschritte der Denaturierung der Matrize, Hybridisierung der Startsequenz und Synthese der Kettenabbruchstränge in einem Ansatz unter mehrfacher Zyklenswiederholung durchgeführt werden.

Komponenten	Menge	Endkonzentration
DNA-Matrize	200 – 500 ng	10 – 25 ng/μl
Sequenzier-Startsequenz	6.4 pmol	0.32 μM
Ready Reaction Mix	4 μl	20 %
Gesamtvolumen mit ddH ₂ O	20 μl	
Mineralöl	30 μl	

Die Sequenzierungsreaktion wird in dem Perkin Elmer Cetus Thermozykler mit 25facher Zyklenswiederholung durchgeführt

Prozess	Temperatur	Dauer
Denaturierung	96 °C	2 min
Denaturierung	96 °C	1 min
Hybridisierung	50 °C	1 min
Synthese	60 °C	4 min
Lagerung	4 °C	∞

25 Zyklen

Der Sequenzierungsansatz wird mit 30 μl ddH₂O verdünnt und mit 5 μl einer 2 % SDS Lösung für 5 min bei 98 °C erhitzt. Nach Abkühlung auf Eis wird die DNA über eine Ethanol-fällung aufgereinigt. Nach Waschen mit 70 % Ethanol wird das Sediment in 12 μl TSR ("template suppression reagent") gelöst und in das Sequenzier-Gefäß überführt. Der Sequenzier-Ansatz wird mit dem "ABI Prism 310 Genetic Analyser" in einer Hochspannungs-Kapillar-Elektrophorese aufgetrennt und die DNA-Terminationsstränge über Laser-induzierte Fluoreszenz detektiert.

3.1.10. Deoxyoligonukleotid-gerichtete Mutagenese von DNA mittels PCR

Die Deoxyoligonukleotid-gerichtete Mutagenese ermöglicht die gezielte Änderung einer DNA-Sequenz unter Austausch von Deoxynukleotiden, sowie die Durchführung von Deletionen und Insertionen. Das gemeinsame Prinzip der verschiedenen Methoden ist die Hybridisierung eines synthetischen Deoxyoligonukleotids, das die geplante Mutation trägt und das als Startsequenz für die Synthese der mutagenisierten DNA dient. Während in den 80er Jahren für die Deoxyoligonukleotid-gerichtete Mutagenese einzelsträngige DNA als Matrize erforderte, setzte sich mit dem Erfolg der Polymerase-Kettenreaktion die PCR-basierende Deoxyoligonukleotid-gerichtete Mutagenese durch, für die Plasmid-DNA als Matrize dient.

Der Austausch von Deoxynukleotiden findet standardmäßig nach der QuikChange[®]-Prozedur (Stratagene, Heidelberg) statt, während Insertionen und Deletionen über inverse PCR nach der ExSite[®]-Prozedur (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt werden.

3.1.10.1. nach der QuikChange Prozedur (Stratagene)

Ausgehend von methylierter Plasmid-DNA als Matrize wird in einer PCR-Reaktion mit zwei Deoxyoligonukleotiden, die die geplante Mutation tragen und zueinander komplementär sind, Tochter-Plasmid-DNA gebildet, die die geplante Mutation trägt und an den jeweiligen 5'-Hydroxylgruppen der Deoxyoligonukleotiden einen Strangbruch aufweist. Nach erfolgter PCR-Reaktion wird eine enzymatische Restriktionshydrolyse mit *DpnI* durchgeführt, die mit der Erkennungssequenz GA^m↓TC nur die von einem *dam*⁺ *E. coli* Bakterienstamm isolierte und somit semi- und voll-methylierte Plasmid-DNA, jedoch nicht die über eine PCR synthetisierte DNA statistisch alle 256 Basen hydrolysiert. Somit ist über die Hydrolyse mit *DpnI* eine Selektion von Mutante gegenüber Wildtyp möglich.

Für eine erfolgreiche Mutagenese ist die Konzeption der mutagenisierenden Deoxyoligonukleotiden entscheidend, die eine Länge von mindestens 25 Basen und einen Schmelzpunkt oberhalb 78 °C aufweisen sollten. Der Schmelzpunkt der mutagenisierten Startsequenz wird hierfür nach

$$T_m = 81.5 + 0.41(\%GC) - \frac{675}{N} - (\%Fehlpaarung)$$

berechnet, wobei für *N* die Länge, für (%GC) der GC-Gehalt als Prozentwert und für (%Fehlpaarung) der Anteil der mutagenisierten Deoxynukleotiden in Bezug zur Gesamtlänge als Prozentwert des Deoxyoligonukleotids angegeben wird.

Die Mutagenese findet in einem 50 µl Standardansatz statt mit folgendem Zyklenprogramm:

Prozess	Temperatur	Dauer
Denaturierung	96 °C	2 min
Denaturierung	96 °C	1 min
Hybridisierung	50 °C	1 min
Synthese	68 °C	1 – 2 min/kb
Lagerung	4 °C	∞

12 - 25 Zyklen

Die erfolgreiche Durchführung der PCR wird durch die Auftrennung von 5 µl Reaktionsmischung in einem 0.8 % Agarosegel überprüft. Wenn unter UV-Licht ein DNA-Fragment auf der Höhe von denaturierter Plasmid-DNA zu erkennen ist, wird der PCR-Ansatz über den JETquick PCR Purification Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) aufgereinigt, wobei die DNA anschließend mit 50 µl auf 70 °C erhitztes ddH₂O eluiert wird. Das Eluat wird im Rotationsverdampfer unter Vakuum auf 10 µl eingengt und dann mit 5 E *DpnI* in 1x Restriktionspuffer 3 – 4 h bei 37 °C inkubiert bevor 1 – 2 µl für die Transformation durch Elektroporation verwendet werden.

3.1.10.2. mittels inverser PCR

Die inverse PCR nützt die Eigenschaft der Plasmid-DNA, zirkulär vorzuliegen. Daher führen Startsequenzen, die nahe beieinander liegen, jedoch in ihrer 5'→3'-Orientierung auf den ersten Blick voneinander weg weisen, zur Amplifizierung der gesamten Plasmid-DNA, die dann als lineares PCR-Produkt vorliegt. Nach Phosphorylierung des PCR-Fragments mit der T4 Polynukleotidkinase wird der Ansatz mit der T4 DNA Ligase zirkularisiert. Die so mittels PCR synthetisierte und enzymatisch zirkularisierte Plasmid-DNA ist unmethyliert. Bei der anschließenden enzymatischen Restriktionshydrolyse mit *DpnI* wird daher nur die vom einem *dam*⁺ *E. coli* Bakterienstamm isolierte

Matrizen Plasmid-DNA statistisch alle 256 Basen hydrolysiert und so eine Selektion der synthetisierten DNA gegenüber der Matrize durchgeführt.

3.2. DNA Klonierung

Gene können einfach gehandhabt werden, wenn die codierenden Abschnitte in Vektoren kloniert werden. Je nach Verwendungszweck kann der Vektor von den viralen λ -Bakteriophagen oder von den bakteriellen Plasmiden abstammen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine cDNA Genbank aus *Arabidopsis thaliana* im Bakteriophagen λ -ZapII amplifiziert und sämtliche Klonierungen in Vektoren durchgeführt, die aus Plasmid DNA hergestellt wurden.

3.2.1. Präparation von Vektoren aus Plasmid DNA

Plasmid DNA liegt in *E. coli* als zirkuläre, doppelsträngige, extrachromosomale DNA vor. Verfügt die Plasmid DNA über das modifizierte pMB1 Replikon, so weist diese in einer *E. coli* Zelle eine Kopienzahl von 400 – 600 auf und wird als *high copy* Plasmid bezeichnet. Alle verwendeten Plasmide verfügen über ein Gen für die β -Lactamase und verleihen so Bakterien, die Plasmid DNA aufgenommen haben, ein Überleben in Ampicillin-haltigen Medien.

Im Rahmen dieser Arbeit wird als PCR-Klonierungsvektor das linearisierte pUC19 Plasmid und für die Proteinüberexpression pIVEX Vektoren der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Die DNA Fragmente werden vor der Klonierung mittels PCR amplifiziert, sei es um über genügend DNA für den ungerichteten Einbau in Vektoren mit glatten Enden zu verfügen, oder mit den bei der PCR verwendeten Startsequenzen Restriktionsschnittstellen einzufügen, die einen gerichteten Einbau in Vektoren mit kohäsive Enden ermöglicht.

3.2.1.1. Direkter Einbau von PCR Fragmenten mit glatten Enden

10 μ g pUC19 Plasmid DNA werden in 50 μ l 1x SURE Puffer A mit 30 E *Sma*I üN bei RT inkubiert. Der Ansatz wird mit dem JETquick PCR Purification Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) aufgereinigt. Für die Dephosphorylierung der *Sma*I hydrolysierten pUC19 DNA wird das Eluat in 50 μ l 1x CIP Puffer mit 3 E alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (*calf intestine phosphatase CIP*) bei 37 °C für 45 min und 56 °C für 30 min inkubiert. Die DNA wird in einer Ethanol-fällung konzentriert und präparativ über ein 0.8 % Agarosegel aufgereinigt. Die Rückgewinnung der *Sma*I hydrolysierten, dephosphorylierten pUC19 DNA aus dem ausgeschnittenen Agarosegelstück erfolgt über den JETquick Gel Extraction Kit (Genomed, Bad Oeynhausen).

PCR Produkte liegen in der unphosphorylierten Form vor und müssen zuerst an den 5' Enden mit der T4 Polynukleotidkinase phosphoryliert werden bevor sie in den *Sma*I-geschnittenen und dephosphorylierten pUC19 Vektor ligiert werden können. Der PCR Reaktionsansatz wird über den JETquick PCR Purification Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) aufgereinigt und das Eluat in 50 μ l 1x PNK Puffer mit 1 mM ATP und 5 E T4 Polynukleotidkinase (ohne 3' Phosphataseaktivität) bei 37 °C für 1 h inkubiert. Der Ansatz wird in einer Ethanol-fällung konzentriert und präparativ über ein Agarosegel aufgereinigt, aus dem das gewünschte DNA Fragment ausgeschnitten und mit dem JETquick Gel Extraction Kit zurückgewonnen wird.

3.2.1.2. Gerichteter Einbau von DNA Fragmenten

10 µg Plasmid DNA sowie der aufgereinigte PCR Ansatz werden jeweils in getrennten Ansätzen zuerst mit der ersten Restriktionsendonuklease vollständig hydrolysiert und nach Aufreinigung mit dem JETquick PCR Purification Kit (Genomed, Bad Oeynhausen) mit der zweiten Restriktionsendonuklease vollständig hydrolysiert. Die beiden Ansätze werden jeweils mit einer Ethanolfällung konzentriert und präparativ über ein Agarosegel aufgereinigt.

3.2.2. Ligation von DNA Fragmenten

Für einen Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 µl 1x Ligationspuffer werden 50 ng Vektor DNA mit der Fragment DNA im 3fachen molaren Überschuss versehen. Nach Zugabe von 0.5 E T4 DNA Ligase wird bei 16 °C üN inkubiert.

3.2.3. Transformation von Ligationsansätzen

Die Aufnahme von Plasmid DNA durch Bakterien wird im molekularbiologischen Sprachgebrauch als Transformation bezeichnet und findet normalerweise nicht spontan statt. Im Rahmen dieser Arbeit wird die physikalische Transformation mit Hilfe der Elektroporation verwendet. In einer Mischung aus einer *E. coli* Bakteriensuspension mit dem Ligationsansatz wird durch ein starkes elektrisches Feld die negativ geladene Plasmid DNA stark beschleunigt und trifft auf bakterielle Zellwände. Durch das Bombardment mit der Plasmid DNA wird so die Barriere der bakteriellen Zellwand überwunden. Das dabei angelegte elektrische Feld ist dabei so hoch, dass nur etwa die Hälfte der Bakterien, die Plasmid DNA aufgenommen haben überleben.

3.2.3.1. Herstellung elektrokompenter Bakterien

1 l LB Medium werden mit 10 ml einer frischen üN Kultur eines *E. coli* Stamms angeimpft und bei 37 °C und 150 UpM geschwenkt bis die Zelldichte eine Absorption A_{600} von 0.5 – 0.7 erreicht hat. Nach 20 minütiger Abkühlung auf Eis werden die Bakterien bei 8000 g für 15 min sedimentiert (Beckman JA14, 7200 UpM) und das Zellsediment zuerst mit 1 l eiskalter 10 % Glycerinlösung resuspendiert und erneut bei 8000 g für 15 min sedimentiert. Analog werden die Waschschrte mit 500 und 50 ml 10 % Glycerin durchgeführt. Das Sediment wird letztlich ad einem Volumen von 3 ml mit 10 % Glycerin resuspendiert, zu Aliquoten von 45 µl aufgeteilt und bei -80 °C gelagert.

3.2.3.2. Transformation elektrokompenter Bakterien

Das Aliquot elektrokompenter Bakterien Zellen wird auf Eis aufgetaut und mit 1 – 2 µl Ligationsansatz versetzt. Die Mischung wird in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgt im Micro-Pulsar (BioRad, München) mit dem Programm "Eco2". Der bei der Spannung von 2.5 kV durchgeführte Puls sollte hierbei ca. 5 ms betragen. Nach erfolgter Elektroporation nimmt man den Ansatz sofort in 1 ml LB-Medium auf, schüttelt bei 37 °C für 60 min, bevor auf selektivem Medium ausplattiert wird.

3.2.4. Selektion von nicht-rekombinanter Plasmid DNA

3.2.4.1. durch α -Komplementierung

Die multiple Klonierungsstelle des Plasmids pUC19 liegt innerhalb des Leserasters des lac Z' Gens, das für den aminoterminalen Bereich der β -Galactosidase codiert. Mit nur sehr wenigen Ausnahmen wird durch den Einbau eines DNA-Fragments in die multiple Klonierungsstelle die Expression des funktionellen aminoterminalen Fragments der β -Galactosidase zerstört. In den verwendeten *E. coli* Stämmen JM109 und XL1-Blue MRF wird nach Induktion mit IPTG eine inaktive Form der β -Galactosidase exprimiert, die nur über die Komplementierung des funktionellen α -Fragments enzymatisch aktiv ist. Bei der Farbreaktion wird der Galactosebaustein in X-gal hydrolysiert und so ein Indolderivat freigesetzt, das zur Aufbildung einer tiefblauen Farbe befähigt ist.

Wird ein Transformationsansatz auf eine LB-Agar Platte mit Amp, IPTG und X-gal ausplattiert, sollten nach Inkubation bei 37 °C üN weiße und blaue Kolonien sichtbar sein, wobei es sich bei den weißen Kolonien um Bakterien mit nicht-rekombinanter Plasmid DNA handelt.

3.2.4.2. durch Restriktionsspaltung

Wird ein PCR-Fragment in den *Sma*I-hydrolysierten pUC19 Vektor ligiert, so wird die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Sma*I zerstört. Nach erfolgter Ligationsreaktion wird zuerst die T4 DNA Ligase durch Inkubation bei 60 °C für 10 min inaktiviert. Die gebildete rekombinante Plasmid DNA wird sodann mit 5 E *Sma*I bei RT für 1 h hydrolysiert.

Wird ein DNA-Fragment durch den gerichteten Einbau in einen Vektor ligiert, so liegen meist zwischen den beiden verwendeten noch weitere Restriktionsschnittstellen, die bei dem Klon mit der nicht-rekombinanten Plasmid DNA fehlen. Durch Inkubation mit einer dieser weiteren Restriktionsendonukleasen wird somit nur die rekombinante Plasmid DNA hydrolysiert.

Wird ein neues Plasmid einzig über die PCR synthetisierte DNA aufgebaut, so liegt dieses Plasmid unmethyliert vor. Die von *dam*⁺ *E. coli* Bakterien gewonnene Plasmid DNA ist jedoch methyliert und wird so selektiv von der Restriktionsendonuklease *Dpn*I, die die Sequenz G^mATC erkennt, statistisch alle 256 Basen hydrolysiert.

3.2.5. Aufreinigung von Plasmid DNA aus *E. coli*

Für eine weitere Handhabung muss die Plasmid DNA aus den *E. coli* Bakterien gewonnen werden. Dafür wird LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37 °C üN in die stationäre Phase wachsen lassen. Bei *high copy* Plasmiden lassen sich pro ml LB üN Kultur 3 bis 10 µg Plasmid DNA isolieren. Die Bakterien werden in einer alkalischen Lyse aufgeschlossen. Nach der Neutralisation präzipitieren bakterielle Zelltümmer, chromosomale DNA und Kalium-SDS-Proteinkomplexe und werden durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand enthält die Plasmid DNA und wird chromatographisch aufgereinigt. Die Plasmid DNA kann zum einen unter cheletropen Salzbedingungen an eine Silica Matrix gebunden und nach erfolgten Waschschritten mit ddH₂O in aufgereinigter Form eluiert werden. Zum anderen kann die Aufreinigung der Plasmid DNA über Ionenaustausch-Chromatographie mit DEAE gekoppelt an einen Silicaträger durchgeführt werden. Die

Bindung an die Säule erfolgt unter moderaten Salzbedingungen und nach einem Waschschrift mit 1 M NaCl erfolgt die Elution mit 1.25 M NaCl.

3.2.5.1. im analytischen Maßstab

4 ml LB üN Bakterienkultur werden mittels des "JET Quick Plasmid Miniprep Spin Kit" (Genomed, Bad Oeynhausen) nach Herstellerangaben verarbeitet. Die Plasmid DNA wird mit 75 µl auf 70 °C erhitztes ddH₂O eluiert. Von den zurückgewonnenen 65 µl an Plasmid DNA Lösung werden 5 µl für eine UV-spektroskopische Konzentrationsbestimmung, bzw. für eine analytische Restriktionshydrolyse verwendet.

3.2.5.2. im präparativen Maßstab

Größere Mengen an Plasmid DNA, die darüber hinaus eine höhere Reinheit und Qualität für weitere Applikationen aufweisen, können über den Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) gewonnen werden. Die Durchführung der Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben, lediglich das Volumen für den Resuspendierungs-, Lyse- und Neutralisationspuffers wurde von 4 auf 8 ml erhöht. Von 25 ml LB üN Bakterienkultur können 50 bis 150 µg Plasmid DNA gewonnen werden, die man 100 µl ddH₂O löst.

3.2.6. Amplifikation und Aufreinigung von λDNA aus Bakteriophagen

Das Genom des Bakteriophagen λ besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA von ca. 50 kb Länge. Aufgrund der einfachen Packung von λDNA mit den Hüllproteinen und der effizienten Infektion und Vermehrung im *E. coli* Wirt werden vom λ-Phagen abgeleitete Vektoren häufig für die Erstellung von DNA Genbanken verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wird eine von J.R. Ecker erstellte cDNA Genbank aus *Arabidopsis thaliana* im Bakteriophagen λZap II verwendet (Gubler *et al.*, 1983), deren cDNA Insertgröße zuvor auf 3 – 6 kb selektioniert worden ist. Die Konzentration einer Phagensuspension wird in den "Plaques bildenden Einheiten" auf einem Bakterienrasen von *E. coli* angegeben und kann in einer Titerbestimmung ermittelt werden.

Für λZap II wird als Wirt *E. coli* XL-1 Blue MRF' verwendet. 20 ml LB Medium mit 0.2 % Maltose werden mit *E. coli* XL1-Blue MRF' angeimpft und üN bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien werden in einer Zentrifugation bei 500 g für 10 min sedimentiert, in 10 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert und bei 4 °C für maximal 1 – 2 Wochen gelagert.

Die Amplifizierung der cDNA Genbank erfolgt über Plattenlysate. 300 µl Bakteriensuspension werden mit 100.000 PBE bei 37 °C für 15 min inkubiert, zu 6 ml auf 46 °C vorgewärmte Top-Agarose durchmischt und auf eine auf 37 °C vorgewärmte 14.5 cm LB-Agar Platte ausplattiert. Nach Inkubation bei 37 °C für 7 – 9 h sollte die konfluente Lyse erreicht werden. Man lässt die LB-Agar Platte auf 4 °C abkühlen, überschichtet mit 15 ml SM-Medium und schüttelt vorsichtig bei 4 °C üN. Die Mischung aus SM-Medium, Top-Agarose und Phagen-Partikeln wird mit einem Drigalski-Spatel in einen Zentrifugenbehälter überführt und bei 10.000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand enthält die Phagenpartikel und kann bei 4 °C für mind. 3 Monate gelagert werden. Für längere Zeiträume wird DMSO zur Endkonzentration von 7 % zugegeben und bei -70 °C gelagert.

Die Aufreinigung der λ DNA aus der Phagensuspension erfolgt nach dem λ DNA Aufreinigungsprotokoll der Firma Qiagen (Hilden) mit Tip20 Anionenaustauschersäulen. 10 ml Phagensuspension werden mit 30 μ l Puffer L1 bei 37 °C für 30 min inkubiert und so über die RNase A und DNase I Hydrolyse von Ribonukleinsäuren und chromosomaler DNA befreit. Mit der Zugabe von 2 ml Puffer L2 wird auf Eis 60 min inkubiert, so dass die Phagenpartikel mit Polyethylenglykol ausgefällt, durch Zentrifugation bei 10.000 g für 10 min sedimentiert und in 1 ml Puffer L3 resuspendiert werden. Die SDS Lyse wird durch Zugabe von 1 ml Puffer L4 initiiert und durch Inkubation bei 70 °C für 10 min vervollständigt. Das Lysat wird mit 1 ml Puffer L5 neutralisiert und die ausgefallenen Kalium-SDS-Proteinaggregate durch Zentrifugation bei 15.000 g für 30 min entfernt. Die Tip20 Säulen werden mit 1 ml Puffer QBT äquilibriert, mit dem klaren Phagenlysat beladen, zweimal mit 2 ml Puffer QC gewaschen und mit 1.5 ml Puffer QF eluiert. Die aufgereinigte Phagen DNA im Elutionspuffer QF wird durch Zugabe von 1 ml Isopropanol präzipitiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 50 μ l ddH₂O gelöst.

Suspensions Medium (SM):

50	mM	Tris-Cl, pH 7.5
100	mM	NaCl
8	mM	MgSO ₄
0.01	%	Gelatine

Puffer L1:

100	mM	Tris-Cl, pH 7.5
300	mM	NaCl
10	mM	Na ₂ EDTA
0.2	mg/ml	BSA
20	mg/ml	RNase A
6	mg/ml	DNase I

Puffer L2:

30	%	Polyethylenglykol PEG 6000
3	M	NaCl

Puffer L3:

100	mM	Tris-Cl, pH 7.5
100	mM	NaCl
25	mM	Na ₂ EDTA

Puffer L4:

4	%	SDS
---	---	-----

Puffer L5:

3	M	KOAc, pH 5.5
---	---	--------------

Puffer QBT, QC und QF:

werden von dem Qiagen Plasmid Midi Kit verwendet

3.3. *In vitro* Transkription von tRNAs

Für die Untersuchung der tRNA Spleißreaktion werden intronhaltige pre-tRNAs mit prozessierten 5' und 3' Enden benötigt. Die Synthese kann zum einen über *in vitro* Kernextrakte aus *HeLa* bzw. *Nicotiana tabacum* BY-2 Zellen erfolgen. Hier transkribiert die eukaryontische RNA Polymerase III Vorläufer transfer Ribonukleinsäuren (tRNA), die von der RNase P, der tRNase Z und der Nukleotidyltransferase an den 5' und 3' Flanken prozessiert werden. Zum anderen können große Mengen an intronhaltiger pre-tRNA enzymatisch mit der T7 RNA Polymerase transkribiert werden. Die mittels des T7 Enzyms transkribierte tRNA unterscheidet sich mit dem Triphosphat am 5' Ende und

der Abwesenheit von einer Vielzahl von Basenmodifizierungen von der im eukaryontischen Kernextrakt synthetisierten tRNA.

3.3.1. Transkription von pflanzlichen transfer Ribonukleinsäuren im HeLa Kernextrakt

Die genomischen Abschnitte von einer Vielzahl von intronhaltigen tRNA Genen aus niederen und höheren Pflanzen sind mittlerweile kloniert worden, und die jeweilig entsprechende Plasmid DNA kann direkt für die *in vitro* Transkription im *HeLa* Kernextrakt eingesetzt werden. Der in dieser Arbeit verwendete *HeLa* Kernextrakt H4 wurde gemäß der Vorschrift von Dignam *et al.* (1983) hergestellt, gegen Puffer D dialysiert und zu Aliquoten von 50 µl in flüssigen Stickstoff gelagert (Junker, 1999).

Puffer D:

20	mM	HEPES, pH 7.9
20	%	Glycerin
100	mM	KCl
0.2	mM	Na ₂ EDTA
0.5	mM	PMSF
0.5	mM	DTT

Die für eine erfolgreiche *in vitro* Transkription erforderlichen Komponenten werden in einer 5x fach konzentrierten Nukleotid-Salz-Lösung zugegeben. Ein analytischer Transkriptionsansatz wird in einem Endvolumen von 10 µl mit 300 ng Plasmid DNA und 5 µl *HeLa* Kernextrakt durchgeführt. Präparative Transkriptionsansätze können auf ein Endvolumen von 50 µl hochskaliert werden. Die Nukleotid-Salz-Lösung setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponenten	Stamm	Volumen	Konz. im 5x Mix	Endkonzentration
ATP, CTP, UTP	30 mM	2 µl	3 mM	0.6 mM
GTP	1.35 mM	2 µl	135 µM	27 µM
[α ³² P]GTP	25 µM	2 µl	2.5 µM	0.4 µM
Creatinphosphat	0.5 M	2 µl	50 mM	10 mM
KCl	1.25 M	2 µl	125 mM	75 mM
MgCl ₂	250 mM	0.4 – 2 µl	5 – 25 mM	1 – 5 mM
ddH ₂ O		ad 20 µl		

Nach Inkubation bei 30 °C für 90 min wird die Transkription durch Zugabe von 4 Vol Stopp-Puffer beendet. Die Nukleinsäuren werden in einer Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt, präzipitiert, in HE-Probenpuffer aufgenommen und über ein denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die radioaktiv markierten Transkripte werden über Autoradiographie visualisiert.

Stopp Puffer:

200	mM	NaOAc, pH 5.5
40	ng/µl	tRNA _γ

HE-Probenpuffer:

8	M	Harnstoff
1	mM	Na ₂ EDTA

3.3.2. Transkription von pflanzlichen transfer Ribonukleinsäuren mit der T7 RNA Polymerase

Die Transkription mit dem Bakteriophagen Enzym der T7 RNA Polymerase ermöglicht die effiziente *in vitro* Transkription von Ribonukleinsäuren, deren Gene unter der Kontrolle des T7-Promotors mit der Basensequenz $^{-17}\text{TAATACGACTCACTATA}^{-1}$ stehen. Für die Initiation der Transkription ist vor allem das erste transkribierte Nukleotid entscheidend, wobei die Effizienz mit $G > A > C \gg U$ abnimmt. Die definierte Termination der Transkription wird über die Restriktionshydrolyse der Matrizen DNA am 3' Ende gewährleistet. Für tRNA Gene wird daher direkt nach der Diskriminatorbase die Erkennungssequenz $\text{CCA}\downarrow\text{GG}$ für die Restriktionsendonuklease *Bst*NI kloniert (Reyes und Abelson, 1987).

Die T7 Transkription wurde zum einen nach der Originalvorschrift von Milligan und Uhlenbeck (1989) durchgeführt, wobei die T7 RNA Polymerase nach Zawadzki und Gross (1991) überexprimiert und aufgereinigt übernommen wurde.

Komponenten	Stamm	Volumen	Endkonzentration
ATP, CTP, UTP	10 mM	2 μl	1 mM
GTP	2 mM	2 μl	200 μM
$[\alpha^{32}\text{P}]\text{GTP}$	25 μM	8 μl	10 μM
Tris-Cl pH 8.0	400 mM	2 μl	40 mM
MgCl_2	60 mM	2 μl	6 mM
Spermidin	10 mM	2 μl	1 mM
DTT	50 mM	2 μl	5 mM
Plasmid DNA, <i>Bst</i> NI hydr.	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1 μl	50 $\text{ng}/\mu\text{l}$
T7 RNA Polymerase	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	0.5 μl	25 $\text{ng}/\mu\text{l}$
ddH ₂ O		ad 20 μl	

Für einen möglichst hohen Umsatz bei der T7 Transkription sind mehrere Aspekte zu beachten. Das von Milligan und Uhlenbeck (1989) ermittelte Mg^{2+} -Optimum von 6 mM liegt nur bei niedriger Nukleotidkonzentrationen vor, zudem werden im Verlauf der Transkription freie Mg^{2+} Ionen dem Reaktionsansatzes entzogen, da sich unlösliche Magnesiumphosphate bilden. Daher wird standardmäßig die T7 Transkription bei 12 – 48 mM MgCl_2 durchgeführt. Das gebildete Pyrophosphat hemmt zudem die T7 Transkription, kann jedoch durch Zugabe der Hefe Pyrophosphatase zu Phosphat abgebaut werden. Zudem können selbst bei sehr sauberen Arbeiten nicht grundsätzlich Spuren von RNasen ausgeschlossen werden, so dass prinzipiell ein RNase Inhibitor den Transkriptionsansätzen zugegeben wird. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte kann die Ausbeute ca. um den Faktor 2 bis 10 erhöht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die T7 Transkription vorwiegend mit dem RiboMax T7 Transkriptions Kit (Promega, Mannheim) durchgeführt.

Komponenten	Stamm	Volumen	Endkonzentration
ATP, CTP, UTP-Mix	10 mM	2 μ l	1 mM
GTP	2 mM	2 μ l	200 μ M
[α ³² P]GTP	25 μ M	8 μ l	10 μ M
5x Tk Puffer:		4 μ l	
HEPES KOH pH 8.0	400 mM		40 mM
MgCl ₂	120 mM		24 mM
Spermidin	10 mM		2 mM
DTT	200 mM		40 mM
Plasmid DNA, <i>Bst</i> NI hydr.	1 μ g/ μ l	1 μ l	50 ng/ μ l
Enzym Mix:		2 μ l	
T7 RNA Polymerase			
Hefe Pyrophosphatase			
RNasin Inhibitor			
ddH ₂ O		ad 20 μ l	

Der T7 Transkriptionsansatz wird bei 37 °C für 60 bis 180 min inkubiert, präzipitiert und über ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das über Autoradiographie sichtbar gemachte Transkript wird mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und über Diffusionselution zurückgewonnen. Die Ausbeute an aufgereinigter pre tRNA beläuft sich auf ca. $2 \cdot 10^6$ bis $4 \cdot 10^7$ cpm (2 bis 40 pmol, 50 ng bis 1 μ g). Das RNA Sediment wird in ddH₂O ad 40 000 cpm/ μ l gelöst, bei -20 °C gelagert und kann ca. 3 Wochen für *in vitro* tRNA Prozessierungsreaktionen verwendet werden.

3.4. *In vitro* Prozessierung von pre-tRNAs

An der Reifung einer intronhaltigen Vorläufer tRNA mit 5' und 3' Flanke sind mehrere enzymatische Aktivitäten beteiligt. Die RNase P schneidet endonukleolytisch die 5' "Leader" Sequenz, während der 3' "Trailer" vorwiegend endonukleolytisch über die tRNase Z prozessiert wird. Die Exzision des Introns erfolgt über die tRNA Spleißendonuklease und die Ligation der entstandenden tRNA Hälften findet durch die tRNA Ligase statt. Alle enzymatischen Aktivitäten konnten in Extrakten aus Weizenkeimen, im *Nicotiana tabaccum* Kernextrakt und im *HeLa* Kernextrakt nachgewiesen werden. Die Analyse der jeweiligen Einzelschritte erfordert ein passendes Substrat. Die Analyse der Intron-Exzision geht günstigerweise von intronhaltigen pre-tRNAs mit prozessierten 5' und 3' Enden aus. Für die Untersuchung der Ligationsreaktion sollten die tRNA Hälften und das lineare Intron jeweils mit einem 2',3'-Cyclophosphat und einer 5'-Hydroxylgruppe im genügenden Überschuss vorliegen.

3.4.1. tRNA Spleißendonuklease-Nachweis

Die analytische Spleißreaktion wird standardmäßig in einem Endvolumen von 20 μ l durchgeführt. Die erforderlichen Komponenten werden in einem 2fach konzentrierten Spleißpuffer vorgelegt und mit $1 \cdot 10^4$ bis $4 \cdot 10^4$ cpm (10 – 40 fmol) Transkript und 1 – 6 μ l Extrakt bzw. Proteinfraction ad 20 μ l mit ddH₂O supplementiert. Nach Inkubation bei 37 °C für 30 – 60 min wird die Reaktion durch Zugabe von 40 μ l Stopp Puffer beendet, der Ansatz phenolisiert, präzipitiert und gelektrophoretisch über ein 12.5 % denaturierendes Polyacrylamidgel analysiert.

2x Spleißpuffer	Stamm	Volumen	2x Konzentration	1x Konzentration
Tris-Cl, pH 7.5	500 mM	400 µl	20 mM	10 mM
KOAc	2.5 M	800 µl	200 mM	100 mM
Mg(OAc) ₂	150 mM	800 µl	12 mM	6 mM
Spermin	30 mM	100 µl	0.3 mM	0.15 mM
DTT	500 mM	20 µl	1 mM	0.5 mM
ATP	100 mM	200 µl	2 mM	1 mM
GTP	100 mM	100 µl	1 mM	0.5 mM
Triton X-100	10 %	1000 µl	1 %	0.5 %
ddH ₂ O		ad 10 ml		

Der tRNA Spleißendonuklease-Nachweis findet mit einer pflanzlichen intronhaltigen pre-tRNA statt. Die optionale Ligation der entstehenden Hälften kann unterbunden werden, wenn ein Spleißpuffer ohne ATP und GTP verwendet wird. Bei der 1x Endkonzentration werden die Salzkonzentrationen des Extrakts bzw. der Proteinfraction nicht berücksichtigt. Vor allem Sulfat- und Phosphationen hemmen die am tRNA Spleißen beteiligten Enzyme.

3.4.2. tRNA Ligase-Nachweis

Der tRNA Ligase-Nachweis kann über tRNA Hälften erfolgen, die *in situ* durch die endogen vorhandene tRNA Spleißendonuklease gebildet worden sind. Für Ligase-angereicherte Proteinfractionen ist jedoch nicht mehr genügend tRNA Spleißendonuklease vorhanden.

Große Mengen an tRNA Hälften lassen sich über die Hydrolyse der chimären Archeuka pre-tRNA mit der rekombinanten tRNA Endonuklease aus *Methanocaldococcus jannaschii* bilden. Das aufgereinigte T7 Transkript (10 – 40 *10⁶ cpm, 10 – 40 pmol) wird in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 10 mM Tris-Cl, pH 7.6, 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 40 µM Spermin und 2 µg rekombinanten Enzym bei 65 °C für 10 min inkubiert. Nach einer Phenolextraktion werden die gebildeten RNA Produkte präzipitiert und das Sediment in ddH₂O ad 40.000 cpm/µl (40 fmol/µl) gelöst und können für den tRNA Ligase-Nachweis verwendet werden.

Die analytische Nachweisreaktion findet in 20 µl 1x Spleißpuffer mit 40 fmol tRNA Hälften und 1 – 6 µl Extrakt bzw. Proteinfraction statt. Nach Inkubation bei 37 °C für 10 – 30 min werden die gebildeten RNA Produkte phenolisiert, präzipitiert und über ein 13 % denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt.

3.4.3. Adenylyltransferase-Nachweis

Die RNA Ligasen von Hefen, Pflanzen und Bakteriophagen sind zur kovalenten Bindung von AMP an die Aminogruppe des Lysins aus dem Nukleotidyltransferase Motiv 1 "KxxG" befähigt und liegen normalerweise in der adenylierten Form vor. Nach der Übertragung von AMP auf den 5'-Phosphat Terminus von RNA gehen die RNA Ligasen bei Anwesenheit von ATP eine Adenylierungsreaktion ein. Bei der Inkubation einer Enzymfraction mit RNA Substrat und [α-³²P]ATP wird somit das RNA Ligase Protein mit [³²P]AMP markiert.

Bei dem Adenylyltransferase-Nachweis werden 10 µl Proteinfraction mit 40 fmol Archeuka tRNA Hälften und 1 pmol [α-³²P]ATP bei 37 °C für 10 min inkubiert, bevor die Reaktion mit 1 Vol 2x SDS Ladepuffer gestoppt wird. Nach Auftrennung und Silberfärbung der Proteine in einem SDS Proteingel wird das getrocknete Gel über Autoradiographie ausgewertet.

3.5. Analyse von pre-tRNAs

Neben der gelelektrophoretischen Analyse von RNA nach dem Molekulargewicht existieren eine Reihe weiterer Analysemethoden, die eine gezielte Charakterisierung von Ribonukleinsäuren ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Primer Extension Analyse und die spezifische Hydrolyse von RNA mittels Ribonukleasen für eine gelelektrophoretische und dünnenschichtchromatographische Analyse der gebildeten Produkte verwendet.

3.5.1. Primer Extension Analyse

Die Primer Extension Analyse dient der Bestimmung des 5' Endes von Ribonukleinsäuren. Eine 5'- ^{32}P -markierte DNA-Startsequenz wird an die RNA Matrize hybridisieren lassen und dient einer reversen Transkriptase als Initiationpunkt für die Synthese eines DNA-Strangs, die an dem 5'-Ende der zu untersuchenden Ribonukleinsäure zum Erliegen kommt. Die gleiche Startsequenz wird für eine Sanger-Sequenzierung mit dem Gen, das für die zu untersuchende Ribonukleinsäure codiert, als Matrize durchgeführt. Die synthetisierten DNA-Stränge der Sanger-Sequenzierung und der Primer Extension Analyse werden in einem harnstoffhaltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Autoradiographie visualisiert. Durch Vergleich der Höhe des Primer Extension Produkts mit dem Sanger-Sequenzmuster kann so das 5' Ende der Ribonukleinsäure experimentell ermittelt werden.

Die DNA Startsequenz wird zuerst durch Transfer von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ mit der Polynukleotidkinase mit ^{32}P phosphoryliert und somit markiert.

Komponenten	Stamm	Volumen	Endkonzentration
Startsequenz	10 μM	2.5 μl	2.5 μM
PNK-Puffer	10 x	1 μl	1 x
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$	4 μl	4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$
Polynukleotidkinase	10 E/ μl	0.5 μl	0.5 E/ μl
ddH ₂ O		ad 10 μl	

Der Ansatz wird für 1 h bei 37 °C inkubiert und auf 10 μl in der Speed Vac eingetrocknete HE-Probenpuffer pipettiert. Nach elektrophoretischer Trennung in einem 15 % denaturierenden Polyarylamidgel wird die markierte Startsequenz mittels Autoradiographie lokalisiert, ausgeschnitten und mittels Diffusionselution zurückgewonnen. Bei der anschließenden Ethanol-fällung wird 1 μg Glycogen als Fällhilfe verwendet. Das Sediment wird nach Cerenkov im Tritiumkanal des Szintillationszählers vermessen und ad 100.000 cpm/ μl in ddH₂O gelöst.

Die zu untersuchende Ziel-RNA wird in 9 μl ddH₂O gelöst, mit 1 μl 5'- ^{32}P -markierter Startsequenz supplementiert, 2 min auf 94 °C erhitzt und über einen Zeitraum von 30 min auf RT abkühlen lassen.

Der Primer Extension Reaktionsansatz

Komponenten	Stamm	Volumen	Endkonzentration
Hybridierungsansatz		10 μl	
AMV Puffer	5 x	2.6 μl	1 x
dNTPs	10 mM	1 μl	0.75 mM
AMV Reverse Transkriptase	20 E/ μl	0.4 μl	1 E/ μl
ddH ₂ O		ad 13 μl	

wird 1 h bei 44 °C inkubiert, präzipitiert und für die Auftragung auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel bei – 20 °C gelagert.

3.5.2. Spezifische Hydrolyse von RNA mit Ribonukleasen

In vitro transkribierte und über den Einbau von [α - 32 P]NTP radioaktiv markierte Ribonukleinsäuren können durch Hydrolyse mit spezifischen Ribonukleasen und anschließender analytischer Auftrennung weiter analysiert werden. Ribonuklease T1 spaltet nach dem 3'-Phosphat von Guanosin, RNase A nach dem 3'-Phosphat von Uridin und Cytidin, RNase T2 nach jedem 3'-Phosphat und RNase P1 vor jedem 3'-Phosphat.

RNase T1 Hydrolyse:

Die RNA-Probe wird in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 5 μ g tRNA_c und 2 E RNase T1 für 4 h bei 37 °C inkubiert.

RNase A Hydrolyse:

Die RNA-Probe wird in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 5 μ g tRNA_c und 2 E RNase A für 4 h bei 37 °C inkubiert.

RNase T2 Hydrolyse:

Die RNA-Probe wird in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit 5 mM NH₄OAc, pH 4.6, 5 μ g tRNA_c und 1 E RNase T2 für 5 h bei 37 °C inkubiert.

RNase P1 Hydrolyse:

Die RNA-Probe wird in einem Gesamtvolumen von 20 μ l mit 50 mM NH₄OAc, pH 5.3, 5 μ g tRNA_c und 200 ng RNase P1 für 2 h bei 50 °C inkubiert.

Die jeweiligen Reaktionsansätze werden im Rotationsverdampfer eingetrocknet und in einem passenden Puffer für die nächste Separationsmethode gelöst.

3.5.3. Analyse der RNA Hydrolyseprodukte über Cellulose Dünnschicht-Chromatographie

Die RNase T2 bzw. P1 Hydrolysate werden in 1 μ l Np bzw. pN Markerlösung aufgenommen und über eine ausgezogene Micro-Glaskapillare auf eine 20 x 20 cm Cellulose Dünnschichtplatte aufgetragen und 1 h bei RT eintrocknen lassen. Die Auftragungsorte befinden sich 1.5 cm von der unteren Kante entfernt und belaufen sich auf einen cm Breite. Ein Chromatographie-Tank wird mit 100 ml Laufmittel A (*iso*-Buttersäure/25% Ammoniak/ddH₂O = 57.7/3.8/38.5) oder mit 100 ml Laufmittel B (*iso*-Propanol/32 % Salzsäure/ddH₂O = 70/17.5/12.5) für mindestens 24 h stehen gelassen, so dass sich die Atmosphäre im Tank mit dem Laufmittel vollständig sättigen kann, bevor die DC-Platte eingesetzt wird. Nach 10 bis 15 h ist die Laufmittelfront bis ca. 1 cm unterhalb des oberen Endes der DC-Platte gewandert, die Platte wird jetzt entnommen und 1 h unter dem Abzug trocknen lassen. Die radioaktiv markierten Nukleosid-3'-[32 P]-phosphate bzw. -5'-[32 P]-phosphate werden über Autoradiographie, die Marker Nukleosid-3'-phosphate bzw. -5'-phosphate über Fluoreszenz bei 254 nm visualisiert. Die Auswertung des chromatographischen Laufverhaltens erfolgt mit Hilfe bereits veröffentlichter Daten (Nishimura, 1979).

3.6. Charakterisierung von Proteinen

3.6.1. Allgemeine Handhabung von Proteinen

Proteine werden in einem wässrigen Milieu unter physiologischen Bedingungen gebildet und behalten *in vivo* durch zelluläre Schutzmechanismen ihre native Struktur, die zur Ausübung der Funktion erforderlich ist. Bei der Handhabung von Proteinen nach einem Zellaufschluss ist es erforderlich die native Struktur und die enzymatische Aktivität der Proteine *in vitro* zu erhalten. Physiologische Bedingungen werden über einen Puffer mit definierter Salzkonzentration erhalten. Als Oxidationsschutz wird DTT oder β -Mercaptoethanol zugegeben. Während einzelner Arbeitsschritte ist es oftmals erforderlich Pufferbedingungen zu ändern, Proteinlösungen zu konzentrieren oder Proteine zu präzipitieren.

3.6.1.1. Dialyse

Bei der Dialyse werden semipermeable Membranen verwendet, die mit definierter Porengröße ein Konzentrationsausgleich von kleinen Partikeln ermöglicht, jedoch Makromoleküle oberhalb der molekularen Ausschlussgröße zurückhalten. Proteinlösungen können so in pH- und Salzkonzentration dem Dialysepuffer angepasst werden.

Vor dem Gebrauch werden die Dialyseschläuche einmal in 1 % (w/v) Na_2CO_3 mit 1 mM Na_2EDTA und anschließend zweimal mit ddH_2O aufgekocht und bei 4 °C gelagert. Bei der Durchführung der Dialyse ist zu beachten, dass sich die Dialyse über einen Zeitraum von mindestens 5 h erstreckt und für einen kompletten Pufferaustausch unter zweifachen Pufferwechsel je das 100fache Volumen an Dialysepuffer benötigt wird.

3.6.1.2. Ultrafiltration

Kleine Volumina an Proteinlösungen können mit den Mikrokonzentratoren microcon-30 und microcon-100 konzentriert und umgepuffert werden. Eine semipermeable Membran mit einer Ausschlussgröße von 30 und 100 kDa befindet sich am Boden des Zentrifugeneinsatz in den die Proteinlösung gegeben wird. Während der Zentrifugation bei max. 14.000 g wird das Wasser und kleine Partikel durch die Membran in ein Auffanggefäß passieren lassen, die Makromoleküle werden jedoch retardiert. Wird eine so ca. 25fach konzentrierte Proteinlösung zweimal im Puffer verdünnt und erneut konzentriert, erfolgt ein Pufferaustausch und optional eine Konzentrierung der Proteinlösung.

3.6.1.2. Entsalzung mit Sephadex G25

Proteinlösungen können effizient über eine Gelfiltration mit Sephadex G25 umgepuffert werden. Das Sephadex G25 Pulver wird gemäß Herstellerangaben 1 h im kochenden Wasserbad vorgequollen, in eine Chromatographie-Säule gepackt und mit 3 Säulenvolumen Puffer equilibriert. Die Proteinlösung mit einem Volumen, das maximal 30 % des Säulenvolumens beträgt, wird auf die Säule aufgetragen und mit Puffer eluiert. Das Eluat wird in Fraktionen gesammelt und über UV-Absorption bei 280 nm auf die Anwesenheit von Protein analysiert. Die Proteine gehen keine Wechselwirkung mit dem Gelfiltrationsmedium ein und eluieren sehr früh von der Säule. Kleine Partikel bis 5000 Da diffundieren während der Gelfiltration in die Poren von Sephadex G25, werden retardiert und verlassen die Säule

erst bei einem deutlich höheren Elutionsvolumen. Die Proteinlösung im Eluat befindet sich jetzt in dem Milieu des Puffers und wird bei einer Rückgewinnung von 95 % um den Faktor 1.3 verdünnt.

3.6.1.3. Präzipitation unter denaturierenden Bedingungen

Proteine können aus wässrigen Lösungen mit dem Zusatz von Trichloressigsäure und / oder Aceton ausgefällt und somit konzentriert und von Salzen befreit werden. Da hierbei die Proteine denaturiert werden, eignet sich die Präzipitation vorwiegend als Probenvorbereitung für die denaturierende Elektrophorese von Proteinen, bei der das Probenvolumen limitiert ist und die Anwesenheit von Salz sich störend auswirken kann.

Proteinlösungen mit einer Konzentration oberhalb 1 mg/ml werden mit 3 Vol eiskaltem Aceton versetzt und 30 min bei -20 °C fällen lassen, bevor 15 min bei 25.000 g (Biofuge, 17.000 UpM, 4 °C) zentrifugiert wird. Das Sediment wird im offenen Reaktionsgefäß an der Luft trocken lassen und in 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Stark verdünnte Proteinlösungen werden mit 1 Vol 10 % Trichloressigsäure versetzt, 30 min bei -20 °C inkubiert und die ausgefallenen Proteine 15 min bei 25.000 g (Biofuge, 17.000 UpM, 4 °C) zentrifugiert. Das Sediment wird anschließend zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, so von restlicher Trichloressigsäure befreit und in einem geeigneten Puffer gelöst.

3.6.2. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Die Zonenelektrophorese nach dem Molekulargewicht wird für Proteine mit der Behandlung des anionischen Detergenz SDS (engl.: sodium dodecylsulfate) erreicht, das sich effektiv an die Polypeptidkette anlagert und die Eigenladung der Proteine quasi vollständig überlagert. Vorhandene Disulfidbrücken werden durch Erhitzung mit β -Mercaptoethanol oder DTT reduziert. Es resultieren mit SDS-beladene lineare Polypeptidketten, die in einem Polyacrylamidgel von der Kathode zur Anode wandern. Proteine neigen jedoch beim Einlauf in ein Polyacrylamidgel zur Aggregation und Präzipitation, und es resultiert eine unsaubere Zonenseparierung des Proteingemischs unter Ausbidung eines Proteinschmiers. Daher wird im Rahmen dieser Arbeit das diskontinuierliche Elektrophoresesystem nach (Laemmli, 1970) mit dem Puffersystem Tris-Glycin / Tris-Cl pH 6.8 / Tris-Cl pH 8.8 / Tris-Glycin verwendet. Beim Eintritt der Proteinprobe in das 5 %ige Sammelgel mit pH 6.8 erfolgt eine isotachometrische Migration und Fokussierung des Proteingemischs, das mit dem Erreichen des Trenngels mit pH 8.8 in einer Zonenelektrophorese gemäß dem Molekulargewicht aufgetrennt wird. Dabei liegt ein linearer Bezug zwischen zurückgelegter Wegstrecke und dem Logarithmus des Molekulargewichts vor. Bei Verwendung eines geeigneten Proteinmarkers kann so das Molekulargewicht eines Proteins bestimmt werden.

Trenngel	7.5 %	10 %	12.5 %	15 %
30 % Acrylamid	7.5 ml	10.0 ml	12.5 ml	15.0 ml
2 % Bisacrylamid	3.0 ml	4.0 ml	5.0 ml	6.0 ml
1.5 M Tris-Cl, pH 8.8	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml	7.5 ml
ddH ₂ O	11.5 ml	8.0 ml	4.5 ml	1.0 ml
2 min im Wasserstrahlvakuum evakuieren				
10 % SDS	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
20 % APS	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
Gesamt	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml

Sammelgel	5 %
30 % Acrylamid	2.5 ml
2 % Bisacrylamid	1.0 ml
0.5 M Tris-Cl, pH 6.8	3.7 ml
ddH ₂ O	7.5 ml
2 min evakuieren	
10 % SDS	150 µl
20 % APS	200 µl
TEMED	10 µl
gesamt	15 ml

SDS Probenpuffer	2x SP	1x SP
0.5 M Tris-Cl, pH 6.8	1.0 ml	0.5 ml
10 % SDS	2.0 ml	1.0 ml
86 % Glycerin	1.0 ml	0.5 ml
14 M β-Mercaptoethanol	0.3 ml	0.15 ml
ddH ₂ O	0.8 ml	150 µl
gesamt	5 ml	5 ml

Elektrophoresepuffer	1x
Glycin	15 g
Tris-Base	5 g
10 % SDS	15 ml
ddH ₂ O	ad 1 l

Proteinegele mit 1 mm Dicke werden zwischen 2 Glasplatten, die durch Abstandhalter separiert und abgedichtet sind, in vertikaler Lage polymerisieren lassen. Die Trenngellösung wird 2 min unter Wasserstrahlvakuum evakuiert, mit SDS, APS und TEMED supplementiert und bis 2,5 cm unterhalb des oberen Rands der ausgeschnittenen Glasplatte gegossen und mit ddH₂O überschichtet. Nach 10 min ist das Trenngel auspolymerisiert, und das überschichtete Wasser wird entfernt. Die evakuierte, mit SDS, APS und TEMED supplementierte Sammelgellösung wird auf das Trenngel gegossen und von einem Taschenformer am oberen Ende abgeschlossen. Nach weiteren 10 min ist das Sammelgel polymerisiert, der Taschenformer sowie der gegenüberliegende Abstandhalter können entfernt und die Taschen mit 1x Lämmli-Elektrophoresepuffer gespült werden. Das Gel wird mit den beiden Glasplatten in die Elektrophoreseapparatur festgeklemmt, in die so lange 1x Lämmli-Elektrophoresepuffer gegeben wird, bis das Gel im vollständigen Kontakt mit dem Puffer steht.

Die Proteinproben werden in 1x SDS Probenpuffer 5 min auf 95 °C erhitzt, somit vollständig denaturiert und nach Abkühlung auf RT in die jeweiligen Taschen pipettiert. Der elektrophoretische Lauf erfolgt zuerst bei 30 mA bis die über BPB sichtbare Pufferfront das Trenngel erreicht hat und wird bei 45 mA fortgesetzt. Direkt nach dem Austritt des Bromphenolblau-Farbstoffs aus dem Trenngel wird die Elektrophorese beendet.

Die im Polyacrylamidgel separierten Proteine können direkt über Coomassie- bzw. Silberfärbung sichtbar gemacht, mittels Western Blot auf eine PVDF Membran übertragen, sowie bei Anwesenheit von ^{35}S - oder ^{32}P markierten Proteinen über Fluorographie oder Autoradiographie analysiert werden.

3.6.2.1. Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Nach erfolgter elektrophoretischer Trennung in einem Polyacrylamidgel müssen die Proteine zuerst fixiert werden, um den Verlust durch eine Diffusion aus dem Gel während des Färbens zu vermeiden. Die Fixierung erfolgt im Rahmen dieser Arbeit mittels eines wässrigen Essigsäure-Methanol-Gemischs.

3.6.2.1.1. mit Coomassie Blau

Die Coomassie Färbung wird standardmäßig für die Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamidgelen verwendet. Der Farbstoff Serva Brilliant Blau R-250 lagert sich mit seiner anionische Form über elektrostatische Wechselwirkungen an positive Seitenketten von Aminosäuren an und wird ferner über hydrophobe Wechselwirkungen mit Proteinen gebunden.

Das Proteingel wird in dem 10fachen Volumen Coomassie Färbelösung 1 h bei RT schwenken lassen, so fixiert und mit dem Farbstoff vollständig durchtränkt. Ungebundener Farbstoff wird anschließend unter mehrfachen Wechsel der Entfärbungslösung über einen Zeitraum von mind. 4 h entfernt. Die Nachweisbarkeitsgrenze für ein Protein liegt bei ca. 100 ng.

Coomassie Färbelösung	
Serva Brilliant Blau R250	2 g
Methanol	450 ml
Essigsäure (100 %)	100 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Der Coomassie Farbstoff wird in Methanol gelöst, mit Essigsäure versehen und mit ddH₂O zum Endvolumen aufgefüllt. Nach 30 min Rühren bei RT werden unlösliche Farbstoffrückstände durch zwei Lagen Faltenfilter entfernt.

Coomassie Entfärbelösung	
Methanol	350 ml
Essigsäure (100 %)	70 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

3.6.2.1.2. über Silberfärbung

Proteine können über Aminosäuren mit Aminogruppen Silberionen binden und in ihrer reduzierenden Eigenschaft elementares Silber bilden, das sich in einem Proteingel mit einer rötlich braunen bis schwarzen Färbung niederschlägt. Diese Färbemethode ist ca. 100fach sensitiver, jedoch bei weitem nicht so spezifisch und quantifizierbar für Proteine wie ein Coomassie Färbung. Die Silberfärbung wird aufgrund der Sensitivität vor allem bei der gelelektrophoretischen Analyse von säulenchromatographischen Elutionsfraktionen verwendet.

Der Ablauf der Silberfärbung erfolgt nach der Vorschrift von Blum *et al.* (1987). Alle Lösungen werden frisch unter Verwendung von entgastem Wasser angesetzt. Bei den einzelnen Schritten wird das Gel in dem 10fachen Lösungsvolumen bei RT für die angegebene Zeit geschwenkt.

Schritt	Lösung	Zeit
1. Fixieren	50 % Methanol 12 % Essigsäure (100 %) 0.5 ml/l 37% Formaldehyd	60 min
2. Waschen	50 % Ethanol	3x 20 min
3. Imprägnieren	0.22 g/l Natriumthiosulfat	1 min
4. Waschen	ddH ₂ O	3x 20 s
5. Silbernitrat	2 g/l Silbernitrat 0.75 ml/l 37 % Formaldehyd	20 min
6. Waschen	ddH ₂ O	2x 20 min
7. Entwickeln	60 g/l Natriumcarbonat 0.5 ml/l 37 % Formaldehyd	1 – 10 min
8. Waschen	ddH ₂ O	2x 1 min
9. Stoppen	50 % Methanol 12 % Essigsäure (100 %)	15 min

3.6.2.2. Übertragung von Proteinen aus einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen über Antikörper müssen die Proteine zuerst aus dem Proteingel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen werden. Dieser sog. Western Blot wird im Rahmen dieser Arbeit im "Semi-dry"-Verfahren mit einem Puffersystem nach Kyhse-Andersen (1984) durchgeführt.

Anodenpuffer I, pH \approx 10.4

0.3 M Tris-Base
10 % Methanol

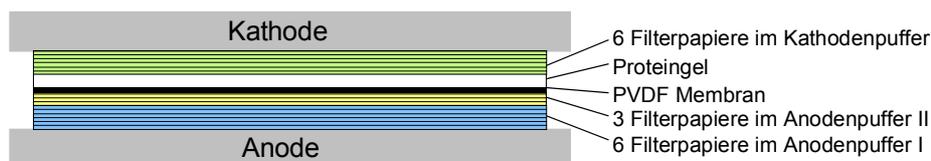
Anodenpuffer II, pH \approx 10.4

25 mM Tris-Base
10 % Methanol

Kathodenpuffer, pH \approx 9.4

25 mM Tris-Base
40 mM Glycin
10 % Methanol

Nach erfolgter elektrophoretischer Trennung wird das Proteingel auf die Maße 9 x 12 cm zurechtgeschnitten und für mind. 15 min im 10fachen Volumen Kathodenpuffer äquilibriert. Je 6 Filterpapiere (Typ Whatman) werden für 30 s im Anodenpuffer I und Kathodenpuffer, sowie 3 Filterpapiere im Anodenpuffer II getränkt. Die PVDF Membran wird 15 s in Methanol angefeuchtet, 2 min in ddH₂O gewaschen und mindestens 5 min im Anodenpuffer II äquilibriert.



In einem Stapel werden aufeinander 6 Filterpapiere mit Anodenpuffer I, 3 Filterpapiere mit Anodenpuffer II, die äquilibrierte PVDF Membran, das äquilibrierte Proteingel und 6 Filterpapiere mit Kathodenpuffer luftblasenfrei und ohne Überhang gelegt. Der so vorliegende Sandwich wird zwischen die beiden Elektroden der Transblot Semi-dry Transfer Cell gelegt und für 90 min eine Spannung von

25 V angelegt. Nach erfolgtem alkalischen Abwärtstransfer der Proteine aus dem Gel wird die PVDF Membran mit den gebundenen Proteinen für 2 min in Methanol angefeuchtet und mind. 1 h in 1x TBS-T mit 2 % BSA blockiert.

1x TBS-T

40 mM Tris-Cl, pH 7.6
280 mM NaCl
0.1 % Tween 20

3.6.2.3. Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Eine Proteinmischung, die über SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese separiert und über Western Blot auf eine PVDF Membran immobilisiert wurde, kann über einen Erstantikörper auf die Anwesenheit des korrespondierenden Antigens untersucht werden. Für den eigentlichen Nachweis wird ein gegen die IgG-Domäne des Erstantikörpers gerichteter Zweitantikörper verwendet, der als Enzymkonjugat mit der alkalischen Phosphatase vorliegt und eine Chemilumineszenzreaktion mit CSPD eingeht.

Antikörperbindung

Alle Schritte werden bei RT unter leichtem Schwenken durchgeführt. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf eine 9 x 12 cm PVDF Membran in einem Gefäß, das stets die komplette Benetzung der Membran mit der Lösung ermöglicht.

Schritt	Lösung	Volumen	Zeit
1. Waschen	1x TBS-T	50 ml	2x 10 min
2. Erstantikörper	Erstantikörper mit einer 1:1000 bis 1: 10.000 Verdünnung in 1x TBS-T mit 0.1 % BSA	15 ml	60 min
3. Waschen	1x TBS-T	50 ml	3x 10 min
4. Zweitantikörper	Zweitantikörper mit einer 1:4000 bis 1:10.000 Verdünnung in 1x TBS-T mit 0.1 % BSA	15 ml	3x 20 s
5. Waschen	1x TBS-T	50 ml	3x 10 min
6. Äquilibration	Nachweispuffer	50 ml	1x 10 min
7. Detektion	Nachweislösung bei 37 °C	2 ml	10 min @37 °C

Chemilumineszenz-Nachweis mit CSPD

Die an den Zweitantikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase wird in Kontakt mit der Nachweislösung gebracht und dephosphoryliert das Substrat Dinatrium 3-(4-methylspiro{1,2'-(5'-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)phenylphosphat (CSPD), das im alkalischen Milieu in der freien Phenolform metastabil ist und unter Aussendung von Lichtquanten der Wellenlänge von 477 nm zu zwei Ketonen zerfällt.

Die im Nachweispuffer äquilibrierte PVDF-Membran wird mit 2 ml Nachweislösung bei 37 °C für 10 min inkubiert. Die PVDF-Membran wird von überschüssiger Lösung befreit und mit Haushaltsfolie abgedeckt, bevor ein Röntgenfilm für 1 bis 20 min aufgelegt wird. Die Chemilumineszenz ist für mehrere Stunden stabil, so dass mehrfach ein Röntgenfilm zur Ausfindung der optimalen Expositionszeit aufgelegt werden kann.

Nachweispuffer

100 mM Tris-Cl, pH 9.5
100 mM NaCl

Nachweislösung

2 ml Nachweispuffer
20 µl CSPD

3.6.3. Präparation von Proteinextrakten

Die Reifung der tRNA vom Vorläufer hin zu der maturen tRNA erfolgt enzymatisch unter Beteiligung von Enzymen aus Ribonukleoproteinen und Proteinen. Das *in vivo* generierte Endprodukt – die mature tRNA – kann aus Pflanzenmaterial isoliert und charakterisiert werden. Die Untersuchung einzelner Reifungsschritte innerhalb der Enzymkaskade erfolgt günstigerweise *in vitro* unter Verwendung von Extrakten bzw. von rekombinant überexprimierten Proteinen, die mit den erforderlichen Komponenten supplementiert und mit den passenden Substraten für die zu beobachtende Umsetzung versehen werden. Die Auswahl des Ausgangsmaterials, der Aufschluss, die Extraktion der Proteine, die Abwesenheit bzw. Inaktivierung der enthaltenen Proteasen und RNasen und die Stabilisierung des Extraktes nehmen entscheidenden Einfluss auf die zu beobachtende enzymatische Aktivität, sowie deren weiteren Charakterisierung und Anreicherung. Die hierfür erforderlichen Parameter und Bedingungen können nur experimentell ermittelt werden und werden nach der Aufgabenstellung und dem Verwendungszweck individuell optimiert.

3.6.3.1. Herstellung von Weizenkeimextrakten

Weizenkeime enthalten Zellen in einem relativ undifferenzierten embryonalen Pflanzenstadium. Mitochondrien sind noch relativ wenig vorhanden, die Chloroplasten liegen in der Vorstufe als Proplastide vor. Die trockenen Keimlinge befinden sich im Ruhestadium, können bei 4 °C lange ohne merklichen Verlust an enzymatischer Aktivität gelagert werden, verfügen über einen hohen Proteingehalt und im Vergleich zu differenzierten Pflanzenzellen über einen geringen Anteil an Nukleasen und Proteasen. Die einfache Verfügbarkeit großer Mengen unter gleich bleibender Qualität und der leichte mechanische Aufschluss der Weizenkeime sind von Vorteil bei der Herstellung eines Proteinextraktes für die anschließende Charakterisierung und Anreicherung von enzymatischen Aktivitäten.

Die Weizenkeime werden durch Rühren in Cyclohexan unter zweimaligen Lösungsmittelwechsel von Lipiden und Stärkeresten befreit und die luftgetrockneten Weizenembryonen in Portionen von 15 g in einer elektrischen Mühle gemahlen. Das resultierende feine Pulver wird mit der vierfachen Menge Extraktionspuffer zu einem homogenen Brei 10 min gerührt. Zelltrümmer und Organellen werden durch Zentrifugation bei 30.000 g für 15 min sedimentiert (JA14, 13000 UpM, 4 °C). Es resultiert ein S30 Weizenkeimextrakt mit einer Proteinkonzentration von 100 – 120 mg/ml. Ribosomen und Membranen können aus einem S30 Extrakt in einer Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 90 min sedimentiert werden (Ti45, 42.000 UpM, 4 °C). Es resultiert ein S100 Weizenkeimextrakt mit einer Proteinkonzentration von 80 – 100 mg/ml.

Extraktionspuffer:

50	mM	Tris-Cl, pH 7.5
200	mM	(NH ₄) ₂ SO ₄ bzw. 100 mM KOAc
3	mM	MgCl ₂
5	mM	β-Mercaptoethanol
0.1	%	Triton X-100

3.6.3.2. Herstellung von Schweineleberextrakten

HeLa S3 Zellen lassen sich im Labor kultivieren und die Herstellung eines Gesamt- bzw. eines Kernextraktes sind etabliert und eignen sich gut für eine analytische Charakterisierung der

enzymatischen Aktivität. Für eine chromatographische Enzymaufreinigung werden jedoch große Mengen an Säugerzellen benötigt. Aufgrund der hohen Homologie der proteincodierenden Sequenzen zwischen Mensch, Schwein, Ratte und Maus und der leistungsfähigen massenspektrometrischen Proteinsequenzierungsmethoden ist es daher geschickt von tierischen Zellen aus mechanisch leicht aufschließbaren Organen auszugehen. Die Leber hat sich für die Enzymaufreinigung als vorteilhaft erwiesen.

Schweineleber konnte im Rahmen dieser Arbeit von einem lokalen Schlachthof frisch und noch handwarm bezogen werden. Nach Abkühlung auf Eis werden Teile der Schweineleber in einem Fleischwolf mechanisch zerkleinert und mit der dreifachen Menge (v/w) an Extraktionspuffer in einem Mixer (Typ Warren Blender) für 5 min durchmischt. Noch intakte Zellkerne schert man durch Ultraschallsonifizierung für 2 min. Die Zelltrümmer werden in einer Zentrifugation bei 25.000 g für 15 min sedimentiert (JA14, 12.000 UpM, 4 °C) und der Überstand durch zwei Lagen Mull zur Entfernung des gebildeten Fettfilms filtriert. Der erhaltenen S25 Schweineleberextrakt weist einen Proteingehalt von 100 – 120 mg/ml auf und ist noch relativ trübe. Die verbliebenen Membranen und Ribosomen werden daher durch eine Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 90 min sedimentiert (Ti45, 42.000 UpM, 4 °C) und der Überstand vorsichtig zwischen obiger Fettschicht und pelletierter Membran- und Ribosomenschicht mit einer 10 ml Pipette entnommen. Es resultiert ein klarer, tieferer S100 Schweineleberextrakt mit einem Proteingehalt von 60 – 80 mg/ml, der für einige Stunden bei 4 °C ohne merklichen Verlust an enzymatischer Aktivität lagerbar ist.

3.6.4. Allgemeine Handhabung von Enzympräparationen

Die enzymatischen Aktivitäten in Proteinextrakten sollten nach Möglichkeit stabilisiert werden. Für die Extraktion wird ein Puffer verwendet, der im physiologischen Bereich liegt und eine genügend hohe Salzkonzentration aufweist. Als Oxidationsschutz wird standardmäßig 2 – 5 mM β -Mercaptoethanol zugegeben. Proteasen inaktiviert man durch Zusatz von 0.2 mM PMSF, 0.2 mM Benzamidin, sowie optional 0.4 μ g/ml Pepstatin A und 0.5 μ g/ml Leupeptin. Oftmals sind enzymatische Aktivitäten in Rohextrakten bei 4 °C nicht stabil bzw. verlieren ihre Aktivität nach einer Lagerung bei -80 °C. Es empfiehlt sich so rasch wie möglich mit einer chromatographischen Enzymaufreinigung fortzufahren. Die enzymatische Aktivität wird sodann stabilisiert, angereichert und von hemmenden Substanzen bzw. interferierenden Enzymen befreit.

3.6.5. Chromatographische Enzymaufreinigung

In einem Proteinextrakt sind ein großer Teil der enzymatischen Aktivitäten vorhanden, die für den Stoffwechselumsatz in der Zelle verantwortlich sind. Für die Aufklärung der Einzelschritte einer Enzymkaskade und der Zuordnung von enzymatischen Aktivitäten zu dem enzymatisch aktiven Protein ist eine Aufreinigung aus dem Extrakt essentiell. Aufgrund der Bedingung des Erhalts der enzymatischen Aktivität während jedes Aufreinigungsschritts fällt die Wahl der Säulenmaterialien auf die Gruppe der Ionenaustausch-, Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographie. Fraktionierte Proteinpräzipitationen unter nicht-denaturierenden Bedingungen können sich zudem als vorteilhaft bei der Verarbeitung großer Proteinmengen zu Beginn einer Enzymaufreinigung erweisen.

3.6.5.2. Ionenaustausch-Chromatographie

Proteine weisen über die geladenen Aminosäuren Oberflächenladungen auf, die eine Interaktion mit den geladenen Gruppen eines Ionenaustauschers eingehen können. Im allgemeinen Sprachgebrauch weisen saure Proteine bei einem physiologischen pH Wert eine negative Nettoladung auf und werden bevorzugt von Anionenaustauschern gebunden, während die basischen Proteine mit ihrer positiven Nettoladung mit Kationenaustauschern interagieren. Die pH-Abhängigkeit der Nettoladung der Proteine und somit die Interaktion mit dem Ionenaustauscher ermöglicht unter der Voraussetzung des Erhalts der enzymatischen Aktivität die Anpassung an ein Säulenmaterial.

3.6.5.2.1. DEAE-Cellulose

Bei der DEAE-Cellulose ist Diethylaminoethyl an Cellulose kovalent verknüpft. Bei einem pH unterhalb von 11 liegt das tertiäre Amin in der protonierten und somit positiv geladenen Form vor, die über das negativ geladene Gegenion zum einen kompensiert wird, zum anderen den reversiblen Anionenaustausch mit negativ geladenen Proteinen ermöglicht.

Die fibröse DEAE SH23 Cellulose wird entsprechend der Herstellerangaben mit Salzsäure und Natronlauge vorbehandelt und mit 0.5 M HCl in die protonierte Form überführt. Nach pH-Adjustierung über den Chromatographiepuffer mit der höchsten verwendeten Salzkonzentration wird die Säule mit 5 Vol Chromatographie-Startpuffer equilibriert. Nach der Auftragung der Probe wird mit 2 Säulenvolumen Startpuffer nachgewaschen. Die gebundenen Proteine werden in einem linearen Gradienten von 0 bis 500 mM KCl über 10 Säulenvolumina eluiert, wobei mindestens 20 Fraktionen gesammelt werden.

Nach erfolgter chromatographischer Aufreinigung wird die Säule mit 2 M KCl im Chromatographiepuffer gewaschen und gelagert. Nach drei Aufreinigungsrunden bzw. bei einer merklichen verbliebenen Verunreinigung auf der Säule wird die Säule nach Herstellerangaben regeneriert ("cleaning in place: CIP"-Prozedur).

3.6.5.2.2. Mono Q

Bei dem Mono Q Säulenmaterial handelt es sich um einen starken Anionenaustauscher bei dem die Trimethylaminoethylgruppe an einen Polystyrenträger mit einheitlicher Partikelgröße von 10 µm gekoppelt ist. Aufgrund des erhöhten Gegendrucks bei üblichen Fließgeschwindigkeiten kann die Mono Q Säule nur in Verbindung mit einer FPLC Apparatur verwendet werden. Die Handhabung erfolgt nach Herstellerangaben.

3.6.5.2.3. Phosphocellulose

Bei der Phosphocellulose sind die freien Hydroxylgruppen der in der Cellulose aufbauenden Zuckerbausteine teilweise mit Phosphorsäure verestert. Unter physiologischen pH liegt dieser Phosphorsäureester als negativ geladenes Phosphat vor, dessen Ladung von einem Kation kompensiert wird und mit positiv geladenen Proteinen einen Kationenaustausch eingehen kann.

Die fibröse Phosphocellulose P11 wird nach Herstellerangaben vorbehandelt, mit 0.5 M KOH in die Kationenform überführt, zuerst mit dem Chromatographie Puffer mit der höchsten Salzkonzentration im pH adjustiert und dann mit 3 Vol Chromatographie Startpuffer equilibriert. Bei der Phosphocellulose sind irreversible Proteinbindungsstellen vorhanden, die vor der eigentlichen chromatographischen

Trennung mit Rinderserumalbumin blockiert werden müssen, um eine verlustfreie reproduzierbare Aufreinigung erzielen zu können. Die equilibrierte Phosphocellulose wird mit 2 Säulenvolumina Startpuffer mit 20 mg/ml Rinderserumalbumin beladen und mit 2 M KCl im Chromatographiepuffer gewaschen. Nach erneuter Equilibrierung im Startpuffer kann die chromatographische Trennung erfolgen. Die gebundenen Proteine werden in einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M KCl in 10 bis 20 Säulenvolumina eluiert und dabei auf mindestens 20 Fraktionen aufgeteilt.

Nach erfolgter chromatographischer Trennung kann die Phosphocellulose in 2 M KCl wenige Wochen bei 4 °C gelagert werden. Da die Phosphoresterbindung an die Cellulose nicht stabil ist wird in diesem Zeitraum Phosphat freigesetzt und die Säule verliert an Bindungskapazität.

3.6.5.2.3. Source S15

Bei dem Source S15 Säulenmaterial sind Sulfatgruppen an einen Träger immobilisiert, deren Partikel einen einheitlichen Durchmesser von 15 µm und eine annähernde Kugelform verfügen. Dadurch wird eine sehr hohe Auflösung bei einem moderaten Gegendruck erzielt. Die Handhabung des Source S15 Säulenmaterials erfolgt nach Herstellerangaben. Die Elution findet in einem linearen Gradienten von 0 bis 500 mM KCl über 15 bis 20 Säulenvolumina statt, es werden dabei mindestens 20 Fraktionen gesammelt.

3.6.5.3. Affinitätschromatographie

Proteine liegen in einer Zelle nicht isoliert vor, sondern gehen Interaktionen mit weiteren Proteinen und / oder Substraten ein. RNA prozessierende Enzyme interagieren mit ihren natürlichen Substraten in der Ausbildung eines Enzym-Substrat-Komplexes, bei 4 °C findet jedoch normalerweise keine merkliche Substratumsetzung statt. Wird das Substrat oder ein Substratanalogon an ein Säulenmaterial gekoppelt, so kann eine reversible Bindung des Enzyms in Abhängigkeit von der Salzkonzentration für eine chromatographische Aufreinigung verwendet werden.

Die limitierte Zugänglichkeit großer Mengen der spezifischen Ribonukleinsäure für eine Kopplung an ein aktiviertes Säulenmaterial, die relative Instabilität der Ribonukleinsäure und die Anwesenheit von einer Vielzahl von RNasen in einem rohen Proteinextrakt schränkt jedoch die Anwendung der Ligand-spezifischen Affinitätschromatographie für bereits stark vorgereinigte Proteinfractionen ein. Zu Beginn und während eines intermediären Aufreinigungszeitpunkts kann eine gute Anreicherung mit gruppenspezifischen Affinitätschromatographiemedien für Nukleinsäure-bindende Proteine erzielt werden. Das Heparin und der Farbstoff Cibacron Blau sind die wichtigsten Vertreter.

3.6.5.3.1. Heparin-Sepharose

Heparin besteht aus einem Polyglykangerüst, das alternierend über die 1→4 β-glykosidisch verknüpften Zuckerderivate Hexuronsäure und D-Glucosamin aufgebaut wird. Die Seitengruppen sind teilweise modifiziert und tragen zu einem hohen Anteil negativ geladene Sulfatgruppen. Das Heparin ähnelt der in der Struktur der polyanionischen Nukleinsäure und interagiert mit einer Vielzahl von Nukleinsäure-bindenden Proteinen. Die relativ unspezifische Wechselwirkung des Heparins über die negativ geladenen Sulfatseitengruppen als Kationenaustauscher mit baschen Proteinen kann durch Zugabe von Salz im Startpuffer minimiert werden. Daher empfiehlt es sich die maximal mögliche Salzkonzentration im Startpuffer, die noch das Binden des aufzureinigenden Proteins an das Heparin

ermöglicht, empirisch in einer Reihe zu ermitteln. Unter optimierten Bedingungen kann so eine hohe Selektivität und eine damit verbundenen hohe Auflösung und Kapazität erreicht werden. Die Elution der gebundenen Proteine findet in einem linearen Salzgradienten von 0 – 500 mM KCl über 10 Säulenvolumen statt, es werden mindestens 20 Fraktionen gesammelt.

3.6.5.3.2. Cibacron-Blau Trisacryl

Der polycyclische Farbstoff Cibacron™ Blau F3G-A weist eine Ähnlichkeit zu NAD^+ auf und bindet eine Vielzahl von Enzymen biospezifisch, die eine Adenyl-gruppe als Cofaktor verwenden. Darüber hinaus finden ionische und hydrophobe Interaktionen des anionischen, aromatischen Farbstoffs mit Proteinen statt. Die biospezifische interagierenden Proteine können sauber in einem Salzgradienten eluiert werden. Sollte das aufzureinigende Protein über einen weiten Bereich des Salzgradienten eluieren, sind bei der nächsten Aufreinigung einige Modifizierungen durchzuführen. Das Säulenmaterial darf dann nicht mehr vollständig gesäubert werden. Vielmehr werden die hydrophoben Bindungsstellen mit Triton X100 und Rinderserumalbumin abgesättigt und nur die bei einem 2 M KCl Waschschrift freigesetzten Bindungsstellen für die Aufreinigung verwendet.

3.6.5.3.3. Weizen tRNA-Sepharose

An der Prozessierung von transfer Ribonukleinsäuren beteiligten Enzyme weisen teilweise eine hohe Substratspezifität auf. Mit der Kopplung des natürlichen Liganden – der pflanzlichen tRNA an ein aktiviertes Säulenmaterial kann so eine sehr hohe Selektivität - insbesondere bei bereits stark angereicherten Proteinfractionen - erzielt werden.

10 mg Gesamt tRNA aus Weizen werden nach Herstellerangaben an eine vorgepackte 1 ml HiTrap NHS-aktivierte Sepharose Säule 2 h bei 4 °C und 1 h bei RT gekoppelt. Anschließend werden die noch freien Bindungsstellen mit Ethanolamin geblockt, die Säule ausgiebig gewaschen, bevor im Chromatographie Startpuffer equilibriert wird. Eine so hergestellte tRNA-Sepharose Säule weist eine Bindungskapazität von ca. 1 mg Protein pro ml Säulenvolumen auf und kann bei 4 °C für 1 – 2 Monate ohne merklichen Kapazitätsverlust gelagert werden. Die Elution der gebunden Proteine erfolgt in einem Salzgradienten von 0 – 500 mM KCl in 10 Säulenvolumina.

3.6.5.4. Gelfiltration mittels Superdex™ 200

Das Prinzip der Gelfiltration beruht in der Auftrennung eines Proteingemischs nach der Größe unter isokratischen Elutionsbedingungen. Die Probe wird in einem Volumen, das maximal 5 % des Säulenvolumens beträgt, aufgetragen. Die Elution erfolgt mit einer konstanten Flussrate des Gelfiltrationspuffers. Das Medium verfügt über kleine Poren und Nischen, in die kleine Proteine leichter hineindiffundieren können und so retardiert werden. Makromoleküle, die keine Wechselwirkung mit dem Medium eingehen werden nach dem sogn. Totvolumen eluiert. Es folgen Proteinaggregate, hochmolekulare bis hin zu niedermolekularen Proteinen. Für lösliche Proteine liegt ein linearer Bezug zwischen Elutionsvolumen und dem Logarithmus der Masse vor, so dass neben der präparativen chromatographischen Aufreinigung eine Molekulargewichtsbestimmung des Proteins im nativen Zustand durchgeführt werden kann. Hierfür ist die Kalibrierung der verwendeten Säule mit Standard-Eichproteinen von Vorteil.

Die Gelfiltration wird im Rahmen dieser Arbeit mit HiLoad™ Superdex™ 200 in einer vorgepackten XK 16/60 Säule mit einem Volumen von 120 ml durchgeführt. Superdex besteht aus einem Composite aus quervernetzter Agarose und Dextran und zeichnet sich durch ein herausragendes chromatographisches Auflösungsvermögen aus. Die Porengröße ist für eine optimale Trennung von Proteinen von 50 bis 200 kDa und die Porendichte für die präparative Separierung eines Proteingemischs ausgelegt. Die Durchführung der Gelfiltration erfolgt nach Herstellerangaben bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min. Das Totvolumen liegt bei ca. 35 ml, die Kalibrierung der Säule erfolgt mit den Eichproteinen β -Amylase (200 kDa, $V_E=58$ ml), Alkoholdehydrogenase (150 kDa, $V_E = 60$ ml) und Rinderserumalbumin (68 kDa, $V_E = 66$ ml).

3.6.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.6.6.1 Kolorische Bestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 liegt wässriger, saurer Lösung in der rötlichen protonierten Form mit einem Absorptionsmaximum bei 465 nm vor. Bei Anwesenheit von Proteinen wird der Farbstoff über polare und hydrophobe Wechselwirkungen mit Arginin sowie weniger stark mit Lysin, Histidin und Phenylalanin gebunden und so in der deprotonierten, tief-blauen Form mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm stabilisiert. Die Absorption bei 595 nm ist proportional der zugegebenen Proteinmenge.

Bradford-Lösung	
Serva Brilliant Blau G250	100 mg
Ethanol p.a.	50 ml
ortho-Phosphorsäure (85%)	100 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Der Farbstoff wird in Ethanol gelöst, durch Zugabe der Phosphorsäure in die protonierte Form überführt, mit ddH₂O zum Endvolumen verdünnt und 30 min bei RT gerührt, bevor durch 2 Lagen Filterpapier unlösliche Farbstoffrückstände abgetrennt werden. Die Bradford-Lösung ist unter Lichtausschluss mehrere Monate bei RT lagerbar.

1 – 50 μ l Proteinlösung werden mit 1 ml Bradford-Lösung durchmischt, 5 min bei RT inkubiert und die Absorption A_{595} gemessen. Die Kalibrierung erfolgt über die Zugabe von 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20 μ g BSA zu 1 ml Bradford-Lösung. Anhand der erstellten Kalibriergeraden kann über die ermittelte Absorption die unbekannte Proteinmenge sowie über Verrechnung des eingesetzten Volumens die Konzentration einer Proteinlösung bestimmt werden.

Die Vorteile der Bradford-Proteinbestimmung liegen in der hohen Sensitivität, der Unempfindlichkeit gegen einer Vielzahl von Reduktionsmitteln, Salzen und Detergenzien und der einfachen, schnellen praktischen Durchführung einer Messung. Der Nachteil der Methode liegt in der relativ hohen Subjektivität der Messung, d.h. gleiche Mengen unterschiedlicher Proteine können deutlich verschiedene Absorptionen A_{595} hervorrufen.

3.6.6.2 UV-Spektrometrische Konzentrationsbestimmung

Proteine absorbieren UV-Licht von 280 nm hauptsächlich aufgrund der enthaltenen aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und in geringem Maß Phenylalanin. Die Ungenauigkeit und die Störanfälligkeit der Messung sind sehr hoch, so dass diese Methode kaum noch für eine Konzentrationsbestimmung einer Probe eingesetzt wird.

Die UV-Messung einer Proteinlösung erfolgt jedoch nach einem physikalischen Parameter – der Absorption A_{280} . Da die Proteinlösung weder in den Kontakt mit weiteren Reagenzien kommt, noch durch die Messung verändert wird, kann eine UV-Messzelle zwischen einer Chromatographie-Säule und einem Fraktionssammler geschaltet werden und über die kontinuierliche Messung A_{280} ein Elutionsprofil der Säule erstellt werden.

3.7. Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Sobald das gewünschte Protein in einer Datenbank identifiziert und vollständig aufgefunden werden kann, bietet die rekombinante Überexpression die Möglichkeit große Mengen des Proteins innerhalb kurzer Zeit und geringem Zeitaufwand zu bilden. Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins aus einem heterologen oder homologen Zellsatz kann über eine kurze spezifische Aminosäuresequenz, die an den Amino- bzw. Carboxyterminus angehängt ist, deutlich erleichtert werden und erlaubt die effiziente, hochspezifische affinitätschromatographische Aufreinigung. Im Rahmen dieser Arbeit liegen die rekombinanten Proteine mit einer Abfolge von sechs aufeinanderfolgenden Histidinen am Amino- bzw. Carboxyterminus vor, die eine hochspezifische Bindung an die Nickel-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) ermöglicht.

Die rekombinante Überexpression erfolgt mit Hilfe der RTS Plattform (Roche, Mannheim) und findet in einem gekoppelten *in vitro* Transkriptions-, Translationsystems auf der Basis des *E. coli* und des Weizenkeim Lysats statt. Bei den *in vitro* Systemen ist die Ausbeute entweder durch die zugegebenen Edukte bzw. durch die gebildeten, hemmenden Nebenprodukte limitiert, so dass in einem abgeschlossenen System die *in vitro* Expression von Proteinen meist nach wenigen Stunden zum Erliegen kommt. Wird das Expressionssystem über eine Dialysemembran mit einer Vorratslösung gekoppelt, finden kontinuierlich die Lieferung von neuen Edukten und die Verdünnung der inhibierenden Nebenprodukte statt. Es resultieren bis zu fünffach höhere Expressionszeiten und -ausbeuten durch die sog. CECF ("countinuous exchange cell free") Technologie.

Die codierende Sequenz für das zu exprimierende Protein wird in einen passenden pVEX Überexpressionsvektor kloniert, der unter der Kontrolle des T7 Promoters steht. Mit der im Expressionssystem vorliegenden T7 RNA Polymerase wird daraus die Botenribonukleinsäure transkribiert. In dem Lysat sind darüber hinaus keine weiteren endogenen mRNAs vorhanden, so dass lediglich das gewünschte Protein exprimiert wird. Durch Zugabe von [35 S]-Methionin im Reaktionsansatz lässt sich somit das rekombinante Protein spezifisch markieren und mittels Fluorographie identifizieren.

3.7.1. Überexpression in dem E. coli RTS 100 Lysat

Die Durchführung der Expression erfolgt nach Herstellerangaben mit dem RTS 100 HY und dem RTS 500 Kit (Roche, Mannheim).

3.7.2. Überexpression in dem Weizenkeim RTS 100 CECF Lysat

Die Durchführung der Expression erfolgt nach Herstellerangaben. Da im Rahmen dieser Arbeit kein Proteomaster Instrument zur Verfügung steht, werden die Reaktionskompartimente auf einen Eppendorf-Inkubator befestigt und in einem Brutschrank bei 24 °C und 900 UpM schütteln lassen. Der Nachweis der exprimierten ³⁵S-Methionin markierten Proteine erfolgt über Fluorographie (Laskey und Mills, 1979), so dass die Menge an eingesetztem ³⁵S-Metionin im Reaktionsansatz deutlich reduziert werden kann. Die Reaktionslösungen für einen Ansatz werden aus folgenden Komponenten zusammengestellt:

Methionine-premix

5	µl	methionin (gelb)
1	µl	³⁵ S-Methionin (15 µCi/µl, 400 Ci/mmol)
19	µl	ddH ₂ O

Feeding-mix

900	µl	feeding (schwarz)
80	µl	aminoacids (braun)
20	µl	methionine-mix

reaction-premix

15	µl	reaction (grün)
4	µl	aminoacids (braun)
1	µl	methionine-mix
15	µl	wheat germ lysate (rot)

reaction-mix

15	µl	ddH ₂ O mit 2 µg Plasmid DNA
35	µl	reaction-premix

Zuerst wird der Feeding-mix in das Vorratsgefäß und dann der reaction-mix auf die Dialysemembran (mit rotem Ring gekennzeichnet) des Reaktionskompartiments gegeben, das dann mit Parafilm verschlossen und für 24 h bei 24 °C und 900 UpM geschüttelt wird. Zur Kontrolle der erfolgreichen Expression werden 4 µl Reaktionsmischung auf einem SDS-Proteingel aufgetrennt, dann mit einer Coomassie-Färbung visualisiert und über Fluorographie analysiert.

Sollen die exprimierten Proteine über Metallchelate-Affinitätschromatographie an Nickel-NTA-Agarose aufgereinigt werden, kann es hilfreich sein, die Anwesenheit des Histidin-Tags mit Hilfe von Anti-His Antikörpern, die eine Abfolge von mind. 4 Histidinen als Epitop erkennen, in einem immunologischen Nachweis zu bestätigen.

3.7.3. Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit dem Histidin-Tag über Ni-NTA Agarose

Rekombinante Proteine mit der Abfolge von 4 – 8 Histidinen am Amino- bzw. Carboxyterminus können hochspezifisch über die Metallchelate-Affinitätschromatographie an Nickel-NTA-Agarose aufgereinigt werden. Ni²⁺-Ionen werden von dem vierzähligen Liganden Nitrilo-triaceto an Agarose

immobilisiert und verfügen jeweils über 2 freie Bindungsstellen für die reversible Bindung des unprotonierten Imidazolstickstoffs der Histidinaminosäure. Die Spezifität wird durch die Bindung von 4 – 8 konsekutiven Histidinen an 2 – 4 benachbarte Ni²⁺-Bindungsstellen erreicht. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Bindungs-, Wasch- und Elutionsstringenz über den Affinitätsliganden Imidazol im Chromatographiepuffer bestimmt.

Chromatographiepuffer

10 mM	Tris-Cl, pH 7.5
200 mM	NaCl
3 mM	MgCl ₂
0.5 %	Triton X-100

Der Bindungspuffer enthält zusätzlich 2 bis 5 mM Imidazol, so dass eine unspezifische Bindung von Proteinen über ein bis zwei räumlich nahe liegende Histidine bzw. Tryptophane weitgehend unterbunden wird. Der Waschpuffer enthält 20 mM Imidazol, so dass unspezifisch gebundene Proteine von der Ni-NTA-Agarose ausgewaschen werden. Die gebundenen His-getaggten werden anschließend im Elutionspuffer mit 500 mM Imidazol eluiert.

Der Weizenkeim RTS 100 CECF Reaktionsansatz wird mit 5 Vol Bindungspuffer verdünnt und mit 20 µl äquilibrierte Ni-NTA-Agarose bei 4 °C für 2 h kontinuierlich durchmischt. Die Ni-NTA-Agarose wird durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 15 s) sedimentiert und der Überstand vorsichtig abgehoben. Nach zwei 5 minütigen Waschschritten mit 200 µl Waschpuffer werden die gebundenen His-getaggten Proteine mit zweimal 20 µl Elutionspuffer von der Ni-NTA-Agarose abgelöst und der Überstand nach Zentrifugation für weitere Charakterisierungen verwendet.

3.8. Datenbank-basierende Sequenzanalysen

3.8.1. BLAST-basierende Sequenzhomologie-Suchen

Die Datenbank-basierende Suche nach homologen Sequenzen ist täglicher Bestandteil bei der Planung von Experimenten. Zum einen können über den BLAST Algorithmus die zu einer Sequenzanfrage homologe Sequenzbereiche aufgezeigt werden. Sequenzhomologien können zwischen Nukleinsäuren (blastn) und Proteinen (blastp) aufgezeigt werden.

Eukaryontische Gene sind oftmals diskontinuierlich, und die Vorhersage der Exon-Intron-Struktur für die Auffindung des korrekten offenen Leserasters (ORF: open reading frame) ist derzeit nur teilweise möglich. Daher empfiehlt es sich die Blast-Suchen mit einer Proteinanfrage ebenfalls gegen Nukleotidsequenzen, in die alle sechs möglichen Leseraster gelegt werden, durchzuführen (tblastn). Die Vielzahl der sequenzierten cDNA Genbanken, sowie die Fülle der Daten aus *expressed sequence tags* (EST) Projekten beinhalten oftmals zusätzliche Informationen für die korrekte Annotation eines Proteins.

3.8.2. Alignment multipler Sequenzen

Für eine Enzymfamilie lässt sich oftmals eine Vielzahl von Proteinsequenzen aus verschiedenen Organismen aufzeigen, die zueinander homologe Bereiche aufweisen. Multiple Sequenzalignments lassen hierfür sich mit dem Programm Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) erstellen. Eine einfache

Handhabung der Proteinsequenzen und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt innerhalb des Programmpakets Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/Bioedit/bioedit.html>).

3.8.3. Sequenzmotiv-Suche

Proteine aus einer Enzymfamilie können sich teilweise sehr stark in der Aminosäuresequenz unterscheiden und benötigen bei einer ähnlichen Faltungsstruktur nur wenige konservierte Aminosäuren am aktiven Zentrum, um die gleiche enzymatische Aktivität auszuüben. Derartige unbekannte Enzyme können nicht über den einfachen Blast Algorithmus aufgefunden werden. Eine direkte Sequenzmotiv-Suche kann über das Programm "Fuzzpro" aus dem Softwarepaket EMBOSS (<http://emboss.sourceforge.net/>) durchgeführt werden. Die zu durchsuchenden Proteindatenbank müssen hierfür lokal als fasta-Datei vorliegen. Eine Sequenzmotiv-Suche gegen die *Arabidopsis* annotierten offene Leseraster kann über die Webseite http://mips.gsf.de/proj/thal/db/search/search_frame.html des Münchner Informationszentrums für Proteinsequenzen (MIPS) sowie über <http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/nph-patmatch.pl> von "The Arabidopsis Information Resource: TAIR" durchgeführt werden.

3.8.4. Computer-unterstützte Sequenzanalyse

DNA-Sequenzen können mit dem Softwarepaket pDRAW (<http://www.acaclone.com/>) einfach und effizient *in silico* analysiert werden. Wichtige und im Rahmen dieser Arbeit verwendete Funktionen werden im Folgenden kurz zusammengefasst. DNA Sequenzen können nach Anwesenheit von offenen Leserastern und Restriktionsschnittstellen untersucht werden und über die Auswahl von geeigneten Restriktionsstellen *in silico* in Vektoren kloniert werden. Ferner kann eine Sammlung von Startsequenzen erstellt werden, für die eine Bindungsanalyse mit Berechnung der Schmelztemperatur und der optimalen PCR-Hybridisierungstemperatur durchgeführt wird.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeitsgruppe ist die erste pflanzliche, kerncodierte, intronhaltige *transfer* Ribonukleinsäure kloniert worden, die für eine funktionelle *Nicotiana* tRNA^{Tyr} codiert (Stange und Beier, 1986). In den darauffolgenden Jahren konnten intronhaltige pre-tRNA^{Tyr} in den Kerngenomen von *Arabidopsis thaliana* (Beier *et al.*, 1991), *Nicotiana tabacum* (Fuchs *et al.*, 1992), *Triticum aestivum* (Arends *et al.*, 1996) sowie intronhaltige Elongator pre-tRNA^{Met} in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Pisum sativum*, *Gingko biloba* (Akama und Kashihara, 1996) als Vertreter höherer Pflanzen aufgefunden und kloniert werden. Die Transkription der intronhaltigen Vorläufer-tRNA erfolgte zumeist in dem heterologen HeLa Kernextrakt und die Prozessierung im Weizenkeimextrakt (Stange und Beier 1987; Stange *et al.*, 1988). Leider erwiesen sich die Weizenkeime für die Herstellung eines RNA Polymerase III-Transkriptionsextrakts als ungeeignet (Furter und Hall, 1991). Erst mit der Etablierung eines Kernextrakts aus Tabak BY-2 Zellen für die Transkription von RNA Polymerase II Genen (Fan und Sugiura, 1995), konnte ebenfalls die Transkription und Reifung von intronhaltiger Vorläufer tRNA in einem homologen *Nicotiana* Kernextrakt untersucht werden (Yukawa *et al.*, 2001). Alle bisher erbrachten Ergebnisse in Bezug auf Transkription und Reifung von intronhaltigen Vorläufer-tRNAs wurden im analytischen Maßstab durchgeführt (van Tol *et al.*, 1987; Stange *et al.* 1991; 1992; Beier *et al.*, 1991; Akama *et al.*, 2000b).

4.1. Etablierung der Enzymnachweismethoden

Der Aufbau eines reproduzierbaren, quantifizierbaren und leicht analysierbaren Nachweissystems ist für die chromatographische Enzymaufreinigung eine essentielle Voraussetzung. Das Substrat sollte dabei einfach und in großen Mengen zugänglich sein. Daher werden die in dieser Arbeitsgruppe ausgearbeiteten Nachweissysteme für die tRNA Endonuklease und tRNA Ligase Aktivität in Hinblick auf die Durchführung einer chromatographischen Enzymaufreinigung optimiert.

4.1.1. Synthese von tRNA Substraten für die Spleißreaktion

Als Substrate für die Durchführung von tRNA Spleißexperimenten wurden die intronhaltigen pre-tRNAs^{Tyr} aus *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* gewählt, für die eine effiziente Intron-Exzision bereits aufgezeigt werden konnte. Die klonierten Gene AtY5II (Stange *et al.*, 1991) und NtY9 (Fuchs *et al.*, 1992) erlauben die effiziente Transkription im HeLa-Kernextrakt und liegen zudem als Subklone unter der Kontrolle des T7-Promoters und mit einer *Bst*NI Schnittstelle nach der Diskriminatorbase versehen vor (AtY5II-T7 und NtY9-T7).

4.1.1.1. Transkription von Vorläufer tRNAs im HeLa Kernextrakt

In einer präparativen Transkription im HeLa Kernextrakt bei 2 mM MgCl₂ mit der Plasmid DNA pAtY5II als Matrize können ca. 500.000 cpm (400 fmol) Vorläufer tRNA synthetisiert werden. Nach 60 min wird durch MgCl₂ Zugabe die Mg²⁺-Konzentration auf 6 mM angehoben und nach Supplementierung mit 4 µl Weizenkeim S100 Extrakt für weitere 60 min inkubiert. Dabei findet eine Umsetzung zur intronhaltigen pre-tRNA in einer Ausbeute von ca. 60 % statt. Nach Separation in einem 8 %

denaturierenden Polyacrylamid Gel wird das Gelstück mit der intronhaltigen pre-tRNA ausgeschnitten und das enthaltene Transkript über Diffusionselution zurückgewonnen (Abbildung 9).

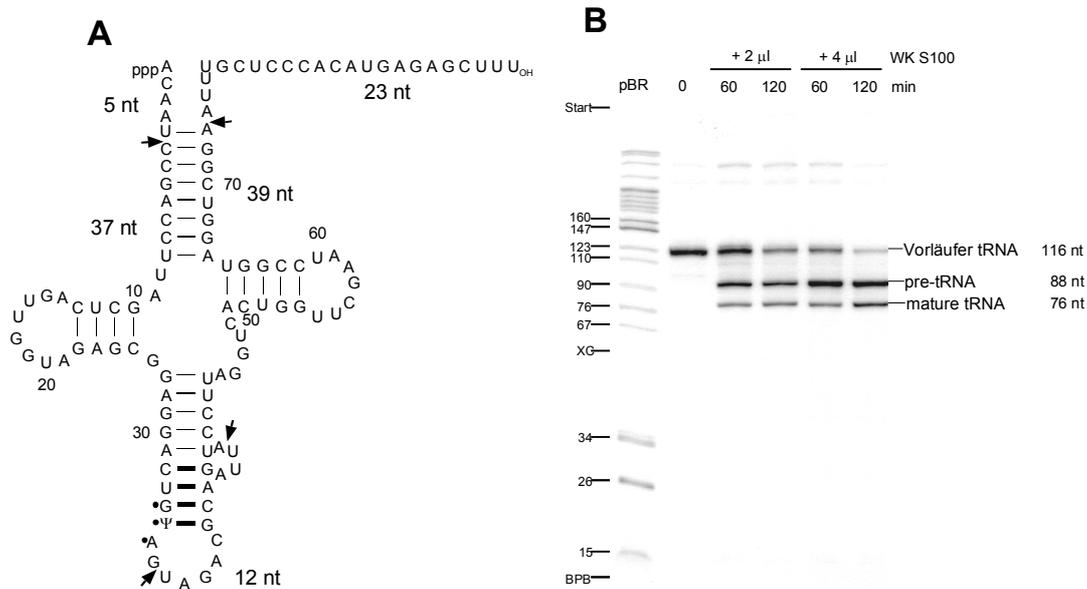


Abbildung 9. Transkription und Prozessierung der *Arabidopsis* pre-tRNA^{Tyr} im heterologen HeLa Kernextrakt und im Weizenkeimextrakt

(A) Die Sequenz und Sekundärstruktur des Vorläufertranskripts von AtY5II ist wiedergegeben. Pfeile zeigen die Schnittstellen für die Hydrolyse durch die RNase P, tRNase Z und die tRNA Spleißendonuklease auf. Die Länge der zu erwartenden Einzelfragmente ist angegeben.

(B) Die präparativen HeLa Transkriptionsansätze werden bei 30 °C für 60 min inkubiert. Anschließend erhöht man die Mg²⁺ Konzentration auf 6 mM und supplementiert mit der angegebenen Menge an Weizenkeim S100 Extrakt. Nach Inkubation bei 30 °C für die angegebene Zeit werden die Ansätze phenolisiert, präzipitiert und in einem 10 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Ribonukleinsäuren werden über Autoradiographie visualisiert.

Bei der heterologen Transkription im HeLa Kernextrakt mit der Plasmid DNA AtY5II als Matrize wird hauptsächlich die 116 nt lange Vorläufer tRNA gebildet. Nach Supplementierung mit Mg²⁺ ad 6 mM und Zugabe von 2 - 4 μ l Weizenkeim S100 Extrakt wird bei 30 °C für die angegebene Zeit inkubiert (Abbildung 9). Dabei werden sowohl die 5'- und 3'-Flanke prozessiert, die CCA-Sequenz an das 3'-Ende angehängt und in geringem Maß das Intron gespleißt.

4.1.1.3. Analytische Spleißreaktion mit HeLa- und T7-transkribierten pre-tRNAs

Die mittels HeLa- bzw. T7 RNA Polymerase transkribierten pre-tRNAs können für eine analytische Spleißreaktion mit dem Weizenkeimextrakt eingesetzt werden. Ziel dieser Versuchsreihe ist es, das Spleißen von T7-transkribierter, intronhaltiger pre-tRNA zu etablieren, um so Substrate für den Endonuklease-Nachweis einfach und in großer Menge synthetisieren zu können. Hierfür werden die pre-tRNA Transkripte aus den präparativen Polyacrylamidgelen über Diffusionselution zurückgewonnen und für analytische Spleißansätze eingesetzt. Die Analyse der Spleißprodukte findet in denaturierenden Polyacrylamidgelen über Autoradiographie statt (Abbildung 10).

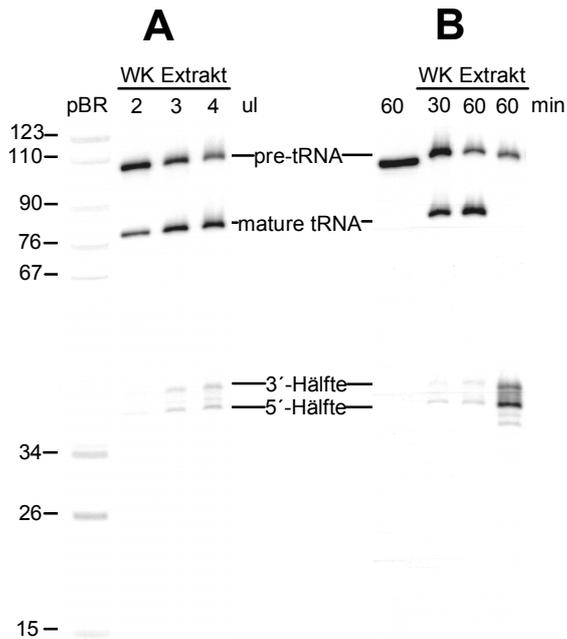


Abb. 10. In vitro Prozessierung von HeLa und T7 transkribierter pre-tRNA im Weizenkeim S23 Extrakt

(A) HeLa transkribierte pre-tRNA (20000 cpm) werden in analytischen Spleißansätzen mit der angegebenen Menge Weizenkeimextrakt für 60 min bei 30 °C inkubiert. Die Analyse der Spleißprodukte findet in einem 10 % denaturierenden Polyacrylamidgel der Abmessungen 20 x 40 cm x 0.4 mm statt. Als Längenstandard wird pBR 322/*Hpa*I hydrolysierte DNA verwendet, die über Phospho-austausch mit γ -[32 P]ATP und der Polynukleotidkinase radioaktiv markiert wurde.

(B) T7 transkribierte pre-tRNA (20000 cpm) wird in einem analytischen Spleißansatz ohne bzw. mit 3 μ l Weizenkeim S23 Extrakt für die angegebene Zeit inkubiert. Bei der Spur 4 wurde ein Puffer ohne ATP verwendet, so dass keine Ligation der entstandenen Hälften eingetreten ist.

Sowohl die HeLa wie auch die T7 transkribierte pre-tRNA werden effizient im Weizenkeim S23 Extrakt prozessiert. Aufgrund der im Weizenkeimextrakt enthaltenen Nukleasen wird das entstehende Intron hydrolysiert und kann in dem Polyarylamidgel nicht aufgezeigt werden. Da kein Unterschied in der Spleißeffizienz für die HeLa und die T7 transkribierten pre-tRNAs aufgefunden werden konnte, wird für die folgenden Experimente ausschließlich mittels T7 RNA Polymerase transkribierte, intronhaltige pre-tRNA verwendet.

4.1.2. Synthese von tRNA Hälften für den Ligase-Aktivitätsnachweis

tRNA Hälften können zum einen aus pflanzlichen intronhaltigen pre-tRNAs über die Spleißreaktion mit angereicherten Endonukleasepräparationen aus Weizenkeimextrakten gebildet werden. Für eine einfache und effiziente Synthese wird im Rahmen dieser Arbeit die Hydrolyse einer chimären pre-tRNA mit der *Methanocaldococcus jannaschii* tRNA Endonuklease etabliert.

4.1.2.1. Konstruktion der Archeuka pre tDNA

Die Archaea tRNA Endonukleasen erkennen ihre Substrate über das Schleifen-Helix-Schleifen Motif ("bulge-helix-bulge") unabhängig von der maturen Domäne bzw. der Sekundärstruktur des Introns von der pre-tRNA (Diener and Moore, 1998; Marck und Grosjean, 2003). Daher wurde auf der Basis der pre-tRNA^{Tyr} aus *Nicotiana tabacum* eine chimäre pre-tRNA konstruiert, die die mature Domäne der pflanzlichen tRNA^{Tyr} und das "bulge-helix-bulge" Motiv im Anticodonstamm aufweist.

Ausgehend von dem 7.5 kb *Eco*RI Fragments mit dem codierenden Abschnitt für NtY9 (Fuchs *et al.*, 1992) wurde über PCR ein Subklon synthetisiert, dessen für tRNA^{Tyr} codierender Abschnitt unter die Kontrolle des T7 Promotors gelegt wurde. Zudem wurde nach der Diskriminatorbase die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *Bst*NI eingefügt, so dass die "run off" Transkription der tRNA mit dem funktionellen CCA endet. Für eine effiziente Initiation der

T7 Transkription wurde das erste C-G Basenpaar im Akzeptorstamm zu einem G-C Basenpaar ausgetauscht. Dieser Subklon wird als NtY9-T7 (Junker, 1999) bezeichnet (Abbildung 11). Die Anticodonschleife ist der empfindlichste Bereich für die autolytische Hydrolyse der pre-tRNA, die es nach Möglichkeit bei den *in vitro* Spleißexperimenten zu unterdrücken gilt. Daher wurde die Original Anticodonschleife mit 8 nt gegen die stabile Tetraschleife (Cheong *et al.*, 1990) ausgetauscht (NtY9-T7 M1; Englert, 2001). Nach dem Protokoll für die "Ex-site" Mutagenese der Firma Stratagene wurde im Rahmen dieser Arbeit über inverse PCR Deoxyoligonukleotid-gerichtet die Mutation zu der Archeuka pre-tDNA durchgeführt. Dabei amplifiziert man über PCR eine lineare Plasmid DNA mit pNtY9-T7 M1 als Matrize. Die erfolgreiche PCR wird über ein analytisches Agarosegel überprüft. Nach Aufreinigung des PCR Ansatzes wird mit der Polynukleotidkinase phosphoryliert und mit der T4 DNA Ligase bei 14 °C üN ligiert. Die über PCR synthetisierte und enzymatisch zirkularisierte Plasmid DNA wird über die Restriktionshydrolyse mit *DpnI* von verbliebener Matrizen DNA befreit und sodann für die Transformation durch Elektroporation verwendet. Die erfolgreiche Durchführung der Mutagenese wird durch DNA Sequenzanalyse bestätigt (Abbildung 11).

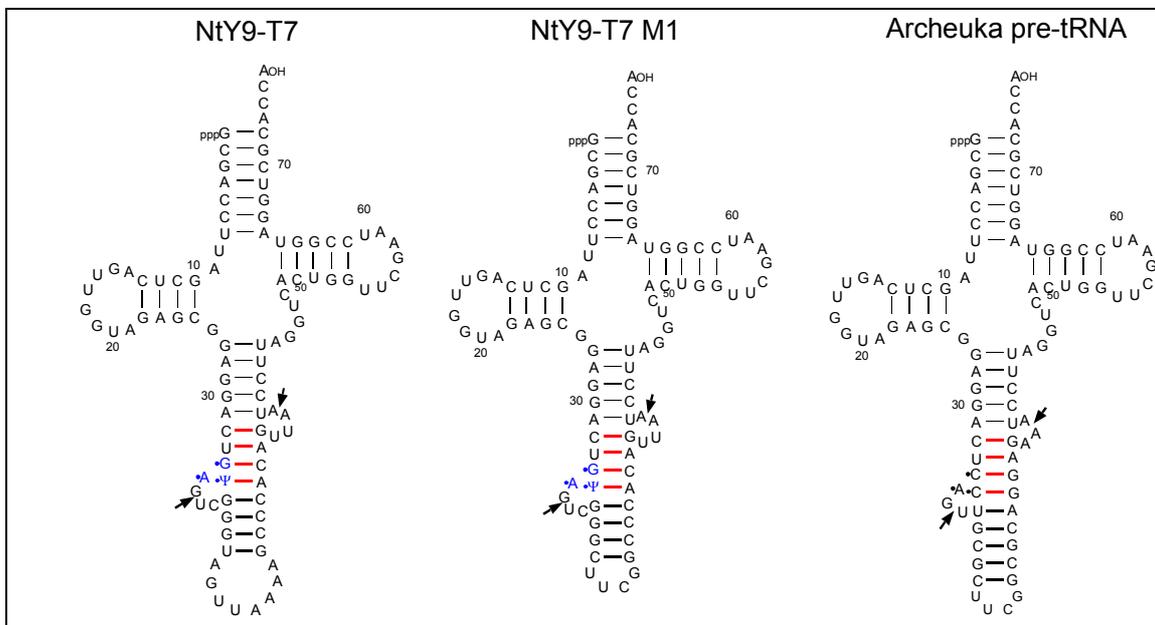


Abbildung 11. Sekundärstruktur intronhaltiger pre-tRNA^{Tyr} aus *Nicotiana tabacum* und der abgeleiteten Archeuka pre-tRNA

Die tRNA Spleißstellen sind mit Pfeilen aufgezeigt. Das Anticodon ist mit Punkten hervorgehoben.

4.1.2.2. Klonierung, rekombinante Expression und Aufreinigung der tRNA Spleißendonuklease aus *Methanocaldococcus jannaschii*

In einer Datenbanksuche des sequenzierten Genoms von *Methanocaldococcus jannaschii* (Bult *et al.*, 1996) konnte ein offenes Leseraster aufgefunden werden, das für ein Protein mit 179 Aminosäuren codiert und eine Homologie zum *S. cerevisiae* Sen44 und zur *H. volcanii* tRNA Endonuklease von 21 % und 30 % aufweist (Lykke-Andersen und Garrett, 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der codierende Bereich über PCR aus genomischer *Methanocaldococcus* DNA mit Startsequenzen, die die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* am amino- und carboxy-Terminus einfügen, amplifiziert und in die Proteinüberexpressionsvektoren pIVEX 2.4c und pIVEX WG 1.4 für die Expression eines Fusionsproteins mit einem amino-terminalen Histidin-tag kloniert.

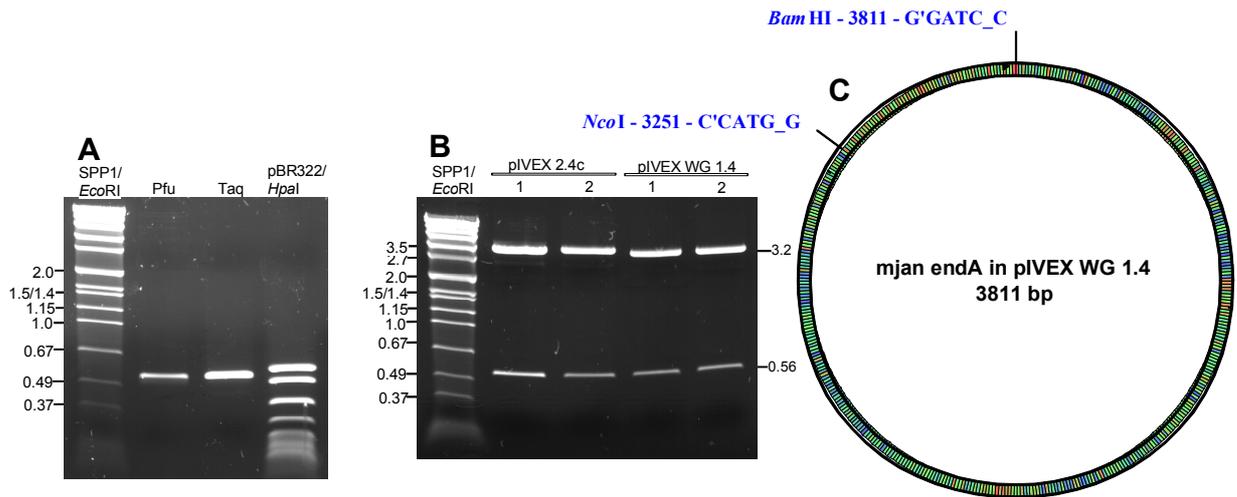


Abbildung 12. Klonierung der *M. jannaschii* RNA Spleißendonuklease

(A) PCR Amplifizierung des codierenden Abschnitts für die RNA Spleißendonuklease aus genomischer *Methanocaldococcus* DNA. Sowohl mit der *Pfu*, wie auch mit der *Taq* DNA Polymerase konnte der codierende Abschnitt amplifiziert werden.

(B) Nach Restriktionshydrolyse sowohl der Plasmid DNAs pIVEX 2.4c und pIVEX WG 1.4, wie auch der PCR Fragmente mit *NcoI* und *BamHI* werden die DNA Fragmente in einem präparativen Agarosegel aufgereinigt und für Ligationsansätze verwendet. Von Kolonien wurde eine Plasmid Mini Präparation durchgeführt und eine analytische Restriktionshydrolyse mit *NcoI* und *BamHI* durchgeführt und die erhaltenen Produkte in einem analytischen Agarosegel aufgetrennt.

(C) Der Plot des Klons der *Methanocaldococcus* Spleißendonuklease in pIVEX WG 1.4 ist zusammen mit den Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* wiedergegeben.

```

3151 TACTCCCCCA CAACAGCTTG TCGAACCATG TCTGGTTCTC ATCATCATCA
                                     M S G S H H H H
3201 TCATCATAGC AGCGGCATCG AAGGCCGCGG CCGCTTAATT AAACATATGA
      H H S S G I E G R G R L I K H M T pIVEX WG 1.4
      NcoI
3251 CCATGGTGAG AGATAAAATG GGCAAAAAAA TAACTGGATT GTTGGATGGA
      M V R D K M G K K I T G L L D G
3301 GATAGAGTTA TAGTGTTTGA CAAAAATGGG ATATCTAAGT TATCAGCAAG
      D R V I V F D K N G I S K L S A R
3351 GCATTATGGA AATGTTGAAG GGAATTTTTT ATCTCTATCT TTAGTTGAAG
      H Y G N V E G N F L S L S L V E A
3401 CCCTCTATTT GATAAAATTA GGATGGTTGG AAGTCAAATA TAAAGATAAC
      L Y L I N L G W L E V K Y K D N
3451 AAACCTCTAA GTTTTGAAGA ACTATATGAA TATGCGAGAA ATGTTGAAGA
      K P L S F E E L Y E Y A R N V E E
3501 AAGACTATGT TAAAATATT TAGTTTATAA GGATTTAAGA ACAAGAGGTT
      R L C L K Y L V Y K D L R T R G Y
3551 ATATAGTAAA GACTGGTTTG AAGTATGGGG CTGATTTTAG GCTTTATGAG
      I V K T G L K Y G A D F R L Y E
3601 AGGGGAGCTA ACATAGATAA AGAACACTCT GTTTATTTGG TTAAGGTATT
      R G A N I D K E H S V Y L V K V F
3651 TCCTGAAGAT AGCTCTTTTC TATTAAGTGA GCTAACTGGG TTTGTTAGGG
      P E D S S F L L S E L T G F V R V
3701 TTGCTCACTC AGTTAGAAAA AAATTACTCA TAGCAATCGT TGATGCAGAT
      A H S V R K K L L I A I V D A D
3751 GGGGATATTG TCTATTATAA CATGACCTAT GTAAAACCAT AAAATTAAAA
      G D I V Y Y N M T Y V K P *
      BamHI
3801 ATTTTGGAG GATCC
    
```

Abbildung 13. Ausschnitt der *Methanocaldococcus* Spleißendonuklease in pIVEX WG 1.4

Die Überexpression der *Methanocaldococcus* RNA Spleißendonuklease findet standardmäßig im RTS 100 WG CECF Kit (Roche, Mannheim), und die Aufreinigung über Metallchelataffinitätschromatographie an Ni-NTA Agarose unter nativen Bedingungen statt. Aus einem 50 µl Reaktionsansatz lassen sich ca. 20 µg aufgereinigte *M. jannaschii* tRNA Endonuklease gewinnen, die für präparative *in vitro* Spleißreaktionen mit der Archeuka pre-tRNA eingesetzt werden können (Abbildung 14).

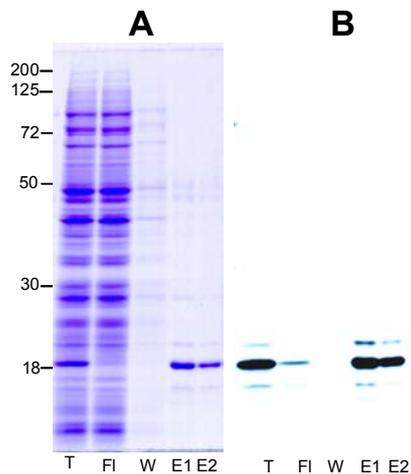


Abbildung 14. Überexpression und Aufreinigung der rekombinanten *M. jannaschii* tRNA Endonuklease

(A) Die Überexpression der *M. jannaschii* RNA Spleißendonuklease wird mit dem RTS 100 WG CECF Kit (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben in Anwesenheit von 0.07 mM Methionin und 0.03 µCi/µl [³⁵S]-Methionin durchgeführt. Je 2 µl Reaktionsmischung vor (T) und nach dem Binden (FI) an die Ni-NTA Agarose, sowie je 1/10 der letzten Waschfraktion (W) und den ersten beiden Elutionsfraktionen (E1, E2) werden in einem 12.5 % Polyacrylamidgel / 0.1 % SDS aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Blau gefärbt.

(B) Das Coomassie Blau gefärbte Gel wird anschließend für die Fluorographie nach Laskey und Mills (1975) vorbereitet. Das getrocknete Gel wird für die Exposition eines Röntgenfilms bei -80 °C für 14 h verwendet.

4.1.2.3. Präparative Hydrolyse der Archeuka pre tRNA zu tRNA Hälften

Der Nachweis dafür, ein enzymatisch aktives Protein der *M. jannaschii* RNA Spleißendonuklease überexprimiert und aufgereinigt und eine funktionsfähige chimäre pre-tRNA konstruiert zu haben, kann nur über Spleißreaktionen mit den oben aufgeführten Komponenten erbracht werden. Die Puffer- und Inkubationsbedingungen orientieren sich hierbei an bereits veröffentlichte Hydrolyseexperimente mit der *M. jannaschii* Endonuklease (Lykke-Andersen und Garrett, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wird der Schwerpunkt auf eine möglichst quantitative Hydrolyse des Substrats unter schonenden Bedingungen gelegt (Abbildung 15).

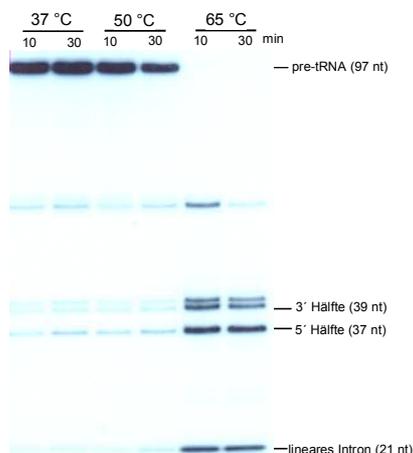


Abbildung. 15. Hydrolyse der Archeuka pre-tRNA (s. Abb. 11) mit der rekombinanten *M. jannaschii* tRNA Endonuklease

Zur Auffindung der optimalen Reaktionsparameter wurden 3 pmol Archeuka pre-tRNA in einem analytischen Spleißansatz bei der angegebenen Temperatur jeweils für 10 bzw. 30 min inkubiert.

Das Temperaturoptimum für die *M. jannaschii* Endonuklease wurde auf 65 °C ermittelt, wobei höhere Temperaturen aufgrund der autolytischen Hydrolyse der Substrate in Anwesenheit von 10 mM Mg²⁺

ausgeschlossen werden müssen (Abbildung 15). Bei Temperaturen bis 50 °C ist keine Zeitabhängigkeit der Hydrolyse zu erkennen. Vermutlich bleiben die gebildeten tRNA Hälften noch an das Enzym gebunden, so dass kein mehrfacher Umsatz möglich ist ("single turn over").

Für die quantitative, präparative Hydrolyse der Archeuka pre-tRNA wird daher das T7 Transkript (10 - 50 pmol) mit 1 – 3 µg *M. jannaschii* RNA Spleißendonuklease bei 65 °C für 10 min inkubiert.

4.1.3. Rekombinante Expression und Aufreinigung der tRNA Ligase aus *Saccharomyces cerevisiae*

Bisher sind lediglich die Gene für die tRNA Ligase aus der Hefe und naher verwandter Organismen bekannt. Die Hefe tRNA Ligase konnte von der Arbeitsgruppe von Prof. Abelson chromatographisch über 5 Stufen aufgereinigt und über eine aminoterminaler Proteinsequenzierung charakterisiert werden. Über ein Hybridisierungsexperiment von einer genomischen DNA Genbank im λ -Phagen mit DNA Sonden, die von der aminoterminalen Proteinsequenz abgeleitet wurden, konnte der genomische Abschnitt für die tRNA Ligase identifiziert werden (Phizicky *et al.*, 1986). Die tRNA Ligase aus *S. cerevisiae* wurde rekombinant in *E. coli* überexprimiert (Xu *et al.*, 1990a; Sawaya *et al.*, 2003) und für enzymatische Studien verwendet (Apostol *et al.*, 1991; Westaway *et al.*, 1993; Sawaya *et al.*, 2003). Von Prof. C. Greer (Irvine, CA) konnte das Plasmid pDAKC mit der codierenden Sequenz für die tRNA Ligase aus *S. cerevisiae* erhalten werden. Mittels PCR und Startsequenzen, die am amino-Terminus eine *Nco*I Schnittstelle und die am carboxy-Terminus eine *Sal*I Schnittstelle nach dem natürlichen Translationsterminationssignal einfügen, wurde die codierende Sequenz amplifiziert und in die *Nco*I/*Sal*I-hydrolysierte Plasmid DNA pIVEX 2.4c und pIVEX WG 1.4 kloniert. Die Expression erfolgt im *E. coli* RTS 100 und im Weizenkeim RTS 100 WG CECF und liefert die rekombinante Hefe tRNA Ligase mit einem amino-terminalen Histidin-Tag für eine konsekutive Aufreinigung an Ni-NTA Agarose (Abbildung 16). Analog wurde ein PCR Fragment für die Klonierung über *Nco*I und *Xho*I amplifiziert, das am carboxy-Terminus das natürliche Translationsterminationssignal entfernt und eine Klonierung im Leseraster für einen carboxyterminalen Histidin-Tag im pIVEX WG 1.3 Plasmid ermöglicht.

Die Expression im *E. coli* RTS 100 und RTS 100 WG CECF erfolgt nach Herstellerangaben (Englert und Beier, 2004; Abbildung 16.).

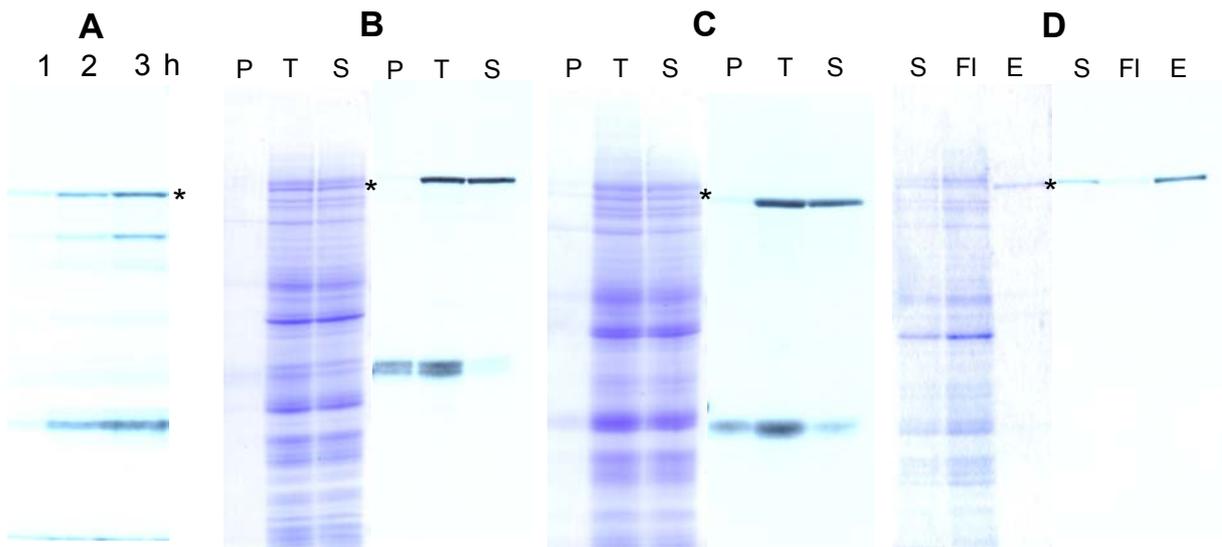


Abbildung 16. Überexpression und Aufreinigung der Hefe tRNA Ligase im RTS System

(A) Das Hefe tRNA Ligase Protein wird im *E. coli* RTS 100 Kit mit dem Plasmid der Hefe tRNA Ligase im pIVEX 2.4c überexprimiert. Zu den Zeitwerten von 1, 2 und 3 h wurden Aliquote von 5 μ l entnommen und in einem 10 % Polyacrylamidgel / 0.1 % SDS aufgetrennt. Es ist das Fluorogramm der über den Einbau von [35 S]-markierten Polypeptidketten zu sehen. Neben dem Volllängenprotein von ~ 95 kDa (*) werden zahlreiche Fragmente gebildet.

(B/C) Das Hefe tRNA Ligase Protein wird im RTS 100 WG CECF Kit mit dem Plasmid der Hefe tRNA Ligase im pIVEX WG 1.4 (B) und pIVEX WG 1.3 (C) überexprimiert. Nach Inkubation bei 24 °C für 24 h werden 3 μ l Gesamtreaktionsmischung (T), sowie der Überstand (S) und das Sediment (P) nach einer Zentrifugation bei 25 000 g für 10 min (Biofuge, 17000 UpM, 4 °C) in einem 10 % Polyacrylamidgel / 0.1 % SDS aufgetrennt, mit Coomassie Blau gefärbt und für die Fluorographie vorbereitet (Laskey und Mills, 1975).

(D) Metallchelate-Affinitätschromatographische Aufreinigung der im Ansatz (B) überexprimierten Hefe tRNA Ligase an Ni-NTA Agarose. 20 μ l Überstand der Reaktionsmischung nach Zentrifugation werden an 10 μ l Ni-NTA Agarose chromatographisch aufgereinigt. Je 1 μ l vor (S) und 2 μ l nach (FI) der Bindung an Ni-NTA Agarose, sowie 1/10 der ersten Elutionsfraktion mit 500 mM Imidazol werden in einem 10 % Polyacrylamid / 0.1 % SDS aufgetrennt.

Die Gesamtausbeute im *E. coli* RTS 100 ist niedrig und zudem werden – wie bei der Überexpression in *E. coli* Zellen – viele kleinere Proteinfragmente neben dem Volllängenprotein gebildet (Abbildung 16A). Lediglich im Weizenkeim-basierenden Expressionssystem (RTS 100 WG CECF) konnte genügend Hefe tRNA Ligase Protein in löslicher Form für eine konsekutive Aufreinigung an Ni-NTA Agarose und für enzymatische Studien gewonnen werden (Englert und Beier, 2004). Als Degradationsprodukt wird hauptsächlich ein 40 kDa Fragment gebildet. Bei der Überexpression der Hefe tRNA Ligase mit einem amino-terminalen Histidin-Tag konnte über Western Blot und immunologischem Nachweis mit Anti-His Antikörpern gezeigt werden, dass bei dem 40 kDa Fragment ein intakter Aminoterminus vorliegt (ohne Abbildung). Vermutlich liegt nach der Adenylyltransferasedomäne ein hydrolyseempfindlicher Teil in dem Hefe tRNA Ligase Protein, so dass eine Degradation des Proteins erfolgen kann (Sawaya *et al.*, 2003).

4.1.4. Ligation von tRNA Hälften mit der Hefe tRNA Ligase

Der Aufbau eines Nachweissystems für die RNA Ligaseaktivität aus Hefe und Pflanzen gestaltet sich etwas aufwendiger. Die Hefe tRNA Ligase verknüpft mit hoher Spezifität tRNA Hälften, die ein 2',3'-Cyclophosphat an der 5'-Hälfte und ein 5'-Hydroxyl oder 5'-Phosphat an der 3'-tRNA Hälfte

aufweisen. Daher verwendete die Arbeitsgruppe von Prof. Abelson tRNA-Hälften, die aus der Hydrolyse von intronhaltigen pre-tRNAs mit stark angereicherten Hefe tRNA Endonuklease Fraktionen erzeugt wurden (Phizicky *et al.*, 1986; Peebles *et al.*, 1983). Die Weizen tRNA Ligaseaktivität wurde anhand der Zirkularisierung eines artifiziiellen Substrats, das aus der RNase T1 Hydrolyse der TMV RNA mit einem 5'-Hydroxyl und einem 2',3'-Cyclophosphat erzeugt wurde, entdeckt (Konarska *et al.*, 1981). Auch in der Arbeitsgruppe von Prof. Hurwitz ist ein artifizielles Substrat mit einem 5'-Phosphat, bzw. 5'-Hydroxyl und einem 2',3'-Cyclophosphat für die chromatographische Anreicherung der Weizen RNA Ligaseaktivität verwendet worden (Furneaux *et al.*, 1983; Pick und Hurwitz, 1986).

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Weizen tRNA Endonuklease Aktivität charakterisiert und für die präparative Hydrolyse von pflanzlichen pre-tRNAs für den Ligaseaktivitätsnachweis angereichert. Zum anderen werden die mit der *M. jannaschii* Endonuklease generierten Archeuka tRNA-Hälften für den RNA Ligaseaktivitätsnachweis eingesetzt (Abbildung 17).

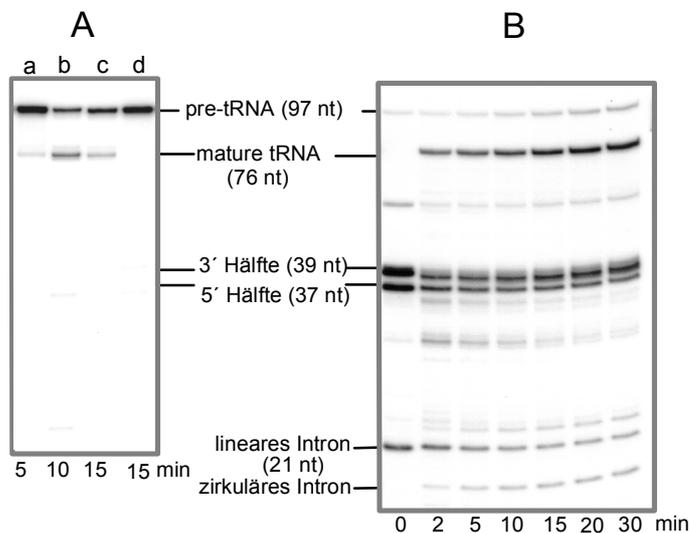


Abbildung 17. Ligaseaktivitätsnachweis der rekombinanten Hefe tRNA Ligase mit pflanzlichen und Archeuka tRNA-Hälften

(A) 40 fmol pflanzliche pre-tRNA N9T7 M1 werden in 20 µl Spleißpuffer mit 2 µl Weizen tRNA Endonuklease angereicherter Fraktion bei 37 °C für 30 min inkubiert, anschließend werden die Ansätze a – c mit 50 ng Hefe tRNA Ligase supplementiert und zu den angegebenen Zeitwerten abgestoppt. Ansatz d wird nicht supplementiert und dient als Negativkontrolle. Nach Phenolisierung und Ethanol-fällung wurden die RNA Produkte in einem denaturierendem 13 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Autoradiographie visualisiert.

(B) 400 fmol aufgereinigte Archeuka pre tRNA Hälften wurden in 100 µl Spleißpuffer mit 100 ng Hefe tRNA Ligase inkubiert und zu den angegebenen Zeitwerten jeweils 10 µl für die elektrophoretische Analyse in einem 13 % denaturierenden Polyacrylamidgel entnommen.

Lediglich mit den Archeuka tRNA Hälften ist genügend Substrat für eine Quantifizierung der Hefe tRNA Ligaseaktivität vorhanden (Abbildung 17). Die *M. jannaschii* RNA Endonuklease kann sehr effizient im RTS 100 WG CECF überexprimiert und leicht an Ni-NTA Agarose aufgereinigt werden. Die Enzympräparation kann mit DTT ad 4 mM und Glycerol ad 50 % (v/v) supplementiert bei – 20 °C für einige Monate gelagert werden. Daher werden seit der Etablierung der Hydrolyse der Archeuka pre-tRNA mit der rekombinanten *Methanocaldococcus* tRNA Endonuklease ausschließlich Archeuka tRNA-Hälften für den Ligaseaktivitätsnachweis verwendet.

4.2. Charakterisierung und Anreicherung der pflanzlichen tRNA Endonuklease

In dieser Arbeitsgruppe konnten zwei Untereinheiten der *Arabidopsis* tRNA Spleißendonuklease aufgefunden werden, die jeweils über die aktiven Zentren für die Hydrolyse der pre-tRNA verfügen (Akama *et al.*, 2000a). Anhand der Überexpression der rekombinanten AtSen1 und AtSen2 Proteine soll mit dem tRNA Endonukleaseaktivitätsnachweis untersucht werden, ob ein funktioneller tRNA Spleißkomplex durch AtSen1 und AtSen2 aufgebaut werden kann. Als Kontrolle wird die native tRNA Endonukleaseaktivität im Weizenkeimextrakt verwendet. Da in diesem pflanzlichen Extrakt noch viele unspezifische Nukleasen vorhanden sind, ist eine chromatographische Anreicherung der pflanzlichen tRNA Endonuklease für eine Charakterisierung sehr von Vorteil.

4.2.1. Unterscheidung zwischen enzymatischer und autolytischer Spaltung von pre-tRNA

Die Anticodonschleife ist der empfindlichste Bereich für die autolytische Hydrolyse von tRNAs. Zudem liegt bei den pre-tRNAs das Intron in einer verlängerten Anticodonschleife mit exponierten 5' und 3' Spleißstellen vor. Daher kann allein bei der Inkubation einer pre-tRNA in einem Spleißpuffer eine autolytische Hydrolyse erfolgen (van Tol *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 1996), deren Produkte den authentischen tRNA Hälften sehr ähnlich sind. Eine Unterscheidung zwischen der enzymatischen und autolytischen Hydrolyse kann nur mit einer chromatographisch angereicherten und von störenden Komponenten befreiten tRNA Endonukleasepräparation erfolgen.

20 ml Weizenkeim S100 Extrakt lässt man durch eine 10 ml DEAE Cellulose Säule (Whatman, DE 52), äquilibriert in Puffer A mit 100 mM KCl, passieren. Der Durchfluss wird auf tRNA Spleißendonukleaseaktivität untersucht und nur die aktiven Fraktionen weiter verarbeitet. Ein Teil der Proteine sind ausgefallen und werden durch die Zugabe von Puffer A ad 4 Volumen und 100 mM KCl wieder gelöst. Diese Fraktionen lässt man durch eine 5 ml HiTrap Heparin Sepharose (Amersham) Säule, äquilibriert in Puffer A mit 100 mM KCl, passieren und der Durchfluss wird ebenfalls auf tRNA Spleißendonuklease Aktivität untersucht (Abbildung 18).

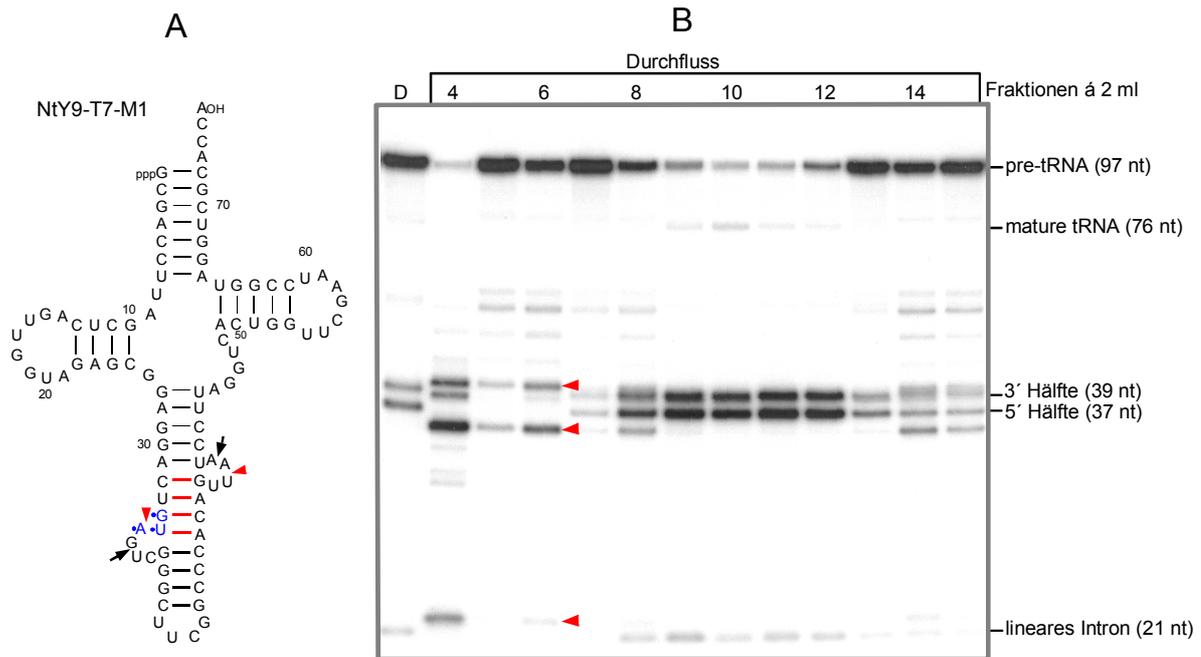


Abbildung 18. tRNA Endonuklease Nachweis der chromatographischen Durchflussfraktionen der HiTrap Heparin Sepharose Säule

(A) Die Sekundärstruktur der *Nicotiana* pre-tRNA^{Tyr} NtY9-T7-M1 ist aufgezeigt. Pfeile zeigen die authentischen, Pfeilköpfe die autolytischen Spleißstellen auf.

(B) tRNA Spleißendonuklease-Aktivitätsnachweis von chromatographischen Fraktionen während der Aufreinigung mit der 5 ml HiTrap Heparin Sepharose Säule. 10 fmol N9T7 M1 werden in einem analytischen Spleißansatz mit 2 µl Fraktion bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die RNA Produkte werden phenolisiert, präzipitiert und in einem 10 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Autoradiographie visualisiert. Die vereinten DEAE Durchflussfraktionen werden ad 100 mM KCl mit Puffer A verdünnt (D) und auf eine HiTrap Heparin Sepharose Säule aufgetragen. Der Durchfluss wurde in 15 Fraktionen gesammelt.

Nur mit den enzymatisch hydrolysierten tRNA Hälften werden RNA Fragmente gebildet, die in dem Polyacrylamidgel ein Laufverhalten von 39 und 37 nt aufweisen. Die autolytischen Hydrolyseprodukte haben vermutlich eine Länge von 40 und 35 nt. Für eine genauere Zuordnung der Länge – zumindest der 3'-tRNA Hälfte – wurde eine "Primer Extension" Analyse durchgeführt.

Bei einer autolytischen Reaktion im präparativem Maßstab mit Fraktion 4 konnte ca. 50 fmol der jeweiligen tRNA Hälfte aus dem Gel durch Diffusionselution zurückgewonnen werden.

Die Startsequenzen für die "Primer Extension" Reaktion werden mit der Polynukleotidkinase und γ [³²P]ATP über das 5'-[³²P]-Phosphat radioaktiv markiert, in einem 15 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgereinigt und über Diffusionselution zurückgewonnen (ohne Abbildung). Die Startsequenzen dienen zum einen für die „Original“ Sanger-Sequenzierung. Zum anderen werden die Startsequenzen für die Matrizen-abhängige reverse Transkription eingesetzt (Abbildung 19).

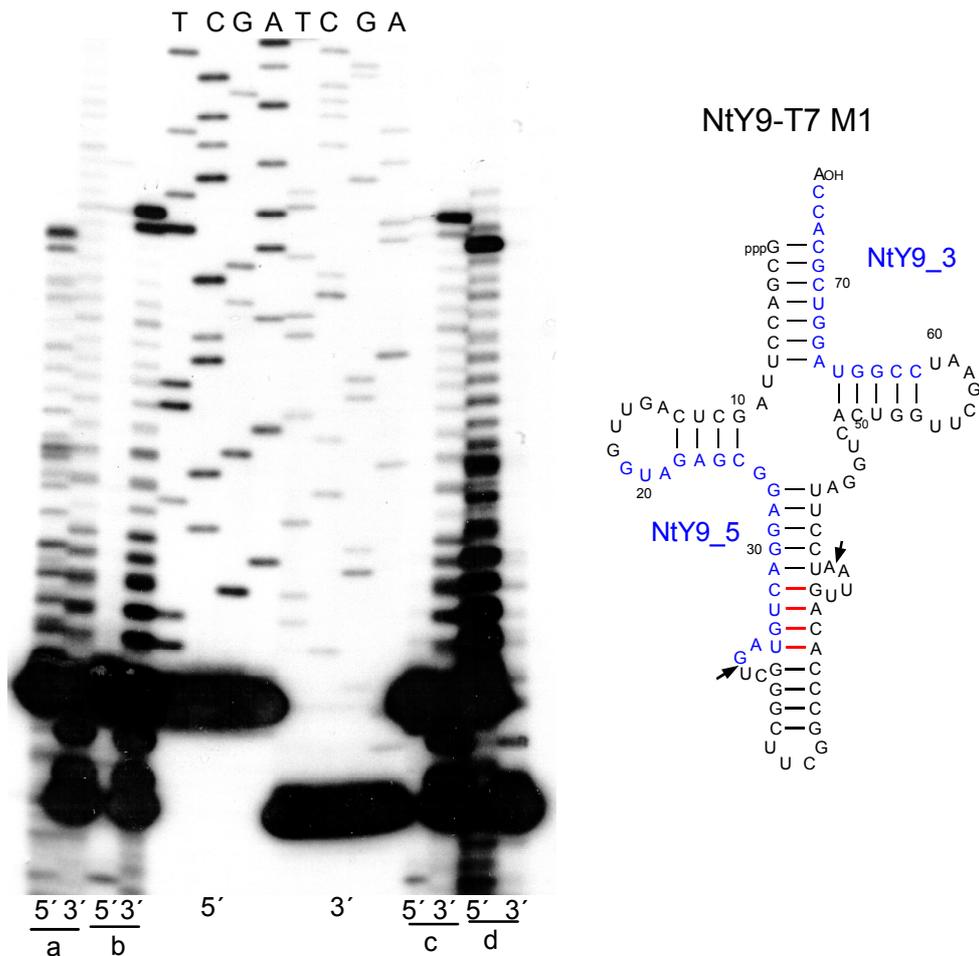


Abbildung 19. Sanger-Sequenzierung und „Primer Extension“ Reaktion in Abhängigkeit von der Matrize pNtY9-T7 M1 und von den autolytisch gebildeten tRNA Hälften von NtY9-T7 M1

Für die Primer Extension Analyse wurde (a) intronhaltige pre-tRNA (b) längste tRNA Hälfte (c) mittlere tRNA Hälfte und (d) kürzeste tRNA Hälfte als Matrize für die reverse Transkription eingesetzt (s. Abb. 18).

Anhand der „Primer Extension“ Reaktion kann die obere und mittlere Bande der 3'-tRNA Hälfte zugeordnet werden (Abbildung 19). Darüber hinaus läuft das „Extension“ Produkt auf der Höhe von 40 nt, so dass gefolgert werden kann, dass die autolytische Hydrolyse an der labilen U-A-Bindungsstelle erfolgt. Die untere Bande kann der 5'-tRNA Hälfte zugeordnet werden, darüber hinaus lassen sich jedoch keine weiteren Aussagen treffen.

4.2.2. Anreicherung der pflanzlichen tRNA Endonuklease Aktivität

Für eine präparative Hydrolyse der intronhaltigen pre-tRNA zu tRNA-Hälften ist es erforderlich, die tRNA Spleißendonukleaseaktivität anzureichern und zudem von unspezifischen Nukleasen zu befreien. Da sich die tRNA Endonuklease wie ein Membranprotein verhält, wird ein Puffer mit 0.1 % Triton X-100 verwendet. Die tRNA Spleißendonukleaseaktivität kann so solubilisiert und zur Bindung an säulenchromatographische Medien befähigt werden.

Stufe 1: S30 Extrakt

40 g Weizenkeime werden dreimal mit Cyclohexan gewaschen und so von Lipiden und Stärkeresten befreit. Die trockenen Weizenembryonen (30 g) werden in einem Mörser mit 30 g Seesand fein verrieben. Zu dem Pulver werden 120 ml Extraktionspuffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 200 mM Ammoniumsulfat, 3 mM DTT, 0.1 % Triton X100) gegeben und bis zur homogenen Paste verrührt. Durch Zentrifugation bei 30.000 g (JA 14, 13000 UpM) werden Zelltrümmer abgetrennt und der Überstand weiter verarbeitet (80 ml, 8 g Protein).

Stufe 2: Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

Der S30 Extrakt wird durch Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung ad 30 % Sättigung eingestellt. Die ausgefallenen Proteine werden durch Zentrifugation bei 15000 g (JA 14, 10000 UpM) entfernt. Der Überstand wird ad 50 % Sättigung durch Zugabe einer gesättigten Ammoniumsulfat-Lösung eingestellt. Die ausgefallenen Proteine werden durch Zentrifugation bei 15000 g für 10 min (JA 14, 10000 UpM) sedimentiert und der Überstand verworfen. Das 30 – 50 % Sediment wird in Puffer B (50 mM MES, pH 6.0, 3 mM MgCl₂, 3 mM DTT, 0.1 % Triton X100) gelöst und solange verdünnt, bis eine Leitfähigkeit von 100 mM KCl in Puffer B erreicht ist (300 ml, 4 g Protein).

Stufe 3: Phosphocellulose-Säule

Eine 50 ml Phosphocellulose wird mit 200 ml Puffer B / 100 mM KCl äquilibriert und mit der verdünnten 30 – 50 % Ammoniumsulfat-Fraktion beladen. Die Elution erfolgt in einem 500 ml linearen Gradienten von 100 – 800 mM KCl. Es werden Fraktionen á 20 ml gesammelt und auf tRNA Spleißendonuklease-Aktivität untersucht (Abbildung 20). Die aktiven Fraktionen 38 – 44 werden vereinigt und mit Puffer A (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 3 mM MgCl₂, 3 mM DTT, 0.1 % Triton X100) zu einer Leitfähigkeit von Puffer A / 100 mM KCl verdünnt. (140 ml, 200 mg Protein).

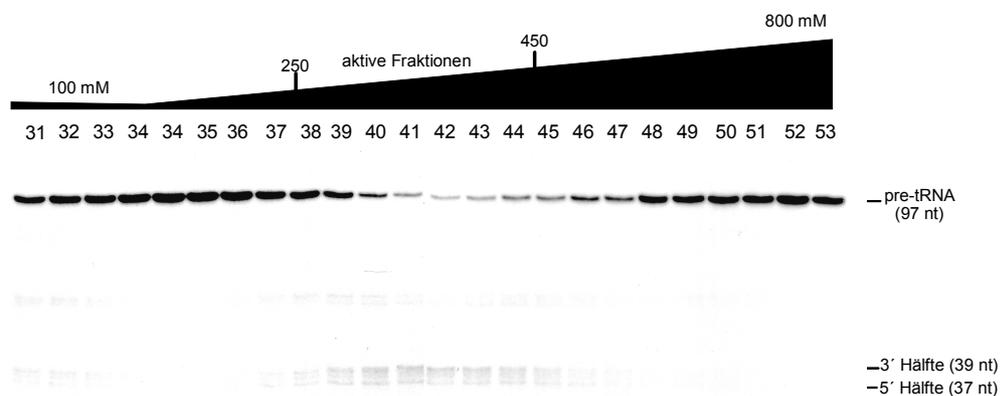


Abbildung 20. tRNA Spleißendonuklease-Nachweis für die Fraktionen der Phosphocellulose Säule

Die analytischen Spleißansätze werden mit 2 µl der jeweiligen Fraktion supplementiert und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die RNA Produkte werden phenolisiert, präzipitiert und in einem 10 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Auswertung findet durch Autoradiographie statt.

Stufe 4: Heparin-Sepharose

Eine 5 ml HiTrap Heparin-Sepharosesäule wird mit 50 ml Puffer A / 100 mM KCl äquilibriert und dann mit den verdünnten Phosphocellulose-Säulenfraktionen beladen. Die Elution findet in einem 50 ml linearen Gradienten von 100 – 800 mM KCl statt. Es werden Fraktionen á 2.5 ml gesammelt. Die tRNA Spleißendonuklease-Aktivität eluiert bei 240 – 420 mM KCl. Die aktiven Fraktionen 9 – 14 werden vereint (12.5 ml, 5.2 mg Protein) und zu einer Leitfähigkeit von Puffer A / 100 mM KCl verdünnt.

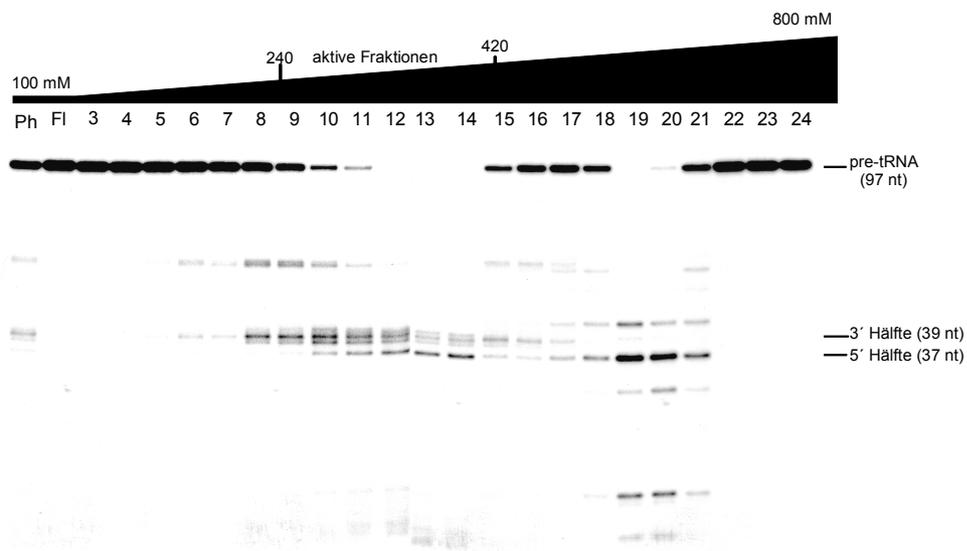


Abbildung 21. tRNA Spleißendonuklease-Nachweis für die Fraktionen der Heparin-Sepharose-Säule

Auf eine 5 ml HiTrap Heparin-Sepharose-Säule werden die verdünnten aktiven Phosphocellulose-Fraktionen (Ph) aufgetragen und dabei der Durchfluss (Fl) ebenfalls wie die Elutionsfraktionen 3 – 24 auf die Spleißendonuklease-Aktivität untersucht.

Stufe 5: Cibacron Blau an Trisacryl M

Eine 2 ml Cibacron Blau-Säule wird mit Puffer A / 100 mM KCl äquilibriert und mit den verdünnten, aktiven Heparin-Sepharose Elutionsfraktionen beladen. Die Elution erfolgt in einem 20 ml linearen Gradienten von 100 – 800 mM KCl, wobei Fraktionen á 1 ml gesammelt werden. Die tRNA Endonuklease-Äktivität eluiert bei 200 – 300 mM KCl (4 ml, 1.8 mg).

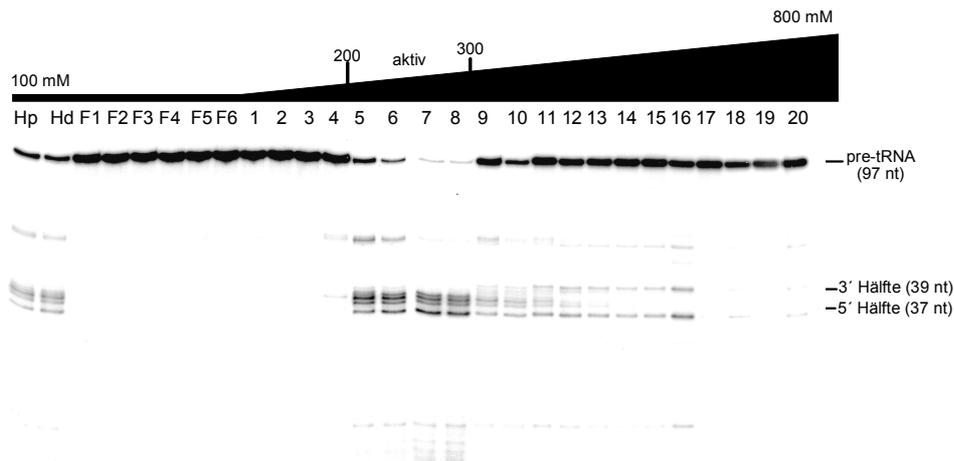


Abbildung 22. tRNA Spleißendonuklease-Nachweis für die Cibacron Blau Trisacryl M Fraktionen

Die aktiven Heparin Fraktionen 9 – 14 werden vereint (Hp), mit Puffer A ad 100 mM KCl verdünnt (Hd) und auf eine 2 ml Cibacron Blau Säule aufgetragen. Von den Durchfluss Fraktionen (F1 – F6), sowie von den Elutionsfraktionen 1 – 20 wird ein analytischer tRNA Spleißendonuklease-Nachweis durchgeführt. Die Analyse der aufgereinigten RNA Produkte findet in einem 12.5 % denaturierenden Polyacrylamidgel durch Autoradiographie statt.

30 g Weizenkeime

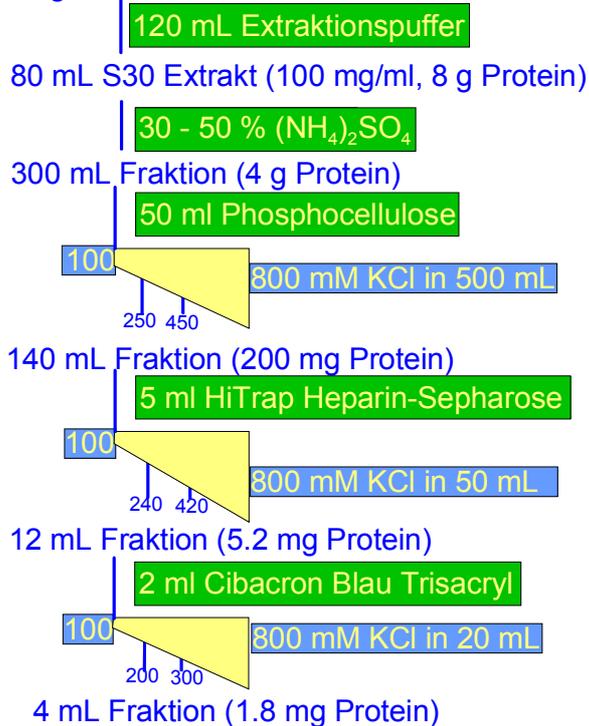


Abbildung 23. Aufreinigungsschema für die Weizen tRNA Spleißendonuklease-Aktivität

Die tRNA Spleißendonuklease kann ausgehend von einem solubilisierten S30 Extrakt über vier chromatographische Säulen ca. 1000 fach angereichert werden.

4.2.3. Immunologische Kreuzreaktion von Anti-AtSen Antikörpern mit pflanzlichen Proteinextrakten

Die Aufreinigung eines Membranproteins mittels klassischer biochemischer Chromatographiesäulen ist sehr schwierig und kann nur über die Etablierung eines vielstufigen Aufreinigungsschemas erfolgen. Für die Isolierung eines Proteinkomplexes ist es sehr von Vorteil, wenn bereits eine Untereinheit bekannt ist. Die Gewinnung von polyklonalen Antikörpern kann durch Immunisierung von Kaninchen mit der rekombinant überexprimierten Untereinheit erfolgen. Diese Antikörper werden dann kovalent an Protein A gekoppelt und für die Immunopräzipitation des Proteinkomplexes mit der bekannten Untereinheit verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Spezifität der Anti-AtSen1- und Anti-AtSen2-Antikörper gegenüber pflanzlichen Extrakten untersucht (Abbildung 24). Als Kontrolle dienen die rekombinant überexprimierten AtSen1- und AtSen2-Proteine. Da die Antikörper-Seren von Kaninchen eine Vielzahl von Antikörpern gegen *E. coli* Proteine enthalten, werden die AtSen-Proteine im Weizenkeim-basierenden RTS 100 WG CECF System überexprimiert.

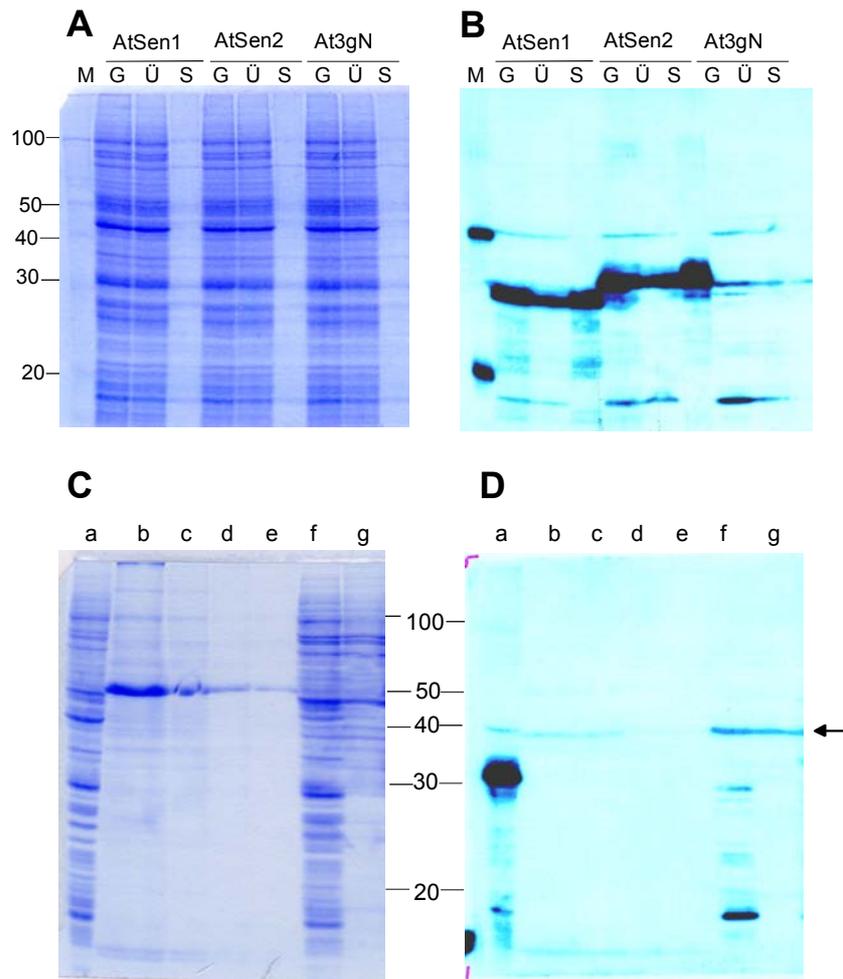


Abbildung 24. Immunologische Kreuzreaktion von Anti-Sen2 Antikörpern mit rekombinanten Proteinen und pflanzlichen Extrakten.

(A) Zur Kontrolle wird das Antigen – AtSen1 und AtSen2 – in dem Weizenkeimextrakt-basierenden RTS 100 WG CECF System überexprimiert. Als Negativkontrolle wird ein neutrales *Arabidopsis* Protein At3g verwendet. Von den Reaktionsansätzen werden jeweils 2 μ l Reaktionsmischung (G), sowie 2 μ l Überstand (Ü) und 2 μ l Sediment (S) nach 10 minütiger Zentrifugation bei 30.000 g aufgetragen.

(B) Auf der Höhe von AtSen1 und AtSen2 kann eine sehr starke Kreuzreaktion beobachtet werden. In der Weizenkeim RTS Reaktionsmischung, die ebenfalls tRNA Spleißendonuklease-Aktivität enthält, können schwache Kreuzreaktionen auf der Höhe von 40 kDa, 30 kDa und 18 kDa beobachtet werden.

(C) Für eine genauere Untersuchung wurden

- (a) die RTS 100 Reaktionsmischung mit AtSen2,
- (b) 50 μ g *Arabidopsis* S30 Extrakt,
- (c) 30 μ g *Arabidopsis* S100 Extrakt,
- (d) 5 μ g *Arabidopsis* S30 Extrakt,
- (e) 3 μ g *Arabidopsis* S100 Extrakt,
- (f) 30 μ g Weizenkeim S30 Extrakt,
- (g) 25 μ g Weizenkeim S100 Extrakt

für den immunologischen Nachweis mit Anti-Sen2-Antikörpern verwendet.

(D) Auf der Höhe von 40 kDa kann eine spezifische Kreuzreaktion von den Anti-Sen2 Antikörpern in einem pflanzlichen Protein nachgewiesen werden.

Es kann eine spezifische Kreuzreaktion von Anti-Sen2-Antikörpern mit einem 40 kDa Protein (\leftarrow) in pflanzlichen Extrakten nachgewiesen werden (Abbildung 24D). Inwieweit es sich dabei um ein Protein aus dem tRNA Spleißendonuklease-Komplex handelt, muss im Rahmen dieser Arbeit offen bleiben.

4.3. Charakterisierung der pflanzlichen tRNA Ligase

4.3.1. Literaturrecherche für die Aufreinigung von RNA Ligasen

Vor Beginn der experimentellen, sukzessiven Aufreinigung der Weizen tRNA Ligaseaktivität empfiehlt es sich, bereits veröffentlichte Ergebnisse für die chromatographische Aufreinigung von RNA Ligasen zu studieren.

Die Weizen RNA Ligase ist ein stark basisches Protein, da eine Bindung an Kationenaustauschern noch bei pH 7.9 und 100 mM NaCl im Chromatographiepuffer möglich ist. Im Glycerolgradienten sedimentiert die Weizen tRNA Ligase mit 6.2 S, was auf ein Molekulargewicht von ca. 90-130 kDa schließen lässt und das mit zwei adenylisierbaren Proteinen von ca. 110 kDa in einem Silbergel korreliert (Pick und Hurwitz, 1986). Zudem ist eine affinitätschromatographische Aufreinigung mit Heparin-, tRNA- und ATP-Sepharose möglich (Gegenheimer *et al.*, 1983; Pick und Hurwitz, 1986). Die Weizen tRNA Ligaseaktivität ist in Lösung nur in Anwesenheit von genügend Salz stabil. Eine Weizen tRNA Ligasefraktion kann in Gegenwart von Proteaseinhibitoren und 500 mM NaCl für einige Tage bei 4 °C ohne merklichen Verlust an Aktivität gelagert werden. Bei niedriger Ionenstärke des Chromatographie-Puffers (50 mM NaCl) geht innerhalb von 12 Stunden 90 % der Aktivität verloren (Pick und Hurwitz, 1986). Eine chromatographische Aufreinigung an Hydroxylapatit ist zudem möglich, jedoch konnte hier nur ein niedriger Aufreinigungsfaktor mit hohem Verlust an enzymatischer Aktivität erzielt werden (Gegenheimer *et al.*, 1983; Pick und Hurwitz, 1986).

Die Weizen und die Hefe tRNA Ligase bilden eine 2'-Phosphomonoester-, 3',5'-Phosphodiesterbindung an der Ligationstelle und verfügen über die Adenylyltransferase, Polynukleotidtransferase und zyklische Phosphodiesterase Aktivität (Greer *et al.*, 1983; Phizicky *et al.*, 1986; Pick und Hurwitz, 1986; Pick *et al.* 1986). Zudem konnte in dieser Arbeitsgruppe eine spezifische Kreuzreaktion mit polyklonalen Antikörpern von der Hefe tRNA Ligase zu einem Weizenprotein von ca. 120 kDa aufgezeigt werden (Naß, 1997). Folglich weisen die Hefe und die Weizen tRNA Ligase eine Ähnlichkeit auf. Für die Hefe tRNA Ligase sind mehrere Aufreinigungsstrategien entwickelt worden, die zunehmend eine höhere Effizienz und Ausbeute zur Folge hatten. Letzlich erwies sich die Reihenfolge von Heparin-, Cibacron Blau-Sepharose, Hydroxylapatit und Gelfiltration als besonders günstig für die Aufreinigung der rekombinant in *E. coli* exprimierten Hefe tRNA Ligase (Xu *et al.*, 1990a).

4.3.2. Chromatographische Aufreinigung der tRNA Ligase aus Weizenkeimen

Alle Schritte während der chromatographischen Aufreinigung werden bei 4 °C unter Verwendung des Puffers A mit der angegebenen Salzkonzentration durchgeführt.

Puffer A:

50	mM	Tris-Cl, pH 7.5
3	mM	MgCl ₂
4	mM	β-Mercaptoethanol
0.1	%	Triton X-100
0.2	mM	PMSF
0.4	mM	Benzamidin
0.4	µg/ml	Pepstatin A
0.5	µg/ml	Leupeptin

Stufe 1: Weizenkeimextrakt S100

160 g Weizenkeime werden dreimal mit Cyclohexan gewaschen und so von Lipiden und Stärkeresten befreit. Die trockenen Weizenembryonen (120 g) werden in einer elektrischen Mühle zu einem feinen Pulver gemahlen und dann bei 4 °C mit 500 ml Puffer A / 200 mM (NH₄)₂SO₄ in einem Mörser mit einem Pistill zu einem homogenen Brei für 5 min gerührt. Durch Zentrifugation (JA14, 13.000 UpM, 15 min) wird ein S30 Weizenkeimextrakt gewonnen (400 ml, 120 mg/ml, 48 g Protein). Ribosomen und Membranen werden durch Ultrazentrifugation (Ti45, 42.000 UpM, 90 min) sedimentiert. Der Überstand (S100 Extrakt) wird vorsichtig mit einer 10 ml Pipette unterhalb der mit Stärkeresten getrübbten Phase entnommen (280 ml, 28 g Protein). Der S100 Extrakt wird mit 1/100 Vol an 10 % Polymin P, pH 7.5 unter Rühren langsam supplementiert und weitere 10 min gerührt. Die ausgefallenen Nukleinsäuren werden durch Zentrifugation (JA14, 10000 UpM, 10 min) entfernt.

Stufe 2: Ammoniumsulfat Fällung

Zu dem S100 Extrakt werden 1 Vol gesättigte Ammoniumsulfatlösung unter Rühren über einen Zeitraum von 5 min tropfenweise hinzugefügt. Nach 30 min Rühren werden die ausgefallenen Proteine sedimentiert (JA14, 10000 UpM, 10 min). Der Überstand wird verworfen, das Sediment in Puffer A gelöst und auf eine Leitfähigkeit von 180 mM KCl in Puffer A eingestellt (800 ml, 12 g Protein).

Stufe 3: Heparin Sepharose

Heparin Sepharose FF ("*fast flow*") wird in eine C16/20 Säule (Amersham, Freiburg) gepackt und der obere Adapter bei der maximalen Fließgeschwindigkeit auf die Sepharose adjustiert. Die Säule wird mit 5 Vol Puffer A mit 180 mM KCl äquilibriert und mit der Ammoniumsulfat-Fraktion beladen. Nach einem Waschschrift von 2 Vol Puffer A / 180 mM KCl werden die gebundenen Proteine in einem 400 ml linearen Gradienten von 180 – 500 mM KCl eluiert und dabei auf 40 Fraktionen verteilt. Für den RNA Ligaseaktivitätsnachweis wird auf dieser Stufe noch die intronhaltige pre-tRNA verwendet (Abbildung 19). Die endogen in allen Fraktionen vorhandene tRNA Endonuklease hydrolysiert genügend pre-tRNA, so dass die Ligation der tRNA Hälften und die Zirkularisation des linearen Introns in einem Bereich von 270 – 340 mM KCl aufgezeigt werden kann (100 ml, 300 mg Protein).

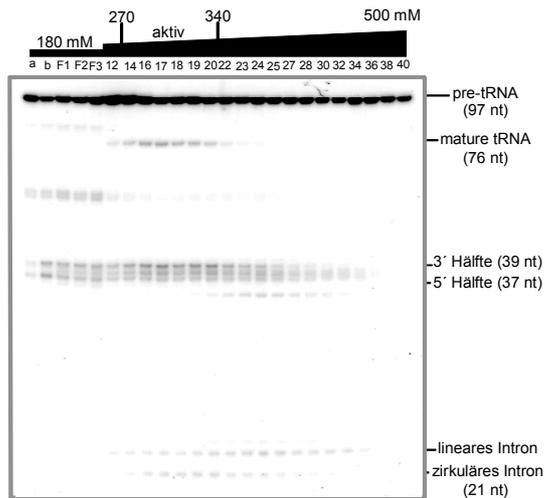


Abbildung 25. Ligaseaktivitätsnachweis für die Fraktionen der Heparin-Sepharose-Säule

Jeweils 2 µl des S100 Extraktes (a), des gelösten 0 – 50 % Ammoniumsulfat-Sedimentes (b), der Durchflussfraktionen der Heparin-Säule (F1 – F3), sowie der Elutionsfraktionen der Heparin-Säule (12 – 40) werden in einem analytischen Spleißansatz mit 40 fmol N9T7-M1 Transkript bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die RNA Produkte werden phenolisiert, präzipitiert, in einem 13 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Autoradiographie visualisiert.

Stufe 4: Cibacron Blau Trisacryl

Cibacron Blau Trisacryl wird in eine C10/20 Säule gepackt und der obere Adapter auf das Säulenbett während der höchsten verwendeten Fließgeschwindigkeit adjustiert. Die Säule wird mit 5 Vol Puffer A / 150 mM KCl äquiliert. Die Heparinfraktionen mit tRNA Ligaseaktivität werden vereinigt, mit Puffer A zu einer Leitfähigkeit von 150 mM KCl verdünnt und auf die Cibacron Blau Trisacryl Säule mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgt in einem 100 ml linearen Gradienten von 150 bis 700 mM KCl, wobei 20 Fraktionen gesammelt werden (Abbildung 20).

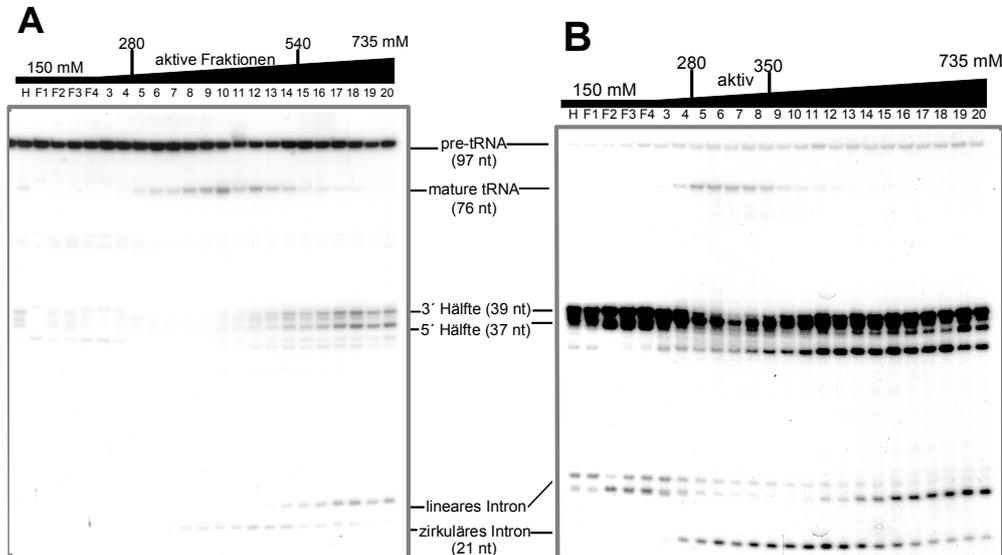


Abbildung 26. Ligasenachweis für die Fraktionen der Cibacron Blau Säule

(A) Ligaseaktivitätsnachweis mit pre-tRNA und endogener tRNA Endonukleaseaktivität

(B) Ligaseaktivitätsnachweis mit Archeuka tRNA Hälften und linearem Intron.

(A/B) In einem 20 µl Reaktionsansatz werden 40 fmol RNA in 1xSpleißpuffer bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend werden die Nucleinsäuren phenolisiert, präzipitiert, in einem 12.5 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Autoradiographie visualisiert.

Lediglich mit den Archeuka tRNA Hälften kann eine quantitative Aussage über die tRNA Ligaseaktivität getroffen werden. Der größte Teil eluiert bei 280 – 350 mM KCl (Abbildung 26B). Der

Peak der Ligaseaktivität in Abbildung 26A ist asymmetrisch mit einem Nachschweif bis hin zu 540 mM KCl.

Die Weizen tRNA Ligase liegt zu über 90 % in der adenylierten Form vor. Daher ist nur eine schwache Bindung an den Cibacron Blau Farbstoff möglich. Die deadenylierte Form kann jedoch eine viel stärkere Wechselwirkung mit dem NAD^+ -ähnlichen Cibacron Blau Farbstoff eingehen und eluiert erst bei einer höheren KCl Konzentration im Elutionspuffer. Wird nur die Hauptligaseaktivität von 280 – 350 mM KCl für die nächste Säule verwendet, findet eine 15-fache Anreicherung der tRNA Ligaseaktivität statt.

Stufe 5. Source S15

Das Säulenmaterial wird in eine leere 1 ml HiTrap Säule gepackt und mit Puffer A / 100 mM KCl äquilibriert. Die vereinten aktiven Fraktionen der Cibacron Blau Säule werden mit Puffer A zu einer Leitfähigkeit von 100 mM KCl verdünnt und mit 0.5 ml/min auf die 1 ml Source S15 aufgetragen. Die Elution erfolgt in einem 15 ml linearen Gradient von 100 – 500 mM KCl. Es werden 30 Fraktionen gesammelt. Die tRNA Ligaseaktivität eluiert bei 180 – 240 mM KCl (2.5 ml, 3 mg Protein).

Stufe 6. Gelfiltration an HiLoad™ Superdex 200

Die fertig gepackte 16/60 XK Säule mit HiLoad™ Superdex 200 wird mit 5 Vol Puffer A / 200 mM KCl äquilibriert. Die aktiven Source S15 Fraktionen der 125 kDa tRNA Ligase werden aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine nach dem nativen Molekulargewicht erfolgt bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min, wobei Fraktionen á 2 ml gesammelt werden. Das Totvolumen der Säule beträgt 35 ml und die tRNA Ligaseaktivität eluiert bei 58 – 60 ml. Der Vergleich mit den Eichproteinen (β -Amylase, 210 kDa, $V_E=58$ ml; Alkoholdehydrogenase, 150 kDa, $V_E=60$ ml; Rinderserumalbumin, 68 kDa, $V_E=66$ ml) ermöglicht eine native Molekulargewichtsbestimmung der tRNA Ligaseaktivität auf ~150 kDa.

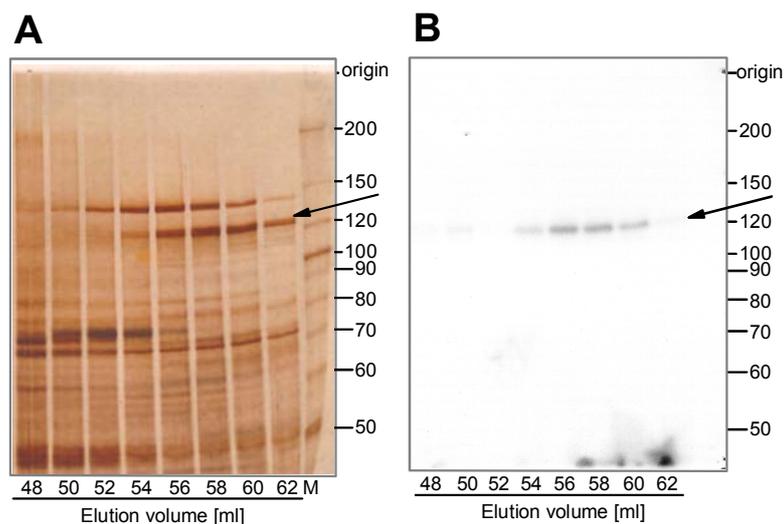


Abbildung 27. Gelfiltration an Superdex™ 200 PC und Adenylyltransferasenachweis der tRNA Ligase

10 μl der Elutionsfraktionen der Superdex™ 200 Fraktionen werden für den Adenylyltransferasenachweis verwendet und anschließend in einem 7.5 % Polyacrylamid / 0.1 % SDS Gel aufgetrennt. Die Proteine werden über eine Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) sichtbar gemacht (A). Über Autoradiographie werden die adenylbaren Proteine visualisiert (B).

Stufe 7. tRNA-Sepharose

Eine tRNA-Sepharose Säule, die nicht älter als 2 Monate ist, wird mit 5 Vol Puffer A mit 50 mM KCl äquiliert. Die aktiven Fraktionen der Superdex 200 Säule werden vereint, vierfach mit Puffer A verdünnt und mit einer Flussrate von 0.2 ml/min auf die 1 ml HiTrap Säule aufgetragen. Die Elution erfolgt in einem 10 ml linearen Gradienten von 50 – 400 mM KCl, wobei 20 Fraktionen gesammelt werden. Die tRNA Ligaseaktivität eluiert bei 180 – 240 mM KCl. Die aktiven Fraktionen 8 – 12 werden vereinigt, über Microcon 100 Konzentratoren auf 20 µl eingengt, mit 20 µl 2x SDS Ladepuffer supplementiert und optional bei – 80 °C gelagert.

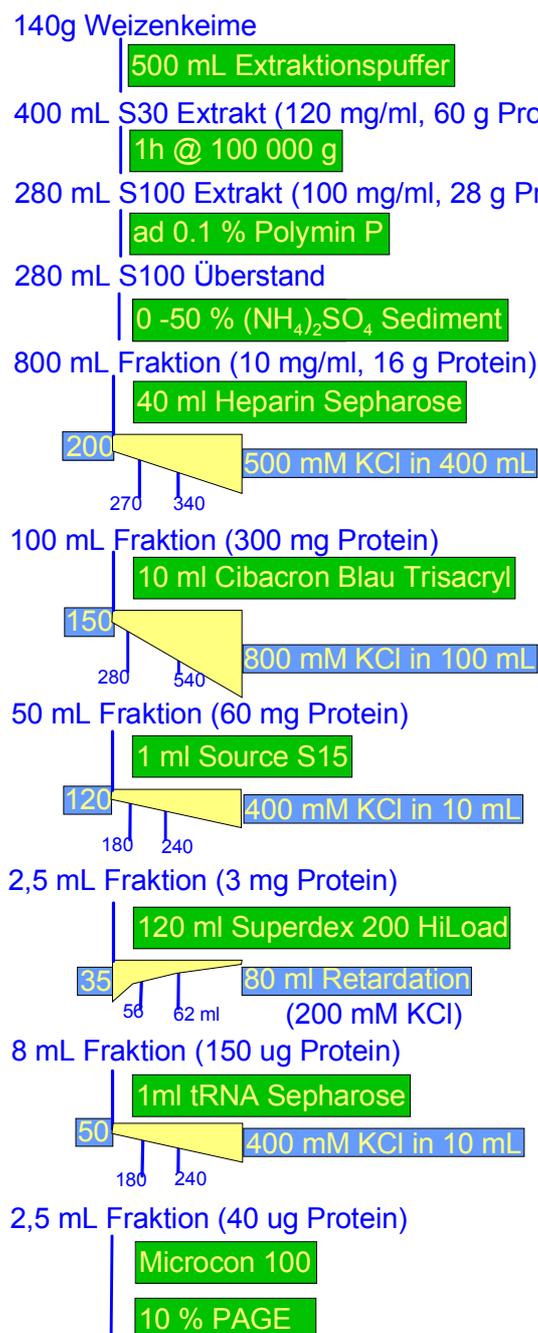


Abbildung 28. Aufreinigungsschema der 125 kDa tRNA Ligase aus Weizenkeimen
Ausgehend von 140 g entfetteten Weizenkeimen wird ein S100 Extrakt hergestellt, der über 7 chromatographische Stufen mit der tRNA Ligase angereichert wird.

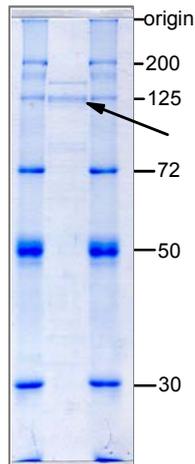


Abbildung 29. Analytisches 10 % Polyacrylamid / 0.1 % SDS Gel der konzentrierten tRNA-Sepharose Fraktionen.

Die aktiven Fraktionen der tRNA Sepharosesäule werden vereint und mit Microcon 100 auf 20 μ l konzentriert. Zur Mengenabschätzung werden 2 μ l mit 2 μ l 2x SDS Ladepuffer versehen, in einem 10 % Polyacrylamid / 0.1 % SDS Gel aufgetrennt und über Coomassie Färbung sichtbar gemacht. Ein Pfeil deutet auf das tRNA Ligase Protein, das über den Adenylyltransferase-nachweis identifiziert worden ist.

Für eine analytische Abschätzung der vorhandenen Proteinmenge werden 5 % des Microcon 100 Eluats in einem 7.5 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und die Proteine über Coomassie-Färbung visualisiert (Abbildung 29). Für die präparative Auftrennung wird ein 10 % Polyacrylamid / 0.1 % SDS Gel der Abmessung 13 x 20 x 0.1 cm verwendet. Die verbliebenen 95 % werden in 2 Taschen mit einer Breite von 8 mm aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine ist auf sehr strikte Sauberkeit zu achten, um eine Kontamination der Probe zu minimieren. Alle verwendeten Gefäße werden mit HPLC Wasser ausgespült. Die Proteinfärbe- und Entfärbelösungen werden frisch angesetzt. Nach 8 min in der Proteinfärbelösung wird das Proteingel für mehrere Stunden entfärbt. Das jeweilige Gelstück mit dem tRNA Ligaseprotein wird mit einer Rasierklinge ausgeschnitten, in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, zweimal mit 500 μ l Acetonitril/H₂O (1:1) für 5 min äquilibriert und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

4.3.3. Massenspektrometrische Proteinsequenzierung der 125 kDa tRNA Ligase

Die weitere Probenbehandlung wurde an der "Harvard Microchemistry Facility, Harvard University" unter Aufsicht von William S. Lane durchgeführt. Nach Alkylierung fand eine tryptische Hydrolyse der im Gelstück enthaltenen Proteine statt. Die gebildeten Peptide wurden aus dem Gelstück eluiert und mittels einer Kapilar-"Reverse Phasen"-Chromatographie aufgetrennt. Das Eluat wird direkt über Elektronenspray-Ionisation (ESI) in eine Quadrupol Ionenfalle überführt, in der das jeweilige Peptid über Sekundärfragmentation weiter analysiert wird. Dabei zerfällt das Peptid vornehmlich an der Peptidbindung, so dass über die jeweilige Massendifferenz der Peptidfragmente die Aminosäuresequenz bestimmt werden kann.

So konnte an der "Harvard Microchemistry Facility, Harvard University" von insgesamt 120 tryptischen Peptiden die Proteinsequenz bestimmt werden. Da Weizen eine hexaploide Pflanze mit einem sehr großen Genom ist, ist bisher keine Genomsequenzierung durchgeführt worden. Stattdessen werden Aussagen über aktive Gene mit der Sequenzierung von Voll-Längen cDNA Genbanken und von exprimierten Sequenzabschnitten (*engl.* "expressed sequence tag" EST) durchgeführt. Daher wurde die Sequest Analyse mit der EST-Datenbank der NCBI durchgeführt, in der alle EST-Sequenzen außer von Mensch und Maus aufgenommen sind ("*EST others*").

4.3.4. Identifizierung des pflanzlichen tRNA Ligase Gens

Die Sequest Analyse gibt eine Auflistung von tryptischen Fragmenten, für die eine Zuordnung zu einer in dem Datensatz vorhandenen Sequenz möglich ist. Für die tryptischen Fragmente kann die Ionenmenge in dem Massenspektrometer bestimmt werden. Über die Summe der Ionenmenge der zugehörigen tryptischen Fragmente kann für eine Sequenz der Anteil zur Gesamtionenmenge ermittelt werden. Somit ist eine Abschätzung möglich, ob eine Sequenz von dem Hauptprotein oder von einer Verunreinigung in dem ausgeschnittenen Gelstück stammt.

Summe der Ionenmenge
für zugeordnete EST Se-
quenzen in Relation zur
Gesamtionenmenge



Weizen EST Sequenz A:

MNRSDEKQQIK**KALLENVGS**SMCPDHRDWFYSGLEPQSRNADKSVVTHFLQAHPTDYATKKLQEMIGLMKRKNFS
ASFKSYWNYQK**VDSLSNDNL**CYKMVIHVYSDSVFRRY**QQEMRKNQELW**PLYRGFFVDVNLFKANNKAAELSKDS
NTLLRNINGALDSKLSKDGLPD

Weizen EST Sequenz B:

MCGMTKAAAVPVI**PDSE**GTDSNPFSLAALAVFMFRVLQR**VNH**PGNLDKASPNAGYILLMFYNYLDGKCRREFESE
LYERFGSLVK**MPL**LKPERAP**LP**GDVKTILDE**GMS**LFR**LH**QSRHGRVEPSK**GSYAQ**EWAQ**WEK**RLRVVLSRNANYL
TSIQVPPFDVAGERS

Weizen EST Sequenz C:

EVLEQLKAVAKVMSKLLILQSEGLGYHFAAVTVPQADILSLLR**KL**GENGDVNNFLNGIKVEDNLSKAHVTL**LAHK**
RAHGVAAVASYGQYQ**NQ**EVVPSFNAFLYT**DK**MA**LEA**Q**LGT**VNGEKIDSKNDWPHVTL**LWTAP**GVAPKEAN**MLP**QL
FSAGQAKRVLIDPPITISGVLDY

Zuckerrübe EST Sequenz D:

MFGNVYTAVGVFVLGRLFHEAWGKEAPK**MQA**E**FND**FLEK**NR**VSISMELVTAVLGDHGQRPKDDYAVVTAVTELGN
GKPKFYSTPEVIAFCRKR**WRL**PT**NH**VWLF**STR**KSATSFFAAYDALCEE**GTAT**PVCKALDEIADTAVPGSKDHVKVQ
GEILEGLVARIVPSQSSTQMEEV**LK**TFFQA

Weizen EST Sequenz E:

MRVRAEDSNLMVKLFLTYKIR**TFLIR**N**GL**ST**LF**KDG**PS**AYKTYYL**RQ**MKIWGTSASKQELTK**ML**DEWAVY**IR**
RKYQNKQLPSSTYLTEAEPFLEQYAKR**SPAN**QALIGAAGDLVQ**TEN**FLA**ILDA**QRDEEGDLQ**PER**GTAPSS**PTST**
SLDVVSKTEGL**IV**FF**PG**IPG**CAK**SALCEQILNTPGG**LD**NRPLHSLMGDR**TK**GRYWQKVADER**KKK**PF**RIT**L**ADK**
NAPNEEV**WR**QIEDMCGMTKGWCCPVI**PD**SE

Reis EST Sequenz G:

MR**AT**F**YP**K**FENE**KSD**Q**ET**R**TRMIEMVSHGLATLEVT**LK**HSGSLFMYAGHHGGAYAKNSFGNIYTAVGVFVLGRLF
REAWGKEAPRMQEEFN**V**FLEKKCISISMELVTAVLGDHGQRPKDDYAVITAVTELGHGKPKFYSTPEVIEFCR**KW**
RLPTNHVWLFSTRKSASSFFAAYDALCEE**GTAT**SVCKALDEIADVAVPGSKDHVKVQGEILEGLVARIVS**RESSV**
QIEEVL**RNY**PLPPLDG**V**SGDLG**PS**LREICAANRSDEKQQIKALLENV**G**PSMCPDHSDFGCSGLDD

Reis EST Sequenz J:

MRQQIKALLENV**G**PSMCPDHSDFGCSGLDDHQSPSANRSVVTKFLQAHPTDYTT**KK**LQEMIRVMKQRNFPAAFK
CYWNYHKIDSLSDSLYK**M**VIHVLSDSVFRRY**QQ**EMRR**NQ**LWPLYRGFFVDVNLFKVNNMKSSIPSEIDITSL
K**NING**ALDSNSSAK**DGL**A**DE**DS**NLM**VK**LK**FLTYKLRT**FLIR**NG**LS**T

Abbildung 30. Auflistung der 7 EST Sequenzen, die eine hohe Homologie zu dem annotierten Arabidopsis Protein At1g07910 aufweisen. Die massenspektrometrisch identifizierten tryptischen Peptide innerhalb der EST Sequenzen sind hervorgehoben. Von den 120 analysierten tryptischen Fragmenten identifizieren 91 die sieben zugehörigen ESTs und tragen zu mehr als 80 % der Gesamtionenmenge bei.

At1g07910 EST_G
 90 100 110 120 130 140 150 160
 SSGDTKVLNLSKIFGGNLEKFSVDKSTYCHAQIRATFYPKFENEKTDQETIRTRMIEMVSKGLATLEVSLKHSGLFMY
 -----MRATFYPKFENEKSDQETIRTRMIEMVSKGLATLEVSLKHSGLFMY

At1g07910 EST_G
 170 180 190 200 210 220 230 240
 AGHKGGAYAKNSFGNM-----EAWGTKAPKKEAEFNDFLEKNRMCI SMELVTAVLGDHGQRPIDDDYDNSVK
 AGHKGGAYAKNSFGNIYTA VGVFVLGRLFEAWGKEAPRMOEEFNWFLEKKCISISMELVTAVLGDHGQRPIDDDYAVITA

At1g07910 EST_G
 250 260 270 280 290 300 310 320
 AVQTL-KGNVDLHLAVVVTAVT---ETLNGG----KPKSVTSFFAAFDALCEEGLATSVCRALDEVADISVPASKDHVKV
 VTEHLGHGKPKFYSTPEVIEFCRWRLPTNHVWLFSTRKSSATFFAAFDALCEEGLATSVCRALDEIADVAVFGSKDHVKV

At1g07910 EST_G
 330 340 350 360 370 380 390 400
 QGEILEGLVARIVSSQSSRDMENVLRDHPFPFPCDGANLDLGLSLREICAAHRSNEKQOMRALLRSVGPSPFCPSDVEWFGD
 QGEILEGLVARIVSRSSVQIEEVLRLNYPLPEPLDGVGSDLGP SLREICAAHRSDEKQIQIKALLENVGSPMCPDHSDFWFG-

At1g07910 EST_D
 170 180 190 200 210 220 230 240
 AGHKGGAYAKNSFGNM-----EAWGTKAPKKEAEFNDFLEKNRMCI SMELVTAVLGDHGQRPIDDDYDNSVKAVQTL-KGNVD-L
 -GNVYTA VGVFVLGRLFEAWGKEAPKMOAEFNDFLEKNRVSISMELVTAVLGDHGQRPIDDDYAVVTA VTEHLNGKPKFY

At1g07910 EST_D
 250 260 270 280 290 300 310 320
 HLA-VVVTAVT---VTEHLNGKPKSVTSFFAAFDALCEEGLATSVCRALDEVADISVPASKDHVKVQGEILEGLVARI
 STPEVIAFCRWRLPTNHVWLFSTRKSSATFFAAFDALCEEGLATFVCKALDEIADVAVFGSKDHVKVQGEILEGLVARI

At1g07910 EST_D
 330 340 350 360 370 380 390 400
 VSSQSSRDMENVLRDHPFPFPCDGANLDLGLSLREICAAHRSNEKQOMRALLRSVGPSPFCPSDVEWFGDESHPKSADKSVI
 VPSQSSTQMEVLRKTFPQA-----

At1g07910 EST_A
 330 340 350 360 370 380 390 400
 VLRDHPFPFPCDGANLDLGLSLREICAAHRSNEKQOMRALLRSVGPSPFCPSDVEWFG--D--ESHPKSADKSVITKFLQSQP
 -----MNRSDKQIQIKALLENVGSSMCPDHRDWFYSGLEPQSRNADKSVVTHFLQAHF

At1g07910 EST_A
 410 420 430 440 450 460 470 480
 ADYSTSKLQEMVRLMKEKRLPAAFKCYHNEHRAEDISPNDLFYKLVVHVHSDSGFRRYHKEMRHMPSLWPLYRGFFVDIN
 TDYATTKKLQEMIRVMKQRNFPAAFKCYWNYHKIDSLNSDLYYKMWIHWLSDSVFRRYQOEMRKNQELWPLYRGFFVDVN

At1g07910 EST_A
 490 500 510 520 530 540 550 560
 LFK-SN---K-GRDL-MALKSIDNA-SENDRGGEKDGLADDDANLMIKMKFLTYKLRFTFLIRNGLSILFKDGAAAYKTTY
 LFKANNKKAELSISNTLLRNINGALDSK-LSSKDGLPD-----

At1g07910 EST_J
 330 340 350 360 370 380 390 400
 VLRDHPFPFPCDGANLDLGLSLREICAAHRSNEKQOMRALLRSVGPSPFCPSDVEWFG--G--DESHPKSADKSVITKFLQSQ
 -----MRQIQIKALLENVGSPMCPDHSDFGCSGLDDHQSPSANRSVVTKFLQAH

At1g07910 EST_J
 410 420 430 440 450 460 470 480
 PADYSTSKLQEMVRLMKEKRLPAAFKCYHNEHRAEDISPNDLFYKLVVHVHSDSGFRRYHKEMRHMPSLWPLYRGFFVDI
 PTDYATTKKLQEMIRVMKQRNFPAAFKCYWNYHKIDSLNSDLYYKMWIHWLSDSVFRRYQOEMRKNQELWPLYRGFFVDV

At1g07910 EST_J
 490 500 510 520 530 540 550 560
 NLFKSNKGRDLMAKSIDNA-SE-N---DGRGGEKDGLADDDANLMIKMKFLTYKLRFTFLIRNGLSILFKDGAAAYKTTY
 NLFKVNMMKSSIPSEDIDTSLKNIINGALDSNSSAKDGLADEDSNLMVKLKFETYKLRFTFLIRNGLST-----

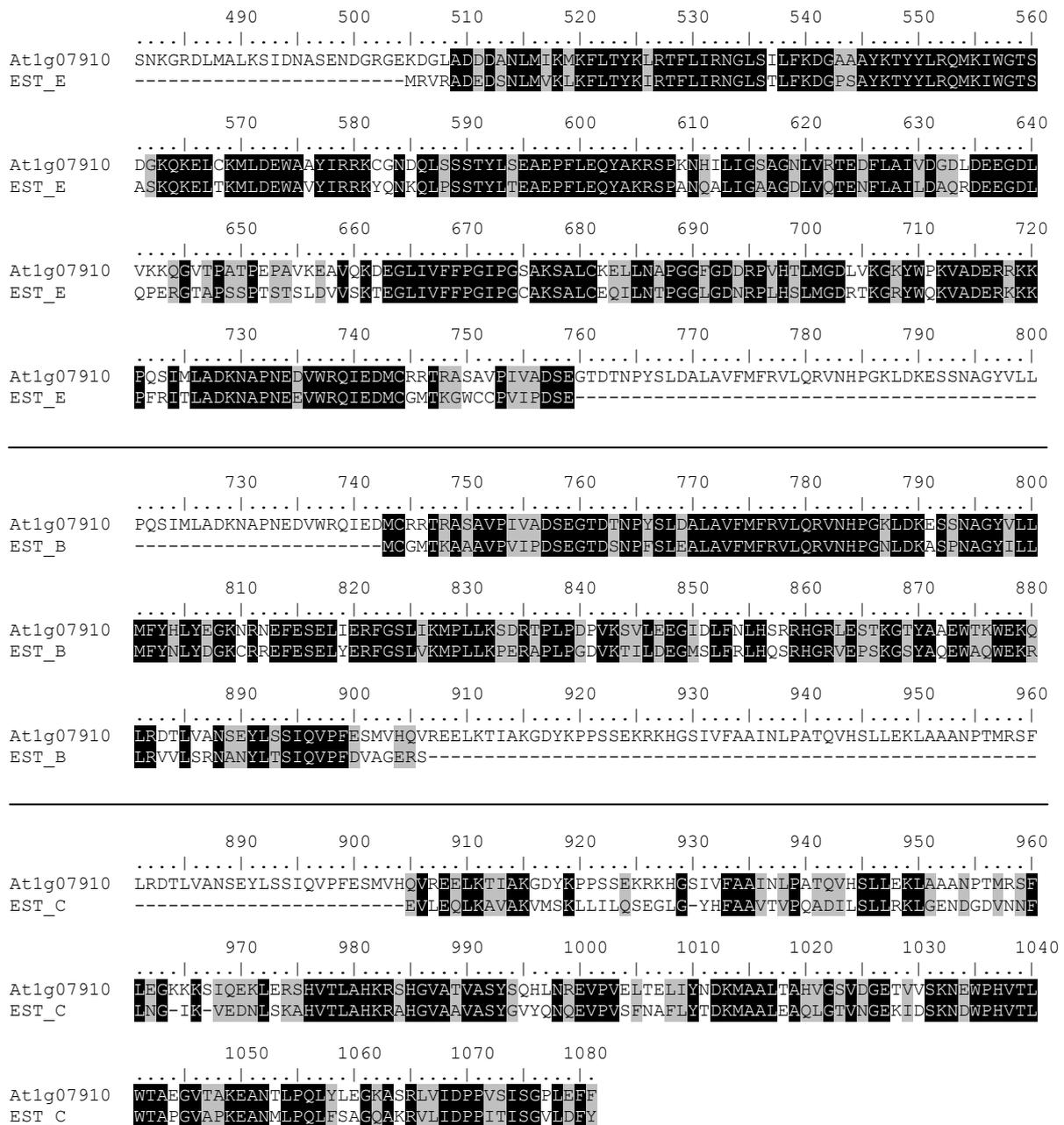


Abbildung 31. Alignment der massenspektrometrisch identifizierten ESTs mit dem *Arabidopsis* Protein At1g07910

Das Alignment wurde anhand der Bioedit Software unter Verwendung von Clustal W durchgeführt (Thompson *et al.*, 1994). Identische Aminosäuren sind schwarz und ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt. Die sieben über Proteinsequenzierung identifizierten ESTs decken das *Arabidopsis* Protein von der Aminosäure 116 bis zum carboxyterminalen Ende ab.

Das Protein At1g07910 wird in den Datenbanken (Acc.No. AC026875) als Translationelongationsfaktor EF-1 α aufgeführt (Axelos *et al.*, 1989). Eine Blast Suche mit der Proteinsequenz von At1g0790 als Anfrage liefert jedoch keine Signifikanz mit identifizierten Translationelongationsfaktoren.

4.3.5. Rekombinante Expression der *Arabidopsis* tRNA Ligase

Eine Verifizierung des vermeintlichen Gens At1g07910 als tRNA Ligase kann nur über den Nachweis der RNA Ligaseaktivität des exprimierten, aufgereinigten rekombinanten At1g07910 Proteins erfolgen. Da das *Arabidopsis* Gen über mindestens 26 Introns verfügt, kann eine Klonierung nur über die Stufe der mRNA erfolgen.

4.3.5.1. PCR-Amplifikation und Klonierung der codierenden Sequenz aus einer cDNA Genbank

Es wird eine von Dr. Ecker erstellte cDNA Genbank verwendet, die in der Länge auf 3 – 6 kb selektioniert, in die *EcoRI* Schnittstelle von λ ZapII ligiert und in den Gigapack II Gold Extrakt gepackt wurde (Gubler und Hoffman, 1983; Kieber *et al.*, 1993). Diese cDNA Genbank (CD16) ist bei dem "Arabidopsis Biological Resource Center" (ABRC, Ohio State University) zum Unkostenbetrag erhältlich und wird mit *E. coli* XL1 Blue *Mrf* als Wirt über Plattenlysate amplifiziert. Die Gewinnung der λ DNA erfolgt nach dem λ DNA Aufreinigungsprotokoll der Firma Qiagen mit tip20 Säulen. Aus 10 ml Phagensuspension lassen sich 10 μ g λ DNA gewinnen.

Ausgehend von 100 ng λ DNA wird mit den "Pico Maxx High Fidelity" System und den beiden Startsequenzen EF_{am} und EF_{carb} ein 3.2 kb DNA Fragment mittels PCR amplifiziert, das aus einem präparativem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt wird. Für eine Klonierung wird das aufgereinigte PCR Fragment mit dem "Pico Maxx High Fidelity" System und den beiden Startsequenzen EF_{am_Not} und EF_{car_Sal} amplifiziert. Nach Restriktionshydrolyse sowohl des PCR Produkts als auch der pIVEX WG 1.4 Plasmid DNA mit den Restriktionendonukleasen *NotI* und *SalI* werden die Produkte über ein präparatives 0.8 % Agarosegel aufgereinigt und anschließend bei 14 °C üN ligiert. Nach Transformation durch Elektroporation werden von 8 Kolonien auf einer LB-Agar-Platte mit 100 μ g/ml Ampicillin eine Plasmid Mini Präparation durchgeführt.

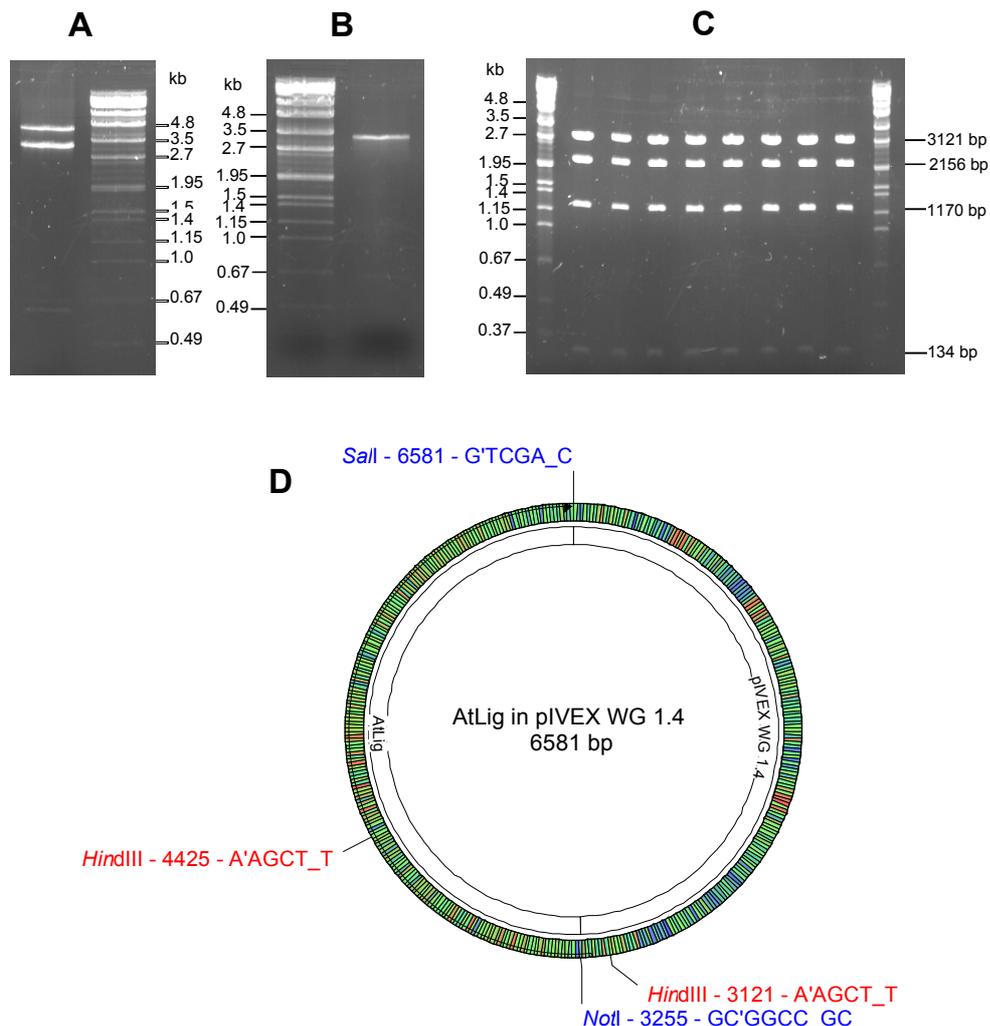


Abbildung 32. Amplifizierung und Klonierung von At1g07910

- (A) Amplifizierung von At1g07910 mit dem Pico Maxx High Fidelity System und den Startsequenzen EF_{am} und EF_{car}.
- (B) Reamplifizierung des 3.2 kb PCR Produkts mit dem Pico Maxx High Fidelity System und den Startsequenzen EF_{am}_Not und EF_{car}_Sal.
- (C) Analytische Restriktionshydrolyse von Plasmid Minipreparationen mit den Restriktionsendonukleasen NotI/HindIII/SalI.
- (D) Schematischer Plot der *Arabidopsis* tRNA Ligase im Vektor pIVEX WG 1.4. Das offene Leseraster (ORF) mit dem aminoterminalen Histidin-"Tag" ist als Pfeil wiedergegeben. Zudem sind die für die analytische Restriktionshydrolyse verwendeten Enzyme mit Position und Erkennungssequenz aufgezeigt.

4.3.5.2. Sequenzierung des klonierten At1g07910 Gens

Bisher ist für das At1g07910 Gen lediglich eine partielle cDNA-Sequenz bekannt, die für den carboxyterminalen Bereich ab der Aminosäure 289 codiert. Das Atg07910 Gen ist in der MIPS Datenbank (<http://mips.gsf.de>) mit 26 Exons annotiert, auf deren Basis die Startsequenzen für eine DNA Sequenzierung konzipiert wurden. Dabei stellte sich heraus, dass das 4. und 6. Exon von der MIPS Annotation abweichende Exongrenzen aufweisen. Zudem wurden zwei Punktmutationen aufgefunden, wobei eine Mutation die Aminosäure des Codons nicht ändert (stille Mutation) und daher unverändert belassen wurde. Die zweite Mutation hätte den Austausch einer konservierten Aminosäure zu Folge und wurde daher mittels der QuikChange Prozedur (Stratagene) entfernt.

1	ttcgctttct	ctatcaacat	tcatctttct	gctacttctc	gaacctctc	tcttctccga	
61	tcatctttct	cttactttac	cttagctcgc	tctctctggt	ttaactcctc	tatcagattt	
121	ttatcctcag	atatgccaaa	gaagcaggtt	tggaaactttc	atcgagtttt	ccttaatctg	
181	ggttaatata	gcgattgcca	aatttatcga	attttaaactc	ctctgttata	tgactctctc	
241	gaagatctgc	actttctggg	ttttgattgc	tttggttcaca	atgtgttagt	ttgtggtgca	
301	gtgttatgac	tttggacttt	tgattatctg	gaaacgaatt	tgaattttgc	atcttaaaaa	
361	attgaaactt	tatactttga	agtcttgggt	tgtgagagtt	tcttgttgc	tttgggtgta	
421	tacaggactt	gactattttt	tgtttttgtt	ggcagaaaa	gagagatcac	gctgagcaga	
481	agtggcaagt	aaaaccgaag	ATGGATGCTC	CATTGGAATC	CGGTGATAGT	TCGGCAACAG	
541	TTGTTGCAGA	AGCAGTAAAC	AACCAATTTG	GCGGGTTAAG	TCTTAAGGAA	AGCAACACTA	
601	ATGCGCCAGT	CTTACCGAGT	CAAACTACAA	GTAACCACCG	TGTTCAAAT	CTAGTATGGA	1. Exon
661	AACCTAAGT	ATATGGAACA	GTTAGTGGAT	CATCTCCGC	AACAGAAGT	GGTAAAAAT	
721	CGGCTGTCTC	ACAGATAGGT	TCTCTGGAG	ATACAAAAGT	TGGTCTCAAT	CTGAGCAAAA	
781	TTTTCGGAGG	TAATTTGTTG	GAAAAATTTT	CGGTGGACAA	ATCGACTTAT	TGTCATGCTC	
841	AGATCAGAGC	CACTTCTAT	CCAAAATTTG	AGAACGAAAA	GACTGACCAA	GAGgtatact	
901	ctatggtgct	ctttctgtga	ttacttgtca	tttgtagccc	ttattgctag	tttgccttat	
961	ttcatggttg	actatcttga	ttttggcagA	TAAGAACAAG	AATGATTGAG	ATGGTATCTA	2. Exon
1021	AAGGATTGGC	AACACTGGAG	gtatcactaa	caaatataca	ctctatatgt	gtatcctttt	
1081	tattgacact	agttttaatc	gtctactgac	ctgttcta	gcacctttta	cagGTATCTC	
1141	TTAAGCATT	AGGCTCTCTC	TTTATGTACG	CCGGTCACAA	GGGGGAGCA	TATGCCAAGA	3. Exon
1201	ACAGTTTTGG	TAATATgtaa	gctcatttat	tcttagcttc	agttacaatt	ttctttatta	
1261	ttgatgagct	cttcacaaaag	aatcttttagc	caaaaaccca	atgaataaac	ccaaactcga	
1321	gcttttagatt	tggtttaccc	tttccattca	ttttaactta	gaacatagat	tatttctaca	
1381	ttttagtttc	atagttagtt	atgcccaagg	agttttgttg	cttgctgatg	atctttagatg	
1441	tacgtttatg	gataagattc	caaccata	aacagttgta	gcacagata	atctcaaaaa	
1501	acattttgat	gaagcaaatg	cattttacta	ttcttttca	tttctgatgt	tatgtaaatc	
1561	tttctggtga	ttgcaaaactg	agctgccgac	caatcggttt	tctcgtatgc	taaccaata	
1621	tttctattac	ag TTATACTG	CGGTTGGTGT	TTTTGTCTT	TCACGGATGT	TCAGGGAGGC	4. Exon
1681	TTGGGGAAGT	AAGGCTCCAA	AGAAAGAAGC	AGAGTTCAAT	GATTTTCTTG	AGgtatttcc	
1741	atggacagaa	ctttaagcaa	cccaaatct	cagttgctcg	aggcgtaac	aattgacaga	
1801	aaaagctagc	tcataatata	agtcattttc	tctcagAAAA	ATCGCATGTG	CATATCTATG	5. Exon
1861	GAAC TGTTAA	CCGCTGTTCT	TGGAGATCAT	GGTCAACGCC	CACTGGATGA	TTATGgtgag	
1921	tctttttttg	tttttaggat	gttcctta	tgtgaaagt	agataactct	gttaaagctg	
1981	ttcagctaaa	aggaaatggt	gatttgcac	ttgcagTGGT	AGTGAAGTCT	GTTACCGAGT	
2041	TAGGTAATGG	GAAGCCCCAG	TTCTATTCAA	CTCCGAAAT	AATTTCAATT	TGCCGGAAT	6. Exon
2101	GGCGTCTACC	CACAAATCAT	GTTTGGCTGT	TTCCACAAG	gtaacttaac	cgctttctat	
2161	tcaattgctt	tatcatcttt	ggtgttcttt	tgcttctatc	atttttggtg	ttcttcccc	
2221	tacttctcta	gctgaggttt	tgatattctt	ggacacatta	tcttaactat	agtaagaatg	
2281	tgctgataga	acctgggttga	tgcaatttact	ggtccaaatc	catagagtct	caaccttag	
2341	aggttttttg	tcctactagg	aggaaatata	tgcttatatg	tttggatgca	cacattgtcc	
2401	atagaagtgt	ttattagaca	gctgtcgtg	aggaaaatga	aagttttaac	aaaggtggtt	
2461	gcgtgtat	tgtaaaaaac	aattatgaag	GAAATCAGTG	ACCTCTTTT	TCGCGGCGTT	
2521	TGATGCAC TG	TGTGAAGAAG	GGATAGCAAC	CTCGTCTGT	AGAGCTCTTG	ATGAAGTAGC	7. Exon
2581	TGATATATCA	GTCCAGgta	aagtctttct	tatttttgt	ttcacttttg	ctttttggag	
2641	gattcatatt	agttattcat	agaactgaac	ttgattaaat	tcattcgcag	aattatttct	
2701	tggaagcaaaa	taagcagCCT	CAAAGGACCA	TGTTAAGGTG	CAGGGTGAGA	TATTAGAGGG	
2761	TCTTGTGCT	CGTATCGTGA	GCAGTCAGAG	CTCAAGAGAT	ATGAAAAATG	TCTTGAGAGA	8. Exon
2821	TCATCTCCCA	CCACCCTGTG	ATGGAGgtgc	actatttatc	atattttaat	tttacttaag	
2881	ttttcatgat	aatccactct	atcaagtcg	tgtagaataa	aaaatgtttt	ccctggattt	
2941	taaaatttca	gCTAATCTTG	ATCTGGGACT	CAGTCTAAGA	GAGATATGTG	CTGCCCATAG	9. Exon
3001	ATCTAACGAG	AAACAGgttc	taaaagaat	ttaaatatga	caagctttat	aaagtggat	
3061	ttttatgctg	ccatctcttg	ataaagattt	ctcattctag	agggtccttt	tcccttgttt	

Abbildung 33. Genomischer Sequenzabschnitt für das At1g07910 Gen

Nach der MIPS Annotation beginnt das At1g07910 Gen mit dem ATG an der Position 501. Die Exons sind in Großbuchstaben, die Introns als Kleinbuchstaben wiedergeben. In Rot hervorgehobene Sequenzabschnitte unterscheiden sich von der MIPS Annotation an den Exongrenzen.

Die Vorhersage der korrekten Exongrenzen über bioinformatische Methoden ist nur teilweise möglich und orientiert sich an vorhandenen Sequenzdaten von cDNAs und ESTs. Daher wurde mit der Aminosäuresequenz von At1g07910 eine Blast-Suche gegen die NCBI Nukleotiddatenbank durchgeführt (tblastn). Ein cDNA Klon aus *Oryza sativa* (Acc. No. AK103768) codiert für ein offenes Leseraster (ORF) mit einer sehr hohen Homologie zu dem *Arabidopsis* Protein von At1g07910. Das *Oryza* Gen befindet sich mit einer Größe von 12860 Basen auf Chromosom 7 und besteht aus 27 Exons (Abbildung 34).

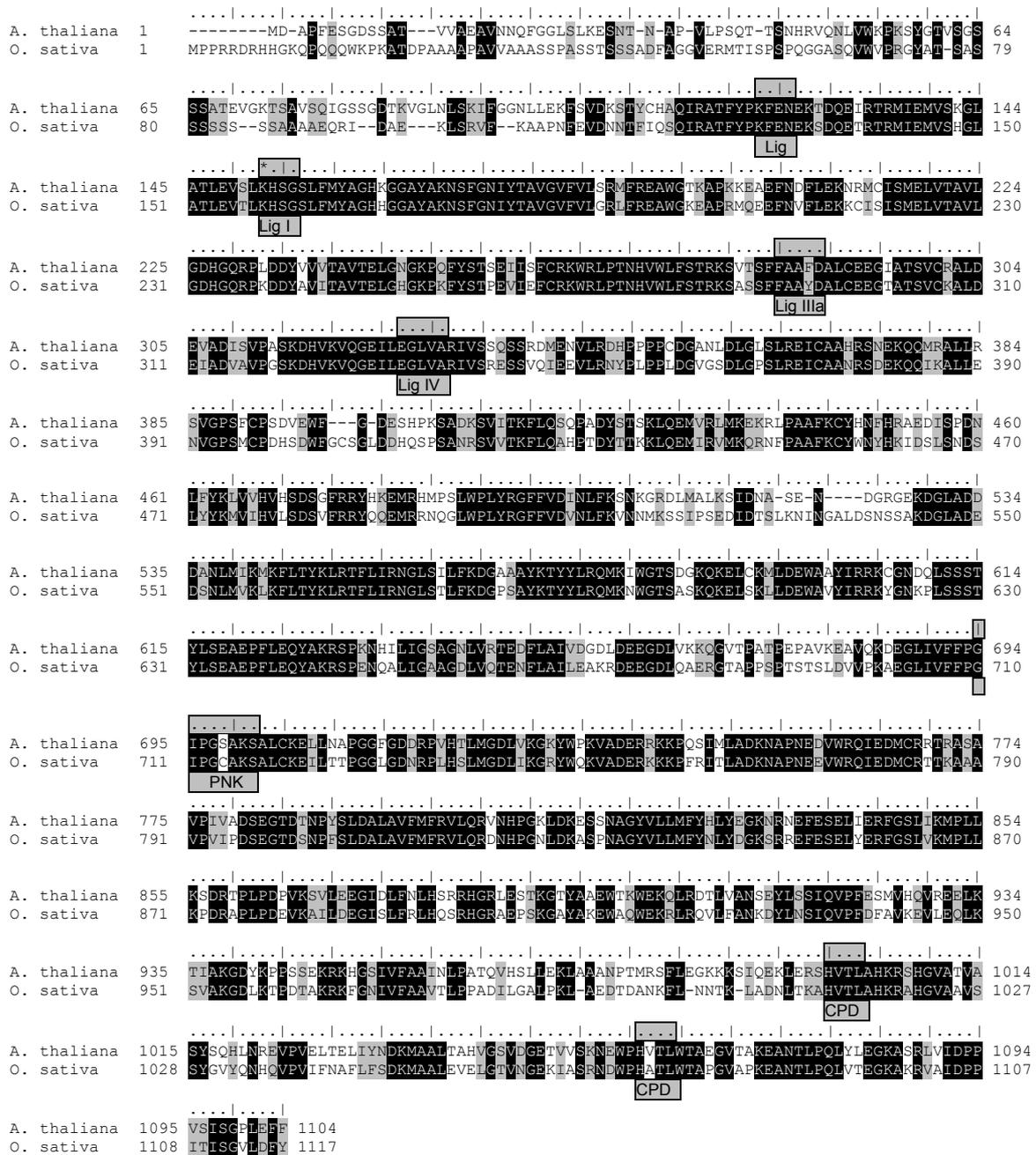


Abbildung 34. Alignment der vermeintlichen Arabidopsis und Oryza tRNA Ligase

Die kürzeste Aminosäuresequenz der Arabidopsis und der Oryza tRNA Ligase wurden mit dem Blossum 62 Algorithmus „aligned“. Identische Aminosäuren sind in schwarz, ähnliche Aminosäuren in grau hinterlegt. Die Sequenzmotive Lig, Lig I, Lig IIIa, LigIV sind charakteristisch für RNA Ligasen des RNL1 Typs und der Hefe tRNA Ligase. Ein Stern innerhalb von Lig I kennzeichnet das Lysin, an das kovalent AMP gebunden wird. Das aktive Zentrum – die P Schleife – für die Polynukleotidkinase (PNK), sowie die 2H Signaturelemente charakteristisch für cyclische Phosphodiesterasen (CPD) sind grau hervorgehoben.

Das Alignment der vermeintlichen Arabidopsis und Oryza tRNA Ligasen bestätigt die Richtigkeit der experimentell über die DNA Sequenzierung gefundenen Exongrenzen des Arabidopsis cDNA Klon.

Für die Klonierung der Arabidopsis tRNA Ligase in den Vektor pIVEX WG 1.3 mit einem carboxyterminalen Histidin-"Tag" wird die AtLig codierende Sequenz mit Startsequenzen, die am amino-terminalen Ende eine NotI Schnittstelle und am carboxyterminalen Ende anstelle des Stopp

Codons eine *XhoI* Schnittstelle einfügen, PCR-amplifiziert. Sowohl das PCR Produkt, wie auch die pIVEX WG 1.3 Plasmid DNA werden mit den Restriktionsendonukleasen *NotI* und *XhoI* hydrolysiert und präparativ über ein Agarosegel aufgereinigt. Die zurückgewonnene DNA des PCR Produkts und des pIVEX WG 1.3 Vektors werden für den Ligationsansatz verwendet. Die erfolgreiche Klonierung von AtLig in pIVEX WG 1.3 wurde durch DNA Sequenzierung bestätigt.

Die Expression der vermeintlichen tRNA Ligase erfolgt mit dem RTS 100 WG CECF Kit (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben. Unter Verwendung von AtLig in pIVEX WG 1.3 wird ein Protein exprimiert, das am carboxyterminalen Ende eine Abfolge von 6 Histidinen aufweist und so eine konsekutive Aufreinigung an Ni-NTA Agarose ermöglicht (Abbildung 35).

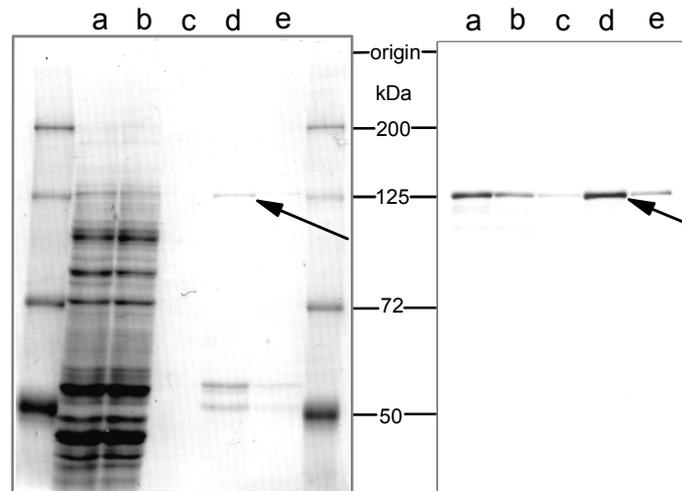


Abbildung 35. Überexpression der *Arabidopsis* tRNA Ligase im RTS 100 WG CECF System und Aufreinigung an Ni-NTA Agarose

Ein 50 μ l Reaktionsansatz wird in Anwesenheit von [35 S]-Methionin bei 24 °C für 24 h inkubiert. 2 μ l Aliquote der Gesamtreaktionsmischung (a), der Reaktionsmischung nach dem Binden an Ni-NTA (b), 20 μ l der letzten Waschfraktion (c) und je 1/5 der Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol werden in einem 7.5 % Polyacrylamid / 0.1 % SDS Gel aufgetrennt und über Färbung mit Coomassie Blau visualisiert (linke Spalte). Anschließend wird das Gel für die Fluorographie nach Laskey und Mills (1975) vorbereitet (rechte Spalte). Pfeile deuten auf das *Arabidopsis* tRNA Ligaseprotein.

4.3.6. Analyse der RNA Ligationsreaktion und der Ligationsprodukte

Der endgültige Nachweis, das funktionelle Gen der pflanzlichen tRNA Ligase über die Proteinsequenzierung der Weizen tRNA Ligase identifiziert zu haben, kann nur mit dem rekombinant exprimierten Protein erfolgen. Hierfür wird die Archeuka pre-tRNA mit der *M. jannaschii* Spleißendonuklease zu tRNA Hälften und dem linearen Intron hydrolysiert, die in aufgereinigter Form für den RNA Ligasenachweis verwendet werden. Untersucht wird die Aktivität für das native Weizenenzym (aktive Gelfiltrationsfraktion), das rekombinante *Arabidopsis* Protein At1g07910, die rekombinante Hefe tRNA Ligase und die Kombination aus T4 Polynukleotidkinase/3'-Phosphatase und T4 RNA Ligase (Abbildung 36).

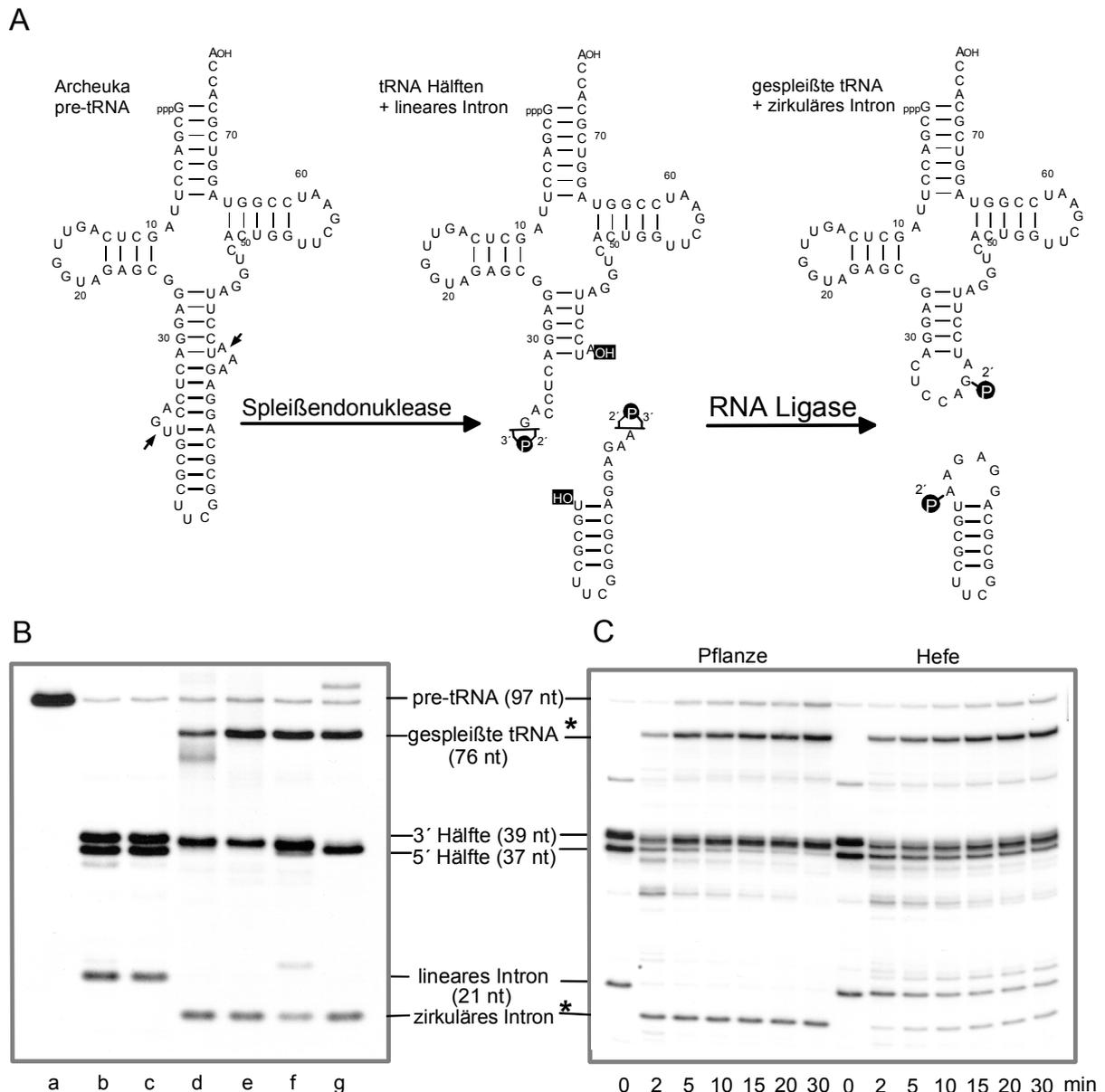


Abbildung 36. tRNA Ligaseaktivitätsnachweis für native und rekombinante Enzyme

(A) Die Sekundärstruktur der Archeuka pre-tRNA mit den Spleißstellen für die Archaea Spleißendonuklease, die entstehenden tRNA Hälften und das lineare Intron jeweils mit dem 2',3'-Cyclophosphat und mit der 5'-Hydroxylgruppe, die verknüpfte, gespleißte tRNA und das zirkularisierte Intron sind aufgezeigt.

(B) Die Archeuka pre-tRNA (a) wurde mit der T7 RNA Polymerase unter Einbau von α - ^{32}P UTP synthetisiert und für die Hydrolyse mit der *M. jannaschii* Spleißendonuklease verwendet (b). Diese aufgereinigten RNA Produkte wurden für die Ansätze c – g als Edukte benutzt. In der Spur c wurde mit der Proteinfraktion inkubiert, die durch Inkubation mit der Plasmid DNA pIVEX WG 1.3 (ohne cDNA Insert) und der sukzessiven Aufreinigung über Ni-NTA Agarose gebildet wurde. In der Spur d wird mit dem nativen Weizenprotein (Gelfiltrationsfraktion), in der Spur e mit 100 ng *Arabidopsis* tRNA Ligase, in der Spur f mit 100 ng Hefe tRNA Ligase und in der Spur g mit 10 E Polynukleotidkinase/3'-Phosphatase in Kombination mit 10 E T4 RNA Ligase für 30 min bei 37 °C inkubiert.

(C) 400 fmol Archeuka pre-tRNA wurde mit der *M. jannaschii* Spleißendonuklease hydrolysiert, und in aufgereinigter Form für die Inkubation mit 100 ng *Arabidopsis* tRNA Ligase und mit 100 ng Hefe tRNA Ligase in 100 μl Spleißpuffer bei 37 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitwerten werden 10 μl Aliqote entnommen und in einem 13 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Das rekombinant überexprimierte Protein von At1g07910 ligiert sowohl die Archeuka tRNA Hälften und zirkularisiert das lineare Intron. Somit kann At1g07910 als das Gen für die *Arabidopsis* tRNA Ligase annotiert werden. Anhand des Zeitwert-Experiments mit der *Arabidopsis* und der Hefe tRNA Ligase kann die breite Substratspezifität der *Arabidopsis* tRNA Ligase aufgezeigt werden, da das lineare Intron bereits nach 5 min vollständig zirkularisiert worden ist (Abbildung 36C). Wie bereits in der Literatur beschrieben werden bei der Hefe tRNA Ligase bevorzugt tRNA Hälften ligiert (Phizicky *et al.*, 1986).

Ein charakteristisches Merkmal der pflanzlichen und der Hefe tRNA Ligase ist die Ausbildung einer 2'-Phosphat-3'-5'-Phosphodiesterbindung an der Spleißstelle, die sich sodann resistent gegenüber der alkalischen Spaltung und der Hydrolyse einer Vielzahl von Nukleasen verhält (Konarska *et al.*, 1982). Die gespleißte tRNA und das zirkularisierte Intron wurden daher aus präparativen Gelen durch Diffusionselution zurückgewonnen und über RNase T1, RNase T2 und RNase P1 Hydrolyse weiter charakterisiert. Die gespleißte tRNA wird mit RNase T1 nach jedem Guanosin zu einem Guanosin-3'-phosphat hydrolysiert. Für die durch *Arabidopsis* und Hefe tRNA Ligase ligierte RNA wird daher in einem 20 % denaturierenden Polyacrylamidgel die Anwesenheit eines RNase T1 resistenten 15mer Oligonukleotid $ACUCCAG \begin{matrix} \nearrow P^+ \\ \searrow P \end{matrix} AUCCUUAGP$ erwartet (Abbildung 37A). Für die T4 Polynukleotidkinase / T4 RNA Ligase verknüpfte RNA wird ein 7mer und ein 8mer erwartet (Abbildung 37A). Das 15mer und das 8mer Oligonukleotid wurde über Diffusionselution zurückgewonnen und für eine Hydrolyse mit RNase T2 (hydrolysiert RNA zu Mononukleosid-3'-phosphaten) und RNase P1 (hydrolysiert RNA zu Mononukleosid-5'-phosphaten) verwendet. Die Nukleotidmischung wird anschließend über Dünnschichtchromatographie in Celluloseplatten mit dem Laufmittel A (Isobuttersäure/ 25 % Ammoniak/ H₂O = 57.7:3.8:38.5) für die RNase T1 hydrolysierten Nukleotid-3'-phosphate und mit dem Laufmittel B (Isopropanol/ 32 % Salzsäure / H₂O = 70:17.5:12.5) für die RNase P1 hydrolysierten Nukleotid-5'-phosphate aufgetrennt. Das zirkularisierte Intron wird direkt für eine RNase T2 Hydrolyse verwendet (Abbildung 37 B-D).

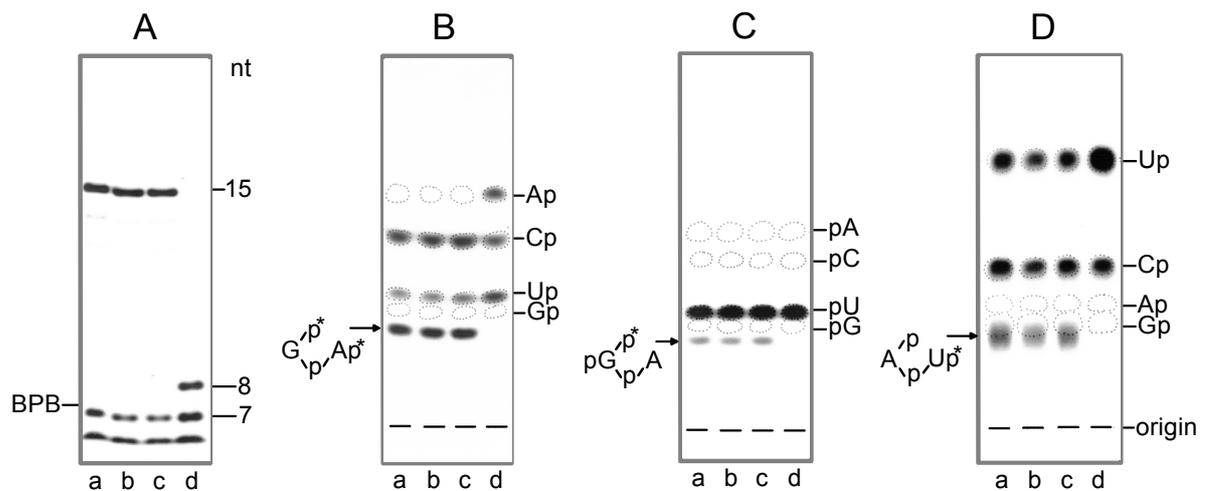


Abbildung 37. Analyse der RNA Spleißprodukte

(A) Es wird jeweils die gespleißte tRNA von der nativen Weizen tRNA Ligase (a), der rekombinanten *Arabidopsis* tRNA Ligase (b), der rekombinanten Hefe tRNA Ligase (c) und der Mischung aus T4 Polynukleotidkinase und T4 RNA Ligase (d) mit RNase T1 hydrolysiert. Die Produkte werden in einem 40 cm langen 20 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Autoradiographie visualisiert. Oligonukleotide ≤ 6 nt laufen mit der Pufferfront und werden nicht aufgelöst. Das jeweilige 15mer Oligonukleotid und das 8mer Oligonukleotid werden aus dem Gel über Diffusionselektion zurückgewonnen und für eine RNase T2 (B) bzw. RNase P1 Hydrolyse (C) verwendet. (D) In analoger Weise wird jeweils das zirkularisierte Intron direkt mit RNase T2 hydrolysiert und über Dünnschichtchromatographie in Celluloseplatten mit Laufmittel B (Isopropanol/ 32 % Salzsäure / H_2O = 70:17.5:12.5) aufgetrennt.

In den Ansätzen von a,b,c ist jeweils eine neue 2'-Phosphat,3',5'-Phosphodiesterbindung gebildet worden, die resistent gegenüber RNase T1 ($ACUCCAG \begin{smallmatrix} p^* \\ \backslash \\ p \end{smallmatrix} AUCCUUAGp$), RNase T2 ($G \begin{smallmatrix} p^* \\ \backslash \\ p \end{smallmatrix} Ap^*$) und RNase P1 ($pG \begin{smallmatrix} p^* \\ \backslash \\ p \end{smallmatrix} A$) ist. Das zirkularisierte Intron ist ebenfalls an der Lignationsstelle RNase T2 ($A \begin{smallmatrix} p \\ \backslash \\ p \end{smallmatrix} Up^*$) resistent (Abbildung 37D). Die Ligation über die T4 Polynukleotidkinase und T4 RNA Ligase bildet eine neue 3',5'-Phosphodiesterbindung, die von der RNase T1, RNase T2 und RNase P1 hydrolysiert werden kann.

4.3.7. Aufreinigung und Identifizierung einer 110 kDa tRNA Ligase aus Weizenkeimen

Wird der Adenyltransferase Nachweis bereits auf der Stufe der aktiven Heparin- und Cibacron Blau-Sepharose Fraktionen durchgeführt, so kann eine Doppelbande mit 125 kDa und 110 kDa aufgezeigt werden. In den aktiven Fraktionen der Source S15 Säule wird jedoch einzig das 125 kDa Protein aufgefunden. Daher wurde für die Source S15 Säule Puffer A mit pH 6.8 (anstelle von pH 7.5) verwendet, um ebenfalls dem adenylbaren 110 kDa Protein ein Binden an den starken Kationenaustauscher zu ermöglichen.

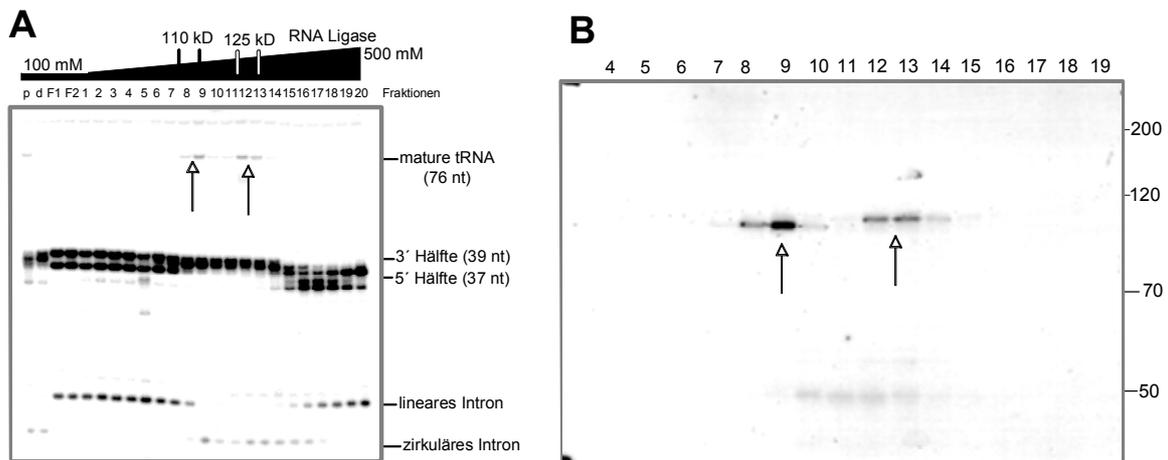


Abbildung 38. Ligaseaktivitäts- und Adenylyltransferasenachweis für die Source S15 Fraktionen

(A) Ligaseaktivitätsnachweis für die Source S15 Fraktionen. In einem Standardansatz von 20 μ l werden 40 fmol tRNA Hälften mit 2 μ l der jeweiligen Source S15 Fraktion für 15 min bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert. Der Reaktionsansatz wird anschließend phenolisiert, präzipitiert und in einem 13 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Pfeile deuten auf die beiden Aktivitätsmaxima.

(B) Adenylyltransferasenachweis für die aktiven Elutionsfraktionen der Source S15 Säule. 10 μ l der jeweiligen Elutionsfraktion werden mit 40 fmol tRNA Hälften und 4 pmol (0.2 μ l, 400 Ci/mmol) α [32 P]ATP supplementiert und bei 37 $^{\circ}$ C für 15 min inkubiert. Der Reaktionsansatz wird mit 1 Vol 2x SDS-Probenpuffer versehen, 3 min bei 90 $^{\circ}$ C erhitzt und in einem 7.5 Polyacrylamidgel / 0.1 % SDS aufgetrennt. Die im Gel aufgetrennten Proteine werden über eine Silberfärbung visualisiert (ohne Abbildung). Das Gel wird anschließend getrocknet und mittels Autoradiographie ausgewertet. Pfeile weisen auf das adenylierbare 110 kDa und auf das 125 kDa Protein.

Bei dem Ligaseaktivitätsnachweis werden zwei voneinander getrennte Aktivitätsmaxima aufgefunden, wobei jedes Aktivitätsmaximum mit einem adenylierbaren Protein bei Adenylyltransferasenachweis korreliert. Für die Identifizierung der 110 kDa Ligase werden nur die Fraktionen des ersten Aktivitätsmaximums (8,9) für die Gelfiltration an Superdex 200 verwendet (Abbildung 38).

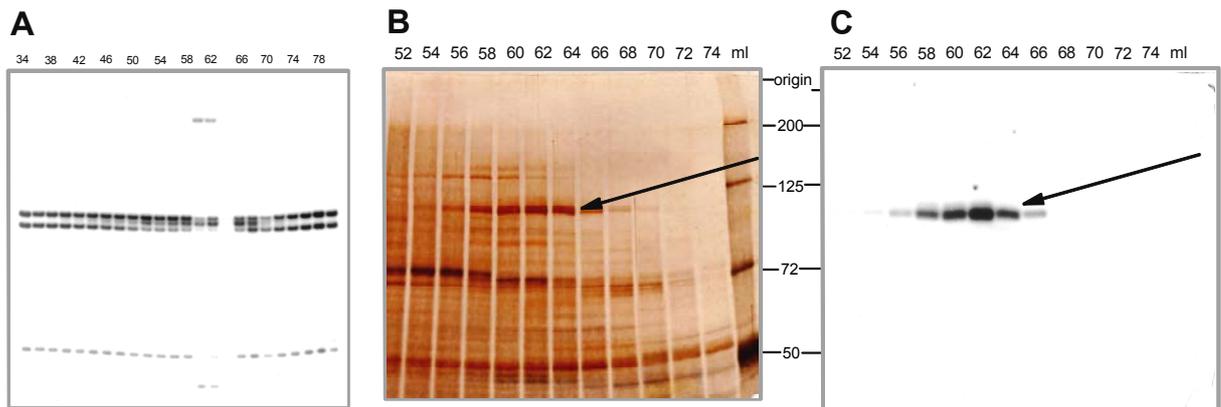


Abbildung 39. Ligaseaktivitätsnachweis und Adenylyltransferasenachweis für die Gelfiltrationsfraktionen

Die vereinten Fraktionen mit der 110 kDa Ligase wurden in einer 120 ml Superdex 200 Säule bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min aufgetrennt. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt.

(A) Von jeder Fraktion wurde mit 2 μ l ein analytischer Ligaseaktivitätsnachweis mit den Archeuka tRNA Hälften durchgeführt. Die Ribonukleinsäuren wurden phenolisiert, präzipitiert, in einem 12.5 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Autoradiographie visualisiert.

(B) 10 μ l Fraktionen werden mit 40 fmol Archeuka tRNA Hälften und 2 pmol α [32 P]ATP bei 37 °C für 10 min inkubiert und anschließend mit 1 Vol 2x Dissoziationspuffer versetzt und in einem 7.5 % Laemmli-Proteingel aufgetrennt. Die Proteine werden durch eine Silberfärbung visualisiert.

(C) Das silbergefärbte Proteingel wird getrocknet und mittels Autoradiographie ausgewertet.

Die aktiven Gelfiltrationsfraktionen (60 – 64 ml) wurden mittels Microcon Konzentratoren auf 40 μ l eingengt, mit 40 μ l 2x SDS-Probenpuffer versetzt und bei -80 °C bis zur präparativen elektrophoretischen Trennung gelagert.

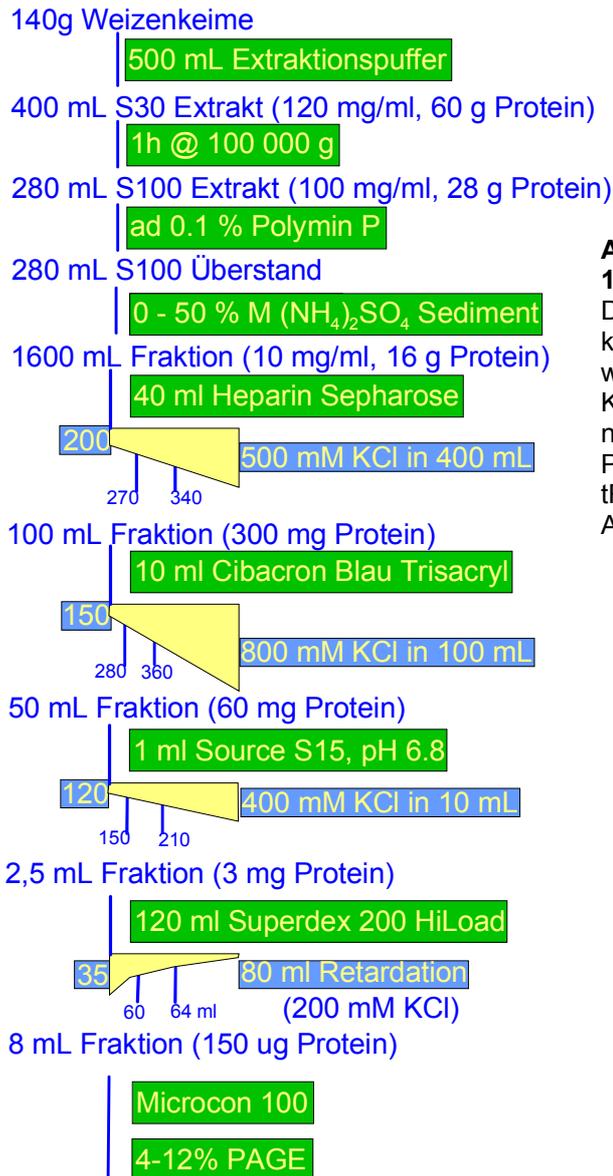


Abbildung 40. Aufreinigungsschema für die 110 kDa tRNA Ligase

Das Aufreinigungsschema für die 125 kDa Ligase kann bis zur Source S15 Säule übernommen werden. Für eine Bindung an den starken Kationenaustauscher Source S15 wird ein niedrigerer pH (6.8) des Chromatographie-Puffers benötigt. Auf die Chromatographie an tRNA Sepharose wurde wegen der hohen Ausbeuteverluste verzichtet.

Für die analytische Evaluierung werden 4 μl (5 %) in einem 7.5 % Polyacrylamid / 0.1 % SDS Gel aufgetrennt, und die Proteine mit Coomassie Blau gefärbt (Abbildung 41).

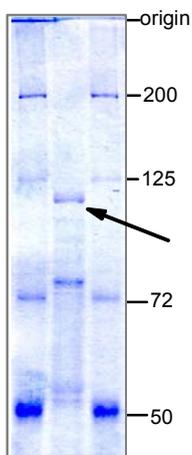


Abbildung 41. Analytisches 7.5 % Polyacrylamid / 0.1 % SDS Gel

Die vereinten aktiven Superdex 200 Fraktionen wurden durch Microcon 100 Ultrafiltration auf 40 μl konzentriert. Davon wurden 2 μl (1/20) auf ein Proteingel aufgetragen. Nach erfolgter elektrophoretischer Trennung werden die aufgetrennten Proteine mit Coomassie Blau gefärbt.

Bei der Aufreinigung der 110 kDa tRNA Ligase wird auf die tRNA Sepharose Säule verzichtet, da bereits die aktiven Superdex 200 Fraktionen eine für die massenspektrometrische

Proteinsequenzierung erforderliche Reinheit besitzen. Anhand Abbildung 41 kann die Menge auf ca. 1 µg des 110 kDa Proteins abgeschätzt werden. Da lediglich 5 % für die analytische Evaluierung eingesetzt worden sind, beläuft sich die Gesamtausbeute an der 110 kDa tRNA Ligase auf 20 µg.

Zur Untersuchung des RNA Ligationsmechanismus der 110 kDa tRNA Ligase wird das zirkularisierte Intron der Archeuka pre-tRNA aus einem präparativen Gel durch Diffusionselution zurückgewonnen und für die Hydrolyse mit RNase T2 verwendet. Die entstandene Nukleotidmischung wird anschließend über Dünnschichtchromatographie in Celluloseplatten mit Laufmittel B (*iso*-Propanol / 32 % Salzsäure / ddH₂O = 70/17.5/12.5) aufgetrennt und über Autoradiographie ausgewertet.

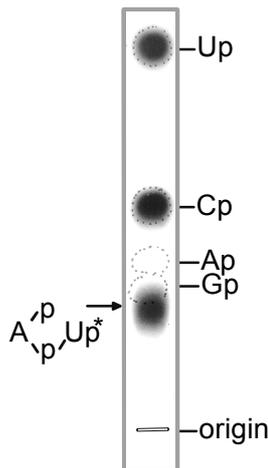


Abbildung 42. Dünnschichtchromatographische Analyse der Nukleotidmischung aus der RNase T2 Hydrolyse des zirkularisierten Introns

Das mit der 110 kDa tRNA Ligase zirkularisierte Intron wird aus präparativen Gelen über Diffusionselution zurückgewonnen und für die RNase T2 Hydrolyse verwendet. Das entstehende Nukleotidgemisch wird in Dünnschicht Cellulose Platten mit dem Laufmittel B aufgetrennt und über Autoradiographie ausgewertet. Die zugesetzten Nukleosid-3'-phosphate werden als Marker unter UV-Licht bei 254 nm visualisiert.

Das Auftreten des nicht durch RNase T2 spaltbaren Dinukleotids $A_p^p U_p^*$ beweist, dass auch die 110 kDa tRNA Ligase RNA Moleküle über eine 2'-Phosphomonoester-3',5'-Phosphodiester-Bindung verknüpft (Abbildung 42).

Für die Identifizierung des codierenden Gens wurde eine massenspektrometrische Sequenzierung des 110 kDa Ligaseproteins angewendet. Die praktische Durchführung erfolgte im Labor von Dr. Sickmann (Virchow Zentrum, Würzburg). 40 µl (50 %) der Proteinprobe werden in 2 Taschen mit 5 mm x 1 mm verteilt und in einem Gradientengel von 8 -12 % aufgetrennt. Das Gelstück mit dem 110 kDa Protein wird ausgeschitten und das enthaltene Protein tryptisch hydrolysiert. Die tryptischen Peptide werden in einer Kapilar-"Reverse Phasen"-nano HPLC aufgetrennt und direkt über Elektronensprayionisation in einer Quadrupol Ionenfalle massenspektrometrisch durch Sekundärfragmentierung untersucht (Abbildung 43).

Weizen EST Sequenz B:

MCGMTKAAAVPVI PDSEG TDSNPF SLEALAVFMFRVLQRVNHGPNL DK**ASP**NAGY ILLMFY NLYD**GK**CRREFESE
LYERFGSLVK**MPLLKPER**APLPGDVK**TILDEGMSLFR**LHQSRHGRVPEPSK**GSYAQEW**AQ**WEK**RRLRVVLSRNANYL
TSIQVPFDVAGERS

Weizen EST Sequenz A:

MNRSDEKQQIKALLENV GSSMCPDHRD WFGYSGLEPQSRNADK**SVVTHFLQAHPTDYATK**KLQEMIGLMKRKNFS
ASFKSYWNYQKVDLSNDNL CYK MVIHVYSDSVFRRYQQEMRKN**NQELWPLYRGFFVDVNL**FKANNKKAELS**KDS**
NTLLRNINGALDSKLSSKDGLPD

Weizen EST Sequenz C:

EVLEQLKAVAKVMSKLLILQSEGLGYHFAAVTVPQADILSLLRKL**LGENDGDVNNFLNGIK**VEDNLSKAHVTLA**HK**
RAHGVA AVAS YGVYQ**NQ**EVVSVFNAFLYTDKMAALEAQLGTVNGEKIDSK**NDWPHVTLWTAPGVAPKEANMLPQL**
FSAGQAK**RVLIDPPITISGVLD**FY

Zuckerrübe EST Sequenz D:

MFGNVYTAVGVFVLGRLFHEAWGKEAPK**MQAEFND**FLEKNRVSISMELVTAVLGDHGQRPKDDYAVVTAVTELGN
GKPKFYSTPEVIAFCRKR**WRLPTNHVWLFSTRKSATSFFAAYDALCEE**GTAT**VPCK**ALDEIADTAVPGSKDHVKVQ
GEILEGLVARIVPSQSSTQMEVVKTFPQA

Abbildung 43. Auflistung der offenen Leseraster der EST-Sequenzen, die zur Identifizierung der 110 kDa tRNA Ligase beigetragen haben

Die sequenzierten tryptischen Fragmente sind in fetter Schrift hervorgehoben.

Die Sequest Analyse zeigt die Weizen EST Sequenzen auf, die zur Identifizierung der 125 kDa tRNA Ligase geführt haben. Da in den sequenzierten Genomen von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* das tRNA Ligase-Gen nur in einer Kopienzahl vorkommt, ist anzunehmen, dass die 125 kDa und die 110 kDa tRNA Ligase von demselben Gen exprimiert werden.

4.3.8. Genannotation der *Arabidopsis* und der *Oryza* tRNA Ligase

Die Reis tRNA Ligase verfügt über 27 Exons und eine Signalsequenz für die Chloroplasten. Bisherige Modelle gehen von einem tRNA Spleißen im Kern bzw. im Cytoplasma aus. Eine Möglichkeit besteht in dem Durchlesen des ersten Initiationscodons und einer Initiation der Translation am zweiten bzw. dritten Methionin.

```

1  MSLSTSTSSLLLLLSPRGNPRLLPLLLLPLRLSSSSSAAAAAMPPRRDRHHGKQPQQQWKPKATDPAAAAPAVVAAA
81  SSPASSTSSSADFAGGVERMTISPSQGGASQVWVPRGYATSASSSSSSSAAAAEQRIDAEKLSRVFKAAPNFEVDNNT
161  FIQSQIRATFYPKFENEKSDQETRTRMIEMVSHGLATLEVTLKHSGSLFMYAGHHGGAYAKNSFGNIYTAVGVFVLGRLF

```

Abbildung 44. Aminoternale Proteinsequenz der *Oryza* tRNA Ligase

Die drei Methionine im gleichen Leseraster, sowie die beiden für die tRNA Ligasen charakteristischen Sequenzmotive Lig und LigI sind hervorgehoben.

Daher wurde die Frage gestellt, ob die *Arabidopsis* tRNA Ligase über ein zusätzliches Exon oberhalb des vermeintlichen Initiationsmethionins verfügt und so wie die *Oryza* tRNA Ligase von insgesamt 27 Exons codiert wird. Hierfür wurde der Bereich zwischen dem λ -ZapII Vektor und der bekannten codierenden Sequenz von AtLig mittels PCR amplifiziert und nach Restriktionshydrolyse mit *Bam*HI und Phosphorylierung mit der Polynukleotidkinase in den *Bam*HI/*Sma*I hydrolysierten und CIP dephosphorylierten pUC19 Vektor für eine DNA Sequenzierung kloniert.

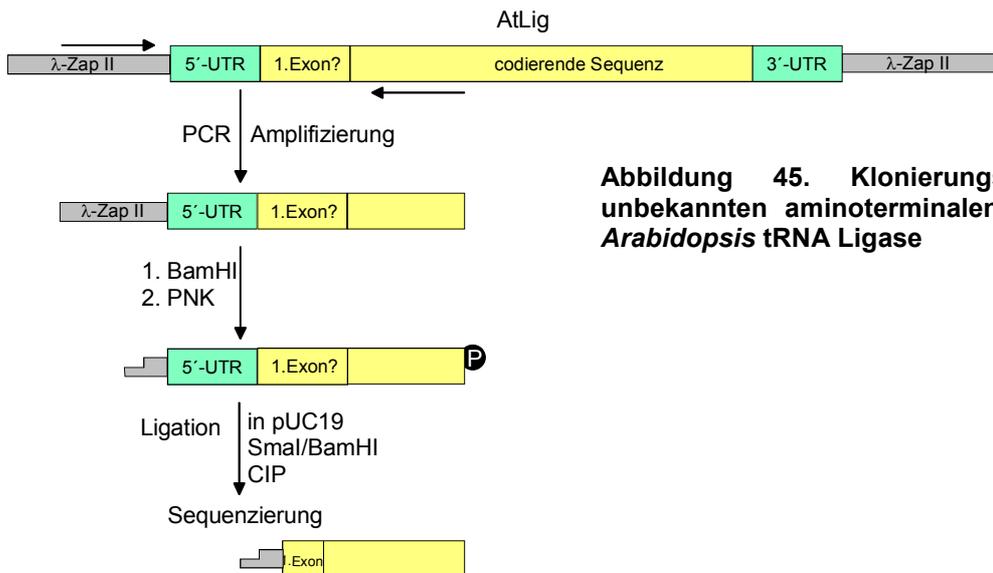


Abbildung 45. Klonierungsstrategie des unbekanntes aminoterminalen Bereichs der *Arabidopsis* tRNA Ligase

Bei der Sequenzierung des Abschnitts oberhalb des Initiationsmethionincodons kann noch codierende Sequenz aufgezeigt werden. Zudem ist eine weitere Exongrenze für die *Arabidopsis* tRNA Ligase vorhanden. Auch wenn der sequenzierte cDNA Klon nicht die vollständige codierende Sequenz enthält, kann das in Abbildung 46 aufgezeigte Genmodell für das vollständige *Arabidopsis* tRNA Ligase Gen AtLig_{long} postuliert werden.

```

1  TGGTTCGCAC AAAATTAAGC CACGTGTTGA TGTCGTTAAT TCCTCACACA
                               M  S  L  I  P  H  T

51  ACTCACTTCG CTTTCTCTAT CAACATTCAT CTTTCTGCTA CTTTCTCGAAC
   T  H  F  A  F  S  I  N  I  H  L  S  A  T  S  R  T

101 CTCTCTCTTT CTCCGATCAT CTTTCTCTTA CTTTACCTTA GCTCGCTCTC
   S  S  L  L  R  S  S  S  P  Y  F  T  L  A  R  S  L  neues 1. Exon

151 TCTGTTTTAA CTCCTCTATC AGATTTTTAT CCTCAGATAT GCCAAAGAAG
   C  F  N  S  S  I  R  F  L  S  S  D  M  P  K  K

201 CAGgtttggg actttcatcg agttttcctt aatctgggtt aatatagcga
   Q

251 ttgccaattt tatcgaattt taaatcctct gttatatgac tctetcgaag

301 atctgcactt tctgggtttt gattgctttg ttcacaatgt gttagtttgt

351 ggtgcagtgt tatgactttg gacttttgat tatctggaaa cgaatttgaa

401 ttttgcatct taaaaaattg aaactttata tcttgaagtc ttggttttgt

451 agagtttctt gttgcttttg ggtgtataca ggacttgact attttttgtt

501 tttgttggca gAAAAAGAGA GATCACGCTG AGCAGAAGTG GCAAGTAAAA
   K  K  R  D  H  A  E  Q  K  W  Q  V  K

551 CCGAAGATGG ATGCTCCATT TGAATCCGGT GATAGTTCGG CAACAGTTGT
   P  K  M  D  A  P  F  E  S  G  D  S  S  A  T  V  V

601 TGCAGAAGCA GTAACAACC AATTTGCCGG GTTAAGTCTT AAGGAAAGCA
   A  E  A  V  N  N  Q  F  G  G  L  S  L  K  E  S  N

```

Abbildung 46. Genomischer Sequenzausschnitt der *Arabidopsis* tRNA Ligase

Exonsequenzen sind in Großbuchstaben, das Intron in roten Kleinbuchstaben wiedergegeben. Die ersten 3 Methionins im gleichen Leseraster sind in fetter Schrift hervorgehoben.

Eine Blast Suche mit dem neu annotierten AtLig_{long} Protein gegen die EST-Datenbank der NCBI (tblastn) findet zwei weitere cDNA Klone, deren offene Leseraster eine hohe Homologie zu dem aminoterminalen Bereich von AtLig_{long} aufweisen (Abbildung 47).

AtLig	1	MSLIPHTTHFAFSINHLISATSR--TSSLRLRSSPYFTLLARSLCFNSSLRFLSSDMFKKOKKRDHAEOKWQVQPKMDAPF	78
Cs	1	MSASQRIVFCAFTLTHSRAFCILRRSSTSLRCYLP-LARARSLTFSSV---SPIMSYNQRGGHSCQLWKKQKQVDTES	76
Vv	1	MSASQRIILCGFTLPTLSSSRSP-----KLRATIFSRSLN-----LRRSISDSV	44
AtLig	79	ESGDSSEAVVVAEAVNNQFGGLSLKESNT---NAPVLPSE-----QTTNHRVONLVWPKPSYGTVSGSSSAFVVG----	144
Cs	77	SEVEGVSSSGAEAVTNGISGLSIAENDG---CQSSVPSTGFGSFLPNCSEFTQGGKATWPKPSYGTVSGQTSAEVGNLPA	152
Vv	45	MSNBSASEAAEAVTNRFGGLAVDESSGQTYQVDFPSVQFGSVLPADLAEVQGEATWPKPSHGTVSGARSVGEKTP--I	122
AtLig	145	KTSAVSQIICSSCDTRKVG----LNLKSLFCNLLKRFSDVKSTYCHAQIRATFYPKFENEKTDQEIIRRMEMVSKGLATL	220
Cs	153	DDTATATKGNASEMPTAQKSRMDLSKLFRCNLLNEFTVDNSTYSLAEVRATFYPKFENEKSDQEIIRRMVVEVSNGLAAV	232
Vv	123	DRTGVEITLGNGAEMAVA-----	139
AtLig	221	EVSLKHSGSLFMYAGHKGGAYAKNSFCNLYTAVGVFVLSRMRREAWGTRAPKKEAEFNDLFLEKNRMCISMELVTAVLGDH	300
Cs	233	EVTLKHSGSLFMYAGHKGGAYAKNSFCNLYTAVGVFVLSRMRREAWGTRAPKKEAEFNDLFLEKNRMCISMELVTAVLGDH	287
Vv	139	-----	139

Abbildung 47. Alignment der N-terminalen Region der *Arabidopsis* tRNA Ligase mit zwei weiteren partiellen cDNA Klonen aus *Citrus sinensis* und *Vitis vinifera*

Es wird das Alignment der *Arabidopsis* tRNA Ligase mit den offenen Leserastern der EST-Sequenzen CN191372 von *Citrus sinensis* und CB342564 von *Vitis vinifera* wiedergegeben. Identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt.

Neben dem Alignment der Aminosäuresequenz der verschiedenen pflanzlichen tRNA Ligasen ist es wichtig auf den Kontext zu achten, in dem sich die einzelnen Initiationsmethionine befinden. Sollten die zwei identifizierten tRNA Ligasen mit einem Molekulargewicht von 125 und 110 kDa von einem Gen entstammen, besteht die Möglichkeit, dass das erste Initiationsmethionin vom Ribosom überlesen wird, da es sich in einem schlechten Kontext befindet. Dann kann die Translation am zweiten und dritten Methionin erfolgen. Die Konsensus-Sequenz für höhere Pflanzen beläuft sich auf caA(A/C)aAUGGCg (Tabelle 3; Joshi *et al.*, 1997).

Tabelle 4. Kontext der Initiationsmethionine der pflanzlichen tRNA Ligasen

	1.met codon	2. met codon	3. met codon
AtLig	GUUG AUG UCG	AGAU AUG CCA	GAAG AUG GAU
OsLig	UUAG AUG UCG	UGCA AUG CCU	GAGG AUG ACC
CcLig	UUGA AUG UCG	AAUC AUG UCU	UGAG AUG ACA
VvLig	CUGA AUG UCG	AGUC AUG UCG	UGAA AUG GCA

Consens caA (A/C) AUGGCg

Die Klonierung der Vollängen *Arabidopsis* tRNA Ligase (AtLig) erfolgt über die Ligation von 2 PCR Fragmenten. Die erste PCR Reaktion amplifiziert das erste Exon von genomischer *Arabidopsis* DNA. Dabei wird oberhalb des 1. Methionins eine *NotI* Schnittstelle für die Klonierung eingefügt, das andere Ende wird über die Polynukleotidkinase für eine spätere Ligation mit glatten Enden phosphoryliert. Die zweite PCR erfolgt mit AtLig_{short} in pIVEX WG 1.3 mittels einer abgewandelten Form des "Ex Site" Mutagenese Protokolls (Stratagene). Eine Startsequenz bindet oberhalb des Initiationsmethionins des pIVEX WG 1.3 Vektors in inverser Richtung und fügt eine *NotI* Schnittstelle ein. Die zweite Startsequenz bindet an den Bereich des 3. Methionins und fügt über das 5'-Ende die fehlende Nukleotidsequenz bis zur 1. Exongrenze an (Abbildung 48).

Beide PCR Fragmente werden nach Aufreinigung mit *NotI* hydrolysiert, das kurze genomische Fragment mit der Polynukleotidkinase phosphoryliert und der Vektor mit der alkalischen Phosphatase aus Kälberdarm ("calf intestinal phosphatase" CIP) dephosphoryliert. Nach Aufreinigung in einem präparativen Agarosegel werden beide PCR Fragmente UN bei 14 °C mit der T4 DNA Ligase ligiert. Anschließend wird die T4 DNA Ligase durch Erhitzung auf 60 °C für 5 min inaktiviert, bevor die

verbliebene Matrizen DNA mit *DpnI* hydrolysiert wird. Die Transformation in *E. coli* XL1-Blue erfolgt über Elektroporation. Die erfolgreiche Klonierung von *AtLig_{long}* wird durch DNA Sequenzierung bestätigt.

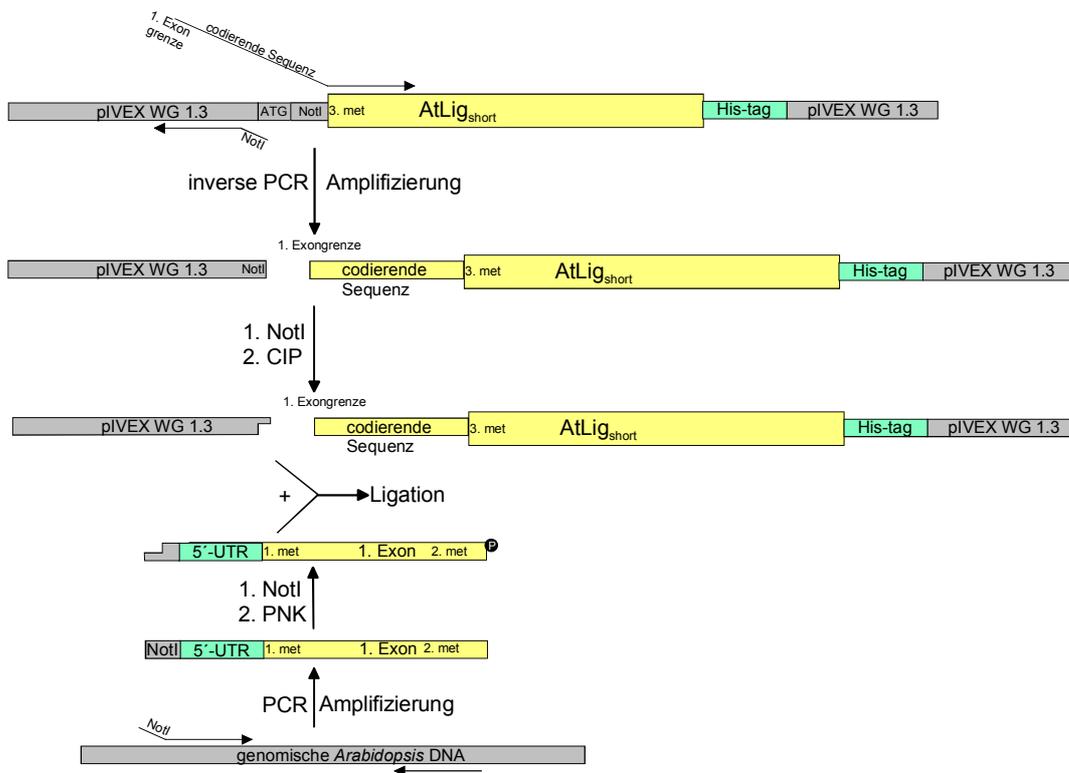


Abbildung 48. Schematische Darstellung für die Klonierungsstrategie der cDNA *AtLig_{long}* in dem *pIVEX WG1.3* Vektor

Die Klonierung geht von zwei PCR Ansätzen aus. Von oben zur Mitte wird die Modifizierung des bestehenden *AtLig_{short}* Klon hin zur Vorbereitung für die Ligation mit dem ersten Exon wiedergegeben. Von unten zur Mitte ist die PCR Amplifizierung des ersten Exons aufgezeigt, bei der über die eine Startsequenz eine *NotI* Schnittstelle eingefügt wird.

4.3.9. Lokalisierung der pflanzlichen tRNA Ligase in der Pflanzenzelle

Für die neu annotierte *Arabidopsis* und für die *Oryza* tRNA Ligase kann eine Signalsequenz am aminoterminalen Ende anhand des Algorithmus SignalP 3.0 mit einer Wahrscheinlichkeit von 97 % und 99,9 % vorhergesagt werden (Bendtsen *et al.*, 2004). Eine differenzierte Aussage in Bezug auf die Lokalisation in den Mitochondrien oder in den Chloroplasten kann über den Algorithmus TargetP V1.0 erhalten werden (Emanuelsson *et al.*, 2000). Für *OsLig* wird eine Lokalisation in den Chloroplasten mit einer Wahrscheinlichkeit von 69 % und in den Mitochondrien von 59 % vorhergesagt. *AtLig_{long}* kann mit einer Wahrscheinlichkeit von 94 % in den Chloroplasten und von 17 % in den Mitochondrien angetroffen werden.

Unabhängig von der Signifikanz einer vorhergesagten Lokalisierung in einzelnen Zellkompartimenten kann die tatsächliche Lokalisierung nur experimentell bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Lokalisierung der *Arabidopsis* und *Oryza* tRNA Ligase *in vivo* in Zwiebelepidermiszellen untersucht. Eine elegante Methode besteht in der Bildung von rekombinanten GFP-Fusionproteinen mit der *Arabidopsis* und *Oryza* tRNA Ligase. Das Fusionsprotein wird dann unter der Kontrolle des starken pflanzlichen CaMV S35 Promotors und des Nos Terminators gestellt. Diese so erhaltene

Plasmid DNA wird dann über eine Goldpartikel "Kanone" in die Pflanzenzellen eingeschleust. Nach einigen Stunden Inkubation kann die Lokalisierung der durch das GFP hervorgerufenen Fluoreszenz unter dem Mikroskop untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die für die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung notwendigen Klonierungen erledigt. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden im Labor von Prof. Akama (Matsue, Japan) durchgeführt.

4.3.9.1 Klonierung von tRNA Ligase-GFP Konstrukten

Für die Lokalisierungsstudien wird der Vektor pTH-2 verwendet. Dieser Vektor entstammt ursprünglich der pUC18 Plasmid DNA, in die der starke pflanzliche CaMV S35-Promoter für eine hohe Transkription der einzufügenden mRNA vorgeschaltet ist. Zudem befindet sich nach einer multiplen Klonierungsstelle die codierende Sequenz für das grün fluoreszierende Protein sGFP S65T, das eine im Vergleich zum GFP-Wildtyp eine 200fach stärkere Fluoreszenz hervorruft.

Für die Klonierung codierender Ligasesequenzen kann die carboxyterminale Restriktionsschnittstelle *Sall* auch im pTH-2 Vektor verwendet werden. Die bei den Ligase-Genen vorliegende aminoternale *NotI* Schnittstelle muß jedoch in den pTH-2 Vektor mittels inverser PCR eingefügt werden. Daher findet die Klonierung über die Ligation von zwei PCR Fragmenten statt. AtLig und OsLig werden mit Startsequenzen amplifiziert, so dass am aminoterminalen Ende eine *NotI* und am carboxyterminalen anstelle des Terminationscodons eine *Sall* Schnittstelle eingefügt wird. Die pTH-2 Vektor DNA wird in einer inversen PCR mit Startsequenzen amplifiziert, die eine *NotI*-Schnittstelle nach dem CaMV S35 Promotor einfügt. Nach Restriktionshydrolyse mit *NotI* und *Sall* werden beide PCR Fragmente über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt und für die Ligationsansätze bei 14 °C üN verwendet. Nach Inaktivierung der T4 DNA Ligase wird mit 10 E *DpnI* supplementiert und bei 37 °C für 1 h inkubiert, bevor die Transformation durch Elektroporation durchgeführt wird. Die erfolgreiche Klonierung wird durch DNA Sequenzierung bestätigt.

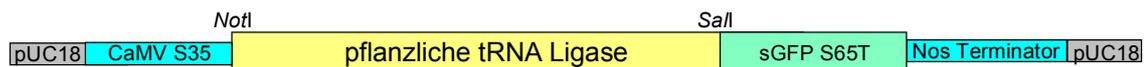


Abbildung 49. Schematischer Aufbau der tRNA Ligase-GFP-Fusionsproteine

Die tRNA Ligase wird ohne das natürliche Terminationscodons im Leseraster vor das verstärkte grüne Fluoreszenzprotein kloniert und unter die Kontrolle des pflanzlichen starken CaMV S35 Promotors gesetzt.

4.3.9.2. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen transformierter Zwiebelepidermiszellen

Bevor die Lokalisierung der gewünschten Proteine AtLig und OsLig untersucht werden, ist es ratsam, die verschiedenen Lokalisierungen in der Pflanzenzelle anhand von Markerproteinen zu visualisieren. Wird das GFP allein ohne Signalsequenz und ohne Kernlokalisierungssignal exprimiert, kommt es zu einer Anhäufung im Cytoplasma. Wird dem GFP eine Kernsignalsequenz angefügt, so wird dieses Konstrukt in den Zellkern importiert, der sodann unter UV Licht grün leuchtet. Verfügen Proteine am

aminoterminalen Ende eine Signalsequenz, so kann ein Import in die Mitochondrien und in die Chloroplasten erfolgen (Abbildung 50).

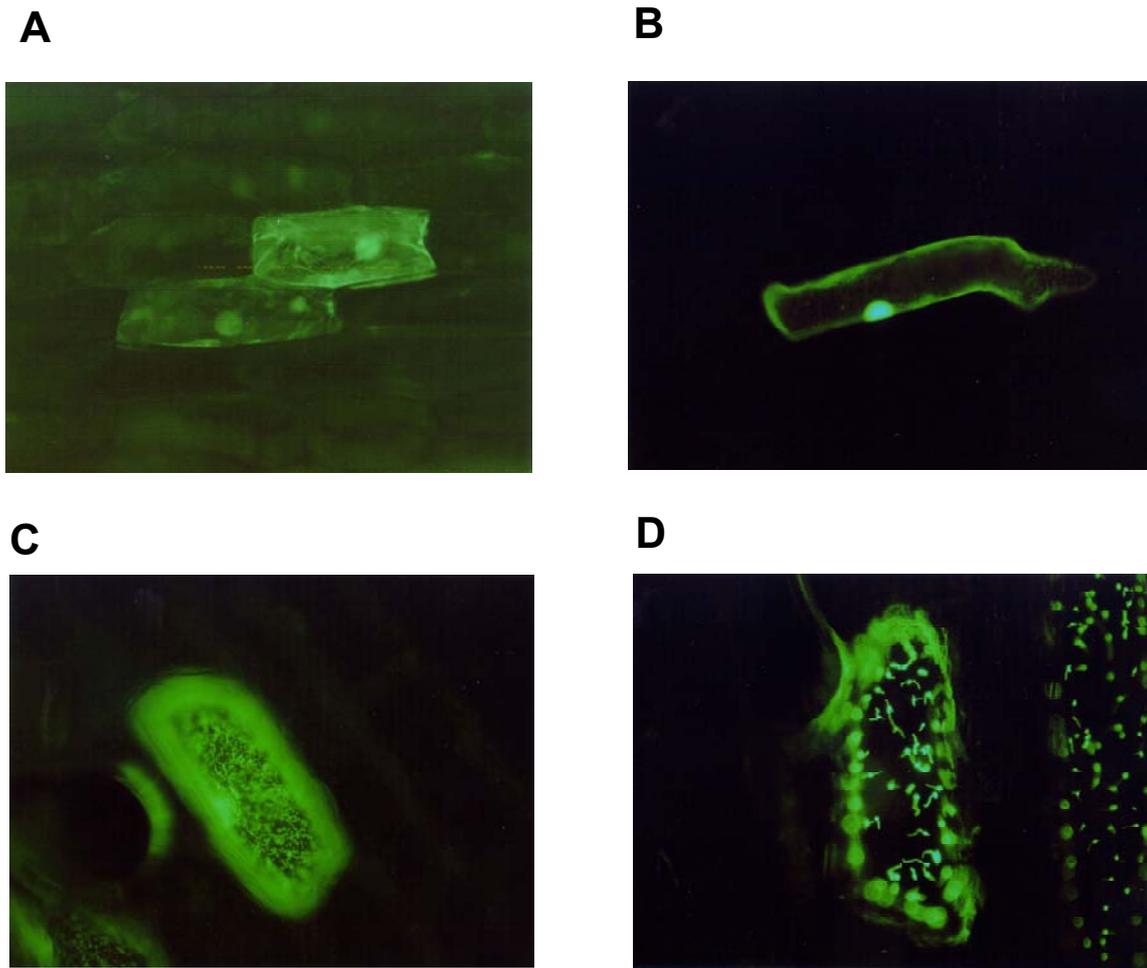
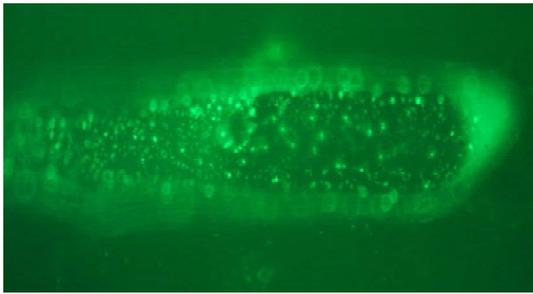


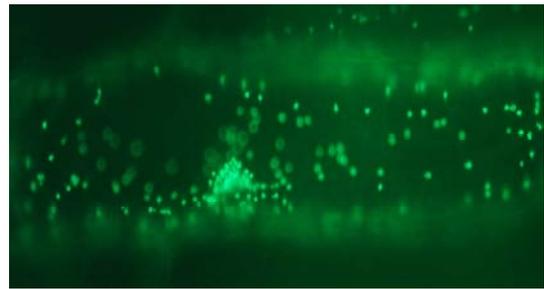
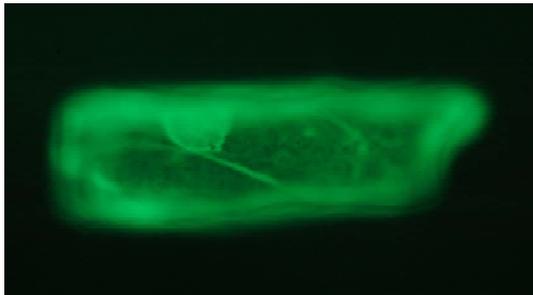
Abbildung 50. Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine in einer Zwiebelepidermiszelle

Wird das sGFP S65T Protein allein in einer Zelle exprimiert, so erscheint das gesamte Cytoplasma in grünlicher Fluoreszenz (A). Verfügt das GFP-Fusionsprotein über eine Kernimportsignalsequenz, leuchtet der Kern in intensiver Fluoreszenz (B). Wird ein Fusionsprotein mit einer Zielsequenz für die Mitochondrien untersucht, tritt die Fluoreszenz fein punktförmig auf (C). Die Lokalisierung in den Chloroplasten kann schön durch die Überlagerung der eigenen Fluoreszenz mit der GFP hervorgerufenen Fluoreszenz erkannt werden (D).

Für die eigentliche Untersuchung werden verschiedene Konstrukte für die *Arabidopsis* und *Oryza* tRNA Ligase in die Zwiebelepidermiszellen eingeschleust und die gebildete Fluoreszenz unter UV Licht mit einem Mikroskop betrachtet. Für die *Oryza* tRNA Ligase wird sowohl OsLig-GFP Wildtyp, wie auch OsLig-GFP M1, bei der das erste Initiationsmethionin zu einem Stopp-Codon mutiert wurde, untersucht (Abbildung 51). Für die *Arabidopsis* tRNA Ligase wird sowohl das Konstrukt AtLig_{long}-GFP, wie auch AtLig_{short}-GFP untersucht (Abbildung 51).

AtLig_{long}-GFP

OsLig-GFP Wt

AtLig_{short}-GFP

OsLig-GFP M1

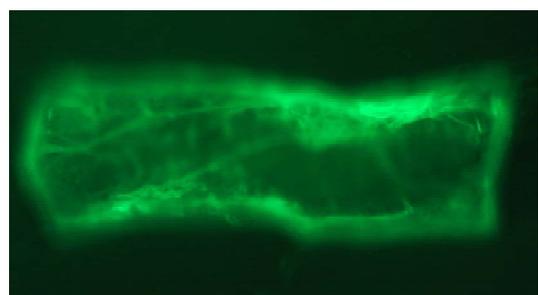


Abbildung 51. Lokalisierung der *Arabidopsis* und *Oryza* tRNA Ligase-GFP Konstrukte in der Zwiebelepidermiszelle

Das vollständige *Arabidopsis* tRNA Ligase-GFP Konstrukt AtLig_{long}-GFP verfügt über eine Lokalisierungssignalsequenz für die Mitochondrien. Kann bei der *Arabidopsis* tRNA Ligase die Initiation der Translation beim 3. Methionin-Codon erfolgen (AtLig_{short}-GFP) so ist weder eine Signalsequenz noch ein Kernlokalisierungssignal vorhanden und das Fusionsprotein kumuliert im Cytoplasma.

Erfolgt bei der *Oryza* tRNA Ligase die Initiation der Translation beim ersten Methionin-Codon (OsLig-GFP Wt), so beinhaltet das Fusionsprotein eine Signalsequenz für die Chloroplasten. Kann die Initiation der Translation erst beim zweiten Methionin erfolgen, so verfügt das Fusionsprotein weder über eine Signalsequenz, noch über ein Kernimportsignal und akkumuliert ebenfalls im Cytoplasma.

Für die *Oryza* tRNA Ligase kann die berechnete Lokalisierung in den Chloroplasten durch die *in vivo* Fluoreszenzstudien mit dem grün fluoreszierenden Protein bestätigt werden. Wird ein Fusionsprotein exprimiert, das erst am zweiten bzw. dritten Methionin-Codon initiiert, so akkumuliert die Fluoreszenz im Cytoplasma. Offensichtlich verfügt die *Oryza* tRNA Ligase nicht über ein Kernimportsignal. Dies ist verwunderlich, da die meisten bisherigen Modelle für das tRNA Spleißen davon ausgingen, dass die Prozesse im Zellkern stattfinden. So verfügt der *Nicotiana* Kernextrakt über alle enzymatischen Aktivitäten, die für die Reifung einer intronhaltigen Vorläufer-tRNA hin zur maturaen tRNA erforderlich sind (Yukawa *et al.*, 2001).

Für die *Arabidopsis* tRNA Ligase konnte die berechnete Lokalisierung in den Chloroplasten nicht bestätigt werden. Vielmehr verfügt die *Arabidopsis* tRNA Ligase über eine Signalsequenz für die Mitochondrien. Die *Arabidopsis* tRNA Endonuklease Untereinheiten lassen sich in den Mitochondrien lokalisieren (persönliche Mitteilung von Prof. Akama, Matsue, Japan). Bereits für die Hefe tRNA Endonuklease konnte die vornehmliche Lokalisierung an den Mitochondrien nachgewiesen werden (Yoshihisa *et al.*, 2003). Wird der *Arabidopsis* tRNA Ligase eine Initiation erst am dritten Methionin ermöglicht (AtLig_{short}), so akkumuliert das Fusionsprotein im Cytoplasma. Die *Arabidopsis* tRNA Ligase – wie auch die *Oryza* tRNA Ligase – verfügen nicht über ein Kernimportsignal.

4.4. Charakterisierung der tRNA Ligase aus Säugern

Bei den Säugern unterscheidet sich der Ligationsmechanismus in fundamentaler Weise von dem Ligationsmechanismus, der bei den Pflanzen und Hefen anzutreffen ist. Das Cyclophosphat ist eine essentielle Voraussetzung für die Ligation und wird in die entstehende 3',5'-Phosphodiesterbindung eingebaut. Ein 5'-Phosphat an der Ligationsstelle wird von der Hefe und von der Pflanzen tRNA Ligase toleriert, hemmt jedoch die Säuger tRNA Ligase vollständig.

4.4.1. Literaturrecherche zu der Aufreinigung der tRNA Ligase aus Säugern

Bisherige Untersuchungen der Säuger tRNA Ligase sind entweder mit Gesamt- oder Kernextrakten aus HeLa Zellen, Frosch Oozyten oder aus Mäuseleber durchgeführt worden. Der Kernextrakt aus der Mäuseleber kann direkt in einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung angereichert werden. Zudem wurde aus einem HeLa Kernextrakt die tRNA Ligaseaktivität an Heparinsepharose gebunden und mit einem Stufengradienten von 500 mM KCl eluiert. Bisher existiert lediglich eine Veröffentlichung mit einer Aufreinigungsstrategie, die zu einer hundertfachen Anreicherung der Aktivität geführt hat. Hierbei wird die Labilität der tRNA Ligase sehr stark betont. Die Aktivität konnte nur wenige Stunden für weitere Charakterisierungen aufrechterhalten werden. Dabei wurde unter anderem das Molekulargewicht über Sedimentation im Glycerolgradienten auf ca. 160 kDa abgeschätzt.

4.4.2. Chromatographische Aufreinigung der tRNA Ligase aus Schweineleber

Im Rahmen dieser Arbeit konnte von einem lokalen Schlachthof frische noch handwarme Schweineleber für die chromatographische Anreicherung der tRNA Ligaseaktivität bezogen werden.

Stufe 1: 200 g gewürfelte Schweineleber wird in einem Fleischwolf mechanisch zerkleinert und mit 400 ml Puffer A (Zusammensetzung siehe 4.3.1) / 200 mM KCl in einem Mixer (Typ "Waren blender") für 5 min durchmischt. Anschließend werden 200 mL Aliquote für 2 min mit Ultraschall sonifiziert (Branson Sonifier, dicke Spitze, Stufe 8) und 15 min bei 25.000 g (JA 14, 12.000 UpM) zentrifugiert. Der erhaltene S 25 Extrakt (450 ml, 45 g Protein) ist noch relativ trübe und wird bei 100.000 g (Ti45, 42.000 UpM) für 90 min ultrazentrifugiert. Der so erhaltene S100 Extrakt wird zwischen sedimentierten Ribosomen und Membranproteinen und der obigen Fettemulsion vorsichtig mit einer 20 ml Pipette entnommen (280 ml, 24 g Protein).

Stufe 2: Der S100 Extrakt wird mit Ammoniumsulfat fraktioniert. Das 0 – 30 % gesättigte Sediment wird verworfen, der Überstand ad 80 % Sättigung durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat eingestellt. Nach ½ Stunde rühren wird 10 min bei 10.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das 30 – 80 % gesättigte Sediment wird in einem kleinen Volumen Puffer A, pH 8.5 aufgenommen (150 ml, 14 g Protein) und über eine 800 ml Sephadex G25 Säule – äquilibriert mit Puffer A, pH 8,5 – entsalzt (250 ml, 14 g Protein).

Stufe 3: Eine 200 ml DEAE SH 23 Säule wird mit Puffer A, pH 8.5 äquilibriert und mit der aktiven Ammoniumsulfatfraktion beladen und mit einem 1400 ml linearen Gradienten von 0 – 300 mM KCl eluiert (Abbildung 51). Die RNA Ligaseaktivität eluiert hier bei 70 – 90 mM KCl. Die aktiven Fraktionen 16-20 werden vereint (120 ml, 600 mg Protein) und über Gelfiltration an Sephadex G25 auf Puffer A, pH 7.5 umgepuffert (180 ml, 600 mg Protein; Abbildung 51).

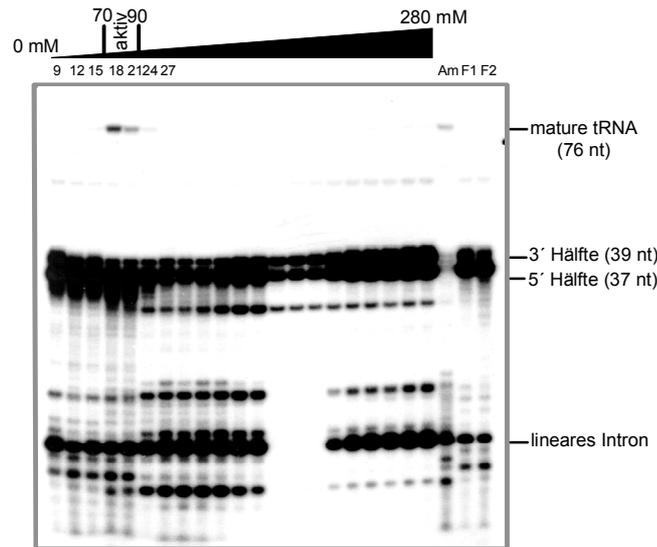


Abbildung 51. Ligaseaktivitätsnachweis für die DEAE-Fractionen mit den Archeuka tRNA Hälften

Das 30 – 80 % ammoniumsulfatgesättigte Sediment wird in Puffer A, pH 8.5 gelöst, über Sephadex G25 entsalzt (Am) und auf die 200 mL DEAE-Cellulosesäule aufgetragen. Der Durchfluss wurde ebenfalls fraktioniert und auf Ligaseaktivität untersucht (F1,F2). Die Elution erfolgte mit einem 1400 ml linearen Gradienten von 0 – 300 mM KCl. Es werden 70 Fraktionen á 20 ml gesammelt.

Stufe 4: Eine 10 ml Cibacron Blau Trisacryl-Säule wird mit Puffer A, pH 7.5 äquilibriert und mit den aktiven DEAE-Elutionsfraktionen beladen. Die Elution erfolgt mit einem 100 ml linearen Gradienten von 0 – 1000 mM KCl. Leider stellte sich heraus, dass die RNA Ligaseaktivität über einen weiten Bereich von 200 – 800 mM KCl eluierte (60 ml, 30 mg Protein). Die aktiven Cibacron Blau Fraktionen wurden dennoch vereint, über Gelfiltration an Sephadex G25 entsalzt und direkt für die nächste Säule verwendet.

Während der analytischen Evaluierung der Cibacron Blau Säule wurde ein gebrauchtes Säulenmaterial verwendet, das lediglich mit 2 M KCl nachgewaschen wurde. Hier eluierte die RNA Ligaseaktivität als scharfer Peak bei 150 – 250 mM KCl..

Stufe 5: Eine 5 ml HiTrap Heparin Säule wird mit Puffer A, pH 7.5 äquilibriert und mit den aktiven, entsalzten Cibacron Blau Fraktionen beladen. Die Elution erfolgt mit einem 50 ml linearen Gradienten von 0 – 500 mM KCl (Abbildung 52). Die RNA Ligaseaktivität eluiert bei 250 – 300 mM KCl (15 ml, 10 mg Protein). Die aktiven Heparin Fraktionen werden vereint und über Gelfiltration an Sephadex G25 auf Puffer A, pH 8.5 entsalzen.

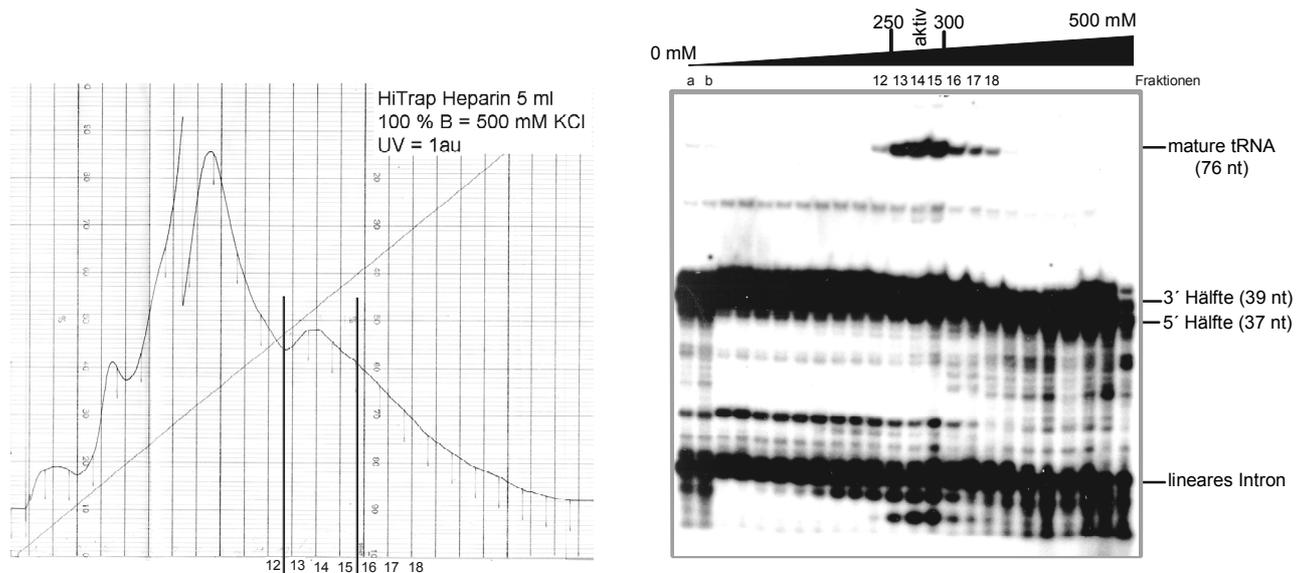


Abbildung 52. Elutionsprofil und Ligaseaktivitätsnachweis für die 5 ml HiTrap Heparin Sepharose Säule

Die vereinten Cibacron Blau Fraktionen (a) werden über Sephadex G25 entsalzen (b) und auf die 5 ml HiTrap Heparin-Säule geladen. Die Elution findet in einem 50 ml linearen Gradienten von 0 – 500 mM KCl statt. Das Elutionsprofil der Heparin-Säule und der Ligaseaktivitätsnachweis für ausgewählte Fraktionen ist wiedergegeben.

Stufe 6: Eine 1 ml Mono Q HR 5/5 Säule wird mit Puffer A, pH 8.5 äquilibriert und mit den aktiven, entsalzten Heparin-Fraktionen beladen. Die Elution erfolgt in einem 15 ml linearen Gradienten von 0 - 400 mM KCl. Die RNA Ligaseaktivität eluiert bei 250 – 300 mM KCl (2 ml, 1 mg). Die aktiven Fraktionen werden vereint und direkt für die anstehende Gelfiltration verwendet.

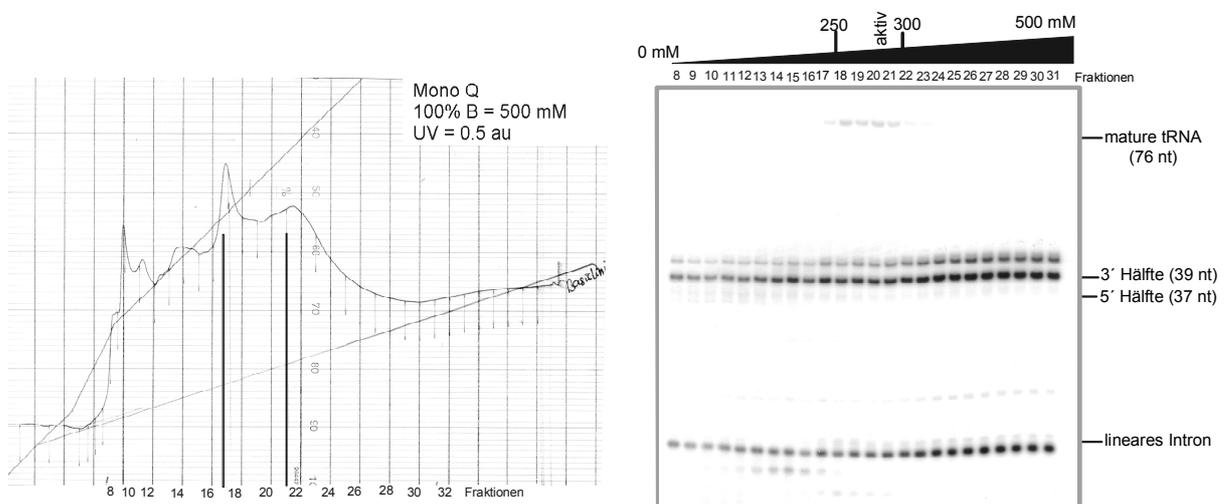


Abbildung 53. Elutionsprofil und Ligaseaktivitätsnachweis für die 1 ml Mono Q Säule.

Die vereinten Fraktionen der Heparin-Säule wurden über Sephadex G25 entsalzen und auf eine 1 ml Mono Q Säule beladen. Die Elution findet in einem 15 ml linearen Gradienten von 0 – 500 mM KCl statt.

Stufe 7: Die aktiven Mono Q Fraktionen werden direkt für eine Gelfiltration an einer 120 ml HiLoad Superdex 200 Säule verwendet. Die RNA Ligaseaktivität eluiert bei einem Volumen von 54 ml – 58 ml. Die Gelfiltrationssäule wurde mit den Markerproteinen β -Amylase (210 kDa, 54 ml), Alkoholdehydrogenase (150 kDa, 58 ml) und Rinderserumalbumin (68 kDa, 62 ml) kalibriert, so dass

mit der Gelfiltration ebenso das native Molekulargewicht auf ca. 150 – 180 kDa abgeschätzt werden kann.

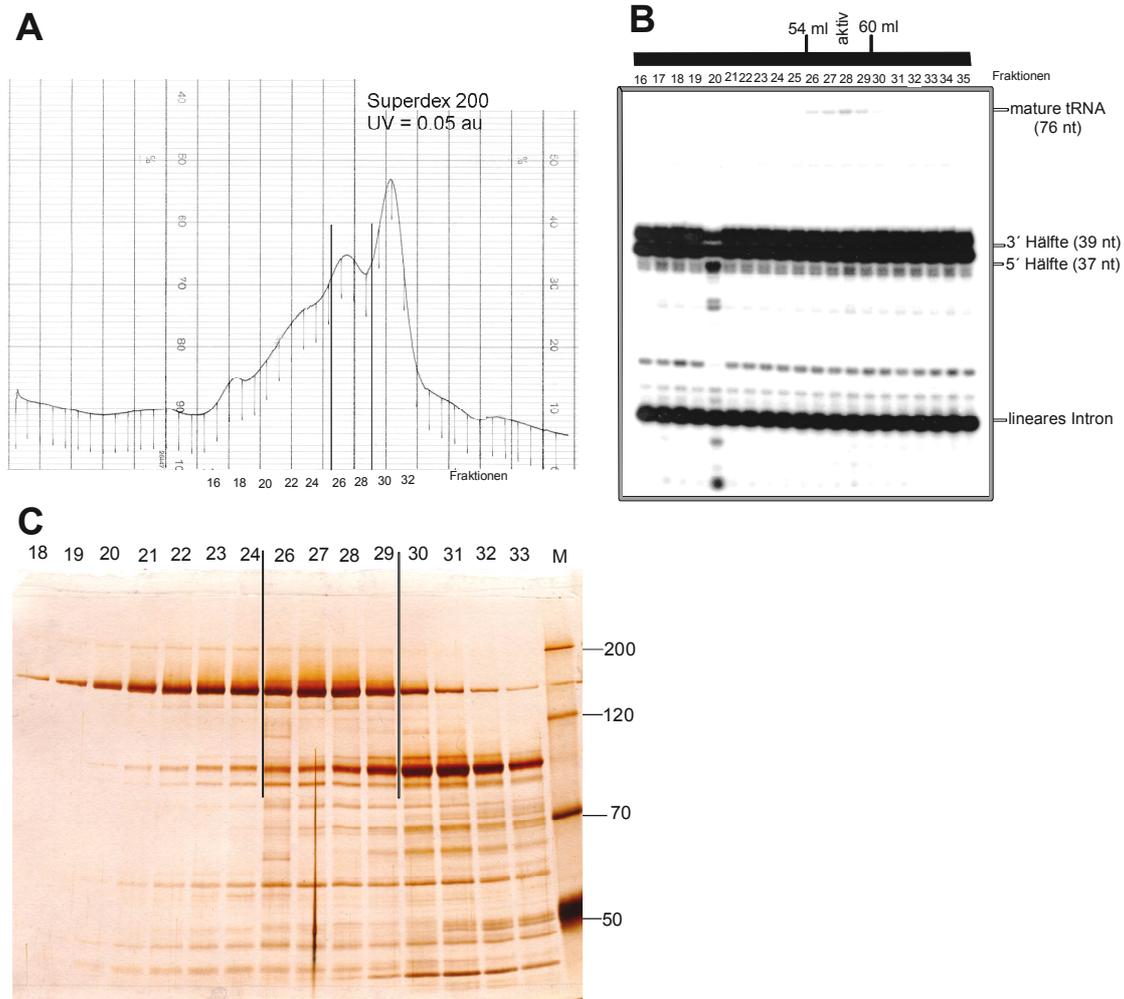


Abbildung 54. Elutionsprofil, Ligaseaktivitätsnachweis und silbergefärbtes Laemmli Proteingel mit den Gelfiltrationsfraktionen

- (A) Das Elutionsprofil der 120 ml Superdex 200 Säule ist wiedergegeben.
 (B) Von ausgewählten Fraktionen wurde der Ligaseaktivitätsnachweis durchgeführt.
 (C) Je 10 μ l der angegebenen Fraktion wurde in einem 7.5 % Polyacrylamid / 0.1 % SDS aufgetrennt. Die enthaltenen Proteine werden anschließend durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht.

Die Aufreinigung der tRNA Ligaseaktivität aus Schweineleber ermöglicht die Identifizierung eines 160 kDa Proteins als Kandidat für die animale tRNA Ligase. Zur Identifizierung des codierenden Gens wird eine Proteinsequenzierung durchgeführt. Zudem wird anhand der aktiven Fraktionen der Ligationsmechanismus untersucht. Das charakteristische Merkmal für die animale tRNA Ligase ist der Einbau des 2',3'-Cyclophosphats in die neu entstehende 3',5'-Phosphodiesterbindung.

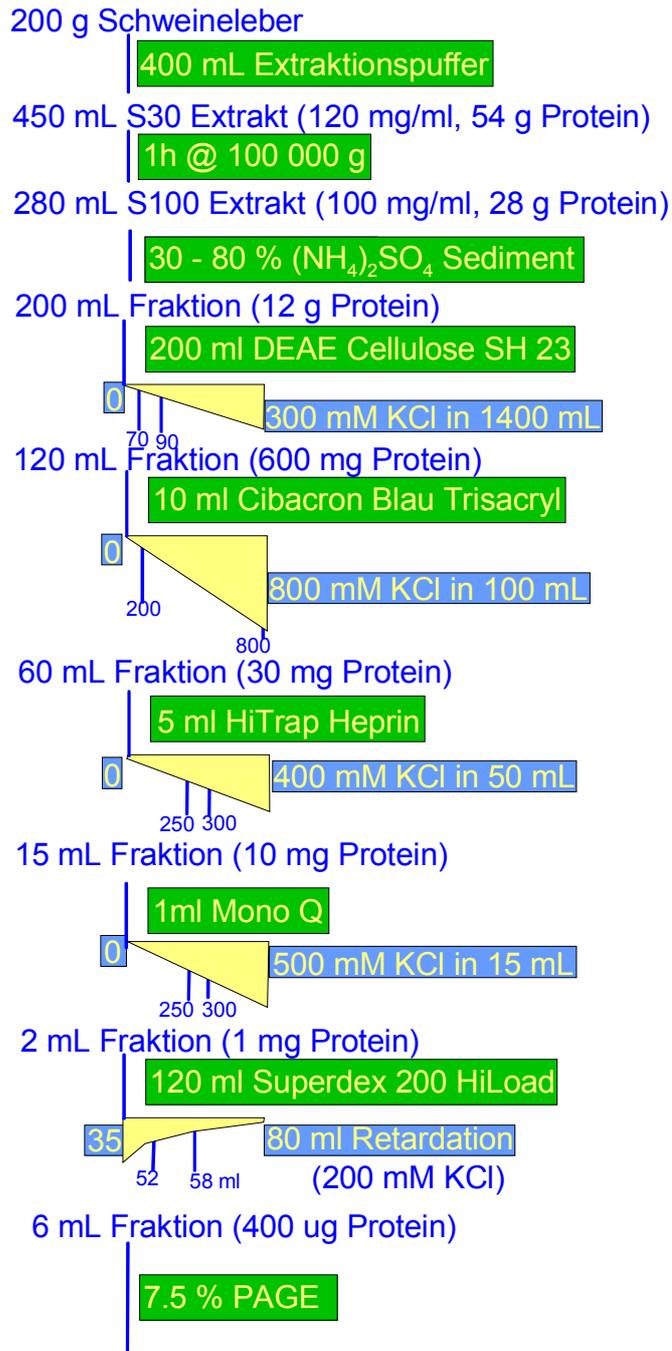


Abbildung 55. Aufreinigungsschema für die tRNA Ligase aus der Schweineleber

4.4.2. Massenspektrometrische Proteinsequenzierung der tRNA Ligase aus Schweineleber

Von den Gelfiltrationsfraktionen werden 40 μl mit 10 μl 5x Dissoziationpuffer durchmischt, 2 min bei 90 °C erhitzt und über ein 7.5 % Polyacrylamid / 0.1 % SDS aufgetrennt. Nach 8 min in der Coomassie-Färbelösung wird vollständig entfärbt, das Gelstück mit dem gewünschten Protein ausgeschnitten, 2x 5 min in 500 μl Acetonitril/ H_2O (1:1) äquilibriert und bei -20 °C gelagert.

Die Proteinsequenzanalyse wurde bei der "Harvard Microchemistry Facility" durchgeführt. Nach tryptischer Hydrolyse des Proteins im Gelstück wurden die Proteinfragmente eluiert, über eine Mikrokapillar "Reverse Phasen" HPLC aufgetrennt, die direkt über ein Nano Elektronenspray Ionisationsquelle (ESI) an eine Quadrupol Ionenfalle gekoppelt ist ($\mu\text{LC}/\text{MS}/\text{MS}$).

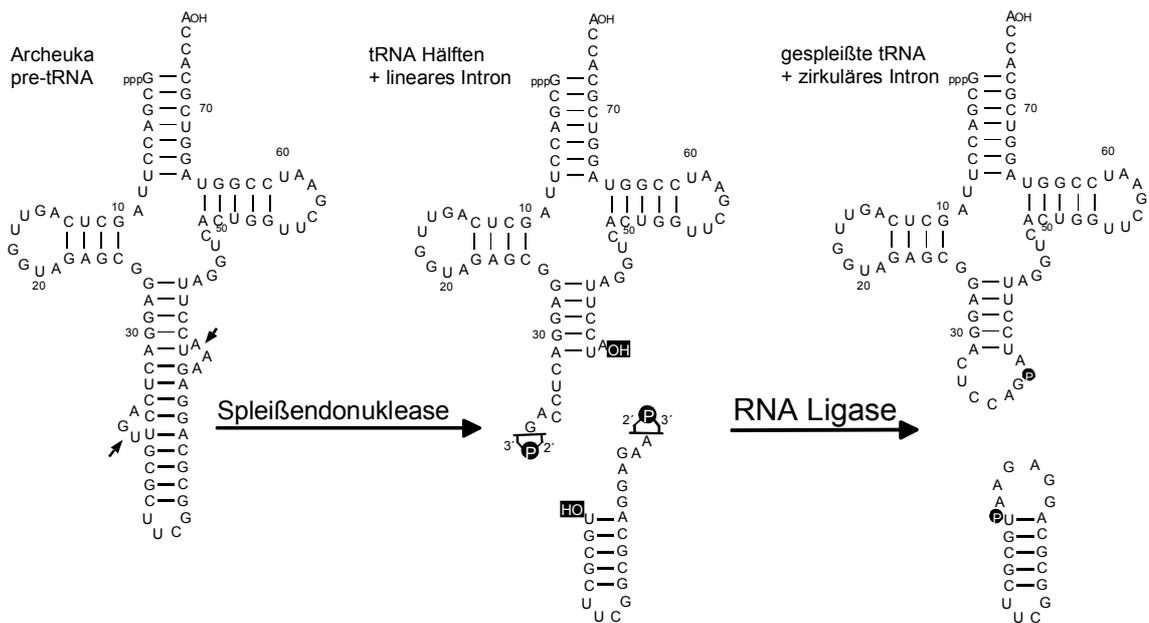
Von insgesamt 120 tryptischen Fragmenten wurde die Proteinsequenz ermittelt. Die Sequest Analyse ergibt eine eindeutige Zuordnung zu einem 160 kDa Protein, das in den Datenbanken als humane Carbamoylphosphatsynthetase annotiert ist.

4.4.3. Analyse der Ligationsprodukte

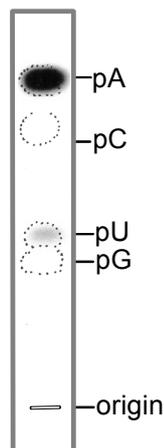
Archeuka tRNA-Hälften und das lineare Intron wurden in präparativen Ligationsansätzen mit den aktiven Fraktionen der Superdex 200 Gelfiltration umgesetzt. Die Reaktionsansätze trennt man in 12.5 % denaturierenden Polyacrylamidgelen auf. Die Gelstücke mit der gespleißten tRNA und mit dem zirkulären Intron wurden ausgeschnitten und die enthaltene RNA über Diffusionselution zurückgewonnen. Das zirkuläre Intron wurde direkt für eine RNase P1 Hydrolyse verwendet. Da das Transkript mit α -[³²P]ATP markiert wurde, ist das aus der Hydrolyse der Archeuka pre-tRNA gebildete Cyclophosphat des linearen Introns markiert. Nur wenn das Cyclophosphat in die neu entstandene 3',5'-Phosphodiesterbindung während der Ligationsreaktion eingebaut wurde, wird neben den p^{*}A Nucleosiden auch das p^{*}U Nucleosid gebildet. Die Analyse des RNase P1 Hydrolysats erfolgt durch Dünnschichtchromatographie in Celluloseplatten mit Laufmittel A (Abbildung 56B).

Die zurückgewonnene gespleißte tRNA wird zuerst mit RNase T1 spezifisch nach jedem Guanodinucleosid hydrolysiert. Die Reaktionsmischung wird in einem 20 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bei den Ligationsprodukten der animalen tRNA Ligase liegt jetzt kein RNase T1 resistentes 15mer Oligonukleotid vor, wie diese bei der Pflanzen und Hefe tRNA Ligase beobachtet wurde (siehe Abbildung 37). Stattdessen werden ein 8mer und ein 7mer Oligonukleotid gebildet, die aus dem 20 % denaturierenden Polyacrylamidgel ausgeschnitten, über Diffusionselution zurückgewonnen und für die Hydrolyse mit RNase T2 verwendet wurden. Die Archeuka pre-tRNA wurde durch den Einbau von α -[³²]UTP radioaktiv markiert. Somit wird bei der Hydrolyse der Archeuka pre-tRNA mit der *Methanocaldococcus* tRNA Spleißendonuklease eine 5'-tRNA Hälfte mit einem markierten Cyclophosphat gebildet. Nur wenn das Cyclophosphat in die neu entstehende 3',5'-Phosphodiesterbindung bei der Ligationsreaktion eingebaut wurde, wird auch ein markiertes Gp^{*} neben 2x Cp^{*} und 1x Up^{*} bei der RNase T2 Hydrolyse der beiden 7mer Oligonukleotide gebildet. Die Analyse erfolgt durch Dünnschichtchromatographie in Cellulose Platten mit Laufmittel A (Abbildung 56C).

A



B



C

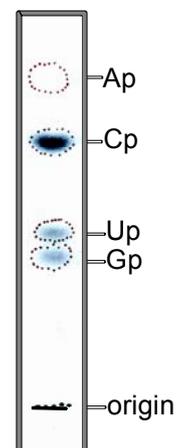


Abbildung 56. Analyse der Ligationsprodukte der animalen tRNA Ligase

- (A) Die Sekundärstruktur der Archeuka pre-tRNA, die tRNA Hälften mit dem linearen Intron und die gespleißte tRNA mit dem zirkulären Intron sind wiedergegeben.
- (B) Das bei einer präparativen Ligationsreaktion gebildete zirkuläre Intron wurde aus einem 12.5 % denaturierenden Polyacrylamidgel zurückgewonnen und für die Hydrolyse mit RNase P1 verwendet. Die Analyse der gebildeten Produkte erfolgt durch Dünnschichtchromatographie in Cellulose Platten mit Laufmittel A. Bei der verwendeten Markierung des Transkriptes mit α - ^{32}P JATP wird nur dann ein p $\dot{\text{U}}$ gebildet, wenn das Cyclophosphat in die neue 3',5'-Phosphodiesterbindung eingebaut wird.
- (C) Die bei einer präparativen Ligationsreaktion gebildete gespleißte tRNA wurde aus einem 12.5 % denaturierenden Polyacrylamidgel zurückgewonnen und für die Hydrolyse mit RNase T1 verwendet. Dabei werden unter anderem zwei 7mer Oligonukleotide gebildet, die aus einem 20 % denaturierenden Polyacrylamidgel zurückgewonnen wurden und für die Hydrolyse mit RNase T2 verwendet wurden. Die Analyse der gebildeten Produkte erfolgt durch Dünnschichtchromatographie in Cellulose Platten mit Laufmittel A. Bei der verwendeten Markierung des Transkriptes mit α - ^{32}P UTP wird nur dann ein Gp $\dot{\ast}$ gebildet, wenn das Cyclophosphat in die neue 3',5'-Phosphodiesterbindung eingebaut wurde.

5. Diskussion

tRNA Spleißen

Mit der Entdeckung von Intronsequenzen in Kern-codierten tRNA Genen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* begann die Erforschung des tRNA Spleißmechanismus (Goodman *et al.*, 1977). Die Exzision des tRNA Introns und die Ligation der tRNA Hälften verlaufen grundsätzlich verschieden vom mRNA Spleißen ab. Mit der Hefe *ma1-1* Mutante war es möglich, intronhaltige pre-tRNAs der Hefe *in vivo* anzureichern und für *in vitro* Spleißexperimente zu verwenden. Später wurde die Transkription von pre-tRNAs mit der T7 RNA Polymerase für *in vitro* Spleißexperimente etabliert (Abelson, 1987).

Intronhaltige pre-tRNAs konnten zuerst in der Hefe aufgezeigt werden, folglich ist der tRNA Spleißmechanismus in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* am besten untersucht und besteht aus mindestens 3 Schritten. Eine tetramere tRNA Spleißendonuklease hydrolysiert die pre-tRNA zu tRNA-Hälften mit einem 2',3'-Cyclophosphat an der 5'-Hälfte und mit einer 5'-Hydroxylgruppe an der 3'-Hälfte. Eine tRNA Ligase verknüpft die beiden tRNA-Hälften in einer ATP-abhängigen Reaktionsfolge. Das Cyclophosphat wird zu einem 2'-Phosphat durch die cyclische Phosphodiesteraseaktivität hydrolysiert, die 5'-Hydroxylgruppe wird durch die Polynukleotidkinaseaktivität bevorzugt von GTP phosphoryliert. Die Hefe tRNA Ligase reagiert mit ATP unter kovalenter Bindung von AMP an das Lysin₁₁₄ des Lig I-Motivs und überträgt AMP an die 5' phosphorylierte Stelle der 3' Hälfte unter Ausbildung einer 5'-5'-Phosphoanhydridbindung. Anschließend ermöglicht die Ligase den nukleophilen Angriff der 3'-Hydroxylgruppe an den aktivierten 5'-Terminus unter Ausbildung einer 2'-Phosphomonoester-3',5'-Phosphodiesterbindung an der Spleißstelle. Die gespleißte tRNA ist noch nicht funktionell und besitzt deutlich weniger Basenmodifizierung als die mature tRNA, die über Übertragung des 2'-Phosphats auf NAD⁺ durch eine 2'-Phosphotransferase gebildet wird (Abelson *et al.*, 1998).

Das Hefe tRNA Ligaseprotein konnte über fünf chromatographische Stufen bis zur nahen Homogenität aufgereinigt werden. Das aminoternale Ende wurde ansequenziert, und die erhaltenen Sequenzdaten wurden für die Wahl von Deoxyoligonukleotid-Sonden verwendet, die für Hybridisierungsexperimente mit einer genomischen DNA Genbibliothek von *Saccharomyces cerevisiae* verwendet wurden (Phizicky *et al.*, 1986). Es gelang die Identifizierung eines 4 kb großen DNA-Fragments, das das Gen für die tRNA Ligase codiert. Dieses Fragment wurde sequenziert, und das offene Leseraster für die Hefe tRNA Ligase konnte aufgezeigt werden (Westaway *et al.*, 1988). Die Hefe tRNA Ligase besitzt eine domänenartige Struktur, wobei die Adenylyltransferaseaktivität im aminoterminalen Bereich, die Polynukleotidkinaseaktivität in der Mitte und die cyclische Phosphodiesteraseaktivität am carboxterminalen Ende anzutreffen ist (Xu *et al.*, 1990; Apostol *et al.*, 1991; Sawaya *et al.*, 2003).

Chromatographische Anreicherung und Charakterisierung der tRNA Endonuklease Aktivität aus Weizenkeimen

Weizenkeime eignen sich als Ausgangsmaterial für die chromatographische Aufreinigung pflanzlicher RNA prozessierender Enzyme, da sie (I) in großer Menge unter gleich bleibender Qualität zugänglich und (II) relativ arm an Proteasen und Nukleasen sind. Zudem ist die Substratspezifität der pflanzlichen

Spleißendonuklease bereits ausgiebig in Weizenkeimextrakten untersucht worden (Stange und Beier, 1987; Stange *et al.*, 1992). Bisherige Untersuchungen der pflanzlichen tRNA Spleißreaktion erfolgte mit intronhaltigen pre-tRNAs, die durch Transkription im HeLa Kernextrakt als intronhaltige Vorläufer tRNAs gewonnen wurden. Für eine chromatographische Anreicherung der tRNA Spleißendonuklease-Aktivität werden jedoch große Mengen an intronhaltiger pre-tRNA benötigt. Daher wurde zuerst die tRNA Spleißreaktion mit intronhaltigen pre-tRNAs, die durch Transkription mittels der T7 RNA Polymerase gebildet wurden, etabliert (Abbildung 10). Im Rahmen dieser Arbeit konnte ausgehend von einem Weizenkeim S30 Extrakt die tRNA Spleißendonukleaseaktivität gänzlich von Nukleasen befreit werden, so dass eine Unterscheidung zwischen autolytischer und enzymatischer Hydrolyse der intronhaltigen pre-tRNA möglich ist (van Tol *et al.*, 1989; Abbildung 18). Die Weizen tRNA Spleißendonuklease liegt hier aggregiert vor und verhält sich wie ein nicht solubilisiertes Membranprotein.

Wird die Weizen Spleißendonuklease durch Zugabe von Triton X100 solubilisiert, ist eine chromatographische Anreicherung der Aktivität über Phosphocellulose, Heparin-Sepharose und Cibacron Blau Trisacryl um den Faktor 1000 möglich (Abbildung 23). Weitergehende Untersuchungen der Verteilung der Endonuklease-Aktivität wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Bereits bei der Aufreinigung der Hefe tRNA Endonuklease auf klassische Weise konnte nicht genügend Protein für eine Sequenzierung gewonnen werden (Rauhut *et al.*, 1990). Erst mit einer abgewandelten Form der Tandem-Affinitätschromatographie ist ein robustes und reproduzierbares Aufreinigungsverfahren etabliert worden, das die Identifizierung aller vier Hefe tRNA Endonuklease Untereinheiten ermöglichte (Trotta *et al.*, 1997). In analoger Weise konnte der menschliche tRNA Spleißendonukleasekomplex über Tandem-Affinitätschromatographie aufgereinigt und charakterisiert werden (Paushkin *et al.*, 2004). Die Tandem-Affinitätschromatographie ist für die Charakterisierung von Proteinkomplexen aus der Hefe ausgearbeitet worden (Rigaut *et al.*, 1999) und konnte erfolgreich für die animalen Zelllinien übernommen werden (Knuesel *et al.*, 2004; Drakas *et al.*, 2005). Für pflanzliche Proteinkomplexe konnte die Methode der Tandem-Affinitätschromatographie kürzlich ebenfalls erfolgreich angewendet werden (Rohila *et al.*, 2004; Rubio *et al.*, 2005).

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung von Proteinkomplexen besteht in der Immunopräzipitation mit polyklonalen Antikörpern, die durch Immunisierung mit einer bekannten Untereinheit gewonnen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Spezifität der anti-AtSen1 und anti-AtSen2 Antikörper gegen die rekombinanten AtSen1 und AtSen2, sowie gegen *Arabidopsis* und *Triticum* Extrakte untersucht. Die Antikörperseren sind hochaktiv gegen die rekombinanten *Arabidopsis* Proteine und erkennen ein 40 kDa Protein jeweils in den Extrakten von *Arabidopsis* und *Triticum* spezifisch (Abbildung 24). Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit die Grundlage für eine Immunopräzipitation gelegt werden.

Etablierung der Hydrolyse der Archeuka pre-tRNA mit der rekombinanten Methanocaldococcus tRNA Spleißendonuklease

In der Arbeitsgruppe von Prof. Abelson wurde die tRNA Ligaseaktivität durch die Verknüpfung von tRNA Hälften nachgewiesen. Die hierfür benötigten tRNA Hälften wurden durch die Hydrolyse von

pre-tRNA mit stark angereicherten tRNA Spleißendonukleasen erzeugt (Greer *et al.*, 1983; Phizicky *et al.* 1986).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls angereicherte tRNA Spleißendonukleasefraktionen zur Erzeugung von tRNA Hälften verwendet, jedoch erwies sich die Prozedur als aufwendig und ist im präparativen Maßstab nur schwer durchzuführen. Da zudem mit den rekombinanten Proteinen AtSen1 und AtSen2 kein aktiver tRNA Spleißendonukleasekomplex gebildet werden konnte, wurde nach einer Alternative gesucht. Seit der Identifizierung der tRNA Spleißendonuklease aus *Haloferax volcanii* (Kleman-Leyer *et al.*, 1997) und aus *Methanocaldococcus jannaschii* (Lykke-Andersen, 1997) als Homo-Dimer bzw. Homo-Tetramer kann mit der rekombinanten Expression der einen Untereinheit ein aktiver Archaea Spleißkomplex gebildet werden, der RNA Substrate mit dem "Schleifen-Helix-Schleifen" ("bulge-helix-bulge") Motif hydrolysiert. Die gebildeten RNA Produkte weisen dabei ein 2',3'-Cyclophosphat und eine 5'-Hydroxylgruppe auf.

In der praktischen Durchführung wurde eine intronhaltige Archeuka pre-tRNA auf der Basis der *Nicotiana* pre-tRNA^{Tyr} (N9-T7 M1) konzipiert, die in hoher Ausbeute mittels T7 RNA Polymerase synthetisiert werden kann (Abbildung 11). Die rekombinante *Methanocaldococcus* tRNA Spleißendonuklease wurde sehr effizient im Weizenkeim RTS 100 CECF System überexprimiert und an Ni-NTA-Agarose aufgereinigt (Abbildung 14). Die Hydrolyse der Archeuka pre-tRNA mit der rekombinanten *Methanocaldococcus* Spleißendonuklease verläuft quantitativ zu Archeuka tRNA Hälften und zu einem linearen Intron (Abbildung 15). Diese gebildeten RNA Produkte werden über Phenolisierung und Ethanolpräzipitation aufgereinigt und können für den RNA Ligaseaktivitätsnachweis verwendet werden. Da eine genügend hohe Menge an Substrat vorhanden ist, konnten quantitative Aussagen zur RNA Ligaseaktivität getroffen werden. Für die Aufreinigung der Weizen tRNA Ligase konnte so die Cibacron Blau, die Source S15 und die Superdex 200 Säule sehr viel aussagekräftiger charakterisiert werden.

Chromatographische Aufreinigung der Weizen tRNA Ligase

Eine RNA Ligaseaktivität konnte in einem Translationsweizenkeimextrakt von M. Konarska (1981) nachgewiesen werden. Für den RNA Ligaseaktivitätsnachweis wurde ein artifizielles Substrat verwendet, das nach RNase T1 Hydrolyse von TMV RNA gebildet wird. Dieses sog. Ω -Fragment weist eine 5'-Hydroxylgruppe und ein 2',3'-Cyclophosphat auf und wird bei der Inkubation mit dem Translationsweizenkeimextrakt zirkularisiert. Durch das unterschiedliche Laufverhalten des linearen und des zirkularisierten Ω -Fragments in einem Polyacrylamidgel kann die RNA-Ligaseaktivität nachgewiesen werden.

Kurze Zeit nach der Entdeckung wurden die ersten Anreicherungen der Weizen RNA Ligaseaktivität durchgeführt. Für den RNA Ligasenachweis wurden zuerst artifizielle Substrate mit einem 5'-Phosphat und einem 2',3'-Cyclophosphat verwendet (Furneau *et al.*, 1983). Letztlich konnte die Weizen RNA Ligaseaktivität 6000-fach angereichert werden und die RNA Ligaseaktivität korrelierte bei der Sedimentation im Glycerolgradienten mit einem Proteinduplett von 110 kDa (Pick und Hurwitz, 1986). Eine Proteinsequenzierung erfolgte nicht. Im Rahmen dieser Arbeit ist ein Aufreinigungsschema für die Weizen tRNA Ligase entwickelt worden, das sich deutlich von den bisher veröffentlichten Aufreinigungsstrategien unterscheidet (Furneau *et al.*, 1983; Gegenheimer *et al.*, 1983; Pick und

Hurwitz, 1986; Pick *et al.*, 1990). Die Weizen tRNA Ligase zeigt selbst bei 200 mM KCl im Chromatographiepuffer eine spezifische Bindung an Heparin-Sepharose. Da unter diesen Bedingungen 95 % der anderen Proteine nicht an Heparin binden, können sehr große Mengen an Protein (bis zu 20 g) mit einer vorhandenen 40 ml Heparin-Sepharose Säule verarbeitet werden.

Der Cibacron Blau Farbstoff ähnelt in der Struktur NAD^+ und wird als gruppenspezifisches Affinitätsmedium für die Aufreinigung von Enzymen, die ATP oder NAD^+ als Cofaktoren benötigen verwendet. Pick und Hurwitz (1986) verwendeten ebenfalls ATP-Agarose für die Aufreinigung der Weizen tRNA Ligase. Jedoch war die Bindung an ATP-Agarose nur sehr schwach ausgeprägt, so dass nur sehr wenig Salz im Chromatographiepuffer für die Bindung an ATP-Agarose vorhanden sein durfte. Zudem ist ATP-Agarose relativ teuer und hydrolyseempfindlich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Aufreinigung der Weizen RNA Ligase an Cibacron Blau Trisacryl etabliert werden. Die Bindung erfolgt bei 150 mM KCl und die Elution bei 300 mM KCl (Abbildung 26). Daher befindet sich die Weizen tRNA Ligase stets in einem Milieu mit genügend Salz. Über 90 % der Weizen tRNA Ligase liegt in der adenylierten Form vor und eluiert daher unter relativ moderaten Salzbedingungen von der Cibacron Blau Säule. Lediglich 10 % der Weizen tRNA Ligase liegt deadenyliert vor und eluiert erst bei deutlich höheren Salzbedingungen. Mit der Etablierung des RNA Ligaseaktivitätsnachweis mit Archeuka tRNA Hälften konnten quantitative Aussagen über die Verteilung der RNA Ligaseaktivität der Cibacron Blau Elutionsfraktionen getroffen werden. Vereint man die Fraktionen mit der Haupt-tRNA Ligaseaktivität, kann ein Aufreinigungsfaktor von 15 mit der Cibacron Blau Säule erreicht werden.

Mit der Source S15 Säule wird zum ersten Mal ein klassischer Kationenaustauscher für die Aufreinigung der Weizen tRNA Ligase verwendet. Pick und Hurwitz (1986) verwendeten die Phosphocellulose zur Aufreinigung und wiesen darauf hin, dass eine ähnliche Aufreinigung mit einer Mono S Säule (Amersham, Freiburg) erzielt werden kann (Pick *et al.*, 1990). Das Source S15 Material weist ähnliche Eigenschaften wie eine Mono S Säule auf. Aufgrund der hohen Flussrate bei den Mono S und Source S15 Säulen und der automatisierten Durchführung in Verbindung mit einer FPLC Anlage ist diesen Säulenmaterialien der deutliche Vorzug insbesondere bei der Intermediär- und Endreinigung zu geben. Im Rahmen dieser Arbeit ist es zudem möglich gewesen, die beiden adenylierbaren Proteine von 125 und 110 kDa über die Source S15 Säule zu trennen (Abbildung 38). Anstelle der Sedimentation im Glycerolgradienten (Pick und Hurwitz, 1986) wurde in dieser Arbeit die Gelfiltration mit Superdex 200 in einer XK16/60 Säule durchgeführt. Die Hauptaufreinigung bestand in der Entfernung von Proteinaggregaten, die mit dem Totvolumen der Säule im Nachschmier eluierten. Die aktiven tRNA Ligasefraktionen weisen eine Reinheit von ca. 40 % auf (Abbildung 27 und 39). In Verbindung mit dem Adenylyltransferasenachweis kann bereits auf dieser Stufe das tRNA Ligaseprotein identifiziert, und eine erfolgreiche massenspektrometrische Proteinsequenzierung von tryptischen Fragmenten durchgeführt werden.

Die Weizen tRNA Ligase kann zwar noch weiter über die tRNA Sepharose Säule aufgereinigt werden, jedoch darf die Salzkonzentration im Bindepuffer nur maximal 50 mM KCl betragen. Während der Chromatographie geht über 75 % der Ligaseaktivität verloren, so dass der Aufreinigungsfaktor kaum in Relation zur gewonnenen Aufreinigung zu sehen ist. Für die Identifizierung der 110 kDa tRNA Ligase wurde daher auf die tRNA Sepharose Säule verzichtet.

Mit der Etablierung des Adenylyltransferase-Nachweises wurde untersucht, ob sich das [³²P]AMP markierte Ligaseprotein in einer komplexen Proteinmischung über eine zweidimensionale Elektrophorese separieren und durch Autoradiographie identifizieren ließ. Die erste Dimension der Auftrennung erfolgt in einer isoelektrischen Fokussierung, bei der sehr hohe Spannungswerte angelegt werden. Folglich darf nur sehr wenig Salz in der Probe vorhanden sein. Aufgrund der hohen Labilität der Weizen tRNA Ligase in Niedrigsalzpuffern geht bereits bei der isoelektrischen Fokussierung das gesamte Ligaseprotein verloren und kann selbst mit dem sehr empfindlichen Adenylyltransferase-Nachweis nicht mehr detektiert werden. Daher wurde auf eine weitere Optimierung der isoelektrischen Fokussierung verzichtet und die chromatographische Aufreinigung der Weizen tRNA Ligase weiter optimiert. An dieser Stelle kann angemerkt werden, dass die zweidimensionale Elektrophorese nur für niedermolekulare Proteine angewendet werden kann.

Proteinsequenzierungsmethoden

Heutzutage sind eine Vielzahl von Möglichkeiten gegeben, von einem Protein eine partielle Sequenz zu erhalten, die für die Identifizierung in öffentlich zugänglichen Datenbanken verwendet werden kann. Die klassische Edman-Sequenzierung ist auch heute noch möglich, jedoch werden ca. 10 pmol Protein geblottet auf einer PVDF-Membran benötigt. Insbesondere bei Proteinen oberhalb 100 kDa wird die Methode unsauber, da sich bei jedem Sequenzierschritt unspezifisch Peptidfragmente von der Membran lösen. Für eine Bromcyan Spaltung und die anschließende Edman Sequenzierung werden ca. 50 pmol sauberes Protein benötigt. Diese Mengen standen im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

Neben der klassischen Edman-Sequenzierung wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl von massenspektrometrischen Sequenziermethoden etabliert. Allen Methoden gemeinsam ist die tryptische Hydrolyse des im ausgeschnittenen Gelstück enthaltenen Proteins. Ein einfacher tryptischer Fingerabdruck kann zwar ein neues Protein identifizieren, wenn es in einer Proteindatenbank vorhanden ist. Jedoch ist die hierfür erforderliche Reinheit des Proteins nur bei vorheriger Auftrennung in einem zweidimensionalen Proteingel gegeben. Zudem sind eine Vielzahl von Proteinen in den Datenbanken noch nicht richtig annotiert, so dass die Massen der tryptischen Fragmente nicht für eine Identifizierung ausreichen. Es verbleibt die Möglichkeit, ein tryptisches Fragment über Sekundärfragmentation näher zu charakterisieren. Der Vorteil hierbei ist, dass die tryptischen Fragmente hauptsächlich an der Peptidbindung fragmentieren. Über den Massenunterschied der Sekundärfragmente kann die jeweilige Aminosäure bestimmt werden. Möchte man möglichst viele tryptische Fragmente sequenzieren, ist es günstig, vor der massenspektrometrischen Sequenzierung eine "Reverse Phasen" Auftrennung der tryptischen Peptide durchzuführen. In den letzten Jahren wurde die Mikrokapillar "Reverse Phasen" Nano HPLC Auftrennung etabliert. Hier werden µg Mengen an tryptischen Fragmenten an eine „Reverse Phasen“ Säule mit einem Volumen von 1 µl gebunden und mit einer Flussrate in der Größe von nl/min über einen linearen Gradienten von ein bis zwei Stunden eluiert. Die Nano HPLC wird direkt mittels eines nano "Elektronenspray Ionisation" (ESI) an eine Quadrupol Ionenfalle, welche die tryptischen Fragmente sekundär weiter fragmentiert, gekoppelt. Mit einer solchen Apparatur lassen sich mehr als 100 tryptische Fragmente innerhalb ein bis zwei Stunden sequenzieren. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgt über die Sequest Analyse. Die

Sequenzierung der beiden Weizen tRNA Ligaseproteine und des animalen tRNA Ligaseproteins erfolgte nach dieser zuletzt beschriebenen Methode.

Identifizierung der codierenden tRNA Ligase-gene in Datenbanken anhand der ermittelten Proteinsequenzabschnitte

Für die Aufreinigung der pflanzlichen tRNA Ligase wurden Weizenkeime verwendet. Da das Weizengenom nicht sequenziert ist, kann eine Identifizierung der tryptischen Fragmente nur über die EST Sequenzen vom Weizen erfolgen. Im Rahmen der Proteinsequenzierung unter der Leitung von Dr. William Lane (Harvard University) konnten 7 pflanzliche ESTs identifiziert werden, die eine hohe Homologie zu dem *Arabidopsis* Protein At1g07910 aufweisen. Das At1g07910 Protein wurde bisher als Translationselongations-Faktor annotiert (Axelos *et al.*, 1989). Jedoch weist das Protein keinerlei Ähnlichkeit mit bekannten Translationselongationsfaktoren auf. Anhand der Klonierung und rekombinanten Expression für den RNA Ligaseaktivitätsnachweis wurde das At1g07910 Gen eindeutig als tRNA Ligase identifiziert werden (Abbildung 36).

Das für At1g07910 codierende offene Leseraster wurde hierfür mittels PCR aus einer cDNA Genbank von *Arabidopsis thaliana* amplifiziert. Nach einer Reamplifikation unter Einfügung von geeigneten Restriktionsschnittstellen wurde die codierende Sequenz in den Proteinüberexpressionsvektor pVEX WG 1.4 kloniert. Der codierende Bereich wurde sequenziert, wobei sich herausgestellt hat, dass die vorhergesagten Exongrenzen für das 4. und 6. Exon nicht mit der experimentell ermittelten Sequenz übereinstimmen (Abbildung 33). Jedoch ist die Vorhersage der richtigen Intron-Exon-Grenzen nur im eingeschränkten Maß möglich und richtet sich immer nach den von ESTs bzw. cDNA-Sequenzen ermittelten Daten. Zudem ist eine *Oryza* Vollängen cDNA vorhanden und das Alignment von experimentell ermittelter *Arabidopsis*, jedoch nicht der vorhergesagten *Arabidopsis* Proteinsequenz liefert eine hohe Ähnlichkeit mit der *Oryza* Proteinsequenz in diesem Bereich (Abbildung 34).

Die *Arabidopsis* tRNA Ligase besitzt wie die Hefe tRNA Ligase alle drei enzymatischen Aktivitäten auf einer Polypeptidkette. Im aminoterminalen Bereich ist die Adenylyltransferase/RNA Ligase-Domäne anzutreffen. Die konservierten Sequenzmotive, die typisch für DNA-, RNA-Ligasen und mRNA Capping-Enzyme sind, können ebenfalls für die *Arabidopsis* tRNA Ligase aufgezeigt werden (Shuman und Schwer, 1995): Das Motiv **KFEN** ist bei allen bekannten tRNA Ligasen konserviert (Sawaya *et al.*, 2003) und wird daher in dieser Arbeit als „Lig“-Motiv bezeichnet. Das Lig I Motiv „**KHSG**“ enthält den Lysinrest, an deren Seitenkette kovalent AMP gebunden wird. Das Lig III Motiv „**FAA^F/V^F**“ und das Lig IV Motiv „**EGLVA**“ gehen Wechselwirkungen mit dem zu bindenden AMP ein. Dabei ist eine π - π -Stapel Wechselwirkung zwischen dem Phenylalanin aus dem Lig III Motiv mit dem Purin des AMP, sowie die koordinative Bindung des α -Phosphats von ATP durch das Aspartat aus dem Lig IV Motiv von Bedeutung.

Im zentralen Bereich befindet sich die P-Schleifen Sequenz „**GIPG^S/GAKS**“, die charakteristisch für Polynukleotidkinasen ist (Wang und Shuman, 2002; Jilani *et al.*, 1999). Im carboxyterminalen Bereich können die aktiven Zentren „**HVTL**“ und „**H^V/A^TTL**“ aufgezeigt werden, die charakteristisch für die 2H cyclischen Phosphodiesterasen sind (Nasr und Filipowicz, 2000). Dabei nehmen die beiden Histidine die Rolle als Protonendonator und als Protonenakzeptor in der Säure-Basen-katalysierten Hydrolyse der

Phosphodiesterbindung ein. Die beiden Threonine koordinieren mit den Sauerstoffatomen des Phosphats und ziehen Elektronendichte weg, so dass das Nukleophil H₂O leichter angreifen kann. Obwohl die Hefe und die pflanzliche tRNA Ligase über die gleichen enzymatischen Aktivitäten mit ähnlichen aktiven Zentren verfügen, kann über den Blossum 62 bzw. Clustal W Algorithmus keine signifikante Ähnlichkeit aufgezeigt werden. Dies ist um so bemerkenswerter, da die jeweiligen Hefe tRNA Ligasen untereinander und die jeweiligen pflanzlichen tRNA Ligasen untereinander eine sehr hohe Homologie aufweisen.

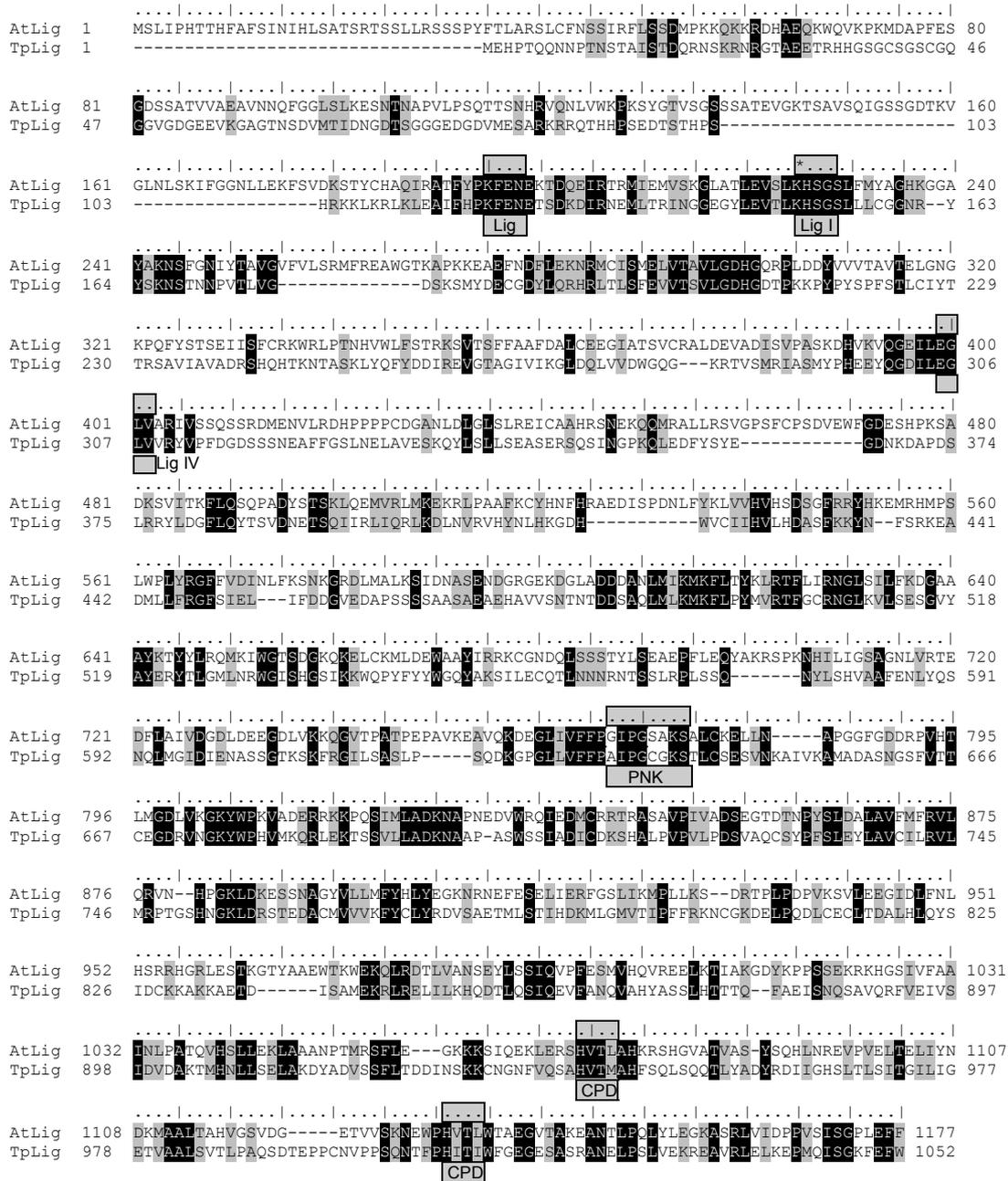


Abbildung 57. Alignment der tRNA Ligasen aus *Arabidopsis thaliana* und *Thalassiosira pseudonana*

Mit der Proteinsequenz der *Arabidopsis* tRNA Ligase kann über eine Blastsuche ein *Thalassiosira* Protein mit einem Erwartungswert kleiner e^{-90} identifiziert werden. Das Alignment beider tRNA Ligaseproteine zeigt eine mittlere Homologie und Ähnlichkeit der beiden Proteine. Jedoch können in beiden Proteinen die für pflanzliche tRNA Ligasen charakteristischen Sequenzmotive aufgezeigt werden.

Interessanterweise besitzt das *Oryza* tRNA Ligasegen 27 Exons, das vorhergesagte *Arabidopsis* tRNA Ligasegen jedoch nur 26 Exons. Daher wurde nach codierenden Sequenzen oberhalb des vorhergesagten Initiationsmethionin mittels PCR gesucht. In der Tat verfügt das *Arabidopsis* tRNA Ligasegen wie auch das *Oryza* Gen über 27 Exons. Bei dem ersten Exon handelt es sich vermutlich um ein zusätzliches Exon, das für eine Signalsequenz zu den Chloroplasten codiert (Abbildung 46). Das vollständige *Arabidopsis* tRNA Ligasegen AtLig_{long} wurde ausgehend von AtLig_{short} mittels Oligodeoxynukleotid-gerichteter Mutagenese und PCR Amplifizierung des ersten Exons konstruiert und für Lokalisierungsstudien verwendet.

Ein tRNA Ligase-Gen für zwei unterschiedliche Proteine

Bereits Pick und Hurwitz (1986) konnten über den Adenylyltransferasenachweis zwei Proteine im silbergefärbten Gel nachweisen und vermuteten aufgrund eines ähnlichen Proteinfragmentmusters bei der Proteolyse mit der Carboxypeptidase Y, dass beide Proteine nahezu identisch sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht nur das 125 kDa, sondern auch das 110 kDa Weizen tRNA Ligaseprotein aufgereinigt (Abbildung 40) und massenspektrometrisch sequenziert werden. Dabei wurden die gleichen pflanzlichen ESTs identifiziert (Abbildung 43), so dass davon auszugehen ist, dass die beiden Proteine von dem gleichen Gen exprimiert werden.

Sowohl die *Arabidopsis* wie auch die *Oryza* tRNA Ligase verfügen über drei Methionine im gleichen Leseraster, wobei das erste Methionin in einem sehr schlechten Kontext (Joshi *et al.*, 1997) vorliegt und von dem Ribosom teilweise überlesen werden kann, so dass eine Initiation der Translation ebenfalls am zweiten bzw. dritten Methionin möglich wäre.

Mittlerweile gibt es eine Reihe von Beispielen, dass ausgehend von einem Gen, mehrere funktionelle Proteine in verschiedene Kompartimente der Zelle transportiert werden (zusammengefasst in Small *et al.*, 1998 und Silva-Filho, 2003). So wird die *Arabidopsis* DNA Ligase von einem Gen codiert. Im aminoterminalen Bereich befinden sich 3 Initiationsmethionine. Das Ribosom bindet an die 5'-Cap Struktur der mRNA und sucht die mRNA stromabwärts solange ab bis das erste Methionin aufgefunden werden kann. Dabei ist der Kontext des Methionins entscheidend, wie gut eine Initiation der Translation erfolgen kann. Zudem gibt es insbesondere bei einem schlechten Kontext des Initiationsmethionins die Möglichkeit, dass das erste Methionin überlesen wird und weiter stromabwärts nach einem neuen Initiationsmethionin gesucht wird. Für den Fall der *Arabidopsis* DNA Ligase kann die Initiation der Translation an allen drei Initiationsmethionine erfolgen. Erfolgt die Translation am ersten Methionin, wird zusätzlich zum funktionellen Protein eine Zielsequenz für die Chloroplasten exprimiert. Wird die Translation vom zweiten Methionin gestartet, so wird eine Zielsequenz für die Mitochondrien exprimiert. Erfolgt letztlich die Initiation am dritten Methionin, so ist keine aminoterminal Zielsequenz vorgegeben und das codierte Kernlokalisierungssignal kann für den Import in den Zellkern verwendet werden (Sunderland *et al.*, 2004).

Lokalisierung der pflanzlichen tRNA Ligase in den Chloroplasten

Die 125 kDa Proteine der *Arabidopsis* und der *Oryza* tRNA Ligase beinhalten im aminoterminalen Bereich eine Anhäufung von Serin und Leucin Aminosäuren, so dass vermutet werden kann, dass eine Signalsequenz vorhanden ist. Daher wurde mit dem SingalIP3.0 Programm der aminoterminalen

Bereich nach einer Signalsequenz untersucht (Bendtsen *et al.*, 2004). In der Tat wird für die *Arabidopsis* und die *Oryza* tRNA Ligase eine Lokalisierung in den Chloroplasten vorhergesagt.

Die tatsächliche Lokalisierung der *Arabidopsis* und der *Oryza* tRNA Ligase kann gut als Fusionsproteine mit dem grün fluoreszierenden Protein untersucht werden. Die *Arabidopsis* und *Oryza* tRNA Ligasegene wurden hierfür unter die Kontrolle des CaMV 35 Promotors gestellt und anstelle des natürlichen Terminationssignals im gleichen Leseraster das sGFP S65T angehängt (Abbildung 49). Die entsprechende Plasmid DNA wurde dann mit einer Goldpartikel Kanone in Zwiebelepidermis-Zellen eingeschleust

Mit dem *Oryza* tRNA Ligase-GFP Fusionsprotein konnte *in vivo* die tatsächliche Lokalisierung in den Chloroplasten nachgewiesen werden (Abbildung 51). Die Gruppe der "Avocado sunblotch" Viroide replizieren in den Chloroplasten. Bisher konnte noch nicht nachgewiesen werden, ob die Zirkularisation der linearen Viroidstränge autokatalytisch oder durch eine Wirts RNA Ligase erfolgt. Die linearen Viroidstränge verfügen über eine 5'-Hydroxylgruppe und ein 2',3'-Cyclophosphat. Zudem sind Extrakte aus *Chlamydomonas in vitro* in der Lage, lineare Viroidstränge zu zirkularisieren. Da die kerncodierte und die chloroplastidär vorliegende tRNA Ligase von demselben Gen abstammt und für die kerncodierte Replikation der "Potato spindle tuber" Viroide (PSTV) eine Beteiligung der Wirts RNA Ligase angenommen wird, kann davon ausgegangen werden, dass ebenfalls in den Chloroplasten die Replikation der Viroide unter Beteiligung der Wirts RNA Ligase abläuft (Darós und Flores, 2004; Tabler und Tsagris, 2004). Die Pflanze selbst nimmt jedoch Schaden von einem Viroidbefall. Daher bleibt die Frage offen, für welche zellulären Abläufe die Pflanze eine RNA Ligase in den Chloroplasten importiert.

Überraschenderweise wird die *Arabidopsis* tRNA Ligase in den Zwiebelepidermiszellen in die Mitochondrien importiert (Abbildung 51). Es sind keine Viroide bekannt, die *Arabidopsis* Pflanzen befallen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die *Arabidopsis* Pflanze über alle nötigen Enzyme verfügt, die für die Replikation der Viroide benötigt werden (Daros und Flores, 2004). Ebenfalls muss für die *Arabidopsis* tRNA Ligase die Frage offen bleiben für welche zellulären Abläufe in den Mitochondrien die tRNA Ligase benötigt wird. Interessanterweise sind ebenfalls die *Arabidopsis* tRNA Endonuklease-Untereinheiten in den Mitochondrien lokalisiert (Prof. Akama, persönliche Mitteilung, Matsue, Japan). Möglicherweise findet das tRNA Spleißen in *Arabidopsis thaliana* in den Mitochondrien statt.

Lokalisierung der tRNA Ligaseproteine in der Zelle

Für die *Oryza* tRNA Ligase konnte eine Lokalisierung in den Chloroplasten nachgewiesen werden. Wird das erste Initiationsmethionin zu einem Stopp-Codon mutagenisiert, befindet sich die *Oryza* tRNA Ligase in dem Cytoplasma. Lange Zeit ging man davon aus, dass das tRNA Spleißen im Zellkern stattfindet (Clark und Abelson, 1987; Melton *et al.*, 1980; De Robertis *et al.*, 1981; Nishikura und De Robertis, 1981). In neuen Arbeiten konnte zum einen gezeigt werden, dass intronhaltige pre-tRNAs aus dem Zellkern exportiert werden können (Arts *et al.*, 1998). Zum anderen wurde die Lokalisierung der Hefe tRNA-Endonuklease-Untereinheiten in der Zelle untersucht. Über Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit chimären tRNA Endonuklease Untereinheiten mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) konnte nachgewiesen werden, dass die tRNA

Spleißendonuklease hauptsächlich bei den Mitochondrien lokalisiert ist. Dieser Befund wurde durch weitere Untersuchungen bekräftigt, u.a durch Fraktionierung der Hefe Zelle enthaltenen Kompartimente durch Zentrifugation im Saccharose-Gradienten (Yoshihisa *et al.*, 2003). Darüberhinaus konnte die Hefe tRNA Ligase hauptsächlich in dem Cytoplasma nachgewiesen werden (T. Yoshihisa, persönliche Mitteilung). Bei der Komplementierung eines tRNA Ligase defizienten Hefestamms durch die beiden Phagenenzyme der T4 Polynukleotidkinase und der T4 RNA Ligase werden überlebensfähige Hefe Mutanten gebildet. Da die T4 Enzyme sicherlich kein Kernimportsignal tragen, ist davon auszugehen, dass die T4 Enzyme ihre Funktion in dem Cytoplasma ausüben (Schwer *et al.*, 2004). Die pflanzliche tRNA Spleißendonuklease ist ebenso vornehmlich an den Mitochondrien lokalisiert und die pflanzliche tRNA Ligase befindet sich neben den Chloroplasten vornehmlich im Cytoplasma. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass das tRNA Spleißen in Pflanzenzellen wie auch bei der Hefe im Cytoplasma in der Nähe der Mitochondrien stattfindet. Es ist jedoch anzumerken, dass im dem Transkriptionsextrakt aus *Nicotiana* BY-2 Zellkernen ebenfalls alle Schritte zur Reifung einer Vorläufer tRNA hin zur maturen tRNA ablaufen, einschließlich dem tRNA Spleißen (Yukawa *et al.*, 2001). An dieser Stelle ist es schwierig zu unterscheiden, ob der Kernextrakt teilweise durch cytosolische Proteine „verunreinigt“ ist oder die tRNA Spleißenzyme ebenso im Zellkern anzutreffen sind.

Weitere Funktionen der pflanzlichen tRNA Ligase

Die Weizen tRNA Ligase verfügt über ein sehr breites Substratspektrum, vorausgesetzt die zu verknüpfende Ribonukleinsäure verfügt über ein 2',3'-Cyclophosphat bzw. ein 2'-Phosphat und eine 5'-Hydroxyl- bzw. 5'-Phosphatgruppe. Die Verwandtschaft der tRNA Ligase zu den T4 Phagenenzymen der Polynukleotidkinase und RNA Ligase legt die Frage nahe, ob die pflanzliche tRNA Ligase ebenfalls an der Reparatur von tRNA Molekülen beteiligt ist. An dieser Stelle kann nochmals betont werden, dass die Anticodonschleife der empfindlichste Bereich der tRNA ist. Interessanterweise konnten in *Chlamydomonas* Zellen tRNA^{Ala} (UGC) und tRNA^{Pro} (UGG) aufgefunden werden, deren 5'- und 3'-Hälften über eine 2'-Phosphat-3'5'-Phosphodiesterbindung verknüpft sind (Tyc *et al.*, 1983). Dabei kann ein tRNA Spleißmechanismus ausgeschlossen werden, da die codierten tRNAs über keine Intronsequenzen verfügen, und zudem die Ligationsstelle sich in der Position von der konservierten Spleißstelle unterscheidet. Die Schlussfolgerung liegt nahe, dass die pflanzliche tRNA Ligase die autolytisch entstandenen tRNA Hälften ligiert hat.

Die Viroide benötigen bei dem Befall einer Pflanzenzelle eine Vielzahl von Wirts-codierten Proteinen für die Replikation. Es wird davon ausgegangen, dass die RNA Polymerase II die Transkription von Viroid RNA Tochtersträngen übernimmt. Diese (-)Viroid-Vorläufer-Stränge sind jedoch noch nicht funktionell, sondern dienen als Vorlage für die Synthese von (+)Tochtersträngen. Diese Stränge werden entweder von Wirtsnuklease am 5'- und 3'-Ende getrimmt oder ein stromabwärtscodiertes Hammerhead-Ribozym schneidet am 3'-Ende unter Ausbildung eines 2',3'-Cyclophosphats. Diese lineare Viroid RNA wird von einer Wirts RNA Ligase unter Ausbildung einer 2'-Phosphat-3',5'-Phosphodiesterbindung ligiert (Branch *et al.*, 1982).

Das Hepatitis δ Virus verfügt über ein zirkuläres RNA Genom und repliziert sich über den „Rolling circle“ Mechanismus. Das zirkuläre Genom dient als Matrize für die RNA-abhängige Transkription von

multimeren (-)Tochtersträngen, die von einem HDV codierten anti-genomischen Ribozym zu Monomeren hydrolysiert werden. Die (-)Monomere werden von einer Wirts RNA Ligase zu antigenomischen HDV Ringen zirkularisiert, die als Matrize für die Synthese von (+) genomischen Tochtersträngen dienen, die wiederum von einem genomischen Ribozym zu (+)-Monomeren mit einer 5'-Hydroxygruppe und 2',3'-Cyclophosphat hydrolysiert werden. Letztlich verknüpft die Wirts RNA Ligase diese (+)-Monomere zur zirkulären, genomischen Hepatitis δ Virus RNA Molekülen.

In der Hefe ist tRNA Ligase an dem zellulären Mechanismus des „unfolded protein response“ beteiligt und vernüpft die HAC-1 mRNA Exons nach der Exzision des Introns durch die IRE Endonuklease (Sidrauski *et al.*, 1998). Es wäre interessant zu untersuchen, ob ein ähnlicher Mechanismus ebenfalls bei der Pflanze anzutreffen ist.

Aufreinigung und Charakterisierung der Säuger tRNA Ligase

Mit der Entdeckung intronhaltiger pre-tRNAs in *Xenopus* und HeLa (Nishikura und De Robertis, 1981) begann die Untersuchung des Spleißmechanismus in den animalen Systemen. Es stellte sich heraus, dass die RNA Ligaseaktivität aus Extrakten von HeLa und *Xenopus* die tRNA-Hälften mit einem 2',3'-Cyclophosphat und einer 5'-Hydroxylgruppe in einer ATP-abhängigen Reaktion verknüpft. Es entsteht eine 3',5'-Phosphodiesterbindung unter Einbau des Cyclophosphat (Laski *et al.*, 1983; Filipowicz und Shatkin, 1983; Filipowicz *et al.*, 1983; Nishikura *et al.*, 1981). Das tRNA Spleißen findet bei den animalen Zellen im Zellkern statt (Melton *et al.*, 1980; Paushkin, 2004). Die RNA Ligaseaktivität konnte chromatographisch aus HeLa Zellen ca. 100fach angereichert werden. Dabei konnte das native Molekulargewicht über Sedimentation im Glycerolgradienten zu ca. 160 kDa bestimmt werden (Perkins *et al.*, 1985). Als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Extrakten wurden zum einen HeLa-Zellen verwendet, aus dem ein Gesamtextrakt (Filipowicz *et al.*, 1983; Perkins *et al.*, 1985), bzw. ein Kernextrakt (Zillmann *et al.*, 1991) gewonnen wurde. Zum anderen wurden Kernextrakte aus der Mäuseleber bzw. dem Mäusegehirn für die Charakterisierung der RNA Ligaseaktivität verwendet (Wang *et al.*, 1984). Zudem gelang es Zillmann *et al.* (1991) die RNA Ligaseaktivität aus dem HeLa Kernextrakt an Heparin-Sepharose aufzureinigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als Ausgangsmaterial Schweineleber für die chromatographische Anreicherung der RNA Ligaseaktivität verwendet. Dabei ist es wichtig, die Schweineleber frisch, d.h. noch handwarm von einem lokalen Schlachthof sofort zu verarbeiten. Die höchste spezifische Ligaseaktivität konnte in einem HeLa Kernextrakt aufgezeigt werden. Jedoch treten bei der Herstellung eines Kernextrakts derart hohe Verluste auf, dass für eine chromatographische Aufreinigung günstigerweise von Gesamtextrakten ausgegangen wird. Der Aufschluss der Schweineleberzellen erfolgte in einem Fleischwolf und die Durchmischung mit dem Extraktionspuffer in einem Mixer (Typ Warren Blender). Der erhaltene Schweineleber S100 Extrakt muss sofort weiter verarbeitet werden. Beim Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff, sowie bei einer Lagerung bei 4 °C für 24 h geht die RNA Ligaseaktivität verloren. Auf eine Hitzebehandlung des Schweineleber S100 Extrakts wurde verzichtet, da hiermit eine deutliche Reduktion der RNA Ligaseaktivität verbunden war. Bereits Wang *et al.* (1984) fraktionierten die Kernextrakte aus der Mäuseleber über eine Ammoniumsulfatfällung. Bei der eigenen fraktionierten Ammoniumsulfatfällung wurde die Haupt-RNA Ligaseaktivität im dem Sättigungsintervall von 40 % bis 75 % aufgefunden.

Der fraktionierte Schweineleberextrakt zeigt erst bei sehr niedriger Salzkonzentration eine Bindung an Säulenchromatographie-Materialien wie DEAE-Cellulose, Mono Q, Heparin-Sepharose, Cibacron Blau-Trisacryl. Daher wurde die Entsalzung mittels Sephadex G25 Gelfiltration etabliert, die es ermöglicht auch große Volumina innerhalb von 30 min zu über 99 % zu entsalzen. Bei der Ionenaustauschchromatographie konnte eine schwache Bindung an DEAE-Cellulose und eine mittlere Bindung an Q-Sepharose, bzw. an Mono Q aufgezeigt werden. Zudem bindet die RNA Ligaseaktivität an Cibacron-Blau-Trisacryl und an Heparin-Sepharose, so dass ein Aufreinigungsschema für die Anreicherung der animalen tRNA Ligaseaktivität ausgearbeitet werden konnte (Abbildung 55). Ausgehend von 200 g Schweineleber wurden 280 ml S100 Schweineleberextrakt gewonnen, der über Ammoniumsulfat fraktioniert wurde. Die Aufreinigung an DEAE-Cellulose ermöglichte die rasche Verarbeitung des Rohextraktes und die Stabilisierung der RNA Ligaseaktivität. Anhand der gruppenspezifischen Affinitätsmedien Cibacron Blau und Heparin konnten die Hauptverunreinigungen der RNA Ligaseaktivität abgetrennt werden. Die endgültige Reinigung erfolgte an Mono Q, wobei hier die RNA Ligaseaktivität relativ unspezifisch eluierte. In Verbindung mit der durchgeführten Gelfiltration an Superdex 200 liegt es nahe, dass ein Teil der RNA Ligaseaktivität denaturiert wurde und teilweise aggregiert vorliegt (Abbildung 54). Bei der Gelfiltration konnte das native Molekulargewicht auf ca 150 – 180 kDa abgeschätzt werden, das mit einem Protein von 160 kDa in einem silbergefärbten Proteingel korreliert.

Das 160 kDa Protein wurde aus einem präparativen Gel ausgeschnitten und für eine massenspektrometrischen Proteinsequenzierung zur Harvard Microchemistry Facility (Cambridge, Massachusetts) gesendet.

Mit 120 sequenzierten tryptischen Fragmenten wurde die Carbamoylphosphat-synthetase als das zu bestimmende Protein indentifiziert. Die Verifizierung, dass es sich hierbei tatsächlich um das animale tRNA Ligasegen handelt, kann nur über die Klonierung und rekombinante Expression des designierten Carbamoylphosphat-Synthetasegens erfolgen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt wurden. Es lassen sich jedoch einige wichtige Erkenntnisse zusammenfassen. Die animale tRNA Ligase aus Rohextrakten ist zwar relative labil, bei rascher Verarbeitung und nach der ersten säulenchromatographischen Anreicherung kann die RNA Ligaseaktivität bis zu einer Woche ohne merklichen Aktivitätsverlust gelagert werden. Zudem ist eine Anreicherung sowohl an klasischen Ionenaustauschmedien, wie auch an den gruppenspezifischen Affinitätsmedien, z.B. Cibacron Blau und Heparin möglich. Während der gesamten Aufreinigung konnte nur eine RNA Ligaseaktivität aufgezeigt werden. Anhand der RNase T2 Hydrolyse des zirkularisierten Introns konnte für diese RNA Ligaseaktivität gezeigt werden, dass das Cyclophosphat in die entstehende 3',5'-Phosphodiesterbindung eingebaut wurde (Abbildung 56). Dies ist verwunderlich, da Zillmann *et al.* (1991) im HeLa Kernextrakt die Anwesenheit einer animalen und einer hefen/pflanzen-analogen RNA Ligaseaktivität nachgewiesen haben.

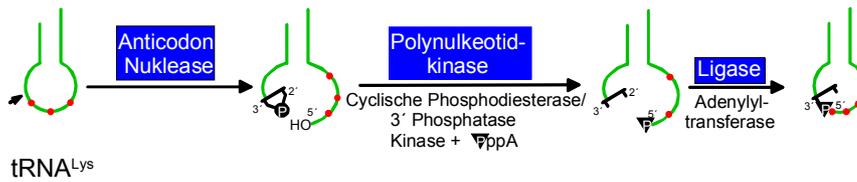
Vergleich der unterschiedlichen RNA Ligasen

Aus T4 Phagen-infizierten *E. coli* Zellen konnte die erste RNA Ligase nachgewiesen, aufgereinigt und kloniert werden (Silber *et al.*, 1972). Die T4 RNA Ligase 1 ligiert RNA Moleküle mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende. Für die T4 RNA Ligase konnte zusammen mit der T4 Polynukleotidkinase eine Funktion in der Reparatur von tRNA^{Lys} aufgezeigt werden, die von einer Wirts-codierten Anticodonnuklease an der Wobble Position hydrolysiert wurde. Mittlerweile sind eine Reihe von Bakteriophagen RNA Ligasen identifiziert worden, darunter ebenfalls Vertreter, die bei einem Temperaturoptimum von 60 °C Ribonukleinsäurestränge ligieren (Blondal, *et al.*, 2003 und 2005). Bei anderen Phagenenzymen befindet sich die RNA Ligase- und die Polynukleotidkinase/3'-Phosphataseaktivität auf einer Polypeptidkette (Martins und Shuman, 2004a, sowie Acc. No. AAX92304). Interessanterweise gibt es in den Bakterien *Fusobacterium nucleatum* (Acc. No. AAL93718) und *Helicobacter hepaticus* (Acc. No. AAP7853) Proteine mit einer hohen Homologie zu dem Phagen Enzym aus dem *Staphylococcus* Phagen Twort (Acc. No. AAX92304). Vermutlich hat hier ein Gentransfer von dem Bakteriophagen zum Bakterium stattgefunden, jedoch konnte noch nicht eine zelluläre Funktion für die bakteriellen RNA Ligasen nachgewiesen werden (Martins und Shuman, 2004b).

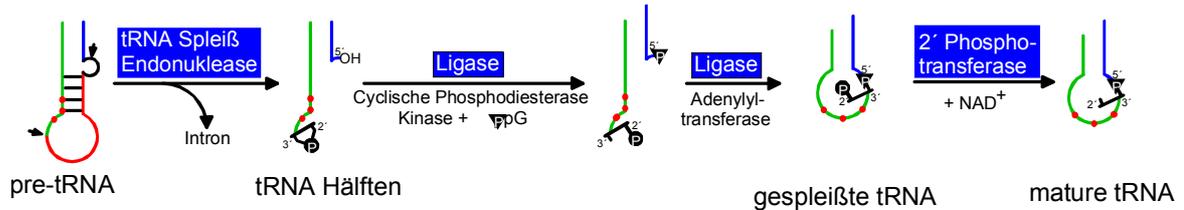
Bei den tRNA Ligasen aus Hefen und Pflanzen ist die RNA Ligase-, Polynukleotidkinase- und eine Cyclischen Phosphodiesterase-Aktivität auf einer Polypeptidkette codiert. Das 2',3'-Cyclophosphat wird dabei zu einem 2'-Phosphat hydrolysiert. Die tRNA Ligaseaktivität benötigt das 2'-Phosphat für die Knüpfung einer 3',5'-Phosphodiesterbindung. Offensichtlich haben die Hefen und Pflanzen eine zusätzliche Kontrolle mittels des 2'-Phosphats entwickelt, um nicht willkürlich RNA Stränge zu verknüpfen (Schwer *et al.*, 2004). Für diese Qualitätskontrolle wird sodann noch ein weiteres Enzym benötigt, das anschließend das 2'-Phosphat entfernt (Culver *et al.*, 1993).

Grundsätzlich verschieden verläuft die RNA Ligationsreaktion bei Archaea und bei den animalen Eukaryonten ab. Das 2',3'-Cyclophosphat und die 5'-Hydroxylgruppe sind eine essentielle Voraussetzung für die Knüpfung einer 3'-5'-Phosphodiesterbindung, wobei das Cyclophosphat in die neu entstehende Bindung eingebaut wird. Bisher ist es noch nicht gelungen ein RNA Ligasegen aus Archea oder aus den animalen Eukaryonten zu identifizieren. Daher ist die dieser Arbeit erfolgte Identifizierung des humanen tRNA Ligasegens und die funktionelle Analyse von entscheidender Bedeutung.

T4-induzierte Hydrolyse und Reparatur von tRNA^{Lys}



tRNA Spleißen bei Pflanzen und Hefe



tRNA Spleißen bei Menschen und Tieren

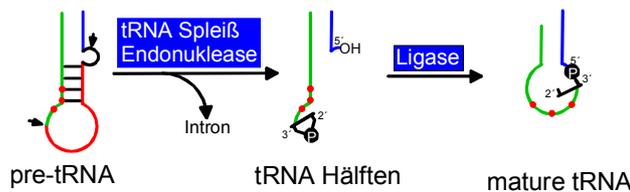


Abbildung 58. Reaktionsmechanismen der T4 induzierten Hydrolyse und Ligation von tRNA^{Lys} Hälften und eukaryontischer tRNA Spleißreaktionen

Befällt der T4 Phage den *E. coli* Stamm CT_r5x, so wird eine wirts-codierte Anticodonnuklease freigesetzt, die tRNA^{Lys} an der Wobble-Position zu einem 2',3'-Cyclophosphat und einer 5'-Hydroxylgruppe hydrolysiert. Diese Enden stellen nicht ein Substrat für die T4 RNA Ligase dar, sondern werden von der Polynukleotidkinase/3'-Phosphatase zuerst an der 5'-Position phosphoryliert. An der 3'-Position wird das 2',3'-Cyclophosphat durch eine Cyclische Phosphodiesterase zu einem 3'-Phosphat geöffnet, das wiederum von der 3'-Phosphatase in eine 3'-Hydroxylgruppe umgewandelt. Sodann kann die T4 RNA Ligase die tRNA^{Lys} Hälften unter Verbrauch von ATP verknüpfen.

Bei dem eukaryontischen tRNA Spleißen hydrolysiert die tRNA Spleißendonuklease die intronhaltige tRNA unter Ausbildung eines 2',3'-Cyclophosphats und einer 5-Hydroxylgruppe.

Bei den Pflanzen und Hefen wird das Cyclophosphat von einer Cyclischen Phosphodiesterase zu einem 2'-Phosphat geöffnet und die 5'-Hydroxylgruppe von der Polynukleotidkinase phosphoryliert. Anschließend verknüpft die tRNA Ligase die Hälften unter Verbrauch von ATP. Interessanterweise sind die RNA Ligase-, Polynukleotidkinase- und Cyclische Phosphodiesterase-Aktivität auf einer Polypeptidkette vereint.

Bei der animalen tRNA Ligase werden die tRNA Hälften mit den 2',3'-Cyclophosphat und der 5'-Hydroxylgruppe direkt zu einer 3',5'-Phosphodiesterbindung umgesetzt, wobei das Cyclophosphat in die neue Phosphodiesterbindung eingebaut wird.

6. Zusammenfassung

Transfer Ribonukleinsäuren werden von der RNA Polymerase III als Vorläufer tRNA transkribiert und durchlaufen eine Vielzahl von Reifungsschritten hin zur maturaen tRNA. Neben der Hydrolyse der 5'- und 3'-Flanke durch die RNase P und die tRNase Z, sowie einer Vielzahl von Basenmodifizierungen, wird bei einigen pre-tRNAs das Intron herausgespleißt. Die ersten intronhaltigen tRNA Gene wurden in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen und folglich wurde der Spleißmechanismus in diesem Organismus als erstes untersucht. Eine tetramere tRNA Spleißendonuklease spaltet das Intron an den Exongrenzen heraus und eine tRNA Ligase ligiert die entstandenen tRNA Hälften zur gespleißten tRNA. Einzig in der Hefe und anderen Pilzen konnten bisher die Gene für die tRNA Ligase identifiziert werden.

Weder molekularbiologische Ansätze – wie z.B. DNA Hybridisierung, Expressions-“Screening“ und funktionelle Komplementationsstudien mit einem tRNA Ligase-defizienten Hefestamm – noch Datenbanksuchen mit der bekannten Hefe tRNA Ligasesequenz haben in den vergangenen Jahren zur Identifizierung eines pflanzlichen oder animalen tRNA Ligase Gens geführt.

In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, das tRNA Ligase Protein aus Weizenkeimen bis zur Homogenität zu isolieren und mit Hilfe erhaltener Peptidsequenzen die entsprechenden Kern-codierten Gene in höheren und niederer Pflanzen zu identifizieren. Die Ligaseaktivität wurde für das klonierte, rekombinant überexprimierte tRNA Ligaseprotein bestätigt. Weiterhin wurde zum ersten Mal das Ligaseprotein aus Schweineleber aufgereinigt und das zugehörige Gen im humanen Genom identifiziert.

Im einzelnen sind folgende Ergebnisse erzielt worden:

1. Das Spleißen von *in vitro* transkribierter intronhaltiger pre-tRNA mittels T7 RNA Polymerase konnte etabliert werden. Somit standen große Mengen an intronhaltiger pre-tRNA für eine Vielzahl von *in vitro* Spleißnachweisen zur Verfügung. Damit ist es möglich gewesen, die pflanzliche tRNA Spleißendonuklease-Aktivität aus Weizenkeimen 1000fach anzureichern und von unspezifischen Ribonukleasen zu befreien. Zudem konnte eine Unterscheidung zwischen enzymatischer und autolytischer Hydrolyse der intronhaltigen pre-tRNA getroffen werden.
2. Eine chimäre Archeuka pre-tRNA wurde konstruiert, die die mature Domäne der *Nicotiana* tRNA und als Intronstruktur das “Schleifen – Helix – Schleifen“ Motif der Archaea pre-tRNA aufweist. Die chimäre pre-tRNA wurde unter die Kontrolle des T7 Promotors für eine effiziente Transkription mit der T7 RNA Polymerase gestellt. Parallel dazu konnte das Gen der *Methanocaldococcus* tRNA Spleißendonuklease kloniert und das rekombinante Protein effizient im Weizenkeim RTS 100 CECF System überexprimiert werden. Nach Affinitätschromatographie an Ni-NTA Agarose wurde das aufgereinigte rekombinante Protein für präparative *in vitro* Spleißreaktionen mit der chimären pre-tRNA eingesetzt. Dabei wird die chimäre pre-tRNA quantitativ zu tRNA Hälften und einem linearen Intron umgesetzt, die als Substrate für anschließende RNA Ligationsnachweise verwendet wurden.

3. Die tRNA Ligaseaktivität aus Weizenkeimextrakten konnte über sieben chromatographische Stufen bis fast zur Homogenität aufgereinigt werden. Die Aufreinigungstrategie setzte sich aus Schritten der gruppen- und ligandspezifischen Affinitäts-, Ionenaustauschchromatographie und der Gelfiltration zusammen. In stark angereicherten Ligasepräparationen konnte das tRNA Ligaseprotein über den Adenylyltransferase-Nachweis identifiziert werden.
4. Das identifizierte tRNA Ligaseprotein wurde massenspektrometrisch sequenziert. Die Sequenzinformationen wurden zur Identifizierung von sieben pflanzlichen "exprimierten Sequenzabschnitten" (ESTs) verwendet, die eine hohe Homologie zu einem 125 kDa *Arabidopsis* Protein aufweisen.
5. Das *Arabidopsis* tRNA Ligase-Gen konnte erfolgreich aus einer cDNA Genbank mittels PCR amplifiziert und in Protein-Überexpressionsvektoren kloniert werden. Die *Arabidopsis* tRNA Ligase wurde im Weizenkeim "Rapid Translation System 100 CECF" effizient überexprimiert und konnte erfolgreich über Affinitätschromatographie an Ni-NTA Agarose aufgereinigt werden. Die rekombinante *Arabidopsis* tRNA Ligase wurde für *in vitro* Ligationsreaktionen verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Ligationsprodukte (gespleißte mature tRNA und zirkuläres Intron) an der Ligationsstelle eine 2'-Phosphomonoester,3',5'-Phosphodiesterbindung aufweisen und dass das Phosphat in der neu geknüpften Phosphodiesterbindung aus exogenem GTP stammt.
6. Über den Adenylyltransferase-Nachweis konnten bis zur Stufe der Source S15 Säule zwei adenylylierbare Weizenproteine von 125 und 110 kDa nachgewiesen werden. Durch eine Senkung des pH Werts auf 6.8 im Chromatographiepuffer konnte mit der Source S15 Säule ebenfalls das 110 kDa tRNA Ligaseprotein gebunden und aufgereinigt werden. Das identifizierte 110 kDa Protein wurde massenspektroskopisch sequenziert. Mit den erhaltenen Sequenzinformationen wurden die gleichen ESTs identifiziert, die zur Zuordnung für die 125 kDa tRNA Ligase herangezogen wurden. Möglicherweise codiert ein Gen im Weizengenom für zwei Proteine unterschiedlicher Länge am N-terminalen Ende (s.u.).
7. Der cDNA Klon der *Arabidopsis* tRNA Ligase wurde vollständig sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass das *Arabidopsis* tRNA Ligase-Gen über ein zusätzliches erstes Exon verfügt, das für eine aminoterminal Signalsequenz codiert, ebenso wie das im Reisgenom annotierte Ligase-Gen.
8. Die *Oryza* und die *Arabidopsis* tRNA Ligase Gene verfügen für die Initiation der Translation über drei im gleichen Leseraster vorliegende Methionin-Codons. Da die 125 kDa und das 110 kDa Weizen tRNA Ligaseprotein wahrscheinlich von dem selben Gen exprimiert werden, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass nicht nur das erste Methionin, sondern ebenfalls das zweite und/oder dritte Methionin-Codon für die Initiation der Proteinexpression verwendet werden und die resultierenden Ligaseproteine in verschiedene Organellen transportiert werden.
9. Für Lokalisierungsstudien wurden die Gene für die *Arabidopsis* und die *Oryza* tRNA Ligase unter die Kontrolle des starken CaMV S35 Promotors gestellt und am carboxyterminalen Ende wurde anstelle des Translationsterminationcodons das Gen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) angehängt. Wird die Plasmid DNA in eine Zwiebelepidermiszelle eingeschleust, kann anschließend die Lokalisierung der tRNA Ligase-GFP-Fusionsproteine unter dem

Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Die *Arabidopsis* tRNA Ligase ist vornehmlich in den Mitochondrien lokalisiert, wenn die Translation am ersten Methionin-Codon beginnt. Erfolgt die Initiation der Translation am dritten Methionin-Codon, so befindet sich die tRNA Ligase im Cytoplasma. Initiiert die *Oryza* tRNA Ligase am ersten Methionin-Codon, so befindet sich das gebildete tRNA Ligaseprotein in den Chloroplasten. Wird das erste Methionin-Codon entfernt, wird ein Protein gebildet, das sich überwiegend im Cytoplasma befindet.

10. Der Ligationsmechanismus der animalen tRNA Ligase unterscheidet sich in fundamentaler Weise von dem Mechanismus, der in der Hefe und den Pflanzen anzutreffen ist. Die animale tRNA Ligaseaktivität konnte in Schweineleberextrakten über die Ligation von tRNA Hälften nachgewiesen werden und über 7 chromatographische Stufen fast bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Die animale tRNA Ligase benötigt ein 2',3'-Cyclophosphat und eine 5'-Hydroxylgruppe und bildet unter Einbau des vorhandenen Cyclophosphats eine neue 3',5'-Phosphodiesterbindung.
11. Das animale tRNA Ligaseprotein konnte massenspektrometrisch sequenziert werden. Die Sequenzinformationen identifizieren ein 160 kDa Protein im menschlichen Genom, das in den Datenbanken als Carbamoylphosphatsynthetase annotiert ist.

Die in dieser Arbeit charakterisierten pflanzlichen und animalen tRNA Ligasen spielen eine wichtige Rolle beim pre-tRNA Spleißen. Eigene Beobachtungen und anderer Wissenschaftler lassen jedoch darauf schließen, dass diese RNA Ligasen eine Vielzahl weiterer noch unbekannter Funktionen übernehmen können.

Summary

Transfer ribonucleic acids (tRNAs) are produced by RNA polymerase III and undergo multiple maturation steps until to the mature tRNA. Besides the endonucleolytic removal of 5'- and 3'-flanks by RNase P and tRNase Z and a multitude of base modifications, the introns of some pre-tRNA is spliced out. The first intron-containing tRNA genes have been identified in *Saccharomyces cerevisiae* and consequently the splicing mechanism has been studied in this organism first. A tetrameric splicing endonuclease cleaves the intron at the exon borders and a tRNA ligase ligates the resulting tRNA halves to the spliced tRNA. The gene for this tRNA ligase has up to now only been identified in yeast and in other fungi.

Neither molecular biological approaches – as, e.g., DNA hybridisation, expression screening and functional complementation studies with a tRNA ligase-deficient yeast strain – nor data bank searches with the known yeast tRNA ligase sequence have led to the identification of a plant or animal tRNA ligase gene.

In this work a purification to homogeneity has been achieved for the wheat germ tRNA ligase protein for the first time, followed by the identification of the corresponding nuclear-encoded genes in higher and lower plants with the help of resulting peptide sequences. The ligase activity was confirmed for the cloned, recombinant overexpressed tRNA ligase protein. Moreover, the ligase protein from pig liver was purified and the corresponding gene identified in the human genome.

In more detail the following results have been achieved:

1. Splicing of *in vitro* transcribed, intron-containing pre-tRNAs was established with T7 RNA polymerase. Hence large amounts of intron-containing tRNA were available for a large number of splicing experiments. This allowed the 1000fold purification of wheat germ splicing endonuclease activity and its separation from unspecific ribonucleases. In addition a discrimination was possible between enzymatic and autolytic hydrolysis of intron-containing tRNA.
2. A chimeric pre-tRNA was constructed which contained the mature domain of an intron-containing *Nicotiana* tRNA and as an intron-structure the "bulge-helix-bulge" motif of archaea pre-tRNAs. The chimeric Archeuka pre-tRNA was put under the control of the T7 promoter for the efficient transcription with T7 RNA polymerase. In parallel the gene of *Methanocaldococcus* tRNA splicing endonuclease has been cloned and the recombinant protein efficiently overexpressed in the wheat germ RTS 100 CECF system. After affinity chromatography on Ni-NTA agarose the purified recombinant protein was applied for preparative *in vitro* splicing reactions with the chimeric Archeuka pre-tRNA. This results in quantitative cleavage of the chimeric Archeuka pre-tRNA to half molecules and the linear intron, which are used as substrates for the following assays for tRNA ligase activity.
3. The tRNA ligase activity could be purified almost to homogeneity over seven chromatographic steps. The purification strategy contained group- and ligand-specific affinity, ion exchange chromatography and gel filtration. The tRNA ligase protein in enriched ligase preparations was identified *via* its adenylyl transfer activity.
4. The identified tRNA ligase protein was sequenced using mass spectrometry. The resulting sequence information was used for the identification of seven plant expressed sequence tags (ESTs) with a high homology with a 125 kDa *Arabidopsis* protein.

5. The tRNA ligase gene of *Arabidopsis* was successfully amplified *via* PCR from a cDNA gene bank and cloned into protein expression vectors. The *Arabidopsis* tRNA ligase was efficiently overexpressed in the wheat germ "Rapid Translation System 100 CECF" and successfully purified *via* affinity chromatography on Ni-NTA agarose. The recombinant *Arabidopsis* tRNA ligase was used for *in vitro* ligations. This revealed that the ligation products (spliced mature tRNA and circular intron) contained a 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester bond at the ligation site and that the phosphate of the newly formed phosphodiester bond derived from exogenous GTP.
6. The adenylyltransferase assay revealed the presence of two adenylylatable wheat proteins of 125 and 110 kDa up to the Source S15 column. A decrease of the pH of the chromatography buffer of the Source S15 column allowed binding and purification of the 110 kDa ligase protein and its mass spectrometric sequencing. The resulting sequences identified the same expressed sequence tags which allowed the identification of the 125 kDa tRNA ligase. Possibly a gene in the wheat genome codes for two proteins of different length at the N-terminus (see below).
7. The cDNA clone of the *Arabidopsis* tRNA ligase was completely sequenced. This revealed an additional first exon encoding an aminoterminal signal sequence as in the rice ligase gene of the rice genome.
8. The *Oryza* and *Arabidopsis* genes have three methionine codons in the same reading frame for the initiation of translation. Since the 125 kDa and the 110 kDa wheat tRNA ligase protein are most likely from the same gene, it can consequently be concluded that not only the first, but also the second and/or the third methionine codon are used for the initiation of protein expression and that the resulting ligase proteins are directed to different organelles.
9. For localization studies the genes for *Arabidopsis* and *Oryza* tRNA ligase were put under the control of the strong CaMV S35 promoter and the termination codon at the C-terminal end was replaced by the gene for the green fluorescent protein (GFP). If this plasmid DNA is introduced into an onion epidermis cell, the localization of the tRNA ligase-GFP fusion proteins can be observed under the fluorescence microscope. The *Arabidopsis* tRNA ligase is predominantly located in the mitochondria if the translation is started at the first methionine codon. If the initiation starts at the third methionine codon, the tRNA ligase is in the cytoplasm. If the *Oryza* tRNA ligase is started at the first methionine codon, then the tRNA ligase protein is in the chloroplasts. If the first methionine codon is removed, the resulting ligase protein is mainly in the cytoplasm.
10. The ligation mechanism of animal tRNA ligase differs fundamentally from that in yeast and plants. The tRNA ligase activity from animals could be identified *via* the ligation of tRNA halves from chimeric (*Nicotiana/Archaea*) pre-tRNA and purified almost to homogeneity in seven chromatographic steps. The animal tRNA ligase needs a 2',3'-cyclophosphate and a 5'-hydroxylgroup and forms the new 3',5'-phosphodiester bond using the cyclophosphate.
11. The animal tRNA ligase protein was sequenced *via* mass spectrometry. The sequence information identifies a 160 kDa protein in the human genome which is annotated as carbamoylphosphate synthetase in data banks.

The plant and animal tRNA ligases characterized in this work play an important role during pre-tRNA splicing. Our own observations and those of other scientists allow the conclusion that these tRNA ligases are involved in a number of other, yet unknown functions.

7. Literatur

- Akama, K. and Kashihara, M. (1996) Plant nuclear tRNA^{Met} genes are ubiquitously interrupted by Introns. *Plant Mol. Biol.* **32**, 427 – 434.
- Akama, K., Nass, A., Junker, V. and Beier, H. (1997) Characterization of nuclear tRNA^{Tyr} introns: their evolution from red algae to higher plants. *FEBS Lett.* **417**, 213 – 218.
- Akama, K., Junker, V. and Beier H. (2000) Identification of two catalytic subunits of tRNA splicing endonuclease from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **257**, 177 – 185.
- Akama, K., Junker, V., Yukawa, Y., Sugiura, M. and Beier, H. (2000) Splicing of *Arabidopsis* tRNA^{Met} precursors in tobacco cell and wheat germ extracts. *Plant Mol. Biol.* **44**, 155 – 165.
- Altman, S., Kirseborn, L. and Talbot, S. (1995) Recent studies of RNase P. In: *tRNA – Structure, biosynthesis and function* Eds: Söll, D. and RajBhandary, U.L.), ASM Press, Washington, 67 – 78.
- Apostol, B.L. and Greer, C.L. (1991) Preferential binding of yeast tRNA Ligase to pre-tRNA substrates. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1853 – 1860.
- Apostol, B.L., Westaway, S.K., Abelson, J. and Greer, C.L. (1991) Deletion analysis of a multifunctional yeast tRNA ligase polypeptide. *J. Biol. Chem.* **266**, 7445 – 7455.
- Arends, S., Kraus, J. and Beier, H. (1996) The tRNA^{Tyr} multigene family of *Triticum aestivum*: genome organization, sequence analyses and maturation of intron-containing pre-tRNAs in wheat germ extract. *FEBS Lett.* **384**, 222 – 226.
- Arends, S. and Schön, A. (1997) Partial purification and characterization of nuclear ribonuclease P from wheat. *Eur. J. Biochem.* **244**, 635 – 645.
- Arts, G.J., Kuersten, S., Romby, P., Ehresmann, B. and Mattaj, I.W. (1998) The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *EMBO J.* **17**, 7430 – 7441.
- Axelos, M., Bardet, C., Liboz, T., Le Van Thai, A., Curie, C. and Lescure, B. (1989) The gene family encoding the *Arabidopsis thaliana* translation elongation factor EF-1 alpha: molecular cloning, characterization and expression. *Mol. Gen. Genet.* **19**, 106 – 112.
- Baldi, M.I., Mattoccia, E., Bufardecì, E., Fabbri, S. and Tocchini-Valentini, G.P. (1992) Participation of the intron in the reaction catalysed by the *Xenopus* tRNA splicing endonuclease. *Science*, **255**, 1404 – 1408.
- Baymiller, J., Jennings, S., Kienzle, B., Gorman, J.A., Kelly, R. and McCullough J.E. (1994) Isolation and sequence of the tRNA ligase-encoding gene of *Candida albicans*. *Gene* **142**, 129 – 134.

- Blondal, T., Hjorleifsdottir, S.H., Fridjonsson, O.F., Aevarsson, A., Skirnisdottir, S., Hermannsdottir, A.G., Hreggvidsson, G.O., Smith, A.V. and Kristjansson, J.K. (2003) Discovery and characterization of a thermostable bacteriophage RNA ligase homologous to T4 RNA ligase 1. *Nucleic Acids Res.* **31**, 7247 – 7254.
- Blondal, T., Thorissdottir, A., Unnsteindottir, U., Hjorleifsdottir, S., Aevarsson, A., Ernstsson, S., Fridjonsson, S., Wheat, J.O., Hermannsdottir, A.G., Sigurdsson, S.T., Hreggvidsson, G.O., Smith, A.V. and Kristjansson, J.K. (2005) Isolation and characterization of a thermostable RNA ligase 1 from a *Thermus scotoductus* bacteriophage TS2126 with good single-stranded DNA ligation properties. *Nucleic Acids Res.* **33**, 135-142.
- Beier, D., Stange, N., Gross, H.J. and Beier, H. (1991) Nuclear tRNA^{Tyr} genes are highly amplified at a single chromosomal site in the genome of *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **225**, 72 – 80.
- Belford, H.G., Westaway, S.K., Abelson, J. and Greer, C.L. (1993) Multiple nucleotide cofactor use by yeast ligase in tRNA splicing. *J. Biol. Chem.* **268**, 2444-2450.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Heijne, G. and Brunak, S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**, 783 – 795.
- Björg, G.R., Ericson, J.U., gustafsson, C.E.D., Hyervall, T.G., Jönsson, Y.H. and Wikström, P.M. (1987) Transfer RNA modification. *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 263 – 287.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93 – 99.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 – 254.
- Branch, A.D., Robertson, H.D., Greer, C., Gegenheimer, P., Peebles, C. and Abelson, J. (1982) Cell-free circularization of viroid progeny RNA by a RNA ligase from wheat germ. *Science* **217**, 1147 – 1149.
- Bryant, F. and Benkovic, S.J. (1982) Phosphorothioate substrates for T4 RNA ligase. *Biochemistry* **21**, 5877 – 5885.
- Cameron, V. and Uhlenbeck, O.C. (1977) 3'-Phosphatase activity in T4 polynucleotide kinase. *Biochemistry* **16**, 5120 – 5126.
- Cheong, C., Varani, G. and Tinocco, I. (1990) Solution structure of an unusually stable RNA hairpin, 5'GGAC(UUCG)GUCC. *Nature* **346**, 680 – 682.
- Choffat, Y., Suter, B., Behra, R. and Kubli, E. (1988) Pseudouridine modification in the tRNA^{Tyr} anticodon is dependent on the presence, but independent of the size and sequence, of the intron in eucaryotic tRNA^{Tyr} genes. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3332 – 3337.

- Clark, M.W. and Abelson, J. (1987) The subnuclear localization of tRNA ligase in yeast. *J. Cell. Biol.* **105**, 1515 – 1526.
- Cranston, J., Silber, R., Malathi, V.G. and Hurwitz, J. (1974) Studies on ribonucleic acid ligase. *J. Biol. Chem.* **249**, 7447 – 7456.
- Darós, J.A. and Flores, R. (2004) *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6792 – 6797.
- De Robertis, E.M., Black, P. and Nishikura, K. (1981) Intranuclear location of the tRNA splicing enzymes. *Cell* **23**, 89 – 93.
- Deutscher, M.P. (1970) Reactions at the 3' terminus of transfer ribonucleic acid: a single enzyme catalyzes the incorporation of adenosine monophosphate and cytidine monophosphate into transfer ribonucleic acid. *J. Biol. Chem.* **245**, 4225 – 4227.
- Diener, J.L. and Moore, P.B. (1998) Solution structure of a substrate for the archaeal pre-tRNA splicing endonuclease: the bulge-helix-bulge motif. *Mol. Cell* **1**, 883 – 894.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M. and Roeder, R.G. (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**, 1475 – 1489.
- Drakas, R., Prisco, M. and Baserga, R. (2005) A modified tandem affinity purification tag technique for the purification of protein complexes in mammalian cells. *Proteomics* **5**, 132 – 137.
- Durantel, D., Croizier, L., Ayres, M.D., Croizier, G., Possee, R.D. and López-Ferber, M. (1998) The *pnk/pnl* gene (ORF86) of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus is a non-essential, immediate early gene. *J. Gen. Virol.* **79**, 629 – 637.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and Heijne, G. (2000) Prediction subcellular localization of preteins on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**, 1005 – 1016.
- Englert, M. (2001) Transkription von humanen 7SL RNA Genen in homologen und heterologen Kernextrakten: Analyse der für Polymerase III-spezifischen internen und externen Promotorelemente. *Diplomarbeit*
- Englert, M. and Beier H. (2004) Efficient overexpression of functionally active yeast tRNA Ligase in the RTS 100 wheat germ lysate. *Biochemica* **3**, 27 – 29.
- Englert, M. and Beier H. (2005) Plant tRNA ligases are multifunctional enzymes that have diverged in sequence and substrate specificity from RNA ligases of other phylogenetic origins. *Nucleic Acids Res.* **33**, 388 – 399.

- Fabbri, S., Fruscoloni, P., Bufardecì, E., Negri, E.D.N., Baldi, M.I., Attardi, D.G., Mattoccia, E. and Tocchini-Valentini, G.P. (1998) Conservation of substrate recognition mechanism by tRNA splicing endonuclease. *Science*, **280**, 284 – 286.
- Fan, H. and Sugiura, H. (1995) A plant basal *in vitro* system supporting accurate transcription of both RNA polymerase II- and III-dependent genes: supplement of green leaf component(s) drive accurate transcription of a light-responsive *rbcS* gene. *EMBO J.*, **14**, 1024 – 1031.
- Filipowicz, W. and Shatkin, A.J. (1983) Origin of splice junction phosphate in tRNAs processed by HeLa cell extract. *Cell* **32**, 547 – 557.
- Filipowicz, W., Konarska, M., Gross, H.J. and Shatkin, A.J. (1983) RNA 3'-terminal phosphate cyclase activity and RNA ligation in HeLa cell extract. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1405 – 1418.
- Filipowicz, W. and Gross, H.J. (1984) RNA ligation in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.*, **9**, 68 – 71.
- Flores, R., Delgado, S., Gas, M.E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S. and De la Pena, M. (2004) Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Lett.* **567**, 42 – 48.
- Fruscoloni, P., Baldi, M.I. and Tocchini-Valentini, G.P. (2001) Cleavage of non-tRNA substrates by eukaryal tRNA splicing endonucleases. *EMBO Rep.*, **2**, 217 – 221.
- Fuchs, T., Beier, D. and Beier H. (1992) The tRNA^{Tyr} multigene family of *Nicotiana rustica*: genome organization, sequence analyses and expression *in vitro*. *Plant Mol. Biol.* **20**, 869 – 878.
- Gaburt, E.A., Pelletier, J., Wilson, G. and Stoddard, B.L. (2002) Structure of a tRNA repair enzyme and molecular biology workhorse: T4 polynucleotidkinase. *Structure (Cambridge)* **10**, 1249 – 1260.
- Gegenheimer, P., Gabius, H.J., Peebles, C.L. and Abelson, J. (1983) An RNA Ligase from wheat germ which participates in transfer RNA splicing *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **258**, 8365 – 8373.
- Gomes, I. and Gupta R. (1997) RNA splicing ligase activity in the archaeon *Haloferax volcanii*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **237**, 588 – 594.
- Goodman, H.M., Olson, M.V. and Hall, B.D. (1977) Nucleotide sequence of a mutant eukaryotic gene: The yeast tyrosine inserting suppressor, SUP4-0. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **74**, 5453 – 5457.
- Greer, C.L., Peebles, C.L., Gegenheimer, P. and Abelson, J. (1983) Mechanism of action of a yeast RNA ligase in tRNA splicing. *Cell*, **32**, 537 – 546.
- Gubler, U. and Hoffman, B.J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* **25**, 263 – 269.
- Ho, C.K. and Shuman, S. (2002) Bacteriophage T4 RNA ligase 2 (gp24.1) exemplifies a family of RNA ligases found in all phylogenetic domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12709 – 12714.

- Jilani, A., Ramotar, D., Slack, C., Ong, C., Yang, X.M., Scherer, S.W. and Lasko, D.D. (1999) Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *J. Biol. Chem.* **274**, 24176 – 24186.
- Johnson, J.D., Ogden, R., Johnson, P., Abelson, J., Dembeck, P. and Itakura, K. (1980) Transcription and processing of a yeast tRNA gene containing a modified intervening sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2564 – 2568.
- Johnson, P.F. and Abelson J. (1988) The yeast tRNA^{Tyr} gene intron is essential for correct modification of its tRNA product. *Nature* **302**, 681 – 687.
- Joshi, C.P., Zhou, H., Huang, X., Chiang, V.L. (1997) Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Mol. Biol.* **35**, 993 – 1001.
- Junker, V. (1999) Expression Intron-haltiger tRNA^{Tyr}, tRNA^{Met} und 7SL RNA Gene in animalen und pflanzlichen *in vitro* Systemen. *Dissertation*, 45 – 46.
- Kaine, B.P., Gupta, R. and Woese, C.R. (1983) Putative introns in tRNA genes of prokaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **80**, 3309 – 3312.
- Kaufmann, G. (2000) Anticodon nucleases. *Trends Biochem. Sci* **25**, 70 – 74.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A. and Ecker, J.R. (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427 – 441.
- Kjems, J. and Garrett, R.A. (1988) Novel splicing mechanism for the ribosomal RNA intron in the archaeobacterium *Desulfurococcus mobilis*. *Cell*, **54**, 693 – 703.
- Kleman-Leyer, K., Armbruster, D.W. and Daniels, C.J. (1997) Properties of *H. volcanii* tRNA intron endonuclease reveal a relationship between the archaeal and eukaryal tRNA intron processing system. *Cell*, **89**, 839 – 847.
- Knuesel, M., Wan, Y., Xiao, Z., Holinger, F., Lowe, N., Wang, W. and Liu, X. (2003) Identification of novel protein-protein interactions using a versatile Mammalian tandem affinity purification expression system. *Mol. Cell Proteomics* **2**, 1225 – 1233.
- Krug, M. and Uhlenbeck, O.C. (1982) Reversal of T4 RNA ligase. *Biochemistry* **21**, 1858 – 1864.
- Konarska, M., Filipowicz, W. and Gross, H.J. (1982) RNA ligation via 2'-phosphomonoester,3',5'-phosphodiester linkage: Requirement of 2',3'-cyclic phosphate termini and involvement of a 5'-hydroxyl polynucleotide kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1474 – 1478.

- Konarska, M., Filipowicz, W., Domdey, H. and Gross, H.J. (1981) Formation of a 2'-phosphomonoester,3',5'-phosphodiester linkage by a novel RNA ligase in wheat germ. *Nature*, **293**, 112 – 116.
- Kyhse-Andersen, J. (1984) Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **10**, 203 – 209.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 – 685.
- Laskey, R.A. and Mills, A.D. (1975) Quantitative film detection of ³H and ¹⁴C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* **56**, 335 – 341.
- Laski, F.A., Fire A.Z., RajBhandary, U.L. and Sharp, P.A. (1983) Characterization of tRNA precursor splicing in mammalian extracts. *J. Biol. Chem.*, **258**, 11974 – 11980.
- Li, H. Trotta, C.R. and Abelson, J. (1998) Crystal structure and evolution of a transfer RNA splicing enzyme. *Science*, **280**, 279 – 284.
- Li, H. und Abelson, J. (2000) Crystal structure of a dimeric archaeal splicing endonuclease. *J. Mol. Biol.*, **302**, 639 – 648.
- Lowe, T.M. and Eddy, S.R. (1997) tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 955 – 964.
- Lykke-Andersen, J. and Garrett, R. (1997) RNA-protein interactions of an archaeal homotetrameric splicing endoribonuclease with an exceptional evolutionary history. *EMBO J.*, **16**, 6290 – 6300.
- Marck, C. and Grosjean, H. (2003) Identification of BHB splicing motifs in intron-containing tRNAs from 18 archaea: evolutionary implications. *RNA* **9**, 1516 – 1531.
- Martins, A. and Shuman, S. (2004a) An RNA ligase from *Deionococcus radiodurans*. *J. Biol. Chem.* **279**, 50654 – 50661.
- Martins, A. and Shuman, S. (2004b) Characterization of a Baculovirus enzyme with RNA ligase, polynucleotide 5'-kinase, and polynucleotide 3'-phosphatase activities. *J. Biol. Chem.* **279**, 18220 – 18231.
- McCraith, S.M. and Phizicky, E.M. (1990) A highly specific phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* implicated in tRNA splicing. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 1049 – 1055.
- McCraith, S.M. and Phizicky, E.M. (1991) An enzyme from *Saccharomyces cerevisiae* uses NAD⁺ to transfer the splice junction 2'-phosphate from ligated tRNA to an acceptor molecule. *J. Biol. Chem.*, **266**, 11986 – 11992.

- Melton, D.A., De Robertis, E.M. and Cortese, R. (1980) Order and intracellular location of the events involved in the maturation of spliced tRNA. *Nature* **284**, 143 – 148.
- Milligan, J.F. and Uhlenbeck, O.C. (1989) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Meth. Enzymol.* **180**, 51 – 62.
- Mireau, H., Lancelin, D. and Small, I.D. (1996) The same *Arabidopsis* gene encodes both cytosolic and mitochondrial alanyl-tRNA synthetases. *Plant Cell* **8**, 1027 – 1039.
- Nakamura, T., Ohta, M., Sugiura, M. and Sugita, M. (1999) Chloroplast ribonucleoproteins are associated with both mRNA and intron-containing precursor tRNAs. *FEBS Let.* **460**, 437 – 441.
- Nasr, F. and Filipowicz, W. (2000) Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* cyclic nucleotide phosphodiesterase involved in the metabolism of ASP-ribose 1',2'-cyclic phosphate. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1676 – 1683.
- Nishikura, K. und De Robertis, E.M. (1981) RNA processing in microinjected *Xenopus* oocytes. Sequential addition of base modifications in the spliced transfer RNA. *J. Mol. Biol.*, **145**, 405 – 420.
- Nishimura, S. (1979) Modified nucleosides in tRNA. In Schimmel, P.R., Söll, D. and Abelson, J.N. (eds), *Transfer RNA: Structure, Properties and Recognition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 59 – 79.
- Papadimitriou, A. und Gross, H.J. (1996) Pre-tRNA 3'-processing in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of exo- and endoribonucleases. *Eur. J. Biochem.* **242**, 747 – 759.
- Paushkin, S.V., Patel, M., Furia, B.S., Peltz, S.W. und Trotta, C.R. (2004) Identification of a human endonuclease complex reveals a link between tRNA splicing and pre-mRNA 3' end formation. *Cell*, **117**, 311 – 321.
- Peebles, C.L., Gegenheimer, P. and Abelson, J. (1983) Precise excision of intervening sequences from precursors tRNAs by a membrane-associated yeast endonuclease. *Cell*, **32**, 525 – 536.
- Peebles, C.L., Ogden, R.C., Knapp, G. and Abelson, J. (1979) Splicing of yeast tRNA precursors: a two stage reaction. *Cell*, **18**, 27 – 35.
- Perkins, K.K., Furneaux, H. and Hurwitz, J. (1985) Isolation and characterization of an RNA ligase from HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 684 – 688.
- Phizicky E.M., Consaul, S.A., Nehrke, K.W. and Abelson, J. (1992) Yeast tRNA ligase mutants are nonviable and accumulate tRNA splicing intermediates. *J. Biol. Chem.*, **267**, 4577 – 4582.
- Phizicky E.M., Schwartz, R.C. and Abelson, J. (1986) *Saccharomyces cerevisiae* tRNA ligase: Purification of the protein and isolation of the structural gene. *J. Biol. Chem.*, **261**, 2978 – 2986.

- Rauhut, R., Green, P.R. and Abelson, J. (1990) Yeast tRNA-splicing endonuclease is a heterotrimeric enzyme. *J. Biol. Chem.*, **265**, 18180 – 18184.
- Reid, C.E. and Lazinski, D.W. (2000) A host specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 424 – 429.
- Reyes, V.M. and Abelson, J. (1987) A synthetic substrate for tRNA splicing. *Anal. Biochem.* **166**, 90 – 116.
- Reyes, V.M. and Abelson, J. (1988) Substrate recognition and splice site determination in yeast tRNA splicing. *Cell*, **55**, 719 – 730.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Séraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* **17**, 1030 – 1032.
- Rösch, S., Späth, B., Schiffer, S., Englert, M., Beier H. and Marchfelder, M. (2005) in Hartmann, R.K., Binderreif, A., Schön, A. and Westhof, E. (2005) Use of RNA affinity matrices for the isolation of RNA-binding proteins. *Handbook of RNA Biochemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, 667 – 675.
- Rohila, J.S., Chen, M., Cerny, R. and Fromm M.E. (2004) Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J.* **38**, 172 – 181.
- Rubio, V., Shen, Y., Saijo, Y., Liu, Y., Gusmarioli, G., Dinesh-Kumar, S.P. and Deng X.W. (2005) An alternative tandem affinity purification strategy applied to Arabidopsis protein complex isolation. *Plant J.* **41**, 767 – 778.
- Sawaya, R., Schwer, B. and Shuman, S. (2003) Genetic and biochemical analysis of the functional domains of yeast tRNA ligase. *J. Biol. Chem.* **278**, 43928 – 43938.
- Schiffer, S., Rösch, S. and Marchfelder, A. (2002) Assigning a function to a conserved group of proteins: the tRNA 3'-processing enzymes. *EMBO J.* **21**, 2769 – 2777.
- Schuman, S. and Schwer, B. (1995) RNA capping enzyme and DNA ligase: a superfamily of covalent nucleotidyl transferases. *Mol. Microbiol.* **17**, 405 – 410.
- Schwer, B., Sawaya, R., Ho, C.K. and Shuman, S. (2004) Portability and fidelity of RNA-repair systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2788 – 2793.
- Segni, G.D., Borghese, L., Sebastiani, S. and Tocchini-Valentini, G.P. (2005) A pre-tRNA carrying intron features typical of Archaea is spliced in yeast. *RNA*, **11**, 70 – 76.
- Sidrauski, C., Chapman, R. and Walter, P. (1998) The unfolded protein response: an intracellular signalling pathway with many surprising features. *Trends Cell. Biol.* **8**, 245 – 249.

- Silber, R., Malathi, V.G. and Hurwitz, J. (1972) Purification and properties of bacteriophage T4-induced RNA ligase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **69**, 3009 – 3013.
- Silva-Filho, M.C. (2003) One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 589 – 595.
- Small, I., Wintz, H., Skashi, K. and Mireau, H. (1998) Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol. Biol.* **38**, 265 – 277.
- Sprinzi, M. and Vassilenko (2005) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.*, **33**, D139 – D140.
- Stange, N. and Beier H. (1986) A gene for the major cytoplasmic tRNA^{Tyr} from *Nicotiana rustica* contains a 13 nucleotide long intron. *Nucleic Acids Res.* **14**, 8691.
- Stange, N., Gross, H.J. and Beier H. (1988) Wheat germ splicing endonuclease is highly specific for plant pre-tRNAs. *EMBO J.* **7**, 3823 – 3828.
- Stange, N., Beier, D. and Beier H. (1991) Expression of nuclear tRNA^{Tyr} genes from *Arabidopsis thaliana* in HeLa cell and wheat germ extracts. *Plant Mol. Biol.* **16**, 865 – 875.
- Stange, N., Beier, D. and Beier H. (1992) Intron excision from tRNA precursors by plant splicing endonucleases requires unique features of the mature tRNA domain. *Eur. J. Biochem.* **210**, 193 – 203.
- Strobel, M.C. and Abelson, J. (1986) Effect of intron mutations on processing and function of *Saccharomyces cerevisiae* SUP53 tRNA *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 1663 – 1673.
- Strobel, M.C. and Abelson, J. (1986) Effect of intron mutations on processing and function of *Saccharomyces cerevisiae* SUP53 tRNA *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 2663 – 2673.
- Sugino, A., Snopek, T.J. and Cozzarelli, N.R. (1977) Bacteriophage T4 ligase: Reaction intermediate and interaction of substrates. *J. Biol. Chem.* **252**, 1732 – 1738.
- Sunderland, P.A., West, C.E., Waterworth, W.M. and Bray C.M. (2004) Choice of start codon in a single transcript determines DNA ligase 1 isoform production and intracellular targeting in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 614 – 616.
- Schwartz, R.C., Greer, C.L., Gegenheimer, P. and Abelson, J. (1983) Enzymatic mechanism of an RNA Ligase from wheat germ. *J. Biol. Chem.* **258**, 8374 – 8383.
- Szweykowska-Kulinska, Z., Senger, B., Keith, G., Fasiolo, F. and Grosjean, H. (1994) Intron-dependent formation of pseudouridines in the anticodon of *Saccharomyces cerevisiae* minor tRNA^{Ile}. *EMBO J.* **13**, 4636 – 4644.

- Tabler, M. and Tsagris, M. (2004) Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci.* **9**, 339 – 348.
- Takuku, H., Minagawa, A., Takagi, M. und Nashimoto, M. (2003) A candidate prostate cancer susceptibility gene encodes tRNA 3' processing endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2272 – 2278.
- Thogersen, H., Morris, H.R., Rand, K.N. and Gait, M.J. (1985) Location of the adenylation site in T4 RNA ligase. *Eur. J. Biochem.* **147**, 325 – 329.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673 – 4680.
- Trotta, C.R., Miao, F., Arn, E.A., Stevens, S.W., Ho, C.K., Rauhut, R. and Abelson, J.N. (1997) The yeast tRNA splicing endonuclease: a tetrameric enzyme with two active site subunits homologous to the archaeal tRNA endonucleases. *Cell*, **89**, 849 – 858.
- Tyc, K., Kikuchi, Y., Konarska, M., Filipowicz, W. and Gross H.J. (1983) Ligation of endogenous tRNA 3' half molecules to their corresponding 5' halves via 2'-phosphomonoester,3',5'-phosphodiester bonds in extracts of *Chlamydomonas*. *EMBO J.* **2**, 605 – 610.
- Valenzuela, P., Venegas, A., Weinberg, F., Bishop R. and Rutter, W.J. (1978) Structure of yeast phenylalanine-tRNA genes: An intervening DNA segment within the coding region for the tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 190 – 194.
- van Tol, H., Stange, N., Gross, H.J. and Beier H. (1987) A human and a plant intron-containing tRNA^{Tyr} gene are both transcribed in a HeLa cell extract but spliced along different pathways. *EMBO J.* **6**, 35 – 41.
- Van Tol, H., Stange, N., Gross H.J. and Beier H. (1987) A human and a plant intron-containing tRNA^{Tyr} gene are both transcribed in a HeLa cell extract but spliced along different pathways. *EMBO J.* **6**, 35 – 41.
- van Tol, H. and Beier, H. (1988) All human tRNA^{Tyr} genes contain introns as a prerequisite for pseudouridine biosynthesis in the anticodon. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1951 – 1966.
- Van Tol, H., Gross, H.J. and Beier, H. (1989) Non-enzymatic excision of pre-tRNA introns? *EMBO J.* **8**, 293 – 300.
- Wang, L.K. and Shuman, S. (2002) Mutational analysis defines the 5'-kinase and 3'-phosphatase active sites of T4 polynucleotide kinase. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1073 – 1080.

- Wang, L.K., Ho, C.K., Pei, Y. and Shuman, S. (2003) Mutational analysis of bacteriophage T4 RNA ligase 1. Different functional groups are required for the nucleotidyl transfer and phosphodiester bond formation of the ligation reaction. *J. Biol. Chem.* **278**, 29454 – 29462.
- Weber, U., Beier, H., Gross, H.J. (1996) Another heritage from the RNA world: self-excision of intron sequences from nuclear pre-tRNAs. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2212 – 2219.
- Westaway, S.K., Phizicky, E.M. and Abelson, J. (1988) Structure and function of the yeast tRNA ligase gene. *J. Biol. Chem.* **263**, 3171 – 3176.
- Willis, I., Hottinger, H., Pearson, D., Chisholm, V., Leupold, U. and Söll, D. (1984) Mutations affecting excision of the intron from a eukaryotic dimeric tRNA precursor. *EMBO J.*, **3**, 1573 – 1580.
- Winey, M. and Culbertson, M.R. (1988) Mutations affecting the tRNA-splicing endonuclease activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **118**, 609 – 617.
- Xu, Q., Phizicky, E.M., Greer, C.L. and Abelson, J.N. (1990a) Purification of yeast transfer RNA Ligase. *Methods Enzymol.*, **181** 463 – 471.
- Xu, Q., Teplow, D., Lee, T.D. and Abelson, J. (1990b) Domain structure in yeast tRNA ligase. *Biochemistry* **29**, 6132 -6138.
- Yin, S., Ho, K. and Shuman, S. (2003) Structure-function analysis of T4 RNA ligase 2. *J. Biol. Chem.*, **278**, 17601 – 17608.
- Yoshihisa, T., Yunoki-Esaki, K., Ohshima, C., Tanaka, N. and Endo, T. (2003) Possibility of cytoplasmic pre-tRNA splicing: the yeast tRNA splicing endonuclease mainly localizes on the mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3266 – 3279.
- Yukawa, Y., Fan, H., Akama, K., Beier, H., Gross, H.J. and Sugiura, M. (2001) A tobacco nuclear extract supporting transcription, processing, splicing and modification of plant intron-containing tRNA precursors. *Plant J.*, **28**, 583 – 594.
- Zawadzki, V. und Gross, H.J. (1991) Rapid and simple purification of T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 1948.
- Zillmann, M., Gorovsky, M.A. and Phizicky, E.M. (1991) Conserved mechanism of tRNA splicing in eukaryotes. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5410 – 5416.
- Zofalova, L., Guo, Y. and Gupta, R. (2000) Junction phosphate is derived from the precursor in the tRNA spliced by the archaeon *Haloflex volcanii* cell extract. *RNA*, **6**, 1019 – 1030.