

**Zusammensetzung eukaryotischer RNase P
aus pflanzlichen Zellkernen und Plastiden**

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

vorgelegt von
Christian Heubeck

aus
Neustadt/Aisch

Würzburg 2003

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:.....

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation "Zusammensetzung eukaryotischer RNase P aus pflanzlichen Zellkernen und Plastiden" 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 13.10.2003

(Christian Heubeck)

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg von September 1999 bis September 2003 unter Anleitung von Frau PD Dr. Astrid Schön angefertigt.

Die 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 biologische Sicherheit beim Robert Koch-Institut, Berlin.

Meinem Großvater

DANKE!

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Priv. Doz. Dr. Astrid Schön für die interessante Themenstellung, ihre stete Unterstützung und ihre fachlichen Ratschläge. Durch ihren persönlichen Einsatz hat sie maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Frau Prof. Dr. H. Beier möchte ich für ihr immerwährendes Interesse am Fortgang meiner Arbeit, ihr persönliches Engagement und insbesondere für die Bereitschaft, das Zweitgutachten für meine Arbeit zu übernehmen, danken.

Herrn Prof. Dr. H. J. Gross danke ich ebenfalls für die Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. U. Fischer möchte ich für die Möglichkeit danken, meine Arbeiten am Institut für Biochemie beenden zu können.

Danken möchte ich auch im Besonderen Olaf Gimple. In seiner freundschaftlichen Art hat er mich durch alle fachlichen, aber auch privaten, Höhen und Tiefen bei meiner Arbeit begleitet. So manch aufmunterndes Wort hat sicher zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Dr. Michael Grimm und Simon Otter möchte ich mich für die vielen kleinen Tipps und Anregungen, aber natürlich auch für die schöne Zeit außerhalb des Labors, bedanken.

Dank gilt auch Anke Meisner, Nikolas Menzel und Sonja Stahl für die fröhliche Zusammenarbeit und das Überlassen von Expressionsklonen.

Karsten Höhn danke ich für seine unerschöpfliche Gelassenheit und Hilfeleistung, wenn ich ihn mal wieder mit einem Computerproblem belästigt habe.

Danken möchte ich auch Patrizia Kunz, Stefanie Kraus, Thomas Müller und Beate Stephan, die mir im Rahmen ihrer Ausbildung und Fortgeschrittenen-Praktika hilfreich zur Seite standen.

Ein spezielles Dankeschön gilt auch Gudrun Grimmer und Hans-Dieter Sickinger für ihre Unterstützung bei den vielen kleinen praktischen und organisatorischen Problemen im Laboralltag.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitskreise Beier, Gross und Grummt danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die zahlreichen Tipps und Anregungen und natürlich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Eltern für die kulinarische, finanzielle und moralische Unterstützung dieser Arbeit bedanken. Dank sei auch meiner Schwester Catrin für viele gute Gespräche. Bei Ute bedanke ich mich für ihr Zuhören, ihr Verständnis und vieles mehr.

„So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig.
Man muß sie für fertig erklären, wenn man nach Zeit und
Umständen das Mögliche getan hat.“

Johann Wolfgang von Goethe, „Italienreise“ (1787)

1. Einleitung	1
1.1. Ribonuklease P: ein ubiquitäres Enzym mit essentieller Funktion	1
1.2. Die Entdeckung der RNase P	1
1.3. Bakterielle RNase P	2
1.3.1. Struktur und Konservierung der bakteriellen RNase P-RNA Untereinheit	2
1.3.2. Substraterkennung und Reaktionsmechanismus	6
1.3.2.1. Substraterkennung durch bakterielle RNase P	6
1.3.2.2. Substratbindung durch bakterielle RNase P	7
1.3.2.3. Der Reaktionsmechanismus der bakteriellen RNase P	10
1.3.4. Das bakterielle RNase P-Protein	11
1.4. Eukaryotische RNase P aus Zellkernen	15
1.4.1. Struktur und Funktion der eukaryotischen RNA-Untereinheit	17
1.4.2. Die Funktion der Protein-Untereinheiten nukleärer RNase P	18
1.4.3. Die Tertiärstruktur der eukaryotischen RNase P aus Zellkernen	19
1.4.4. Die Beziehung zwischen RNase P und RNase MRP	20
1.5. Archaeobakterielle RNase P	21
1.6. RNase P aus Organellen	23
1.6.1. Mitochondrielle RNase P	23
1.6.1.1. Die mitochondrielle RNase P-Protein Untereinheit	23
1.6.1.2. Die mitochondrielle RNase P-RNA Untereinheit	24
1.6.2. RNase P aus Chloroplasten	24
1.6.3. Morphologie und phylogenetische Stellung von <i>Cyanophora paradoxa</i>	25
1.6.4. Funktionelle und strukturelle Eigenschaften der Cyanellen-RNase P von <i>C. paradoxa</i>	27
1.7. Aufgabenstellung	29
2. Material	30
2.1. Chemikalien	30
2.2. Nukleotide und Oligonukleotide	32
2.3. Enzyme, Proteine und Antikörper	33
2.4. Plasmide	34
2.5. Biologisches Material	35
2.5.1. Bakterienstämme	35
2.5.2. λ -Phagen	36
2.5.3. Algenkulturen	36
2.6. Chromatographiemedien	36

2.6.1. Lose Materialien	36
2.6.2. Fertige Chromatographieplatten, Folien und Säulen	36
2.7. Gebrauchsfertige Analyse-Reagentiensätze (<i>Kits</i>)	36
2.8. Geräte und sonstige Materialien	36
3. Methoden	38
3.1. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	38
3.1.1. Auftrennung von Nukleinsäuren durch horizontale Agarosegel-Elektrophorese	38
3.1.1.1. Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA	38
3.1.1.2. Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von RNA	39
3.1.2. Polyacrylamid-Elektrophorese zur Analyse von Nukleinsäuren (PAGE)	39
3.1.3. Lokalisierung von Nukleinsäuren	40
3.1.3.1. Lokalisierung durch Fluoreszenzlöschung	40
3.1.3.2. Lokalisierung durch Toluidinblaufärbung	41
3.1.3.3. Lokalisierung durch Autoradiographie	41
3.1.4. Elution von gelelektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren aus der Gelmatrix	41
3.1.4.1. Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen	41
3.1.4.2. Elution von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen	42
3.2. Lokalisierung spezifischer Nukleinsäuresequenzen durch Hybridisierung	42
3.2.1. Übertragung von Nukleinsäurefragmenten aus Agarosegelen auf Membranfilter	42
3.2.1.1. Kapillar-Transfer von Nukleinsäuren aus Agarosegelen auf Membranfilter	42
3.2.1.2. Alkalischer Abwärtstransfer von DNA	43
3.2.2. Übertragung von Nukleinsäurefragmenten aus Polyacrylamidgelen auf Membranfilter	44
3.2.3. Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden	45
3.2.4. Waschen der Membranfilter	46
3.2.5. 5'-Markierung von Oligodesoxyribonukleotiden mit [γ - 32 P] rATP	46
3.2.6. Isolierung von radioaktiv 5'-markierten Oligodesoxyribonukleotiden	46
3.3. Isolierung von Nukleinsäuren	47
3.3.1. Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	47
3.3.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung	47
3.3.2.1. UV-Spektroskopische Quantifizierung von Nukleinsäuren	47
3.3.2.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren durch Ethidiumbromidbindung	48
3.3.3. Abtrennung von Proteinen aus wässrigen Nukleinsäurelösungen	48
3.3.4. Isolierung von DNA	49
3.3.4.1. Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab und Anlegen von Glycerinkulturen	49
3.3.4.2. Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	49
3.3.5. Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen	50
3.3.5.1. Präparation von Gesamt-RNA durch Phenol-Extraktion	50
3.3.5.2. Präparation von Gesamt-RNA mit Hilfe des <i>RNeasy Plant Mini Kit</i>	51
3.3.5.3. Anreicherung von mRNA aus Gesamt-RNA Präparationen	51

3.4. Amplifizierung von DNA durch die Polymeraseketteneaktion (PCR)	52
3.4.1. Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von DNA-Matrizen	52
3.4.2. Kombinierte Reverse-Transkription/Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	53
3.4.3. Kolonie-PCR	54
3.4.4. Oligodesoxynukleotid-gestützte bidirektionale Mutagenese	55
3.4.5. Analyse und Aufreinigung von PCR-Produkten	56
3.5. <i>In vitro</i> Transkription mit T7-RNA-Polymerase	56
3.5.1. Herstellung von RNase-freiem ddH ₂ O mit DEPC	56
3.5.2. Präparative T7-Transkription	56
3.5.3. Präparation radioaktiv markierter Transkripte	57
3.6. Sequenzierung von DNA mit <i>AmpliTaq polymerase FS Big Dye Terminator</i>	58
3.7. Klonierung von Fremd-DNA in Plasmid-Vektoren	59
3.7.1. Präparation von Plasmidvektoren durch Restriktionshydrolyse	59
3.7.2. Dephosphorylierung linearisierter Plasmide mit alkalischer Phosphatase (CIP)	59
3.7.3. Erzeugung glatter Enden und 5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten	60
3.7.4. Ligation von PCR-Produkten	61
3.7.5. Präparation chemokompetenter Zellen (Hanahan, 1983)	61
3.7.6. Präparation elektroporationskompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	62
3.7.7. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	63
3.7.7.1. Hitzeschocktransformation	63
3.7.7.2. Elektroporation	63
3.8. Charakterisierung von Proteinen	63
3.8.1. Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen	63
3.8.1.1. Dialyse	63
3.8.1.2. Konzentrieren von Proteinlösungen durch Ultrafiltration	63
3.8.1.3. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	64
3.8.1.4. Fällung von Proteinen mit Methanol/Aceton	64
3.8.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	64
3.8.2.1. Konzentrationsbestimmung nach Bradford	64
3.8.2.2. Konzentrationsbestimmung durch UV-Messung	65
3.8.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	66
3.8.4. Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	67
3.8.4.1. Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	67
3.8.4.2. Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	68
3.8.5. Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (<i>Western-Blot</i>)	69
3.8.6. Anfärben von membrangebundenen Proteinen	70
3.8.6.1. Anfärben mit Ponceau S	70
3.8.6.2. Anfärben mit Amidoschwarz	70
3.8.7. Nachweis von Proteinen durch gekoppelte Immunreaktion	70
3.8.7.1. Immundetektion durch gekoppelte Merrettich-Peroxidasereaktion	71
3.8.7.2. Immundetektion durch gekoppelte Alkalische Phosphatasereaktion	72
3.8.7.3. Befreiung membrangebundener Proteine von gebundenen Antikörpern	73

3.8.8. Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose	73
3.8.8.1. Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose	73
3.8.8.2. Immunpräzipitation aus <i>Cyanophora paradoxa</i> S100-Extrakt	74
3.8.8.3. Elution von immunopräzipitierten Proteinen	75
3.8.9. Herstellung und Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern	75
3.8.9.1. Immunisierung von Kaninchen	75
3.8.9.2. Reinigung von Antikörperserum durch Ammoniumsulfatfällung	75
3.8.9.3. Entfernung von anti- <i>E. coli</i> -Komponenten aus einer Antikörper-Präparation	76
3.8.9.4. Handhabung von Antikörpern	76
3.9. Präparation rekombinanter Proteine	77
3.9.1. Expressionssysteme auf Basis der <i>E. coli</i> RNA-Polymerase (pQE-Vektoren)	77
3.9.2. Das Bakteriophage T7-Expressionssystem (pRSET-Vektor)	77
3.9.3. Überexpression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> -Stämmen	78
3.9.3.1. Überexpression im analytischen Maßstab	78
3.9.3.2. Umgang mit Protein-Einschlußkörperchen (<i>Inclusion Bodies</i>)	81
3.9.3.3. Überexpression im präparativen Maßstab	82
3.10. Proteinaufreinigungsmethoden	82
3.10.1. Säulenchromatographie	82
3.10.1.1. Denaturierende Aufreinigung eines rekombinanten Proteins über Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	82
3.10.1.2. Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose	83
3.10.2. Ultrazentrifugation im Glyceringradienten	85
3.10.3. Präparation eines S100-Extrakts	86
3.10.4. Silanisieren von Plastikgefäßen	86
3.11. Kultivierung von Algen und Bakterien	87
3.11.1. Kultivierung von <i>E. coli</i>	87
3.11.1.1. Kultivierung von <i>E. coli</i> in Flüssigkultur	87
3.11.1.2. Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen als Plattenkultur	87
3.11.2. Anzucht von <i>B. subtilis</i> in Flüssigkultur	88
3.11.3. Anzucht und Ernte von <i>Synechocystis</i> PCC6803 in Flüssigkultur und auf Agarplatten	88
3.11.4. Anzucht von <i>Cyanophora paradoxa</i> in Flüssigkultur	89
3.11.5. Isolierung von Cyanellen aus <i>C. paradoxa</i>	90
3.12. Prozessierung von Vorläufer-tRNA durch RNase P	91
3.12.1. <i>In vitro</i> Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P-RNA	91
3.12.2. Homologe und Heterologe Rekonstitution	92
3.12.3. <i>In vitro</i> Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P Holoenzyme	92
3.12.3.1. Prozessierung von pre-tRNA durch rekonstituiertes RNase P Holoenzym	92
3.12.3.2. <i>In vitro</i> Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P-Enzympräparationen	93
3.13. Erstellung einer cDNA-Bibliothek im Uni-ZAP [®] XR Vektor-System	93
3.13.1. Synthese der doppelsträngigen cDNA	94
3.13.2. Ligation der cDNA in Uni-ZAP [®] XR und Verpackung rekombinanter cDNA in λ -Phagen	95
3.13.3. Amplifikation und Titerbestimmung der sekundären λ -cDNA-Bibliothek	96

3.13.4. Verwendung des <i>E. coli</i> -Stammes XL1-Blue MRF'	97
3.13.5. Vorbereitung einer <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'-Bakterienstamm-Suspension	97
3.13.6. Bakteriophagen-Infektion und Ausplattieren des <i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'-Stamms	97
3.13.7. Induktion der Phagen-gekoppelten cDNA-Expression	98
3.13.8. Identifizierung spezifischer Phagen-Klone durch Protein-Protein-Interaktion	98
3.13.9. Identifizierung spezifischer Phagen-Klone durch RNA-Protein-Interaktion	98
3.13.9.1. Vorbereitung und Vorhybridisierung der Membran	99
3.13.9.2. Hybridisierung [³² P]-markierter RNase P-RNA an die Bibliotheksproteine	99
3.13.9.3. Präparation der Hefe-Träger-RNA	100
3.13.10. Isolierung potentiell positiver Plaques	100
3.13.11. Überprüfung potentiell positiver Plaques	100
3.13.12. <i>In vivo</i> -Exzision von cDNA aus dem Uni-ZAP® XR Vektor-System	100
3.14. Bioinformatische Methoden	102
3.14.1. Datenbanksuche	102
3.14.2. Erstellung von Alignments	102
3.14.3. Strukturmodellierung durch Sequenzalignment	102
4. Ergebnisse	103
4.1. Expression und Isolierung rekombinanter bakterieller RNase P-Proteine	103
4.1.1. Überproduktion und Isolierung des RNase P-Proteins aus <i>Synechocystis</i> PCC6803	103
4.1.1.1. Expression in LB-Medium	103
4.1.1.2. Expression in M9-Minimalmedium	
4.1.1.3. Isolierung des rekombinanten SynPP	104
4.1.2. Überproduktion und Isolierung des RNase P-Proteins aus <i>Prochlorococcus marinus</i> PCC9511 (Pm9511PP)	106
4.2. Präparation und Charakterisierung von anti-SynPP-Antikörpern	108
4.2.1. Herstellung von Antikörpern	108
4.2.2. Untersuchungen zur Antikörper-Präparation und Optimierung der in <i>Western-Blot</i> -Analysen verwendeten Antikörper-Mengen	108
4.2.3. Nachweis der Erkennung von SynPP und Spezifität von α -SynPP-AB	109
4.2.3. Optimierung der Bedingungen für die Übertragung von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran	109
4.3. Konstruktion von RNase P-RNA T7-Transkriptionsklonen	110
4.3.1. Mutagenese der RNase P-RNA aus <i>Prochlorococcus marinus</i> PCC1375	110
4.3.1.1. Bestimmung der Mg ²⁺ -Abhängigkeit der Ribozymreaktion der PmRPR-Mutanten	111
4.3.2. Klonierung des <i>Synechocystis</i> PCC6803 <i>mpB</i> Gens	113
4.4. T7-Transkription von RNA-Genen und ihren Derivaten	114
4.5. Rekonstitution und funktionelle Charakterisierung chimärer RNase P-Holoenzyme	115
4.5.1. Funktionelle Untersuchung der <i>C. paradoxa</i> Cyanellen-RNase P durch heterologe Rekonstitution	115

4.5.1.1. Heterologe Rekonstitution der Cyanellen-RNase P-RNA mit SynPP zum funktionellen Holoenzym	116
4.5.1.2. Vergleich der Prozessierungsaktivität von chimären Holoenzymen aus SynPP und Cyanellen-RNase P-RNAs	117
4.5.1.3. Heterologe Rekonstitution chimärer Holoenzyme aus CyRPR und Pm9511PP	118
4.5.1.4. Vergleich der Prozessierungsaktivitäten	119
4.5.2. Funktionelle Charakterisierung von RNase P-RNA aus <i>Glaucozystis nostochinearum</i>	120
4.5.2.1. Ribozymeigenschaften von GlauRPR	121
4.5.2.2. Heterologe Rekonstitution mit GlauRPR und SynPP	121
4.6. Prozessierung des 5'-Endes von pre-tRNA ^{Arg} und pre-tRNA ^{Arg} ΔCCA durch chimäre RNase P	122
4.6.1. Prozessierung von pre-tRNA ^{Arg} und pre-tRNA ^{Arg} ΔCCA durch PmRPR/Pm9511PP-Holoenzym	123
4.6.2. Prozessierung von pre-tRNA ^{Arg} und pre-tRNA ^{Arg} ΔCCA durch CyRPR/Pm9511PP-Holoenzym	123
4.6.3. Prozessierung von pre-tRNA ^{Arg} und pre-tRNA ^{Arg} ΔCCA durch CyRPR/SynPP-Holoenzym	124
4.7. Präparation von 5'-pre-tRNA-Prozessierungsextrakten aus den Cyanellen von <i>C. paradoxa</i>	124
4.8. Immunologische Beziehung zwischen Cyanobakterien und Plastiden	125
4.9. Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität mit anti-SynPP-Antikörpern	126
4.9.1. Kovalente Koppelung von α-SynPP-AB an Protein-A-Sepharose	126
4.9.2. Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität aus <i>Synechocystis</i> S100-Extrakt mit α-SynPP-AB	126
4.9.3. Immunopräzipitation der <i>C. paradoxa</i> Cyanellen-RNase P-Aktivität mit cyanobakterien-spezifischen Antikörpern	128
4.10. Darstellung und Charakterisierung zirkular permutierter Cyanellen-RNase P-RNA mit kovalent verknüpfter pre-tRNA	130
4.10.1. Klonierung der zirkular permutierten RNase P-RNA pCyP305Tetra	131
4.10.2. Ligation des Substrat-pre-tRNA-Gens	132
4.10.3. Funktionelle Charakterisierung von cpCyRPR-pre-tRNA	134
4.10.3.1. Ribozymeigenschaften von cpCyRPR-pre-tRNAs	134
4.10.3.2. Heterologe Rekonstitution von cpCyP305Tetra-pre-tRNA und SynPP	135
4.10.3.3. Inhibition der cpCyP305Tetra-pre-tRNA-Prozessierungsreaktion	137
4.11. Charakterisierung des RNase P Holoenzym aus den Cyanellen von <i>C. paradoxa</i> durch Ultrazentrifugation im Glyceringradienten	139
4.11.1. 5'-Prozessierungsaktivität in den Gradienten-Fractionen	141
4.11.2. Nachweis der Cyanellen RNase P-RNA	142
4.11.2.1. Identifizierung der Cyanellen RNase P-RNA durch RT-PCR und <i>Southern</i> -Blot	142
4.11.2.2. Nachweis der Cyanellen RNase P-RNA durch <i>Northern</i> -Blot	143

4.11.3. Proteinzusammensetzung	144
4.11.4. Charakterisierung prozessierungsaktiver Fraktionen durch immunologische Methoden	144
4.11.4.1. Enzymgekoppelter immunologischer Nachweis	
4.11.4.2. Immunopräzipitation aus RNase P-aktiven Fraktionen mit α -SynPP-AB	145
4.11.5. Größenabschätzung des <i>C. paradoxa</i> Cyanellen-RNase P-Holoenzym	146
4.12. Erstellung einer <i>C. paradoxa</i> cDNA-Bibliothek in Uni-ZAP XR	147
4.12.1. Isolierung der Gesamt RNA und Anreicherung der mRNA	147
4.12.2. Präparation der cDNA für die gerichtete Klonierung	148
4.12.3. Ligation der Adaptoren und Größenfraktionierung	148
4.12.4. Ligation der cDNA in λ -Uni-ZAP XR-Vektor und Titration der primären λ -cDNA-Bibliothek	149
4.12.5. Amplifikation und Titration der sekundären Lambda cDNA-Bibliothek	150
4.13. <i>Screening</i> der <i>C. paradoxa</i> λ -cDNA-Bibliothek	151
4.13.1. Suche nach RPP-codierenden Phagen-Klonen über Antikörperbindung	151
4.13.2. Suche nach Phagen-Klonen, welche RNA-bindende Proteine exprimieren	152
4.13.2.1. Charakterisierung der erhaltenen Klone	153
4.13.2.2. <i>In vivo</i> -Exzision des Phagemids aus isolierten λ -Klonen und Charakterisierung der klonierten cDNAs	153
4.14. Nukleäre RNase P aus Pflanzen	155
4.14.1. Analyse des <i>ATpop1</i> -Spleiß-Musters	155
4.14.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	156
4.14.1.2. <i>Northern-Blot</i> Hybridisierung zur Größen-Bestimmung von <i>ATpop1</i> -mRNA	156
4.14.2. Expression und Aufreinigung von ATPOP1/ATPOP1 Δ I	157
4.14.3. α -ATPOP1P-AB -Aufreinigung	158
4.14.4. Test auf Spezifität der Antikörper durch enzymgekoppelten immunologischen Nachweis	158
4.14.5. Immunopräzipitation der <i>T. aestivum</i> - RNase P-Aktivität mit α -ATPOP1P-AB	160
5. Diskussion	162
5.1. RNase P aus Cyanellen und Cyanobakterien	162
5.1.1. RNase P-RNA in Cyanobakterien und Cyanellen	162
5.1.2. Cyanobakterielle RNase P-Proteine	164
5.2. Funktionelle Charakterisierung der RNase P-RNA aus den Plastiden von <i>C. paradoxa</i> und <i>G. nostochinearum</i>	168
5.2.1. Besitzt GlauRPR Ribozymeigenschaften?	168
5.2.2. Heterologe Rekonstitution von Plastiden-RNase P-RNA mit cyanobakteriellen RNase P-Proteinen	169
5.2.3. Einfluss der CyRPR Nukleotide A22 und A213 auf die Prozessierungseigenschaften des chimären Holoenzym	171
5.2.4. Substratspezifität chimärer Holoenzyme	172
5.2.5. Konstruktion und funktionelle Charakterisierung zirkular permutierter Cyanellen-RNase P-RNAs	173

5.3. <i>In vitro</i> Substratspezifität des RNase P-Holoenzym aus <i>P. marinus</i>	175
5.4. Immunologische Verwandtschaft zwischen cyanobakteriellem und Cyanellen-RNase P-Protein	176
5.5 Holoenzymaufbau und Identifizierung von Proteinkomponenten der <i>C. paradoxa</i> Cyanellen-RNase P	177
5.6. Phylogenetische Stellung der Cyanellen-RNase P	179
5.7. <i>Screening</i> der <i>C. paradoxa</i> λ -cDNA-Expressionsbibliothek	180
5.7.1. Suche nach RNase P codierenden Phagen-Klonen über Antikörperbindung	181
5.7.2. Suche nach Phagen-Klonen, welche RNA-bindende Proteine exprimieren	181
5.8. Nukleäre RNase P aus höheren Pflanzen	183
5.8.1. Das RNase P Protein ATPOP1 aus <i>A. thaliana</i>	183
5.8.2. RNase P aus Weizen	184
5.9 Ausblick	185
6. Zusammenfassung	186
7. Literaturverzeichnis	188
Anhang I – IV	
Verzeichnis der Abkürzungen	
Abbildungsverzeichnis	

1. Einleitung

1.1. Ribonuklease P: ein ubiquitäres Enzym mit essentieller Funktion

Die Ribonuklease P (RNase P) ist ein für die Reifung der Transfer-Ribonukleinsäuren (tRNAs) essentielles Enzym. Diese Ribonukleinsäuren spielen neben ihrer Hauptfunktion als Adaptormoleküle der Translation auch in verschiedenen Regulations- und Biosynthesewegen eine wichtige Rolle. In der Zelle werden sie als Vorläufermoleküle (pre-tRNAs) mit 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen transkribiert; dabei können sie zusätzliche, intervenierende Sequenzen (Introns) enthalten. Erst durch die Entfernung aller dieser nichtcodierenden Sequenzen entsteht die funktionsfähige reife tRNA. Dieser Reifungsprozess umfasst die hydrolytische Abspaltung der 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen und das Einführen von Nukleotidmodifikationen. Er kann durch das Entfernen von Introns und das Anhängen der CCA-Sequenz am 3'-Ende der tRNA ergänzt werden.

Die Endonuklease RNase P hydrolysiert dabei strikt Magnesium-abhängig die Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Flanke und reifer tRNA des tRNA-Primärtranskripts. Es verbleiben eine endständige 5'-Phosphatgruppe an der gereiften tRNA und eine 3'-Hydroxylgruppe an der 5'-Flanke. RNase P ist das strukturell und funktionell außergewöhnlichste Enzym im Biosyntheseweg der tRNAs.

Als ubiquitäres Enzym existiert RNase P in allen Organismen sowie den genetisch kompetenten Organellen der eukaryotischen Zelle: Kern, Mitochondrien und Chloroplasten. Das Enzym zeigt jedoch eine außerordentliche Variabilität in Aufbau und Funktion. In allen bisher genauer untersuchten Organismen und Organellen besteht RNase P aus einer RNA-Untereinheit und bis zu zehn Protein-Untereinheiten (Krupp *et al.*, 1986; Bartkiewicz *et al.*, 1989; Lee und Engelke, 1989; Morales *et al.*, 1989; Nieuwlandt *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1996; Baum *et al.*, 1996; Chamberlain *et al.*, 1998; Jarrous *et al.*, 1998; Jarrous und Altman, 2001). RNase P wird deshalb als Ribonukleoprotein beschrieben. Lediglich für die RNase P aus den Chloroplasten und Mitochondrien höherer Pflanzen und aus animalen Mitochondrien konnte die Existenz einer RNA-Untereinheit bis jetzt nicht eindeutig bewiesen werden.

Die pre-tRNA-Spaltungsreaktion kann von der RNA-Komponente bakterieller RNase P unter bestimmten Bedingungen *in vitro* - ohne Proteinuntereinheit – durchgeführt werden; sie ist deshalb ein Ribozym (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Für die RNase P-RNAs aus eukaryotischen Zellkernen (Pitulle *et al.*, 1998), Organellen (Groom *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1996; Rossmanith und Karwan, 1998) und einigen Archaea (LaGrandeur *et al.*, 1993; Pannucci *et al.*, 1999) konnte diese *in vitro* Ribozym-Aktivität bis jetzt nicht nachgewiesen werden.

1.2. Die Entdeckung der RNase P

Ausgangspunkt der Entdeckung von RNase P war eine temperatursensitive *E. coli*-Mutante, die unter nicht-permissiven Wachstumsbedingungen tRNA-Vorläufermoleküle akkumulierte (Altman, 1971). Diese pre-tRNAs verfügten noch über die 5'-Flanke des Primärtranskripts. Auf der Suche nach dem für diesen Prozessierungsschritt verantwortlichen Enzym stieß B. Stark auf ein bis dato unerklärliches Phänomen: *in vitro* besaß das Enzym unter Niedrigsalzbedingungen hitzelabile, unter Hochsalzbedingungen hingegen hitzestabile Aktivität. In weiterführenden Untersuchungen konnte erstmals der Ribonukleoprotein-Charakter des Enzyms sowie eine essentielle Funktion der RNA-Untereinheit bei der

Katalyse gezeigt werden (Stark *et al.*, 1978). Koe *et al.* (1980) zeigten erstmals, dass sich RNA- und Protein-Untereinheit trennen und anschließend wieder zu aktivem Holoenzym rekonstituieren lassen. 1983 entdeckten schließlich Guerrier-Takada *et al.* die katalytische Aktivität und damit den Ribozym-Charakter der RNase P-RNA Untereinheit unter Hochsalzbedingungen. Cech *et al.* (1982) hatten nur kurz zuvor erstmals das Tetrahymena-Ribozym beschrieben. Die Entdeckung der Ribozyme veränderte die bis dahin dogmatische Aufgabenteilung zwischen Nukleinsäuren und Proteinen. Das neue Wissen um die Doppelfunktion der RNA als Informationsträger und Biokatalysator, vereint in einer Molekülklasse, unterstützte dabei die Modellvorstellungen von einer präbiotischen RNA-Welt (Gilbert, 1986).

Die meisten heute bekannten Ribozyme, wie *Hammerhead* oder das rRNA-Intron aus *Tetrahymena*, sind nicht zu mehrfachem Substratumsatz fähig, da sie sich bei der Hydrolysereaktion selbst zerstören (Doherty und Doudna, 2001; Blount und Uhlenbeck, 2002). Die RNA-Komponente der bakteriellen RNase P stellt hier immer noch eine äußerst bemerkenswerte Ausnahme dar: RNase P ist das einzige natürlich vorkommende Ribozym, welches die *trans* liegenden Substrate spaltet (Gilbert, 1986). Sie ist zu mehrfachem Substratumsatz fähig und somit ein wirklicher Katalysator.

Für die Entdeckung katalytisch aktiver RNA wurden S. Altman und T. Cech 1989 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet (Altman, 1990).

1.3. Bakterielle RNase P

Insbesondere wegen ihrer Ribozymeigenschaften sind die RNase P-Enzyme aus Bakterien heute am besten charakterisiert. Das bakterielle RNase P-Holoenzym setzt sich aus einem 350-450 nt langen RNA-Molekül, welches vom *rnpB*-Gen codiert wird und einer 14-15 kDa großen, durch *rnpA* codierten, Protein-Untereinheit zusammen (Darr *et al.*, 1992).

1.3.1. Struktur und Konservierung der bakteriellen RNase P-RNA Untereinheit

Obwohl eine Sequenz-Homologie von nur 10-15 % besteht, ist allen eubakteriellen RNase P-RNA Untereinheiten eine minimale Konsensusstruktur zu eigen (Haas *et al.*, 1994; Abb. 1-1). Um auch *in vitro* enzymatisch aktiv zu sein, müssen alle strukturellen Domänen der RNase P-RNA in einer katalytisch kompetenten Tertiärstruktur angeordnet sein. Diese Grundstruktur besteht aus elf basengepaarten Abschnitten (P1, P2, P3, P4, P5, P7, P8, P9, P10, P11 und P15). Zusätzlich lassen sich fünf Regionen mit hochkonservierten Basen (CR I bis CR IV) erkennen. Diese Regionen können auch in eukaryotischer RNase P-RNA lokalisiert werden (1.4.1.; Frank *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2002). Alle bekannten bakteriellen RNase P-RNA Sequenzen werden auf Grund ihrer strukturellen Merkmale in zwei Klassen eingeteilt: Typ A und Typ B (Abb. 1-2). Die RNA-Untereinheit des Typ A findet sich in Gram-negativen Bakterien, sowie Gram-positiven Bakterien mit einem hohen genomischen GC-Gehalt. *E. coli* M1-RNA steht stellvertretend für Typ A. Typ B wird durch *B. subtilis* RNase P-RNA repräsentiert. Diese evolutiv jüngere RNA findet sich in Gram-positiven Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. Vergleicht man beide RNA-Typen sind mehrere Unterschiede feststellbar. Typ A verfügt über die zusätzlichen Helices P13 und P14. Im Anschluss an P15 findet sich P16, in einigen Fällen P17. Typ B besitzt dagegen zwischen P10 und P11 eine zusätzliche Helix P10.1. Für dieses Strukturelement wird

eine die Ribozymstruktur stabilisierende Wechselwirkung mit dem P12 abschließenden *Tetra-loop* angenommen. (Siegel *et al.*, 1996; Massire *et al.*, 1998). Neben der nicht verlängerten P15 existieren die Helices P15.1 und P15.2; zwischen P5 und P7 findet sich P5.1

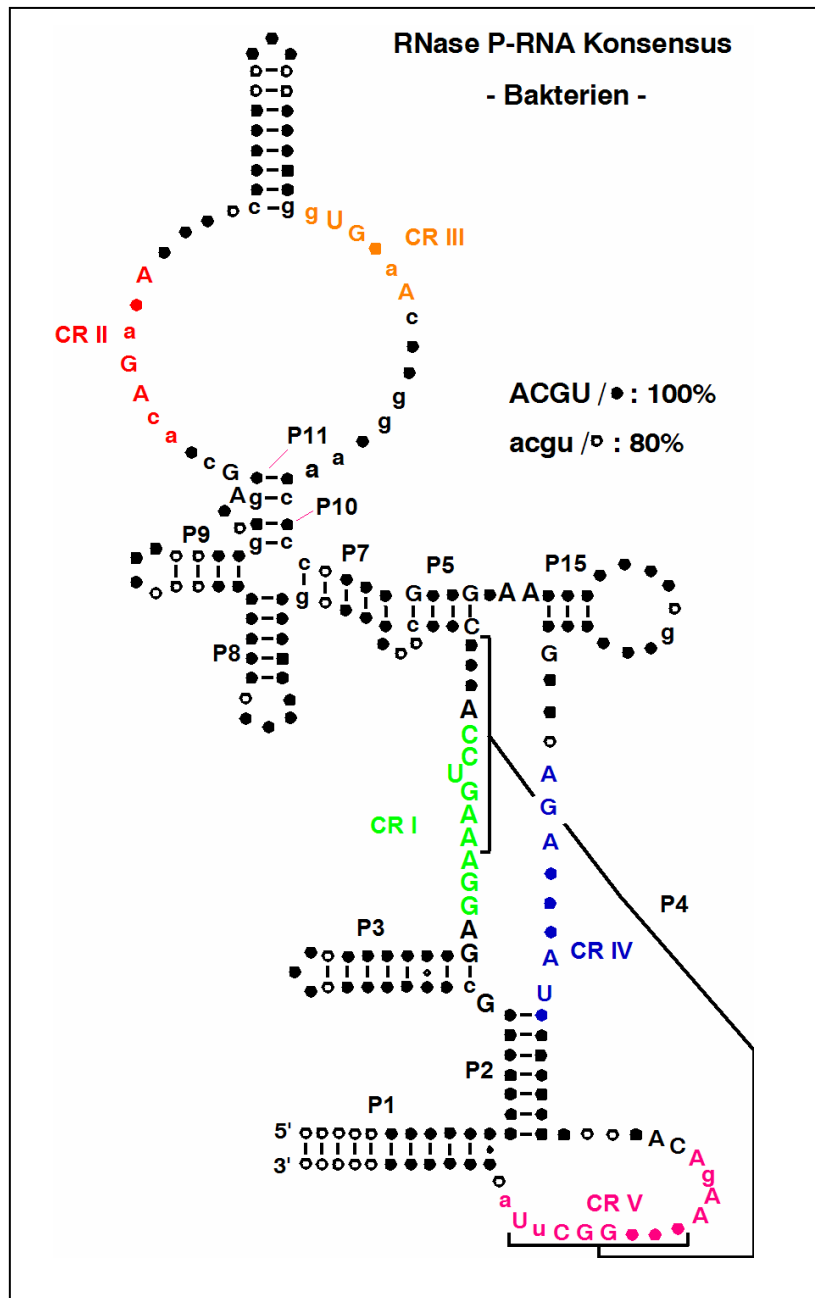


Abb. 1-1: Minimale Konsensusstruktur der eubakteriellen RNase P-RNA

Zur Erstellung der Konsensusstruktur wurden nur Strukturelemente berücksichtigt, die in allen Eubakterien enthalten sind. Vollständig konservierte Nucleotide werden durch Großbuchstaben gekennzeichnet. Kleinbuchstaben bezeichnen Nucleotide, die in mindestens 80 % aller Eubakterien konserviert sind. Schwarz ausgefüllte Kreise symbolisieren Nucleotide, die in keiner RNase P-RNA fehlen, während solche, die in mindestens 80 % der Eubakterien identifiziert wurden, durch leere Kreise dargestellt werden (Haas *et al.*, 1994; Siegel *et al.*, 1996). Regionen, die auch in eukaryotischer RNase P-RNA konserviert sind, sind farbig dargestellt (CR I bis CR V; Xiao *et al.*, 2002).

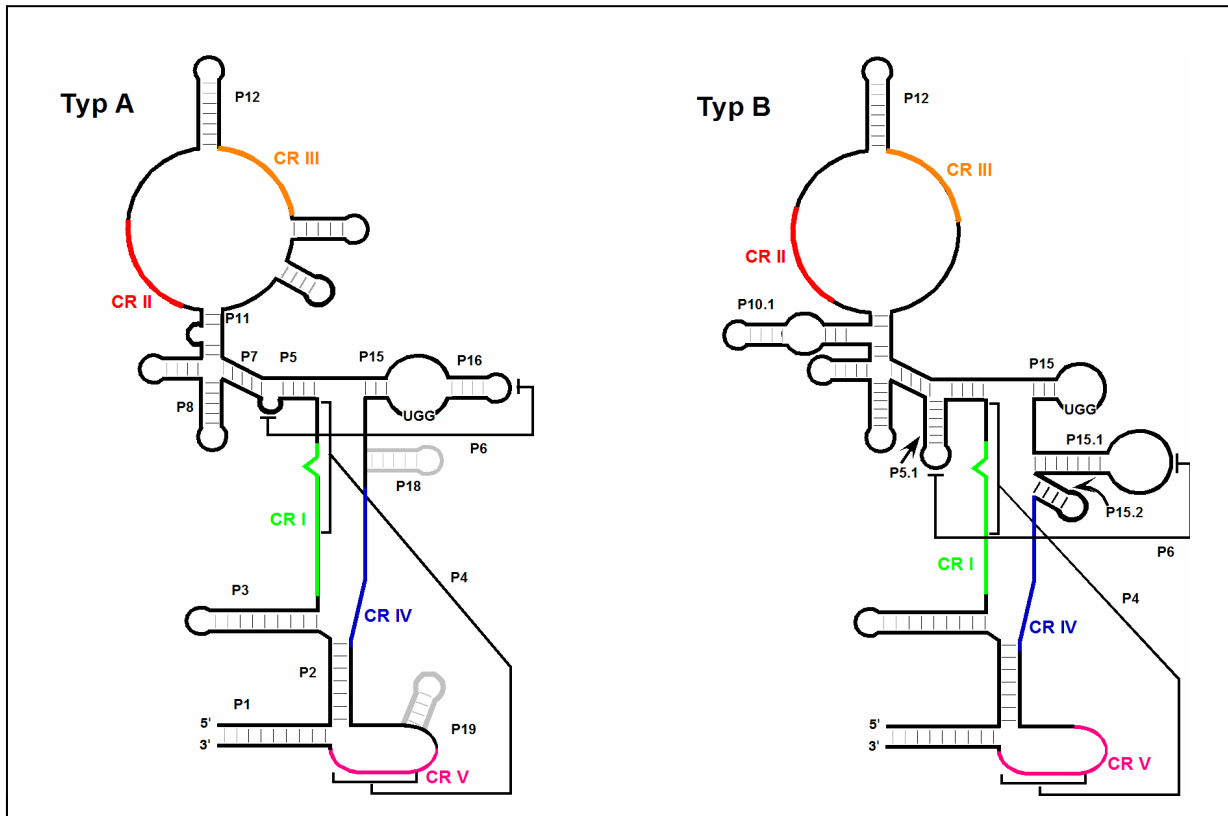


Abb. 1-2: Schematische Sekundärstruktur-Darstellung von Typ A und Typ B RNase P-RNAs

Die universal, auch in Eukaryoten, konservierten Elemente CR I bis CR V sind farbig dargestellt; P18 und P19, welche nicht zwingend konserviert sind, in grau. Die minimale Zahl an Basenpaarungen pro Helix ist durch dicke, schwarze Linien repräsentiert, Abweichungen hiervon in grau. Die Fernwechselwirkungen P4 und P6 sind durch Linien angedeutet. Das 3'-CCA-Substratbindungsmotiv GGU in L15 ist durch Buchstaben repräsentiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind in Struktur B nur die sich von A unterscheidenden Strukturelemente benannt (Schön, 2000).

Jede bakterielle RNase P-RNA-Untereinheit lässt sich in zwei Domänen aufteilen. Domäne I beinhaltet die Helices P7-P14 und ist für die Substraterkennung zuständig, während Domäne II mit den Helices P1-P5.1 und P15-P20 das Katalysezentrum umfasst (Loria und Pan, 1996). Domäne I besteht aus drei irregulären Helices. In Typ A bilden P7, P10 und P11 zusammen mit L11/12 und P12 eine lange irregulär gepaarte Region. Daneben sind P8 und P9 ebenfalls koaxial gestapelt, während P13/P14 die dritte Helix bilden. Die Wechselwirkungen in Domäne I des Typ B sind annähernd gleich. Lediglich P10.1 übernimmt auf Grund des Fehlens von P13/P14 vollständig deren Rolle zur Stabilisierung der Tertiärstruktur. Die räumliche Fixierung der doppelsträngigen Regionen in Domäne I geschieht durch mehrere Wechselwirkungen der koaxialen Stapel untereinander. Während Domäne I in Typ A zusätzlich durch Interaktion von L13 mit dem Akzeptormotiv in P12 stabilisiert wird (Massire *et al.*, 1998), wird in Typ B durch eine L12/P10.1a Fernwechselwirkung ein analoger Effekt erzielt (Tanner und Cech, 1995).

In Domäne II findet sich ebenfalls ein Motiv aus drei gestapelten Helices. Sowohl in Typ A als auch in Typ B bilden P1/P4/P5 die erste und P2/P3 die zweite Basis. Die dritte Helix wird in Typ A durch P18, in Typ B durch den koaxialen Stapel P15.1/P15.2 dargestellt. P5.1 verlängert in Typ B P1/P4/P5 im Anschluss an P5 und kommt deshalb P15.1 räumlich sehr nahe (Chen *et al.*, 1998). Eine deshalb

mögliche Wechselwirkung zwischen P5.1 und P15.1 (P22) wurde häufig postuliert (Haas *et al.*, 1991, Haas *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1998), konnte jedoch erstmals von Otter (2001) für Phytoplasma RNase P-RNA durch Mutationsanalyse bestätigt werden.

Eine vergleichbare Wechselwirkung P6 findet sich für *E. coli* zwischen P17 und der Schlaufe J5/7 (Haas *et al.*, 1991). Zur weiteren Stabilisierung der Ribozym-Gesamtstruktur tragen mehrere zusätzliche Fernwechselwirkungen zwischen den beiden Domänen bei: Für Typ A postulierten Brown *et al.* (1996) eine Wechselwirkung des *Tetraoops* L18 und L14 mit gepaarten Basen aus P8 unter Ausbildung von Basentriplets. Eine Interaktion des *Tetraoops* L9 mit einem *Tetraoop*-Akzeptor in P1 konnte von Massire *et al.* (1997) gezeigt werden. Auf Grund dieser Ergebnisse wird außerdem eine Fernwechselwirkung zwischen L8 und Helix P4 angenommen.

Für Typ B wird als einzige Wechselwirkung zwischen den Domänen eine L8/P4-Interaktion postuliert (Harris *et al.*, 1997).

Basierend auf einer Vielzahl von unterschiedlichen Ansätzen lassen sich für die zentrale Domäne der RNase P-RNAs von *E. coli* und *B. subtilis* Raumstrukturmodelle aufstellen (Abb. 1.4.; Harris *et al.*, 1994; Westhof und Altman, 1994; Westhof *et al.*, 1996; Harris *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1998; Massire *et al.*, 1998). Obwohl die meisten dieser Modelle im Detail voneinander abweichen, gleichen sie sich alle in der Lokalisierung einer zentralen, katalytisch entscheidenden Domäne: Helix P4. P4 wird von zwei hoch konservierten RNA-Abschnitten gebildet (CR II und CR V; Abb. 1-2). Bestimmte Phosphoratome im Rückgrat dieser Helix sind von entscheidender Bedeutung für die Bindung von Mg^{2+} -Ionen; gleichzeitig spielen sie eine wichtige Rolle bei der Bindung des Akzeptor-Stamms der pre-tRNA. (Hardt *et al.*, 1995; Harris und Pace, 1995; Schmitz und Tinoco, 2000). Die Konservierung dieser essentiellen Strukturelemente impliziert dabei die Erhaltung der katalytischen Funktion (Chen und Pace, 1997).

Für einzelne Domänen der *E. coli* RNase P-RNA konnte die Struktur durch NMR-Versuche bestimmt werden: Easterwood und Harvey (1997) lösten die Struktur der J15/16 Domäne, während dies Schmitz und Tinoco (2000) für die P4-Helix gelang. Krasilnikov *et al.* (2003) lösten erst kürzlich die Struktur der Domäne I für *B. subtilis* durch Kristallstrukturanalyse (Abb. 1-3):

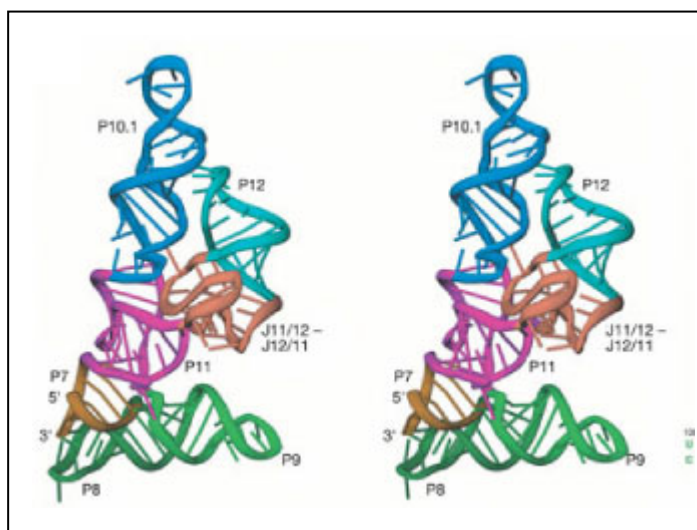


Abb. 1-3:
Kristallstruktur der Domäne I aus
B. subtilis in einer Stereoansicht
 (Krasilnikov *et al.*, 2003).

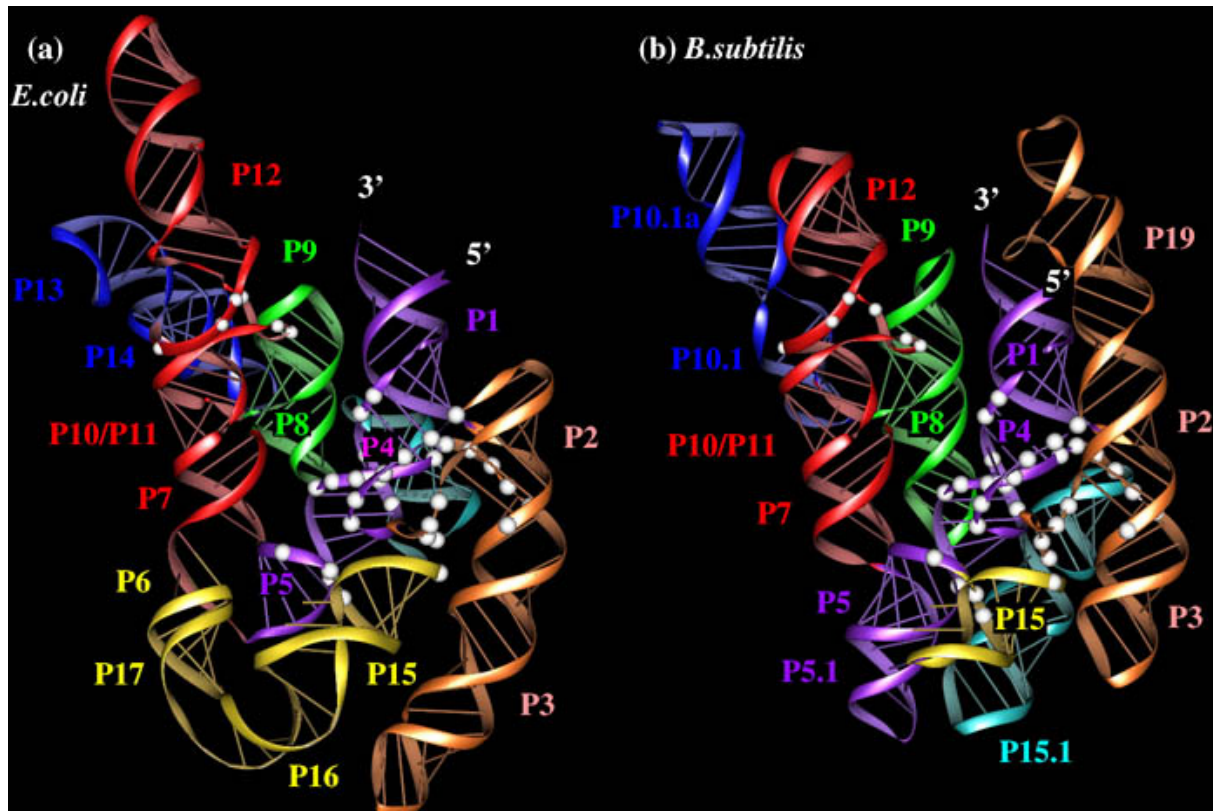


Abb. 1-4: *E. coli* und *B. subtilis* RNase P-RNA-Raumstrukturmodelle

Gezeigt sind Raumstrukturmodelle der RNase P-RNA für *E. coli* (a) und *B. subtilis* (b). Helices der Domäne I sind jeweils rot, grün und dunkelblau gefärbt; die der Domäne II türkis, gelb, orange und hellblau. Hoch konservierte Nukleotide im katalytischen Zentrum sind als große weiße Kugeln dargestellt. Kleine weiße Kugeln repräsentieren konservierte Nukleotide der pre-tRNA T-Schleife-Erkennungsstelle (entnommen aus Massire *et al.*, 1998).

1.3.2. Substraterkennung und Reaktionsmechanismus

1.3.2.1. Substraterkennung durch bakterielle RNase P

RNase Pprozessiert *in vivo* alle pre-tRNAs einer gegebenen Zelle oder Organelle. Unter *in vitro* Bedingungen ist das Enzym zusätzlich in der Lage, pre-tRNAs der verschiedensten Spezies korrekt heterolog umzusetzen (Baer *et al.*, 1988; Pace und Smith, 1990; Darr *et al.*, 1992; Loria und Pan, 1998; Loria *et al.*, 1998). Wegen den nur geringen Sequenzähnlichkeiten der tRNAs - insbesondere der pre-tRNA-5'-Flanken - in einem Organismus muss sich die Substraterkennung auf allgemeine Tertiärstrukturmerkmale, unspezifisches Binden frei zugänglicher pre-tRNA Regionen und spezifische Interaktionen mit den wenigen absolut konservierten tRNA Nukleotiden beschränken. Dies gilt umso mehr für die interspezifische pre-tRNA Erkennung. Für ein tieferes Verständniss der pre-tRNA-Substraterkennung durch RNase P bildet deshalb das ausführliche Wissen über Sekundär- und Tertiärstrukturen der tRNAs eine unabdingbare Grundlage. Durch Interaktionsexperimente mit pre-tRNA Substraten konnte der tRNA-Akzeptorstamm und die T ψ C-Schleife bzw. Stamm als entscheidende Elemente der Substraterkennung identifiziert werden (Kahle *et al.*, 1990; Holm *et al.*, 1992; Christian *et al.*, 2002). Anticodon- und Dihydrouracilschleife (DHU) können zusätzliche, jedoch nicht essentiell notwendige, Wechselwirkungen zur pre-tRNA ausbilden (McClain *et al.*, 1987; Carrara *et al.*, 1995).

Der Akzeptorstamm nahezu aller pre-tRNAs wird von einer kurzen Helix mit sieben Basenpaaren gebildet. Eine Ausnahme bilden tRNA^{His} und tRNA^{Sec}, deren Akzeptorstamm acht Basenpaare lang ist (Steegborn *et al.*, 1995). Die Länge und Primärstruktur des Akzeptorstammes sind für die Erkennung der richtigen Schnittstelle zwischen 5'-Flanke und tRNA durch RNase P von entscheidender Bedeutung (Holm und Krupp, 1992; Kirsebom und Svärd, 1992). Für die pre-tRNA^{His}, welche über ein zusätzliches G an Position -1 verfügt, kommt der Diskriminatorbase eine besondere Bedeutung hinsichtlich der Schnittstellenfestlegung zu. Diese tRNA besitzt als einzige ein Cytosin als Diskriminatorbase. Dieses C ist nicht in der Lage, mit dem U der GGU-Sequenz der RNase P-RNA zu paaren und die gesamte tRNA wird um ein Nukleotid in der Bindungstasche verschoben, sodass die Prozessierung korrekt ausgeführt werden kann. Die Insertion zweier Basenpaare in den Akzeptorstamm einer Hefe pre-tRNA₁^{Leu} verschiebt die Schnittstelle um 2 Basen in Richtung 3'-Ende, um so den 7-Basenpaar-Akzeptorstamm zu erhalten. RNase P aus *Xenopus laevis* ist offensichtlich fähig, die Akzeptorstamm-Länge zu messen, um so die richtige Position der Schnittstelle zu lokalisieren (Carrara *et al.*, 1989).

Für RNase P aus *E. coli* konnte sowohl für das Holoenzym als auch für die isolierte RNA-Untereinheit die Bedeutung einzelner konservierter Nukleotide für eine korrekte Prozessierung gezeigt werden (Svärd und Kirsebom, 1992). Die meisten dieser Nukleotide befinden sich in räumlicher Nähe zum katalytischen Zentrum oder in Strukturbereichen für welche Interaktionen mit Substrat diskutiert werden (Abb. 1-3). Es wird eine mögliche Wechselwirkung zur pre-tRNA über exozyklische Aminogruppen der Nukleotide diskutiert (Kufel und Kirsebom, 1996; Meinel und Blanquet, 1995; Tallsjö *et al.*, 1996).

1.3.2.2. Substratbindung durch bakterielle RNase P

Für T_ψC-Stamm und T_ψC-Schleife der pre-tRNA konnte ein eindeutiger Beitrag zur Substratbindung durch RNase P-RNA aus *E. coli* und *B. subtilis* gezeigt werden. Insbesondere der T_ψC-Stamm interagiert dabei mit P8, einer Helix des RNase P-RNA *Cruziform*-Sekundärstrukturelements. Einzelne Nukleotide treten dabei über ihre 2'-OH-Gruppen mit dem Ribozym in Kontakt (Pan *et al.*, 1995; Loria und Pan, 1997; Chen *et al.*, 1998). Insgesamt kann der entscheidende Sekundärstrukturbereich P7-P11 (Kleeblattstruktur) in allen bakteriellen RNase P-RNAs sowohl in der Sequenz als auch strukturell als hoch konserviert bezeichnet werden (Abb. 1-2). Lediglich einige cyanobakterielle RNase P-RNAs und solche aus Plastiden bilden hier eine Ausnahme (Brown, 1998).

Untersuchungen zur RNase P Prozessierung von zirkular permutierten Substraten zeigen, dass Unterbrechungen im Zucker-Phosphatrückgrat innerhalb des Akzeptorstammes und der T_ψC-Stamm-Schleife vom Enzym nicht toleriert werden. Es findet keine Hydrolysereaktion statt (Carrara *et al.*, 1995).

Bereits in frühen Arbeiten zur Substraterkennung durch RNase P wurde der Einfluss des pre-tRNA 3'-CCA-Endes erkannt. Das 3'-CCA-Ende tritt dabei mit der sowohl in RNase P-RNA Typ A als auch Typ B konservierten Erkennungssequenz 5'-GGU-3' in Wechselwirkung (Abb. 1-5). Mutation oder Deletion des CCA-Endes führt zu einer Erhöhung von K_M und in einigen Fällen zu einer Positionsverschiebung der Schnittstelle. Dies unterstreicht die Bedeutung des Bindungsmotivs für die Enzym-Substrat-

Komplexbildung (Guerrier-Takada *et al.*, 1988; Krupp *et al.*, 1991; Kirsebom und Svärd, 1994; LaGrandeur *et al.*, 1994; Oh und Pace, 1994; Hardt *et al.*, 1995; Svärd *et al.*, 1996; Tallsjö *et al.*, 1996). Die beiden Cytosine der pre-tRNA bilden Watson-Crick Basenpaare mit zwei Guanidin-Basen der RNase P-RNA aus. Diese Enzym-Substrat-Wechselwirkung wird zusätzlich durch eine *Wobble*-Basenpaarung verstärkt. Sie bildet sich zwischen dem verbleibenden Uracil des 5'-GGU-3'-Motivs und der einzelsträngigen pre-tRNA Diskriminatorbase (Purin 73) aus (Kirsebom und Svärd, 1994; Schön, 1999). Für RNase P-RNA vom Typ A liegt das 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv in J15/16; für Typ B in L15. Durch die relativ stabile Wasserstoffbrückenbindung soll der Akzeptorstamm der pre-tRNA teilweise aufgeschmolzen werden; die korrekte Schnittstelle kann dann vom Ribozym einfacher festgelegt werden. Die Vorstellung der 3'-CCA RNase P Substrat-Wechselwirkung wird durch NMR und Modellierungsexperimente gestützt (Glemarec *et al.*, 1996; Easterwood und Harvey, 1997).

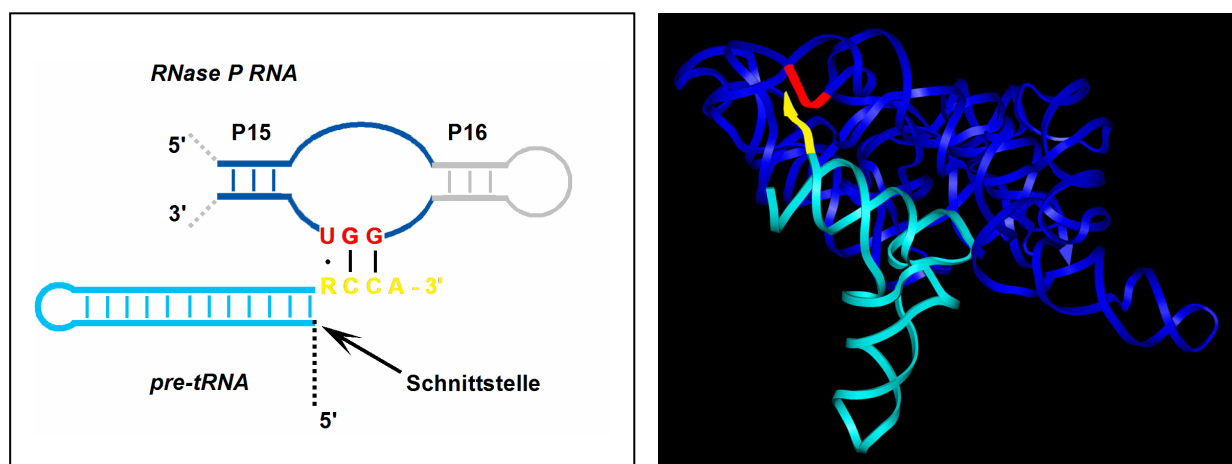


Abb. 1-5: Wechselwirkung der 3'-CCA-pre-tRNA-Flanke mit bakterieller RNase P-RNA

Die Abbildung zeigt die Bindung von pre-tRNA (türkis) mit dem 3'-CCA-Ende (gelb) an die P15/P16-Bindungsregion der RNase P-RNA (blau) schematisch und als 3D-Modell. Das 5'-GGU-Bindungsmotiv ist gelb dargestellt. Die pre-tRNA Purin-Diskriminatorbase (N73) wird durch R dargestellt. Die Watson-Crick-Basenpaarungen sind durch schwarze Balken (|), die Wobble-Basenpaarung durch einen schwarzen Punkt (•) dargestellt (Schön, 1999; Massire *et al.*, 1998).

Das 5'-GGU-3'-Substratbindungsmotiv wird in den meisten bakteriellen Spezies gefunden. Sein Auftreten lässt sich bis zu einem gewissen Grad mit der Anwesenheit von codierten 3'-CCA-Enden in den tRNA Genen des jeweiligen Organismus erklären. Alle tRNA Gene aus *E. coli* und die meisten aus *B. subtilis* codieren für dieses Motiv; die RNase P-RNA aus beiden Spezies enthält das 5'-GGU-3'-Substratbindungsmotiv. Im Gegensatz dazu stehen die tRNA-Gene von Archaea, den Chloroplasten und anderer photosynthetischer Organellen sowie deren phylogenetische Vorläufer, den Cyanobakterien. In der Regel codieren ihre Genome nicht für ein tRNA 3'-CCA-Ende (Reith und Munholland, 1995 a,b; Löffelhardt *et al.*, 1997; Kowallik, 1997; Sprinzl *et al.*, 1998; Pannucci *et al.*, 1999). In erstaunlicher Übereinstimmung verfügt die RNase P-RNA primitiver Plastiden und der meisten Cyanobakterien über kein 5'-GGU-3'-Substratbindungsmotiv, obwohl dieses in Bakterien als hoch konserviert gilt (Vioque, 1992; Baum *et al.*, 1996; Vioque, 1997; Fingerhut und Schön, 1998). Überraschender Weise zeigt die RNase P-RNA des Cyanobakteriums *Prochlorococcus marinus* eine deutlich höhere Affinität für Substrate mit 3'-CCA-Ende, obwohl die RNase P-RNA über kein 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv verfügt. Der Erkennungsmechanismus ist noch nicht geklärt (Hess *et al.*, 1998).

Einige RNase P-RNAs aus Archaea ohne 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv zeigen unter Hochsalzbedingungen *in vitro* keine katalytische Aktivität. Hier wird eine Übertragung der Substratfixierungsfunktion von RNase P-RNA auf die Protein-Untereinheit(en) im Holoenzym diskutiert (Pannucci *et al.*, 1999; Hall und Brown, 2002). Dieser Hypothese stehen allerdings RNase P-RNAs aus Cyanobakterien, primitiven Plastiden und anderen Archaea gegenüber. Sie verfügen ebenfalls nicht über ein 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv, prozessieren unter Hochsalzbedingungen *in vitro* aber dennoch pre-tRNAs korrekt (Baum *et al.*, 1996; Haas und Brown, 1998; Pannucci *et al.*, 1999).

Neben den pre-tRNAs erkennt RNase P als Holoenzym *in vivo*, aber auch als Ribozym *in vitro* eine Reihe weiterer natürlicher Substrate. Beispielsweise wird die 4.5S RNA aus Archaea und Eukaryoten von RNase P als Substrat akzeptiert und umgesetzt. Beide RNAs bilden Strukturelemente aus, die der räumlichen Anordnung von pre-tRNA Akzeptorstamm und T Ψ C-Schleife zueinander gleichen (Komine *et al.*, 1994; Kirsebom und Vioque, 1996). Die 10Sa RNA sowie einige virale RNAs aus Pflanzen bilden an ihren Enden ebenfalls pre-tRNA Strukturelemente aus und können RNase P als Substrat dienen (Guerrier-Takada, 1984; Mans *et al.*, 1990; Komine *et al.*, 1994; Gimple und Schön, 2001). Dabei wird die pre-tRNA ähnliche Domäne der 10Sa RNA von RNase P prozessiert, um eine Wechselwirkung der 10Sa RNA mit dem Ribosom und ihrer Rolle beim Abbau von Polypeptidbruchstücken zu ermöglichen.

Ein Minimalsubstrat für RNase P leitet sich aus der pre-tRNA^{Phe} ab (McClain *et al.*, 1987). Es besteht nur aus einem Akzeptorstamm mit kleiner Schleife, dem 3'-CCA-Ende und einer 5'-Flanke. Perreault und Altman (1992) konzipierten erstmals ein bipartites Minimalsubstrat, welches sich lediglich aus zwei teilweise gepaarten Oligoribonukleotiden zusammensetzt. Aktuelle Arbeiten zeigen, dass ein durch RNase P prozessiertes Minimalsubstrat lediglich über eine vier Basenpaare lange Region und eine ein-Nukleotid 5'-Flanke verfügen muss (Abb. 1-6; Hansen *et al.*, 2001; Zuleeg *et al.*, 2001).

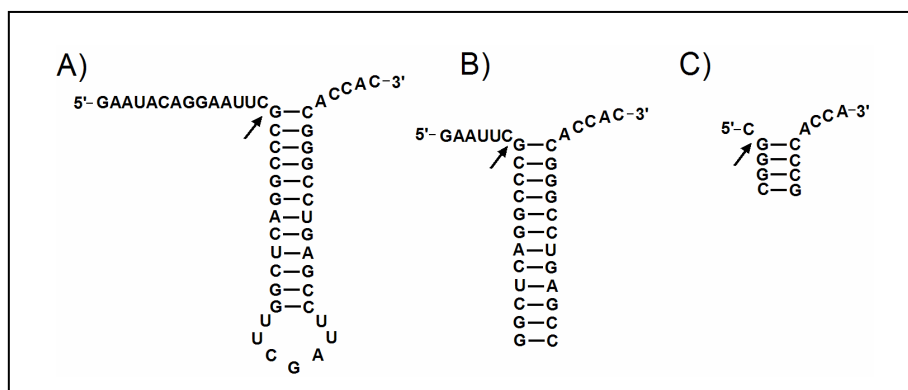


Abb. 1-6: Synthetische Minimalsubstrate für *E. coli* RNase P

Die Substrate sind entnommen aus A) McClain *et al.*, 1987 B) Forster und Altman, 1990 C) Hansen *et al.*, 2001. Die Schnittstelle ist jeweils durch einen Pfeil angezeigt.

1.3.2.3. Der Reaktionsmechanismus der bakteriellen RNase P

RNase P katalysiert eine direkte Hydrolyse (Smith und Pace, 1993), für die ein Metallionen-abhängiger S_N2 -Mechanismus diskutiert wird (Reich *et al.*, 1988; Steitz und Steitz, 1993; Warnecke *et al.*, 1999). Guerrier-Takada *et al.* (1986) postulieren einen S_N2 -Mechanismus, in welchem der nukleophile Angriff eines H_2O -Moleküls auf das Phosphatrückgrat durch einen Komplex aus Magnesiumionen und 6 H_2O -Molekülen unterstützt wird (Abb. 1-7). An der Katalyse durch M1 RNA sind mindestens zwei Magnesiumionen beteiligt, von denen eines an die M1 RNA koordiniert. Das zweite Ion bindet an das Substrat und aktiviert dieses, bevor es zur Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes kommt (Perreault und Altman, 1992). Reich *et al.* (1988) gehen vom direkten Eingriff einer Hydroxylgruppe der M1 RNA in die Katalysereaktion aus.

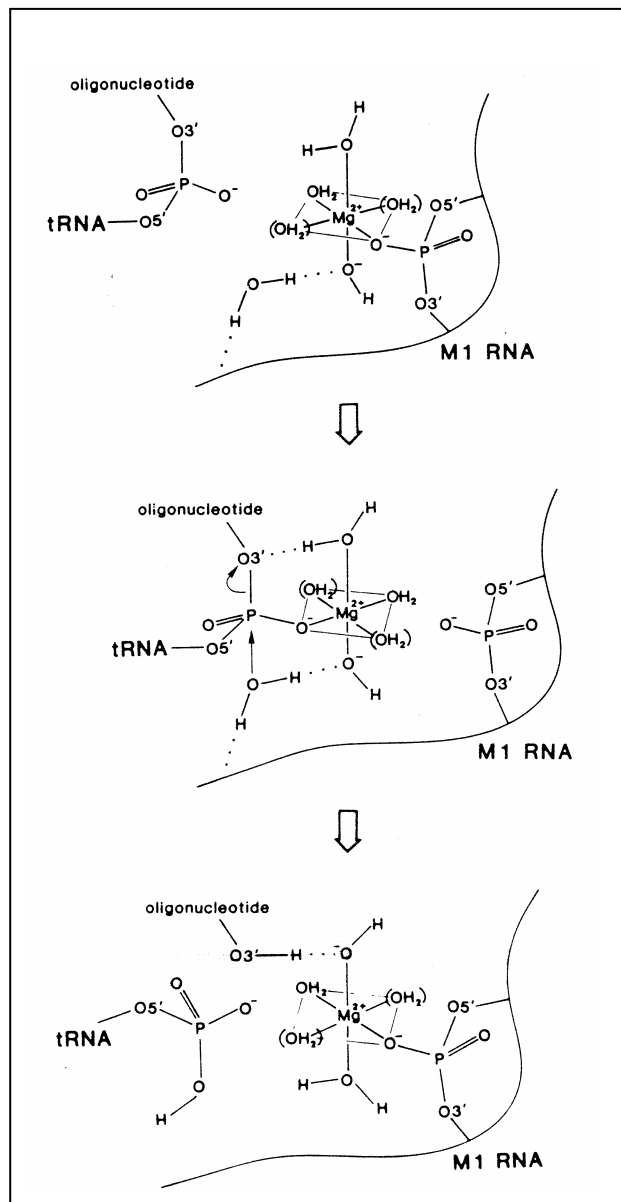


Abb. 1-7: Mechanismus der RNase P-Reaktion nach Guerrier-Takada *et al.* (1986)

Beebe und Fierke (1994) schlagen, basierend auf kinetischen Parametern, die für *B. subtilis* RNase P-RNA und pre-tRNA^{Asp} gewonnen wurden, einen vierstufigen Mechanismus vor: Der Katalysezyklus beginnt mit rascher irreversibler Bindung der pre-tRNA durch RNase P-RNA und anschließender Hydrolyse der entscheidenden Phosphodiesterbindung. Die Reaktion erfolgt mit zwölfmal höherer Geschwindigkeitskonstante (6 s^{-1}) gegenüber der Dissoziationskonstanten des Enzym-Substrat-Komplexes ($0,5 \text{ s}^{-1}$). Die Produktfreisetzung erfolgt kinetisch kontrolliert. Zuerst verlässt die pre-tRNA-5'-Flanke das katalytische Zentrum; im geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritt dissoziiert dann die reife tRNA ab. Im abschließenden vierten Schritt bildet sich ein zweites Ribozymkonformer, welches pre-tRNA wesentlich schlechter bindet.

Das beschriebene RNase P Ribozym ist strikt Mg^{2+} -Ionen abhängig. Die Mg^{2+} -Ionen werden für die Katalyse benötigt, nicht jedoch für die Ausbildung des Enzym-Substratkomplexes: Ein Mg^{2+} -Ion wird dabei durch die 2'-Hydroxylgruppe der Phosphodiesterbindung direkt an der Schnittstelle gebunden. Die Geschwindigkeit der Katalyse steigt mit zunehmender Mg^{2+} -Konzentration solange an, bis die gesteigerte Affinität zwischen RNase P-RNA und reifer tRNA zu verzögerter Produktfreisetzung führt. Für eine optimale katalytische Aktivität sind mindestens drei Mg^{2+} -Ionen pro RNase P-RNA notwendig. (Smith und Pace, 1993). Insgesamt übernehmen bivalente Kationen während der Reaktion drei Aufgaben: Durch Koordination ermöglichen sie die Deprotonierung von H_2O -Molekülen; sie polarisieren Phosphorylsauerstoffatome und ermöglichen so einen nukleophilen Angriff auf das korrespondierende Phosphoratom bei gleichzeitiger Stabilisierung des Übergangszustands. Bei Substitution von Mg^{2+} -Ionen durch Ca^{2+} findet nahezu kein Substratumsatz statt (Smith *et al.*, 1992; Pomeranz Krummel und Altman, 1999). Wird Mg^{2+} durch Mn^{2+} ersetzt, zeigt Mn^{2+} wegen seiner größeren Nukleotidaffinität bei niedrigen Salzkonzentrationen eine größere Effektivität. Für höhere Konzentrationen kommt es wegen der starken Wechselwirkungen von Mn^{2+} mit den Nukleotiden zu reduzierter Substratbindung und verzögerter Katalyse (Smith *et al.*, 1992; Rossmann und Karwan, 1998).

Der Einfluss monovalenter Kationen auf die Ribozym-Reaktion liegt in einer Verminderung elektrostatischer Abstoßung zwischen RNase P-RNA und pre-tRNA und dadurch wesentlich vereinfachter Substratbindung. Optimale Reaktionsbedingungen können durch den Zusatz von Cs^+ , K^+ , Rb^+ und NH_4^+ erreicht werden. Der ähnliche Radius dieser Ionen spielt dabei die entscheidende Rolle (Smith *et al.*, 1992). Polyamine wie Spermin oder Spermidin können die durch Metall-Ionenzugabe erreichten Katalyseeffekte nicht erzielen (Pannucci *et al.*, 1999).

1.3.4. Das bakterielle RNase P-Protein

Trotz der Ribozym-Eigenschaften bakterieller RNase P *in vitro* ist die Protein-Untereinheit *in vivo* essentiell (Kirsebom und Vioque, 1996). Durch eine Verminderung der elektrostatischen Abstoßung zwischen den negativ geladenen Ribonukleinsäuren erniedrigt sie die zur *in vitro* Hydrolyse notwendige Salzkonzentration und ermöglicht so eine effiziente Katalyse unter physiologischen Bedingungen (Guerrier-Takada *et al.*, 1983; Reich *et al.*, 1988).

Das durch das *mpA*-Gen codierte RNase P-Protein weist eine außerordentlich hohe Sequenzvariabilität auf (Brown, 1999). Seine Genstruktur ist allerdings hochkonserviert: es tritt stets in einem Operon mit dem für das ribosomale Protein L34 codierende *rpmH*-Gen auf. Bis auf nur wenige Ausnahmen befindet sich dieses Operon in Nähe zur *dnaA* Region. Die Protein-Untereinheit des Holoenzym ist durchschnittlich 120-140 Aminosäuren lang, wobei sich nur wenige konservierte Aminosäuren bestimmen lassen. Die Aminosäure-Konsensussequenz beschränkt sich auf einen sehr kleinen Bereich, der auffallend viele aromatische und basische Aminosäurereste besitzt (Brown, 1998). Da sich aber RNase P-Proteine und RNA-Untereinheiten im Verhältnis 1:1 heterolog rekonstituieren lassen (Guerrier-Takada *et al.*, 1983; Rivera-Leon *et al.*, 1995; Pascal und Vioque, 1996), kann davon ausgegangen werden, dass die Protein-RNA-Interaktion hauptsächlich auf Erkennung der dreidimensionalen Proteinstruktur beruht.

Die Aufklärung der Kristallstruktur für das RNase P-Protein aus *B. subtilis* (Abb. 1-8) ermöglichte es, die Funktion des Proteins aus struktureller Sicht zu verstehen (Stams *et al.*, 1998). Die Raumstruktur lässt drei mögliche RNA-Bindungsdomänen erkennen: Eine Bindungs-Furche für einzelsträngige RNA bildet sich zwischen einer α -Helix und der zentralen β -Faltblatt-Struktur aus. Die Protein-RNA-Interaktionen beruhen hier vermutlich sowohl auf ionischen Wechselwirkungen mit basischen Aminosäuren als auch auf Stapelung aromatischer Aminosäuren (Talbot und Altman, 1994; Stams *et al.*, 1998). Diese auf aromatischen und basischen Aminosäuren beruhende Protein-RNA-Interaktion wird auch durch zusätzliche spektroskopische Daten und Funktionsanalysen mit Proteinmutanten der Arbeitsgruppe um Gopalan (1997 a,b) gestützt. Niranjanakumari *et al.* (1998) konnten durch *Cross-link*-Experimente einen direkten Kontakt zwischen den Positionen -4 bis -8 der 5'-Flanke des Substrats und der Protein-Untereinheit nachweisen (Abb. 1-9). Die zweite Domäne fixiert in einer frei exponierten Schleife eine Reihe konservierter basischer Aminosäurereste zwischen Helix B (rot) und der zentralen β -Faltblattstruktur. Die dritte RNA-Bindungsregion wird durch eine der ersten Bindungsdomäne gegenüberliegende Schleife (grün) gebildet. Hier sind die wenigen sauren Aminosäuren des Proteins lokalisiert. Durch die so erhöhte Metallaffinität könnte diese Domäne bei metallunterstützter RNA-Bindung eine Rolle spielen.

Die *B. subtilis*-Struktur wurde durch Röntgenstruktur-Analyse für das RNase P-Protein aus *Thermotoga Maritima* (Kazantsev *et al.*, 2003) und NMR-Untersuchungen am RNase P-Protein aus *Staphylococcus aureus* bestätigt (Spitzfaden *et al.*, 2000). Die Topologie des Proteins ähnelt stark derjenigen zweier universell konservierter Proteine des Translationsapparates und deutet auf einen gemeinsamen evolutiven Ursprung hin (Stams *et al.*, 1998).

Im Holoenzym werden mehrere Regionen der RNase P-RNAs aus *E. coli* und *B. subtilis* durch die Protein-Untereinheit vor chemischer Modifikation oder Nukleaseverdau geschützt (Vioque *et al.*, 1988; Talbot und Altman, 1994; Loria *et al.*, 1998). Da sich die vor Modifikation oder Abbau geschützten RNA-Abschnitte über größere Bereiche erstrecken als von der Sekundärstruktur ausgehend erwartet werden kann, wird eine Konformationsänderung der RNA-Untereinheit durch Binden des RNase P-Proteins postuliert. Biswas *et al.* (2000) klonierten spezielle *E. coli* Proteinmutanten, wobei sie einzelne Aminosäuren chemisch so modifizierten, dass sie Nuklease-Charakter besaßen. Bei der Rekonstitution mit mutiertem Protein zum Holoenzym wurde eine spezifische Hydrolyse der RNase P-RNA innerhalb der Regionen P3, P4, J2/4 und J18/2 beobachtet. In Übereinstimmung mit der Funktion des Proteins als Substrat-bindende Untereinheit, zeigen diese Daten die räumliche Nähe von Protein und katalytischem Zentrum im Holoenzym.

Trotz der nur geringen Sequenzähnlichkeiten können RNase P-RNA-Untereinheiten und Protein-Untereinheiten heterolog zu aktivem Holoenzym rekonstituiert werden (Guerrier-Takada *et al.*, 1993; Talbot und Altman, 1994; Pascual und Vioque, 1996). Die Stöchiometrie der Protein- und RNA-Untereinheiten im Holoenzym ist 1:1 (Rivera-Leon *et al.*, 1995; Niranjanakumari *et al.*, 1998). Für RNase P aus *B. subtilis* wird eine Tetramerstruktur des Holoenzym diskutierte (Fang *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zum Verhalten der RNase P-RNA *in vitro* zeigt das Holoenzym keine Diskriminierung gegenüber Substraten ohne 3'-CCA-Ende. Das Holoenzym kann außerdem eine Reihe von Substraten prozessieren, die von der RNase P-RNA nicht umgesetzt werden: Vorläufer-Moleküle der 4,5 S RNA, eine polycistronische mRNA, phagen-codierte antisense RNA oder auch tmRNA-Vorläufer in *E. coli* (Kirsebom und Altman, 1989; Peck-Miller und Altman, 1991; Alifano *et al.*, 1994; Komine *et al.*, 1994; Hartmann *et al.*, 1995; Gimple und Schön, 2001). Die Anwesenheit der Proteinuntereinheit erhöht die Affinität der RNase P für pre-tRNAs signifikant; nicht jedoch für tRNAs. Es wird weiterhin angenommen, dass das Protein die Produktfreisetzung aus dem Enzym-Substrat-Komplex erleichtert (Crary *et al.*, 1998).

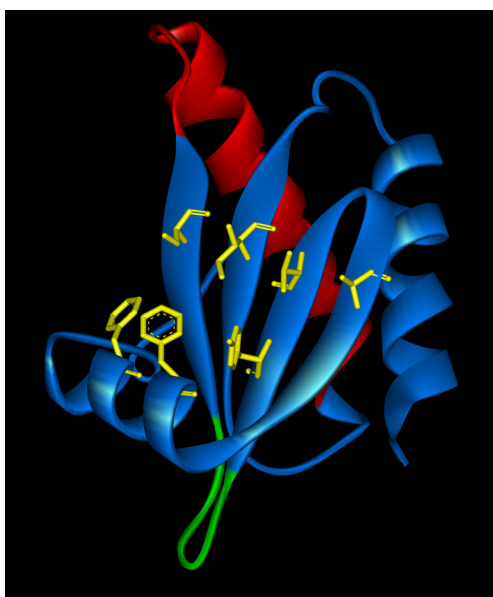


Abb. 1-8: Struktur des RNase P-Proteins in *Bacillus subtilis*

Die Topologie des Proteins wird als $\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$ -Struktur angegeben. Die Abbildung zeigt das ungewöhnliche Strukturmotiv des RNase P-Proteins: eine linksgängige $\beta\alpha\beta$ kreuzende Verbrückung von β -Strang 3 über Helix B zu β -Strang 4.

Die die konservierten Aminosäuren enthaltende Helix ist rot dargestellt. Für sie wird wie für die Schleife mit sauren Aminosäuren (grün) eine RNA-Bindungsfunktion postuliert. Aminosäuren, welche zur Wechselwirkung mit dem pre-tRNA-Substrat beitragen, sind gelb hervorgehoben (Abb. 1-7).

Die Dimensionen des Proteins im Kristall betragen $40 \times 35 \times 30 \text{ \AA}$ (Stams *et al.*, 1998).

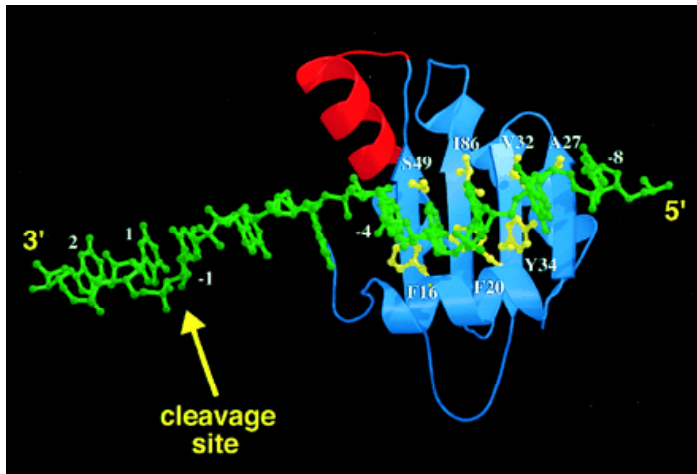


Abb. 1-9: Wechselwirkung der 5'-pre-tRNA-Flanke mit dem RNase P-Protein

Die einzelsträngige 5'-pre-tRNA-Flanke ist grün, das RNase P-Protein blau bzw. rot dargestellt. Die aromatischen Aminosäuren, die über Stapelungseffekte mit dem Substrat wechselwirken, sind entsprechend ihrer Position im Protein gelb nummeriert. Die konservierte basische Helix des Proteins ist rot dargestellt (Niranjanakumari *et al.*, 1998).

1.3.5. Ein Modell der dreidimensionalen Struktur des RNase P-Holoenzym

Basierend auf RNase P-RNA Modellen (1.3.2.), der gelösten Struktur der Protein-Untereinheit (1.3.4.) sowie zusätzlichen *Footprinting*- und Modellierungsexperimenten präsentierten Tsai *et al.* (2003) erstmals das vollständige Modell eines bakteriellen RNase P-Holoenzym mit pre-tRNA-Substrat.

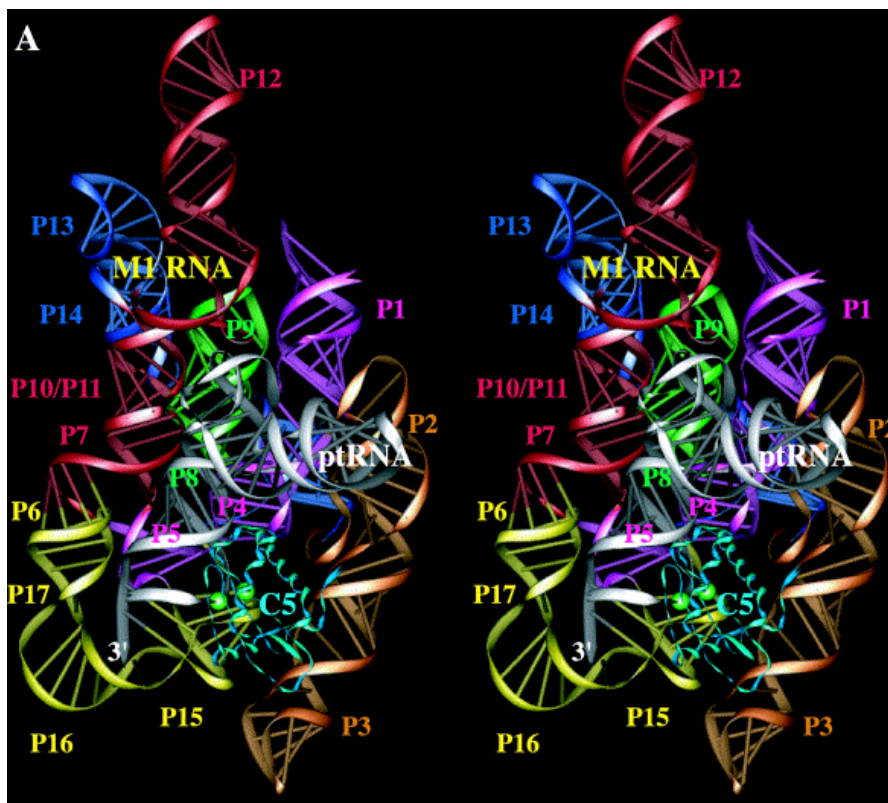


Abb. 1-10: Modell des *E. coli* RNase P Holoenzym

Stereoansicht des dreidimensionalen *E. coli* RNase P Holoenzym Substrat Komplex. Das Farbschema der RNA entspricht dem aus Abb. 1-4. Die Protein-Untereinheit ist in türkis, die pre-tRNA in elfenbein dargestellt (Tsai *et al.*, 2003).

1.4. Eukaryotische RNase P aus Zellkernen

Eukaryotische Zellen sind kompartimentiert. Die RNase P für cytosolische tRNAs ist im Zellkern lokalisiert, da nur reife tRNAs aus dem Zellkern exportiert werden können (Zasloff, 1983; Tobian *et al.*, 1985).

Für eine Reihe von Eukaryoten, vornehmlich Hefen und Wirbeltiere, wurden RNase P Holoenzyme partiell aufgereinigt. Die Annahme, dass eukaryotische RNase P einen wesentlich höheren Proteinanteil als die bakteriellen Enzyme besitzt, wird dabei durch ihre große, meist über Gelfiltration bestimmte, Molekülmasse und ihre geringe Dichte bestätigt: Ihre CsCl- bzw. Cs₂SO₄-Schwebbedichte liegt in einem Bereich von 1,28-1,40 g/ml (Abb. 1-11). Diese Werte liegen signifikant niedriger als die für bakterielle RNase P (z.B. *E. coli* 1,55 mg/ml), aber dennoch deutlich zwischen den Grenzwerten für Protein und RNA. (Kline *et al.*, 1981; Barktiewicz *et al.*, 1989; Doria *et al.*, 1991; Jayanthi und Van Tuyle, 1992; Stathopoulos *et al.*, 1995; Arends und Schön, 1997). Eukaryotische RNase P Holoenzyme können im Allgemeinen durch Behandlung mit Ribonuklease inaktiviert werden.

Auf diesen Ergebnissen basierend wurde auch für RNase P aus Eukaryoten der Ribonukleoprotein-Charakter postuliert.

Die RPR1 RNA-Untereinheit der nuklearen RNase P aus *S. cerevisiae* wurde 1989 von Lee und Engelke erstmals beschrieben. Durch Immunopräzipitation und genetische Studien konnten die ersten mit nuklearer Hefe RNase P assoziierten Proteine identifiziert werden: Pop1p, Pop3p, Pop4p und Rpp1p (Lygerou *et al.*, 1994; Dichtl und Tollervey, 1997; Chu *et al.*, 1997; Stolc und Altman, 1997). Durch biochemische Aufreinigungsmethoden konnte die Anwesenheit dieser Proteine und der RPR1 RNA bestätigt und fünf weitere Protein-Untereinheiten identifiziert werden: Pop5p, Pop6p, Pop7p, Pop8p und Rpr2p (Abb. 1-12) (Chamberlain *et al.*, 1998). Alle zehn identifizierten Untereinheiten sind für RNase P-Aktivität und Vitalität von Hefe-Zellen essentiell. Für *S. pombe* wurde 1986 von Krupp *et al.* erstmals eine RNase P-RNA Untereinheit beschrieben bzw. 1993 eine noch heute nicht eindeutig besätigte Protein-Untereinheit (Zimmerly *et al.*, 1993).

Durch die Aufreinigung humaner RNase P aus HeLa-Zellen konnte die Existenz einer RNA-Untereinheit, H1 RNA (Bartkiewicz *et al.*, 1989) und von mindestens sechs Proteinen (Rpp14, Rpp20, Rpp29, Rpp30, Rpp38 und Rpp40), die mit RNase P-Aktivität korrelieren, nachgewiesen werden (Eder *et al.*, 1997). Zusätzlich konnte hPOP1 als menschliches Homologes zum Hefe-Protein Pop1p durch Sequenzvergleich identifiziert werden. Trotz nur geringer Sequenzähnlichkeiten können mit Antikörpern gegen hPop1 sowohl H1 RNA als auch RNase P-Aktivität aus HeLa-Extrakten präzipitiert werden (Lygerou *et al.*, 1996). Zwei weitere humane RNase P-Protein-Untereinheiten konnten durch bioinformatische Ansätze identifiziert werden: hPop5 und Rpp21 als Homologa zu den Hefe-Proteinen Pop5p und Rpr2p (Abb. 1-12) (Jarrous *et al.*, 2001; van Eenennaam *et al.*, 2001).

RNase P aus verschiedenen Eukaryoten zeigt eine sehr unterschiedliche Substratspezifität. Während für RNase P aus HeLa-Zellen (Yuan und Altman, 1995) und *Xenopus laevis* Oocyten (Carrara *et al.*, 1995) Minimalsubstrate ermittelt wurden, die nur aus Akzeptorstamm, T-Stamm, T-Schleife, 5'-Flanke und einer Verbindungsregion zwischen Akzeptor- und T-Stamm bestehen, ist für Weizenkeim RNase P eine intakte Tertiärstruktur der pre-tRNA unabdingbar (Arends und Schön, 1996).

Organismus/Plastid	Schwebedichte	Sensitivität gegen Micrococcus Nuklease	Protein-Untereinheiten	RNA-Untereinheiten	katalytisch-aktives Ribozym
Bakterien					
<i>Escherichia coli</i>	1,55 g/ml ^a	+	14 kD (<i>maA</i>)	377 nt (mpB)	+
<i>Bacillus subtilis</i>	1,7 ^a	+	14 kD	401 nt	+
Archaea					
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	1,27 ^b	-	+	315 nt	-
<i>Haloferax volcanii</i>	1,61 ^b	+	+	435 nt	+
<i>M. thermoautotrophicus</i>	1,42 ^b	+	13,5 kD (Mth11p), 16 kD (Mth687p), 29,5 kD (Mth668p), 21,5 kD (Mth1618p)	293 nt	+
Eukaryoten: Kern					
<i>S. pombe</i>	1,40 ^b	+	100 kD	285 nt	-
<i>S. cerevisiae</i>	unbekannt	+	9 identifizierte Untereinheiten siehe Abb. 1-12	369 nt (RPR1)	-
<i>Xenopus laevis</i>	1,34 ^b	+	+	320 nt	-
<i>Homo sapiens</i>	1,28 ^b	+	10 identifizierte Untereinheiten siehe Abb. 1-12	340 nt	-
<i>Rattus rattus</i>	1,36 ^b	-	+	+	-
<i>Dictyostelium discoïdium</i>	1,23 ^b	+	+	+	-
<i>Triticum aestivum</i>	1,34 ^a	-	+	postuliert	ungeklärt
Mitochondrien					
<i>S. cerevisiae</i>	1,28 ^b	+	105 kD (RPM2)	490 nt (RPM1)	-
<i>H. sapiens (HeLa)</i>	unbekannt	+	+	umstritten	-
Plastiden					
<i>Spinat</i>	1,28 ^a	-	+	-	ungeklärt
<i>C. paradoxa</i>	1,29 ^b	+	+	351 nt (mpB)	-

^a bestimmt in CsCl; ^b bestimmt in Cs₂SO₄

Abb. 1-11: Ausgewählte RNase P-Holoenzyme aus allen drei Königreichen und Zellkompartimenten. Die Zusammenfassung wurde nach Frank und Pace (1998) erstellt und erweitert; Literaturangaben sind dem fortlaufenden Text zu entnehmen.

1.4.1. Struktur und Funktion der eukaryotischen RNA-Untereinheit

Trotz des großen prozentualen Proteinanteils am Holoenzym ist eine intakte RNA-Untereinheit für die katalytische Aktivität der RNase P aus Mensch oder Hefe essentiell (Krupp *et al.*, 1986; Lee und Engelke, 1989; Bartkiewicz *et al.*, 1989). So sind *S. cerevisiae* RNase P-RNA *Knock-out*-Mutanten nicht lebensfähig (Lee *et al.*, 1991). Die RNA-Untereinheit eukaryotischer RNase P wurde in mehreren Organismen identifiziert (Abb. 1-11; Brown, 1999; Frank *et al.*, 2000), wobei die meisten Daten zu Hefe-Enzymen vorliegen. Frank *et al.* postulierten 2000 erstmals eine Konsensussequenz für eukaryotische RNase P-RNA. Das korrespondierende Gen wird in Hefen und Wirbeltieren von RNA III Polymerase transkribiert. In *S. cerevisiae* wird das *RPR1* RNA Gen als 486 Nukleotide langes Primärtranskript transkribiert (Lee *et al.*, 1991). Die pre-*RPP1* RNA unterliegt am 5'-Ende einem einzigen endonukleolytischen Schnitt, während die 3'-flankierende Sequenz mehreren exonukleolytischen Hydrolyseschritten unterliegt (Lee *et al.*, 1991). *RPR1* RNA kann durch affinitätsmarkierte Protein-Untereinheiten immunopräzipitiert werden (Lygerou *et al.*, 1994; Dichtl und Tollervey, 1997; Chu *et al.*, 1997; Stolz und Altman, 1997).

Basierend auf phylogenetischen Studien und "Footprinting"-Experimenten wurde für die *RPR1* RNA ein Sekundärstrukturmodell (Abb. 1-13) erstellt (Zimmerly *et al.*, 1990; Tranguch und Engelke, 1993; Tranguch *et al.*, 1994; Frank *et al.*, 2000). Der Vergleich der eukaryotischen *RPR1* RNase P-RNA-Struktur mit dem bakteriellen Konsensus läßt sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede erkennen: Für alle RNase P-RNAs, sowohl aus Bakterien als auch aus Eukaryoten, scheint eine gemeinsame Kernstruktur konserviert zu sein (Altman *et al.*, 1993; Chen und Pace, 1997; Pitulle *et al.*, 1998). In dieser Kernstruktur lassen sich die fünf konservierten Elemente (CR-I bis CR-V; auch Abb. 1-1 & Abb. 1-2) einschließlich mehrerer konservierter Nukleotide und basengepaarter Bereiche (P1, P2, P3, P4, P7, P10/11 und P12) identifizieren. Die Strukturelemente CR-I, CR-IV und CR-V können auch in RNase P-RNA aus den Mitochondrien von *S. cerevisiae* lokalisiert werden (Martin und Lang, 1997).

Für die durch Paarung der konservierten Regionen CR-I und CR-V gebildete P4-Helix wird im bakteriellen Holoenzym sowohl das katalytische Zentrum als auch eine Protein-Bindungsstelle postuliert (1.3.4.). Durch Mutationsstudien konnte für die P4-Helix der *RPR1* RNA, neben einem Beitrag zur pre-tRNA-Bindung ebenfalls eine essentielle Bedeutung für die Katalysereaktion gezeigt werden (Pagan-Ramos *et al.*, 1996). Den Elementen CR-II, CR-III, P10/11 und P12 wird eine Rolle bei der Koordination von Metallionen in räumlicher Nähe zum katalytischen Zentrum zugeschrieben (Pagan-Ramos *et al.*, 1996; Ziehler *et al.*, 1998), wohingegen für CR-IV Substratbindungsaufgaben vermutet werden (Burgin und Pace, 1990; Harris *et al.*, 1994). Die strukturellen Hauptunterschiede zwischen bakterieller und eukaryotischer RNase P-RNA liegen in den P3 und P15-Elementen. Während P3 in Eukaryoten meist komplexer ist, gilt dies für P15 in Bakterien. Dennoch wird für die eukaryotische P3-Helix, ähnlich wie für das bakterielle Holoenzym (1.3.4.), eine Proteinbindungsfunktion angenommen (Yuan *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1994). Für das P3-Strukturelement wird deshalb ein allgemeiner zentraler Beitrag zur räumlichen Koordination der RNase P-Untereinheiten postuliert. Für die eukaryotische RNase P-RNA konnten bis jetzt keine Hinweise gefunden werden, dass P15 eine so zentrale Rolle zur pre-tRNA-Bindung zukommt, wie dies für das bakterielle Ribozym gilt.

1.4.2. Die Funktion der Protein-Untereinheiten nukleärer RNase P

Der Proteinanteil der eukaryotischen RNase P liegt mit etwa 90 % der Holoenzym-Masse wesentlich höher als der für das bakterielle Ribonukleoprotein (1.3.4.). Gereinigte RNase P aus *S. cerevisiae* verfügt über neun essentielle Protein-Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 15,5-100 kD. (Abb. 1-12). Ähnlich der bakteriellen Protein-Untereinheit zeichnen sich diese Proteine, mit Ausnahme von Pop5p und Pop8p, durch ihren basischen Charakter aus. Wie durch "Footprinting"-Experimente gezeigt werden konnte, überdecken die eukaryotischen RNase P-Proteine die RNA-Untereinheit nahezu vollständig (Tranguch *et al.*, 1994). Keines der identifizierten eukaryotischen Proteine zeigt signifikante Sequenz- oder Domänenhomologien zu bakteriellen Protein-Untereinheiten. Es gilt dennoch als wahrscheinlich, dass sich die Aufgaben einer oder auch mehrerer Protein-Untereinheiten der eukaryotischen RNase P mit denen der bakteriellen Protein-Untereinheit decken. Unbekannt ist, ob die Protein-Untereinheiten als Komplex oder einzeln mit der RNA-Untereinheit zur Bildung des Holoenzym in Kontakt treten.

Typ der Untereinheit	RNase P-Gene in Hefe	Molekulargewicht ^a	RNase P-Gene in Mensch	RNase MRP-Gene in Hefe
RNA	RPR1	120 kD	H1	NME1
Protein	POP1	100,5 kD	hPOP1	POP1
Protein	POP3	22,6 kD	-	POP3
Protein	POP4	32,9 kD	RPP29 ^b	POP4
Protein	POP5	19,6 kD	hPOP5	POP5
Protein	POP6	18,2 kD	-	POP6
Protein	POP7 ^c	15,8 kD	RPP20	POP7 ^c
Protein	POP8	15,5 kD	-	POP8
Protein	RPP1	32,2 kD	RPP30	RPP1
Protein	RPP2	16,3 kD	RPP21	-
Protein	-	-	RPP38 ^d	-
Protein	-	-	RPP40 ^d	-
Protein	-	-	RPP25 ^d	-
Protein	-	-	RPP14 ^d	-
Protein	-	22,5 kD	-	Snm1p

^aMolekulargewichte sind nur für Hefe exakt angegeben; ^bRPP29 auch bekannt als hPOP4; ^cPOP7 auch bekannt als RPP2; ^dBeziehung zwischen Proteinuntereinheiten aus Mensch und Hefe konnte noch nicht hergestellt werden.

Abb 1-12: Zusammensetzung der nukleären RNase P aus Hefe und Mensch, erstellt nach Xiao *et al.*, 2002; Literaturverweise sind dem fortlaufenden Text zu entnehmen.

Zur Funktion der einzelnen Protein-Untereinheiten existieren kaum Daten. Als rekombinante Proteine exprimiert zeigen einige *in vitro* unspezifische RNA-Bindungseigenschaften. Für Pop3p konnte kürzlich gezeigt werden, dass dieses Protein sowohl *RPR1* RNA, pre-tRNA als auch einzelsträngige RNAs bindet (Brusca *et al.*, 2001). Für Rpp21 und Rpp14 menschlicher RNase P wird eine direkte Substrat-Wechselwirkung postuliert, da in *Gelshift*-Experimenten gezeigt werden konnte, dass beide Protein-Untereinheiten pre-tRNAs binden (Jarrous *et al.*, 2001). In *Tetrahymena thermophila* konnten

Quervernetzungen zwischen markierter pre-tRNA und RNase P-Proteinen identifiziert werden (True und Celander, 1998). Einige der Proteine könnten für die Lokalisation des Holoenzym im Kern verantwortlich sein. Verglichen mit der bakteriellen Ribozym-Reaktion scheinen die zusätzlichen Protein-Untereinheiten den Katalysemechanismus nicht wesentlich zu verändern (Pfeiffer *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2000).

1.4.3. Die Tertiärstruktur der eukaryotischen RNase P aus Zellkernen

Durch *in vivo* Interaktionsstudien und *Cross-link*-Experimente war es möglich, ein Modell der Raumstruktur eukaryotischer RNase P aus *S. cerevisiae* zu erstellen (Fields und Song, 1989; SenGupta *et al.*, 1996; Houser-Scott *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass jedes Protein mindestens mit je einer weiteren Protein-Untereinheit in Wechselwirkung steht (Abb. 1-13). Pop1p und Pop4p sind hingegen die einzigen beiden Untereinheiten, die mit *RPR1* RNA spezifische Interaktionen eingehen. Dabei wurde die P3-Helix der *RPR1* RNA als Bindestelle von Pop1p identifiziert (Ziehler *et al.*, 2001). Die proteinbindende RNA-Domäne für Pop4p ist unbekannt. Eine direkte Wechselwirkung weiterer Proteine mit *RPR1* RNA kann von der Konformation der Untereinheiten im Holoenzym abhängig sein. Sie kann deshalb nicht ausgeschlossen werden.

Die Protein-Protein und Protein-RNA-Interaktionen in Hefe decken sich nicht vollständig mit den für humane RNase P gefundenen (Jiang *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass die aus den nur geringen Sequenz-Homologien resultierenden unterschiedlichen Protein-Oberflächen zu unterschiedlichen binären Kontakten führen, während sich die Tertiärstrukturen der Holoenzyme dennoch gleichen.

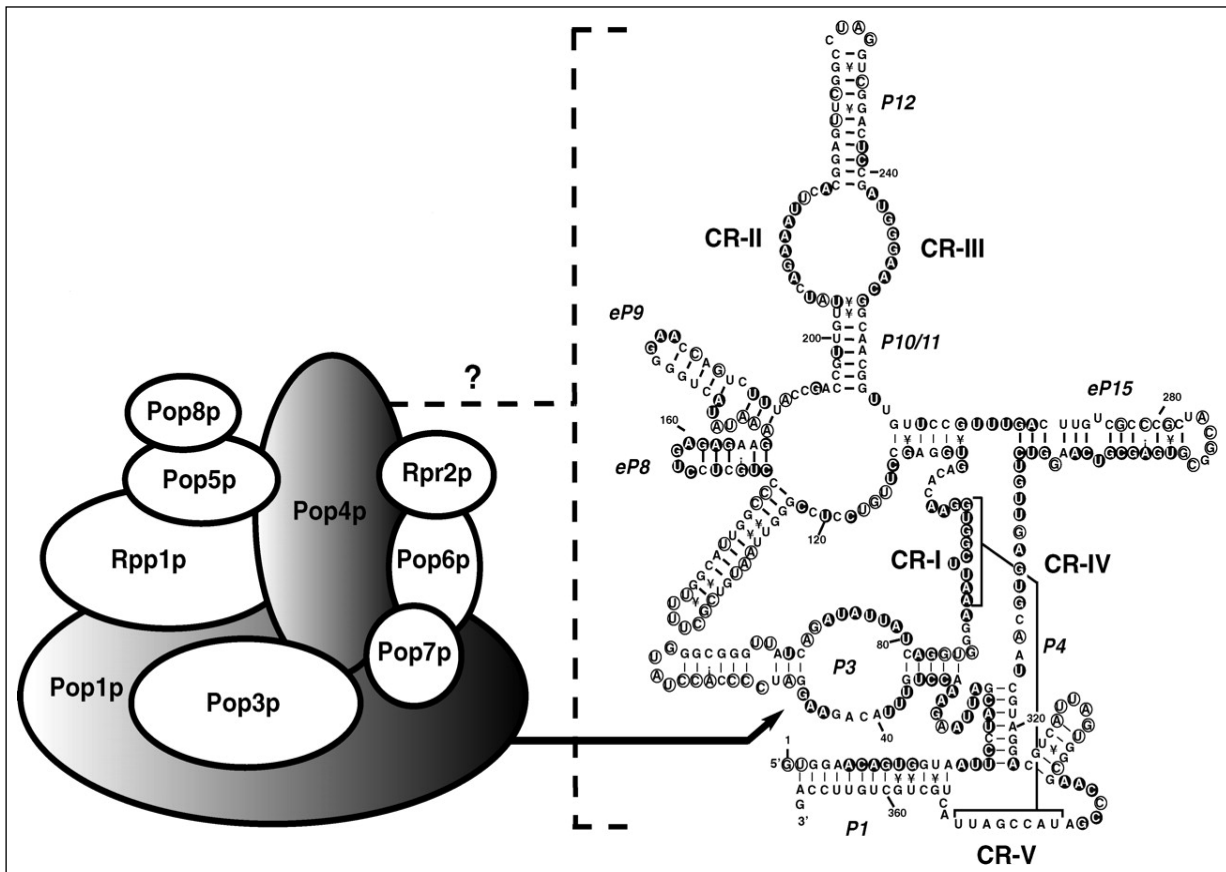


Abb. 1-13: Interaktionsmodell für das nukleäre *S. cerevisiae* RNase P Holoenzym

a) Die Abbildung fasst die in *in vivo* Interaktionsstudien gefundenen Wechselwirkungen für das nukleäre *S. cerevisiae* RNase P Holoenzym zusammen. Sich überschneidende Ovale stehen für Protein-Protein-Wechselwirkungen; die Schattierung von Pop1p und Pop4p repräsentiert eine Interaktion mit der *RPR1* RNA. Pop1p steht dabei, wie durch den Pfeil angedeutet, mit P3 der RNA-Untereinheit in Kontakt. Für Pop4p ist dies ungeklärt.

b) Sekundärstruktur von *RPR1* RNA; die fünf auch in Bakterien hochkonservierten Sequenzbereiche sind mit CR-I bis CR-V bezeichnet. Während mit P konservierte helicale Abschnitte benannt werden, steht eP für Strukturelemente, für die keine direkte Homologie besteht. Jedoch besetzen sie zu bakteriellen RNase P-RNAs ähnliche Sekundärstrukturpositionen (Frank *et al.*, 2000). Nukleotide in gefärbten Kreisen sind im Holoenzym vor chemischer Modifikation oder Nuklease-Angriff geschützt, während nicht eingefärbte Kreise Exposition zum Solvens symbolisieren (Tranguch *et al.*, 1994; Abb. entnommen aus Houser-Scott *et al.*, 2002).

1.4.4. Die Beziehung zwischen RNase P und RNase MRP

Nukleäre RNase P steht in einem engen verwandtschaftlichen Verhältnis zu einem anderen Ribonukleoprotein-Komplex, der RNase MRP. Dieses Enzym konnte bis jetzt nur in Eukaryoten identifiziert werden. Der Großteil der RNase MRP-RNA ist im Kern lokalisiert (Reimer *et al.*, 1988; Kiss *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1994; Jacobson *et al.*, 1995) und spielt vermutlich bei der Prozessierung von pre-rRNAs eine wichtige Rolle (Lindahl und Zengel, 1995; Reilly und Schmitt, 1995; Tollervey, 1995). Sowohl die RNA als auch die Protein-Untereinheiten des Enzyms sind für die Lebensfähigkeit von Hefe Zellen entscheidend (Tollervey, 1995).

Die nukleäre RNase MRP der Hefe ist aus einer RNA-Untereinheit, *NME1* RNA, und mindestens neun Proteinuntereinheiten aufgebaut (Abb. 1-12). Von diesen neun Proteinen sind acht identisch zu Proteinen der nukleären RNase P. Das neunte Protein der RNase MRP, *Snm1p*, unterscheidet sich auf Sequenzebene deutlich vom neunten RNase P-Protein, *Rpr2p*. Allerdings konnte gezeigt werden, das

beide Proteine über ähnliche Protein-Bindungseigenschaften verfügen und beide mit Pop4p interagieren (Houser-Scott *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu Rpr2p kann Snm1p jedoch mit RNA wechselwirken und bindet an die RNase MRP-RNA-Untereinheit (Schmitt und Clayton, 1994).

Für RNase MRP-RNA wurde mehrere Sekundärstrukturen vorgeschlagen, die alle auf phylogenetischen Ansätzen basieren (Forster und Altman, 1990; Karwan, 1993; Schmitt *et al.*, 1993; Schmitt, 1999; Li *et al.*, 2002). Dabei kann die RNA zu einer Struktur gefaltet werden, welche eine hohe strukturelle Homologie zu RNase P-RNA besitzt. RNase MRP-RNA verfügt über mindestens drei der fünf in allen RNase P-RNAs hochkonservierten Regionen (CR-I, CR-IV und CR-V) und über die für Eukaryoten typische Schleife in P3 (Abb. 1-13). Es ist unter jeweiligem Funktionserhalt möglich P3 zwischen RNase P und RNase MRP auszutauschen (Lindahl *et al.*, 2000). Wie in RNase P spielt die P3 Domäne auch in RNase MRP eine wichtige Rolle bei der Bindung von Proteinen im Ribonukleoprotein-Komplex (Pluk *et al.*, 1999).

Die räumliche Anordnung der RNase MRP-Protein-Untereinheiten zur RNA ist noch nicht endgültig geklärt.

1.5. RNase P aus Archaea

Die Charakterisierung archaebakterieller RNase P ist bei weitem nicht so fortgeschritten wie für bakterielle Organismen, da archaebakterielle RNase P-RNA lange Zeit als nicht katalytisch aktiv galt. Unter den extremen Hochsalzbedingungen einer gesättigten NH₄Cl-Lösung konnte in der Zwischenzeit für einige archaebakterielle RNase P-RNAs Ribozym-Aktivität nachgewiesen werden (Pannucci *et al.*, 1999).

Nur vier RNase P Holoenzyme aus Archaea sind genauer untersucht: *H. volcanii* (Lawrence *et al.*, 1987; Nieuwlandt *et al.*, 1991), *S. acidocaldarius* (Darr *et al.*, 1990), *M. jannaschii* und *M. thermoautotrophicus* (Andrews *et al.*, 2001). Die biochemischen Charakteristika dieser Holoenzyme zeigen kein einheitliches Bild: Während *H. volcanii* (Schwebedichte 1,61 g/ml) und *M. thermoautotrophicus* (1,42 g/ml) sich als sensitiv gegenüber Behandlung mit Micrococcus Nuklease erweisen und unter Hochsalzbedingungen über Ribozym-Aktivität verfügen, verhält sich *S. acidocaldarius* (1,27 g/ml) genau entgegengesetzt (Abb. 1-11).

Sowohl auf Sequenz- als auch auf Strukturbasis zeigen alle bekannten RNase P-RNAs aus Archaea größere Homologie zu bakteriellen als zu eukaryotischen RNA-Untereinheiten (Brown *et al.*, 1993; Haas *et al.*, 1996). Die Archaea lassen sich in zwei RNase P-RNA Sekundärstrukturtypen A und M einteilen. *M. thermoautotrophicus* ist ein typischer Vertreter des Typ A, wie er auch in Eubakterien vorkommt (Abb. 1-14). Typ M RNAs finden sich nur in den Archaea *Methanococcus* und *Archaeoglobus*. Sie verfügen nicht über die Strukturelemente P8, L15, P16, P17 und P6. Ein Charakteristikum für RNAs des Typ M sind Erweiterungen in den Bereichen P7, P10 und P11 (Abb. 1-14; Massire *et al.*, 1998; Harris *et al.*, 2001). Typ A RNAs aus Archaea besitzen in den meisten Fällen das 5'-GGU-3'-Substratbindungsmotiv; Typ M RNAs nicht. Alle bekannten archaebakteriellen RNase P-RNAs

mit Ribozym-Aktivität lassen sich ausschließlich dem Typ A zuordnen. Sie können weiterhin mit *B. subtilis* RNase P-Protein zum aktiven Holoenzym rekonstituiert werden (Pannucci *et al.*, 1999).

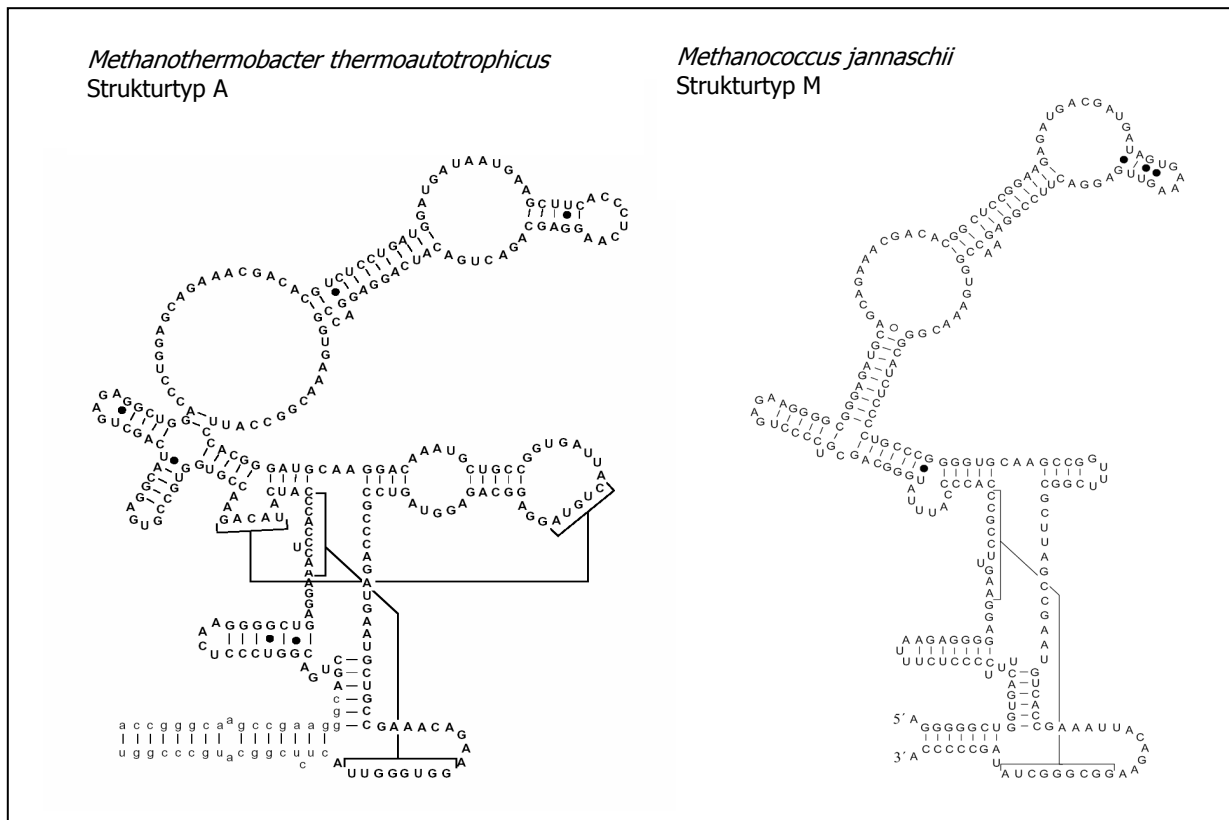


Abb. 1-14: RNase P-RNA Sekundärstrukturen der Archaea *M. thermoautotrophicus* und *M. jannaschii*

Gezeigt sind RNase P-RNA Sekundärstrukturen der Archaea *Methanothermobacter thermoautotrophicus* als Vertreter des Strukturtyp A und *Methanococcus jannaschii* als Vertreter des Typ M.

In keinem Archäebakterium konnte bis heute eine Proteinsequenz identifiziert werden, die über eine signifikante Homologie zu einem bakteriellen RNase P-Protein verfügt. Während die Schwebedichte von *H. volcanii* (Abb. 1-11) eher auf eine kleine bakterienähnliche Protein-Untereinheit schließen lässt, konnten Hall und Brown (2002) zeigen, dass das *M. thermoautotrophicus* RNase P-Holoenzym über mindestens vier Protein-Untereinheiten verfügt. Diese Untereinheiten zeigen eine hohe Sequenzhomologie zu *S. cerevisiae* RNase P-Proteinen. Es ist möglich, die archäobakteriellen Proteine durch Immunpräzipitation mit gegen die eukaryotischen Proteine gerichteten Antikörpern zu isolieren.

RNase P aus Archaea ist also aus einer RNA-Untereinheit von großer Homologie zu bakterieller RNase P-RNA und mehreren Protein-Untereinheiten, die denen aus eukaryotischen Kernen ähneln, zusammengesetzt.

1.6. RNase P aus Organellen

Die energie-gewinnenden Organellen (Mitochondrien und Plastiden) sind in der Zelle durch Membranen räumlich abgegrenzte Strukturen mit speziellen Aufgaben, die als halbautonom bezeichnet werden: sie verfügen über ein reduziertes Genom und sind so zu identischer Vermehrung und Bildung einiger der von ihnen benötigten Proteine fähig.

1.6.1. Mitochondrielle RNase P

Neben dem Nukleus besitzen eukaryotische Zellen Mitochondrien und Chloroplasten als genetisch kompetente Organellen. In Übereinstimmung mit der Endosymbiontentheorie verfügen diese Kompartimente, die ihren Ursprung in frei-lebenden Bakterien haben, über ein eigenes Genom (Gray, 1989). Im Zuge der Evolution wurde jedoch ein Großteil der ursprünglichen genetischen Information an den Zellkern abgegeben. Neben einer Reduzierung der Größe des Organellengenoms, führte diese Entwicklung zur Notwendigkeit des Imports kerncodierter Proteine und RNAs (Lang *et al.*, 1997; Race, 1999) in die Organelle. Die Betrachtung der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen bestimmten Bakterien und Organellen, insbesondere der Vergleich ihrer jeweiligen RNase P, ist deshalb in besonderem Maße geeignet, Einblicke in die Evolution eines ursprünglichen RNA-Enzyms zu geben. Die mögliche Verteilung der Gene für die verschiedenen Untereinheiten eines Holoenzym auf die Zellkompartimente erschwert diesen Ansatz jedoch nicht unwesentlich.

Mitochondrielle RNase P wurde, wenn auch mit großen Unterschieden in der Ausführlichkeit, für Pflanzen, Vertebraten, Hefen und parasitäre Protozoa charakterisiert (Frank und Pace, 1998; Salavati *et al.*, 2001). Dabei ist Zusammensetzung und Struktur der mitochondrialen RNase P aus Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*, am besten untersucht. Das mitochondrielle *S. cerevisiae* RNase P Holoenzym besteht aus einer im mitochondrialen Genom codierten essentiellen RNA-Untereinheit, Rpm1r (490 Nukleotide), und einer kerncodierten Protein-Untereinheit, Rpm2p (105 KDa), (Miller und Martin, 1983; Underbrink-Lyon *et al.*, 1983; Hollingsworth und Martin, 1986; Morales *et al.*, 1989; Morales *et al.*, 1992; Dang und Martin, 1993).

1.6.1.1. Die mitochondrielle RNase P-Protein Untereinheit

Die Rpm2p Protein-Untereinheit ist für die mitochondrielle RNase P Aktivität essentiell. Für diese Untereinheit finden sich jedoch, wie für die nukleären RNase P-Proteine, keine signifikanten Sequenzähnlichkeiten zu den bakteriellen RNase P-Proteinen. Mutationen im Rpm2p codierenden Gen führen zu einer Anreicherung am 5'-Ende nicht prozessierter mitochondrialer tRNAs (Morales *et al.*, 1992). Zusätzlich zur pre-tRNA Reifung spielt Rpm2p für die Prozessierung der mitochondrialen RNase P-RNA eine entscheidende Rolle (Stribinskis *et al.*, 1996; Stribinskis *et al.*, 2001 a/b). Versuche mit *RPM2*-Deletionsmutanten legen den Schluss nahe, dass Rpm2p, zusätzlich zu seiner Funktion für die mitochondrielle Translation, zumindest eine weitere, für die Zelle lebenswichtige, Aufgabe übernommen hat (Kassenbrock *et al.*, 1995). Durch Co-Immunopräzipitation kann in Hefe mit Antikörpern gegen Rpm2p die mitochondrielle RNase P-RNA Untereinheit spezifisch präzipitiert werden (Dang und Martin, 1993). Trotz ähnlicher Masse weisen das nukleäre POP1p und RPM2p keine Sequenzhomologie auf.

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* korrelieren bei der Isolierung von mitochondriellem RNase P Holoenzym aus *Aspergillus* mehrere Proteine mit RNase P Aktivität. Ihre genaue Funktion ist bis jetzt unbekannt (Lee *et al.*, 1996).

1.6.1.2. Die mitochondrielle RNase P-RNA Untereinheit

Die Rpm1r-Untereinheit zeichnet sich trotz ihres hohen Anteils an A-U-Basenpaaren durch zwei in allen RNase P-RNAs konservierte Bereiche aus und lässt sich in der typischen Sekundärstruktur darstellen. Eine Degradierung der RNA, etwa während einer Holoenzym-Präparation, hat keinen Einfluss auf die Prozessierungsaktivität. Katalyse und Substratbindung scheinen deshalb hauptsächlich Aufgabe der Protein-Untereinheit zu sein (Morales *et al.*, 1989). In mehreren anderen Hefen konnten Homologe zu Rpm1r identifiziert werden, die in ihrer Größe (140-490 Nukleotide) jedoch zum Teil erhebliche Unterschiede aufweisen (Shu *et al.*, 1991; Wise und Martin, 1991; Sulo *et al.*, 1995; Stribinskis *et al.*, 1996). Bei der Charakterisierung mitochondrieller RNase P aus Pflanzen konnte ein assoziiertes RNA Fragment identifiziert werden. Die Funktion dieser RNA und das sie codierende Gen sind unbekannt (Marchfelder und Brennicke, 1994).

Für humane mitochondrielle RNase P konnte die Existenz einer RNase P-RNA Untereinheit bis jetzt nicht eindeutig nachgewiesen werden. Während in früheren Arbeiten die Existenz einer RNA-Untereinheit für RNase P aus mitochondriellen HeLa-Extrakten nicht gezeigt werden konnte (Rossmannith *et al.*, 1995; Rossmannith und Karwan, 1998; Rossmannith und Karwan, 1998; Rossmannith und Potuschak, 2001;), wurde von Puranam und Attardi (2001) eine RNA-Untereinheit identifiziert, die der kerncodierten H1 RNA entspricht. Allerdings kann eine Verunreinigung mit nicht-mitochondriellen Zellkompartimenten nicht ausgeschlossen werden. Es erscheint jedoch möglich, wenn auch unwahrscheinlich, dass humane Mitochondrien über zwei Enzyme zur 5'-Prozessierung von pre-tRNA verfügen. Da für keines der beiden Enzyme Studien zu ihrer Rolle im Biosyntheseweg der pre-tRNAs in Mitochondrien vorliegen, ist die Frage nach einer RNase P-RNA im humanen Mitochondrium bis jetzt nicht geklärt.

1.6.2. RNase P aus Chloroplasten

In Analogie zur Diskussion einer RNase P-RNA Untereinheit im humanen mitochondriellen System ist die Zusammensetzung der RNase P aus Chloroplasten höherer Pflanzen ebenfalls unklar. Dabei wurde RNase P-Aktivität bis jetzt aus den Chloroplasten von Spinat und Tabak isoliert (Wang *et al.*, 1988; Gegenheimer, 1995). Eine Reihe von experimentellen Befunden deutet darauf hin, dass sich die RNase P aus den Chloroplasten des Spinats ausschließlich aus Protein-Untereinheiten aufbaut: (a) Die CsCl-Schwebelichte des Enzyms (1,28 g/ml) stimmt mit der von Chloroplastenproteinen überein (Abb. 1-11). (b) Die RNase P-Aktivität ist gegenüber Hydrolyse mit *Micrococcus*-Nuklease inert. (c) Der Mechanismus der 5'-tRNA-Prozessierung scheint sich von dem der bakteriellen RNase P-Ribozyme zu unterscheiden: Chen *et al.* (1997) konnten zeigen, dass durch den Austausch eines Sauerstoff-Atoms gegen Schwefel in der *pro-R_p*-Position des Übergangszustandes die RNase P-Aktivität im Gegensatz zu der aus Bakterien (Warnecke *et al.*, 1996) kaum herabgesetzt wird. Für den Spaltungsmechanismus bakterieller RNase P ist dieses Sauerstoffatom über die Koordination von Mg²⁺-Ionen in direkter

räumlicher Nähe zum katalytischen Zentrum von essentieller Bedeutung. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Gegenheimer (Thomas *et al.*, 2000) lassen deshalb den Schluss zu, dass die Katalysereaktion der RNase P aus Chloroplasten einem anderen Mechanismus folgt.

1.6.3. Morphologie und phylogenetische Stellung von *Cyanophora paradoxa*

Moderne Chloroplasten und Cyanobakterien gehen auf einen gemeinsamen Ursprung zurück. Da die primitiven photosynthetischen Organellen der einzelligen Alge *Cyanophora paradoxa*, die Plastiden, als "Übergangsstadien" zwischen Cyanobakterien und modernen Chloroplasten gelten (Abb 1-16A), wurden sie für diese Arbeit als Modellorganismen gewählt.

C. paradoxa ist eine eukaryontische Alge, die zur Klasse der Glaucophyceae zählt. Die 15 µm lange, dorsiventrale Zelle besitzt zwei unterschiedlich lange Geißeln, die direkt hinter dem Zellvorderpol inserieren (van den Hoek, 1993). Im Inneren der Zelle befinden sich 1-4 photosynthetische Zellorganellen, die Cyanellen (Abb. 1-15). Die Cyanellen stellen aus phylogenetischer Sicht ein echtes Intermediat zwischen Cyanobakterien und modernen Chloroplasten dar.

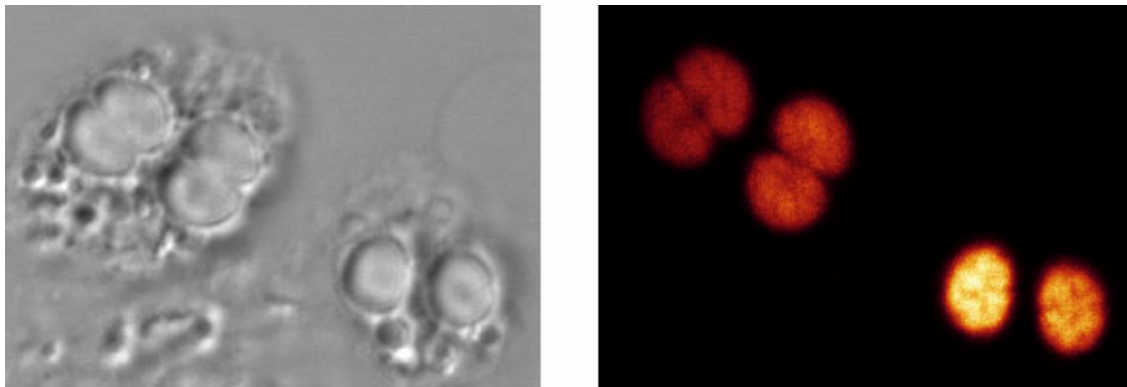


Abb. 1-15: *C. paradoxa* Zellen

und ihre Cyanellen im Durch- und Fluoreszenzlicht. Die Cyanellen sind im Fluoreszenzbild deutlich zu erkennen. Die beiden Aufnahmen sind deckungsgleich. Sie wurden mit einem Konfokalen *laser-scanning* Mikroskop von K. H. Rein (Institut für Genetik, Universität Würzburg) aufgenommen.

Die Cyanellen werden von einer Peptidoglycanschicht nach Außen hin abgrenzt (Herdman und Stanier, 1977; Aitken und Stanier, 1979) und besitzen im Inneren zentral liegende Carboxysomen, die als Speicher für Ribulose-1,5-Biphosphat-Carboxylase dienen. Des Weiteren verfügen sie über an der Zellwand anliegende, konzentrisch angeordnete Thylakoide. Neben Chlorophyll a dienen auch Phycobiliproteine als Photosynthesepigmente. Während den Cyanellen alle diese Eigenschaften mit den Cyanobakterien gemeinsam sind, entsprechen die Größe und die Organisation ihres Genoms eher den in Chloroplasten vorliegenden Verhältnissen (Bohnert *et al.*, 1982; Lambert *et al.*, 1985). Mit ca. 135 kb ist das Cyanellen-Chromosom etwa so groß wie ein typisches Chloroplasten-Genom, aber zehnmal kleiner als das Genom freilebender Cyanobakterien. Wie im Chloroplasten-Genom finden sich im Cyanellen-Genom zwei invers angeordnete repetitive Sequenzen, die durch zwei unterschiedliche lange Regionen mit *single copy*-Genen voneinander getrennt sind (Stirewalt *et al.*, 1995). Die

"inverted repeats" enthalten die Gene für die ribosomalen RNAs, die durch Verdopplung und Inversion diese chloroplastenspezifische Organisation erhielten. In Cyanobakterien und dem sehr ursprünglichen Rotalgen-Chloroplasten aus *Porphyra purpurea*, der ebenfalls für RNase P-RNA codiert, liegen die für ribosomale RNAs codierenden Gene nicht als "inverted repeats" vor.

Trotz der Gemeinsamkeiten in der Genomorganisation zwischen Cyanellen und Chloroplasten wird auch durch den Vergleich der Genanordnung die Abstammung der Cyanellen von den Cyanobakterien deutlich: Das Cyanellen-Genom besitzt proteincodierende Gene, die zwar im Chromosom der Cyanobakterien, nicht aber im Chloroplasten-Genom gefunden werden können. Die Vorläufer der modernen Chloroplasten wurden endosymbiotisch von einer heterotrophen Zelle aufgenommen und verloren im Laufe der Evolution bis zu 90 % ihres Genoms an den Kern.

Die intermediäre Stellung der Cyanellen innerhalb der Chloroplasten-Evolution wird durch Sequenzvergleiche der 16 S rRNA bestätigt (Abb. 1-16).

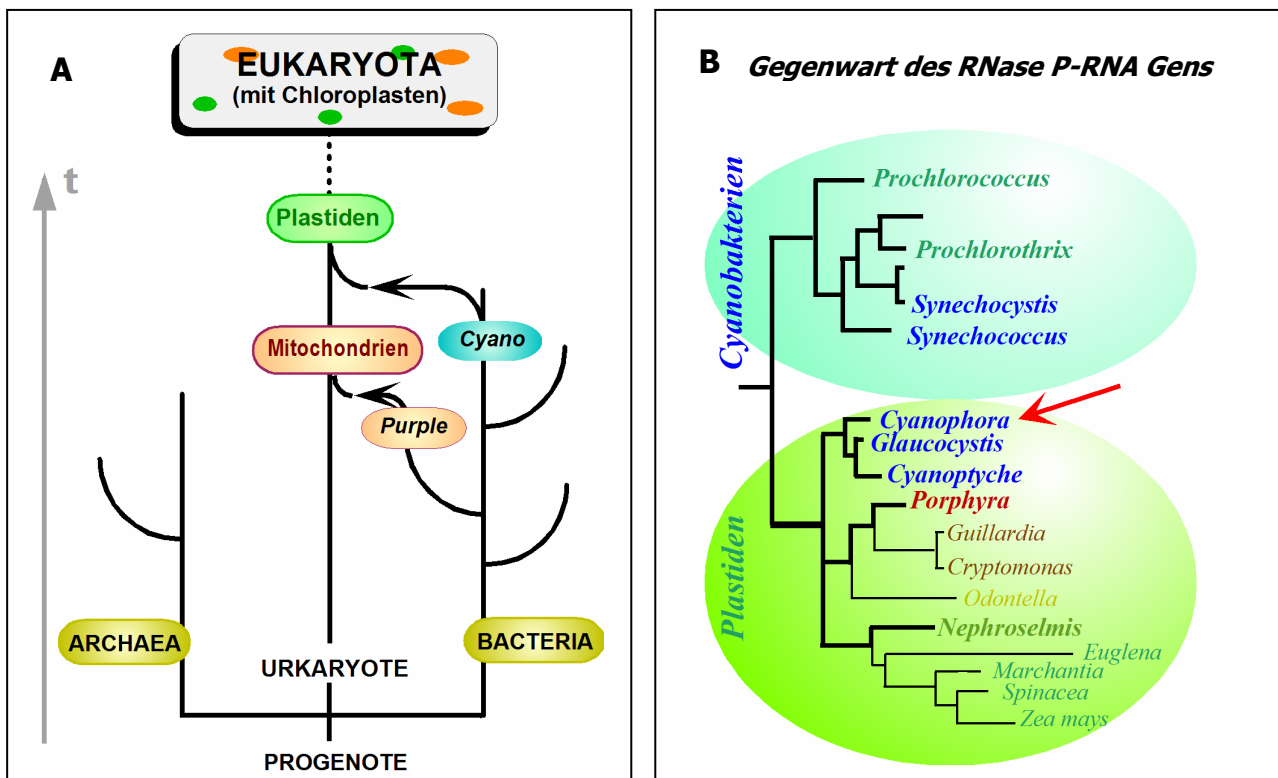


Abb. 1-16: Phylogenetische Stellung von *Cyanophora paradoxa*.

A) Allgemeiner phylogenetischer Stammbaum zur Veranschaulichung der Brückenstellung von Plastiden zwischen Bakterien und Eukaryoten.

B) Der Stammbaum wurde durch 16 S rRNA Sequenzvergleich erstellt. Die Position von *C. paradoxa* ist durch einen roten Pfeil hervorgehoben. Die Anwesenheit eines RNase P-RNA codierenden Gens wird durch dicke schwarze Linien angezeigt.

1.6.4. Funktionelle und strukturelle Eigenschaften der Cyanellen-RNase P von *C. paradoxa*

Baum und Schön (1996) konnten für die Cyanellen der *C. paradoxa* die erste RNA-Untereinheit einer RNase P aus photosynthetischen Organellen nachweisen. Diese RNA ist im Cyanellen-Genom codiert. Sowohl die Sequenz als auch die postulierte A-Typ 2D-Struktur der RNA zeigt große Homologien zu cyanobakteriellen RNase P-RNAs (Abb. 1-17).

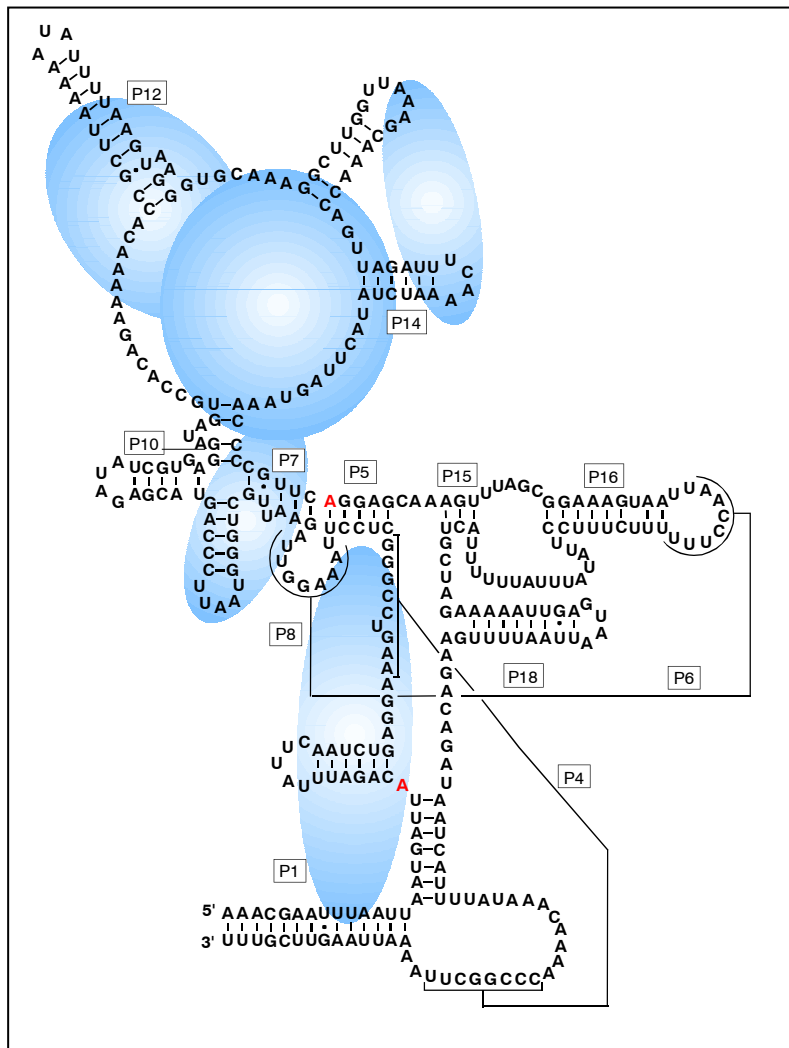


Abb. 1-17: Sekundärstruktur der *C. paradoxa* RNase P-RNA

Die beiden Positionen an denen die Sequenz vom bakteriellen Konsensus abweicht, sind durch rote Buchstaben gekennzeichnet.

Die nach Cordier und Schön (1999) in *Footprinting*-Experimenten geschützten Sequenzabschnitte sind durch blaue Kugeln dargestellt.

Die Nummerierung der Helices richtet sich nach Haas *et al.* (1994).

In den Plastomen höherer Pflanzen können hingegen keine Sequenzhomologien zu RNase P RNAs gefunden werden. In Analogie zur Mehrzahl der Cyanobakterien, jedoch im Gegensatz zu den meisten anderen Bakteriengruppen, enthält die Cyanellen-RNase P-RNA keine Bindungsstelle für das pre-tRNA 3'-CCA-Ende. Ihre Sequenz weicht an zwei sonst voll konservierten Positionen vom bakteriellen Konsensus ab (Abb. 1-17). Die beobachtete Fragmentierung der RNA während der Aufreinigung führt nicht zu einer signifikanten Abnahme der Enzymaktivität. Da die Behandlung mit einer exogenen Nuklease die RNase P-Aktivität jedoch irreversibel zerstört, muss die identifizierte RNA-Untereinheit eine essentielle Komponente für die katalytische Aktivität des Enzyms sein (Cordier und Schön, 1999). Trotz dieser Ergebnisse und der großen Ähnlichkeit der Cyanellen-RNase P-RNA zum Cyanobakterien-Typ zeigt *in vitro* synthetisierte RNA auch unter Hochsalzbedingungen keine Ribozym-Aktivität. Wie

durch Mutationsanalyse gezeigt wurde, ist die Abweichung vom bakteriellen Ribozymkonsensus in den Positionen A22 und A213 (Abb. 1-17) hierfür nicht verantwortlich (Cordier, 1998). Das Fehlen des CCA-Bindungsmotivs in nahezu allen cyanobakteriellen RNase P-RNAs schließt eine hierdurch verhinderte Substratbindung als Grund für die fehlende Cyanellen-Ribozym-Aktivität ebenfalls aus (Hess *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur RNA-Untereinheit kann im Cyanellen-Genom kein zum bakteriellen *mpA*-Gen homologe codierende Sequenz identifiziert werden. Dies gilt für alle bekannten Genome primitiver Plastiden (Reith und Munholland, 1995; Löffelhardt *et al.*, 1997, Kowallik, 1997).

Da die geringe Cs₂SO₄ Dichte (1,28 g/ml) der Cyanellen-RNase P auf einen nur geringen RNA-Anteil und die durch Gelfiltration bestimmte Größe des Enzyms auf einen Protein-Anteil von mehr als 50 % hinweist, lässt sich folgern, dass Cyanellen-RNase P einen wesentlich höheren Protein-Anteil als bakterielle Enzyme besitzt (Cordier, 1998).

Neben RNase P aus den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa* konnten in der Zwischenzeit RNase P-RNA Sequenzen in den Plastomen von *Porphyra purpurea* (Reith und Munholland, 1995), *Nephroselmis olivacea* (Turmel *et al.*, 1999) und *Glaucozystis nostochinearum* (Schön, nicht veröffentlicht) identifiziert werden (Abb. 1-16b). Für das Chloroplasten-Genom aus Mais wird als einziger höherer Pflanze eine RNase P-RNA Sequenz kontrovers diskutiert (Collins *et al.*, 2000).

1.7. Aufgabenstellung

Ribonuclease P (RNase P) aus den Cyanellen von *C. paradoxa* ist bisher die einzige als Ribonucleoprotein charakterisierte RNase P aus photosynthetischen Organellen. Im Rahmen dieser Arbeit sollten verschiedene Aspekte dieses Enzyms näher untersucht werden, um einen umfassenden Vergleich mit schon bekannten RNase P-Spezies durchführen zu können. Von besonderem Interesse war dabei Evolution der RNase P aus Plastiden.

Die funktionelle Charakterisierung cyanobakterieller RNase P-Proteine und der Cyanellen RNase P-RNA durch Rekonstitution zum chimären Holoenzym sollte daher im Vordergrund stehen. Die Prozessierungsaktivität und Substratspezifität dieser heterolog rekonstituierten Holoenzyme sollten genauer untersucht werden. Vergleichende Untersuchungen der RNase P-RNAs aus *C. paradoxa* und *G. nostochinearum* sollten zu einer Definition der minimalen Plastiden-RNase P-RNA beitragen.

Ein besonderes Interesse galt der Identifizierung der Protein-Komponente der Cyanellen RNase P. Diese sollte durch eine Reihe unterschiedlicher Ansätze näher charakterisiert werden, wobei immunologische Studien im Mittelpunkt stehen sollten.

Um die Frage der fehlenden Ribozymaktivität der Organellen-RNase P-RNAs zu beantworten, sollten funktionelle Mutationsanalysen an cyanobakterieller katalytisch aktiver RNase P-RNA durchgeführt werden. In diesem Zusammenhang sollten weiterhin zirkular permutierte Cyanellen RNase P-RNAs mit kovalent verknüpfter pre-tRNA konstruiert und auf Prozessierungsaktivität untersucht werden, um zu klären, ob die Unfähigkeit zur Substratbindung den Grund für die fehlenden Ribozymeigenschaften darstellt.

Auf dem Gebiet der tRNA-Prozessierung im Bereich der Eukaryonten besteht ein erheblicher Wissensrückstand. Deshalb sollte für die nukleäre RNase P aus Pflanzen in Vorarbeiten ein experimenteller Weg zur Isolierung und Charakterisierung des Holoenzym aus *Arabidopsis thaliana* und Weizen aufgezeigt werden.

2. Materialien

2.1. Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Serva, Heidelberg
Amidoschwarz	Serva, Heidelberg
Ammoniumacetat	Grüssing, Filsum
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniummolybdat	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche Dignostics, Mannheim
α -Biotin (Vitamin B ₇)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Detroit, USA
Borsäure	Riedel-de Haën, Seelze
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-gal)	Roche Dignostics, Mannheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid	Riedel-de-Haën, Seelze
Casamino Säuren	Difco, Detroit, USA
Caesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Riedel-de Haen, Seelze
Citronensäure	Riedel-de-Haën, Seelze
Cobalt(II)-Chlorid	Merck, Darmstadt
Cobalt(II)-Nitrat	Merck, Darmstadt
Coomassie Blau (R250)	Serva, Heidelberg
Coomassie Blau (G250)	Serva, Heidelberg
<i>p</i> -Cumarsäure	Roth, Karlsruhe
Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dichlormetylsilan	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylpimelimidat	Fluka, Neu-Ulm
Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{I,2-dioxetan-3,2'-(5'-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]Decan}-4-yl Phenylphosphat (CSPD)	Roche, Penzberg
Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
Eisenammoniumcitrat	Merck, Darmstadt
Eisen(III)-Chlorid	Merck, Darmstadt
Eisen(II)-Ammonium-Disulfat	Merck, Darmstadt
Eisen(II)-Sulfat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethanolamin	Fluka, Neu-Ulm
Ethidiumbromid	Roche Dignostics, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat	Roche Dignostics, Mannheim

Ethylenglycoltetraacetat	Roche Dignostics, Mannheim
Ficoll	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Gelantine	Merck, Darmstadt
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Henkel, Düsseldorf
Guanidiniumhydrochlorid	Serva, Heidelberg
L-Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe
iBlock (gereinigtes Casein)	Roth, Karlsruhe
Imidazol	BIOMOL, Hamburg
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Fluka, Neu-Ulm
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche Dignostics, Mannheim
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Grüssing, Filsum
Kanamycin	Merck, Darmstadt
Kupfer(II)-Sulfat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Roche, Penzberg
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Luminol	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Magnesium(II)-Chlorid	Merck, Darmstadt
Magnesium(II)-Sulfat	Riedel-de Haën, Seelze
Maltose	Merck, Darmstadt
Mangan(II)-Chlorid	Merck, Darmstadt
Mangan(II)-Sulfat	Riedel-de Haën, Seelze
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N'-Methylenbisacrylamid	Merck, Darmstadt
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Serva, Heidelberg
Natriumacetat	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumazid	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumcarbonat	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Roth, Karlsruhe
Natriumborat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumnitrat	Merck, Darmstadt

Natriummolybdat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Grüssing, Filsum
Nickel(II)-Chlorid	Roche Dignostics, Mannheim
Nonidet P-40 (NP-40)	Fluka, Neu-Ulm
Norleucin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pepstatin	Roche, Penzberg
Pepton	Difco, Detroit, USA
Phenol	Riedel-de Haën, Seelze
Phenylalanin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roche Dignostics, Mannheim
Polyvinylpyrrolidon (PVP-4)	Roche Dignostics, Mannheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
ortho-Phosphorsäure	Riedel-de Haën, Seelze
Rubidiumchlorid	Merck, Darmstadt
D(+)-Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
Silber(I)-Nitrat	Merck, Darmstadt
Spermidin	Roche Dignostics, Mannheim
Tetracyclin	Roche Dignostics, Mannheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Thiamin (Vitamin B ₁)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Toluidinblau	Merck, Darmstadt
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxy-methyl)-aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (30 %)	Serva, Heidelberg
Xylencyanol FF	Serva, Heidelberg
Polyethylenglykol 20000	Merck, Darmstadt
Zinksulfat	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Serva, Heidelberg

Alle Chemikalien wurden in der Qualität p.a. oder in der Qualität für Molekularbiologie eingesetzt.

2.2. Nukleotide und Oligonukleotide

2'-Deoxyribonukleosid-5'-triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche Dignostics, Mannheim
Ribonukleosid-5'-triphosphate (ATP, CTP, GTP, UTP)	Roche Dignostics, Mannheim
Hefe-tRNA	Roche Dignostics, Mannheim

Radiochemikalien:

Adenosin-5' [γ ³² P]-triphosphat (spezifische Aktivität: 3000 Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig
Guanosin-5' [α ³² P]-triphosphat (spezifische Aktivität: 400Ci/mmol)	Hartmann, Braunschweig

Oligonukleotid	Oligonukleotidsequenz	T _m
As1	5'-GAATTCGTATATGGCCCTCGTCTAGTGATGCCCTATCGTCTAGTGG-3'	142 °C
AtpopIntr	5'-CTAGGACCATGACAAAAACAACC-3'	64 °C
Cy3'Dra	5'-ACGTCACGCGTCGACCTACTTTAAACGAACTTAATTTAAGCC-3'	126 °C
Cy2F	5'-GAGCCTCGGTCTGAATAG-3'	58 °C
Cy5'Tetra	5'-ACGCGTCGACCCGGTAACCAAACGAATTTAATTAATG-3'	110 °C
Cy2rev	5'-GCTCTCCACGCCAACCCAG-3'	60 °C
Cprp5'-anti	5'-GAGCCCGGACTTTCCTCAGAATTCG-3'	78 °C
Cprp3'-anti	5'-TTTGTTCCTGGGCCGAATTT-3'	52 °C
cp305Eco	5'-GCGAATTCTCTTCAAATAATTAATTC-3'	70 °C
CyGSP2	5'-GTGTTTTTCTGTGGCACTATCCTC-3'	70 °C
ET7Syn5'	5'-GCGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTAGGGAGG-3'	120 °C
Fl15Tyr	5'-GCGGAATTCCTCCCGTGGTGGGGTTCC-3'	92 °C
Fl17Tyr	5'-GCGGAATTCACCCCGTGGTGGGGTTCC-3'	92 °C
Fl19Tyr	5'-GCGGAATTCATTACCCCGTGGTGGGGTTC-3'	92 °C
Glu3'Eco	5'-CGCGAATTCGTCAGGATGTCCGACGCTGGTACC-3'	110 °C
PmA20-53	5'-GCAGGAGAGGTGATCACAATCGAGATTTATC-3'	94 °C
PmA20-R	5'-CGATAAATCTCGATTGTGATCACCTCTCCTG-3'	94 °C
PmA240-53	5'-GCTTGGTAAACCCCGTTAGGTGCAAGGCAA-3'	102 °C
PmA240-R	5'-CTTTGCCTTGACCTAACCGGGGTTACCAA-3'	102 °C
PmT79-53	5'-GGAAAGTCCGGGCTCCTAGATGGTCCAATT-3'	98 °C
PmT79-R	5'-CAAGTTGGACCATCTAGGAGCCCGGACTTTC-3'	98 °C
POP1GSP2	5'-CATAGTGAATCGTTTAGCGTGC-3'	64 °C
Rpl18f	5'-CGCACAACATGTACAAGGAG-3'	60 °C
Rpl18rev	5'-GGAGATCGAGTTTGTGAGGG-3'	62 °C
Syn3'Bam	5'-GCGGATCCGACGCATCTCGAGAGTTAGTCGTAAG-3'	106 °C
T7cp305	5'-CGCAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGCAGATAATCATTATAAAC-3'	130 °C

2.3. Enzyme, Proteine und Antikörper

Alkoholdehydrogenase

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

β-Amylase

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

AMV Reverse Transkriptase

Promega, Mannheim

α-SynPP-AB (Kaninchen)

Eurogentec, Herstal

α-ATPOP1P- AB (Kaninchen)

Eurogentec, Herstal

Anti-Kaninchen IgG (Ziege) Alkalische Phosphatase gekoppelt

Sigma, Deisenhofen

Anti-Maus-IgG (Ziege) Meerrettich-Peroxidase gekoppelt

Santa Cruz, Heidelberg

Anti-RGS(H)₄ Antikörper (Maus)

Qiagen, Hilden

Apoferritin

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Bam HI

NEB, Schwalbach

Bs I

NEB, Schwalbach

Bst NI

NEB, Schwalbach

Bst XI

NEB, Schwalbach

Carboanhydrase

Roche Dignostics, Mannheim

Cytochrom C	Serva, Heidelberg
CIP	Roche Dignostics, Mannheim
<i>Dpn I</i>	NEB, Schwalbach
<i>Eco RV</i>	Roche Dignostics, Mannheim
<i>Eco RI</i>	NEB, Schwalbach
<i>Fok I</i>	NEB, Schwalbach
Fumarase	Roche Dignostics, Mannheim
<i>Hind III</i>	NEB, Schwalbach
Ovalbumin	Roche Dignostics, Mannheim
<i>Pfu</i> -Polymerase	NEB, Schwalbach
<i>Pvu II</i>	Pharmacia, Freiburg
Phosphorylase b	Roche Dignostics, Mannheim
Rinderserumalbumin (Fraktion V)	Roche Dignostics, Mannheim
RNase A	Roche Dignostics, Mannheim
RNase-Inhibitor (RNasin)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RNase Protection Kit	Promega, Mannheim
Sequenase 2.0 Kit	Amersham, Braunschweig
<i>Sma I</i>	NEB, Schwalbach
<i>Sna BI</i>	NEB, Schwalbach
T4 RNA-Ligase	Roche Dignostics, Mannheim
T7 RNA-Polymerase	Dr. A. Schön, Leipzig
T4 Polynukleotidkinase (PNK)	NEB, Schwalbach
TMV-Hüllprotein	Biochemie, Würzburg
<i>Tth</i> -Polymerase	Biozym, Oldendorf
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	Serva, Heidelberg
Trypsin-Inhibitor (Rind)	Serva, Heidelberg
<i>Xho I</i>	Pharmacia, Freiburg

Protein-Molekulargewichtstandards:

Die genaue Zusammensetzung der Molekulargewichtstandards ist nur dann angegeben, wenn diese nicht kommerziell erstanden wurden.

<u>MW-Standard I</u>	<u>MW-Standard II</u>	<u>MW-Standard III</u>	<u>MW-Standard IV</u>
BioLabs Broad-Range 6-175 kD (PP708S)	Serva Low Weight 7,5-28 kD (39209 NPS)	28 kD Carboanhydrase 17,5 kD TMV-Hüllprotein 14,0 kD Lysozym	48 kD Aldolase 28 kD Carboanhydrase 17,5 kD TMV-Hüllprotein 12,5 kD Cytochrom C

2.4. Plasmide

pBlue9511PP-T	S. Stah, Würzburg
pBluescribeQF	Dr. A. Schön, Leipzig
pBlueE-wt	Dr. A. Schön, Leipzig
pCyEH4.3	M. Baum, Würzburg
pDW27	Dr. A. Schön, Leipzig
pE-wt	Dr. A. Schön, Leipzig

pRSETATpop1	N. Menzel, Würzburg
pRSETATpop1ΔI	N. Menzel, Würzburg
pSu3-wt	Dr. G. Krupp, Kiel
pT7G3-CyRPR	C. Fingerhut, Würzburg
pT7His	A. Cordier, Würzburg
pT7CyRPR-G22	C. Fingerhut, Würzburg
pT7CyRPR-G213	C. Fingerhut, Würzburg
pT7CyRPR-G22-G213	C. Fingerhut, Würzburg
pT7CyRPR-C57-G213	C. Fingerhut, Würzburg
pT7CyRPR-G22-C57-G213	C. Fingerhut, Würzburg
pUC19	C. Fingerhut, Würzburg
pT7Pmk	O. Gimple, Würzburg
pQE-30PPBsub	R. Hartmann, Lübeck
pQE-30C5	Dr. C. Green, SRI
	International Menlo Park, USA
pQ9511PP	S. Stahl, Würzburg

2.5. Biologisches Material

2.5.1. Bakterienstämme

Bakterienstämme zur Klonierung

E. coli DH5α

A. Schön, Leipzig

E. coli JM109

A. Schön, Leipzig

Bakterienstämme zum λ-cDNA-Bibliothek-Screening bzw. *In vivo* Exzision

E. coli XL1-Blue-MRF'

Stratagene, Heidelberg

E. coli SOLR

Stratagene, Heidelberg

Bakterienstämme zur Überexpression im T5-System

Bakterienstamm

Eigenschaften

M15 (pREP4) (Qiagen)

lac⁻, ara⁺, gal⁺, F⁻, recA⁺, uvr⁺, lon⁺, mtl⁻, thi⁻,
pREP4kan^r

SG13009 (pREP4)

lac⁻, ara⁺, gal⁺, F⁻, recA⁺, uvr⁺, lon⁺, mtl⁻, thi⁻,
pREP4kan^r

Bakterienstämme zur Überexpression im T7-System

Bakterienstamm

Eigenschaften

BL21(DE3) (InVitrogen)

recA⁻, endA⁻, dcm⁻, gal⁺, lac⁻, lon⁺, F⁻, uvr⁻, rne⁻
hsdS_B(r_B-m_B⁻), (DE3)

BL21Star (DE3) (InVitrogen)

recA⁻, endA⁻, dcm⁻, gal⁺, lac⁻, lon⁺, F⁻, uvr⁻, rne⁻
hsdS_B(r_B-m_B⁻), rne131⁻, (DE3)

Rosetta(DE3) (Novagen)

recA⁻, endA⁻, lac⁻, lon⁺, ompT⁻, (DE3)

Rosetta(DE3)pLysS (Novagen)

recA⁻, endA⁻, lac⁻, lon⁺, ompT⁻, (DE3), pRAREcam^r

2.5.2. λ-Phagen

λSynPP
λpBr

G. Grimmer
A. Meisner

2.5.3. Algenkulturen

Cyanophora paradoxa, Stamm PCC C. 7201
Glaucocystis nostochinearum

Dr. A. Schön, Leipzig
Dr. A. Schön, Leipzig

2.6. Chromatographiemedien

2.6.1. Lose Materialien

DEAE-Cellulose DE23
Nickel-NTA-Agarose
Oligo (dT)Cellulose
Protein-A-Sepharose

Whatman Ltd, Maidstone, GB
Diagen, Düsseldorf
Stratagene, Heidelberg
Pharmacia, Freiburg

2.6.2. Fertige Chromatographieplatten, Folien und Säulen

F254 fluoreszierende Dünnschichtplatte
Microcon™ Mikrokonzentratoren
Mobicol 1 ml Säulchen
Nucleobond AX5
Nucleobond AX500

Merck, Darmstadt
Amicon, Witten
MoBiTec, Göttingen
Macherey und Nagel, Düren
Macherey und Nagel, Düren

2.7. Gebrauchsfertige Analyse-Reagentsätze (Kits)

ABI PRISM Dye Terminator Sequencing Ready Reaktion

Prekin Elmer, Foster City, CA,
USA

Gigapack III Gold Cloning Kit
JETquick Gel Extraction Spin Kit
JETquick PCR Purification Spin Kit
JETprep Plasmid DNA Isolation und Purification Kit
RNeasy Plant Mini Kit
Quiaquick-spin PCR-Purification Kit
ZAP-cDNA Synthesis Kit

Stratagene, Heidelberg
Genomed, Bad Oyenhausen
Genomed, Bad Oyenhausen
Genomed, Bad Oyenhausen
Qiagen, Hilden
Qiagen, Hilden
Stratagene, Heidelberg

2.8. Geräte und sonstige Materialien

Apparaturen für die vertikale Gelelektrophorese

Eigenbau des Instituts für
Biochemie, Würzburg

Apparaturen für die horizontale Gelelektrophorese
Aquariumluftpumpe
Dialyseschläuche
Econo Columns, diverse
Elektroblotting Apparatur 250/2.5 power supply
Faltenfilter
Geltrockner Modell 223

Pharmacia, Freiburg
Vitakraft, Hamburg
Serva, Heidelberg
BIO-RAD, München
BIO-RAD, München
Machery und Nagel, Düren
BIO-RAD, München

Gene Pulser	BIO-RAD, München
Hybaid Omni Gene	MWG-Biotech, Ebersberg
Kolbenhubpipetten	Gilson/Abimde, Langenfeld
	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge J-6B	Beckman Instruments,
Rotor JA10	München
Kühlzentrifuge TJ-6	Beckman Instruments,
Rotor JS 4.2	München
Kühlzentrifuge Hermle ZK400	Hermle, Gosheim
Rotoren AS6.9, AS8.4	
Kühlzentrifuge Biofuge 28 RS	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge J2-21	Beckman Instruments,
Rotoren SS34, GSA, GS-3	München
Magnetrührer	IKA-Labortechnik, Staufen
Mikroreaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrowellenherd R-8200E	Sharp-Elektronik, Hamburg
Nitrocellulose-Membran, Protran (0,45 µm)	Schleicherer und Schüll, Dassel
Nitrocellulos-Rundfilter (Ø 7 und 13,5 0,45 µm)	Schleicherer und Schüll, Dassel
Nylonmembran <i>Porablot NY plus</i>	Machery und Nagel, Düren
PhosphoImager	Molecular Dynamics, Kent, GB
Photometer Novaspec II	Pharmacia, Freiburg
Röntgenfilm Retina XBD	Photochemische Werke, Berlin
Rundschüttelinkubator HT	Infors, München
Speed Vac Concentrator SVC 100	Savant Instruments,
	Farmingdale, USA
Sterilbank HA 2458 GS	Heraeus, Hanau
Sterilfilter, Porengröße 0,22/0,45 µm	Schleicher und Schüll, Dassel
Szintillationszähler LS 5000 TD	Beckman Instruments,
	München
Tischschüttler Ika-Vibrax-VXR	IKA-Labortechnik, Staufen
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikroliter	Hettich, Tuttlingen
Transblot SD Semi-Dry Transfer-Cell	BIO-RAD, München
Transblot SD Semi-Dry Transfer-Cell Spannungsgerät	BIO-RAD, München
Ultrazentrifuge L8-55	Beckman Instruments,
Rotoren: Ti-40/Ti80	München
Verstärkerfolie Dr. Goos Spezial	Hartenstein, Würzburg
Vortexgerät	Bachofer, Reutlingen
Wasserbad	Ges. f. Laboratoriumsgeräte,
	Burgwedel
Western-Blot Spannungsgerät	BIO-RAD, München
Western-Blot Transferzelle	BIO-RAD, München
Zeta-Probe ^R Membran	BIO-RAD, München

3. Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden nach Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Alle in dieser Arbeit angegebenen Konzentrationen beziehen sich, soweit nicht anders erwähnt, auf die jeweilige Endkonzentration. Arbeiten im Umgang mit RNA und Zellextrakten bedürfen einer besonderen Sorgfalt, um eine Kontaminierung mit RNasen und Proteasen zu vermeiden. Die verwendeten Plastikgefäße und Lösungen wurden deshalb - soweit nicht anders angegeben - autoklaviert (20 min, 120 °C) bzw. steril filtriert (Porengröße 0,22 µm); Glasgeräte wurden 2 h bei 150 °C gebacken.

3.1. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

3.1.1. Auftrennung von Nukleinsäuren durch horizontale Agarosegel-Elektrophorese

3.1.1.1. Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA (Plasmide, PCR-Produkte) wird die horizontale Agarosegel-Elektrophorese verwendet (Sambrook und Russel, 2001).

Die aus D- und L-Galaktose alternierend linear aufgebaute Agarose wirkt als Molekularsieb. Die Trennleistung der Agarose ist dabei abhängig von der Konzentration: Man verwendet standardisiert 0,6%, 0,8% und 2,0% (w/v) für Trennbereiche von 1-20 kbp, 0,7-9 kbp bzw. 0,1-2,0 kbp. Dabei verhält sich die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare des Nukleinsäuremoleküls solange die angelegte Spannung 5 V/cm Elektrodenabstand nicht übersteigt. Durch gleichzeitige Auftrennung eines Längenstandards kann die Größe unbekannter Nukleinsäuren durch Vergleich bestimmt werden. Wird dem Gel- und Laufpuffer Ethidiumbromid zugesetzt, können die Nukleinsäuren im langwelligen UV (302 nm) sichtbar gemacht werden. Ethidiumbromid interkaliert zwischen GC-Paare und fluoresziert nach entsprechender Anregung. Die Nachweisgrenze für DNA liegt bei etwa 50-100 ng.

Gelmaße:	7 x 10,5 bzw. 3 x 7,7 cm
Volumen der Gellösung:	45 bzw. 27 ml TBE
Volumen des Elektrophoresepuffers	250 ml
Trennspeisung:	100 V/1-2 h

Die Agarose (% (w/v) = Gelkonzentration) wird durch mehrmaliges Aufkochen in 50 ml des gewählten Elektrophoresepuffers vollständig gelöst. Die auf 60 °C abgekühlte Gellösung wird mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) supplementiert, in die Gelkammer gegossen und der Taschenformer zügig eingesetzt. Nach dem Erstarren der Gelmatrix wird das Gel so in die mit Puffer und Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) gefüllte Elektrophoresekammer gelegt, dass es vollständig mit Puffer überschichtet ist. Erst jetzt wird der Taschenformer herausgezogen und die Taschen sorgfältig mit Puffer nachgespült. Die Proben werden mit 5x Agarosegel-Ladepuffer versetzt, in die Taschen gefüllt und nach Anlegen einer Spannung von 60-80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Dauer der Elektrophorese richtet sich nach der Agarose-Konzentration des Gels und der Größe der erwarteten Fragmente.

10x TBE		
		Einwaage [g/l]
Tris	890 mM	107,8
H ₃ BO ₄	890 mM	55,02
Na ₂ EDTA	20 mM	7,44
ddH ₂ O	ad 1000 ml	

5x Agarosegel-Ladepuffer		
		Menge/10 ml
Glycerin (86 %)	50 %	5,8 ml
Na ₂ EDTA (0,5 M)	25 mM	0,5 ml
XCFE (1 %)	0,03 %	300 µl
BPB (1 %)	0,03 %	300 µl
ddH ₂ O	ad 10 ml	

3.1.1.2. Denaturierende Agarosegel-Elektrophorese zur Auftrennung von RNA

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA unter denaturierenden Bedingungen werden 1 % Agarosegele mit 2 % Formaldehyd-Anteil verwendet. Nach dem Einwiegen der Agarose wird diese in ddH₂O mehrmals aufgekocht (3.1.1.1.). Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C werden MOPS-Puffer und 37 % Formaldehyd zugegeben. Direkt vor der Auftrennung wird die RNA mit 0,5 Vol. frisch zubereitetem Probenpuffer versetzt und für 2 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wird in 1x MOPS bei 30 bis 100 V solange durchgeführt, bis BPB das untere Drittel des Gels erreicht hat. Die RNA wird im Anschluss unter UV-Licht durch fluoreszierendes Ethidiumbromid nachgewiesen.

Denaturierendes Agarosegel (1 %)		
	Menge/60 ml-Gel	Menge/300 ml-Gel
Agarose	0,5 g	3 g
MOPS-Puffer (10 x)	6 ml	30 ml
Formaldehyd (37 %)	9 ml	54 ml
EtBr (10 mg/ml)	1 µl	6 µl
DEPC ddH ₂ O	ad 60 ml	ad 300 ml

10x MOPS-Puffer	
MOPS	0,2 M
NaOAc	50 mM
EDTA	10 mM
ddH ₂ O	pH 7,0 mit NaOH

Probenpuffer	
	Menge/100 µl
Formaldehyd (37 % (v/v))	17,3 µl
Formamid (deionisiert)	48 µl
Probenpuffer-Prämix	34,7 µl

Probenpuffer-Prämix	
	Menge/500 µl
10x MOPS	160 µl
EtBr (10 mg/ml)	10 µl
Glycerin (86 % (v/v))	80 µl
BPB-Lösung (gesättigt)	80 µl
ddH ₂ O	ad 500 µl

3.1.2. Polyacrylamid-Elektrophorese zur Analyse von Nukleinsäuren (PAGE)

Für ein Gel der Maße 20 x 40 x 0,04 cm werden 40 ml Gellösung benötigt. Unmittelbar nach der Zugabe von 40 µl TEMED und 200 µl 10 % APS wird die Lösung luftblasenfrei zwischen zwei durch Abstandhalter getrennte Glasplatten gegossen und der Taschenformer eingesetzt. Das Gel polymerisiert in horizontaler Lage und wird anschließend vertikal mit den Taschen nach oben in eine mit Elektrophoresepuffer (1x TBD) gefüllte Gelapparatur eingespannt. Die hintere Glasplatte wird mit einer Aluminiumplatte (1-3 mm dick) bedeckt, um eine gleichmäßige Wärmeverteilung zu gewährleisten.

Die zu analysierenden Proben, die sich in einem Harnstoff- oder Formamidpuffer befinden, werden kurz vor dem Auftragen durch Erhitzen (80 °C, 2 min) denaturiert, kurz zentrifugiert und dann auf Eis gestellt, um eine Renaturierung zu verhindern. Kurz vor dem Auftragen der denaturierten Proben werden die Taschen gründlich mit Elektrophoresepuffer ausgespült.

Gelmaße:	20 x 40 / 20 x 20 cm
Volumen der Gellösung:	20 bzw. 40 ml
Volumen des Elektrophoresepuffers:	1000 ml
Trennungsspannung:	20 x 20 cm: max. 20 W / 1-2 h 40 x 20 cm: max. 40 W / 1-2 h

Für den Übertritt der Proben in die Gelmatrix wird eine Spannung von 600 V gewählt. Die Elektrophorese wird bei 1600 V mit einer maximalen Leistung von 40 W durchgeführt. Nach Beendigung der Auftrennung können die Nukleinsäurebanden durch Fluoreszenzlöschung (3.1.3.1.), Toluidinblaufärbung (3.1.3.2.) oder, falls sie radioaktiv markiert sind, durch Autoradiographie (3.1.3.3.) sichtbar gemacht werden.

500 ml Stammlösung	6 %	8 %	10 %	15 %	20 %
AA:Bis (29:1) 30 %	100 ml	133 ml	166 ml	250 ml	333 ml
10x TBD	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml	50 ml
Harnstoff	240,8 g	240,8 g	240,8 g	240,8 g	240,8 g
ddH ₂ O	ad 500 ml	ad 500 ml	ad 500 ml	ad 500 ml	ad 500 ml

-Die Stammlösungen werden filtriert und sind bei 4 °C mehrere Wochen haltbar-

Harnstoff-Puffer (RNA-Proben)		Formamid-Puffer (DNA-Proben)		10x TBD		
Harnstoff	8 M	Formamid	90 %		Endkonzentration	Einwaage/ l
XCFE	0,03 %	Na ₂ EDTA	20 mM	Tris	900 mM	11,6 g
BPB	0,03 %	XCFE	0,03 %	H ₃ BO ₄	900 mM	55,6 g
		BPB	0,03 %	Na ₂ EDTA	25 mM	9,3 g
				ddH ₂ O	ad 1000 ml	

3.1.3. Lokalisierung von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen

3.1.3.1. Lokalisierung durch Fluoreszenzlöschung

Größere Mengen an Nukleinsäuren, die in präparativen Gelen aufgetrennt wurden, können durch Fluoreszenzlöschung leicht lokalisiert werden. Das beidseitig mit Haushaltsfolie bedeckte PAA-Gel wird nach der Elektrophorese auf eine im UV-Licht fluoreszierende DC-Platte gelegt und mit UV-Auflicht (254 nm) bestrahlt. Größere Nukleinsäuremengen löschen bei Licht dieser Wellenlänge die Fluoreszenz der Platte und sind als blau-graue Schatten sichtbar. Die entsprechenden Banden werden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Nukleinsäuren nach 3.1.4.2. eluiert. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 1 µg.

3.1.3.2. Lokalisierung durch Toluidinblaufärbung

Toluidinblau ist ein kationischer Farbstoff, der sich an Nukleinsäuren anlagert und diese nach Gelentfärbung so sichtbar macht. Die Nachweisgrenze liegt bei 50 - 100 ng.

Zur Anfärbung wird das Polyacrylamidgel vorsichtig von beiden Glasplatten getrennt und in Färbelösung 30 min geschüttelt. Das Gel wird solange entfärbt, bis die Nukleinsäurebanden deutlich sichtbar werden. Bei präparativen Gelen werden die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die Nukleinsäuren eluiert (3.1.4.2.). Analytische PAA-Gele können auf Whatman 3MM-Filterpapier getrocknet und so archiviert werden.

Toluidinblaufärbelösung		Entfärbelösung	
Toluidinblau	0,4 % (w/v)	Methanol	35 % (v/v)
Methanol	35 % (v/v)	Essigsäure	1 % (v/v)
Essigsäure	1 % (v/v)		

3.1.3.3. Lokalisierung durch Autoradiographie

analytisch:

Zur Konservierung des Bandenmusters mittels PAA-Gel aufgetrennter radioaktiv markierter Nukleinsäuren wird das Gel auf einem Whatman 3MM-Filterpapier getrocknet und exponiert. Die optimalen Expositionsbedingungen sind von der eingesetzten Menge an Radioaktivität abhängig. Neben der Expositionsdauer können Signale durch die Verwendung von Verstärkerfolie (Dr. Goos Spezial), vorsensibilisiertem Film und Lagerung bei -80 °C verstärkt werden.

Wahlweise kann das Bandenmuster auch über Exponierung in einer PhosphoImager-Kassette sichtbar gemacht werden.

präparativ:

Nach der Auftrennung von radioaktiv markierten Nukleinsäuren wird eine der beiden Glasplatten des PAA-Gels vorsichtig entfernt, das Gel mit Haushaltsfolie abgedeckt, mit Fluoreszenzmarkern versehen und mit einer Glasplatte abgedeckt. Zur Lokalisierung der Nukleinsäuren wird ein Röntgenfilm zwischen Haushaltsfolie und Glasplatte gelegt, entsprechend exponiert und entwickelt. Durch die Fluoreszenzmarker wird eine eindeutige Positionierung des Films relativ zum Gel möglich.

3.1.4. Elution von gelelektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren aus der Gelmatrix

3.1.4.1. Elution von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Zur Isolierung werden die durch Ethidiumbromid gefärbten Nukleinsäure Fragmente unter UV-Licht der Wellenlänge 302 nm lokalisiert und ausgeschnitten. Die weitere Aufarbeitung erfolgt mit Hilfe des *JETquick Gel Extraction Spin Kits (Genomed)* nach der Herstellervorschrift. Dabei werden die Nukleinsäuren bei hoher Salzkonzentration an die Oberfläche einer Silikamatrix-Suspension gebunden und bei niedrigerer Konzentration wieder abgelöst. Durch die Verwendung von vorgewärmtem (65 °C) TE-Puffer (pH 8,0) kann die Ausbeute erhöht werden.

TE-Puffer	
Tris-HCl; pH 7,	10 mM
Na ₂ EDTA	1 mM

3.1.4.2. Elution von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen

Zur Rückgewinnung von Nukleinsäuren aus einer Polyacrylamidmatrix wird die entsprechende Bande nach ihrer Lokalisierung mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200 µl Elutionspuffer wird die Probe 20 min bei -20 °C eingefroren, um die Gelmatrix aufzubrechen. Nach Elution über Nacht (4 °C , IKA-Vibrax-VXR 1600 UpM) wird der Überstand abgenommen und nochmals mit 150 µl Elutionspuffer eluiert (4 °C , 3 h). Die Nukleinsäurefraktionen werden anschließend vereinigt und präzipitiert (3.3.1.).

Elutionspuffer	
Tris-HCl; pH 7,5	500 mM
Na ₂ EDTA	1 mM
SDS	0,1 % (w/v)

3.2. Lokalisierung spezifischer Nukleinsäuresequenzen durch Hybridisierung

Durch Gelelektrophorese aufgetrennte Nukleinsäuren können zur weiteren Untersuchung auf eine Membran transferiert werden. Nach dem Transfer können die fixierten Nukleinsäuren durch Hybridisierung mit entsprechend markierten Sonden identifiziert werden.

3.2.1. Übertragung von Nukleinsäure-Fragmenten aus Agarosegelen auf Membranfilter

3.2.1.1. Kapillar-Transfer von Nukleinsäuren aus Agarosegelen auf Membranfilter

Der hier beschriebene Kapillarblot erfordert nur einen geringen apparativen Aufwand (Souhern, 1975). Die Nukleinsäuren werden aus einem Agarosegel durch Kapillarkräfte auf die Membran übertragen. Dies geschieht, indem der Blot-Puffer durch Unterlegen einer dicken Schicht aus Papiertüchern durch das Gel auf die Membran gesaugt wird (Abb. 3-1). Der Kapillarblot wurde in dieser Arbeit ausschließlich für den Transfer von RNA verwendet, eignet sich aber auch für den Übertrag von DNA.

Die Gelkammer wird zunächst RNase-frei gemacht, indem Kammer, Gelschlitten und Taschenformer mit Spülmittel und destilliertem Wasser gereinigt und mit 70 % EtOH nachgespült werden. Gelschlitten und Taschenformer werden in die Kammer gelegt, 15 min mit 0,2 N NaOH oder 3 % H₂O₂ behandelt und anschließend mit DEPC-Wasser (3.5.1.) ausgespült. Die Gesamt-RNA wird durch ein 1 % denaturierendes Agarosegel aufgetrennt (3.1.1.2.).

Zur präparativen Auftrennung müssen die RNA-Proben entsprechend vorbereitet werden. Nach Präzipitierung mit EtOH (3.3.1.) werden sie in DEPC ddH₂O gelöst und die weiteren RNA-Probenpuffer-Reagenzien (3.1.1.2.) zugesetzt:

Die Proben werden 15 min bei 65 °C inkubiert, kurz auf Eis gestellt, zentrifugiert (Tischzentrifuge 30 sec) und auf das Agarosegel aufgetragen (Elektrophorese über Nacht, 30 V). Vor dem RNA-Transfer wird das Gel im UV-Durchlicht fotografiert, vermessen und zur Entfernung des Formaldehyds 10 min in DEPC ddH₂O geschwenkt.

Die als Transferbrücken dienenden langen Streifen Filterpapier werden in 20x SSC-Puffer (3.2.2.) getränkt, auf ein Geltablett über dem 20x SSC-Flüssigkeitsspiegel gelegt und zu beiden Seiten in das Reservoir aus 20x SSC-Puffer getaucht. Der weitere Aufbau der Kapillar-Blotapparatur erfolgt nach Abb. 3-1. Nach dem Auflegen der Membran auf das Gel wird zur Markierung eine Ecke deckungsgleich

abgeschnitten. Es ist strikt darauf zu achten, dass zwischen den einzelnen Schichten des Blots keine Luftblasen zurückbleiben.

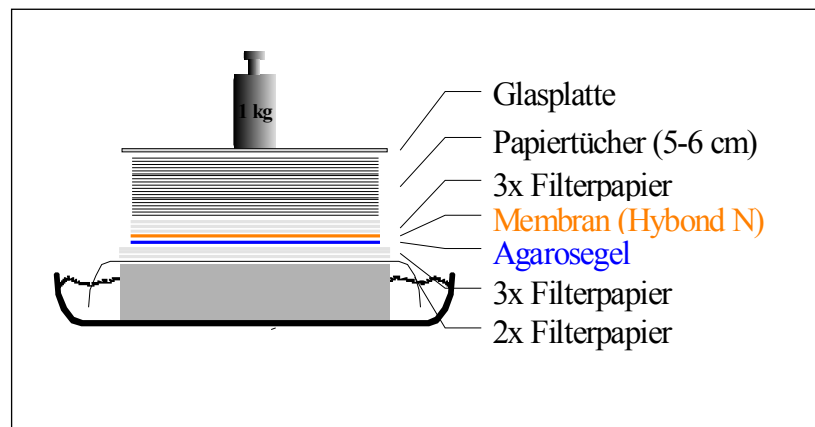


Abb. 3-1: Schematischer Aufbau des *Kapillar-Blots* nach Southern

Die Transferzeit beträgt 16-24 h. Um anhaftende Agarosereste zu entfernen wird die Membran nach dem Transfer kurz in 2x SSC-Puffer (3.2.2.) gewaschen. Zur Fixierung der RNA wird die Membran 1 h im Vakuumofen (*Salvis* Vakuumofen, 2 mbar, 80 °C) gebacken.

3.2.1.2. Alkalischer Abwärtstransfer von DNA

Chomczynski entwickelte in Anlehnung an die Methode nach Southern eine schnellere Transfer-Variante, die neben den Kapillarkräften zusätzlich die Schwerkraft nutzt (1991). Die Auftrennung von RNA ist wegen der Verwendung von NaOH im Denaturierungspuffer nicht möglich.

Zunächst wird die DNA wie unter 3.1.1.1. beschrieben in einem Agarosegel mit geeignetem Längemaßstab aufgetrennt und fotografiert. Dies ermöglicht eine spätere Zuordnung zu den Hybridisierungssignalen auf dem Autoradiogramm. Das Gel wird 1 h unter leichtem Schütteln bei RT in 300 ml Denaturierungslösung inkubiert und anschließend 15 min unter einmaligem Pufferwechsel in Transferlösung gewaschen.

Für den DNA-Transfer von oben nach unten benötigt der Aufbau folgende Schichten:

- einen 2-3 cm hohen Stapel an saugfähigen Papiertüchern (etwa 1 cm breiter als das Gel)
- fünf Lagen Filterpapier (ca. 2 mm breiter als das Gel); die oberste Lage wird angefeuchtet
- Nylonmembran (z.B. Biotex B), die zuvor auf Gelgröße zugeschnitten und zum Anfeuchten 10 min in ddH₂O inkubiert wurde
- das gewaschene Gel
- drei Lagen feuchte Filterpapiere in Gelgröße
- zwei Lagen feuchte Filterpapiere, welche als Brücke zu Transferlösung dienen und dementsprechend groß bemessen sein müssen
- eine luftdichte Bedeckung (z.B. kleine Glasplatte), die mit einem zusätzlichen Gewicht beschwert, auf das oberste Papier gelegt wird

Es ist streng darauf zu achten, dass sich zwischen den verschiedenen Schichten keine Luftblasen befinden. Die überstehenden Enden der Papierbrücke werden zu einem flachen Gefäß geführt, welches die Transferlösung enthält. Die Gefäße sollten sich auf etwa gleicher Höhe mit dem Gel befinden, sodass die Brücke horizontal zum Liegen kommt. Um zu vermeiden, dass die Brücke Kontakt zum Papiertuchstapel bekommt, empfiehlt es sich, den Papierstapel an den Rändern mit Parafilm oder Frischhaltefolie zu isolieren. Hierdurch wird vermieden, dass es im Verlauf des Transfers durch Kompression des Gels ein Kontakt zwischen oberen und unteren Filterpapieren entstehen kann. Nach einer Stunde ist der Transfer abgeschlossen. Die Membran wird neutralisiert (0,2 M Phosphatpuffer, pH 6,8) und 30 min bei 80 °C im vorgeheizten Vakuumofen getrocknet. Hierdurch wird die DNA abschließend fixiert. Die getrocknete Membran kann bei RT aufbewahrt werden.

Denaturierungslösung		Transferlösung	
NaOH	0,5 M	NaCl	3 M
NaCl	1,5 M	NaOH	8 mM

3.2.2. Übertragung von Nukleinsäurefragmenten nach der PAA-Gelaufreinigung auf Membranfilter (*Wet-Blotting-Transfer*)

Nach Auftrennung der RNA in einem 8 % Polyacrylamidgel (3.1.2.) wird das Gel 30 min in 0,5x TAE mit 1 µg Ethidiumbromid/ml äquilibriert, dabei gleichzeitig gefärbt und anschließend im UV-Durchlicht (302 nm) fotografiert. Anders als beim *Southern-Blot* (3.2.1.1.) entfällt der Denaturierungsschritt, da die RNA bereits in einem denaturierenden Gel aufgetrennt wurde. Inzwischen wird die Nylonmembran (Zeta-Probe™, BIO-RAD) und zwei Filterpapiere auf Gelgröße (max. 21 x 15,5 cm) zugeschnitten und mit 0,5x TAE befeuchtet.

Für das folgende Elektroblothing ist nachfolgender Aufbau in einer zur Apparatur gehörigen durchlässigen Plastikkassette (Gelhalter) nötig:

- ein gründlich mit 0,5x TAE angefeuchteter Schwamm
- ein eingeweichtes Filterpapier
- das äquilibrierte PAA-Gel
- die Nylonmembran
- und wiederum angefeuchtetes Filterpapier und ein Schwamm

Der Gelhalter wird in die mit 0,5x TAE gefüllte *Trans-Blot-Apparatur* (BIO-RAD) eingesetzt und die Kühlschlange angeschlossen. Es ist darauf zu achten, dass die Membran dem Pluspol zugewandt ist. Ein Magnetrührer übernimmt zum besseren Wärmeausgleich die Durchmischung des Puffers. Der elektrophoretische Transfer erfolgt bei 80 W für 2 h.

Nach Beendigung der Übertragung wird die Membran luftgetrocknet und zwischen zwei Filterpapieren im vorgeheizten Vakuumofen 1 h bei 80 °C zur RNA-Fixierung gebacken. Die Membran kann bei RT aufbewahrt werden.

10x TAE

Tris-HCl	0,5 M
NaOAc	1,5 M
Na ₂ EDTA	10 mM

3.2.3. Hybridisierung von immobilisierten Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden

Radioaktiv markierte Oligonukleotide (3.2.5.), die zu bekannten Sequenzabschnitten der Ziel-Nukleinsäure komplementär sind, werden mit immobilisierter DNA bzw. RNA (3.2.1. - 3.2.3.) hybridisiert. Dabei ermöglicht die radioaktive 5'-Markierung der Oligonukleotide die Detektion der Nukleinsäure mittels Autoradiographie.

Vor Beginn der Hybridisierung in 5x SSC wird die Schmelztemperatur (T_m) der Sonde bei optimaler Basenpaarung abgeschätzt. Dabei gilt für Oligonukleotide bis 25 Basenpaare (Sambrook und Russel, 2001).

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

Dies ist nötig, um einen Anhaltspunkt bezüglich der spezifischen stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen zu erhalten.

Die Membran mit der fixierten Nukleinsäure wird in eine verschließbare Kunststoffschale gelegt und zur Vorhybridisierung 1 h bei 50 °C mit Vorhybridisierungslösung (40 ml pro 100 cm² Membran) unter leichtem Schütteln (Infors Rundschüttler HT, 60 UpM) inkubiert. Die eigentliche Hybridisierung erfolgt unter gleichen Bedingungen wie die Vorhybridisierung in einem Puffervolumen, welches eine vollständige Benetzung der Membran gerade noch gewährleistet. Der Hybridisierungspuffer enthält das radioaktiv markierte Oligonukleotid, das mit einer Konzentration von 10⁵–10⁶ cpm/ml eingesetzt werden sollte.

Nach der Hybridisierung wird die Membran in Waschlösung (0,1x SSC, 0,1 % (w/v) SDS) gewaschen. Man beginnt das Waschen in geeigneten Plastikschaalen bei 40 °C und erhöht dann die Temperatur in 5 °C-Schritten (bis maximal 5 °C unter der Schmelztemperatur des hybridisierten Oligonukleotids). Bei jeder Temperatur wird 10 min gewaschen. Dabei wird die Temperatur solange erhöht, bis das Signal im Geigerzähler gerade noch detektiert werden kann (2-3 cps). Die Membran wird feucht in Haushaltsfolie eingeschlagen, Fluoreszenzmarkierungen befestigt und ein Röntgenfilm mit Verstärkerfolie aufgelegt. Die Autoradiographie erfolgt bei -80 °C für bis zu 7 d.

Vorhybridisierungspuffer

20x SSC	5x
Na-Phosphat; pH 7,0	20 mM
Denhardts Reagenz	1x
SDS	1 % (w/v)

Hybridisierungspuffer

Vorhybridisierungslösung +
5 x 10⁶ cpm [³²P]-markiertes
Oligonukleotid/50 ml (3.2.5.)

50x Denhardts Reagenz

Ficoll 40	5 % (w/v)
Polyvinylpyrrolidin	5 % (w/v)
Rinderserumalbumin	5 % (w/v)

20x SSC

NaCl	3 M
Na-Citrat	0,3 M

3.2.4. Waschen der Membranfilter

Die Membran kann luftdicht und feucht verpackt längere Zeit aufbewahrt werden. Bei Bedarf können die gebundenen Oligonukleotide durch hohe Waschttemperaturen abgelöst (10 min, 95 °C, 0,1x SSC, 0,1 % (w/v) SDS) und die Membran so einer weiteren Hybridisierungsreaktion zugänglich gemacht werden.

3.2.5. 5'-Markierung von Oligodesoxyribonukleotiden mit [γ - 32 P] rATP

Als Hybridisierungssonden wurden im Rahmen dieser Arbeit stets chemisch synthetisierte Oligodesoxyribonukleotide eingesetzt, die am 5'-Ende radioaktiv markiert waren. Die nach der Phosphoamidit-Methode synthetisierten Oligodesoxyribonukleotide besitzen eine freie 5'-Hydroxylgruppe, auf welche die terminale Phosphatgruppe des [γ - 32 P] rATP übertragen wird. Die Reaktion wird von der T4-Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert.

5'-Markierung von Oligodesoxyribonukleotiden mit [γ - 32 P] rATP

Reaktionsansatz (10 μ l)	Endkonzentration
2,5 μ l Oligodesoxyribonukleotid (10 μ M)	2,5 μ M Oligodesoxyribonukleotid
1 μ l 10x PNK-Puffer	1x PNK-Puffer
2 μ l [γ - 32 P] rATP (10 μ Ci/ μ l)	2 μ Ci/ μ l [γ - 32 P] rATP bzw. 1 μ Ci/1,25 pmol Oligodesoxyribonukleotid
4 μ l ddH ₂ O	
0,5 μ l T4-PNK (10 U/ μ l)	0,5 U/ μ l T4-PNK

Der Ansatz wird 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung des markierten Oligonukleotids ist von seiner weiteren Verwendung abhängig (3.2.6.).

3.2.6. Isolierung von radioaktiv 5'-markierten Oligodesoxyribonukleotiden

Um nicht eingebautes [γ - 32 P]-rATP zu entfernen, muss der Reaktionsansatz nach der Inkubation aufgereinigt werden.

Aufreinigung durch ein PAA-Gel

Das Reaktionsgemisch wird durch ein denaturierendes 15 % PAA-Gel (3.1.2.) elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wird der Reaktionsansatz mit 6 μ l Formamidpuffer supplementiert, und die gesamte Probe direkt in eine Proben tasche eines Gels der Maße 20 x 20 x 0,05 cm aufgetragen. Die Elektrophorese wird mit 600 V bei maximal 20 W durchgeführt, bis das BPB den unteren Gelrand erreicht hat. Nun wird eine Glasplatte abgenommen, das Gel mit Haushaltsfolie bedeckt und Fluoreszenzmarker angebracht. Durch Audiographie (30 - 60 sec) wird das markierte Oligodesoxyribonukleotid lokalisiert, anschließend ausgeschnitten und über Nacht eluiert (3.1.4.2.). Nach einer zweiten Elution (3 h) werden die Eluate vereinigt und mit 96 % EtOH (3.3.1.) präzipitiert (Zugabe von 5 μ g tRNA_{Hefe}, -80 °C über Nacht). Die Radioaktivität des Sediments wird durch Messung der Čerenkov-Strahlung im [32 P]-Fenster eines Szintillationszählers bestimmt. Die Ausbeute einer

Markierung beträgt durchschnittlich 10×10^6 cpm. Das markierte Oligodeoxyribonukleotid wird in einem entsprechenden Volumen ddH₂O gelöst, sodass 150000 cpm/ μ l an Oligonukleotid resultieren.

Aufreinigung über eine Nukleobond AX5-Säule

Das Reaktionsgemisch wird mit Puffer QO1 auf ein Endvolumen von 1 ml aufgefüllt und auf eine Nukleobond AX5-Säule, die mit 1 ml Puffer QOT äquilibriert wurde, aufgetragen. Man wäscht 5x mit je 1 ml Puffer QO1 und eluiert mit 2x 0,5 ml Puffer QO2. Die Oligodeoxyribonukleotide werden mit EtOH gefällt (3.3.1.) und durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge, 17 000 UpM, 4 °C, 30 min) sedimentiert. Die Bestimmung der Ausbeute erfolgt wie für die Aufreinigung über PAA-Gel beschrieben.

Puffer QO1		Puffer QO2		Puffer QOT	
NaCl	100 mM	LiCl	1 M	NaCl	100 mM
Tris-HCl; pH 7,0	50 mM	Tris-HCl; pH 7,0	50 mM	Tris-HCl; pH 7,0	50 mM
EtOH	15 % (v/v)	EtOH	15 % (v/v)	Triton X-100	0,15 % (v/v)
				EtOH	15 % (v/v)

3.3. Isolierung von Nukleinsäuren

3.3.1. Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Durch Ethanolzugabe können Nukleinsäuren quantitativ aus wässrigen Lösungen ausgefällt werden. Dabei wird die Hydrathülle der Nukleinsäuren gestört, ihre Aggregation erleichtert und somit die Löslichkeit herabgesetzt. Durch Zugabe von monovalenten Kationen (Li⁺, Na⁺, NH₄⁺) kann dieser Effekt verstärkt werden. Die Alkalisalze der Nukleinsäuren sind in 70 % EtOH nahezu unlöslich. Schnelle Präzipitation bei tiefen Temperaturen kann leicht zu einem unerwünschten Ausfällen von anorganischen Alkalisalzen führen. In stark verdünnten Nukleinsäurelösungen kann durch Zugabe von Fällungshilfen (10 - 20 μ g/ml tRNA oder 50 μ g/ml Glykogen) eine quantitative Präzipitation erreicht werden.

Die Präzipitation erfolgt durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M NaOAc (pH 6,0) und 2,5 Vol. 96 % EtOH. Der Ansatz wird mindesten 1 h bei -20 °C oder 30 min bei -80 °C inkubiert. Die Nukleinsäuren werden durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge 28 RS, 4 °C, 17 000 UpM, 30 min) sedimentiert. Das Sediment wird nach Abnahme des Überstands mit 1 Vol. kaltem (-20 °C) 70 % EtOH gewaschen und erneut abzentrifugiert (Heraeus Biofuge 28 RS, 4 °C, 17 000 UpM, 10 min). Nach quantitativem Entfernen des Überstands wird das Nukleinsäuresediment im Exsikkator getrocknet und anschließend in einem geeignetem Volumen ddH₂O oder Puffer aufgenommen.

Die Konzentration der Nukleinsäure kann nach 3.3.2.1. bestimmt bzw. bei radioaktiver Markierung im Szintillationszähler vermessen werden.

3.3.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in wässriger Lösung

3.3.2.1. UV-Spektroskopische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Das Absorptionsmaximum der Purin- und Pyrimidinbasen von Nukleinsäuren liegt im UV-Bereich bei 260 nm. Durch den direkten Zusammenhang zwischen Absorption und Basen-Konzentration wird die Konzentrationsbestimmung durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}) möglich. Bedingt durch den Hypochromie-Effekt unterscheiden sich die Extinktionskoeffizienten für doppel- und

einzelsträngige Nucleinsäuren. Durch zusätzliche Messung der Absorption bei 280 nm (A_{280}), dem Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäurereste, ist eine Aussage über die Reinheit der Probe möglich. Der Quotient A_{260}/A_{280} liegt für reine DNA bei 1,8 bzw. 2,0 für RNA. Dabei entspricht eine A_{260} -Einheit 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ dsRNA oder 33 $\mu\text{g/ml}$ ssRNA bzw. einzelsträngiges Oligonucleotid.

Die Konzentrationsbestimmung der Nucleinsäuren erfolgt durch Bestimmung der Absorption bei 260 nm und 280 nm gegen das Lösungsmittel als Referenz in einer 100 μl Küvette.

3.3.2.2. Quantifizierung von Nucleinsäuren durch Ethidiumbromidbindung

Bei sehr geringen, außerhalb des Messbereichs eines UV-Spektralphotometers liegenden Nucleinsäuremengen, können Ethidiumbromidplatten zur Konzentrationsbestimmung herangezogen werden. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert dabei zwischen die GC-Paare von dsDNA und dsRNA und kann mittels UV-Licht (302 nm) zur Fluoreszenz angeregt werden. Dabei ist die Intensität der Fluoreszenz direkt abhängig von der Menge der vorhandenen DNA, sodass eine Quantifizierung der Probenkonzentration durch den Vergleich mit einem geeigneten Standard möglich ist.

Zur Durchführung wird eine 0,8 % Agarose-Lösung in TBE-Puffer (siehe 3.1.1.1.) hergestellt, mit Ethidiumbromid (0,5 $\mu\text{g/ml}$ Endkonz.) versetzt und in kleine PP-Petrischalen (\varnothing 30 mm x 3 mm) gegossen. Als Standard werden Verdünnungen (10 - 200 ng/ μl) einer Nucleinsäurelösung mit bekannter Konzentration vorbereitet und je 0,5 μl vorsichtig auf die Ethidiumbromidplatten aufgetropft. Von der zu bestimmenden Nucleinsäurelösung wird ebenfalls 0,5 μl aufgetragen. Nach 10 min Inkubation bei RT sind die Tröpfchen durch Kapillarkräfte in die Platte eingedrungen und können unter UV-Licht analysiert werden. Durch Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten kann die unbekannte Konzentration nun relativ genau abgeschätzt werden.

Die Ethidiumbromidplatten können unter Lichtausschluss bei 4 °C über mehrere Wochen gelagert werden.

3.3.3. Abtrennung von Proteinen aus wässrigen Nucleinsäurelösungen

Zum Entfernen von Proteinen aus wässrigen Protein-Nucleinsäurelösungen wird die Lösung mit 1 Vol. TE gesättigtem Phenol (pH 8,0) extrahiert. Nach Zentrifugation (Eppendorf 5415 C, 12000 UpM, Rotor F45-18-11, RT, 5 min) enthält die wässrige Phase die Nucleinsäuren und wird abgenommen. Die Phenolphase wird mit 1 Vol. ddH₂O gewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen werden anschließend zweimal mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und die Nucleinsäuren mit EtOH ausgefällt (3.3.1.).

3.3.4. Isolierung von DNA

3.3.4.1. *Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab und Anlegen von Glycerin kulturen*

Nach Ligation eines PCR-Fragments in den gewünschten Vektor, der Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen und der Selektion durch Antibiotika auf LB-Platten werden diskrete Klone von der LB-Platte abgenommen und in antibiotikahaltigem Nährmedium mindestens 6 h bei 37 °C unter Schütteln (Infors Rundschüttler HT, 160 UpM) inkubiert.

Vor der Isolierung der Plasmid-DNA wird eine Glycerinkultur angelegt. Hierzu werden 200 µl Bakterienkultur mit 300 µl 86 % Glycerin gemischt. Die Glycerinkultur kann, je nach Stamm, bei -20 °C über mehrere Jahre gelagert werden.

Die übrige Kulturlösung wird zur Isolierung der Plasmid-DNA mit dem *JET Prep Plasmid Miniprep Kit* der Firma *Genomed* nach Herstellervorschrift aufgearbeitet. Das Prinzip dieser Isolierung basiert auf alkalischer Lyse der Bakterien (Birnboim und Doly, 1979), Fällung verunreinigender Proteine und anschließende Bindung der Plasmid-DNA an eine Glaspartikelmatrix unter Hochsalzbedingungen. Nach mehrfachem Waschen erfolgt die Elution mit zweimal 30 µl vorgewärmtem (37 °C) ddH₂O. Die durchschnittliche Ausbeute beträgt 15-20 µg pro Ansatz.

3.3.4.2. *Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab*

Wie bei der Plasmidisolierung im analytischen Maßstab werden die Nukleinsäuren im ersten Schritt durch alkalische Lyse freigesetzt, dann aber über Anionenaustauscher-Säulenchromatographie aufgereinigt. Hierzu werden Chromatographie-Säulen der Firma Macherey & Nagel (Nucleobond AX500, AX1000, AX2000) nach Herstellervorschrift verwendet.

Zunächst werden 500 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer Vorkultur des betreffenden Klons angeimpft und 15-20 h bei 37 °C geschüttelt (Infors Inkubationsrundschüttler HT, 120 UpM). Nach dem Ernten (Beckman Kühlzentrifuge J-6B, Rotor JA10, 4000 UpM, 4 °C, 10 min) wird der Überstand abdekantiert und das Bakteriensediment in 12 ml Puffer S1 resuspendiert. Durch Zusatz von 12 ml frisch zubereitetem Puffer S2 werden die Bakterien aufgeschlossen. Das Lysat inkubiert 10 min bei RT. Dabei werden die Nukleinsäuren freigesetzt und die RNA hydrolysiert. Vorhandene Proteine und das proteinassoziierte Bakterienchromosom werden durch Zugabe von 10 ml Puffer S3 gefällt. Die in S3 enthaltenen Kaliumionen bilden mit SDS aus Puffer S2 das schwer lösliche Kaliumsalz des Dodecylsulfats. Alle Proteine, an die sich SDS angelagert hatte, werden mit dem anorganischen Salz ausgefällt. Der Niederschlag wird abzentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J-6B, Rotor JA10, 10000 UpM, 4 °C, 20 min) und der Überstand auf eine mit 5 ml Puffer N2 äquilibrierte Säule AX500 der Firma Macherey-Nagel gegeben. Nachdem die geladene Säule mit dreimal 12 ml Puffer N3 gewaschen wurde, wird die Plasmid-DNA mit dreimal 3 ml Puffer N5 in ein steriles Corex-Röhrchen eluiert.

Die Nukleinsäuren werden durch Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol bei RT (60 min) aus dem Eluat ausgefällt. Durch Zentrifugation (Beckman Kühlzentrifuge J-6B, Rotor: JA13.1, 10000 UpM, 4 °C, 20 min) wird die Plasmid-DNA sedimentiert und das Präzipitat mit 10 ml 70 % EtOH gewaschen. Es wird abermals wie zuvor zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J-6B, Rotor: JA13.1, 10000 UpM, 4 °C, 20 min) und das Nukleinsäuresediment im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Die DNA wird in 300 µl TE-Puffer (3.1.4.1.) aufgenommen und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (3.3.2.1.).

S1-Puffer		
	Endkonzentration	Volumen/500 ml
Tris (1 M)	50 mM	25 ml
Na ₂ EDTA (0,5 M)	10 mM	10 ml
ad 500 ml ddH ₂ O; pH 8,0 mit HCl; -autoklavieren-		
RNase A 100 mg/ml	100 µg/ml	500 µl

S3-Puffer		
	Endkonzentration	Einwaage/500 ml
KOAc	2,8 M	137,4 g
ddH ₂ O	ad 500 ml; pH 5,1 mit AcOH	

N3-Puffer		
	Endkonzentration	Menge/500 ml
Tris (1 M)	100 mM	50 ml
KCl	1150 mM	42,9 g
ad 422 ml ddH ₂ O; pH 6,3 mit H ₃ PO ₄ ; -autoklavieren-		
EtOH 96 %	78,1 ml	15 %

S2-Puffer		
	Endkonzentration	Volumen/500 ml
NaOH (2 M)	200 mM	50 ml
SDS (10 %)	1 % (w/v)	50 ml
ddH ₂ O	ad 500 ml	

N2-Puffer		
	Endkonzentration	Menge/500 ml
Tris (1 M)	100 mM	50 ml
KCl	900 mM	33,5 g
ad 422 ml ddH ₂ O; pH 6,3 mit H ₃ PO ₄ ; -autoklavieren-		
EtOH 96 %	15 % (v/v)	78,1 ml

N5-Puffer		
	Endkonzentration	Volumen/500 ml
Tris (1 M)	100 mM	50 ml
KCl	1000 mM	37,3 g
ad 422 ml ddH ₂ O; pH 6,3 mit H ₃ PO ₄ ; -autoklavieren-		
EtOH 96 %	78,1 ml	15 %

3.3.5. Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzen

3.3.5.1. Präparation von Gesamt-RNA durch Phenol-Extraktion

Alle verwendeten wässrigen Lösungen und Plastikgeräte müssen frisch autoklaviert und absolut RNase-frei sein. Glasgeräte werden über Nacht bei 150 °C sterilisiert. Das Tragen von Handschuhen ist während aller Arbeitsschritte ein unbedingtes Muß.

Das noch gefrorene Zellmaterial (ca. 5 g) wird in einem PP-Röhrchen mit 1 Vol. Phenol versetzt und bei 4 °C 15 – 30 min geschüttelt bis eine homogene Suspension entstanden ist (IKA-Vibrax-VX8 mit Gummirollenaufsatz). Die Mischung wird bis zur Phasentrennung zentrifugiert (Beckman Kühlzentrifuge J-6B, 4000 Upm, 15 - 30 min, 4 °C). Die wässrige Oberphase wird in ein frisches Röhrchen überführt, während die Unterphase mit 1 Vol. TE extrahiert wird. Die vereinigten Oberphasen werden je einmal mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1, pH 4,5 bis 5,0) bzw. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) abermals extrahiert. Anschließend wird das Volumen der wässrigen Phase bestimmt und mit 0,1 Vol. NaOAc versetzt. Die Präparation wird auf 2 30 ml-Corex Röhrchen verteilt und zur RNA-Fällung mit 2,5 Vol. EtOH versetzt. Die Röhrchen werden sorgfältig mit Parafilm verschlossen und die Fällung über Nacht bei –20 °C vervollständigt. Die RNA wird sedimentiert (Beckman Kühlzentrifuge J2-21, 10 000 Upm, 4 °C, 10 min) und das Pellet mit 3 M NaOAc (pH 5,2) viermal gewaschen. Abschließend wird die RNA nochmals mit 10 ml 70 % EtOH gewaschen und dann in 14 ml DEPC-ddH₂O aufgenommen (3.5.1.). Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Präparation erfolgt spektralphotometrisch (3.3.2.1.).

3.3.5.2. Präparation von Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kit

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Blattmaterial kann mit Hilfe des *RNeasy Plant Mini Kit* der Firma *Qiagen* einfach und zuverlässig durchgeführt werden. Dabei wird unter strenger Einhaltung der Bedingungen für RNase-freies Arbeiten nach Herstellervorschrift verfahren. Nach der abschließenden Elution wird ein Aliquot der Gesamt-RNA spektralphotometrisch vermessen (3.3.2.1.).

3.3.5.3. Anreicherung von mRNA aus Gesamt-RNA Präparationen

Die Extraktion von mRNA aus Gesamt-RNA-Präparationen wird mit Hilfe von Oligo(dT)Cellulose durchgeführt. Oligo(dT)Cellulose besteht aus 18 bis 30 Nukleotiden langen Deoxythymidilat-Oligomeren, die kovalent an eine Cellulose-Matrix gekoppelt sind. Da eukaryotische mRNAs am 3'-Ende polyadenyliert sind, können sie mit Oligo(dT)Cellulose Basenpaare ausbilden. Sie werden deshalb auf der Säule zurückgehalten, während andere Nukleinsäuren sich im Durchlauf befinden.

Zur Äquilibration wird die Oligo(dT)Cellulose in 5 ml Elutionspuffer aufgenommen und fünfmal mit je 5 ml Bindungspuffer gewaschen. Des Weiteren wird zur Vorbereitung eine 1 ml Säule (Mobicol, MoBiTec) mit Filter (90 µm Porengröße) versehen und autoklaviert. Die so vorbereitete Säule wird auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgesetzt und die äquilibrierte Oligo(dT)Cellulose direkt aufgetragen. Mit Hilfe einer sterilen Einwegspritze wird überschüssiger Bindungspuffer durch den Filter gedrückt, sodass nur die Cellulose auf der Säule bleibt, welche anschließend mit der RNA-Lösung befüllt wird. Um eine gute Durchmischung von Cellulose-Matrix und RNA-Lösung zu gewährleisten, wird die Säule mehrmals invertiert. Zur möglichst quantitativen Bindung wird die Gesamt-RNA-Lösung dreimal über die Cellulose-Matrix pipettiert. Um unspezifisch gebundene RNA zu entfernen, wird die Säule anschließend mit 1 ml Bindungspuffer gewaschen. Die Elution der mRNA erfolgt in zwei Schritten mit jeweils 500 µl Elutionspuffer. Der Nukleinsäuregehalt der Elutionsfraktionen, sowie des ungebundenen Filtrats wird zur Zwischenkontrolle spektralphotometrisch bestimmt (3.3.2.1.). Die Fraktionen werden durch EtOH präzipitiert (3.3.1.) und sedimentiert (Kontron-Hermle ZK 400, 17 000 Upm, 4 °C, 30 min). Die mRNA-Pellets werden in 1 ml DEPC-ddH₂O (3.5.1.) aufgenommen und erneut ihre Konzentration bestimmt. Die Qualität der Präparation kann durch ein Agarose-Gel überprüft werden (3.1.1.).

Elutionspuffer	
Tris-HCl; pH 7,5	10 mM

Bindungspuffer	
NaCl	0,5 M
Tris-HCl; pH 7,5	10 mM

3.4. Amplifizierung von DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen ermöglicht es, eine DNA-Matrize in einer zyklischen Reaktion beliebig oft zu amplifizieren. Diese Polymerasekettenreaktion besteht im Wesentlichen aus 3 sich wiederholenden Schritten:

1) Denaturierung: Bei 94 °C wird die doppelsträngige DNA-Matrize in ihre beiden Einzelstränge aufgeschmolzen.

2) Hybridisierung (Annealing): Beim Hybridisierungsschritt binden die Plus- bzw. Minusstrang-Startsequenzen (Primer) an die DNA-Matrize. Dabei wird die Reaktionstemperatur 3-5 °C niedriger als T_m des Matrizen/Oligodesoxynukleotid-Hybrids gewählt. Die primerspezifische Hybridisierungstemperatur kann nach der Schmelzpunkt-Formel (3.2.3.) berechnet werden. Die optimalen Reaktionsbedingungen sind dabei für jedes Primerpaar neu zu bestimmen.

3) Polymerase-Reaktion: Im Elongationsschritt werden die zuvor hybridisierten Oligodesoxynukleotide verlängert. Die dabei verwendeten Polymerasen besitzen ein Temperaturoptimum von 72-78 °C.

In dieser Arbeit wurden zur Amplifikation von DNA die hitzestabilen Enzyme *Tth*-DNA-Polymerase (aus dem Eubakterium *Thermus thermophilus*) und *Pfu*-DNA-Polymerase (aus dem Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*) verwendet. Die PCR-Reaktionen erfolgen in einem Thermocycler mit Heizdeckel (Hybaid, *Omnigene*). Um Kontamination zu vermeiden, wird ausschließlich mit aerosoldichten Spitzen gearbeitet.

3.4.1. Polymerasekettenreaktion zur Amplifizierung von DNA-Matrizen

Wird bei der Amplifizierung von DNA-Fragmenten eine hohe Genauigkeit angestrebt, so wird bevorzugt *Pfu*-DNA-Polymerase (Lundberg *et al.*, 1991; Cline *et al.*; 1996) verwendet, da dieses Enzym zusätzlich über 3'→5' Exonucleaseaktivität (*proof-reading*-Funktion) verfügt. Analytische PCR-Reaktionen werden in einem Volumen von 20 µl, präparative Ansätze in 50 µl durchgeführt.

Amplifizierung von DNA durch PCR

Reaktionsansatz (20 µl)	Endkonzentration
1-10 µl Plasmid DNA (1 ng/µl)	0,1-1 ng/µl
2 µl 5'-Startoligonukleotid (10 µM)	1 µM (2,5 ng/µl)
2 µl 3'-Startoligonukleotid	1 µM (2,5 ng/µl)
2 µl dNTP-Mix (2 mM)	200 µM
2 µl 10x <i>Pfu</i> -Puffer	1x
1 µl <i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)	125 mU/µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

Erfolgt die PCR direkt aus genomischer DNA, so werden 10-100 ng DNA eingesetzt. Als Kontrolle wird stets ein Ansatz ohne Matrizen-DNA durchgeführt.

Für eine Standardreaktion werden dabei folgende Programmparameter gewählt:

Standard-PCR-Programm zur Amplifizierung von DNA				
	<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>	<i>Zyklenzahl</i>
Stufe 1	Denaturierung	94 °C	120 s	1
Stufe 2	Denaturierung	94°C	30 s	30-40
	Hybridisierung	T_M-2-4 °C	30 s	
	Elongation	72 °C	45 s*	
Stufe 3	Abschlussphase	72 °C	300 s	1
		25 °C		Hold

* Als Faustregel für die Bestimmung der Elongationsdauer rechnet man mit 1 min/1000 bp zu amplifizierender DNA. Die T_M wird dabei nach der Schmelzpunktformel (3.2.3) berechnet. Nach der PCR wird jeweils ein Aliquot jedes Ansatzes (5-10 μ l) mit 5x Agarosegelpuffer versetzt und zur Analyse in einem geeigneten Agarosegel aufgetrennt (3.1.1.1.).

3.4.2. Kombinierte Reverse-Transkription/Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Durch die Kombination von reverser Transkription (RT) und anschließender PCR ist es möglich, aus geringsten RNA-Mengen die entsprechende cDNA beliebig zu amplifizieren. Da die *Tth*-DNA-Polymerase in Anwesenheit von Mn^{2+} -Ionen reverse Transkriptaseaktivität besitzt, können durch einfache Umpufferung RT und PCR direkt nacheinander in einem Reaktionsgefäß erfolgen (Myers und Gelfand, 1991). Nach der RT, die zum Auflösen von RNA-Sekundärstrukturen bei 70 °C durchgeführt wird, wird Mn^{2+} durch Zugabe von EGTA komplexiert und durch Mg^{2+} ersetzt. Die sich anschließende PCR folgt dem unter 3.4.1. beschriebenen Prinzip. Da die Fehlerrate des *Tth*-Enzyms im Vergleich zur reversen Transkriptase AMV bzw. zur DNA-Polymerase *Pfu* jeweils höher ist, eignet sich die hier beschriebene kombinierte RT-PCR hauptsächlich zur raschen Detektion seltener RNAs.

(RT-PCR)-RT-Reaktionsansatz

<i>Reaktionsansatz (10 μl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
Gesamt-RNA 50 ng	5 ng RNA/ μ l
1 μ l 10x RT-Puffer	1x RT-Puffer
1 μ l dNTP-Mix (2 mM)	200 μ M
1 μ l 3'-Oligonukleotid (7,5 μ M)	0,75 μ M
2,5 U <i>Tth</i> -Polymerase	0,25 U <i>Tth</i> -Polymerase/ μ l
ddH ₂ O	ad 10 μ l

Der Ansatz wird zur Denaturierung in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß 2 min bei 94 °C inkubiert. Anschließend erfolgt die RT für 60 min bei 70 °C. Die PCR erfolgt in demselben Reaktionsgefäß wie die RT in Volumina von 20-50 μ l. Das PCR-Programm folgt in Abhängigkeit von den verwendeten Startsequenzen dem Standardprogramm (3.4.1.).

(RT/PCR)-PCR-Ansatz

<i>Reaktionsansatz (50 µl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
RT-Reaktionsansatz	
2,5 µl 5'-Oligonukleotid (10 µM)	0,5 µM
1,5 µl 3'-Oligonukleotid (10 µM)	0,45 µM
10x RT/PCR-Puffer	1x RT/PCR-Puffer
2 µl dNTP-Mix (10 mM)	200 µM
ddH ₂ O	ad 50 µl

10x RT-Puffer

Tris-HCl; pH 8,3	100 mM
KCl	900 mM
MnCl ₂	10 mM

10x RT/PCR-Puffer

Tris-HCl; pH 8,3	100 mM
KCl	1000 mM
MgCl ₂	25 mM
EGTA	7,5 mM
Glycerin	50 % (v/v)

3.4.3. Kolonie-PCR

Durch Kolonie-PCR (Güssow und Clackson, 1989) ist es möglich, innerhalb kurzer Zeit eine große Zahl positiv vorselektierter Bakterienkolonien auf ein kloniertes Insert hin zu untersuchen.

Für jede zu analysierende Kolonie werden 20 µl *Mastermix* vorbereitet und in einem PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt. Die entsprechende Bakterienkolonie wird mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und an eine nummerierte Position auf einer frischen Agarplatte übertragen, um eine Sicherungskopie des Klons anzulegen. Die Platte wird über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die an der Pipettenspitze verbliebenen Bakterien werden dann sofort in ein Aliquot PCR Master-Mix übertragen und die Reaktion gestartet (siehe Kolonie PCR-Programm). Die Reaktionsbedingungen während des ersten Denaturierungsschritts sind harsch genug um Bakterienzellwände zu zerstören, sodass genügend DNA für die PCR-Reaktion zur Verfügung steht. Der Erfolg der Kolonie-PCR wird auf einem Agarose-Gel kontrolliert (3.1.1.1.). Bei ungenügender Spezifität der *Primer* kann es zur Bildung mehrerer Nebenprodukte kommen.

Master-Mix (20 µl/Kolonie)

	Endkonzentration	Volumen
10 µM 5'- Oligonukleotid	1 µM	2 µl
10 µM 3'- Oligonukleotid	1 µM	2 µl
2 mM dNTP-Mix	2 mM	2 µl
5x <i>Tth</i> – Puffer	1 x	4 µl
2,5 U/µl <i>Tth</i> - Polymerase	37,5 mU/µl	0,3 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl	

5x *Tth*-Puffer

Tris-HCl; pH 9,0	250 mM
MgCl ₂	7,5 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	100 mM

3.4.4. Oligodesoxynukleotid-vermittelte bidirektionale Mutagenese

Durch PCR-gestützte bidirektionale Mutagenese können DNA-Sequenzen *in vitro* gezielt verändert werden. Dazu wird zirkuläre *dam*⁺-Plasmid-DNA, welche das zu mutierende Insert trägt, mit zwei zueinander komplementären *Primern*, welche jeweils in ihrer Mitte die gewünschte Mutation enthalten, in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Da die mutagenen Startsequenzen durch die DNA-Polymerase verlängert werden, entsteht eine lineare mutierte Kopie der Plasmid-DNA. Durch anschließende Zugabe von *Dpn* I, einem Restriktionsenzym, welches methylierte DNA hydrolysiert (Erkennungssequenz = 5'-G^{me6}ATC-3'), wird das ursprüngliche Plasmid abgebaut. Die so allein resultierenden linearen, zueinander komplementären DNA-Moleküle können zu einem doppelsträngigem Molekül hybridisieren und werden dann direkt in kompetente Zellen transformiert. Durch den zelleigenen Reparaturmechanismus werden die hybridisierten, linearen Moleküle zum Plasmid ligiert. Basierend auf dieser Methode werden Mutationsraten von über 80 % erhalten (Picard *et al.*, 1994; Weiner *et al.*, 1994).

Für das Gelingen der Mutagenese ist die Konzipierung der Oligonukleotid-Startsequenzen ein wichtiger Punkt. Die verwendeten *Primer* müssen zueinander komplementär sein. Die gewünschte Mutation sollte in der Mitte der Sequenz mit 10-15 Basen Wildtypsequenz auf beiden Seiten liegen und mit mindestens einer G- oder C-Base abschließen. Ihre Länge sollte zwischen 25-45 Basen, der GC-Gehalt bei 40 % und ihre $T_m \sim 10$ °C über der Elongationstemperatur der DNA-Polymerase liegen. Für die Ausbeute an mutierter DNA ist das Verhältnis von DNA-Matrize zur Startsequenz von entscheidender Bedeutung. Für jeden Ansatz ist deshalb die Konzentration der Templat-DNA variabel.

Bidirektionale Mutagenese-PCR

Reaktionsansatz (50 µl)	Endkonzentration
1-10 µl Plasmid DNA (5 ng/µl)	0,1-1 ng/µl
1 µl 5'-Startoligonukleotid (10 µM)	0,2 µM (2,5 ng/µl)
1 µl 3'-Startoligonukleotid (10 µM)	0,2 µM (2,5 ng/µl)
5 µl dNTP-Mix (10 mM)	200 µM
1 µl 10x <i>Pfu</i> -Puffer	1x
1 µl <i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)	50 mM/µl
ddH ₂ O	ad 50 µl

Die Zyklenzahl des PCR-Programms ist ebenfalls von Templat und Startsequenzen abhängig. Für das Einfügen einer Punktmutation sind 12 PCR-Zyklen ausreichend:

PCR Programm für Thermo-Cycler				
	Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Stufe 1	Denaturierung	95 °C	120 s	1
Stufe 2	Denaturierung	95°C	30 s	12
	Hybridisierung	$T_m - 3-5$ °C	60 s	
	Elongation	68 °C	120 s/kb	
Stufe 3	Abschlussphase	68 °C	480 s	1

Nach der PCR-Reaktion werden je 5 µl pro Ansatz auf einem 0,8 % Agarosegel (3.1.1.1.) aufgetrennt. Die Matrizen-DNA der positiven Mutagenese-Ansätze wird durch Zugabe von 10 U *Dpn*I Restriktionsendonuklease hydrolysiert (3.7.1.). Mit 1-5 µl dieses Ansatzes können kompetente Zellen direkt transformiert werden (3.7.7.). Die Plasmid-DNA (3.3.4.) der transformierten Klone wird durch Sequenzierung (3.6.) auf die gewünschte Mutation hin untersucht.

3.4.5. Analyse und Aufreinigung von PCR-Produkten

Der Erfolg einer PCR-Reaktion wird durch elektrophoretische Auftrennung auf einem Agarosegel (3.1.1.1.) kontrolliert. Wurde das gewünschte Fragment amplifiziert, so wird der Ansatz mit Hilfe des *QIAquick PCR Purification Kit* durch reversible Bindung an eine Silica-Matrix gereinigt. Soll nur ein spezielles DNA-Fragment aus dem PCR-Ansatz isoliert werden, so wird die gewünschte Bande aus einem präparativen Agarose-Gel ausgeschnitten. Die DNA wird dann mit dem *QIAquick Gel Extraktion Kit* aus der Gelmatrix eluiert (3.1.4.1.).

3.5. *In vitro* Transkription mit T7-RNA-Polymerase

Mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus dem T7-Phagen können DNA-Sequenzen, die unter Kontrolle des T7-Promotors stehen, *in vitro* transkribiert werden (Milligan und Uhlenbeck, 1989). Hierzu sind folgende Schritte notwendig:

- Die zu transkribierende DNA-Sequenz muss unter der Kontrolle des T7-Promotors stehen.
- Das die RNA codierende Plasmid wird durch eine geeignete Restriktions-Endonuklease linearisiert (z.B. *Fok*I), um eine "Endlos-Transkription" zu vermeiden und den Terminationsort für die Polymerase festzulegen. Anschließend erfolgt die Synthese der RNA in einer *run off*-Transkription.

3.5.1. Herstellung von RNase-freiem ddH₂O mit DEPC

RNasen sind häufig resistent gegen Denaturierung durch Hitze oder Detergenzien und somit schwer inaktivierbar. Zur irreversiblen Inhibierung vieler RNasen kann Diethylpyrocarbonat (DEPC) verwendet werden. DEPC bindet kovalent an primäre und sekundäre Amine und damit auch an die für die katalytische Funktion wichtigen His-Seitenketten im katalytischen Zentrum vieler RNasen. Da DEPC als Ethylierungsmittel kanzerogene Eigenschaften besitzt, werden alle Arbeiten unter einem Abzug ausgeführt.

1 ml DEPC wird mit 1000 ml ddH₂O in einer sauberen Glasflasche bei geöffnetem Schraubverschluss über Nacht gerührt. Nach entsprechender Verteilung für die zur längeren Lagerung gewünschten Aliquots wird abschließend autoklaviert, um überschüssiges DEPC zu hydrolysieren.

3.5.2. Präparative T7-Transkription

Zur präparativen T7-Transkription linearisierter DNA nach Milligan und Uhlenbeck (1989) wird nachfolgender Ansatz verwendet. Da die verwendete T7-Polymerase selbst überproduziert und aufgereinigt wurde, kann der hierfür angegebene Menge Schwankungen unterliegen.

Präparative T7-Transkription

<i>Reaktionsansatz (250 µl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
125 µl linearisiertes Plasmid (12,5 µg)	0,05 µg/µl
25 µl 10x T7-Puffer	1x T7-Puffer
25 µl rNTP-Mix (rATP, rCTP, rGTP, rUTP, je 20 mM)	2 mM rNTPs
2,5 µl T7-RNA-Polymerase (3,7 µg/µl)	37 ng/µl T7-RNA-Polymerase
ddH ₂ O	ad 250 µl

Um eine vorzeitige Hydrolyse des synthetisierten Transkripts durch RNasen zu unterbinden, kann dem Ansatz zusätzlich 1 µl RNasin-Lösung (4 U/µl) beigefügt werden.

Der Ansatz wird über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 13 µl 0,5 M Na₂EDTA gestoppt, indem die für die enzymatische Reaktion essentiellen Mg²⁺-Ionen komplexiert werden. Der Ansatz wird phenolisiert und die aus der wässrigen Phase ausgefällten Nukleinsäuren (3.3.1.) werden in Harnstoffpuffer aufgenommen und zur Reinigung über ein 6 % denaturierendes Polyacrylamidgel (20 x 20 x 0,1 cm) aufgetrennt (3.1.2.). Die Lokalisierung der RNA im Gel erfolgt mittels Fluoreszenzlöschung bei 254 nm (3.1.3.1.) oder durch Anfärben mit Toluidinblau (3.1.3.2.). Anschließend wird die RNA aus dem Gel eluiert (3.1.4.2.). Das getrocknete Transkript wird in insgesamt 300 µl TE (pH 7,2; 3.1.4.1.) gelöst und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt (3.3.2.1.).

10x T7-Transkriptionspuffer

Tris-HCl; pH 8,0	400 mM
DTT	50 mM
Spermidin	10 mM
MgCl ₂	120 mM

3.5.3. Präparation radioaktiv markierter Transkripte

Als Matrizen-DNA wird der das Transkript codierende Vektor linearisiert eingesetzt (3.7.1.). Zur Darstellung radioaktiv markierter Transkripte wird folgender Ansatz verwendet:

Radioaktive Transkription mit T7 RNA-Polymerase

<i>Reaktionsansatz (20 µl)</i>	<i>Endkonzentration</i>
6 µl Matrizen-DNA (0,1 µg/µl)	0,03 µg/µl
2 µl 10x T7-Puffer	1x T7 Puffer
2 µl NTP minus GTP (je 10 mM)	1 mM rNTPs
2 µl GTP (2 mM)	0,2 mM rGTP
2 µl [α^{32} P]-rGTP (10 µCi/µl)	1 µCi/µl [α^{32} P]-rGTP
1 µl T7 RNA-Polymerase (0,3 µg/µl)	15 ng/µl T7-RNA-Polymerase
ddH ₂ O	ad 20 µl

Dieser Ansatz wird 2 h bei 37 °C inkubiert, mit kaltem ddH₂O auf 100 µl aufgefüllt, phenolisiert, präzipitiert und das getrocknete Sediment in 10 µl Harnstoffpuffer gelöst. Zur Aufreinigung wird das radioaktiv markierte Transkript auf ein denaturierendes 8 % Polyacrylamidgel (3.1.2.) aufgetragen. Das Transkript wird durch Autoradiographie lokalisiert (3.1.3.3.), ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (3.1.4.2.). Die Präzipitate werden in TE-Puffer (3.1.4.1.) gelöst, sodass sich eine Konzentration von 10×10^3 cpm/µl ergibt.

Durch Zugabe von 0,02 % (w/v) Triton X-100 kann die Löslichkeit des Sedimentes erhöht werden.

3.6. Sequenzierung von DNA mit "AmpliTaQ polymerase FS Big Dye Terminator"

Die maschinelle Sequenzierung mit dem *Abi PRISM Genetic Analyzer* beruht auf der Markierung der Terminationsbasen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (*BigDye Terminator*). Die Fluoreszenzfarbstoffe besitzen dabei eine unterschiedliche Emissionswellenlänge. Die templat-abhängige Startsequenzverlängerung findet mit AmpliTaQ Polymerase FS im PCR-Block statt. Im Reaktionsansatz wird dGTP durch dITP ersetzt, um Gelkompression zu vermeiden. Standardansatz zur Sequenzierung:

Sequenzierreaktion mit *AmpliTaQ Polymerase FS BigDye Terminator*

Sequenzieransatz (10 µl)	Menge/10 µl
DNA	1-7 µl
Startsequenz (3,2 µM)	1 µl
<i>BigDye-Terminator-Mix</i>	2 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Die entsprechende Menge DNA (5-100 ng für PCR-Produkte, 100 ng ssDNA bzw. 500 ng dsDNA) wird mit 1 µl Startsequenz hybridisiert, mit 2 µl BigDye-Terminator-Mix versetzt und anschließend die unidirektionale PCR-Reaktion gestartet:

PCR Programm zur Sequenzierung mit *AmpliTaQ Polymerase*

	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
Denaturierung	96 °C	30 s	25x
Hybridisierung	50 °C	15 s	
Elongation	60 °C	240 s	

Der Reaktionsansatz wird mit 25 µl eiskalter Fällungslösung (3.3.1.) 10 min auf Eis präzipitiert, anschließend sedimentiert (Hereaus Biofuge 28 RS, 4 °C, 17 000 UpM, 30 min) und zweimal mit je 250 µl kaltem 70 % EtOH gewaschen (Hereaus Biofuge 28 RS, 4 °C, 17 000 UpM, 10 min).

Das getrocknete Präzipitat wird in 12 µl TSR-Lösung aufgenommen, denaturiert (95 °C, 2 min) und bis zur Analyse mit Hilfe des *Genetic Analyzers (ABI)* auf Eis bzw. bei 4 °C gelagert. Nach Aufnahme in TSR ist die Probe bis zu 48 h stabil.

3.7. Klonierung von Fremd-DNA in Plasmid-Vektoren

3.7.1. Präparation von Plasmidvektoren durch Restriktionshydrolyse

Zur Präparation eines Klonierungsvektors werden 10 µg entsprechendes Plasmid mit geeigneten Restriktionsendonukleasen linearisiert (3.7.1.) und mit dem *Jetquick PCR Purification Spin Kit* nach Herstellervorschrift aufgereinigt. Die Vollständigkeit der Spaltung wird durch ein Agarose-Gel überprüft (3.1.1.1.).

Die große Mehrzahl der Restriktionsendonukleasen spaltet doppelsträngige DNA spezifisch innerhalb einer 4-8 Nukleotide langen, palindromen Erkennungssequenz; dabei werden, abhängig von der Nuklease, kohäsive oder glatte Enden erzeugt.

Eine der für molekularbiologisches Arbeiten wichtigen Ausnahmen stellt *FokI* dar. Das Enzym schneidet innerhalb einer beliebigen Sequenz, die sich in definiertem Abstand zu seiner Erkennungssequenz befindet.

Präparative Restriktionshydrolyse von DNA

Reaktionsansatz (100 µl)	Endkonzentration
25 µg Plasmid	0,25 µg/µl Plasmid
10 µl 10x Reaktionspuffer	1x Reaktionspuffer
10 U Restriktionsendonuklease	0,1 U/µl
ddH ₂ O	ad 100 µl

Die Temperatur und Dauer der Inkubation sowie der jeweilige Reaktionspuffer sind vom verwendeten Enzym abhängig und richten sich nach den Herstellerangaben. Die Qualität der Hydrolyse wird durch ein Agarose-Gel (3.1.1.1.) kontrolliert. Ein Aliquot des Ansatzes wird neben Längenstandard und nicht hydrolisiertem Plasmid zum Vergleich auf das Gel aufgetragen.

3.7.2. Dephosphorylierung linearisierter Plasmide mit alkalischer Phosphatase (CIP)

Eine Eigen-Ligation eines nur mit einem Restriktionsenzym linearisierten Vektors wird durch dessen Dephosphorylierung am 5'-Ende verhindert (Sambrook und Russel, 2001). Die Reaktion wurde direkt im Plasmid-Linearisierungsansatz (3.7.1.) durchgeführt:

Dephosphorylierung von DNA durch CIP

Reaktionsansatz (111 µl)	Endkonzentration
100 µl Linearisierungsansatz (3.7.1.)	0,25 µg/µl Plasmid-DNA
10 µl 10x CIP-Reaktionspuffer	1x Reaktionspuffer
0,5 µl CIP (0,5 U/µl)	0,0025 U/µl CIP (ca. 10 mU/pmol 5'-Enden)

Die Inkubation des Ansatzes erfolgt für 30 min bei 37 °C. Es wird dann abermals ein Aliquot CIP-Enzym zugesetzt und die Inkubation wiederholt. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt durch Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Präzipitation mit EtOH (3.3.1.) oder Zugabe von 7 µl 40 mM NTA und Inkubation für 15 min bei 68 °C und anschließender Präzipitation. Das Sediment wird in TE-Puffer (3.1.4.1.) zu einer Konzentration von 100 ng/µl aufgenommen. Zur Überprüfung der

Vektor-Dephosphorylierung wird dieser später in einem gesonderten Ligationsansatz ohne DNA-Fragment eingesetzt.

10x CIP-Reaktionspuffer

NaCl	1 M
DTT	10 mM
MgCl ₂	100 mM
Tris-HCl; pH 7,9	500 mM
ddH ₂ O	ad 10 ml

3.7.3. Erzeugung glatter Enden und 5'-Phosphorylierung von PCR-Produkten

Während der PCR können durch das Anhängen einzelner Nukleotide durch die DNA-Polymerase 3'-überhängende Enden entstehen. Um eine erfolgreiche Ligation von Fragmenten mit glatten Enden (*blunt-end-* Ligation) durchführen zu können, werden deshalb am 5'-Ende des komplementären Strangs mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase die entsprechenden Nukleotide aufgefüllt.

Erzeugung glatter Enden mit T4-DNA-Polymerase

Reaktionsansatz (10 µl)	Endkonzentration
Aufgereinigtes PCR-Produkt	-
1 µl 10x PNK-Puffer	1x PNK-Puffer
1 µl 100µM dNTP-Mischung	10 µM dNTPs
1 µl T4-DNA-Polymerase (1 /µl)	0,1 U T4-DNA-Polymerase
DdH ₂ O	ad 10 µl

Die Reaktion wird für 15 min bei 14 °C durchgeführt. Anschließend wird das Enzym 10 min bei 74 °C hitzeinaktiviert.

Aufgrund der Synthesemethode der *Primer* besitzen PCR-Produkte kein 5'-Phosphat und müssen daher vor der Ligation in einen dephosphorylierten Vektor phosphoryliert werden. Diese Reaktion kann direkt im selben Reaktionsgefäß durchgeführt werden. Der Ansatz wird zusätzlich mit rATP (3 mM Endkonzentration) und T4-Polynukleotid-Kinase (PNK; 0,05 U/µl) supplementiert und für 45 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wird für 10 min bei 68 °C inaktiviert und der Ansatz mit Hilfe des *JETquick PCR purification spin kit* aufgereinigt.

Phosphorylierung glatter Enden mit PNK

Reaktionsansatz (20 µl)	Endkonzentration
10 µl PCR-Reaktion	-
3 µl ATP (20 mM)	3 mM ATP
1 µl PNK (10 U/µl)	0,5/µl U T4-PNK
ddH ₂ O	ad 20 µl

3.7.4. Ligation von PCR-Produkten

Fremd-DNA-Fragmente können in einen linearisierten Vektor mit kompatiblen Enden ligiert werden. Die T4-DNA-Ligase katalysiert dabei die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphat- und der 3'-Hydroxylgruppe zweier benachbarter Nukleotide. Grundsätzlich unterscheidet man zwei Arten der Ligation, die davon abhängen, mit welchen Restriktionsendonukleasen das Plasmid vorbereitend gespalten wurde. Während bei der *blunt-end* Ligation DNA-Fragmente mit glatten Enden verknüpft werden, werden bei der zweiten Art der Ligation, der *sticky-end*-Ligation, DNA-Fragmente mit komplementären 3'- bzw. 5'-kohäsiven Enden miteinander verknüpft. Ein großer experimenteller Vorteil der *sticky-end*-Ligation liegt darin, dass es bei Spaltung des Vektors mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen und entsprechender Präparation der Fremd-DNA möglich ist, ein Insert mit gerichteter Orientierung ins Plasmid einzubauen.

Für eine effektive Ligation sollte das zu insertierende DNA-Fragment im 10-fachen molaren Überschuss zum Vektor vorliegen (ca. 0,05 pmol Vektor zu 0,5 pmol Insert).

Ligation von Fragmenten mit kohäsiven Enden

Reaktionsansatz (10 μ l)	Endkonzentration
1 μ l DNA-Fragment	ca. 100 ng bzw. 0,05 pmol
1 μ l dephosphorylierter Vektor	ca. 100 ng bzw. 0,5 pmol
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	1x T4-DNA-Ligase-Puffer
1 μ l T4 DNA Ligase (1 U/ μ l)	0,1 U/ μ l
ddH ₂ O	ad 10 μ l

Für *blunt-end*-Ligationen gilt derselbe Ansatz, allerdings bei 50-facher Enzymmenge. Dabei sollte die Ligation von glatten Enden in jedem Fall bei niedrigen Temperaturen über ein großes Zeitintervall durchgeführt werden. Als Standard gelten Inkubationszeiten von 24 h bei 14 °C oder 48 h bei 4 °C. Bei Fragmenten mit überstehenden Enden ist eine Inkubation von 12 h bei 14 °C ausreichend.

Der Ligationsansatz kann ohne Aufreinigung direkt zur Transformation chemokompetenter Zellen eingesetzt werden (3.7.7.1.). Soll der ligierte Vektor zur Elektrotransformation verwendet werden, muss der Ansatz zuvor über das *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt werden. Es wird eine salzarme Lösung mit geringer Leitfähigkeit erhalten (3.7.7.2.).

3.7.5. Präparation chemokompetenter Zellen (Hanahan, 1983)

Ein Verdünnungsausstrich des zu präparierenden *E. coli*-Stammes wird 36 h bei 37 °C auf Minimalplatte inkubiert. Man impft dann 1 ml SOB-Medium mit einer der gewachsenen Bakterienkolonien an und lässt die Kultur unter Schütteln über Nacht wachsen (Infors Rundschüttler HT, 180 UpM, 37 °C). Mit 1 ml dieser Vorkultur werden 100 ml SOC-Medium in einem 1 l-Erlenmeyerkolben angeimpft und bis zu einer optischen Dichte $OD_{(600)} = 0,5$ weitergeschüttelt. Um eine hohe Transformationsrate zu erreichen, ist es wichtig für alle folgenden Schritte die angegebenen Temperaturen exakt einzuhalten und zügig zu arbeiten. Hat die Kultur die geforderte Zelldichte erreicht, wird die Zellsuspension auf Eis abgekühlt, in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 15 min auf Eis gelagert und anschließend zentrifugiert (Beckman J6-B, Rotor JA-10, 2500 UpM, 1100 g, 4 °C, 10 min). Der Überstand wird verworfen und das Sediment vorsichtig in 33,3 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 15 min

auf Eis werden die Zellen erneut sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 8 ml eisgekühlter RF2-Lösung aufgenommen. Nach 5 min auf Eis werden 280 µl 2,25 M DTT-Lösung hinzugegeben; dann lässt man die Zellen weitere 10 min auf Eis ruhen. Die Zellen werden zu 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können so mehrere Jahre bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Die Kompetenz der präparierten Zellen wird durch Transformation eines Aliquots mit einer definierten Menge pUC19 Plasmid-DNA (1-10 ng) festgestellt. Sie errechnet sich aus der Anzahl der erhaltenen Klone pro µg DNA. "Gute" Zellen besitzen eine Kompetenz von 10^7 - 10^9 Kolonien pro µg DNA.

SOC-Medium		SOB-Medium	
NaCl	10 mM	NaCl	5 mM
KCl	2,5 mM	KCl	2,5 mM
Bacto-Trypton	2 % (w/v)	Bacto-Trypton	2,0 % (w/v)
Bacto-Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)	Bacto-Hefe-Extrakt	0,5 % (w/v)

-autoklavieren-

folgende Lösungen steril filtrieren, dann zugeben

MgSO ₄ (1 M)	10 mM	MgSO ₄ (1 M)	10 mM
MgCl ₂ (1 M)	10 mM	MgCl ₂ (1 M)	10 mM
CaCl ₂ (5 M)	50 mM		
Glucose (1 M)	20 mM		

RF1-Lösung		RF2-Lösung	
	Endkonzentration		Endkonzentration
RbCl	100 mM	RbCl	10 mM
MnCl ₂	50 mM	MOPS	10 mM
KOAc	30 mM	CaCl ₂	75 mM
CaCl ₂	10 mM	Glycerin	15 % (v/v)
Glycerin	15 % (v/v)	ddH ₂ O	pH 6,8 mit NaOH
ddH ₂ O	pH 5,8 mit 0,2 M AcOH		

-steril filtrieren, nicht autoklavieren; Lagerung

bei 4 °C-

- steril filtrieren, nicht autoklavieren;

Lagerung bei 4 °C -

3.7.6. Präparation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

1 l SOC-Vollmedium wird in einem 2,5 l Erlenmeyerkolben mit 10 ml einer stationären Vorkultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (Infors Inkubationsrundschtüttler HT, 120 UpM) inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,6-0,8 erreicht wird. Die Kultur wird 15-30 min auf Eis gekühlt, in vorgekühlte Stahlbecher überführt und abzentrifugiert (Beckman J-6B, 4000 UpM, 4 °C, 15 min).

Die sedimentierten Zellen werden in 1 l 10 % Glycerin vorsichtig resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wird einmal mit 500 ml 10 % Glycerin wiederholt. Das Bakteriensediment wird in 20 ml 10 % Glycerin aufgenommen, in 2 PP-Zentrifugengefäße (15 ml) überführt und 15 min zentrifugiert. Die Sedimente werden in jeweils 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen und in Aliquoten zu 50 µl auf vorgekühlte Mikroreagiergefäße verteilt. Die Proben werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ über mehrere Monate gelagert werden.

3.7.7. Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

3.7.7.1. Hitzeschocktransformation

Zu 200 µl chemokompetenter Zellen (3.7.5), die langsam auf Eis aufgetaut wurden, werden 1-10 ng Plasmid-DNA bzw. 5 µl Ligationsansatz gegeben. Man mischt vorsichtig und inkubiert den Ansatz für 45 min auf Eis. Nach einem Hitzeschock (42 °C, 90 s) werden die Zellen abermals 10 min auf Eis inkubiert. Das Aliquot wird in einem 15 ml-PS Röhrchen mit 1,5 ml SOC-Medium versetzt und 1 h bei 37 °C geschüttelt (160 UpM). Dieser Schritt gibt den transformierten Bakterien Zeit, die für ihre jeweilige Antibiotikaresistenz verantwortlichen Enzyme zu exprimieren.

Es werden Aliquote zu 20, 100 und 500 µl auf LB-Agar-Platten ausplattiert (3.11.1.2.) und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.7.7.2. Elektroporation

Die elektrokompenten Zellen (3.7.6) werden auf Eis aufgetaut und mit 0,5 bis 1 µl Plasmid-DNA-Lösung (ca. 100 ng DNA) versetzt. Diese Suspension wird in eine Elektroporationsküvette überführt und einem 2,5 kV Elektropuls ausgesetzt (*Gene-Pulser, Bio-Rad*). Anschließend wird die Suspension in 1 ml Vollmedium aufgenommen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Der Ansatz wird in ein Mikroreagiergefäß überführt, kurz zentrifugiert (Tischzentrifuge, 4000 UpM, RT) und in 200 µl Restmedium ausplattiert (3.11.1.2.).

3.8. Charakterisierung von Proteinen

3.8.1. Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen

Das Arbeiten mit Proteinen erfordert in verschiedenen Arbeitsschritten oftmals unterschiedliche Pufferbedingungen; dabei kann etwa der pH-Wert eine Rolle spielen oder ein verwendetes Reagenz kann sich im nächsten Arbeitsschritt störend verhalten. Bei präparativen Arbeiten ist es oft auch notwendig, verdünnte Lösungen für einen nächsten Arbeitsschritt zu konzentrieren. Hierfür wurden in dieser Arbeit folgende Methoden verwendet.

3.8.1.1. Dialyse

Vor Gebrauch müssen die Dialyseschläuche einmal in 1 % (w/v) Na₂CO₃ mit 1 mM Na₂EDTA und anschließend drei- bis viermal mit ddH₂O bis zu einem annähernd neutralen pH-Wert aufgeköcht werden. Die Dialyseschläuche werden in 0,1 mM Na₂EDTA-Lösung 15 min autoklaviert und bei 4 °C aufbewahrt. Der Lösung wird 0,1 % Natriumazid zugesetzt, um mikrobielles Wachstum zu inhibieren. Die Dialyse wird im 100 fachen Volumen des gewünschten Puffers durchgeführt.

3.8.1.2. Konzentrieren von Proteinlösungen durch Ultrafiltration

In dieser Arbeit wurden Mikrokonzentratoren des Typs *microcon-10* und *microcon-30* der Firma *Amicon* mit einer Membranausschlußgrenze von 10 bzw. 30 kD verwendet.

Die Mikrokonzentratoren können verwendet werden, um kleinere Volumina an Proteinlösung umzupuffern oder zu konzentrieren. In diesem Fall wird die Probe (max. 500 µl/Filter) bis zur Trockene zentrifugiert (Eppendorf 5415 C, Upm ist säulenabhängig, siehe Herstellervorschrift) und durch mehrfachen Pufferauftrag direkt auf den Mikrokonzentrador gewaschen. Abschließend wird die

Probe im gewünschten Puffer aufgenommen. Des Weiteren werden die Filter zur Filtration von Proteinlösungen eingesetzt. Abhängig von Proteingröße und Membranausschlussgrenze der verwendeten Säule befindet sich das gewünschte Protein in Filtrat oder Überstand.

3.8.1.3. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Das Ausfällen von Proteinen aus Lösungen mittels der stark denaturierend wirkenden Trichloressigsäure (TCA) eignet sich besonders gut zur Vorbereitung von Proben aus Proteinlösungen unter denaturierenden Bedingungen für die SDS-PAGE-Elektrophorese (3.8.3.). Die TCA-Fällung wird weder durch Harnstoff noch durch Guanidiniumhydrochlorid gestört. Hochmolare Lösungen dieser beiden Reagenzien können jedoch nicht direkt auf SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen werden. Detergenzien hingegen inhibieren die TCA-Fällung. Die minimale Probenkonzentration sollte 5 µg/ml nicht unterschreiten.

Die Proteinlösung wird mit 1 Vol. eiskalter, 10 % TCA-Lösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Niederschlag wird durch Zentrifugation gesammelt (Heraeus 22 R Biofuge, 4 °C, 13 000 UpM, 15 min) und das Pellet in 100 µl 96 % eiskaltem Aceton zweimal gewaschen. Das Sediment wird im gewünschten Puffer aufgenommen (1x SDS-PAGE-Puffer) und weiterverarbeitet.

3.8.1.4. Fällung von Proteinen mit Methanol/Aceton

Durch die Zugabe von organischen Lösungsmitteln wird die Dielektrizitätskonstante der Lösung erniedrigt, wodurch die Solvatationskraft der wässrigen Lösung für gelöste Proteine herabgesetzt wird. Dies begünstigt die Aggregation von Proteinen durch elektrostatische Wechselwirkungen.

Die wässrige Proteinlösung wird mit 5 Vol. eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) gemischt und die Proteine über Nacht bei -80 °C gefällt. Der Niederschlag wird durch Zentrifugation (Heraeus Biofuge 22 R, 17000 UpM, 75 min, 4 °C) sedimentiert. Nach Abnahme des Überstands wird das Proteinpräzipitat getrocknet und im gewünschten Volumen Puffer aufgenommen.

3.8.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

3.8.2.1. Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Im Mittelpunkt dieser 1976 von M.M. Bradford veröffentlichten Färbemethode steht der blaue saure Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G250. Im sauren Milieu verschiebt sich in Gegenwart von Proteinen das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 zu 595 nm. Grund dafür ist die Stabilisierung in der unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung zwischen Protein und Farbstoff. Dabei bindet der Farbstoff recht unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten des Proteins. Die wichtigste Rolle spielen dabei Wechselwirkungen mit dem basischen, unter den Testbedingungen am terminalen Stickstoff protonierten, Arginin. Weniger wichtig sind Wechselwirkungen mit Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Daher ist die Lichtabsorption der Lösung bei 595 nm annähernd proportional zur Proteinkonzentration in der Lösung. Die Vorteile des Bradford-Tests zur Proteinkonzentrationsbestimmung liegen in seiner einfachen Durchführung und seiner Unempfindlichkeit gegenüber Reduktionsmitteln. Der wohl größte Nachteil besteht darin, dass gleiche Massen an verschiedenen Standardproteinen aufgrund unterschiedlichen Arginingehalts erhebliche Differenzen in ihren resultierenden Absorptionskoeffizienten verursachen können.

Bradford-Stammlösung

	Menge/l
Coomassie Brilliant Blue G250	100 mg
EtOH (96 %)	50 ml
H ₃ PO ₄	100 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

Die Lösung wird durch drei Lagen Filterpapier filtriert und kann bei 4 °C über mehrere Monate gelagert werden.

Messung einer unbekanntten Proteinkonzentration:

10 µl Proteinlösung werden mit 1 ml Bradford-Lösung gemischt und nach fünf Minuten die Absorption bei 595 nm gemessen. Als Referenz wird mit BSA-Lösungen bekannter Konzentration (0,0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 mg/ml) kalibriert. Bei der Auswertung ist dabei zu achten, dass nur im linearen Bereich der Eichkurve zuverlässige Werte erhalten werden. Die zu vermessenden Proben sind entsprechend zu verdünnen.

3.8.2.2. Konzentrationsbestimmung durch UV-Messung

Christian und Warburg etablierten die Messung von Proteinkonzentrationen durch Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (A_{280}). Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin, in geringerem Maß auch Phenylalanin. Da Proteinlösungen oft durch Nukleinsäuren verunreinigt sind, welche ihr Maximum bei 260 nm haben, jedoch ebenfalls bei 280 nm absorbieren, ermittelten Christian und Warburg einen zweiten Absorptionswert bei 260 nm (A_{260}) und erhielten eine Gleichung mit empirisch ermittelten Korrekturfaktoren:

$$\text{Proteinkonzentration (in mg mL}^{-1}\text{)} = (1,55 - A_{280}) - (0,76 - A_{260})$$

Die A_{280} -Methode orientiert sich maßgeblich an Tryptophan, welches den bei weitem größten molaren spektralen Absorptionskoeffizienten (ϵ) besitzt:

Aminosäure	$\epsilon_{280} \cdot 10^{-3}$ [L mol ⁻¹ cm ⁻¹]	λ_{max} [nm]
Tryptophan	5,559	219, 279
Tyrosin	1,197	193, 222, 275
Phenylalanin	0,0007	188, 206, 257

Der molare Absorptionskoeffizient eines Proteins setzt sich additiv aus den einzelnen Beträgen der enthaltenen Aminosäuren zusammen.

Die Vorteile der A_{280} -Methode sind ihre schnelle und einfache Anwendbarkeit und ihre geringe Störanfälligkeit gegenüber Nichtproteinsubstanzen.

3.8.3. Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die grundlegende Idee der (diskontinuierlichen) SDS-Polyacrylamidelektrophorese besteht darin, alle Proteine nach kompletter Denaturierung in einheitliche, vollständig entfaltete Polypeptidketten mit gleichen Ladungseigenschaften zu überführen (Laemmli, 1979).

Dabei wird das Aggregieren von Proteinen beim Eintritt ins Gel verhindert und eine größere Bandenschärfe erreicht. Hierzu wird die Gelmatrix in zwei Bereiche eingeteilt: das engporige Trenngel und das weitporige Sammelgel. Das zugesetzte SDS (engl. Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat) überdeckt als anionisches Detergenz die Proteineigenladung so effektiv, dass sich Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit ausbilden. Dabei ist die elektrophoretische Beweglichkeit der SDS-Polypeptid-Micellen dem Logarithmus ihrer Masse proportional. Die Molekulargewichte der zu bestimmenden Proteine werden durch Vergleich mit Hilfe von geeigneten Standards ermittelt.

Für ein Gel mit den Maßen (16 x 14 x 0,5 cm) werden 30 ml Gellösung benötigt. Unmittelbar nach der Zugabe von SDS, TEMED und APS wird die Lösung luftblasenfrei zwischen zwei durch Silikonabstandhalter getrennte Platten bis zu einer Höhe von 2 cm vom oberen Rand her gegossen. Die Gellösung wird sofort mit ddH₂O überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels (30 min) wird das H₂O vollständig entfernt und das Sammelgel nach Zugabe von SDS, TEMED und APS auf das Trenngel gegossen. Nach Einpassen des Taschenformers lässt man das Gel in vertikaler Lage polymerisieren (20 min). Nach Entfernen des unteren Silikonstreifens und des Taschenformers wird das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingespannt. Der zwischen Silikonstreifen und Gelmasse nach Polymerisation auftretende Spalt wird mit Fett abgedichtet und die Apparatur mit Elektrophoresepuffer befüllt. Vor dem Auftragen der Proben werden die Geltaschen gründlich mit Puffer gespült.

Die zu analysierenden Proben (10 µl) werden mit 10 µl 2x Probenpuffer versetzt und direkt vor dem Auftragen hitzedenaturiert (3 min, 95 °C). Die Elektrophorese beginnt bei 50 V; wenn BPB das Trenngel erreicht hat, wird die Spannung auf 150 V erhöht und die Elektrophorese gestoppt, nachdem BPB das Gel verlassen hat.

Gelmaße:	16 x 14 x 0,05 cm
Volumen der Gellösung:	30 ml Trenngel 15 ml Sammelgel
Volumen des Elektrophoresepuffers	1000 ml
Trennspeisung	50 V Sammelgel 150 V Trenngel

Zusammensetzung kontinuierlicher Trenngele zur SDS-PAGE Elektrophorese

Material	12,5 %	15,0 %	18 %	Endkonzentration
40 % AA-Bis (29:1)	9,4 ml	11,25 ml	13,5 ml	12,5; 15,0 bzw. 18,0 (w/v)
1,5 M Tris; pH 8,8	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	375 mM
ddH ₂ O	12,7 ml	10,9 ml	7,8 ml	-
20 % SDS	150 µl	150 µl	150 µl	0,1 % (w/v)
10 % APS	200 µl	200 µl	200 µl	-
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl	-
Gesamtvolumen:	30 ml	30 ml	30 ml	

Für einige Auftrennungsprobleme ist die Verwendung eines PAA-Gradienten im Trenngel von Vorteil. Zur Herstellung eines 12,5-18 % Gels werden je 10 ml 12,5, 15 und 18 %ige Gellösung angesetzt und beginnend mit der höchstkonzentrierten Lösung überschichtend zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen. Wird nur 1 %ige APS-Lösung verwendet, so bildet sich während der langsamen Polymerisation über Nacht ein annähernd linearer Gelgradient aus. Die Ausbildung des Gradienten kann durch den Zusatz von Bromphenolblau zu einer der Gellösungen visualisiert werden.

Zusammensetzung des Sammelgels

Material	Menge	Endkonzentration
40 % AA-Bis (29:1)	1,9 ml	5,0 % (w/v)
0,5 M Tris; pH 6,8	3,7 ml	123 mM
ddH ₂ O	8,5 ml	-
20 % SDS	75 µl	0,1 %
10 % APS	200 µl	-
TEMED	10 µl	-
Gesamtvolumen:	15 ml	

2x Probenpuffer		Elektrophorese-Puffer	
Tris-HCl; pH 6,8	100 mM	Tris	44 mM
SDS (20 % (w/v))	4 % (w/v)	Glycin	200 mM
Glycerin (86 % (w/v))	17 % (w/v)	SDS (10 % (w/v))	0,15 % (w/v)
2-Mercaptoethanol	0,1 % (w/v)		
Bromphenolblau	0,1 % (w/v)		

3.8.4. Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

3.8.4.1. Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung von Proteingelen ist eine schnelle und einfache Methode zum Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen. Der Farbstoff (Serva Blue R-250) ist unter den sauren Bedingungen der Färbelösung negativ geladen und lagert sich durch elektrostatische Wechselwirkungen an positiv geladene Aminosäurereste an. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 100 ng Protein pro Gelbande.

Das Proteingel (3.8.3.) wird nach der Elektrophorese mindestens 30 min bei RT in Färbelösung geschüttelt (IKA-Vibrax-VXR, 40 Upm). Anschließend wird das Gel unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung für mindestens 1 h entfärbt. Die aufgetrennten Proteine erscheinen im Gel als blaue Banden. Abschließend wird das Gel zwischen zwei Cellophanfolien bei 80 °C auf dem Geltrockner getrocknet.

Silbernachfärbung

Sollte die Nachweisgrenze dieser Färbemethode (0,1–0,2 µg Protein pro Bande) unterschritten werden, ist es möglich, das Gel mit der sensitiveren Silberfärbung (Nachweisgrenze: 1-10 ng pro Bande) nachzubearbeiten. Hierzu wird das Gel in 30 % Methanol unter mehrmaligem Lösungsmittelwechsel möglichst vollständig entfärbt (mindestens 2 Tage). Das weitere Vorgehen

entspricht der unter 3.8.4.2. ausführlich beschriebenen Silberfärbung. Lediglich der 1. Arbeitsschritt (Fixierung) entfällt.

3.8.4.2. Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Methode beruht auf der Bindung von Silberionen an den Seitenketten bestimmter Aminosäuren und der Reduktion dieser fixierten Metallionen zu elementarem Silber. Die Silberfärbung ist etwa um den Faktor 100 sensitiver als die Coomassie-Färbung. Sie eignet sich deshalb insbesondere zur Analyse von Elutionsfraktionen säulenchromatographischer Reinigungsmethoden. Ihre Nachweisgrenze liegt bei 0,1 ng Protein pro Gelbande.

Der Ablauf des Färbeverfahrens ist in Anlehnung an Blum *et al.* (1987) im nachfolgenden Schema zusammengefasst. Die Färbungsreaktionen erfolgten unter leichtem Schütteln (Vibrax, 40 UpM) bei RT. Dabei sind die angegebenen Reaktionszeiten, insbesondere für die Schritte 4 und 6 exakt einzuhalten. Möglichst vollständige und schnelle Lösungswechsel können durch Absaugen mittels einer Wasserstrahlpumpe erreicht werden. Alle Lösungen (je 200 ml) werden stets frisch hergestellt.

	Vorgang:	Lösung:	Inkubationszeit:
1.	Fixieren	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure	30 min
2.	Waschen	50 % (v/v) EtOH	3x 15 min
3.	Imprägnieren	Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O: 0,22 g/l	1 min
4.	Waschen	ddH ₂ O	3x 20 sec
5.	Imprägnieren	AgNO ₃ : 2 g/l 37 % HCOH: 500 µl/l	20 min
6.	Waschen	ddH ₂ O	2x 20 sec
7.	Reduzieren	Na ₂ CO ₃ : 60 g/l Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O: 4 mg/l 37 % HCOH: 500 µl/l	1 bis 10 min
8.	Abstoppen	50 % (v/v) Methanol 12 % (v/v) Essigsäure	5 min
9.	Waschen	ddH ₂ O	2x 2 min
10.	Konservieren	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Glycerin	30 min

Beim Schütteln in Reduzierlösung erscheinen die fixierten Proteine als rötlich-orange bis braunschwarze Banden. Nach dem Konservieren wird das Gel wie unter 3.8.4.1. beschrieben getrocknet.

3.8.5. Übertragung von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen (*Western-Blot*)

Proteine, die in einem ersten Schritt gelelektrophoretisch aufgetrennt wurden, können zur weiteren Charakterisierung auf einer Membran immobilisiert werden. Dieser *Western-Blot* wurde 1979 von Towbin *et al.* erstmals beschrieben. Dabei wird senkrecht zur Elektrophoreserichtung des Gels ein elektrisches Feld angelegt. Die aufgetrennten Proteine wandern im Ionengradienten auf die proteinbindende Membran aus Nitrocellulose oder Nylon.

In dieser Arbeit wurde der Transfer, wie von Khyse-Andersen (1984) beschrieben, im Semi-Dry-Verfahren durchgeführt. Er erfolgte in der *Transblot Semi-Dry Transfer Cell* der Firma BioRad für 75 min bei einer konstanten Spannung von 25 V. Für das Elektroblothing ist folgender Aufbau nötig:

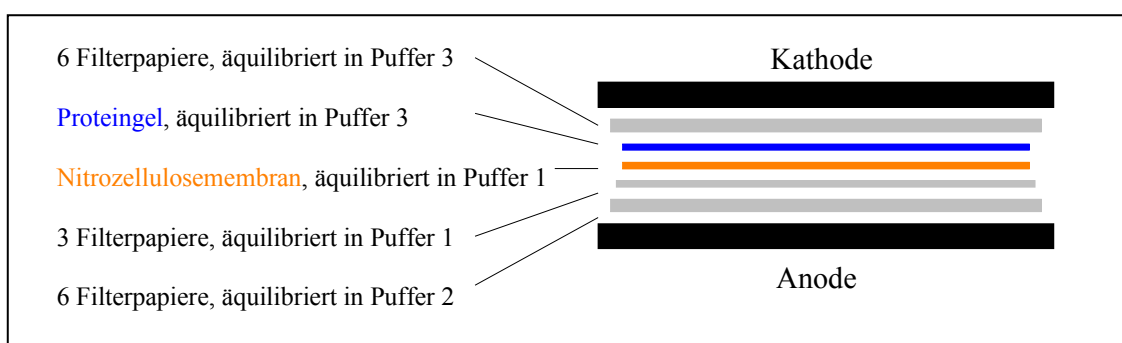


Abb. 3-2: Schematischer Aufbau des *Semi-Dry-Western-Blots*

Das Proteingel wird exakt 3 min in Puffer 3 äquilibriert. Beim Zusammenbau des Western-Blots ist es wichtig darauf zu achten, dass sich zwischen den puffergetränkten Filterpapieren, der Membran und dem Gel keine Luftblasen befinden; im Bereich solcher Blasen wäre kein Proteintransfer möglich. Die Blasen können durch vorsichtiges Rollen mit einem angefeuchteten Glasstab entfernt werden.

Nach dem Blotvorgang wird die Oberseite der Membran mit einem Kugelschreiber markiert und 1x in TBS-Puffer gewaschen. Bis zur Weiterbehandlung der Membran durch Immun- oder Farbstofffärbung kann sie mehrere Tage in TBS-Puffer bei 4 °C gelagert werden. Zur Kontrolle auf vollständigen Proteintransfer kann das SDS-Gel mit Commassie-Blau (3.8.4.1.) nachgefärbt werden.

Puffer 1 (W1)

Tris-HCl pH 10,4	25 mM
Methanol	20 % (v/v)

Puffer 2 (W2)

Tris-HCl; pH 10,4	300 mM
Methanol	20 % (v/v)

Puffer 3 (W3)

Tris-HCl pH 9,4	25 mM
Norleucin	40 mM
Methanol	20 % (v/v)

10x TBS

Tris-HCl pH 7,6	400 mM
NaCl	2,75 M

3.8.6. Anfärben membrangebundener Proteine

Nach der Übertragung von Proteinen auf eine Membran können gebundene Proteine durch verschiedene Färbetechniken sichtbar gemacht werden. Einerseits kann so die Vollständigkeit der Übertragung vom Gel auf die Membran kontrolliert werden, zum anderen können Banden reversibel angefärbt werden, um sie für weitere Untersuchungen auszuschneiden.

3.8.6.1. Anfärben mit Ponceau S

Diese reversible Färbemethode eignet sich besonders, um Proteinbanden kurzfristig sichtbar zu machen. Vor aufwändigeren Immunonachweisen kann so der möglichst vollständige Proteintransfer auf die Membran kontrolliert werden. Bei Bedarf können Proteinbanden nach dieser Lokalisation auch ausgeschnitten werden. Dabei beeinträchtigt der Farbstoff die Struktur der Proteine kaum und kann einfach wieder ausgewaschen werden.

Direkt nach Proteintransfer auf die Membran wird diese dreimal 5 min in ddH₂O gewaschen und 1 min unter leichtem Schütteln in Ponceau S-Lösung gefärbt. Die Membran wird mehrmals mit ddH₂O bzw. zur Beschleunigung mit Extraktionslösung gewaschen, bis der Hintergrund nur noch schwach gefärbt ist und die Proteinbanden deutlich rot erkennbar sind.

Ponceau S-Färbelösung

Ponceau S	0,005 % (w/v)
Essigsäure	1 % (v/v)

Entfärbelösung

Acetonitril	20 % (v/v)
NaOH	0,2 mM

3.8.6.2. Anfärben mit Amidoschwarz

Während Ponceau S nur sehr schwach an Proteine bindet und sich deshalb zur reversiblen Färbung eignet, bildet Amidoschwarz eine praktisch irreversible Färbung aus.

Nach dem Proteintransfer wird die Membran dreimal 5 min in ddH₂O gewaschen und dann 3 min in Färbelösung geschwenkt. Die Membran wird solange in Entfärbelösung gewaschen bis der Hintergrund klar und Proteine als grau-blaue Banden sichtbar sind. Abschließend wird die Membran einmal in ddH₂O kurz gewaschen und auf einem Filterpapier bei RT an der Luft getrocknet. Im trockenen Zustand ist die Membran allerdings sehr brüchig und sollte deshalb rasch fotografiert oder gescannt werden; feucht in Folie eingeschweißt kann sie längere Zeit gelagert werden.

Amidoschwarz-Färbelösung

Amidoschwarz	0,10 % (w/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	5 % (v/v)

Entfärbelösung

Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	5 % (v/v)

3.8.7. Nachweis von Proteinen durch gekoppelte Immunreaktion

Für die Immunodetektion von Antigenen auf einer Membran ist es nötig, die Membran zunächst unter Verwendung einer konzentrierten, immunologisch neutralen Proteinlösung (z.B. LB-Medium, 10 % fötales Kälberserum, 5 % fettfreies Milchpulver) zu "blockieren". Dadurch werden unspezifische Bindungsstellen für Proteine abgesättigt und unspezifische Hintergrundfärbungen vermindert. Der "blockierte" Blot wird dann zuerst mit dem gegen das gesuchte Protein gerichteten Primärantikörper

inkubiert. Ungebundener Primärantikörper wird abgewaschen und der Blot mit einem markierten Sekundärantikörper inkubiert, der spezifisch an den Primärantikörper bindet. Nach weiterem Waschen wird der Antigen-Antikörper-Komplex mit Hilfe der Markierung des Sekundärantikörpers sichtbar gemacht.

Die Spezifität der Immunfärbung hängt hauptsächlich von der Spezifität der Antikörper, sowie von deren Konzentration ab. Die Reaktionsparameter müssen für jeden Primärantikörper optimiert werden. Die verwendeten Primärantikörper wurden un Verdünnungen von 1:250 bis 1:10000 eingesetzt.

Vorgang	Lösung	Inkubationszeit
Blockieren	1x TBS mit 2 % (w/v) Magermilchpulver oder 1 % BSA oder 0,1 % (v/v) TWEEN 20	mind. 1 h oder über Nacht (4 °C)
1. Antikörper	verdünnt in 1x TBS, 0,2 % (v/v) TWEEN 20	1 h
Waschen	1x TBS 0,5 % (v/v) TWEEN 20	2x 10 sec 3x 5 min
2. Antikörper	verdünnt in 1x TBS, 0,2 % (v/v) TWEEN 20	1 h
Waschen	1x TBS 0,5 % (v/v) TWEEN 20	2x 10 sec 3x 5 min

Alle Inkubationsschritte werden, soweit nicht anders angegeben, unter leichtem Schütteln bei RT durchgeführt. Es ist darauf zu achten, dass die Membran immer vollständig mit Flüssigkeit benetzt ist. Nach dem letzten Waschschrift verbleibt die Membran in Waschlösung, bis sie zur Immundetektion eingesetzt wird.

Die für die Immundetektion eingesetzten sekundären Antikörper können direkt markiert (fluoreszierend, radioaktiv, Biotin) oder mit Enzymen gekoppelt sein, welche für eine Farbreaktion geeignet sind und damit eine bessere Empfindlichkeit durch Verstärkung des Signals ermöglichen.

3.8.7.1 Immundetektion durch Merrettich-Peroxidase

Hier erfolgt der Proteinnachweis durch eine Peroxidasereaktion. Dabei wird Luminol mit Wasserstoffperoxid zur Reaktion gebracht. Bei dieser Reaktion entsteht ein elektronisch angeregtes Molekül, welches beim Übergang in den Grundzustand einen Lichtquant aussendet. Diese Chemolumineszenz kann durch Schwärzung eines Röntgenfilms durch die Peroxidase-gekoppelten Konjugate detektiert werden.

Zur Detektion werden 100 µl Lösung I und 44 µl Lösung II gemischt und mit 5,85 µl H₂O₂ zu 10 ml TBS (pH 7,4) gegeben. Nachdem der Waschpuffer von der Membran durch Abtropfen sorgfältig entfernt wurde, wird diese mit der "Proteinseite" nach oben auf Frischhaltefolie gelegt und vollständig mit Substratlösung (125 µl/cm²) bedeckt. Nach 1 min Inkubation bei RT wird die Reaktionslösung abgetropft und die Membran luftblasenfrei in Folie verpackt. Zur Detektion wird sie sofort für 2-300 sec auf Röntgenfilm exponiert. Um den Hintergrund auf ein Minimum zu reduzieren, empfiehlt es

sich in vielen Fällen, 30 min nach Abschluss der Enzymreaktion eine weitere Röntgenfilmexposition (1 h) durchzuführen. Durch Vergleich mit vorgefärbten Proteinstandards ist es möglich, den spezifischen Signalen auf dem Röntgenfilm die entsprechende Protein-Masse in kD zuzuordnen.

Nach der Immunfärbung kann die feuchte Membran durch luftdichtes Verschweißen über mehrere Wochen bei 4 °C gelagert und nach der Ablösung der Antikörper für eine weitere Immunfärbung eingesetzt werden.

Peroxidase-Substratlösung	
	Volumen/10 ml
Tris-HCl (1 M); pH 7,5	1 ml
30 % H ₂ O ₂	5,85 µl
Lösung I	100 µl
Lösung II	44 µl

-Lösungen unmittelbar vor Verwendung herstellen-

Lösung I		
	Konzentration	Menge/5 ml
Luminol	250 mM	224 mg
DMSO	--	5 ml

-je 100 µl-Aliquote werden bei -20 °C gelagert-

Lösung II		
	Konzentration	Menge/2,5 ml
p-Cumarsäure	90 mM	37,1 mg
DMSO	--	2,5 ml

-je 44 µl-Aliquote werden bei -20 °C gelagert-

3.8.7.2. Immundetektion durch Alkalische Phosphatase

Die Proteindetektion erfolgt hier über an den Sekundärantikörper gebundene Alkalische Phosphatase (AP) und Umsetzung des Chemilumineszenz-AP-Substrats Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-Chloro) Tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] Decan}-4-yl Phenylphosphat (CSPD). Die (enzymatische) Dephosphorylierung von CSPD bewirkt eine Lichtemission mit einem Maximum bei 477 nm; diese wird mittels Röntgenfilm aufgezeichnet. Das CSPD-Chemilumineszenzsignal auf Nitrocellulosemembran ist über mehrere Stunden beständig. Es verstärkt sich in den ersten Stunden nach dem Start der Detektionsreaktion bis zu einem Intensitätsplateau, das für 24-48 h konstant bleibt. Um die gewünschte Signalintensität zu erreichen, können also mehrere Aufnahmen erfolgen.

Direkt vor der Nachweisreaktion wird die Membran 2 x 2 min mit *Assay*-Puffer äquilibriert und anschließend 5 min in AP-Substratlösung inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wird abgetropft und die Membran feucht exponiert. Sollte die Membran währenddessen austrocknen, zeigen sich diese Stellen als schwarzer Hintergrund.

AP-Substratlösung	
	Volumen/2,12 ml
<i>Assay</i> -Puffer	2 ml
CSPD	20 µl
5 % Nitroblock	100 µl

<i>Assay</i> -Puffer	
Tris-HCl; pH 9,8	200 mM
MgCl ₂	10 mM
ddH ₂ O	ad 100 ml

3.8.7.3. Befreiung membrangebundener Proteine von gebundenen Antikörpern

Western Blots können mehrfach hintereinander mit verschiedenen Antikörpern angefärbt werden. Dabei ist es wichtig, Signale aus vorhergegangenen Färbungen zu vermeiden. Zur zuverlässigen Entfernung membrangebundener Proteine wird die Membran in Puffer S unter leichtem Schütteln für 30 min bei 50 °C inkubiert und anschließend dreimal 10 min mit 1x TBS gewaschen. Mit dem Blockierungsschritt beginnend, kann die Membran jetzt einer erneuten Immunodetektion unterzogen werden.

Puffer S	
SDS (20 % (w/v))	2 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	100 mM
Tris-HCl; pH 6,8	62,5 mM

3.8.8. Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose

Immunpräzipitationen dienen der spezifischen, selektiven Isolierung eines Antigens und seiner Komplexpartner aus Zellextrakten. Dabei ist die Präzipitierung durch Kopplung der Antikörper an Protein A-Sepharose eine der verbreitetsten Methoden. Protein A ist ein Zellwandprotein aus *Staphylococcus aureus* mit einer spezifischen Affinität zur Fc-Region von γ -Immunglobulinen. Es weist eine hohe pH-Stabilität von 2-10 auf, wobei die Bindungsaffinität zur Fc-Domäne pH-abhängig ist. Die Bindungsaffinität von Protein A kann abhängig von der Herkunft (Spezies) und Subklasse der Antikörper erheblich variieren. Zur Herstellung von Protein A-Sepharose wird Protein A kovalent an die als Trägermaterial fungierende unlösliche und inerte Sepharose gekoppelt.

3.8.8.1. Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose

Die kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose erfolgt mit Abwandlungen nach Simanis und Lane (1985). Im ersten Schritten binden die Antikörper nicht kovalent an Protein-A-Sepharose. Durch die Zugabe von Dimethylpimelimidat (DMP), einem Diimidsäuredimethylester, erfolgt dann die kovalente Kopplung. Sowohl primäre Amine (Lysin; N-Terminus der Peptid-Ketten) der Protein-A-Sepharose als auch des Antikörpers reagieren nukleophil mit dem Doppellester; es kommt zur Verküpfung. Durch reduktive Desaminierung werden dann stabile sekundäre Amine ausgebildet. Alle Arbeiten werden bei 4 °C durchgeführt. Pro Präzipitierungsansatz werden 20 mg Protein A-Sepharose in 500 μ l Puffer H unter Schütteln 30 min vorgequollen. Nach kurzer Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge, 8000 Upm, 10 sec) wird der Überstand abgenommen und die Sepharose kann für die Antikörperbindung verwendet werden. Hierzu werden 25 μ g aufgereinigte Antikörper (3.8.9.2. & 3.8.9.3.), 20 mg Protein A-Sepharose und 500 μ l TBS (pH 7,4) über Nacht inkubiert. Dabei werden die Ansätze über Kopf rotiert, um ein Absetzen der Protein A-Sepharose am Reaktionsgefäßboden zu verhindern. Die Sepharose wird durch kurzes Zentrifugieren (Eppendorf Tischzentrifuge, 8000 Upm, 10 sec) gesammelt und zweimal mit je 500 μ l 100 mM Na_3BO_3 (pH 9,0) gewaschen. Das Sediment wird in 500 μ l 100 mM Na_3BO_3 (pH 9,0) resuspendiert und DMP bis zu einer Endkonzentration von 40 mM zugegeben. Der Ansatz wird für 90 min unter Rotieren wie oben beschrieben bei RT inkubiert, abzentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 8000 Upm, 10 sec) und das Pellet dreimal mit je 1 ml 200 mM Ethanolamin (pH 8,0) gewaschen. Die Kopplungsreaktion wird in 1 ml 200 mM Ethanolamin (pH 8,0) durch Inkubation für 90 min unter ständiger Durchmischung (RT) gestoppt. Abschließend wird die Sepharose dreimal mit je 1 ml Puffer WIP 1 gewaschen, um nicht

gekoppelte Antikörper abzutrennen. Die Effizienz der Kopplung kann durch Entnahme eines Aliquots vor und nach der Kopplung durch SDS-PAGE (3.8.3.) überprüft werden.

Puffer H		Puffer WIP 1	
Tris-HCl; pH 8,0	10 mM	Tris-HCl ; pH 8,0	10 mM
NaCl	150 mM	NaCl	500 mM
Na ₂ EDTA (1 M)	5 mM		
Nonidet P-40 (NP-40)	0,1 % (v/v)		

3.8.8.2. Immunpräzipitation aus *Cyanophora paradoxa* S100-Extrakt

Vor der Immunpräzipitation werden unspezifisch an Protein A-Sepharose bindende Proteine abgetrennt. Hierzu werden 1 mg S100-Extrakt mit Puffer F+ auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und zu 20 mg Protein A-Sepharose gegeben. Der Ansatz wird über Nacht bei 4 °C über Kopf rotiert. Die Sepharose wird dann durch Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge, 8000 Upm, 2 min) abgetrennt und verworfen. Der so behandelte S100-Extrakt wird zu 20 mg Antikörper-gekoppelter Protein A-Sepharose gegeben (3.8.8.1.), wiederum über Nacht bei 4 °C über Kopf rotiert und zentrifugiert (Eppendorf Tischzentrifuge, 8000 Upm, 2 min). Der Überstand wird verworfen und das Pellet je zweimal mit Puffer WIP 2 und WIP 3, sowie einmal mit WIP 4 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift und anschließender Zentrifugation wird Puffer WIP 4 abgenommen und das Sediment in 50 µl Puffer F+ aufgenommen. Nach vorsichtiger Resuspendierung kann die Suspension direkt in RNase P-Standard-Prozessierungstests (3.12.3.) eingesetzt werden.

Neben verschiedenen Protease-Inhibitoren wird den hier verwendeten Puffern auch RNasin zugesetzt. RNasin ist ein Protein aus humaner Plazenta und bildet nichtkovalente äquimolare Komplexe mit RNasen. Es ist nur unter nicht-denaturierenden Bedingungen einsetzbar und benötigt für seine Aktivität reduzierende Pufferbedingungen (mindestens 5 mM DTT). Alle verwendeten Puffer werden mit DEPC ddH₂O angesetzt (3.5.1.).

Puffer F+		Puffer WIP 2	
Tris-HCl; pH 7,0	20 mM	Tris-HCl; pH 7,5	50 mM
KCl	130 mM	NaCl	150 mM
MgCl ₂	15 mM	Nonidet P-40 (NP-40)	1 % (v/v)
PMSF (1 M)	1 mM	Na-deoxycholat	0,5 % (w/v)
Leupeptin (1 mM)	2 µM	PMSF (1 M)	1 mM
Pepstatin (1 mM)	1 µM	Leupeptin (1 mM)	2 µM
RNasin	1 U/ml	Pepstatin (1 mM)	1 µM
DTT (500 mM)	20 mM	Rnasin	1 U/ml
		DTT (500 mM)	20 mM

Puffer WIP 3		Puffer WIP 4	
Tris-HCl; pH 7,5	50 mM	Tris-HCl; pH 7,5	10 mM
NaCl	500 mM	Nonidet P-40 (NP-40)	0,1 % (v/v)
Nonidet P-40 (NP-40)	0,1 % (v/v)	Na-deoxycholat	0,05 % (w/v)
Na-deoxycholat	0,05 % (w/v)	PMSF (1 M)	1 mM
PMSF (1 M)	1 mM	Leupeptin (1 mM)	2 µM
Leupeptin (1 mM)	2 µM	Pepstatin (1 mM)	1 µM
Pepstatin (1 mM)	1 µM	Rnasin	1 U/ml
RNasin	1 U/ml	DTT (500 mM)	20 mM
DTT (500 mM)	20 mM		

3.8.8.3. Elution der immunpräzipitierten Proteine

Immunpräzipitierte Proteine können vom kovalent an Protein-A-Sepharose gekoppeltem Antikörper eluiert werden. Hierzu wird eine 20 mg Protein-A-Sepharose entsprechende Menge an Immunpräzipitat in 400 µl IP-Elutionspuffer (72 °C) 30 sec bei 72 °C inkubiert, kurz abzentrifugiert (Hettich Tischzentrifuge, 30 sec) und der Überstand abgenommen. Der Vorgang wird zweimal wiederholt und die Überstände vereinigt. Die Isolation der eluierten Proteine erfolgt durch Methanol-Aceton-Fällung (3.8.1.4.).

IP-Elutionspuffer	
Glycin	100 mM
	pH 2,5-3,0 mit HCl

3.8.9. Herstellung und Aufreinigung von polyklonalen Antikörpern

Die Reinheit und Spezifität von polyklonalen Antikörpern, wie man sie nach Immunisierung eines Tieres mit einem aufgereinigten Antigen erhält, reicht für viele immunologische Anwendungen nicht aus. Es gibt eine Reihe von Verfahren, um Antikörper, die einer bestimmten Immunglobulin-Klasse angehören, aus einem Antiserum aufzureinigen (Harlow und Lane, 1988). Die Spezifität solcher Antikörper-Präparationen kann sowohl durch Anreicherung der spezifischen Komponenten als auch durch Abtrennung von verunreinigenden, unspezifischen Komponenten weiter erhöht werden.

3.8.9.1. Immunisierung von Kaninchen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten polyklonalen Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen. Dazu werden 200 µg homogen gereinigtes Protein pro Immunisierung benötigt. Die Proteinproben können lyophilisiert oder als ausgeschnittenes Gelstück zugesandt werden. Die Immunisierung sowie das Abnehmen der Serumproben erfolgt firmenseitig anhand eines Standardprotokolls.

3.8.9.2. Reinigung von Antikörpern aus Kaninchenserum durch Ammoniumsulfatfällung

Durch die Zugabe von $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zur 40 %igen Sättigung können γ -Immunglobuline aus Serum ausgefällt werden.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,43 g/10 ml Serum) wird in kleinen Portionen bei 4 °C über einen Zeitraum von 1 h unter leichtem Rühren zugegeben. Nach Zugabe der gesamten Menge wird 1 h bei 4 °C weitergerührt. Das gefällte IgG wird abzentrifugiert (10000 UpM, 15 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das Sediment wird in 10 ml 33 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (w/v) behutsam mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators suspendiert und wie oben zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt. Das Präzipitat wird in 4 ml 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und unter mehrmaligem Pufferwechsel gegen 10 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) mindestens 12 h dialysiert. Abschließend wird die IgG-Konzentration bei 280 nm bestimmt ($\epsilon_{280}(0,1\%) = 1,3 \text{ cm}^2/\text{mg}$).

3.8.9.3. Entfernung von anti-*E. coli*-Antikörpern aus einer IgG-Präparation

Antiseren immunisierter Tiere enthalten oft einen relativ hohen Anteil an Antikörpern, die bakterielle Antigene erkennen und deshalb bei der Analyse von Expressions-Bibliotheken in *E. coli*-Zellen zu hohen Hintergrundsignalen führen. Die in dieser Arbeit verwendete Methode von Gruber und Zignales (1995), abgewandelt nach Naß (1997), beruht auf der Inkubation der Antikörper-Lösung mit abgetöteten, unlöslichen *E. coli*-Zellfraktionen. Anti-*E. coli*-Immunglobuline lassen sich durch Zentrifugation dann leicht abtrennen.

Gewinnung des *E. coli*-Zellmaterials

Es werden insgesamt 2,4 l (viermal 600 ml in 2,5 l Kolben) Maltose-haltiges (2 % (w/v)) LB-Medium mit demjenigen *E. coli*-Stamm angeimpft, der für das Expressions-Screening verwendet wird, und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (Infors Inkubationsrundschtüttler HT ,110 UpM). Eine Hälfte der Bakterien-suspension wird für 1 h bei 120 °C autoklaviert; die andere Hälfte wird mit 16,2 ml 37 % (w/v) Formaldehyd-Lösung (Endkonzentration 0,5 % (w/v)) versetzt und für weitere 2 h bei 37 °C geschüttelt. Nach Abkühlen der autoklavierten Lösung werden beide Suspensionen vereinigt und anschließend zentrifugiert (Rotor GSA, 5500 UpM, 10 min, 4 °C, 5000 g). Das Sediment wird zweimal mit je 250 ml 1x PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das erhaltene Zellmaterial wird aliquotiert und kann mehrere Wochen bei -20 °C gelagert werden.

Bindung und Abtrennung von anti-*E. coli*-Immunglobulinen

Zu 10 ml einer 1x PBS-Lösung (mit 10 µg/ml BSA), die den aufzureinigenden Antikörper in einer 1:100 Verdünnung (v/v) enthält, werden 0,2 g der *E. coli*-Zelltrümmer gegeben. Diese Suspension wird 2 h bei 4 °C sanft geschüttelt und anschließend zentrifugiert (Beckman JS 13.1, 5700 UpM, 4 °C, 10 min, 5000 g). Der Überstand wird abgenommen und dieser Zyklus damit zweimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wird die Antikörper-Lösung durch eine 0,22 µm-Membran steril filtriert. Die Antikörperlösung kann jetzt einige Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

3.8.9.4. Handhabung von Antikörpern

Antikörper sind als Antiserum am stabilsten und können so bei -20 °C über mehrere Jahre gelagert werden. Bei falscher Handhabung und Lagerung von Antikörperpräparationen kann es zu einem merklichen Verlust der Bindungsaktivität kommen. Dabei werden besonders isolierte, reine Antikörper leicht durch bakterielles Wachstum oder durch Aggregieren, besonders aber durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren, geschädigt. Isolierte Antikörper können durch den Zusatz von 1 % BSA (w/v) vor Aggregation geschützt werden. Durch die Addition von 0,02 % NaN_3 (w/v) wird bakterielles Wachstum weitgehend gehemmt. Frische Antikörper-Präparationen werden in flüssigem N_2

schockgefroren und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert bzw. einfrieruntaugliche Antikörper-Präparationen bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um ein Austrocknen von eingefrorenen Antikörperproben und einen damit verbundenen Aktivitätsverlust bei längerer Lagerung zu verhindern, sollten die eingelagerten Proben mindestens die Hälfte des Röhrchenvolumens einnehmen. Zusätzlich wird der Druckverschluss mit Parafilm überzogen.

3.9. Präparation rekombinanter Proteine

Viele Proteinexpressionsstrategien basieren auf dem Prinzip, das Zielprotein als rekombinantes Fusionsprodukt mit einer speziellen N- oder C-terminalen Aminosäuresequenz zu exprimieren. Mit dem Ziel einer vereinfachten Proteinaufreinigung kann diese zusätzliche Aminosäuresequenz anschließend als Bindungsstelle (*Tag*) verwendet werden. Der *Tag* ermöglicht die spezifische reversible Bindung an eine feste Phase und erleichtert so chromatographische Aufreinigungen wesentlich.

Alle in dieser Arbeit exprimierten rekombinanten RNase P Proteine sind als Fusionsprodukt mit 6 konsekutiven Histidin-Resten (*6x-His-Tag*) konzipiert. Die Aufreinigung des Zielproteins erfolgt hier durch reversible Bindung des *His-Tag* an immobilisierte Ni^{2+} -Ionen. Der verwendete *His-Tag* ist relativ klein, nur schwach immunogen, bei physiologischem pH-Wert ungeladen und bindet unabhängig von der Konformation der Proteine sehr stark an Ni^{2+} -Ionen.

3.9.1. Expressionssysteme auf Basis der *E. coli* RNA-Polymerase (pQE-Vektoren)

Die pQE-Expressionsvektoren (Qiagen) basieren auf einem optimierten Transkriptions-Translations-System, das vom frühen Promotor des Bakteriophagen T5 gesteuert wird. Der Vektor trägt hierzu ein optimiertes Promotor/Operator-Element, welches aus dem diesem starken Promotor und zwei *lac*-Operator-Sequenzen gebildet und von der endogenen *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird. Die Expression ist durch Zugabe von IPTG induzierbar. Durch eine synthetische, optimierte Ribosomen-Bindungsstelle (RBS) wird eine hohe Translationsrate gewährt. Zwei Transkriptionsterminatoren sorgen für eine effiziente Beendigung der Transkription. Das Plasmid enthält das Ampicillin-Resistenzgen *bla*. Um die Expression der rekombinanter Proteine ausreichend kontrollieren zu können, bedarf der T5-Promotor einer zusätzlichen Kontrolle, die durch die *lac*-Operatorsequenzen in pQE30 bzw. das *lac*-Repressorprotein gewährleistet wird. Die für eine vollständige Repression der erforderliche Menge *lac*-Repressor wird dem System durch das zusätzliche Plasmid pREP-4 zur Verfügung gestellt (Farabaugh, 1978). Das Plasmid codiert neben dem *lacI*-Gen für Neomycin-Phosphotransferase, welche Kanamycin-Resistenz verleiht. Die in dieser Arbeit zur Proteinexpression im pQE-System verwendeten *E. coli* Bakterienstämme M15 und SG13009 tragen das pREP-4 Plasmid (Abb. 3-4).

3.9.2. Das T7-Expressionssystem (pET- und pRSET-Vektoren)

Die *high-copy* pRSET-Vektoren (Invitrogen) sind gekoppelte Transkriptions-Translationsvektoren und verfügen über einen Bakteriophagen T7-Promotor. Das T7-System ist das zur Zeit wohl am erfolgreichsten verwendete Expressionssystem. Das zu exprimierende Gen befindet sich hierbei unter der Kontrolle des späten Bakteriophagen T7-Promotors, der ausschließlich von der RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 erkannt und transkribiert wird. Eine Kopie des T7 RNA-Polymerase-Gens befindet sich als λ -Lysogen auf der chromosomalen DNA der verwendeten Bakterienstämme und steht unter Kontrolle des *lacUV5* Promotors. Durch Zugabe von IPTG kann die Synthese der T7 RNA-

Polymerase induziert werden. Da diese ausschließlich die mRNA des Zielproteins transkribiert, sind die Ribosomen der Zelle nun fast ausschließlich auf die Translation des rekombinanten Proteins programmiert. Die im Rahmen dieser Arbeit zur Expression im T7-System verwendeten Stämme BL21 (DE3) pLysS und Rosetta (DE3) pLysS verfügen über das zusätzliche Plasmid pLysS, welches eine effizientere Repression des im Expressionsvektor klonierten Gens ermöglicht. Das Plasmid trägt eine Kopie des T7-Gens für Lysozym und zur Selektion eine Chloramphenicol-Resistenz (Abb. 3-4). Lysozym wird in der Zelle auf niedrigem Niveau exprimiert und hemmt zusätzlich zu seiner Zellwand lysierenden Eigenschaft auch die T7-RNA-Polymerase. Eine vorzeitige, nicht induzierte Expression des Zielproteins findet daher nicht statt. Nach IPTG-Induktion wird dieser Effekt durch die dann großen Mengen T7-RNA-Polymerase aufgehoben. Ein Zutritt des in der Zelle vorhandenen Lysozyms zur Zellwand ist nicht möglich. *E. coli*-Stämme mit pLysS eignen sich deshalb besonders zur Expression toxischer Proteine.

Der *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) coexprimiert zusätzlich eine Reihe von in *E. coli* nur in geringer Menge vorkommenden tRNAs, welche für das Lesen einiger seltene Codons notwendig sind (CCA/UCA und CCG für Arginin; UAU für Isoleucin; UAG für Leucin; GGG für Prolin und UCC für Glycin). Er bietet sich deshalb speziell zur Überexpression von Fremdproteinen an, die eine Vielzahl in *E. coli* nur selten auftretender Codons enthalten können.

3.9.3. Überexpression rekombinanter Proteine in *E. coli*-Stämmen

3.9.3.1. Überexpression im analytischen Maßstab

Da die optimalen Expressionsbedingungen (insbesondere Medienzusammensetzung, IPTG-Konzentration, Induktionstemperatur und Dauer) für jedes rekombinante Protein bzw. für jeden Bakterienstamm unterschiedlich sind, werden vor jeder präparativen Proteinexpression die optimalen Parameter im analytischen Maßstab bestimmt (Abb. 3-3).

Nach der Transformation (3.7.7.) des *E. coli*-Überexpressionsstammes kultiviert man den Stamm in 20 ml Medium unter ständiger Wachstumskontrolle bis zu einer $OD_{(600)}=0,5-0,8$. Nach Abnahme einer Probe (1 ml) wird die Expression durch IPTG-Zugabe gestartet. Es werden weitere Proben (je 1 ml) in definierten Zeitabständen entnommen und bis zu ihrer Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

Zur Analyse der Expression wird ein *E. coli* Gesamtlysat hergestellt. Hierzu werden die Proben abzentrifugiert (Hettich Tischzentrifuge, 5 min) und die sedimentierten Zellen in jeweils 100 µl 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Um einen besseren Übertritt der Proteinproben in die Gelmatrix zu gewährleisten, wird die chromosomale DNA direkt vor der Hitzedenaturierung (95 °C, 5 min) sonifiziert (Sonicator, Fa. Branson, 50 % Interrupt, Stufe 2). Das Lysat wird über ein SDS-PAGE-Gel (3.8.3.) und anschließende Coomassie-Blaufärbung (3.8.4.1.) analysiert.

Wachstum der Überexpressionskultur bei 37 °C bis zu $OD_{(600)} = 0,6 - 0,8$ in LB-Medium
 Induktion durch 1,0 mM IPTG bei 37 °C für 5 h

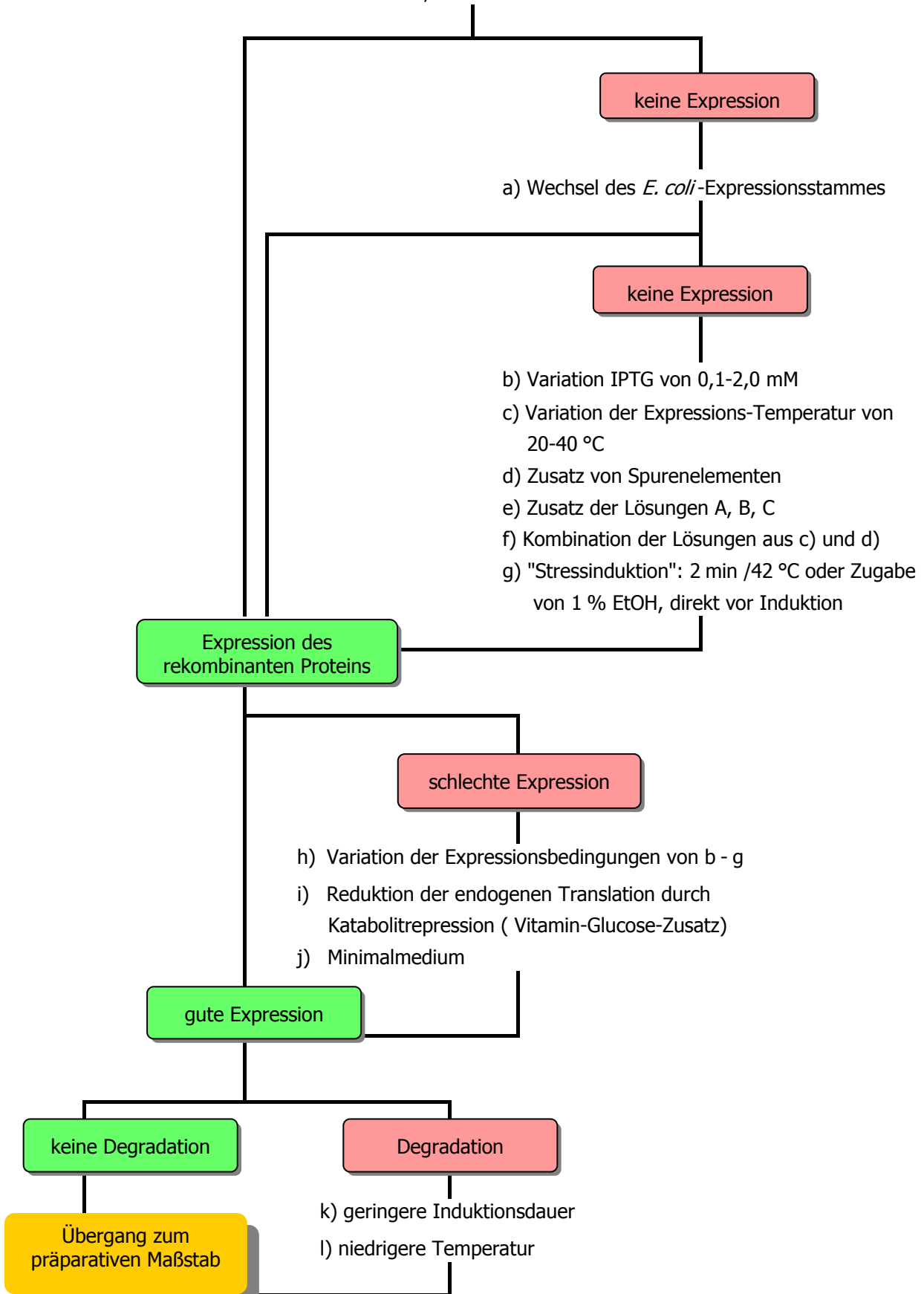


Abb. 3-3: Flussschema zur Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen in *E. coli*

- a) Die Wahl des Vektorsystems sowie des *E. coli*-Stammes kann von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Proteinüberexpression sein (3.9.1. & 3.9.2.). Die verwendeten Vektoren unterscheiden sich hauptsächlich bezüglich ihrer Promotoren. Die verwendeten Bakterienstämme besitzen unterschiedliche Proteasedefizienzen oder verfügen über unterschiedliche Plasmide, die sie wiederum mit Repressor-Fähigkeiten oder zusätzlichen tRNAs zur Translation (3.9.2) ausstatten.
- b), c) Durch eine niedrigere IPTG-Konzentration und/oder eine niedrigere Expressions-Temperatur kann die Bildung von *Inclusion Bodies* reduziert werden.
- d), e), f) Durch den Zusatz von Spurenelementen (Lösungen A, B, C) und Vitaminen in verschiedenen Kombinationen können Expressions-Ergebnisse stark verbessert werden. Insbesondere die Zugabe von Zn²⁺-Ionen hat einen positiven Einfluss.
- g) Durch verschiedene Stresseinflüsse direkt vor der Induktion wird der Translationsapparat der Zelle zusätzlich aktiviert.
- h) Siehe d), e) und f).
- i) Durch den Zusatz von bis zu 2 % (w/v) Glucose kann der Zielprotein-Basallevel durch katabolische Repression signifikant abgesenkt werden.
- j) Durch die Verwendung von M9 Minimalmedium wird die Produktion endogener *E. coli* - Proteine auf ein Minimum beschränkt. Es werden mit Abstand die besten Expressions-Ergebnisse (Verhältnis endogener *E. coli* - Proteine zu rekombinantem Protein) erzielt.
- k), l) Sowohl durch eine niedrigere Expressions-Temperatur als auch durch kurze Induktionszeiten kann die Aktivität der für den Abbau zuständigen Proteasen reduziert werden. Um auszuschließen, dass es sich um Degradation und nicht um vorzeitigen Abbruch während der Translation handelt, empfiehlt sich in diesem Fall die Verwendung eines Expressionsstammes, der zusätzlich für seltene tRNAs codiert (3.9.2.).

Lösung A:

		Menge/100 ml
Fe(III)Cl ₃	7,5 mM	0,2 g
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	80 µM	0,03 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	230 mM	5,9 g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	3,0 mM	0,088 g
MnSO ₄ x H ₂ O	3,2 mM	0,054 g
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,5 mM	0,013 g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,5 mM	0,013 g
H ₃ BO ₃	0,6 mM	0,004 g
ddH ₂ O	ad 100 ml	

-steril filtrieren-

Spurenelement-Lösung

		Menge/100 ml
H ₃ BO ₃	46 mM	0,286 g
MnCl ₂	12 mM	0,155 g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	77 mM	2,22 g
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	4,7 mM	0,198 g
CuSO ₄ 5x H ₂ O	32 mM	0,789 g
Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O	17 mM	0,491 g
ddH ₂ O	ad 100 ml	

-steril filtrieren-

Lösung B:

		Menge/100 ml
CaCl ₂ 2xH ₂ O	680 mM	10 g
α-Biotin (Vitamin B ₇)	4,1 mM	100 mg
ddH ₂ O	ad 100 ml	

-steril filtrieren-

Lösung C:

		Menge/10 ml
Thiamin (B ₁)	3 mM	10 mg
ddH ₂ O	ad 10 ml	

-steril filtrieren-

10x M9-Salz:		Glucose-Vitamin-Zusatz	
	Einwaage/1000 ml		Menge/500 ml Medium
NH ₄ Cl	10 g	MgSO ₄ (1,0 M)	200 µl
Na ₂ HPO ₄	60 g	CaCl ₂ (0,5 M)	100 µl
NaH ₂ PO ₄	30 g	Glucose (40 % (w/v))	2,5 ml
NaCl	5 g	Vitamin B1 (10 mg/ml)	0,5 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml		

-Lösung jeweils frisch ansetzen
und steril filtrieren-

1x Minimalmedium mit Glucose-Vitamin-Zusatz	
	Menge/500 ml
10x M9-Salz:	50 ml
Trypton	5 g
ddH ₂ O	ad 500 ml
-autoklavieren-dann Zugabe von	
Glucose-Vitamin-Zusatz	3,3 ml

3.9.3.2. Umgang mit Protein-Einschlußkörperchen (*Inclusion Bodies*)

Inclusion Bodies entstehen durch die micellen-artige Zusammenlagerung von rekombinanten Proteinmolekülen in der Zelle. Die entstehenden Aggregate bleiben nicht in Lösung und fallen auch in der Zelle aus. In diesen Einschlusskörperchen liegen die Proteine meist entfaltet vor und müssen deshalb nach ihrer Isolierung in jedem Fall renaturiert werden. Für native Aufreinigungsstrategien gilt es deshalb, die Bildung dieser Protein-Aggregate in jedem Fall zu vermeiden. Allerdings bieten sie sich durch ihre relativ einfache Isolierung über Zentrifugation für denaturierende Aufreinigungen an. Es gilt jedoch bis jetzt als nicht geklärt, warum in diesem Fall eine vollständige Renaturierung nicht immer möglich ist. Das *Inclusion Body*-Verhalten muss für jedes rekombinante Protein neu getestet werden, wobei die Faustregel gilt, dass hydrophobe Proteine eher zur Aggregation neigen. Für RNase P-Proteine hat sich dabei gezeigt, dass ihr aktiver Anteil nach dem abschließenden Renaturierungsschritt geringer ist, wenn während der Aufreinigung auf *Inclusion Bodies* zurückgegriffen wurde. Es wurde deshalb versucht die Bildung von *Inclusion Bodies* zu vermeiden.

Test auf Protein-Einschlußkörperchen

Zum Test auf *Inclusion Bodies* wird der Bakterienkultur nach Beendigung der Expression eine 1 ml Probe entnommen, abzentrifugiert (Tischzentrifuge, 5 min) und das Zellpellet danach 100 µl ddH₂O aufgenommen. Die Zellen werden durch Sonifizieren aufgeschlossen (Sonificator, Fa. Branson, 50 % Interrupt, Stufe 2, 1 min), abermals abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Lösliches rekombinantes Protein befindet sich im Überstand, *Inclusion Bodies* hingegen im Zellsediment. Die Analyse erfolgt durch SDS-PAGE (3.8.3.).

Vermeidung von Protein-Einschlusskörperchen

Zur Vermeidung von *Inclusion Bodies* können eine Reihe von Expressions-Parametern verändert werden, die alle eine langsamere Translation des rekombinanten Proteins oder eine Erhöhung seiner Löslichkeit bewirken sollen:

- niedrigere Temperatur nach der Induktion (20-30 °C)
- niedrigere IPTG-Konzentration (< 0,1 mM)
- stärkeres Schütteln der Überexpressionskultur (> 150 Upm). Eine bessere Sauerstoffzufuhr kann eine höhere Löslichkeit des Zielproteins bewirken.
- kürzere Induktionszeit
- Induktion bei $OD_{(600)} > 0,8$

3.9.3.3. Überexpression im präparativen Maßstab

5 ml LB-Kulturmedium (Antibiotikazugabe entsprechend Abb. 3-4) werden mit einer frisch ausgestrichenen Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus dieser Vorkultur werden in einem 2 l Erlenmeyerkolben 500 ml antibiotika-supplimentiertes Medium in einer 1:1000 Verdünnung angesetzt. Unter Schütteln (Infors Inkubationsschüttler HT, 120 Upm) lässt man die Bakterienkultur bis zu einer $OD_{(600)}$ von 0,6-0,7 heranwachsen und induziert dann die Proteinexpression durch IPTG-Zugabe (Endkonzentration 0,5-2,0 mM). Die Inkubation wird für 3-5 h Stunden bei 34 °C fortgesetzt. Die Zellen werden durch Zentrifugation (Beckman J-6B, 15 min, 4000 Upm, 4 °C) geerntet, gewogen und - falls nötig - zur Aufbewahrung in flüssigem N₂ schockgefroren. Dabei werden aus 500 ml Kultur etwa 2,5 g feuchte Zellmasse gewonnen. Die gefrorenen Zellen können bis zur Weiterverarbeitung (3.10.) mehrere Wochen bei -80 °C gelagert werden. Zur Analyse auf Erfolg und Quantität der Expression werden vor IPTG-Zugabe und vor der Zellernte jeweils 1 ml Kultur entnommen, sedimentiert und mit SDS-Proben-Puffer für ein SDS-PAGE-Gel vorbereitet (3.8.3.).

3.10. Proteinaufreinigungsmethoden

3.10.1. Säulenchromatographie

Chromatographie im Säulenverfahren ist eine wichtige Trennmethode, bei der eine gelöste Substanzmischung mit Hilfe eines Flüssigkeitsstroms über eine stationäre Phase geleitet und dabei in die einzelnen Bestandteile der Mischung aufgetrennt wird.

Zum Packen der Säule wird das jeweilige Chromatographie-Material im 10-fachen Volumen des entsprechenden Puffers aufgenommen. Die Suspension wird luftblasenfrei in eine Säule entsprechender Größe gegossen und mit dem 10-fachen Säulenvolumen Startpuffer äquilibriert.

Die im Startpuffer gelöste Proteinprobe wird langsam auf die Säule aufgetragen. Nichtbindende Proteine werden mit dem 10-fachen Säulenvolumen Startpuffer ausgewaschen. Die Elution erfolgt - je nach Säule - in einem Salzkonzentrations-, pH- oder Harnstoffgradienten. Das Gradientenvolumen sollte in der Regel mindestens das 10-fache Säulenvolumen betragen. Die eluierten Proteine werden in Fraktionen geeigneter Größe gesammelt.

3.10.1.1. Denaturierende Aufreinigung eines rekombinanten Proteins über Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Die hier beschriebene Protein-Präparation findet bei RT unter denaturierenden Bedingungen statt, um endogene RNase P-RNA vollständig vom rekombinanten RNase P-Protein zu trennen. Nach jedem Arbeitsschritt werden von der jeweiligen Lösung oder Suspension 100 µl entnommen, um sie später per SDS-PAGE (3.8.3.) analysieren zu können. Dabei muss die zu analysierende Probe vor der Auftragung auf das Gel durch Ultrafiltration (3.8.1.2.) oder Protein-Fällung (3.8.1.3. & 3.8.1.4.) umgepuffert werden. Wird der Puffer nicht gewechselt, bildet Guanidiniumhydrochlorid mit SDS ein schwerlösliches Salz, das die Proben am Übertritt in die Gelmatrix hindert.

Zur Aufreinigung wird das Zellsediment in Lysepuffer A resuspendiert (5 ml/g Feuchtgewicht) und bis zur vollständigen Zellyse etwa 1 h vorsichtig geschüttelt. Die Suspension wird zentrifugiert (Beckman J2-21, Rotor JA-20, 4 °C, 30 min bzw. 10 000 g) und der proteinhaltige Überstand abgenommen. Das Pellet wird verworfen. Zum Überstand werden 2,0 ml mit Puffer A äquilibrierter Ni²⁺-NTA-Agarose (ca. 1,0 ml/250 ml Bakterienkultur) gegeben. Um ein möglichst vollständiges Binden des rekombinanten Proteins an die Ni²⁺-NTA-Agarose zu gewährleisten, wird die Suspension anschließend 1 h in einem silanisierten 50 ml PP-Röhrchen (3.10.4.) durch langsames Rotieren am KPG-Rührer gemischt und anschließend in eine 15 ml PP-Säule (1,6 x 7,5 cm) gegeben. Nachdem sich das Säulenmaterial abgesetzt hat, wird der Überstand als Durchlauf aufgefangen. Die Säule wird nun sukzessive mit je 20 ml Puffer B, C und D gewaschen (0,5 ml/min). Die Elution des Proteins erfolgt mit 5 ml Puffer E (0,2 ml/min). Die Vollständigkeit der Elution kann durch einen parallel ausgeführten Bradford-Test (3.8.2.1.) festgestellt werden.

Das im Eluat enthaltene RNase P-Protein wird in einem zweiten Schritt an DEAE-Cellulose chromatographisch aufgearbeitet (3.10.1.2.).

Regenerierung der Ni²⁺-NTA-Agarose:

Die Ni²⁺-NTA-Agarose kann regeneriert und so mehrmals verwendet werden. Nach ihrem Gebrauch wird die Säule mit jeweils 10 Volumen 0,2 M Essigsäure, 30 % Glycerin und ddH₂O gewaschen. Danach wird die Matrix bei 4 °C in 30 % EtOH gelagert, um mikrobielles Wachstum zu verhindern.

Puffer A		Puffer B		Puffer C	
Guanidiniumhydrochlorid	6 M	Harnstoff	8 M	Harnstoff	4 M
NaH ₂ PO ₄	100 mM	NaH ₂ PO ₄	100 mM	NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris-HCl, pH 8,0	10 mM	Tris	10 mM	Tris	10 mM
Glycerin (50 % (v/v))	5 % (v/v)	Imidazol	30 mM	Imidazol	30 mM
		Triton X-100	0,1 % (v/v)	Triton X-100	0,2 % (v/v)
		NaCl	500 mM	NaCl	1 M
			pH 8,0 mit HCl		pH 6,3 mit HCl

Puffer D		Puffer E	
Harnstoff	2 M	Harnstoff	2 M
NaH ₂ PO ₄	100 mM	NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris-HCl; pH 8,0	10 mM	Tris-HCl; pH 8,0	10 mM
Imidazol	30 mM	Imidazol	250 mM
Triton X-100	0,2 % (v/v)	ddH ₂ O	ad 500 ml, pH 4,5
NaCl	1 M		
ddH ₂ O	ad 500 ml, pH 8,0		

3.10.1.2. Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose

DEAE-Cellulose besteht aus Diethylaminoethyl-modifizierter Cellulose und wirkt aufgrund der positiven Ladung dieser Gruppen im physiologischen pH-Bereich als Anionenaustauscher. Die Kapazität der verwendeten DE23-Cellulose beträgt etwa 10 mg Protein/ml.

Anionische, an DEAE bindende Proteine können über einen Salz- oder pH-Gradienten eluiert werden. Kationische Proteine befinden sich im Durchlauf.

Da das aufzureinigende RNase P-Protein viele, unter den pH-Bedingungen protonierte, basische Reste trägt, bindet es im Gegensatz zu RNA nicht an die DEAE-Matrix und kann im Durchlauf gesammelt werden.

Vorbereitung der DEAE-Cellulose:

Zur Aktivierung wird die trockene DEAE-Cellulose im 6-fachen Volumen ddH₂O über Nacht zum Quellen suspendiert. Das ddH₂O wird über einen Büchnertrichter abfiltriert und die Cellulose im 15-fachen Volumen 0,5 N HCl aufgenommen. Das Material wird 1 h bei RT gerührt und anschließend über einem Büchnertrichter solange mit ddH₂O gewaschen, bis sich pH 5 einstellt. Nach Versetzen mit dem 15-fachen Volumen 0,5 N NaOH und 30 min Rühren wird das Säulenmaterial mit ddH₂O gewaschen, bis pH 9 erreicht wird. Jetzt wird die DEAE-Cellulose im Puffer der späteren Anwendung äquilibriert, mit 0,1 % Natriumazid versetzt und bei 4 °C aufbewahrt.

Durchführung der DEAE-Säulenchromatographie:

Für die Chromatographie wird eine Säule (2,0 x 20 cm) 8 cm hoch mit aktivierter DEAE-Cellulose gefüllt und mit 100 ml Puffer B (3.10.1.1.) äquilibriert (1 ml/min). Anschließend werden die über Ni²⁺-NTA vorgereinigten Proteinfractionen noch Puffer E befindlichen (3.10.1.1.) aufgetragen (0,25 ml/min). Wegen ihres stark basisch geprägten Charakters binden RNase P-Proteine im Gegensatz zu RNA unter diesen pH-Bedingungen nicht an die DEAE-Säule und befinden sich im Durchlauf.

Chromatographie an DEAE im "batch"-Verfahren

Dieses Verfahren erlaubt bei ständiger Durchmischung sehr lange Kontaktzeiten zwischen Säulenmaterial und Proteinlösung und kann dadurch die Ausbeute erhöhen.

25 ml aktivierte DEAE-Cellulose wird in ein 50 ml PP-Zentrifugengefäß gefüllt und mit Puffer B durch mehrmaliges Waschen äquilibriert. Die in Puffer E (3.10.1.1.) gelösten Proteine werden dann direkt zur DEAE-Matrix gegossen und die Cellulose-Suspension 1 h bei RT geschüttelt. Die DEAE-Cellulose wird in eine Säule (2,0 x 20 cm) eingefüllt, das Filtrat gesammelt, und die Säule fünfmal mit je 2 ml Puffer F gewaschen.

Das basische RNase P-Protein befindet sich im Durchfluss. Dieser wird durch Ultrafiltration (3.8.1.2) eingengt und abschließend gegen Lagerpuffer L dialysiert (3.8.1.1). Die Proteinpräparation ist in Puffer L über mehrere Monate bei -20 °C stabil.

Durch homologe Rekonstitution mit RNase P-RNA zum Holoenzym kann die Aktivität und der Renaturierungsgrad des rekombinanten Proteins getestet werden (3.12.2. & 3.12.3.).

Puffer L

Tris-HCl; pH 7,0	20 mM
KCl	130 mM
MgCl ₂	15 mM
Glycerin	50 % (v/v)
PMSF	0,01 mM
Leupeptin	2 µM
Pepstatin	1 µM

3.10.2. Ultrazentrifugation im Glyceringradienten

Die Ultrazentrifugation im Dichtegradienten bietet eine sehr schonende Möglichkeit, um Proteine oder Enzym-Komplexe nativ aus einem Gemisch (z.B. Zellhomogenat) aufzureinigen oder anzureichern.

Die gleichmäßige Wanderung der Partikel in einem Schwerfeld kann durch mechanische Vibrationen, Wärmegradienten oder Konvektionen gestört werden. Die Zentrifugation in einem Dichtegradienten minimiert diese Einflüsse. Zur Bildung des Gradienten werden meist Saccharose, Glycerin, Cäsiumchlorid oder Cäsiumsulfat verwendet. Die Dichte ist am Boden des Zentrifugenröhrchens am höchsten und nimmt nach oben ab. Die Wahl der Eigenschaften des Gradienten hängt vom gewünschten Verwendungszweck ab. Die Dichtegradienten-Zentrifugation läßt sich in die Zonen-Zentrifugation und die isopyknische Zentrifugation einteilen. Das Charakteristische der Dichtegradienten-Differentialzentrifugation ist die Wanderung der Partikel durch einen stabilisierenden, relativ flachen Gradienten, dessen minimale Dichte nicht größer sein darf als die des sedimentierenden Materials. Während der Zentrifugation wandern die Partikel im Idealfall mit konstanter Geschwindigkeit durch den Gradienten; diese ist von Größe und Form der Partikel, Zentripetalbeschleunigung sowie Dichte und Viskosität des Mediums abhängig. Enthält die Probe, die auf den vorgeformten Gradienten aufgeschichtet wird, eine Mischung verschiedener Partikel, so wandert jede Partikelklasse unabhängig von den anderen durch den Gradienten. So kann eine Trennung der Partikel selbst dann erzielt werden, wenn ihre Unterschiede in den Sedimentationseigenschaften nur gering sind. Die Technik der isopyknischen Zentrifugation dient der Trennung von Partikeln unterschiedlicher Dichte, unabhängig von Form oder Größe. Wie bei der Zonen-Zentrifugation ist ein Dichtegradient nötig, aber im Unterschied dazu übersteigt hier die maximale Dichte des Gradientenmaterials die der Partikel. Die Partikel wandern im Gradienten solange, bis sie in den Gradientenbereich gelangen, an dem die Dichte des Gradientenmaterials der Dichte der Partikel entspricht. Hier sedimentieren die Teilchen nicht weiter, da sie praktisch auf einer Unterlage schwimmen, die eine größere Dichte als sie selbst besitzt.

In dieser Arbeit wurde Glycerin als Gradientenmaterial verwendet (Morales *et al.*, 1992). Dazu werden die Glycerinlösungen direkt vor ihrer Verwendung mit RNasin (1 U/ml), PMSF (1 mM Endkonzentration), Leupeptin (1 μ M) und Pepstatin (1 μ M) supplementiert. Der Gradient wird dann von unten nach oben in vier Stufen gegossen: 3 ml 30 % (v/v) Glycerin, 2,5 ml 24 % (v/v), 2,5 ml 17 % (v/v) und 2,5 ml 10 % (v/v). Über Nacht bildet sich bei 4 °C ein annähernd linearer Gradient aus. 250 μ l (entspricht bis zu 3,5 mg) des aufzutrennenden jeweils frisch hergestellten, kein Glycerin enthaltenden, S100-Extrakts (3.10.3.) werden vorsichtig auf die Flüssigkeitsoberfläche des Gradienten geschichtet und umgehend die Ultrazentrifugation bei 141 000 x g gestartet (Beckmann L8-55; Rotor SW 41; 28 000 Upm, 4 °C; 34 h). Um Erschütterungen beim Abbremsen zu vermeiden, wird die Luftbremse abgeschaltet. Der Gradient wird vom Boden des Röhrchens her durch Abpumpen in 0,5 ml fraktioniert (0,5 ml/min). Abschließend wird der Brechungsindex jeder einzelnen Fraktion am Refraktometer bestimmt. Um die Linearität des Gradienten zu überprüfen, wird der Brechungsindex der isolierten Fraktionen mit dem der zur Gradientenbildung verwendeten Glycerinlösungen verglichen. Die Fraktionen werden gegen 50 % Glycerin (v/v) in Puffer F+ (3.8.8.2.) dialysiert (3.8.1.1.) und können so mehrere Wochen bei -80 °C gelagert werden. Neben der zu reinigenden Probe werden in separaten Ansätzen Standardproteine (2 Proteine/Gradienten-Röhrchen; je 250 μ g/Protein) aufgetrennt, um die Größe zu analysierender Proteine durch Vergleich bestimmen zu können.

3.10.3. Präparation eines S100-Extrakts

Im Rahmen dieser Arbeit wurden S100-Extrakte aus den Cyanellen von *C. paradoxa* (3.11.5.), sowie aus Zellen von *E. coli* DH5 α (3.11.1.1.), *B. subtilis* MB8 (3.11.2.) und *Synechocystis* PCC 6803 (3.11.3.) hergestellt. Im Folgenden soll die Präparation eines *C. paradoxa* S100-Extrakts detailliert beschrieben werden. Das Vorgehen zur Herstellung von Extrakten aus Bakterien ist nahezu identisch, allerdings wird beim Aufschluss nur mit den halben Volumina gearbeitet. Alle Arbeitsschritte werden auf Eis ausgeführt.

Die Cyanellen von zwei Ernten (je 6 l-Suspensionskultur; 3.11.5; bzw. ca. 10 g Bakterienmasse) werden vereinigt und in einem sterilen, über Nacht auf -20 °C vorgekühlten Mörser mit dem gleichen Volumen Seesand gründlich zerrieben. Während des manuellen Aufschlusses werden portionsweise etwa 10 ml Puffer F+ (auf Eis vorgekühlt; 3.8.8.2.) zugegeben und weiter zerrieben, bis keine Cyanellenklümpchen mehr sichtbar sind. Das Gemisch wird in ein 15 ml-Corex-Röhrchen überführt, wobei Sand möglichst vermieden werden sollte. Nach Zentrifugation (Sorvall RC5-B, Rotor SS34, 8000 Upm, 15 min, 4 °C) wird der Überstand durch einen Faltenfilter in ein 15 ml PP-Schraubdeckelröhrchen überführt. Das Filtrat wird in ein Polycarbonat-Ultrazentrifugenröhrchen eingefüllt und ultrazentrifugiert (Beckmann L8-55; Rotor Ti 50, 40 000 Upm, 1 h, 4 °C). Der Überstand wird abgenommen, in einen vorbereiteten Dialyseschlauch gefüllt und unter zweimaligem Pufferwechsel bei leichtem Rühren über Nacht gegen je 1 l Puffer F+ (3.8.8.2. mit RNasin 1 U/10 ml) dialysiert.

Der erhaltene S100-Extrakt wird in 1,5 ml Reagiergefäße, deren Deckel mit 2-3 Nadelstichen durchbohrt sind, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Extrakte werden bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert. Der Proteingehalt der S100-Präparation wird durch einen Bradford-Test (3.8.2.1.) bestimmt. In der Regel behalten die S100-Extrakte ihre RNase P-Aktivität über eine längere Zeitspanne.

3.10.4. Silanisieren von Plastikgefäßen

Um Verluste durch Adsorptionseffekte an der Oberfläche von Plastik- oder Glasgefäßen zu minimieren, werden diese silanisiert. Alle Arbeitsschritte werden unter einem Abzug ausgeführt, da das verwendete Dichlormethylsilan hochflüchtig und giftig ist. Die zu silanisierenden Gegenstände werden neben einem 10 ml Becherglas, welches 1 ml Dichlormethylsilan enthält, in einem Exsikkator platziert. Anschließend wird der Exsikkator solange evakuiert, bis das Dichlormethylsilan seinen Siedepunkt erreicht hat. Der Glashahn am Exsikkator wird geschlossen und erst wieder geöffnet, wenn alles Dichlormethylsilan verdampft ist. Die Plastikgefäße sind nun vollständig silanisiert und können autoklaviert werden.

3.11. Kultivierung von Algen und Bakterien

3.11.1. Kultivierung von *E. coli*

3.11.1.1. Kultivierung von *E. coli* in Flüssigkultur

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgt im Allgemeinen in LB-Medium. Die Bakterienkultur wird, soweit nicht anders angegeben, bei der für *E. coli*-Zellen optimalen Temperatur von 37 °C bei 150 Upm (Infors Inkubationsrundschtüttler HT) geschüttelt. Zur Kontrolle des Wachstums kann die Zelldichte durch Messen der Absorption bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt werden.

LB-Medium	
Bacto-Hefe-Extrakt	0,5 (w/v)
Bacto-Trypton	1,0 (w/v)
NaCl	0,5 (w/v)

Plasmid-transformierte *E. coli*-Zellen verfügen über eine vom Plasmid abhängige Antibiotikaresistenz. Zur Selektion auf plasmid-tragende Zellen werden der Kulturlösung die entsprechenden Antibiotika zugesetzt:

Plasmid	codierte Antibiotikaresistenz	Endkonzentration in Kulturlösung ($\mu\text{g/ml}$)	Lösungsmittel für Zusatz
PUC19	Ampicillin	100	ddH ₂ O
PQE-30	Ampicillin	100	ddH ₂ O
pRSETa	Ampicillin	100	ddH ₂ O
pRep-4	Kanamycin	25	ddH ₂ O
pLysS	Chloramphenicol	40	Ethanol
--	IPTG	24 $\mu\text{g/ml}$	ddH ₂ O
--	X-Gal	40 $\mu\text{g/ml}$	Dimethylformamid

Abb. 3-4: Zur Selektion auf positive Klone verwendete Zusätze

3.11.1.2. Kultivierung von *E. coli*-Zellen als Plattenkultur

Zur Herstellung von LB-Agar-Platten wird LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 50 °C erfolgt der Zusatz des entsprechenden Antibiotikums (Abb. 3-4) und das Gießen der Platten unter sterilen Bedingungen. Nach dem Aushärten werden die Platten im Luftstrom einer Sterilbank getrocknet und können dann über mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.

E. coli-Zellen aus Transformationsansätzen (3.7.7.) oder Glycerinkulturen (3.3.4.1.) werden unter sterilen Bedingungen mit dem Drygalski-Spatel bzw. einer Impföse ausgestrichen und je nach *E. coli*-Stamm bis zu 18 h bei 37 °C inkubiert. Die meisten Bakterienkulturen können bei 4 °C über mehrere Wochen als Plattenkultur gelagert werden.

Selektion durch α -Komplementierung

Die pUC-Vektoren verleihen transformierten *E. coli*-Zellen neben der Antibiotikaresistenz noch ein weiteres Selektionskriterium. Die Polylinker-Region des Plasmids liegt im Leserahmen des α -Peptids der β -Galactosidase. Enthält das pUC-Plasmid kein Insert, so bleibt das *LacZ*-Gen, welches den N-Ter-

minus der β -Galactosidase codiert, intakt. Das Bakterium kann nach IPTG-Induktion durch intra-allelische Komplementation der chromosomalen, defizienten Kopie des *LacZ*-Gens das Farbstoffvorläufermolekül X-Gal spalten. Die Bakterienkolonie färbt sich blau. Durch Ligation von Fremd-DNA in das *LacZ α* -Gen ist diese Komplementation nicht mehr möglich und die Bakterienkolonie bleibt farblos. Die Selektion auf α -Komplementierung setzt den Zusatz von IPTG und X-Gal zum LB-Agar voraus (Abb. 3-4).

3.11.2. Anzucht von *Bacillus subtilis* in Flüssigkultur

Die Anzucht der *B. subtilis* Zellen erfolgte in Landy-Medium Hierzu werden die Zellen auf Landy-Agarplatten ausgestrichen und 72 h bei 30 °C inkubiert. Mit einer Vorkultur (30 °C über Nacht; 200 Upm) wird eine 500 ml Hauptkultur angelegt und 8 h unter Schütteln (Infors Inkubationsrundschüttler HT, 200 Upm) bei 30 °C inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation (Beckman J-6B, 15 min, 4000 Upm, 4 °C) geerntet, das Zellsediment in TE (pH 7,2; 3.1.4.1.) und Glycerin (Endkonzentration 15 %) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Sie können bis zur Weiterverarbeitung (3.10.3.) mehrere Monate bei -80 °C gelagert werden.

Landy-Medium

Lösung A:	Einwaage/l
Glutaminsäure	5,0 g
Phenylalanin	2,0 g
Bacto-Hefe-Extrakt	1,0 g
4,5 mM MnSO ₄ x 4H ₂ O	500 µl
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Strammlösung?
KCl	
4 mM CuSO ₄ x 5H ₂ O	16 µl
4 mM FeSO ₄ x 7H ₂ O	15 µl

-ad ddH₂O 900 ml; autoklavieren-

Lösung B:	Einwaage/100 ml
Glucose	20 g
KH ₂ PO ₄	1 g

-ad ddH₂O 100 ml; steril filtrieren-

-Lösungen A und B in sterilem Gefäß

vereinigen-

Landy-Agarplatten

-siehe Landy-Medium + 1,6 % Agar

3.11.3. Anzucht und Ernte von *Synechocystis* PCC 6803 in Flüssigkultur und auf Agarplatten

Die Kulturen werden bei Zimmertemperatur bis 32 °C gehalten; Temperaturen über 37 °C schädigen sie (Waterbury und Stanier, 1981).

Zur Isolation von *Synechocystis* lässt man die Cyanobakterien in 2 l Erlenmeyerkolben in jeweils 500 ml Kulturen bis zur Sättigung heranwachsen (ca. 3-4 Tage). Danach werden die Bakterien durch Zentrifugation (Beckman J-21, Rotor JA10, 7000 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet. Der Überstand wird

verworfen und das Zellsediment in TE (pH 7,2; 3.1.4.1.) und Glycerin (Endkonzentration 15 %) aufgenommen. Die Bakterien können über mehrere Monate bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

BG-11 Medium für Flüssigkulturen

	Volumen/1000 ml
100x BG-FPC	10 ml
Na ₂ CO ₃ -Stammlösung	1 ml
K ₂ HPO ₄ -Stammlösung	1 ml
Eisenammoniumcitrat	1 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

-autoklavieren;

es kann sich weißer Niederschlag bilden-

BG-11 Medium für Agarplatten

2x Salzlösung	Menge/500 ml	2x Agar	Menge/500 ml
100x BG-FPC	10 ml	Agar	15 g
Na ₂ CO ₃ -Stammlösung	1 ml	ddH ₂ O	ad 500 ml
K ₂ HPO ₄ -Stammlösung	1 ml		
Eisenammoniumcitrat	1 ml		
1 M TES-KOH; pH 8,2	10 ml		
ddH ₂ O	ad 500 ml		

-beide Lösungen autoklavieren; auf 55 °C abkühlen lassen, steril mischen und dann Platten gießen-

100x BG-FPC

	Einwaage [g/1000 ml]
NaNO ₃	149,58 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	7,49 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	3,60 g
Zitronensäure	0,600 g
0,25 M Na ₂ EDTA; pH 8,0	1,12 ml
Spurenelemente	100 ml

Spurenminerale für 100x BG-FPC

	Einwaage [g/1000 ml]
H ₃ BO ₃	2,860 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	1,810 g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,2200 g
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,3900 g
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,0790 g
Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O	0,0494 g

Na₂CO₃-Stammlösung

Na₂CO₃ | 189 mM

K₂HPO₄-Stammlösung

K₂HPO₄ | 175 mM

Eisenammoniumcitrat

C₆H₈O₇-Fe-N₄H | 6 mg/ml

3.11.4. Anzucht von *Cyanophora paradoxa* in Flüssigkultur

Cyanophora paradoxa (Stamm PCCC 7201) wird in steril belüfteten 1,5 l Flüssigkulturen bei Raumtemperatur in Staniers Medium (Herdmann und Stanier, 1977) kultiviert. Hierzu werden 3 l und 5 l Suspensions-Zellkulturflaschen verwendet. Eine 10 ml Glaspipette ragt durch einen durchbohrten Wattestopfen, der die zentrale Flaschenöffnung verschließt, in die Kultur. Durch diese Glaspipette wird mit Hilfe einer Aquariumpumpe die Kultur belüftet. Durch drei seriell angeordnete Filtersysteme wird die zugeführte Luft entkeimt: Ein in die Aquariumpumpe integrierter Partikelfilter bildet das erste Filtersystem; als zweites Filtersystem dient ein bakteriendichter Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm); ein dicht gepackter Wattebausch, der direkt in den Pipettenschaft eingebracht wird, bildet das dritte System. Die Menge der zugeführten Luft kann über Schlauchklemmen bzw. durch Hähne am Verteilerrechen reguliert werden. Staniers Medium wird ohne Vitaminmix in der Suspensions-Zellkulturflasche mit Stopfen und Pipette, die sorgfältig mit Aluminiumfolie umwickelt wurden, autoklaviert (60 min, 120 °C). Unter der Sterilbank wird das Medium mit den Vitaminen supplementiert

und mit etwa 75 ml/1,5 l Medium einer dicht gewachsenen Kultur *C. paradoxa* (ca. 2×10^6 Zellen/ml) durch die seitliche Flaschenöffnung angeimpft. Die Kultur benötigt zwei bis drei Wochen, um in die stationäre Wachstumsphase zu gelangen. Die Zellen werden geerntet, wenn eine durchschnittliche Zellzahl von 6×10^9 Zellen/ml erreicht wird. Die Kultur wird von sechs Warmton-Leuchstoffröhren (Osram L15W/25) bei 1000 lx in einem Abstand von 50 cm täglich 16 h beleuchtet.

Staniers Medium (1 l)

25 ml 40x SM
 25 ml 40x CyII
 1 ml Spurenelementlösung
 2,5 g Casamino Säuren
 2,5 g D(+)-Saccharose
 125 µl Vitaminmix
 ad 1 l ddH₂O

40x CyII

	Konzentration	Einwaage/l
CaCl ₂	19,6 mM	2,18 g
KCl	16 mM	1,19 g
FeCl ₃	59,2 mM	9,60 g
β-Glycerophosphat pentahydrat	20,4 mM	4,41 g

40x SM

	Konzentration	Einwaage/l
Tris-HCl; pH 7,6	98,8 mM	12,3 g
NH ₄ OAc	114 mM	8,79 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	16 mM	3,94 g

Spurenelementlösung

	Konzentration	Einwaage/100 ml
H ₃ BO ₃	46,3 mM	0,286 g
Mn(II)Cl ₂ x 2H ₂ O	9,1 mM	0,147 g
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	77,2 mM	2,22 g
(NH ₄) ₂ Mo ₄	1,6 mM	0,067 g
CuSO ₄ x 5H ₂ O	31,6 mM	78,8 g
Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O	16,9 mM	0,492 g

Vitaminmix

	Konzentration	Einwaage/10 ml
Cyanocobalamin (B ₁₂)	6 µM	80 µg
Thiamin-HCl (B ₁)	23,7 µM	79,9 µg
α-Biotin (B ₇)	32,7 µM	80 µg

3.11.5. Isolierung von Cyanellen aus *C. paradoxa*

Zur Isolierung von Cyanellen aus *C. paradoxa* werden 6 l Suspensionskultur geerntet. Die Zellen werden in 500 ml Zentrifugengefäßen sedimentiert (Beckman J2-21, Rotor JA10, 7000 UpM, 10 °C, 15 min). Der Überstand wird abdekantiert und verworfen. Die Zellsedimente werden mit einem Ionenbesen behutsam in je 5 ml TE-Puffer (pH 7,5; 3.1.4.1.) resuspendiert und in einem 50 ml PP-Röhrchen vereinigt. Um die Cyanellen aus den Zellen zu isolieren, wird die Zellsuspension mit Triton X-100 bis zu einer Konzentration von 1 % (v/v) versetzt (Stanes *et al.*, 1985). Durch das nicht-ionische Detergenz wird die strukturelle Einheit von Phospholipidmembranen wie der Zellmembran oder den Mitochondrien- und Kerndoppelmembranen zerstört, während die Cyanellen aufgrund ihrer Peptidoglykanschicht gegen Zersetzung resistent sind. Durch die Zellyse kommt es so zur Freisetzung der intakten Cyanellen. Diese werden durch Zentrifugation (Beckman TJ-6, 3000 UpM, 10 min, 4 °C)

von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Das Cyanellenpellet wird in flüssigem N₂ schockgefroren und kann mehrere Jahre bei -80 °C gelagert werden.

3.12. Prozessierung von Vorläufer-tRNA durch RNase P

RNase P ist ein Enzym, welches an der Reifung von Vorläufer-tRNA (pre-tRNA) durch Abspaltung der 5'-Flanke beteiligt ist. Durch homologe und heterologe Rekonstitution rekombinanter RNase P Proteine und diverser RNase P-RNAs zum funktionsfähigen Holoenzym können durch Messung der Substratumsätze Aussagen über Kompatibilität von Protein- zu RNA-Untereinheit oder auch zur Substraterkennung getroffen werden.

Als Substrate zur Untersuchung der katalytischen Aktivität dienen *in vitro* hergestellte pre-tRNAs (3.5.). Durch RNase P wird die 5'-Flanke dieser Substrate endonukleolytisch abgespalten. Zur Bestimmung des Substratumsatzes wird das Substrat/Produkt-Verhältnis nach einem Aktivitätstest am PhosphoImager aus dem Autoradiogramm ermittelt.

3.12.1. *In Vitro* Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P-RNA

Als in trans-agierendes Ribozym ist bakterielle RNase P-RNA unter bestimmten Salzbedingungen *in vitro* katalytisch aktiv (Guerrier-Takada *et al.*, 1983). Diese Reaktion ist stark von mono- und divalenten Kationen (NH⁴⁺, Mg²⁺) abhängig.

***In vitro* RNase P-RNA Ribozym-Reaktion**

Reaktionsansatz	Endkonzentration
RNase P-RNA	10-100 nM
1 µl pre-tRNA (5000 cpm + 50 ng)	2,5 ng/µl
Puffer	ad 20 µl

Das Ribozym wird im entsprechenden Puffer auf Eis vorgelegt. Die Reaktion wird durch Zugabe des Substrats gestartet und bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen dienen folgende Ansätze:

- Substrat in Reaktionspuffer ("Pufferkontrolle");
- Substrat mit M1 RNase P-RNA in Hochsalzpuffer ("Prozessierungskontrolle")
- Substrat und RNase P-RNA in Niedrigsalzpuffer ("RNA-Kontrolle")

Zur Bestimmung der RNase P-RNA Aktivität werden drei Standardpuffer (P1, P2 und P3) verwendet. Zur Erfassung der optimalen Reaktionsparameter einer RNase P-RNA werden für Mg²⁺ (0-500 nM) und NH₄⁺ (0-5 M) Konzentration-Aktivitätskurven ermittelt.

	Puffer P1	Puffer P2	Puffer P3
Tris-HCl	50 mM	50 mM	50 mM
NH ₄ Cl	2 M	3 M	3 M
MgCl ₂	250 mM	250 mM	25 mM
pH	8,0	8,0	8,0

Nach der Reaktion wird der Ansatz mit EtOH präzipitiert (3.3.1.) und getrocknet. Das Sediment wird in 10 µl Harnstoffpuffer aufgenommen und nach Hitzedenaturierung (94 °C, 2 min) zur Analyse auf ein 10 % PAA-Gel (Gelmaße: 20 x 20 x 0,04 cm) aufgetragen (3.1.2.). Die Elektrophorese wird solange durchgeführt, bis BPB den unteren Gelrand erreicht hat.

Die Reaktionsprodukte werden auf einem Röntgenfilm oder im PhosphoImager sichtbar gemacht und quantifiziert (3.1.3.3.).

3.12.2. Homologe und Heterologe Rekonstitution

Aus aufgereinigten rekombinanten RNase P-Proteinen (3.9.) und *in vitro* transkribierten RNase P-RNAs (3.5.) kann katalytisch aktives homologes bzw. heterologes Holoenzym rekonstituiert werden.

Homologe und heterologe Rekonstitution

Rekonstitutionsansatz (9 µl)	Endkonzentration
RNase P-Protein	10-250 nM
RNase P-RNA	10-50 nM
Puffer F	ad 9 µl

Puffer F

Tris-HCl; pH 7,0	20 mM
KCl	130 mM
MgCl ₂ x 6H ₂ O	15 mM

Der Ansatz wird 10 min bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 36 µl Puffer F verdünnt (1:5). Von diesem Ansatz werden direkt 9 µl pro Prozessierungsreaktion eingesetzt. Die optimalen Rekonstitutionsbedingungen können dabei stark variieren. Sie sind unter anderem abhängig vom Renaturierungsgrad des verwendeten RNase P-Proteins. Während für rekonstituierte homologe Holoenzyme ein RNase P-RNA : RNase P-Protein Stoffmengenverhältnis von 1:1 angesetzt wird, muss der Proteinanteil in heterologen Systemen auf bis 1:5 erhöht werden.

3.12.3. *In-Vitro* Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P Holoenzyme

3.12.3.1. Prozessierung von pre-tRNA durch rekonstituiertes RNase P Holoenzym

Pro Zeitwert bzw. Umsatzreaktion wird folgender Ansatz verwendet:

Prozessierungsreaktion mit rekonstituiertem Holoenzym

Prozessierungsansatz (10 µl)

9 µl Rekonstitutionsansatz (3.12.2)

1 µl pre-tRNA (5000 cpm + 50 ng)

Das Substrat wird zum vorgelegten Rekonstitutionsansatz (3.12.2.) zugegeben. Die Reaktion wird, abhängig vom eingesetzten Enzym, bei 28-37 °C inkubiert. Die Reaktionszeit ist von Holoenzym und Zweck der Prozessierungsreaktion abhängig: soll maximaler Umsatz erreicht werden, beträgt die Reaktionszeit 2 h. Als Kontrollen dienen dabei immer die unter (3.12.1.) beschriebenen Ansätze zuzüglich einer "Proteinkontrolle" (Substrat mit RNase P-Protein). Die Probe wird nach der Reaktion phenolisiert (3.3.3.), mit EtOH gefällt (3.3.1.) und wie unter 3.12.1. weiter aufgearbeitet.

3.12.3.2. In-Vitro Prozessierung von pre-tRNA durch RNase P-Enzympräparationen

Die Detektion auf RNase P-Prozessierungsaktivität in Extrakten (Cyanellen, *E. coli* etc.) oder partiell gereinigten Enzymfraktionen wird unter nachfolgenden Bedingungen durchgeführt. Hierzu werden je nach Qualität der verwendeten Extrakte bis 25 µg Extrakt eingesetzt. Die Enzympräparation wird vor dem Test stets gegen Puffer F bzw. F+ (3.8.1.2.) dialysiert.

Prozessierungsreaktion mit nativem Holoenzym

Reaktionsansatz (10 µl)

9 µl Enzympräparation

1 µl pre-tRNA (5000 cpm + 50 ng)

Der Ansatz wird 60 min bei 32 °C inkubiert. Anschließend wird durch Phenolisierung der Proteinanteil abgetrennt und die wässrige Phase mit EtOH gefällt (3.3.1.). Mit der Probe wird dann wie unter (3.12.1.) beschrieben verfahren.

3.13. Erstellung einer cDNA-Bibliothek aus *Cyanophora paradoxa* im "Uni-ZAP® XR" Vektor-System

Komplementäre DNA (cDNA) Bibliotheken geben die vollständige mRNA Population einer Zelle oder eines Gewebes wieder. Nach der Präparation einer cDNA-Bank kann diese unbegrenzt aufbewahrt und mehrfach wiederverwendet werden. mRNA-Präparationen sind im Allgemeinen sehr labil und in ihrer natürlichen Form nur relativ umständlich zu amplifizieren. Die mRNA wird deshalb in die stabilere Form der doppelsträngigen cDNA umgeschrieben und in ein Vektorsystem kloniert. In dieser Arbeit wurde hierzu der vom λ-Phagen Uni-Zap® XR-Vektor abgeleitete *ZAP-cDNA® Synthesis Kit* sowie der *Gigapack III Gold Cloning Kit* der Firma Stratagene verwendet. Dabei wurden alle Schritte, soweit nicht anders beschrieben, gemäß der Herstellervorschrift durchgeführt.

Das Uni-Zap® XR-Vektor-System wurde vom λ-Phagen abgeleitet und kombiniert dessen Effizienz mit allen Vorteilen eines zur Blau-Weiß-Selektion ausgelegten Plasmid-Systems. Uni-Zap® XR wird vom Hersteller bereits *EcoRI/XhoI* geschnitten geliefert und kann DNA-Fragmente bis zu 10 kb aufnehmen. Durch *in vitro* Verpackung der rekombinanten Phagen-DNA in Phagenpartikel und anschließender Infektion der entsprechenden Bakterienzellen bietet der Vektor eine besonders hohe Transformationseffizienz. Das Vektorsystem kann sowohl für Immuno- als auch Nukleinsäurescreening-Methoden eingesetzt werden und ermöglicht die *in vivo* Exzision des Plasmids

pBluescript® Phagemid durch einen Helfer-Phagen. Neben T3 und T7 Promotoren verfügt das Phagemid über einen *lacZ* Promotor zur Expression rekombinanter Proteine.

Als Ausgangsmaterial für die Erstellung einer cDNA-Bibliothek in Uni-Zap® XR werden mindestens 5 µg reine mRNA benötigt, für deren Präparation wiederum mindestens 250 µg Gesamt-RNA isoliert werden müssen (3.3.5.).

3.13.1. Synthese doppelsträngiger cDNA

Die cDNA-Synthese erfolgt mit Hilfe des *ZAP-cDNA® Synthesis Kit* der Firma Stratagene. Die einzelnen Reaktionsschritte werden soweit nicht anders angegeben streng nach Herstellervorschrift durchgeführt.

Erststrang-Synthese

Die Synthese des ersten Strangs der cDNA erfolgt mit Hilfe der reversen Transkriptase aus MMLV (Moloney Maus Leukämie Virus). Dabei wird als Startsequenz ein Oligonukleotid verwendet, welches über eine Oligo-dT-Sequenz, an die 3'-poly(A)-Region der als Matrize fungierenden mRNA hybridisieren kann. Zusätzlich enthält die Startsequenz eine *Xho*I-Schnittstelle, um die gerichtete Klonierung zu ermöglichen.



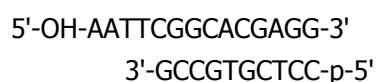
Die bei der Reaktion eingesetzte dNTP-Mischung enthält neben dATP, dGTP, dTTP, 5-Methyl-dCTP, so dass jedes eingebaute Cytosin methyliert ist. Dadurch ist die synthetisierte cDNA bei den folgenden Klonierungsschritten vor Restriktionsspaltung geschützt.

Zweitstrang-Synthese

Während der Synthese des komplementären zweiten cDNA-Strangs werden durch die Zugabe von RNase H Einzelstrangbrüche in der RNA gesetzt. Hierdurch entsteht eine Vielzahl von RNA-Fragmenten, die ihrerseits als Startsequenzen für nun verwendete DNA Polymerase I dienen. Um die Wahrscheinlichkeit einer Methylierung des Zweitstrangs zu minimieren, enthält die verwendete dNTP-Mischung unmethylierte Desoxynukleotide. Die überhängenden Enden der cDNA werden schließlich durch *Pfu* DNA-Polymerase aufgefüllt. Zur Möglichkeit einer späteren Lokalisierung der cDNA-Fragmente während ihrer Aufreinigung werden dem Ansatz zusätzlich 2 µl [α -³²P] dATP ($3,7 \times 10^5$ Bq/µl) zugesetzt.

Ligation der EcoR I Adaptoren

Die gerichtete Klonierung der cDNA Fragmente in den Uni-Zap® XR-Vektor erfordert neben der *Xho*I-Erkennungssequenz die Anwesenheit einer weiteren Restriktionsschnittstelle. Aus diesem Grund werden kurze zueinander komplementäre Oligonukleotide (Adaptoren) an die cDNA ligiert, welche die *Eco*R I-Erkennungssequenz als überhängende Enden besitzen:



Dabei ist das 14-mere Oligonukleotid am 5'-Ende dephosphoryliert, während das 10-mere Oligonukleotid phosphoryliert vorliegt. Dies ermöglicht die Ligation der Oligomere an die glatten Enden der cDNA, während eine Ligation an kohäsive Enden verhindert wird.

Um eine Ligation in den dephosphorylierten Uni-Zap® XR-Vektor zu ermöglichen müssen, nach der Ligation dieser *Eco*R I-Adaptoren die 5'-Enden abschließend phosphoryliert werden. Durch die folgende *Xho*I-Restriktionsspaltung wird die entsprechende überhängende Sequenz freigesetzt. Die Reaktionsprodukte werden mit EtOH präzipitiert (3.3.1.) und in 14 µl STE-Puffer aufgenommen.

10x STE-Puffer

Tris-HCl; pH 7,5	200 mM
NaCl	1 M
EDTA	100 mM

Abtrennung von nicht eingebauten Oligonukleotiden durch Gelpermeationschromatographie

Die Ligation der wie beschrieben vorbereiteten cDNA in den Uni-Zap® XR-Vektor kann durch die Anwesenheit der Startsequenzen und ungebundener *Eco*R I-Adaptoren aus den vorhergehenden Reaktionen behindert werden. Die nicht eingebauten Oligonukleotide werden deshalb mittels Gelpermeationschromatographie abgetrennt.

Als Säulenmaterial wird mit 1x STE-Puffer äquilibrierte Sepharose CL-2B verwendet. Die Säulenmatrix wird in eine mit steriler Watte abgedichtete 1 ml Einwegpipette bis etwa 1 cm unterhalb des Pipettenrands eingefüllt. Nach einem weiteren Äquilibrierungsschritt mit 600 µl STE-Puffer wird die cDNA Präparation direkt aufgetragen und fünfzehn Fraktionen zu je etwa 100 µl (3 Tropfen) gesammelt. Jeder Fraktion wird anschließend ein Aliquot von 8 µl entnommen und zur cDNA-Längenbestimmung auf einem 5 % nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel (3.1.2.) aufgetrennt. Die Visualisierung der cDNA-Fragmente wird durch den radioaktiv markierten Zweitstrang möglich und erfolgt durch mehrstündige Exposition eines Röntgenfilms (3.1.3.3.). Die cDNA-Fraktionen werden größenabhängig vereinigt und durch EtOH präzipitiert (3.3.1.). Nach Zentrifugation (Kontron-Hermle ZK 400, 15 000 Upm, 60 min, 4 °C) wird das Pellet 2 mal mit eiskaltem 80 % EtOH gewaschen und im Vakuumrotationsverdampfer getrocknet. Zur Wiederfindungskontrolle werden alle Waschlösungen im Szintillationszähler auf Radioaktivität überprüft.

3.13.2. Ligation der cDNA in Uni-ZAP® XR und Verpackung rekombinanter cDNA in λ-Phagen

Die Ligation der cDNA in den Uni-ZAP® XR-Vektor erfolgt bei 4 °C über 48 h. Der Ansatz wird direkt anschließend nach Herstellervorschrift zu Phagen-Partikeln verpackt (ZAP-cDNA Gigapack III Gold) und zur Bestimmung der Transformationseffizienz titriert. Zügiges Arbeiten ist hierbei von entscheidender Bedeutung. Zur Bestimmung der Ligations- und Transformationseffizienz wird der Phagen-Extrakt titriert.

Zur Titerbestimmung werden 2 µl des frisch verpackten Phagen-Extrakts mit 200 µl *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellsuspension (3.13.5.) vermischt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 3 ml NZY-Top-Agar (42 °C), 15 µl 0,5 M IPTG und 50 µl X-Gal (250 mg/ml) und vorsichtigem Durchmischen,

wird die Lösung zügig auf vorgewärmte LB-Platten (37 °C) gegossen. Nach Aushärten des Top-Agars werden die Platten gewendet und 6-9 h bei 37 °C inkubiert. Mit Sichtbarwerden der Plaques können diese gezählt und so der Titer der primären cDNA-Bank bestimmt werden. Der Titer der Phagen-cDNA-Bank wird unter Berücksichtigung des jeweiligen Verdünnungsfaktors in *pfu* pro ml (*plaque forming units*) angegeben. Die Phagen blau gefärbter Plaques tragen Leervektoren, während weiße Plaques rekombinant sind. Der Anteil der blauen Plaques sollte mindestens um den Faktor 100 geringer sein als der Anteil weißer Plaques.

NZY-Medium	
	Einwaage/1000 ml
NZ Amin (Casein Hydrolysat)	10 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,0 g

NZY-Top-Agar
Siehe NZY-Medium + 0,7 % Agarose (w/v)

NZY-Agar-Platten
Siehe NZY-Medium + 1,5 % Agar (w/v)

3.13.3. Amplifikation und Titerbestimmung der sekundären λ -cDNA-Bibliothek

Primär erstellte cDNA-Bibliotheken in λ -Phagen sind instabil. Aus diesem Grund wird immer ein Amplifikationsschritt zu einer sekundären, stabilen Bibliothek durchgeführt. Dieser Arbeitsschritt erfolgt bis auf leichte Abwandlungen grundsätzlich nach Herstellervorschrift. Die Phagen-Suspension wird mit entsprechend vorbehandelten *E. coli* XL1-Blue MRF' Zellen (3.13.5) 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien-Phagen-Mischung wird mit der vorgewärmten Agar-Lösung (45 °C) vermischt und sofort auf frischen, ebenfalls vorgewärmten LB-Platten (37 °C) verteilt (ca. 50 000 *Pfu*/ 13,5 cm Ø Platte). Nach dem Aushärten der Agarose-Lösung werden die Platten bis zum Sichtbarwerden der Plaques 6 bis 8 h bei 37 °C inkubiert. . Anschließend werden sie mit 10 ml SM-Puffer überschichtet und um die Diffusion der Phagen in den Puffer zu ermöglichen, über Nacht bei 4 °C sanft geschüttelt. Die Phagen-Suspension wird abgenommen und jede Platte einmal mit 2 ml SM-Puffer nachgewaschen. Die Phagenlösungen werden vereinigt und mit 5 % (v/v) Chloroform versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur werden die Zellreste durch Zentrifugation (Beckman Kühlzentrifuge, CL-TJ6R, 500 g, 30 min, 4 °C) abgetrennt. Nachdem der Überstand mit Chloroform versetzt wurde (0,3 % (v/v)), kann er bei 4 °C gelagert werden. Ein Aliquot der amplifizierten Phagen-Bibliothek wird mit DMSO (7 % (v/v)) versetzt und kann so über eine lange Zeit bei -80 °C gelagert werden.

Verdünnungen der Phagen-Suspension im Bereich von 1:10³ bis 1:10⁷ werden zur Titerbestimmung der amplifizierten Bibliothek verwendet (3.13.2.).

SM (storage medium)-Puffer (für λ -Phagen)	
	Menge/1000 ml
NaCl	5,8 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	2,0 g
Tris-HCl (1 M); pH 7,5	50 ml
2 % (v/v) Gelatine	5 ml
ddH ₂ O	ad 1000 ml

3.13.4. Verwendung des *E. coli*-Stammes XL1-Blue MRF'

Die Verwendung des *E. coli*-Wirtstammes XL1-Blue MRF' stellt für das Expressions-*Screening* der Phagen-cDNA-Bibliothek eine unerlässliche Notwendigkeit dar. Da dieser Bakterienstamm McrA⁻ (Methylase C-Restriktion A), McrB⁻ (Methylase C-Restriktion B) und RecA⁻ (Rekombinase A) defizient ist, wird sowohl der Abbau der methylierten Fremd-cDNA durch das *E. coli*-Reperatursystem als auch seine Integration ins Zellgenom verhindert. Das konjugative Plasmid (F'-Episom) dieses *E. coli*-Stammes bietet zudem eine Reihe weiterer wichtiger Vorteile:

Das $\Delta M15$ *lacZ*-Gen, welches auf dem F'-Episom lokalisiert ist, kann nach dem Prinzip der α -Komplementierung zur Selektion von rekombinanten Klonen genutzt werden. Nichtrekombinante Klone lösen dabei nach Zugabe von X-Gal zum Plattenmedium eine blaue Farbreaktion aus (3.11.1.2.). Durch Codierung für den *lac*-Repressor wird eine vorzeitige, unter Kontrolle des *lacZ*-Promotors stehende, Transkription der cDNA Gene verhindert. Deren Transkription wird durch Zugabe von IPTG induziert. Zusätzlich codieren Gene des F'-Episoms für F-Pili, welche für die Infektion der Zellen mit filamentösen Phagen (z.B. ExAssist-Helferphage) essentiell sind. Da das Episom eine für die Prolinbiosynthese essentielle Region des *pro*-defizienten Wirts komplementiert, kann außerdem in Minimalmedium gegen den Verlust dieses Plasmids selektiert werden.

3.13.5. Vorbereitung einer *E. coli* XL1-Blue MRF'-Bakterienstamm-Suspension

Zur Bereitung der Bakteriensuspension wird ein Klon einer frischen Plattenkultur (LB-tet) in 50 ml LB-Medium, welches zusätzlich mit Maltose (0,2 % (w/v)), MgSO₄ (10 mM) und Tetracyclin (12,5 μ g/ml) supplementiert wurde, unter ständiger Wachstumskontrolle bei 37 °C geschüttelt. Durch die Zugabe von Maltose wird in den Bakterien die Expression des *lamB*-Rezeptors induziert, der von infektiösen λ -Phagen in Anwesenheit von Mg²⁺-Ionen zur Absorption an das Wirtsbakterium verwendet wird. Nach etwa fünf Stunden hat die Suspension eine optische Dichte von 0,6-0,8 erreicht und die Zellen werden durch Zentrifugation (Beckman Kühlzentrifuge, 500 g, 4 °C, 10 min) geerntet. Die Zellen werden in 10 mM MgSO₄ aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und eine optische Dichte von 0,5 eingestellt. Die Bakteriensuspension ist bei 4 °C maximal eine Woche ohne Einbußen in der Effizienz der Zellen haltbar.

3.13.6. Bakteriophagen-Infektion und Ausplattieren des *E. coli* XL1-Blue MRF'-Stamms

Pro NZY-Platte (\varnothing 13,5 cm) werden 600 μ l der *E. coli* XL1-Blue MRF'-Stammlösung (3.13.5.) mit 1 μ l Phagenlösung, die zuvor in SM-Medium auf 50 000 *pfu*/ μ l eingestellt wurde, in einem Mikroreagiergefäß gemischt und zur Adsorption der Phagen an die Bakterien für 15 min bei 37 °C inkubiert. Währenddessen werden pro NZY-Platte 7,5 ml NZY-Top-Agar in Glasröhrchen gefüllt und im Heizblock bei 45 °C gehalten. Gleichzeitig werden die getrockneten NZY-Platten bei 37 °C im Brutschrank vorgewärmt. Anschließend wird die Phagen-Bakterien-Suspension zur vorgewärmten NZY-Top-Agar-Lösung gegeben, gut vermischt und zügig auf den NZY-Platten verteilt. Die Platten werden für etwa 7 bis 9 h bei 37 °C inkubiert, sodass die Plaques gerade sichtbar werden. Nachdem die LB-Platten mit Parafilm luftdicht verschlossen wurden, können sie bis zum *Screening* mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden.

3.13.7. Induktion der Phagen-gekoppelten cDNA-Expression

Für das *Screening* der cDNA-Bibliothek muss das Plaque-Muster von der LB-Agar-Platte auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden. Die Menge an übertragenem Protein in einem Phagen-Plaque ist abhängig von der Expression des Gens und der Stabilität des rekombinanten Proteins in der Wirtszelle. Die durch die Lyse der Bakterien freigesetzte Proteinmenge (ca. 30-800 pg/Plaque) reicht aber in der Regel aus, um durch spezifische Bindung eines Primär-Antikörpers nachgewiesen werden zu können. Polyklonale Antikörper haben dabei gegenüber monoklonalen Antikörpern den Vorteil, dass sie mehrere Epitope des gesuchten Proteins erkennen können (Mierendorf *et al.*, 1987).

Vor ihrer Verwendung werden die Nitrocellulose-Membranen 10 min in ddH₂O geschwenkt, bei 110 °C für 10 min autoklaviert und unter der Sterilbank getrocknet. Direkt vor dem Auflegen auf die LB-Platten werden diese Filter mit blauem Kugelschreiber numeriert, für 10 min in 10 mM IPTG getränkt und wiederum unter der Sterilbank getrocknet. Zur Expression und Anreicherung der rekombinanten Proteine werden die Filter dann mit einer Pinzette luftblasenfrei auf die bei 4 °C vorgekühlten Platten aufgelegt. Ihre Position wird durch Einstechen mit einer sterilen Kanüle asymmetrisch markiert, um später eine Zuordnung zwischen Autoradiogramm und Plaque-Muster zu ermöglichen. Nach 3-4 h Inkubation bei 37 °C werden die Platten abermals für mindestens 30 min bei 4 °C gekühlt. Die Filter werden dann vorsichtig abgezogen und zweimal je 10 min in 1x PBS gewaschen. Die Platten werden mit Parafilm verschlossen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.13.8. Identifizierung spezifischer Phagen-Klone durch Protein-Protein-Interaktion

Für das immunologische Expressions-*Screening* wird ein durch Inkubation mit *E. coli* XL1-Blue MRF' vorbehandelter (3.8.9.3.), polyklonaler Antikörper verwendet. Die Antikörper-Lösung wird hierfür mit Blockierlösung weiter verdünnt (Endverdünnungen von 1:1000 – 1:25 000 (v/v)) und kann insgesamt zweimal benutzt werden. Die Inkubation der Filter in Blockier-, Antikörper- und Waschlösungen erfolgt, wie unter 3.8.7. beschrieben, in Petrischalen. Dabei werden Arbeitsvolumina von 8 ml bzw. 20 ml für 8,5 bzw. 13,5 Ø cm-Filter benötigt. Zur Detektion über Chemolumineszenz werden schließlich 3 ml bzw. 7 ml Substratlösung eingesetzt. Wird CPSD als Substrat verwendet, läßt sich die Substratlösung nach Filtration einmal wiederverwenden. Die Filter werden einzeln in Haushaltsfolie verpackt und zusammen mit Fluoreszenzmarkern auf einem Röntgenfilm exponiert (3.1.3.3.). Die Dauer der Exposition ist abhängig vom verwendeten Substrat (3.8.7.1. & 3.8.7.2.).

3.13.9. Identifizierung spezifischer Phagen-Klone durch RNA-Protein-Interaktion

Durch eine Reihe von Rekonstituierungsversuchen (3.12.2.) kann die Interaktion zwischen RNase P-Proteinuntereinheiten und ihren homologen, sowie heterologen, RNase P-RNA Untereinheiten gezeigt werden. Auf diesen Kenntnissen aufbauend wurde mit homologer radioaktiv markierter RNase P-RNA ein auf RNA-Protein-Interaktion basierendes *Screening* durchgeführt.

Die [³²P] markierten RNase P-RNAs werden hierzu durch präparative radioaktive Transkription nach 3.5.2. dargestellt. Einem 250 µl Ansatz werden dabei 5 µl [^α³²P]-rGTP zugesetzt.

3.13.9.1. Vorbereitung und Vorhybridisierung der Membran

Bevor die Membran mit RNase P-RNA inkubiert wird, muss sie sehr sorgfältig von Bakterien-Zellresten und locker gebundenen Proteinen gereinigt werden. Dafür werden die Membranen, nachdem sie von den Platten abgezogen wurden (3.13.7.), in einer sterilen RNase-freien Kristallisationsschale mit ca. 25 ml Puffer SRP-A überschichtet. Unter leichtem Schütteln werden die Membranen so viermal 5 min bei 4 °C gewaschen.

Puffer SRP-A

HEPES (1 M); pH 7,9	10 mM	DDT	0,5 mM
KCl	50 mM	Nonidet P-40	0,1 % (v/v)
MnCl ₂	100 mM	Ficoll 400-DL	0,1 % (w/v)
ZnCl ₂	100 mM	Poyvinyl-Pyrrolidin (PVP)	0,01 % (v/v)
Na ₂ EDTA (1 M)	0,1 mM		

Zur Herstellung des Puffers werden alle Zutaten außer HEPES, DTT und Na₂EDTA in ddH₂O aufgenommen, mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt und über Nacht gerührt. Anschließend wird die Lösung durch Autoklavieren sterilisiert. Nach Abkühlen des Puffers werden die restlichen Substanzen in DEPC behandeltem ddH₂O (3.5.1.) entsprechend gelöst, sterilfiltriert und zugegeben.

3.13.9.2. Identifikation RNA-bindender Proteine in einer cDNA-Bank

Das *Screening* der cDNA-Bank zur Identifikation RNA-bindender Proteine erfolgt nach Sägesser *et al.* (1997). Nach der Entfernung der Bakterien-Zellreste werden die Membranfilter durch 30 min Schütteln bei 4 °C in 25 ml Puffer SRP-B vorhybridisiert. Puffer SRP-B entspricht bis auf den Zusatz von 0,1 mg/ml Hefe Träger-RNA in Puffer SRP-A (3.13.9.1.). Hierdurch sollen unspezifische RNA-Bindungsstellen der Bibliotheksproteine abgesättigt werden.

Die Bindung erfolgt mit mindestens 10×10^6 cpm in 25 ml Puffer SRP-B unter Schütteln bei 4 °C über Nacht. Um die RNase P-RNA Transkripte nach der Inkubation auf eventuelle Degradation zu überprüfen, werden 100 µl des Puffers abgenommen und auf einem denaturierenden PAA-Gel analysiert (3.1.2.). Durch die Zugabe von RNasin kann das Ausmaß der Degradation eingeschränkt werden.

Nach der Hybridisierung werden die Filter in vier Schritten mit jeweils 25 ml Puffer SRP-A unter leichtem Schütteln bei 4 °C gewaschen. Anschließend werden die Membranen auf sterilem Whatman-Papier verteilt und für 30 min bei 50 °C getrocknet. Danach werden sie in Haushaltsfolie verpackt und zur Positionszuordnung zusammen mit Fluoreszenzmarkern auf einem Röntgenfilm exponiert (3.1.3.3.). Bei Verwendung einer Verstärkerfolie und Lagerung des Films bei -80 °C kann die Autoradiographie nach 24 h ausgewertet werden.

Puffer SRP-B

Siehe Puffer SRP-A + 0,1 mg Hefe Träger-RNA/ml

3.13.9.3. Präparation der Hefe-Träger-RNA

1 g Hefe-RNA (Sigma R-6625, RNA-typ VI) wird in 10 ml TE-Puffer aufgenommen und mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Hierzu werden 5 mg Proteinase K eingewogen und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dieser Ansatz wird mit 1 Vol. RNase-freiem Phenol/Chloroform extrahiert und mit EtOH präzipitiert (3.3.1.). Die RNA wird sedimentiert (Beckman Kühlzentrifuge, JA13.1, 10 000 UpM, 4 °C, 30 min) und zweimal mit je 2 ml 70 % (v/v) EtOH gewaschen. Das Pellet wird in DEPC-behandeltem ddH₂O (3.5.1.) aufgenommen und auf eine Konzentration von 50 mg/ml eingestellt. Die RNA-Präparation kann über lange Zeit bei -20 °C gelagert werden.

3.13.10. Isolierung potentiell positiver Plaques

Zunächst werden hierzu die Markierungen des Membran-Filters auf den Röntgenfilm übertragen und die Signale den entsprechenden Membranen bzw. NZY-Agar-Platten zugeordnet. Durch Übereinanderlegen von Röntgenfilm und NZY-Platte auf einer Leuchtplatte ist es so möglich, die Plattenbereiche zu lokalisieren, für die ein positives Signal angenommen wird. Die Bereiche werden mit der großen Öffnung einer sterilen Pasteurpipette isoliert und in Mikroreagiergefäße mit 500 µl SM-Puffer überführt. Während der Inkubation bei 4 °C über Nacht diffundieren die Phagenpartikel aus dem Agar in den Puffer. Nach kurzer Zentrifugation (Tischzentrifuge, 500 g, 10 min) wird der Überstand abgenommen und der Titer dieser Phagen-Suspension bestimmt (3.13.3.). Ein Aliquot der Suspension wird zur Lagerung bei -80 °C mit DMSO (7 % (v/v)) versetzt, während ein zweites Aliquot einer erneuten *Screening*-Runde unterzogen wird.

3.13.11. Überprüfung potentiell positiver Plaques

Phagen-Partikel, die ein Protein exprimieren, welches mit RNase P-RNA interagiert, sollten in der unter 3.13.10. hergestellten Suspension angereichert vorliegen. Durch eine weitere *Screening*-Runde sollen einzelne Klone, welche das gesuchte Protein oder zumindest mit RNase P-RNA interagierende Proteine, exprimieren, isoliert werden. Dazu werden in Bakterienzellen mit mehreren Verdünnungen (1:10 bis 1:1000) der erhaltenen Phagen-Suspension infiziert und auf NZY-Platten ausgestrichen (3.13.6.). Die erhaltenen Plaques werden dem unter 3.13.8. bzw. 3.13.9. beschriebenen Verfahren unterzogen. Wird die Interaktion in dieser zweiten Runde bestätigt, wird der entsprechende Phage isoliert (3.13.10.).

3.13.12. *In vivo*-Exzision von cDNA aus dem "Uni-ZAP® XR" Vektor-System

Der in dieser Arbeit verwendete Uni-ZAP® XR Insertionsvektor ermöglicht das *Phagemid*-Prinzip. Dieses System bietet mehrere Verbesserungen gegenüber den ursprünglich verwendeten λ-Vektorsystemen. Da die multiple Klonierungsstelle im Uni-ZAP-Vektor sich inmitten der pBluescript® SK(-) *Phagemid*-DNA befindet, entstehen bei einer Coinfektion von *E. coli* XL-1 Blue MRF⁻-Zellen mit Uni-Zap Phagen und M13 Helfer-Phagen durch deren Gp II pBluescript SK(-)II-*Phagemids*, die in ihrer multiplen Klonierungsstelle weiterhin die entsprechende cDNA-Insertion aus dem Uni-ZAP-Phagen besitzen. Durch Hitzebehandlung werden die *E. coli*-Zellen und die Uni-ZAP-Phagen inaktiviert. Die verbliebenen pBluescriptII-*Phagemids* und Helferphagen werden mit einer frischen *E. coli*-Kultur in einem hohen Zell zu Phagen Verhältnis gemischt. Hierzu wird der SOLR-Bakterienstamm verwendet, der einerseits die Vermehrung und Zirkularisierung der pBluescriptII-*Phagemids* erlaubt andererseits

aber auch die Vermehrung des eingesetzten Helferphagen unterdrückt. Die infizierten SOLR-Zellen werden dann auf Ampicillin-haltigen (100 µg/ml) LB-Agarplatten ausplattiert, um Klone mit pBluescriptII-Vektor zu isolieren.

Die Kultur der *E. coli*-Zellen erfolgt wie unter 3.13.5. beschrieben. Nachdem sie mit 10 mM MgSO₄ zu einer optischen Dichte von etwa 1,0 verdünnt wurden, können sie eingesetzt werden. In einem 50 ml Polypropylen-Röhrchen werden etwa 10⁷ pfu der Uni-ZAP XR Bibliothek mit 10⁸ XL-1 Blue MRF¹-Zellen (ca. 1 ml) und 10⁹ "ExAssist"-Helferphagen gründlich vermischt und 15 min bei 37 °C inkubiert, um die Adsorption der Phagenpartikel an die Bakterien zu gewährleisten. Nach Zugabe von 20 ml LB-Medium wird der Ansatz 2,5 h bei 37 °C geschüttelt (Infors Rundschüttler HT, 160 UpM). Zur Hitzeinaktivierung der Uni-ZAP-Phagen und Bakterien wird das Röhrchen 20 min bei 65 bis 70 °C im Wasserbad inkubiert. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation sedimentiert (Beckman J6-B, 1800 Upm, 1000 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand in ein steriles PP-Röhrchen überführt. Um den Titer der ausgeschnittenen *Phagemids* zu bestimmen, wird 1 µl dieser Lösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zu 200 µl SOLR-Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C werden 100 µl auf Ampicillin-Agar-Platten (100 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

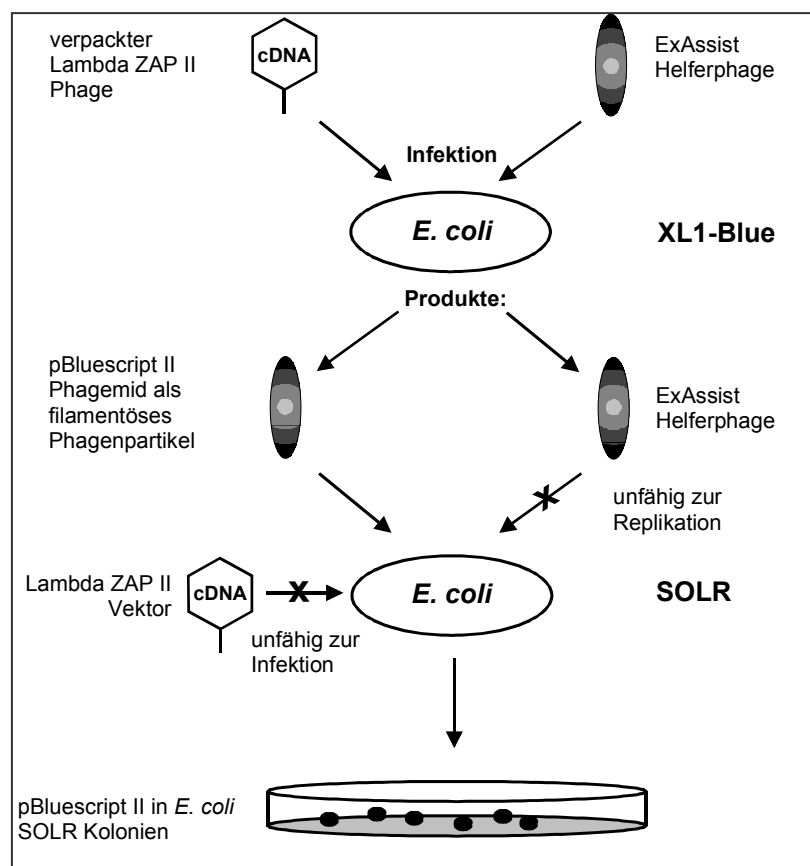


Abb. 3-5: Schematische Darstellung des Phagemid-Systems von Gen-Bibliotheken im Phagen Lambda Uni-ZAP® XR (Stratagene). Als Helferphage wird der f1-Abkömmling ExAssist verwendet. Die Selektion auf *E. coli*-Zellen mit zirkulärer Phagemid-DNA ohne Infektion durch Lambda ZAPII oder Helferphagen erfolgt im Stamm SOLR auf Ampicillin-haltigem Medium.

3.14. Bioinformatische Methoden

3.14.1. Datenbanksuche

Alle allgemeinen Datenbanksuchen auf Nukleotidbasis wurden unter <http://www.ncbi.nih.gov> (Stand 06.10.2003) mit dem Algorithmus "blast" ausgeführt. Zu translatierende Nukleotid-Anfragen gegen die Proteindatenbank wurden mit dem Algorithmus "blastx" bearbeitet.

3.14.2. Erstellung von Alignments

Die Erstellung aller Alignments erfolgte unter Verwendung des Programms "ClustalW" im Programm BioEdit oder unter <http://www.ebi.ac.uk/clustalw> (Stand 06.10.2003).

3.14.3. Strukturmodellierung durch Sequenzalignment

Die Berechnung des 3D-Modellen erfolgte durch das Programm "SWISS-MODEL" auf der Basis eines Homologie-Modellierungsansatzes (Peitsch, 1995; Guex und Peitsch, 1997; Schwede *et al.*, 2003).

4. Ergebnisse

4.1. Expression und Isolierung rekombinanter bakterieller RNase P-Proteine

4.1.1. Überproduktion und Isolierung des RNase P-Proteins aus *Synechocystis* PCC6803

Das für das RNase P-Protein (SynPP) des Cyanobakteriums *Synechocystis* PCC 6803 codierende Gen *rnpA* wurde in den Vektor pQE30 kloniert (Heubeck und Schön, 2001). Der Expressionsklon codiert für ein N-terminales *6x-His-tag*.

Das Plasmid pSynPP wurde in *E. coli* M15 oder SG13009-Expressionszellen transformiert, welche beide über ein zusätzliches pREP-4-Plasmid verfügen (3.9.1. & 3.11.1.). Beide Stämme exprimieren das rekombinante Protein mit gleicher Effizienz (Heubeck, 1999).

4.1.1.1. Expression in LB-Medium

Für eine präparative Expression wurde eine 500 ml Antibiotika-supplementierte LB-Kultur (0,1 mg/ml Ampicillin, 0,05 mg/ml Kanamycin) aus einer 5 ml LB-Vorkultur in einer 1:1000 Verdünnung angesetzt. Nachdem eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,6 erreicht war, erfolgten Induktion und Expression unter optimierten Bedingungen (1 mM IPTG, 34 °C, 4 h; Heubeck, 1999). Aus 500 ml Kultur wurden durchschnittlich 3,0 g Zellsediment gewonnen (Abb. 4-1).

4.1.1.2. Expression in M9-Minimalmedium

Durch die Verwendung von M9 Minimalmedium wird die Expression endogener *E. coli* Proteine auf ein absolutes Minimum beschränkt. Im Verhältnis endogene *E. coli* Proteine : rekombinantes Zielprotein werden deutlich bessere Expressions-Ergebnisse als in LB-Medium erzielt (Abb. 4-1). Der Zusatz von bis zu 2 % (w/v) Glucose als Energiequelle führt durch katabolische Repression zu einer Absenkung des Zielprotein-Basalleveles. Das Wachstum der *E. coli* Expressionszellen in Minimalmedium ist wesentlich verlangsamt (Abb. 4-1).

	LB-Medium	M9-Minimalmedium
	Menge an Protein (Ausbeute in %)	
Zellfreies Lysat	18,4 mg (100)	12,7 mg (100)
nach NR^{2+} -NTA	2,83 mg (15,3)	2,63 mg (20,1)
-"- DEAE	2,47 mg (13,4)	2,07 mg (16,2)

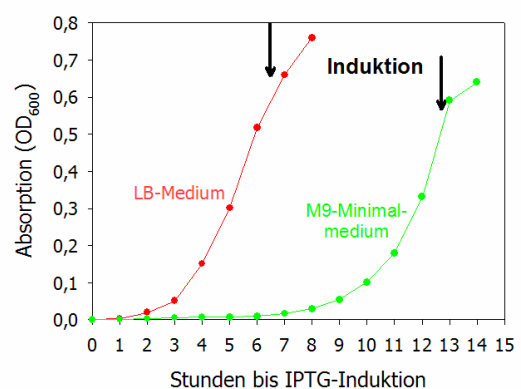


Abb. 4-1: Vergleich der Expression von SynPP in LB- und Minimalmedium

A) Ausbeute an SynPP ausgehend von je 500 ml IPTG-induzierter *E. coli* SG13009-Kultur in LB- und Minimalmedium nach verschiedenen Aufreinigungsstufen. Die Proteinmengen wurden durch Bradford-Assay (3.8.2.1.) und durch Absorptionsmessung bei 280 nm (3.8.2.2.) bestimmt. Die zu vermessende Probe wurde jeweils durch Mikrokonzentrierung von jeweils störenden Detergenzien befreit.

B) Wachstumskurven von *E. coli* SG13009-Kulturen in LB- und Minimalmedium. Der Zeitpunkt der IPTG-Induktion ist durch Pfeile angezeigt.

Die Aufreinigung der in LB oder M9-Minimalmedium gezogenen Zellkulturen unterschied sich nicht.

4.1.1.3. Isolierung des rekombinanten SynPP

Nach der Lyse der Zellen mit Puffer A wurde der Protein-Rohextrakt zuerst über eine Ni²⁺-NTA-Säule aufgereinigt (3.10.1.1.). Das Lysat wurde im *batch*-Verfahren an die Agarose-Matrix gebunden und mit jeweils 20 Volumen Puffer B, C und D gewaschen. Die Elution wurde mit Imidazol-haltigem Puffer E solange durchgeführt, bis im Eluat nach Bradford-Analyse (3.8.2.1.) kein Protein mehr detektiert werden konnte. Nach Vereinigung der proteinhaltigen Fraktionen wurden durchschnittlich 3 mg SynPP aus 500 ml LB *E. coli* M15-Kultur gewonnen.

Um eine Kontamination mit endogener RNA auszuschließen, wurden die vereinigten Protein-Fractionen über DEAE-Cellulose im *batch*-Verfahren chromatographiert (3.10.1.2.). Da SynPP über einen ausgeprägt basischen Charakter verfügt, bindet es unter den pH-Bedingungen (pH 4,5 des Ni²⁺-NTA-Elutionspuffers) nicht an den Anionenaustauscher und wird als Durchlauf gesammelt. Nukleinsäuren hingegen werden gebunden und können so abgetrennt werden. Die Protein-Konzentration im Durchlauf wurde nach Bradford (3.8.2.1.) und UV-Messung bei 280 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von 7953 M⁻¹ cm⁻¹ bestimmt. Der Messunterschied zwischen beiden Methoden betrug weniger als 10 %. Ausgehend von 18,4 mg zellfreiem Lysat wurden nach diesem Reinigungsschritt 2,07 mg SynPP bei Expression in M9-Minimalmedium erhalten (Abb. 4-1A), für die keine endogene RNase P-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Die vereinigten Proteinfractionen wurden durch Ultrafiltration (3.8.1.2.) eingengt. Anschließend wurde diese konzentrierte Lösung zur Renaturierung achtmal mit je 200 µl detergentenfreiem Puffer F gewaschen und zur Lagerung bei -20 °C gegen Puffer F+ mit 50 % (v/v) Glycerin dialysiert (3.8.1.1.). Unter diesen Bedingungen blieben die SynPP-Präparationen bis zu 10 Monaten stabil.

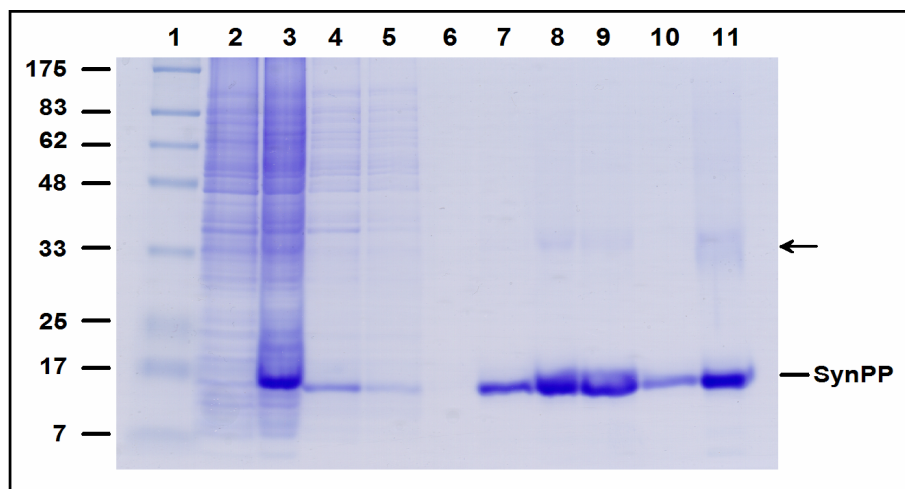


Abb. 4-2: Aufreinigung von SynPP durch Ni²⁺-Agarose und DEAE-Chromatographie

Aliquots aller Reinigungsstufen wurden mit Probenpuffer versetzt. Rohfraktionen, welche Zellbestandteile enthielten, wurden direkt vor dem Auftrag sonifiziert. Die Proben wurden auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel (3.8.3.) aufgetrennt und mit Coomassie-Blau (3.8.4.1.) angefärbt. Die Position von SynPP im Gel ist angezeigt, das durch einen Pfeil markierte Protein wird im Text diskutiert. Am linken Rand sind die Molekulargewichte des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

1	Protein-Längenstandard I	7	Elutionsfraktion I (500 µl)
2	<i>E. coli</i> M15-Kultur vor IPTG-Induktion	8	Elutionsfraktion II (500 µl)
3	<i>E. coli</i> M15-Kultur 5 h nach IPTG-Induktion bei 34 °C	9	Elutionsfraktion III (500 µl)
4	Durchlauf nach Binden an Ni ²⁺ -Agarose	10	Elutionsfraktion IV (500 µl)
5	Waschfraktion mit Puffer B	11	Protein-Präparation nach DEAE-Chromatographie
6	Waschfraktion mit Puffer C		

In Abb. 4-2 ist in einigen Elutionsfraktionen und nach Chromatographie an DEAE-Cellulose deutlich ein Protein mit einem Molekulargewicht von 31-32 kD zu erkennen (schwarzer Pfeil). Diese Bande ist vermutlich auf Dimerisierung von SynPP zurückzuführen, da das Protein an Position 95 über einen ungeschützten frei zugänglichen Cysteinrest verfügt. Diese Aminosäure neigt bedingt durch Sauerstoffoxidation zur Ausbildung von Disulfidbrücken.

Auf eine proteolytische Abspaltung des *6x-His-tags* wurde verzichtet, da in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass funktionelle Rekonstitutionsstudien durch die Anwesenheit dieser N-terminalen Aminosäuresequenz nicht beeinflusst wurden (Heubeck, 1999). Das verwendete *Tag* gilt außerdem als nur sehr schwach immunogen, sodass es bei der Herstellung polyklonaler Antikörper vernachlässigt werden kann (Qiagen).

Nach der denaturierenden Aufreinigung eines rekombinanten Proteins kann nur in wenigen Fällen von einer vollständigen Renaturierung ausgegangen werden. Deshalb wurde für jede einzelne SynPP-Präparation eine Titration gegen homologes SynRPR (25 nM) durchgeführt, um über die Holoenzym-Aktivität den Renaturierungsgrad des Proteins zu bestimmen (Abb. 4-3; 3.12.3.1.). Für einzelne SynPP-Präparationen wurde ein Aktivitätsmaximum bei einem molaren Verhältnis von 1 SynRPR : 1,5 SynPP erreicht. Dies entsprach einem Renaturierungsgrad von etwa 70 %.

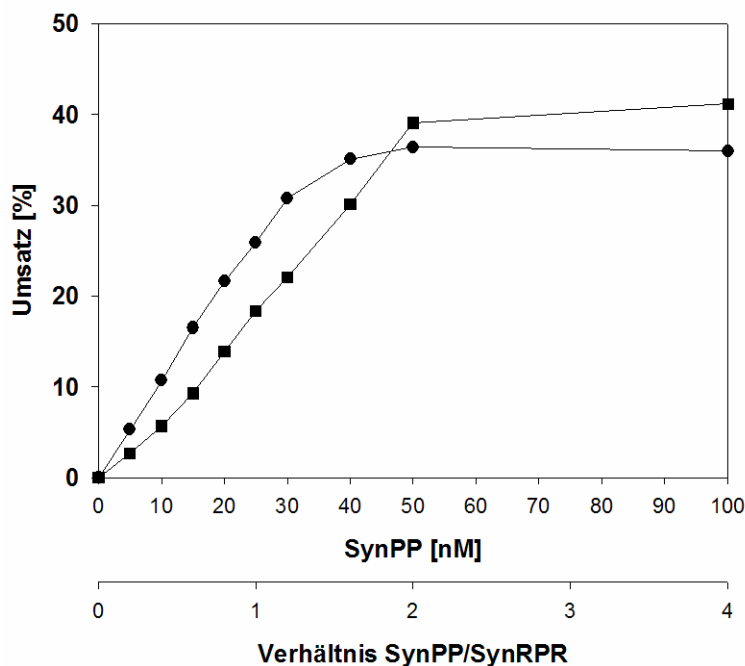


Abb. 4-3: Stöchiometrie von SynPP und SynRPR im Holoenzym

Gezeigt ist der Substratumsatz [%] in Abhängigkeit der SynPP-Konzentration [nM] für zwei unterschiedliche Protein-Präparationen. Das jeweilige Verhältnis von SynPP zu SynRPR kann der abgesetzten x-Achse direkt entnommen werden. Die Rekonstitutionen wurden mit jeweils 25 nM SynRPR durchgeführt (3.12.2.). Der Aktivitätstest erfolgte mit *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} für 10 min bei 37 °C.

4.1.2. Überproduktion und Isolierung des RNase P-Proteins aus *Prochlorococcus marinus* PCC9511 (Pm9511PP)

Zur Expression des RNase P-Proteins aus *Prochlorococcus marinus* PCC9511 (Pm9511PP) standen zwei Expressionsvektoren zur Verfügung: pQ9511PP und pBlue9511PP-T (Stahl, 2001). Ausgehend von pQ9511PP konnte weder in *E. coli* M15 noch in SG13009-Zellen eine Expression von Pm9511PP induziert werden. Da Pm9511PP sieben Arginin-Reste besitzt, wovon fünf durch in *E. coli* nur selten vorkommende Codons codiert werden (3x AGA, 2x AGG), wurde für nachfolgende Expressionsstudien auf den unter Kontrolle des T7-Systems stehenden Vektor pBlue9511PP-T in den *E. coli* Stämmen Rosetta (DE3) und Rosetta (DE3) pLysS zurückgegriffen. Diese Zellen exprimieren zusätzlich in *E. coli* seltene tRNAs (3.9.2).

Eine Expression von Pm9511PP in Rosetta (DE3) war nicht möglich. Da wegen des jedoch sehr stark basisch geprägten Charakters von Pm9511PP eine den Stoffwechsel der Zelle beeinträchtigende oder toxische Wirkung angenommen werden kann, wurden gleichzeitig Expressionsversuche in Rosetta (DE3) pLysS unternommen. Dieses Plasmid reprimiert die nicht beabsichtigte Expression des rekombinanten Zielproteins vor der IPTG-Induktion (3.9.2.)

Die Expression des in pBlue9511PP-T codierten *P. marinus* 9511 RNase P-Proteins in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS war erfolgreich (Abb. 4-4).

Plasmid	<i>E. coli</i> -Stamm	Medium	Expressionstemperatur												
			20 °C			30 °C			33 °C			37 °C			
			IPTG zur Induktion (Endkonzentration in mM)												
			0.1	1.0	2.0	0.1	1.0	2.0	0.1	1.0	2.0	0.1	1.0	2.0	
pQ9511PP	<i>E. coli</i> /SG13009	LB-Medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LB-Medium +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. coli</i> M15	LB-Medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LB-Medium +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pBlue9511PP-T	Rosetta (DE3)	LB-Medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LB-Medium +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Rosetta (DE3) pLysS	LB-Medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		LB-Medium +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Abb. 4-4: Expressionbedingungen für Pm9511PP

Zusammenstellung der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Expressionsbedingungen für Pm9511PP (3.9.3.). Die Plasmide pQ9511PP und pBlue9511PP-T wurden in die *E. coli*-Stämme SG13009 pREP4 und M15 pREP4 bzw. in Rosetta (DE3) und Rosetta (DE3) pLysS transformiert. Für die resultierenden Expressionszellen wurden Medien (je 25 ml), Expressionstemperatur und IPTG-Konzentration variiert. Die Induktion erfolgte stets bei $OD_{600} = 0,6-0,7$. "LB-Medium +" steht für den Zusatz von 2 % Glucose (w/v) und Spurenelement-Lösungen A, B und C (je 1 µl/20 Medium). "-" steht für keine, "+" für eine erfolgreiche Expression. Größere Pluszeichen stehen für eine höhere Expression.

Die Zellen wurden bei $OD_{600} = 0,6-0,7$ mit 2 % (w/v) Glucose und je 25 µl der Spurenelement Lösungen A, B und C (3.9.3.3.) versetzt. Nach der IPTG Induktion (1 mM Endkonzentration) erfolgte die Proteinexpression für 4 h bei 30 °C. Die Aufreinigung erfolgte durch Chromatographie an Ni^{2+} -

Agarose (3.10.1.1.) und DEAE-Cellulose (3.10.1.2.; Abb. 4-6). Aus 19,4 mg zellfreiem Lysat konnten 1,54 mg Pm9511PP isoliert werden (7,9 %; Abb. 4-5).

		"LB +"-Medium
		Menge an Protein (Ausbeute in %)
Zellfreies Lysat		19,4 (100)
nach Ni^{2+} -NTA		1,98 (10,2)
-"-	DEAE	1,54 (7,9)

Abb. 4-5: Ausbeute an Pm9511PP

ausgehend von je 500 ml IPTG-induzierter *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS in LB+-Medium nach den einzelnen Aufreinigungsstufen. Die Proteinmengen wurden durch Bradford-Assay (3.8.2.1.) und durch Absorptionsmessung bei 280 nm (3.8.2.2.) bestimmt. Die zu vermessende Probe wurde jeweils durch Mikrokonzentrierung von störenden Detergenzien befreit.

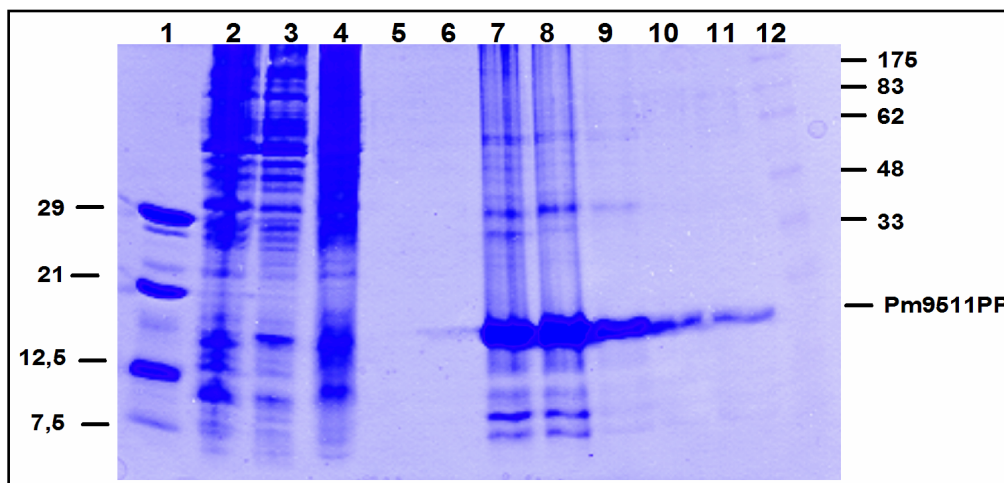


Abb. 4-6: Aufreinigung von rekombinantem Pm9511PP

Aliquots aller Reinigungsstufen wurden mit Probenpuffer versetzt. Rohfraktionen, welche Zellbestandteile enthielten, wurden direkt vor dem Auftrag sonifiziert. Die Proben wurden auf einem 12,5 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Die Position von Pm9511PP im Gel ist angegeben. Am linken und rechten Rand sind die Molekulargewichte zweier Protein-Längenstandards angegeben (kD).

1	Protein-Längenstandard II	7	Waschfraktion nach Puffer D
2	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS-Kultur vor Induktion	8	Elutionsfraktion I (500 μ l)
3	<i>E. coli</i> Rosetta (DE3) pLysS-Kultur nach Induktion	9	Elutionsfraktion II (500 μ l)
4	Durchlauf nach Binden an Ni^{2+} -Agarose	10	Elutionsfraktion III (500 μ l)
5	Waschfraktion mit Puffer B	11	Pm9511PP-Präparation nach DEAE-Chromatographie
6	Waschfraktion mit Puffer C	12	Protein-Längenstandard I

Die Pm9511PP-Präparation zeigte keine endogene RNase P-Aktivität. Ihr Renaturierungsgrad, welcher durch Titration gegen Pm1375RPR bestimmt wurde (3.12.2. & 3.12.3.1.), lag bei etwa 30 % (Aktivitätsmaximum für 1 RNA : 3 Pm9511PP). Die Präparation wurde bei -20 °C gelagert und war 2-3 Monate stabil.

4.2. Präparation und Charakterisierung von anti-SynPP-Antikörpern (α -SynPP-AB)

4.2.1. Herstellung von Antikörpern

Von der Firma "Eurogentec" wurde ein Kaninchen mit 350 μ g SynPP immunisiert. Das Protein wurde im getrockneten Zustand verschickt. Vor der ersten Immunisierung wurde eine prä-Immunsersumprobe abgenommen. 38 bzw. 66 Tage nach der ersten Immunisierung wurde eine kleine (ca. 15 ml) bzw. große (100 ml) Serumprobe abgenommen. Die Proben wurden auf Trockeneis zugesandt.

4.2.2. Untersuchungen zur Antikörper-Präparation und Optimierung der in *Western-Blot-Analysen* verwendeten Antikörper-Mengen

Mit Hilfe der Bradford-Methode (3.8.2.1.) und Extinktionsberechnungen (3.8.9.2.) wurde für die durch Ammoniumsulfat-Fällung (3.8.9.2.) aufgereinigte α -SynPP-AB-Präparation eine durchschnittliche Protein-Konzentration von 25,5 mg/ml bestimmt. Um die Reinheit der Antikörper-Präparation zu untersuchen, wurden 20 μ g Protein auf einem 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Gel nicht gezeigt). Antikörper der IgG-Klasse besitzen zwei "schwere" Polypeptidketten mit je 55 kD, an welche zwei "leichte" Polypeptidketten (25 kD) über Disulfid-Brücken kovalent binden (Harlow und Lane, 1988). Unter den denaturierenden Bedingungen der SDS-Gelelektrophorese zerfallen die Antikörper-Moleküle in die einzelnen Polypeptidketten. Zusätzlich zu den IgG-Protein-Banden bei 55 kD und 25 kD waren eine Reihe weiterer, zum Teil stärkerer, Proteinbanden zu erkennen. Offensichtlich enthält die Antikörper-Präparation noch verunreinigende Proteine. Es könnte sich hierbei um Antikörpermoleküle anderer Immunoglobulin-Klassen oder um weitere Serum-Proteine handeln. Inwieweit diese Verunreinigungen die Immunoreaktivität der Antikörper-Präparation beeinflussen bleibt ungeklärt.

Um in immunologischen Nachweisen ein gutes Signal/Hintergrundverhältnis zu erhalten, muss in erster Linie die Konzentration des Primär-Antikörpers in entsprechender Lösung optimiert werden. Hierzu wurden je 50 ng rekombinantes SynPP-Protein auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Nach dem Blockieren wurde die Membran geteilt und die den einzelnen Spuren entsprechenden Streifen mit Primär-Antikörper-Lösung verschiedener Konzentration 1 h inkubiert. Die Verdünnungen des Antikörpers reichten dabei von 1:100 bis 1:25 000 (v/v). Die Sekundär-Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase bzw. Meerrettichperoxidase wurden - wie empfohlen - in einer Verdünnung von 1:10 000 (v/v) eingesetzt. Nach Zugabe von CSPD-Substratlösung reicht eine Exposition von 30 sec (3.8.7.2.), für Luminol-Substratlösung von 2 sec (3.8.7.1.), aus, um ein deutliches Signal auf dem Röntgenfilm zu erhalten. Wie durch den Vergleich mit *E. coli*-Rohextrakt gezeigt werden konnte, handelt es sich um ein spezifisches Signal, welches durch Bindung des Antikörpers an das zugehörige SynPP-Epitop zustande kommt.

Bei zu hohen Primär-Antikörper-Konzentrationen war über die gesamte Spur ein starker Hintergrund zu erkennen. Mit zunehmender Verdünnung konnte eine Verbesserung des Signal/Hintergrund-Verhältnisses erreicht werden. Für nachfolgende Western-Blot-Experimente wurde eine 1:2000-Verdünnung (v/v) von durch Ammoniumsulfatfällung gereinigtem α -SynPP-AB verwendet. Die Proteinkonzentration einer so erhaltenen Lösung betrug etwa 13 μ g/ml bezogen auf den Antikörper und lag damit im empfohlenen Bereich zwischen 1 und 50 μ g/ml (Harlow und Lane, 1988).

4.2.3. Nachweis der Erkennung von SynPP und Spezifität von α -SynPP-AB

Für den Nachweis der spezifischen Erkennung von *Synechocystis* RNase P-Protein durch α -SynPP-AB wurden 10 ng hochreines rekombinantes SynPP und 1 μ g *E. coli* RNase P-Protein (C5-Protein) durch ein 12-18 % SDS-Gradientengel aufgetrennt. Nach der Übertragung des Protein-Musters auf eine Nitrocellulose-Membran (3.8.5.) folgten die Antikörper-Inkubation (α -SynPP-AB in 1:2000 Verdünnung) und der Nachweis über Chemolumineszenz (3.8.7.).

Abb. 4-7 zeigt das erhaltene Bindungsmuster für die beiden rekombinanten RNase P-Proteine. Da das beobachtete Signal für SynPP weder durch Inkubation mit Präimmenserum oder alleinige Zweitantikörper-Inkubation detektiert werden konnte, muss es sich hierbei um eine spezifische Bindung von α -SynPP-AB an SynPP-Epitope handeln.

Der gegen das cyanobakterielle RNase P-Protein gerichtete Antikörper erkennt das eubakterielle *E. coli* RNase P-Protein nicht, obwohl dieses in hundertmal höherer Konzentration aufgetragen ist.

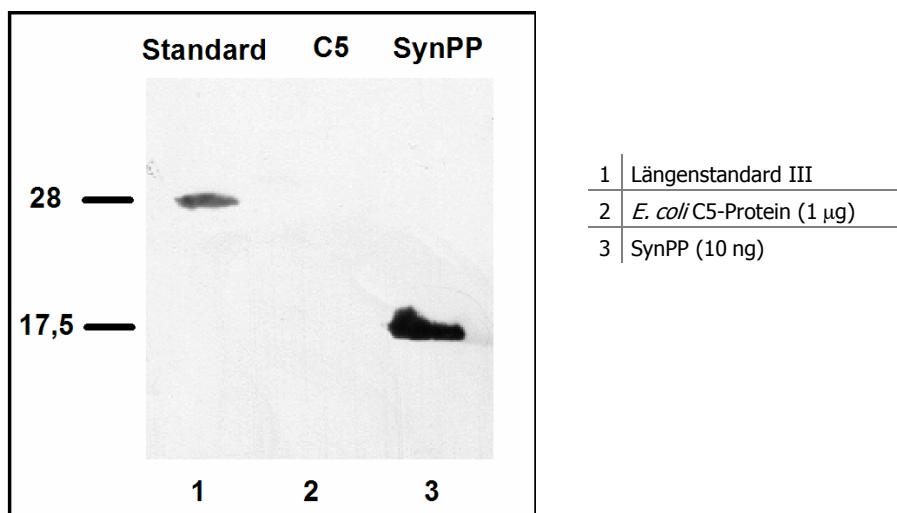


Abb. 4-7: Test auf Spezifität der α -SynPP-AB-Präparation

10 ng SynPP und 1 μ g C5-Protein wurden auf einem 12-18 % SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, auf Nitrocellulose-Membran übertragen und mit α -SynPP-AB inkubiert (1:2000 Verdünnung). Die Detektion erfolgte über Chemolumineszenz mit Luminol als Substrat. Am linken Rand sind die Molekulargewichte des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

4.2.3. Optimierung der Bedingungen für die Übertragung von Proteinen aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran

Die Dauer der Äquilibration des Gels vor dem Transfer erwies sich für einen effizienten Transfer der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf die Nitrocellulose von entscheidender Bedeutung. Methanol im Puffer bewirkt dabei durch Dehydratisierung eine Verkleinerung des Gels auf seine endgültige Größe. Hierdurch werden Gel-Verzerrungen während des Transfers vermieden. Bei längerer Inkubation im Transfer-Puffer diffundieren allerdings auch zunehmend SDS-Moleküle, die für einen effizienten Transfer in Form von Protein-SDS-Komplexen notwendig sind, aus dem Gel. Eine Äquilibrationszeit von 3 min erwies sich als beiden Effekten genügend. Durch eine Verlängerung der Transferzeit auf bis zu 120 min konnte eine Erhöhung der übertragenen Proteinmenge erreicht werden. Bei verlängerten Transferzeiten mussten allerdings die nicht direkt dem Gel oder der Membran benachbarten Filterpapiere gegen frisch äquilibrierte ausgewechselt werden, da die Puffer-Menge beim *Semi-Dry*-Transfer nur sehr begrenzt ist. Nur auf diese Weise kann erstens die Stromstärke während des

gesamten Transfers auf gleichmäßig hohem Niveau gehalten (ca. 1,6 mA/cm² Gelfläche) und andererseits ein Austrocknen der Membran vermieden werden.

4.3. Konstruktion von RNase P-RNA T7-Transkriptionsklonen

4.3.1. Mutagenese der RNase P-RNA aus *Prochlorococcus marinus* PCC1375

Die RNase P-codierende Region des Cyanobakteriums *P. marinus* enthält außer dem *rnp B*-Gen neben einem offenen Leserahmen und mehreren *inverted Repeats* strangaufwärts noch das für eine Arginin-tRNA (tRNA^{Arg}_{CCU}) codierende Gen *trnR* in entgegengesetzter Orientierung (Hess *et al.*, 1998). Diese Genanordnung steht dem Arrangement in den Plastiden aus *C. paradoxa* und *P. purpurea* näher als dem anderer Cyanobakterien (Baum *et al.*, 1996; Reith und Musholland, 1995). In Übereinstimmung mit tRNA-Genen von Cyanobakterien und Plastiden ist das 3'-CCA-Ende nicht codiert. Konsequenterweise besitzt die RNase P-RNA kein 5'-GGU-3'-Bindungsmotiv für 3'-CCA-Enden.

Im Gegensatz zur Plastiden-RNase P-RNA aus *C. paradoxa* weicht *P. marinus* an den entsprechenden Positionen G20 und G240 nicht vom bakteriellen Konsensus ab (Anhang II) und besitzt Ribozymcharakter (Hess *et al.*, 1998). Um die Bedeutung der Identität dieser Positionen bzw. der Stabilität der betroffenen Basenpaare für die katalytische Aktivität der RNase P-RNA zu untersuchen, wurden in die *P. marinus* RNase P-RNA Mutationen eingefügt, welche die RNA-Sequenz vom bakteriellen Konsensus weg, hin zur Cyanellen RNase P-RNA veränderten.

Ausgehend von pT7PmK (Gimple, 1999) wurden alle Mutanten durch bidirektionale Mutagenese (3.4.4.) nach Standardbedingungen hergestellt:

RNase P-RNAs codierende Plasmide	Beschreibung des klonierten Gens	Ausgangsplasmid	Startoligonukleotid
pT7PmK	<i>P. marinus</i> RPR	Gimple, 1999	--
pT7PmA20	<i>P. marinus</i> RPR G20A	pT7PmK	PmA20-53 & PmA20-R
pT7PmA240	<i>P. marinus</i> RPR G240A	pT7PmK	PmA240-53 & PmA240-R
pT7PmA20A-240	<i>P. marinus</i> RPR G20A-G240A	pT7PmA20	PmA240-53 & PmA240-R
pT7PmT79-A240	<i>P. marinus</i> RPR C79T-G240A	pT7Pm240	PmT79-53 & PmT79-R
pT7PmA20-T79-A240	<i>P. marinus</i> RPR G20A-C79T-G240A	pT7PmT79-A240	PmA20-53 & PmA20-R

Abb. 4-8: Darstellung der Plasmide zur T7-Transkription von PmRPR-Mutanten

Von den Plasmiden pT7PmK, pT7PmA20, pT7PmA240, pT7PmA20A-240, pT7PmT79-A240 und pT7PmA20-T79-A240 wurden T7-Transkripte erstellt (Abb. 4-11).

Alle diese Transkripte zeigten wie der PmRPR-Wildtyp unter Standard-Ribozymbedingungen (3.12.1.) katalytische Aktivität (Abb. 4-9).

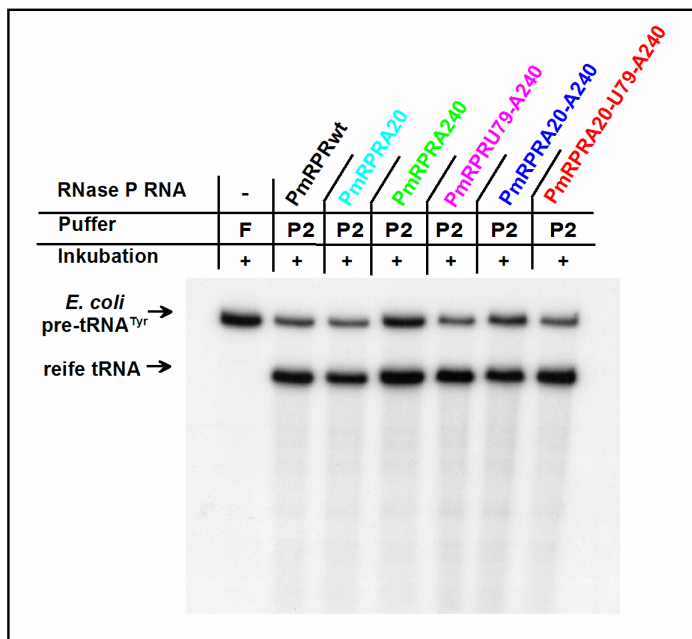


Abb. 4-9 A: Ribozymtest von PmRPR und Mutanten

Je 25 nM Pm RNase P-RNA wurden mit *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} in Puffer P2 bei 37 °C für 5 min (3.12.1.) inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch ein 12 % PAA-Gel aufgetrennt. Zur farbigen Zuordnung der Pm-Mutanten siehe auch Anhang II.

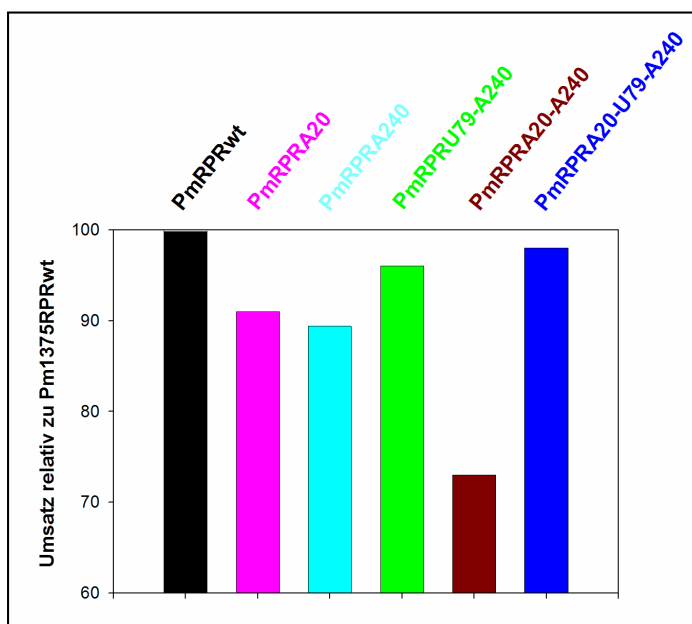


Abb. 4-9 B: Quantifizierung

der Ribozymaktivität der PmRPR-Mutanten relativ zur *P. marinus* PCC1375 Wildtyp RNase P-RNA (Pm1375RPRwt).

4.3.1.1. Bestimmung der Mg²⁺-Abhängigkeit der Ribozymreaktion der PmRPR-Mutanten

Die Aktivität des RNase P-Ribozyms ist von der Anwesenheit mono- und divalenter Kationen abhängig. Während monovalente Kationen hauptsächlich durch Absättigung des negativ-geladenen Phosphodiester-Rückgrates der RNA-Moleküle die elektrostatische Abstoßung zwischen Ribozym und Substrat vermindern (Gardiner *et al.*, 1985), spielen divalente Kationen bei der korrekten dreidimensionalen Faltung des Ribozyms und der Bildung des katalytischen Zentrums eine tragende Rolle (Guerrier-Takada *et al.*, 1983; Ciesiolka *et al.*, 1994; Beebe *et al.*, 1996).

Bei den bisher durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zur katalytischen Aktivität von *P. marinus* PCC1375 RNase P-RNA (Hess *et al.*, 1998; Gimple, 1999) wurde festgestellt, dass die Prozessierung von pre-tRNAs hohe Konzentrationen an Mg²⁺ (150 mM MgCl₂) und monovalenten Kationen (2-3 M

NH_4Cl) benötigt. Nach Harris und Pace (1996) können mutationsbedingte Konformations-Störungen der RNase P-RNA durch eine erhöhte Mg^{2+} -Konzentration ausgeglichen werden. Da durch die in die *P. marinus* RNase P-RNA eingeführten Mutationen Störungen bei der korrekten Faltung des Ribozyms und damit auch bei der Ausbildung des katalytischen Zentrums als möglich angesehen wurden, wurde das Aktivitätsoptimum der Mutanten-Ribozymreaktionen in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration bei konstanter NH_4^+ -Konzentration bestimmt.

Hierfür wurden insgesamt drei Titrations pro Ribozym durchgeführt. Aus den Autoradiographien wurde am PhosphoImager jeweils der absolute Substratumsatz durch die Quantifizierung von Substrat, Produkt und abgeschnittener Flanke ermittelt. Aus diesen Datensätzen wurden Mittelwerte bestimmt, welche in Abb. 4-10 zusammengefasst sind.

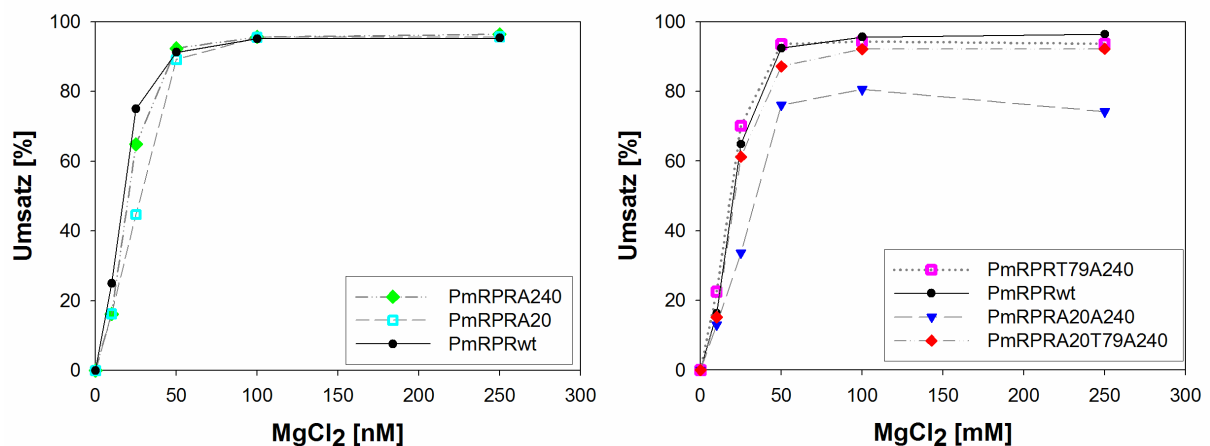


Abb. 4-10: Abhängigkeit der Ribozym-Aktivität mutierter Pm1375RPRs von der Mg^{2+} -Konzentration

Aufgetragen ist jeweils der absolute Substratumsatz (%) gegen die Mg^{2+} -Konzentration (mM). Zur besseren Übersicht sind die einzelnen Mutanten (je 25 nM) jeweils im Vergleich zum Wildtyp dargestellt (Farbcode siehe auch Anhang II). Die linke Graphik zeigt den Wildtyp und die Einzel-Mutanten, die rechte Doppelmutanten und die Tripelmutante. Die Ansätze wurden mit *P. marinus* pre-tRNA^{Arg} (50 ng/Ansatz) 10 min bei 37 °C inkubiert (3.12.1.).

Der Wildtyp und alle Mutanten erreichen unter nahezu vollständigem Umsatz ein Aktivitätsmaximum bei 50-75 nM Mg^{2+} . Lediglich die Doppelmutante PmRPR A20A240 erzielt nur 80 % des Wildtyp-Umsatzes.

4.3.2. Klonierung des *Synechocystis* PCC6803 *rnpB* Gens

Da für frühere Arbeiten (Heubeck, 1999) nur ein *Synechocystis* RNase P-RNA (SynRPR) Transkriptionsklon mit C-U-Austausch an Position 291 zur Verfügung stand (Erdmann, 1998), wurde ein dem Wildtyp entsprechender Klon erstellt (Vioque, 1992).

Ausgehend von genomischer *Synechocystis* PCC6803 DNA wurde das *rnpB*-Gen durch PCR mit *Pfu*-Polymerase unter Verwendung der Startsequenzen ET7Syn5' (5'-GCGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTTAGGG AGG-3') und Syn3'Bam (5'-GCGGATCCGACGCATCTCGAGAGTTAGTCGT AAG-3') amplifiziert (3.4.1.). ET7Syn5' verfügt neben einer *Eco*RI Restriktionsschnittstelle (rot) über einen T7 RNA-Polymerase Promotor (grün). Syn3'Bam besitzt neben einer *Bam*HI-Schnittstelle (rot) zur Klonierung eine zusätzliche *Xho*I-Erkennungssequenz (orange). Sie ermöglicht eine spätere Linearisierung des Transkriptionsklons und somit eine nachfolgende *run-off*-Transkription (3.5.). Nach gerichteter Ligation des PCR-Produkts über die Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Bam*HI in pUC19 ergab sich der Transkriptionsvektor pT7SynRPR.

4.4. T7-Transkription von RNA-Genen und ihren Derivaten

Mit Hilfe der T7-Polymerase wurden RNA-Transkripte präpariert (3.5.). Dabei wurden Ausbeuten von 5-8x 10⁶ cpm für radioaktive Transkriptionen (3.5.3.) und 50 - 150 µg für nicht-radioaktive präparative Transkriptionen (3.5.2.) erreicht. Die zur Transkription eingesetzten Plasmide sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

RNase P-RNA codierende Plasmide	Beschreibung des klonierten Gens	Linearisierung zur <i>run-off</i>-Transkription mit
pT7GluRPR	<i>G. nostochinearum</i> Plastiden RPR	<i>Fok</i> I
pT7SynRPR	<i>Synechocystis</i> PCC6803 RPR	<i>Xho</i> I
pDW27	<i>E. coli</i> RPR (M1-RNA)	<i>Sna</i> BI
pT7G3-CyRPR	<i>C. paradoxa</i> Cyanellen RPR	<i>Fok</i> I
pT7CyRPR-G22	<i>C. paradoxa</i> Cyanellen RPR A22G	<i>Fok</i> I
pT7CyRPR-G213	<i>C. paradoxa</i> Cyanellen RPR A213G	<i>Fok</i> I
pT7CyRPR-G22-G213	<i>C. paradoxa</i> Cyanellen RPR A22G-A213G	<i>Fok</i> I
pT7CyRPR-C57-G213	<i>C. paradoxa</i> Cyanellen RPR T57C-A213G	<i>Fok</i> I
pT7CyRPR-G22-C57-G213	<i>C. paradoxa</i> Cyanellen RPR A22G-T57C-A213G	<i>Fok</i> I
pT7cpCyRPR35Glu	zirkular permutierte CyRPR (cpCyRPR) mit kovalent verknüpfter pre-tRNA ^{Glu} aus Gerste (27 Nt Flanke)	<i>Fok</i> I
pT7cpCyRPR15Tyr	cpCyRPR mit kovalent verknüpfter pre-tRNA ^{Tyr} <i>E. coli</i> (15 Nt Flanke)	<i>Fok</i> I
pT7cpCyRPR17Tyr	cpCyRPR mit kovalent verknüpfter pre-tRNA ^{Tyr} <i>E. coli</i> (17 Nt Flanke)	<i>Fok</i> I
pT7cpCyRPR19Tyr	cpCyRPR mit kovalent verknüpfter pre-tRNA ^{Tyr} <i>E. coli</i> (19 Nt Flanke)	<i>Fok</i> I
pT7Pmk	<i>P. marinus</i> PCC1375 RPR	<i>Bam</i> HI
pT7PmA20	<i>P. marinus</i> PCC1375 RPR mit G20A	<i>Bam</i> HI
pT7PmA240	<i>P. marinus</i> PCC1375 RPR mit G240A	<i>Bam</i> HI
pT7PmA20-A240	<i>P. marinus</i> PCC1375 RPR mit G20A-G240A	<i>Bam</i> HI
pT7PmT79-A240	<i>P. marinus</i> PCC1375 RPR mit C79T-G240A	<i>Bam</i> HI
pT7PmA20-T79-A240	<i>P. marinus</i> PCC1375 RPR mit G20A-C79T-G240A	<i>Bam</i> HI
pre-tRNA codierende Plasmide		
pT7ArgTerm	Cyanellen pre-tRNA ^{Arg} mit 3'-Flanke	<i>Fok</i> I
pT7Arg <i>Bst</i> NI	Cyanellen pre-tRNA ^{Arg}	<i>Bst</i> NI
pT7His	Cyanellen pre-tRNA ^{His}	<i>Fok</i> I
pSu3-wt	<i>E. coli</i> pre-tRNA ^{Tyr}	<i>Fok</i> I

Abb. 4-11: Zur T7-Transkription eingesetzte Plasmide.

Die Plasmide sind in die zwei Gruppen RNase P-RNAs und pre-tRNA Prozessierungssubstrate eingeteilt. Alle als pre-tRNAs bezeichneten Transkripte verfügen über eine 5'-Flanke. Neben dem Plasmidnamen sind eine Beschreibung des geklonten Gens und das zur Linearisierung zum Zwecke einer *run-off* Transkription verwendete Restriktionsenzym angegeben.

4.5. Rekonstitution und funktionelle Charakterisierung chimärer RNase P-Holoenzyme

Das Phänomen der heterologen Rekonstitution katalytisch aktiver RNase P-Holoenzyme wurde erstmals von Guerrier-Takada *et al.* (1983) für den *E. coli*-Enzymkomplex beschrieben. Die heterologe Rekonstitution wird heute häufig eingesetzt, um durch den Austausch von Holoenzym-Untereinheiten Hinweise auf phylogenetische Beziehungen zu erhalten.

In dieser Arbeit wurde die Rekonstitution von RNase P-Holoenzym aus homologen oder heterologen Komponenten durch direktes Mischen der jeweiligen Untereinheiten erreicht (3.12.2.). Bedingt durch den nie vollständigen Renaturierungsgrad der verwendeten Protein-Präparationen (Abb. 4-3) wurde meist ein molarer Überschuss an Protein eingesetzt, um maximale Ausbeuten an katalytisch aktivem Holoenzym zu erhalten. Dabei wurden Temperatur und Dauer der Inkubation in einem Rahmen gewählt, der den Untereinheiten die thermodynamische Möglichkeit zur Umlagerung geben sollte, um so die für die Bildung des Holoenzym notwendig Konformation einzunehmen. Allgemein konnte durch die Inkubation von Cyanellen-RNase P-RNA und cyanobakteriellen RNase P-Protein-Untereinheiten im fünffachen molaren Überschuss bei 37 °C für 10 min ein ausreichender Rekonstitutionsgrad an aktivem Holoenzym erreicht werden (3.12.2.).

4.5.1. Funktionelle Untersuchung der *C. paradoxa* Cyanellen RNase P durch heterologe Rekonstitution

Da die eubakteriellen RNase P-Proteinuntereinheiten aus *E. coli* und *B. subtilis* keine bzw. nur geringe Fähigkeiten zur heterologen Rekonstitution mit CyRPR zeigen, lassen sich sowohl funktionelle als auch strukturelle Unterschiede zwischen dem eubakteriellen Typ der RNase P und dem Cyanellen-Enzym vermuten.

Die Möglichkeit einer effizienten Rekonstitution von Cyanellen-RNase P-RNA mit dem cyanobakteriellen RNase P-Protein aus *Synechocystis* PCC6803 ist bekannt (Heubeck, 1999; Pascual und Vioque, 1999; Heubeck und Schön, 2001). Cyanellen-RNase P-RNA besitzt im Gegensatz zu bakteriellen RNase P-RNAs (z.B. M1 RNA, *B. subtilis* P RNA, *P. marinus* RPR, SynRPR) keine Ribozymaktivität und weicht an zwei Positionen (A22, A213; Abb. 1-14 bzw. Anhang I) von der bakteriellen Konsensussequenz ab (Baum *et al.*, 1996).

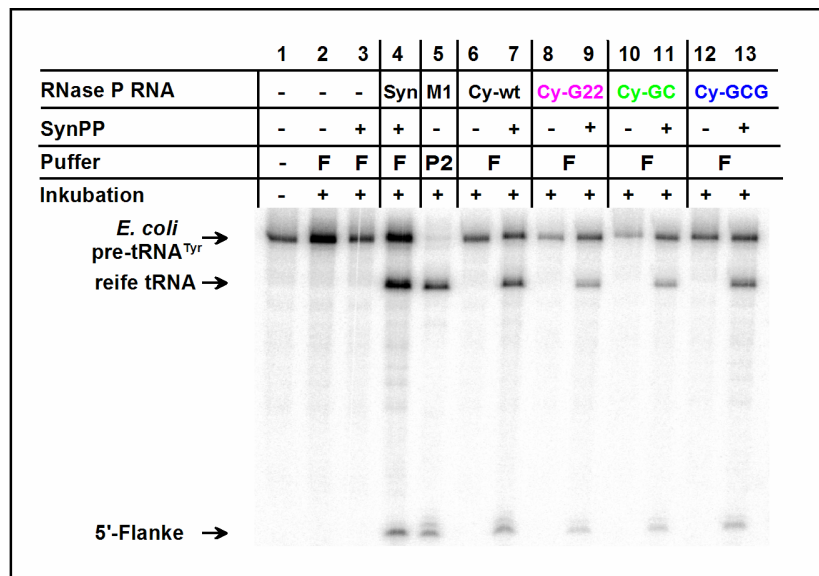
Um den Einfluss dieser Nukleotide auf die katalytische Aktivität zu überprüfen, hatte Cordier (1998) die Cyanellen-RNA durch Mutagenese zum bakteriellen Konsensus hin verändert. Mit diesen Mutanten sollte untersucht werden, inwiefern die katalytische Effizienz des heterolog rekonstituierten Holoenzym von der Identität der abweichenden Positionen bzw. der Stabilität der betroffenen Basenpaare abhängig ist.

Hierzu wurden T7-Transkripte der durch die Plasmide pT7CyRPR-G22, pT7CyRPR-G213, pT7CyRPR-G22-G213, pT7CyRPR-C57-G213 und pT7CyRPR-G22-C57-G213 codierten Cyanellen-RNase P-RNAs eingesetzt (Abb. 4-11; Anhang I). SynPP stand rekombinant exprimiert und aufgereinigt zur Verfügung (4.1.).

4.5.1.1. Rekonstitution der Cyanellen-RNase P-RNA mit SynPP zum chimären Holoenzym

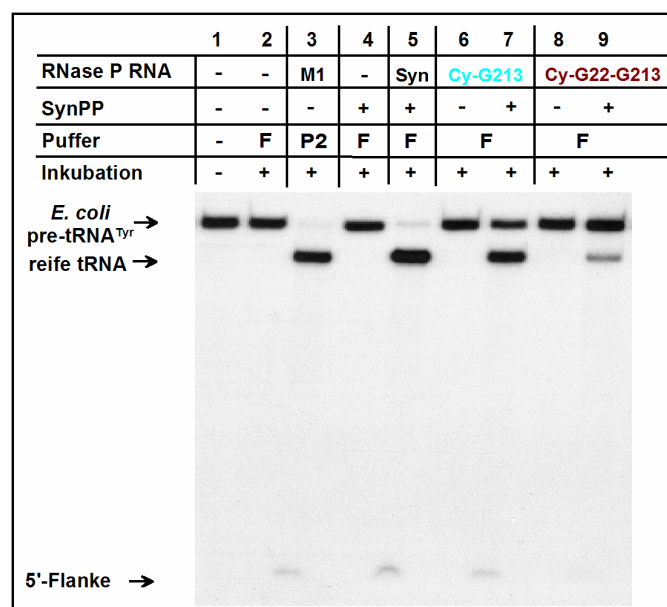
Die heterologe Rekonstitution des chimären RNase P-Holoenzym aus rekombinantem SynPP und Cyanellen-RNase P-RNAs wurde im molaren Verhältnis 2:1 durchgeführt (3.12.2.; Abb. 4-12).

A)



1	Substratkontrolle	8	Ribozymkontrolle
2	Pufferkontrolle	9	+ SynPP-Rekonstitution
3	SynPP-Kontrolle	10	Ribozymkontrolle
4	Rekonstitutionskontrolle (SynRPR + SynPP)	11	+ SynPP-Rekonstitution
5	M1-Produktkontrolle (Hochsalzpuffer P2)	12	Ribozymkontrolle
6	Cy-wt	13	+ SynPP-Rekonstitution
7	Ribozymkontrolle + SynPP-Rekonstitution		

B)



1	Substratkontrolle	6	Ribozymkontrolle
2	Pufferkontrolle	7	+ SynPP-Rekonstitution
3	M1-Produktkontrolle (Hochsalzpuffer P2)	8	Ribozymkontrolle
4	SynPP-Kontrolle	9	+ SynPP-Rekonstitution
5	Rekonstitutionskontrolle (SynRPR + SynPP)		

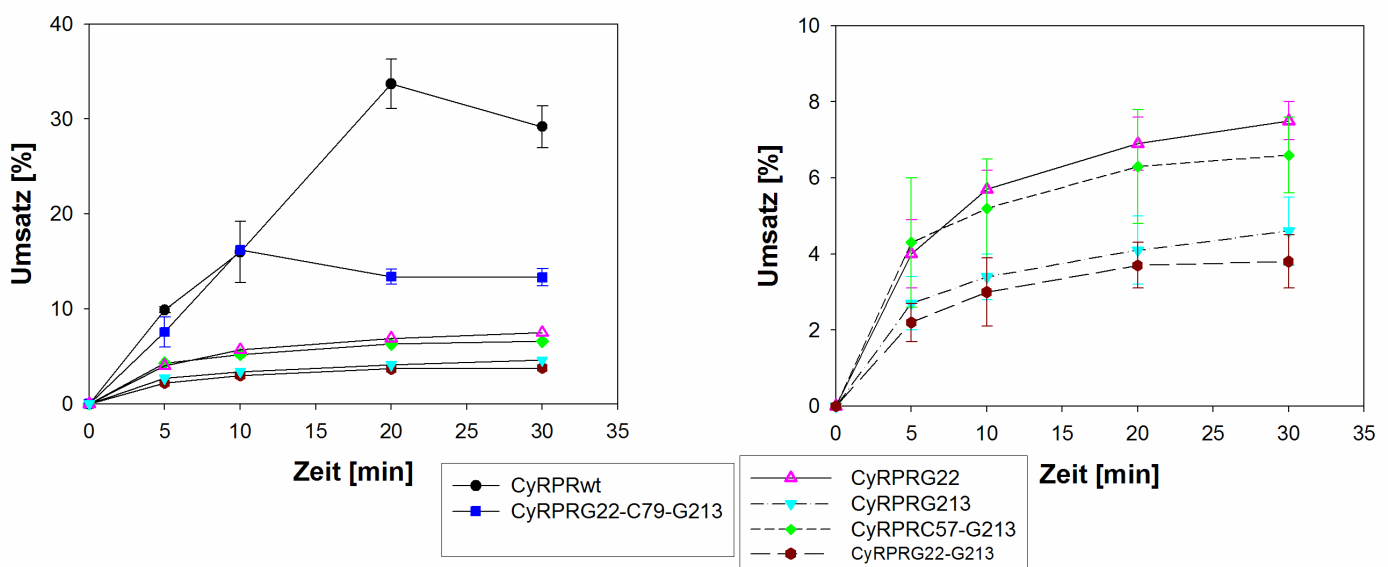
Abb. 4-12: Rekonstitution katalytisch aktiver Holoenzyme aus CyRPR und SynPP

A) und B): Die Aktivität wurde nach Rekonstitution (3.12.2.) mit 50 nM RNase P-RNA und 100 nM SynPP in Puffer F nach 60 min bei 37 °C bestimmt (3.12.3.1.). Die M1-Produktkontrolle wurde in Hochsalzpuffer P2 (3.12.1.) durchgeführt. Die Art der Mutation ist den jeweiligen Gelschemata zu entnehmen.

4.5.1.2. Vergleich der Prozessierungsaktivität von chimären Holoenzymen aus SynPP und Cyanellen-RNase P-RNAs

Um die katalytische Aktivität der chimären Holoenzyme vergleichen zu können, wurde die Kinetik des Prozessierungsverhaltens ermittelt.

Die Rekonstitution der Holoenzyme erfolgte wie unter 3.12.2. beschrieben. Die Prozessierung der als Substrat eingesetzten Cyanellen-pre-tRNA^{His} wurde analog der Beschreibung in 3.12.3.1. durchgeführt. Dabei wurden pro RNase P-RNA Mutante drei Zeitreihen aufgenommen. Aus den Autoradiographien wurde am PhosphoImager jeweils der absolute Substratumsatz ermittelt, wobei die abgeschnittenen 5'-Flanken mit einbezogen wurden. Aus diesen Datensätzen wurden Mittelwerte bestimmt, die in Abb. 4-13 zusammengefasst sind. Die Zeitreihen wurden alle mit frischen T7-Cyanellen-RNase P-RNAs (3.5.; Anhang I) durchgeführt, da ältere RNA-Präparationen niedrigere Substratumsätze zeigten. Um Fehler durch Konzentrationsabweichungen zu minimieren, wurden alle Komponenten mehrmals UV-vermessen. Für die SynPP-Untereinheit wurde stets eine frische Arbeitsverdünnung erstellt und mit dieser jeweils ein vollständiger Datensatz über alle Cyanellen-RNase P-RNAs erstellt.

**Abb. 4-13: Vergleich der Prozessierungsaktivität der chimären Holoenzyme**

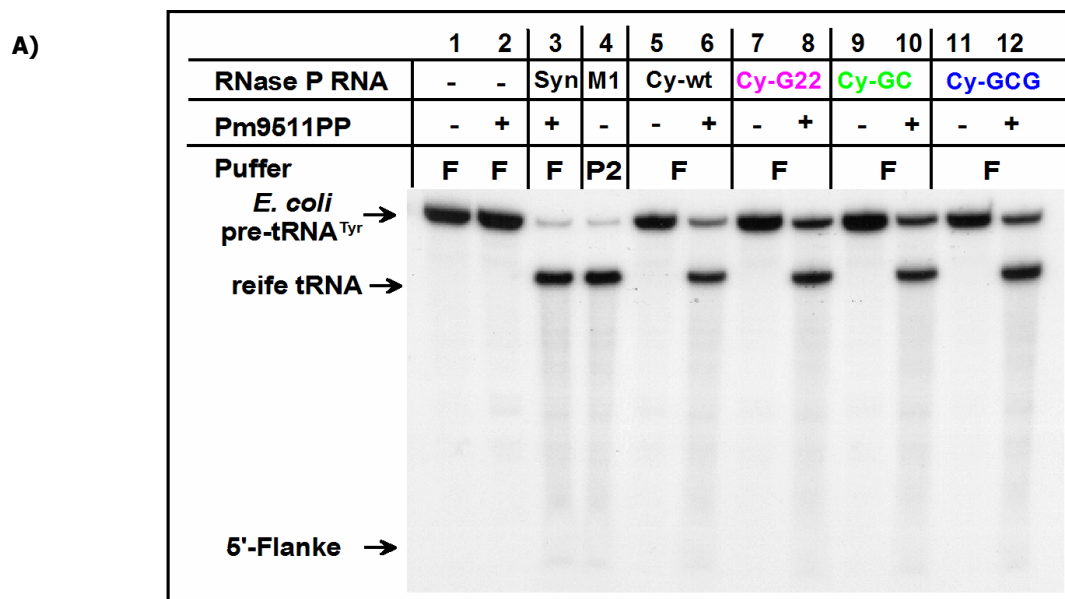
aus SynPP und Cy RNase P-RNA Mutanten (100 nM SynPP und 50 nM RNase P-RNA). Als Substrat wurde Cyanellen-pre-tRNA^{His} verwendet (50 nM), die Reaktionsparameter betragen 37 °C und 10 min. Aufgetragen ist der absolute Substratumsatz (%) gegen die Reaktionszeit (min). Die rechte Graphik zeigt den Bereich bis 10 % Substratumsatz vergrößert.

Die höchsten Umsatzraten werden für die Wildtyp-RNA (CyRPR_{wt}) und die Dreifach-Mutante (CyRPRG22-C79-G213) erreicht. Alle anderen Mutanten zeigen deutlich niedrigere Umsatzraten, die sich im Rahmen der Messgenauigkeit nicht signifikant voneinander unterscheiden.

4.5.1.3. Heterologe Rekonstitution chimärer Holoenzyme aus CyRPR und Pm9511PP

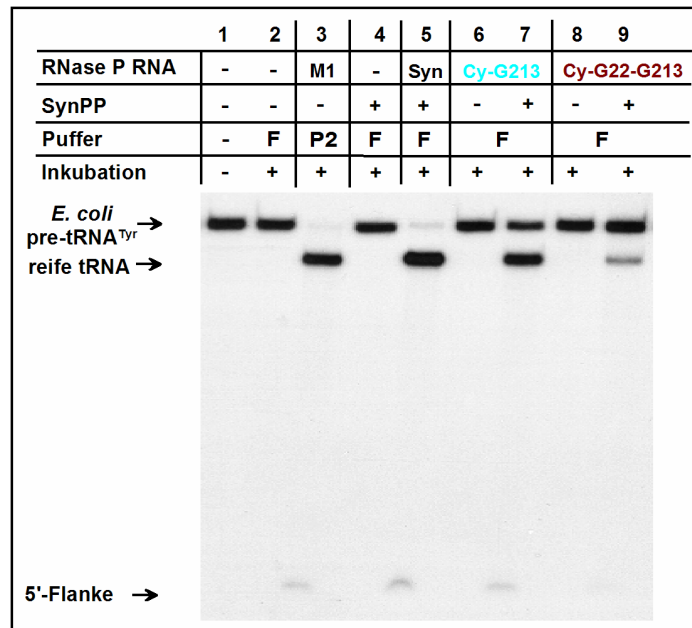
Die funktionelle Analyse eines weiteren cyanobakteriellen RNase P-Proteins aus *Prochlorococcus marinus* PCC9511 (Pm9511PP) sollte die für SynPP gefundenen Ergebnisse bestätigen und erweitern. Dabei unterscheidet sich Pm9511PP in Sequenz und Struktur stark von SynPP (Abb. 5-3). Da *P. marinus* RNase P-RNA im Gegensatz zu SynRPR über keine CCA-Erkennungssequenz verfügt (Hess *et al.*, 1998), könnten auch für die RNase P-Proteinuntereinheit Pm511PP im Vergleich zu SynPP veränderte Substratbindungseigenschaften erwartet werden.

Der Befund, dass cyanobakterielle Proteine zur funktionellen Rekonstitution chimärer RNase P-Holoenzyme mit plastidären RNase P-RNAs geeignet sind, konnte für Pm9511PP bestätigt und erweitert werden (Abb. 4-14).



1	Substratkontrolle	7	Ribozymkontrolle
2	Pm9511PP-Kontrolle	8	+ Pm9511PP -Rekonstitution
3	Rekonstitutionskontrolle (PmRPR + Pm9511PP)	9	Ribozymkontrolle
4	M1-Produktkontrolle (Hochsalzpuffer P2)	10	+ Pm9511PP -Rekonstitution
5	Cy-wt	11	Ribozymkontrolle
6	+ Pm9511PP -Rekonstitution	12	+ Pm9511PP -Rekonstitution

B)



1	Substratkontrolle	6	Ribozymkontrolle
2	Pufferkontrolle	7	+ Pm9511PP -Rekonstitution
3	M1-Produktkontrolle (Hochsalzpuffer P2)	8	Ribozymkontrolle
4	Pm9511PP-Kontrolle	9	+ Pm9511PP -Rekonstitution
5	Rekonstitutionskontrolle (PmRNA + Pm9511PP)		

Abb. 4-14: Rekonstitution katalytisch aktiver Holoenzyme aus CyRPR und Pm9511PP

A) und B) Prozessierung von *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} mit aus Pm9511PP (250 nM) und Cyanellen-RNase P-RNA (50 nM) Mutanten rekonstituierten Holoenzymen. Die Aktivität wurde in Puffer F nach 60 min bei 37 °C bestimmt (3.12.3.1.). Die Art der Mutation ist den jeweiligen Gelschemata zu entnehmen. Die M1-Produktkontrolle wurde in Hochsalzpuffer P2 (3.12.1.) durchgeführt.

4.5.1.4. Vergleich der Prozessierungsaktivitäten der CyRPR/Pm9511PP-Holoenzyme

Zum Vergleich der Prozessierungsaktivitäten der CyRPR/Pm9511PP-Holoenzyme aus Pm9511PP und unterschiedlichen CyRPR-Mutanten wurde die Aktivität über 30 min bei 37 °C bestimmt.

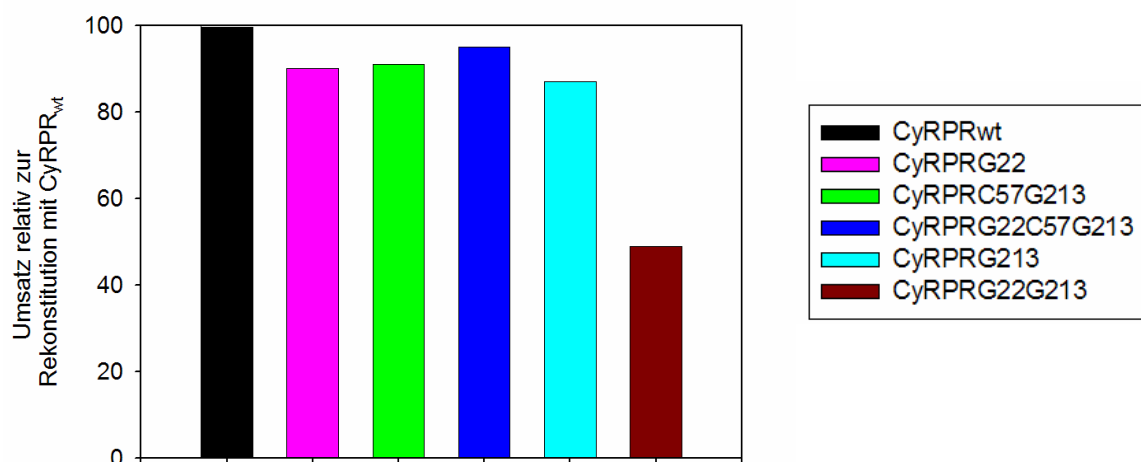


Abb. 1-15: Quantifizierung der Prozessierungsaktivität der chimären Holoenzyme

Gezeigt ist die Prozessierungsaktivität aus Pm9511PP und Cy RNase P-RNA Mutanten (250 nM SynPP und 50 nM RNase P-RNA). Als Substrat wurde *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} verwendet (50 nM); die Reaktionsparameter betragen 37 °C und 15 min.

4.5.2. Funktionelle Charakterisierung von RNase P-RNA aus *Glaucozystis nostochinearum*

Glaucozystis nostochinearum wird wie *C. paradoxa* zur Klasse der *Glaucophyceae* gezählt (Abb. 1-16). Die *G. nostochinearum* RNase P-RNA (GluRPR) weicht im Gegensatz zur *C. paradoxa* nur an Position A213 vom bakteriellen Konsensus ab und besitzt nur eine rudimentäre Helix P13 (Abb. 4-16). Der GluRPR-T7-Transkriptionsklon wurde von Menzel (2001) zur Verfügung gestellt.

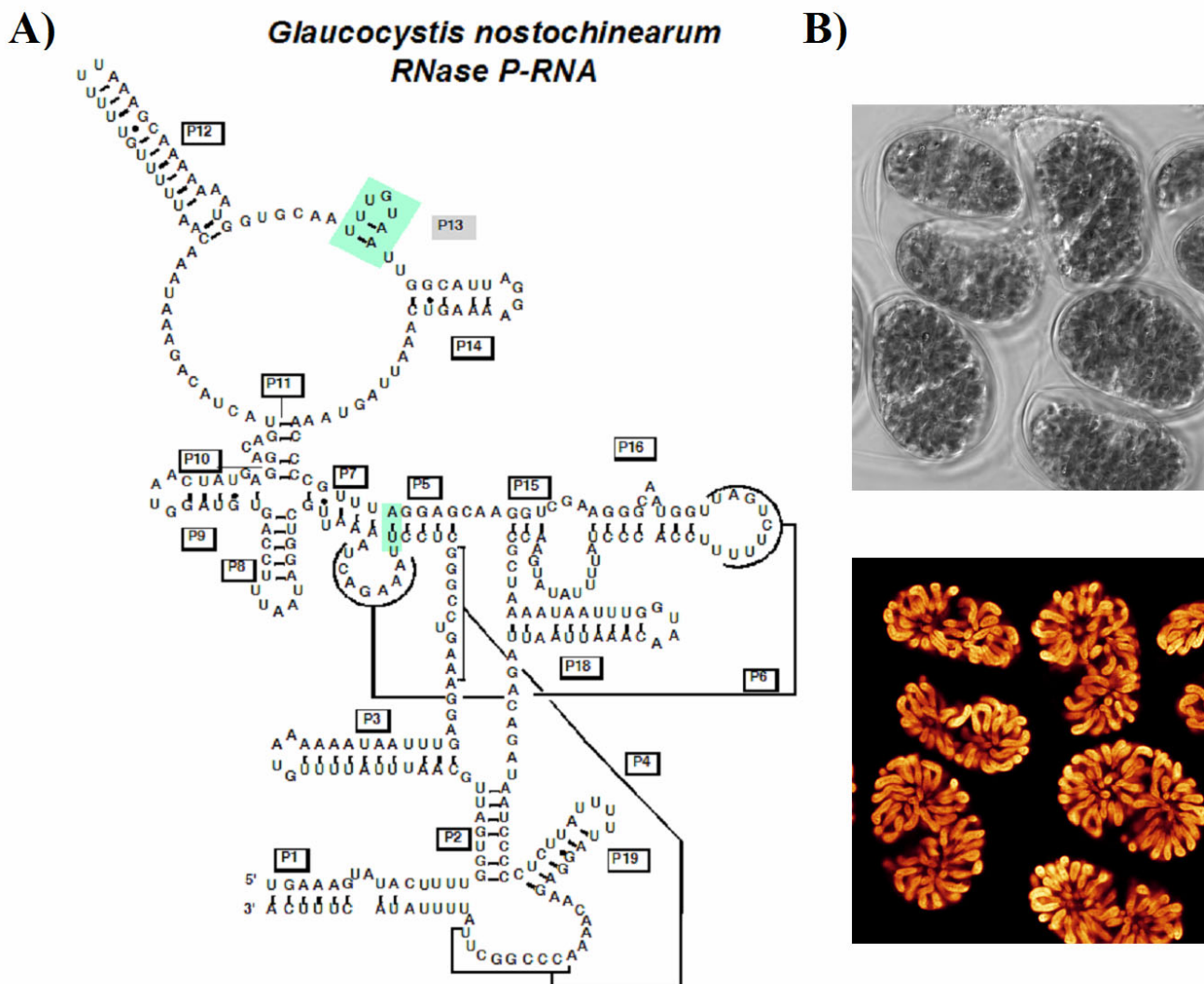


Abb. 4-16: Sekundärstruktur der RNase P-RNA aus *G. nostochinearum*

A) Das vom bakteriellen Konsensus abweichende Nukleotid A213 ist wie die verkürzte Helix P13 farblich hervorgehoben.

B) *G. nostochinearum* und ihre Plastiden im Phasenkontrast- und Fluoreszenzlicht. Die photosyntheseaktiven Cyanellen sind im Fluoreszenzbild deutlich zu erkennen. Die beiden Aufnahmen sind deckungsgleich. Sie wurden mit einem konfokalen *laser-scanning* Mikroskop von K. H. Rein (Institut für Genetik, Universität Würzburg) aufgenommen.

4.5.2.1. Ribozymeigenschaften von GlauRPR

Alle Ansätze zur *in vitro* Prozessierung von pre-tRNAs durch GlauRPR wurden nach 3.12.1. durchgeführt. Dabei zeigte GlauRPR - wie CyRPR - unter keiner der untersuchten Bedingungen Ribozymaktivität (Abb. 4-17):

Zusätze	Reaktionstemperatur/-zeit											
	37 °C 3 h/12 h			45 °C 3 h/12 h			70 °C 3 h			65 °C/10 min dann 45 °C/400 min		
	Puffer (Zusammensetzung 3.12.1.; pH-Werte 6,0; 7,0 und 8,0)											
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
kein Zusatz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,1 % (w/v) SDS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,05 % (v/v) NP40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SDS + NP40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abb. 4-17: Zusammenstellung der für GlauRPR getesteten Ribozym-Bedingungen

Angegeben sind die verwendeten Hochsalzpuffer (3.12.1.), Zusätze zu diesen Puffern und die Reaktionstemperaturen. Sind zwei Temperaturen angegeben, so wurde, um eine Konformationsänderung zur katalytisch aktiven Struktur zu ermöglichen, die RNase P-RNA zuerst in Reaktionspuffer denaturiert und anschließend langsam auf Reaktionstemperatur abgekühlt. Erst dann wurde Substrat zugegeben. "-" steht für nicht nachweisbare Produktbildung

Auch durch den Ersatz von Mg^{2+} gegen $100 \text{ nM } Mn^{2+}$, wie von Pannucci *et al.* (1999) für RNase P-RNAs aus Archaea vorgeschlagen, konnte keine Ribozym-Aktivität generiert werden.

4.5.2.2. Heterologe Rekonstitution mit GlauRPR und SynPP

Die heterologe Rekonstitution des chimären RNase P-Holoenzym aus rekombinantem SynPP und Cyanellen RNase P-RNAs wurde, wie unter 3.12.2. beschrieben, in Puffer F durchgeführt. Im Vergleich zu Rekonstitutionen mit CyRPR (Abb. 4-12 & 4-14) mussten die molaren Verhältnisse zwischen GlauRPR und SynPP für eine erfolgreiche Prozessierungsreaktion drastisch verändert werden: für eine erfolgreiche Rekonstitution zum katalytisch aktiven Komplex mussten sowohl höhere Konzentrationen an RNA und Protein eingesetzt, als auch SynPP im molaren Überschuss von 10:1 zugesetzt werden. Dieser Befund konnte nicht auf eine fortgeschrittene Degradation der Protein-Präparation zurückgeführt werden, da gleichzeitig Holoenzym mit CyRPR nach den unter in 4.5.1. beschriebenen Bedingungen generiert werden konnte. Die Reaktionsparameter der Rekonstitution betragen 37 °C und 10 min. Die anschließende Prozessierung der als Substrat verwendeten *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} wurde analog der Beschreibung in 3.12.3.1. durchgeführt (Abb. 4-18).

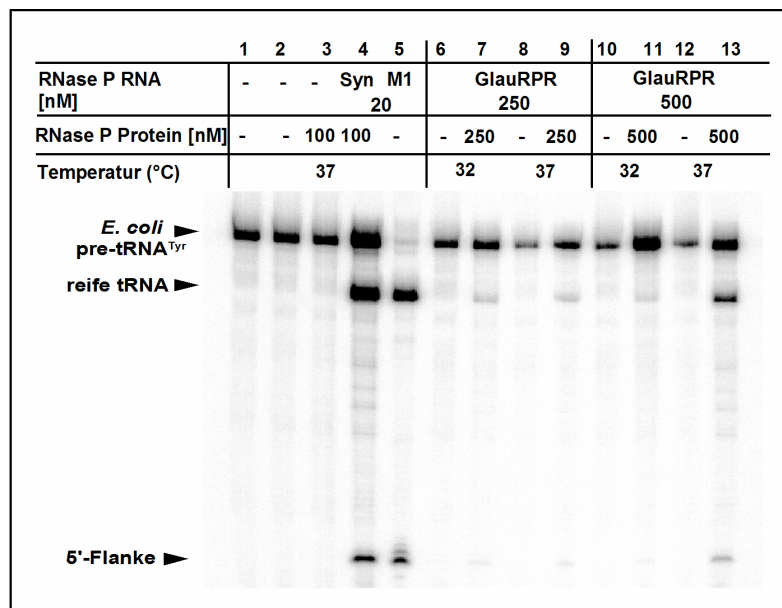


Abb. 4-18: Rekonstitution von chimärem Holoenzym aus GlauRPR und SynPP

Prozessierung von *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} durch aus SynPP und GlauRPR unter verschiedenen Bedingungen rekonstituiertem Holoenzym. Die Aktivität wurde für verschiedene molare Verhältnisse der Untereinheiten (500 nM SynPP) in Puffer F nach 60 min bei 37 °C bestimmt. Die M1-Produktkontrolle wurde in Hochsalzpuffer P2 (3.12.1.) durchgeführt.

1	Substratkontrolle	6	250 nM GlauRPR	32 °C	Ribozymkontrolle
2	Pufferkontrolle	7			+ SynPP-Rekonstitution
3	SynPP-Kontrolle	8		37 °C	Ribozymkontrolle
4	Rekonstitutionskontrolle (SynRPR + SynPP)	9	+ SynPP-Rekonstitution		
5	M1-Produktkontrolle (20 nM; Hochsalzpuffer)	10	500 nM GlauRPR	32 °C	Ribozymkontrolle
		11			+ SynPP-Rekonstitution
		12		37 °C	Ribozymkontrolle
		13			+ SynPP-Rekonstitution

4.6. Prozessierung des 5'-Endes von pre-tRNA^{Arg} und pre-tRNA^{Arg} Δ CCA durch chimäre RNase P

Cyanobakterielle *mnpB*-Gene codieren in der großen Mehrzahl nicht für das 3'-CCA-Bindungsmotiv der tRNAs (Brown, 1999). Dennoch zeigen diese RNase P-RNAs unter Ribozymbedingungen eine höhere Substratspezifität für pre-tRNAs mit 3'-CCA-Ende als für solche ohne (Fingerhut und Schön, 1998; Hess *et al.*, 1998).

Um zu untersuchen, ob die Protein-Untereinheit einen Beitrag zur Substratspezifität im rekonstituierten Holoenzym leistet, wurden Prozessierungskinetiken mit den Substraten mit pre-tRNA^{Arg} (besitzt ein 3'-CCA-Ende) und pre-tRNA^{Arg} Δ CCA (pre-tRNA^{Arg}_{G73}) durchgeführt. Das Substrat pre-tRNA^{Arg} Δ CCA verfügt nicht über ein 3'-CCA-Ende und schließt mit der Diskriminatorbase G73 ab.

Insgesamt wurden jeweils zwei bis drei Kinetiken pro pre-tRNA-Holoenzym-Kombination durchgeführt. Aus den Autoradiographien wurde am PhosphoImager jeweils der absolute Substratumsatz durch die Quantifizierung von Substrat, Produkt und abgeschnittener Flanke ermittelt. Aus diesen Datensätzen wurden Mittelwerte bestimmt, welche in den jeweiligen Abbildungen zusammengefasst sind.

4.6.1. Prozessierung von pre-tRNA^{Arg} und pre-tRNA^{Arg} Δ CCA durch PmRPR/Pm9511PP-Holoenzym

Zur Untersuchung der Substratspezifität im PmRPR/Pm9511PP-Holoenzym wurden Prozessierungskinetiken mit pre-tRNA^{Arg} und pre-tRNA^{Arg} Δ CCA (je 50 nM) nach (3.12.3.1.) durchgeführt. Die heterologe Rekonstitution hierzu wurde mit 25 nM CyRPR und 100 nM Pm9511PP nach 3.12.2. vorgenommen.

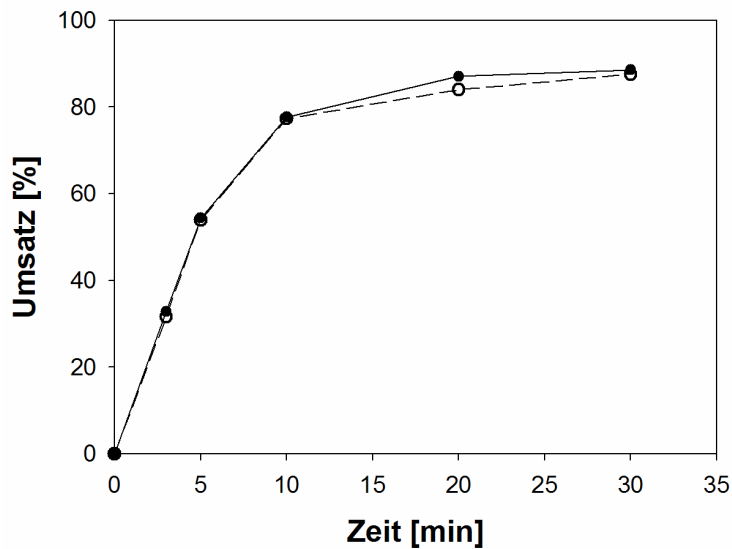


Abb. 4-19:

Prozessierung von pre-tRNA^{Arg} mit PmRPR/Pm9511PP Holoenzym

Aufgetragen ist der absolute Substratumsatz (%) gegen die Reaktionszeit (min). Der Graph mit den **gefüllten Kreisen** beschreibt den Umsatz von pre-tRNA^{Arg}. Der Umsatz von pre-tRNA^{Arg} Δ CCA ist durch nicht gefüllte Kreise symbolisiert.

4.6.2. Prozessierung von pre-tRNA^{Arg} und pre-tRNA^{Arg} Δ CCA durch CyRPR/Pm9511PP-Holoenzym

Zur Untersuchung der Substratspezifität im CyRPR/Pm9511PP-Holoenzym wurde die heterologe Rekonstitution mit 25 nM CyRPR und 150 nM Pm9511PP bei einer Substratkonzentration von 50 nM nach 3.12.2. vorgenommen.

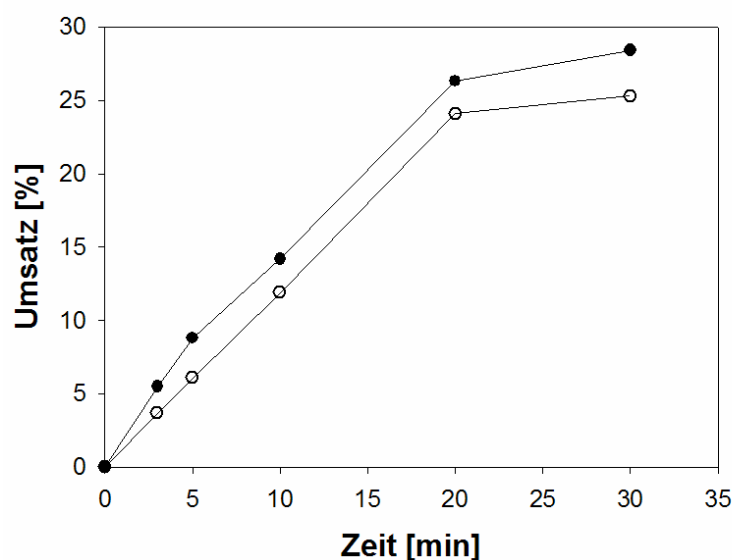


Abb. 4-20:

Prozessierung von pre-tRNA^{Arg} mit CyRPR/Pm9511PP Holoenzym

Aufgetragen ist der absolute Substratumsatz (%) gegen die Reaktionszeit (min). Der Graph mit den **gefüllten Kreisen** beschreibt den Umsatz von pre-tRNA^{Arg}. Der Umsatz von pre-tRNA^{Arg} Δ CCA ist durch nicht gefüllte Kreise symbolisiert.

4.6.3. Prozessierung von pre-tRNA^{Arg} und pre-tRNA^{Arg}ΔCCA durch CyRPR/SynPP-Holoenzym

Zur Untersuchung der Substratspezifität im CyRPR/SynPP-Holoenzym wurde die heterologe Rekonstitution mit 25 nM CyRPR und 50 nM SynPP nach 3.12.2. vorgenommen.

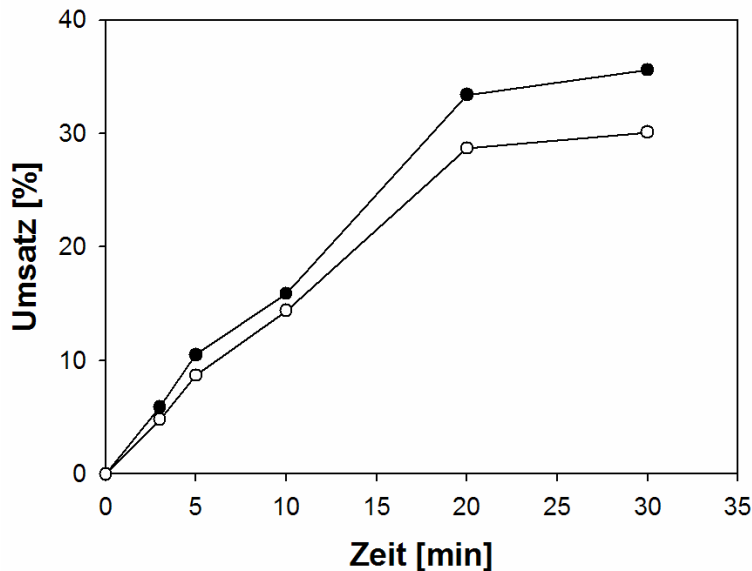


Abb. 4-21:

Prozessierung von pre-tRNA^{Arg} mit CyRPR/SynPP-Holoenzym

Aufgetragen ist der absolute Substratumsatz (%) gegen die Reaktionszeit (min). Der Graph mit den **gefüllten Kreisen** beschreibt den Umsatz von pre-tRNA^{Arg}. Der Umsatz von pre-tRNA^{Arg}ΔCCA ist durch nicht-gefüllte Kreise symbolisiert

4.7. Präparation von 5'-pre-tRNA-Prozessierungsextrakten aus den Cyanellen von *C. paradoxa*

Ziel solcher Präparationen war es, Extrakte zu erzeugen, die pre-tRNAs am 5'-Ende korrekt prozessieren konnten. Die Extrakte sollten möglichst wenige unspezifische Nukleasen enthalten und eine angereicherte RNase P-Aktivität besitzen.

Herstellung von S100-Extrakten

Alle zwei bis drei Wochen wurden 6 l *C. paradoxa*-Zellkultur, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befand, geerntet (ca. 6×10^9 Zellen/ml), die Cyanellen isoliert, schockgefroren und bei -80 °C gelagert (3.11.5.).

Aus den Cyanellen zweier Ernten wurden jeweils 10-15 ml prozessierungsaktiver S100-Extrakt hergestellt (3.10.3.). Der Proteingehalt wurde nach Bradford bestimmt (3.8.2.1.) und lag zwischen 11 und 14 mg Protein/ml Extrakt. Je nach zugedachter Verwendung wurde der Extrakt entsprechend aliquotiert. Die RNase P-Aktivität blieb bei -80 °C Lagerung über mehrere Wochen, in flüssigem Stickstoff über mehrere Monate, erhalten.

4.8. Immunologische Beziehung zwischen Cyanobakterien und Plastiden

CyRPR lässt sich mit den cyanobakteriellen Proteinen SynPP (4.5.1.1.) und Pm9511PP (4.5.1.3.) zum katalytisch aktiven Holoenzym rekonstituieren. Da deshalb funktionelle und strukturelle Ähnlichkeiten zwischen plastidären und cyanobakteriellen RNase P-Proteinen angenommen werden können, wurde die Spezifität von α -SynPP-AB (4.2.) gegen CyRP untersucht. Zu diesem Zweck wurden jeweils 150-200 μ g Gesamtprotein aus einem *C. paradoxa* S100-Extrakt in die Taschen eines SDS-Polyacrylamidgels (10-15 %; 1 mm Dicke) aufgetragen. Ein solches Gel gewährleistet eine gute Auftrennung der Proteine im Molekulargewichtsbereich von 10-15 kD und erlaubt gleichzeitig einen effizienten Transfer der Proteine aus der Gelmatrix auf die Membran. Die Übertragung der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde nach dem *Semi-Dry*-Verfahren für 90 min bei 25 V (3.8.5.) durchgeführt. Nach dem Protein-Transfer folgten die Antikörperinkubation mit α -SynPP-AB (1:1000 Verdünnung) und Nachweis über Chemolumineszenz (3.8.7.).

Durch Bindung der SynPP-spezifischen Antikörper wurden immunologisch verwandte Proteine nachgewiesen. Abb. 4-22 zeigt das erhaltene Bindungsmuster für prozessierungsaktive S100-Extrakte aus *E. coli*, *Synechocystis* und den Cyanellen von *C. paradoxa*. Als Kontrolle dient gereinigtes rekombinantes SynPP. Der Immunoblot zeigt spezifische Signale im homologen *Synechocystis* PCC 6803 und im Cyanellen-S100-Extrakt, jedoch keinerlei Bindung des RNase P Proteins aus *E. coli*. Das mit Pfeil **A** markierte Signal ist auf Eigenfluoreszenz des *Cyanophora*-Extraktes zurückzuführen. Eine Überdeckung von Antikörper-spezifischen Signalen im Bereich 15 kD kann nicht ausgeschlossen werden.

Ein deutliches spezifisches Signal befindet sich auf Höhe von Pfeil **B** bei ca. 28-30 kD (Abb. 4-22).

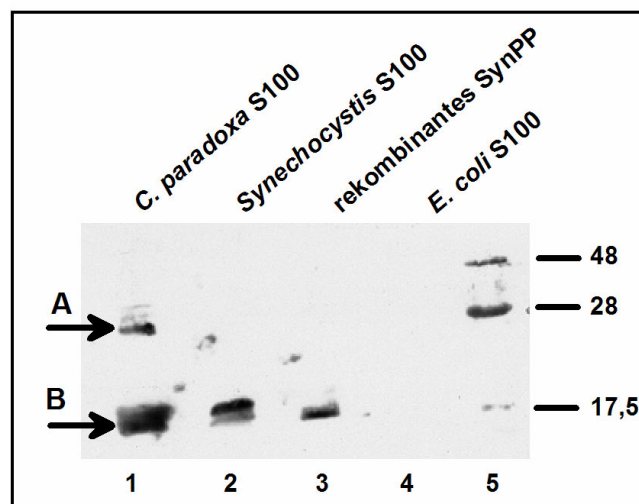


Abb. 4-22: Immunoblot von RNase P-Proteinen

Je 150 μ g S100 Extrakte aus *C. paradoxa* Cyanellen (Spur 1), dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC6803 (Spur 2) und *E. coli* (Spur 4), sowie rekombinantes SynPP (10 ng; Spur 3) wurden auf einem 10-15 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran wurden immunologisch verwandte Proteine durch die Bindung SynPP-spezifischer Antikörper (1:1000) nachgewiesen. Am rechten Rand sind die Molekulargewichte des mitaufgetragenen Protein-Längenstandards angegeben IV (kD). Im Text erwähnte Signale sind entsprechend gekennzeichnet.

Das Ergebnis steht in Widerspruch zu den Ergebnissen von Pascual und Vioque (1999), welche mit α -SynPP-AB in den Cyanellen aus *C. paradoxa* kein entsprechendes Signal detektieren konnten.

Um die eigenen Ergebnisse und die Spezifität der α -SynPP-AB-Präparation zu bestätigen, wurden deshalb Immunopräzipitations-Versuche angestellt.

4.9. Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität mit α -SynPP-AB

4.9.1. Kovalente Kopplung von α -SynPP-AB an Protein-A-Sepharose

Die kovalente Kopplung von α -SynPP-AB an Protein-A-Sepharose wurde wie unter 3.8.8.1. beschrieben durchgeführt. Dabei wurden pro 10 mg Protein-A-Sepharose 25 μ g durch Ammoniumsulfat-Fällung gereinigter (3.8.9.2.) Antikörper eingesetzt. Die Qualität der Kopplung bzw. die Menge von gekoppeltem α -SynPP-AB wurde durch SDS-Gelelektrophorese (3.8.3.) überprüft bzw. abgeschätzt. Durchschnittlich wurden 10-15 μ g Antikörper pro Ansatz an die Protein-A-Sepharose gekoppelt.

4.9.2. Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität aus *Synechocystis* S100-Extrakt mit α -SynPP-AB

Vor heterologen Immunopräzipitationsversuchen mit α -SynPP-AB gegen Cyanellen-Extrakt wurde das experimentelle Vorgehen im homologen System für *Synechocystis* S100-Extrakt etabliert.

Um während der Präzipitation ein unspezifisches Binden von Proteinen des *Synechocystis* S100-Extrakts an Protein-A-Sepharose auszuschließen, wurde der S100-Extrakt vor der eigentlichen Immunoreaktion mit in Puffer F+ äquilibrierter Protein-A-Sepharose inkubiert. Es zeigte sich, dass der Zusatz von RNasin und diversen Protease-Inhibitoren wesentlichen Einfluss auf den Erfolg der Präzipitation und den anschließenden Aktivitätstest hat (3.8.8.2.). Der so behandelte S100-Extrakt (100 μ g) wurde zu 20 mg Protein-A-Sepharose mit gekoppeltem α -SynPP-AB gegeben und bei 4 °C unter ständiger Rotation über Nacht inkubiert. Die Protein-A-Sepharose wurde durch Zentrifugation isoliert und mehrmals gewaschen. Dabei wurde nach jedem Arbeits- bzw. Waschschrift ein Aliquot des Überstands- bzw. Waschlösung für einen späteren Test auf Prozessierungsaktivität zurückgestellt.

Die einzelnen Fraktionen wurden mit *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} als Substrat auf ihre Prozessierungsaktivität hin getestet (3.12.3.2.). Die Spuren 1-3 zeigen Kontrollen zum Aktivitätsnachweis (Abb. 4-23): Während Spur 1 unbehandeltes Substrat zeigt, ist in Spur 2 Substrat aufgetragen, welches in Reaktionspuffer (= Puffer F) den Prozessierungsbedingungen unterworfen wurde. Als Produktkontrolle wurde eine SynRPR-Ribozym-Reaktion in Hochsalzpuffer P2 (3.12.1.) durchgeführt (Spur 3). Kontrollen zur Prozessierungsaktivität des *Synechocystis* S100-Extrakts sind durch die Reaktionen 4 und 5 berücksichtigt. Während 4 die RNase P-Aktivität in frisch aus Stickstoff aufgetautem S100-Extrakt zeigt, wurde Reaktion 5 mit Extrakt durchgeführt, der den gleichen Bedingungen (Temperatur, Dauer der Inkubation) ausgesetzt war, wie der Extrakt des Immunopräzipitations-Vorgangs. Beide Reaktionen zeigen das erwartete Produkt bei deutlichem Umsatz. Die Aktivität des Überstands nach der Inkubation mit Protein-A-Sepharose gekoppelten α -SynPP-AB wurde in Ansatz 6 detektiert. Da hier ein sehr deutlicher Substratumsatz (> 90 %) zu erkennen ist, kann davon ausgegangen werden, dass keine quantitative Präzipitation des RNase P-Holoenzym stattgefunden hat. Diese wurde auch in anderen Versuchsansätzen nie erreicht. In den Reaktionen 7-10 wurden die Waschfraktionen 1 und 2 analysiert. Dabei sollte insbesondere durch die Reaktionen 9 und 10 untersucht werden, ob zu intensives Waschen des gebundenen Holoenzym zu dessen Degradation bzw. zur Ablösung der RNA-Untereinheit führt. Hierzu wurden 250 μ l der Waschfraktionen ethanolpräzipitiert und in Hochsalz-

puffer aufgenommen. Wäre es zum Verlust der RNA-Untereinheit im Holoenzym gekommen, hätte die RNA durch ihre spezifische Ribozymaktivität im Hochsalzpuffer in den entsprechenden Ansätzen nachgewiesen werden können. Das war nicht der Fall. Die mit ★ gekennzeichneten Banden sind auf unspezifische Hydrolyse im Hochsalzpuffer zurückzuführen. Spur 11 zeigt die durch Bindung an den Antikörper präzipitierte RNase P-Aktivität aus *Synechocystis* S100-Extrakt.

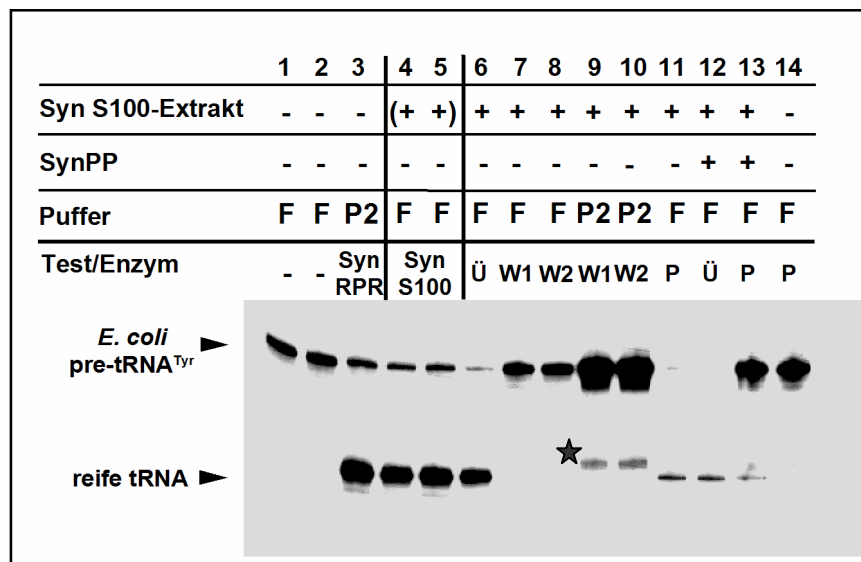


Abb. 4-23: Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität aus *Synechocystis* S100-Extrakt mit α -SynPP-AB

Prozessierungsaktive S100 Extrakte aus *Synechocystis* wurden mit SynPP-spezifischen trägergekoppelten Antikörpern behandelt. Nach Inkubation und mehreren Waschschritten wurden die Sepharose-Kügelchen direkt in RNase P-Aktivitäts-Tests (3.12.2.) eingesetzt. Als Substrat wurde *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} verwendet und auf einem 12 % PAA-Gel aufgetrennt. Mit einem Stern gekennzeichnete Signale werden im Text diskutiert (Ü = Überstand; P = Sepharose-Pellet, W = Waschfraktion; Puffer vgl. 3.12.).

1	Kontrollen zur <i>E. coli</i> pre-tRNA ^{Tyr} - Prozessierung	.9	Waschfraktionen 1 und 2 nach Antikörper-Bindung
2		10	in Hochsalzpuffer
3		11	Antikörper-gebundene RNase P-Aktivität im Pellet
4	Kontrollen zur Prozessierungsaktivität des <i>Synechocystis</i> S100-Extrakts	12	Immunopräzipitation mit Antikörpern, welche mit
5		13	homologem Antigen (SynPP) inhibiert wurden
6	Überstand nach Antikörper-Bindung	14	an Protein-A-Sepharose gekoppelter α -SynPP-AB
7		7	Waschfraktionen 1 und 2 nach Antikörper-
8	8	8	Bindung in Puffer F

Wurde der verwendete Antikörper vor der Immunopräzipitationsprozedur mit homologem Antigen (SynPP) inkubiert, so wurde die Präzipitation des Holoenzym deutlich inhibiert (Spur 13). Die RNase P-Aktivität wurde nahezu vollständig im Überstand detektiert (Spur 12). Wurden an Protein-A-Sepharose gekoppelte Antikörper unter Prozessierungsbedingungen mit Substrat inkubiert, fand keine Prozessierung statt (Spur 14). Eine Verunreinigung der verwendeten Antikörper-bzw. Sepharose-Präparation mit unspezifischen Nukleasen konnte deshalb ausgeschlossen werden.

Nach diesem ersten erfolgreichen Test der Immunopräzipitation als Methode zur Isolierung von RNase P-Aktivität wurde die Methode auf das heterologe System mit den cyanobakterien-spezifischen Antikörpern im *C. paradoxa* Cyanellen-Extrakt übertragen.

4.9.3. Immunopräzipitation der *C. paradoxa* Cyanellen-RNase P-Aktivität mit cyanobakterien-spezifischen Antikörpern

Unspezifisch an Protein-A-Sepharose bindende Proteine des *C. paradoxa* Cyanellen S100 Extrakts wurden entfernt (3.8.8.2.) und der Extrakt (500 µg) anschließend mit an die Protein-A-Sepharose-Matrix gekoppelten Antikörpern inkubiert (4.9.2.).

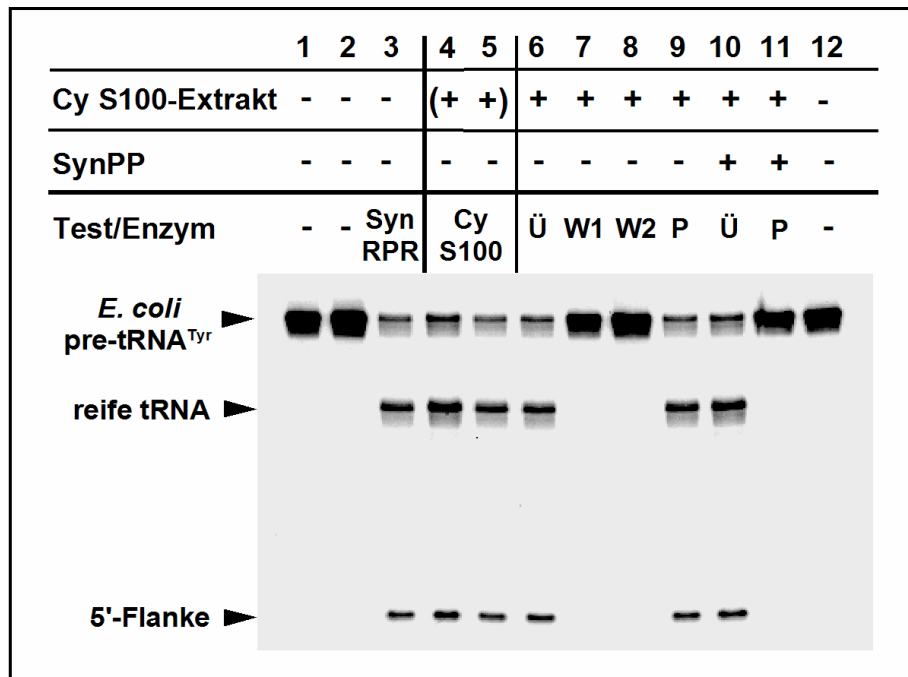


Abb. 4-24: Immunopräzipitation der Cyanellen-RNase P-Aktivität mit α -SynPP-AB

Prozessierungsaktiver S100 Extrakt aus *C. paradoxa* Cyanellen wurden mit SynPP-spezifischen trägergekoppelten Antikörpern behandelt. Nach Inkubation und mehreren Waschschrritten wurden die Sepharose-Kügelchen direkt in RNase P-Aktivitäts-Tests (3.12.3.) eingesetzt. Als Substrat wurde *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} verwendet und nach der Reaktion auf einem 12 % PAA-Gel aufgetrennt (Ü = Überstand; P = Sepharose-Pellet, W = Waschfraktion).

1	Kontrollen zur <i>E. coli</i> pre-tRNA ^{Tyr} -	7	Waschfraktionen nach Antikörper-Bindung
2	Prozessierung	8	
3		9	Antikörper-gebundene RNase P-Aktivität im Pellet
4	Kontrollen zur Prozessierungsaktivität des	10	Immunopräzipitation mit Antikörpern, welche mit homologem
5	<i>C. paradoxa</i> S100-Extrakts	11	Antigen (SynPP) inhibiert wurden
6	S 100 Überstand nach Antikörper-Bindung	12	an Protein-A-Sepharose gekoppelter α -SynPP-AB

Abb. 4-24 zeigt die Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität aus den Cyanellen von *C. paradoxa* mit cyanobakterien-spezifischen α -SynPP-AB. Als Substrat wurde [³²P]-markierte *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} verwendet und auf einem 12 % PAA-Gel analysiert. Wie für die Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität aus *Synechocystis* S100-Extrakt mit α -SynPP-AB ausführlich beschrieben, (4.9.2.) zeigen die Reaktionen 1-5 Kontrollreaktionen zu tRNA-Prozessierung und zur Prozessierungsaktivität des verwendeten Cyanellen-S 100-Extrakts (Spur 1-5). Die Aktivität des überstehenden S100-Extrakts wurde, nachdem dieser mit an Protein-A-Sepharose gekoppelten Antikörpern inkubiert wurde, in Reaktion 6 detektiert. Da hier deutlicher Substratumsatz zu erkennen ist, kann davon ausgegangen werden, dass keine quantitative Präzipitation des RNase P-Holoenzym stattgefunden hat. Diese wurde auch in anderen Versuchsansätzen nie erreicht. Die Überstände der ersten beiden

Waschschritte des Protein-A-Sepharose-Pellets zeigten keine Prozessierungsaktivität (Spuren 7 und 8). Spur 9 zeigt deutlich die durch Antikörperbindung mit cyanobakteriellem α -SynPP-AB präzipitierte RNase P-Aktivität aus *C. paradoxa* Cyanellen. Für diesen Reaktionstest wurde die Sepharose-Matrix mit gekoppeltem Antikörper bzw. gebundenem RNase P-Holoenzym direkt in einer Prozessierungsreaktion nach Standardbedingungen eingesetzt (3.12.3.2.). Eine Elution des funktionstüchtigen Holoenzym vom Trägermaterial war nicht möglich, da alle bekannten Elutionsverfahren den Zerfall des RNase P-Holoenzym bewirken würden (3.8.8.3).

Wurde der verwendete Antikörper vor der Immunpräzipitation mit homologem Antigen (SynPP) inkubiert, so fand keine Präzipitation des CyRP-Holoenzym statt. Dies steht im Gegensatz zum *Synechocystis* S100-Extrakt, der keine vollständige Bindung bzw. Präzipitierung des Holoenzym zeigt (Spur 10; 4-23). Die Cyanellen-RNase P-Aktivität wurde nahezu vollständig im Überstand detektiert (Spur 11).

Eine Verunreinigung der verwendeten Antikörper-Präparation mit unspezifischen Nukleasen konnte ausgeschlossen werden (Spur 12). Der Zusatz von RNasin und verschiedenen Protease-Inhibitoren über alle Stufen der Präzipitation erwies sich als zwingend erforderlich (3.8.8.2.).

4.10. Darstellung und Charakterisierung zirkular permutierter Cyanellen-RNase P RNA mit kovalent verknüpfter pre-tRNA

C. paradoxa Cyanellen RNase P-RNA zeigt keine Ribozymaktivität (Baum, 1995; Baum *et al.*, 1996; 1.6.4.). Da bereits eine kurze Behandlung mit Mikrococcusnuklease das Cyanellen-RNase P-Holoenzym irreversibel inaktiviert, ist davon auszugehen, daß das katalytische Zentrum der RNA-Untereinheit trotz der Abweichungen vom bakteriellen Konsensus funktionstüchtig ist. Es wird deshalb eine Störung der Substraterkennung oder der Bindung von Mg^{2+} -Ionen durch die isolierte RNase P-RNA postuliert (Baum *et al.*, 1996). Um die Frage zu beantworten, ob die fehlende Ribozymaktivität von CyRPR auf das Fehlen der Fähigkeit zur Substratbindung zurückzuführen ist, wurde eine zirkular permutierte Cyanellen-RNase P-RNA (cpCyRPR) mit kovalent verknüpften pre-tRNAs konstruiert. Derartige Konstrukte aus bakteriellen RPRs zeigen die volle Prozessierungsaktivität (Kikuchi *et al.*, 1993; Kikuchi und Suzuki-Fujita, 1995; Frank *et al.*, 1994). Die zu hydrolysierende Phosphodiesterbindung ist dabei in direkter Nähe zum postulierten katalytischen Zentrum P4 fixiert (Chen und Pace, 1997). Die Flankenlängen der Substrate wurden variiert, um sterische Probleme möglichst auszuschließen (Abb. 4-25).

Die zirkular permutierte RNase P-RNA wurde durch eine Dimerisierung des *mnpB*-Gens erstellt, um die RNase P-RNA an jeder beliebigen Stelle unterbrechen und anschließend die pre-tRNA an jedes beliebige der neuen Enden anfügen zu können. Da bereits frühere kinetische Analysen zeigten, dass die enzymatische Aktivität der RNase P durch die notwendige Unterbrechung des ursprünglichen Phosphodiesterückgrats kaum beeinflusst wird (Guerrier-Takada und Altman, 1992; Waugh und Pace, 1993; Harris *et al.*, 1994), kann das Substrat an jeder beliebigen Stelle der zirkular permutierten RNase P-RNA eingefügt werden.

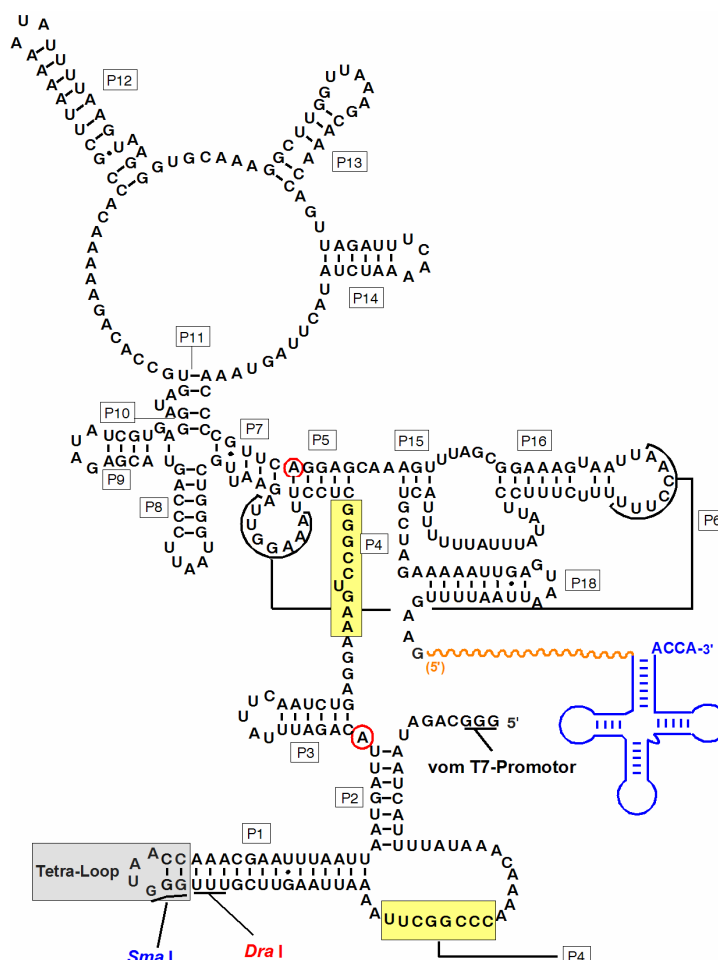


Abb. 4-25:

Zirkular permutierte *C. paradoxa* RNase P-RNA.

Die ursprünglichen Enden der RNA wurden durch einen *Tetra-loop* geschlossen (grau unterlegt). Die pre-tRNA-Substrate (blau) mit unterschiedlichen Flankenlängen (orange schematisiert; Anhang III) wurden in J18/2 integriert. Die hochkonservierte Helix P4, die für die Mg^{2+} -Bindung essentiell ist, ist gelb unterlegt. Die beiden Abweichungen vom bakteriellen Konsensus sind rot markiert.

4.10.1. Klonierung der zirkular permutierten RNase P-RNA pCyP305Tetra

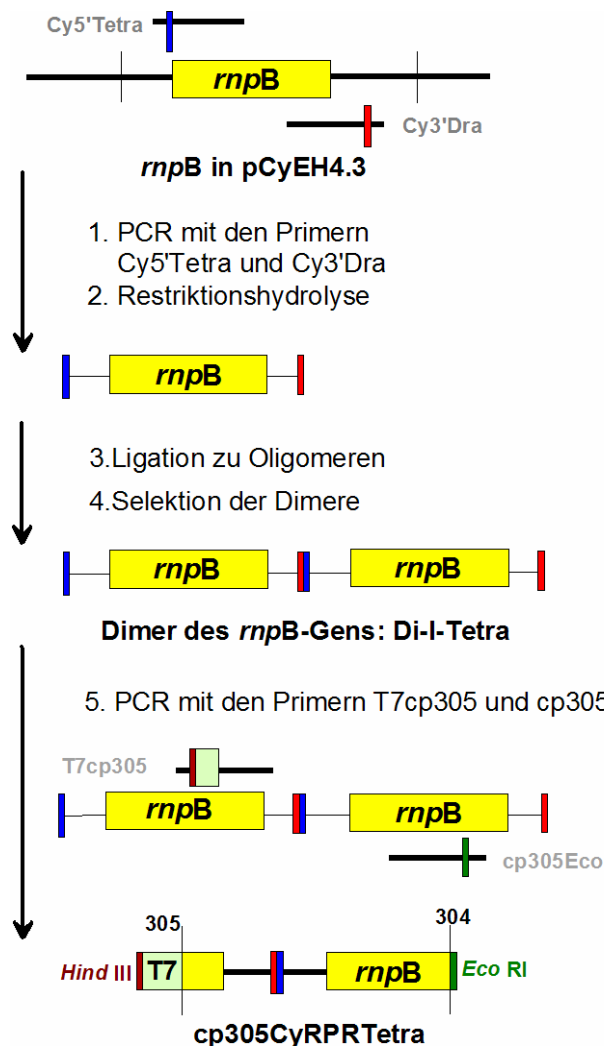


Abb. 4-26: Klonierung von pCyP305Tetra

Details der Klonierung siehe Text. Das *rnpB*-Gen ist gelb dargestellt. Alle verwendeten Primer sind in grauer Schrift benannt. Restriktionsschnittstellen sind farbig dargestellt und entsprechend beschriftet. (2D-Struktur von pCyP305Tetra siehe Anhang III).

Um das zirkular permutierte *rnpB*-Gen mit assoziiertem pre-tRNA-Gen unter Kontrolle des T7-Promotors zu erhalten, wurden zunächst zwei *rnpB*-Gene mit Linker hintereinander kloniert. Dieses Gen-Dimer diente als Matrize für eine PCR, durch welche das zwischen Nukleotid 305 und 304 zirkular permutierte *rnpB*-Gen erstellt wird (Abb. 4-26). Ausgehend vom Plasmid pCyEH4.3 wurde das *rnpB*-Gen durch PCR mit den Primern Cy5'Tetra und Cy3'Dra amplifiziert (1) und anschließend mit *Sma*I und *Dra*I hydrolysiert (2). Das Produkt wurde aufgereinigt und direkt zur Ligation mit T4-DNA-Ligase eingesetzt (3). Diese Reaktion erfolgte über 48 h bei 4 °C. Das erhaltene Oligomeregemisch wurde zur Dimer-Isolierung durch ein Agarosegel aufgetrennt (4) und die Dimer-Bande Di-I-Tetra bei etwa 800 bp eluiert. Di-I-Tetra wurde durch eine weitere PCR-Reaktion (5) unter Verwendung der Primer T7cp305 (*Hind*III) und cp305Eco (*Eco*RI) mit unterschiedlichen überhängenden 3'- und 5'-Schnittstellen versehen. So wurde eine gerichtete Klonierung ermöglicht. T7cp305 stattet das Konstrukt zusätzlich mit dem für eine spätere Transkription der zirkular permutierten RNA unerlässlichen T7-Promotor aus. Für eine korrekte Spaltung der Enden des PCR-Produkts cp305CyRPRTetra wurde der PCR-Ansatz mit *Eco*RI und *Hind*III hydrolysiert und mittels *PCR Purification Spin Kit* (Genomed) aufgereinigt. Das Konstrukt cp305CyRPRTetra wurde abschließend in den entsprechend vorbereiteten Vektor pUC19 ligiert um das Plasmid pCyP305Tetra zu ergeben.

4.10.2. Ligation des Substrat-pre-tRNA-Gens

Um sterische Probleme bei der Prozessierung weitgehend auszuschließen, wurden Art und Flankenlänge der mit pCpP305Tetra verknüpften pre-tRNAs variiert.

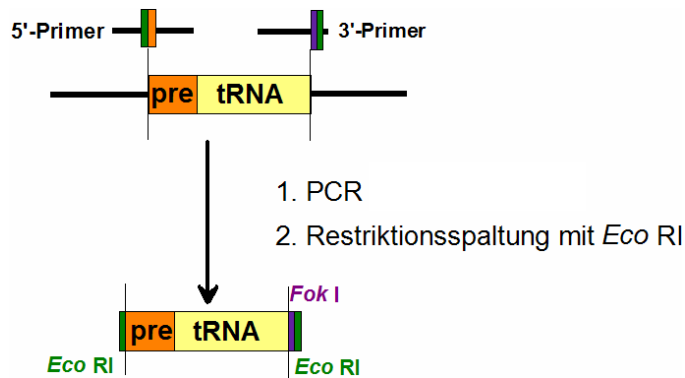


Abb. 4-27:

Herstellung der pre-tRNAs-Inserts

Die in den verschiedenen Konstrukten in der Länge variiierende pre-tRNA-Flanke ist orange dargestellt. Die Zuordnung der Primer zum jeweiligen tRNA-Gen und ihre Bezeichnung sind Abb. 4-28 zu entnehmen.

An die 5'- und 3'-Enden der pre-tRNA codierenden Regionen der jeweiligen Plasmide wurde durch PCR (Abb. 4-28; 3.4.1.) eine *Eco*RI Restriktionsschnittstelle addiert. Die 3'-Startsequenzen verfügten jeweils zusätzlich über eine *Fok*I Erkennungssequenz um eine spätere Linearisierung des Zielplasmids für die *run-off* Transkription zu ermöglichen. Direkt nach der PCR wurden die Ansätze jeweils mit *Eco*RI gespalten und mit Hilfe des *PCR Purification Spin Kit* (*Genomed*; 3.4.5.) gereinigt.

codierte pre-tRNA	5'-Flankenlänge	Ausgangsplasmid	Startoligonukleotide
Gerste pre-tRNA ^{Glu}	28 Nukleotide	pGlu5'wt	As1 und Glu3'Eco
<i>E. coli</i> pre-tRNA ^{Tyr}	15 Nukleotide	pSu3-wt	Fl15Tyr und TyrRev
-"-	17 Nukleotide	pSu3-wt	Fl17Tyr und TyrRev
-"-	19 Nukleotide	pSu3-wt	Fl19Tyr und TyrRev

Abb. 4-28: Zur Fusion mit pCpP305Tetra vorbereitete pre-tRNA-Gene

Die so vorbereiteten Inserts wurden in das ebenfalls *Eco*RI geschnittene und dephosphorylierte Plasmid (3.7.2.) pCpP305Tetra ligiert (Abb. 4-29; 3.7.4.). Die Sequenzen der zirkular permutierten CyRPR mit kovalent gekoppelter pre-tRNA befinden sich in Anhang III.

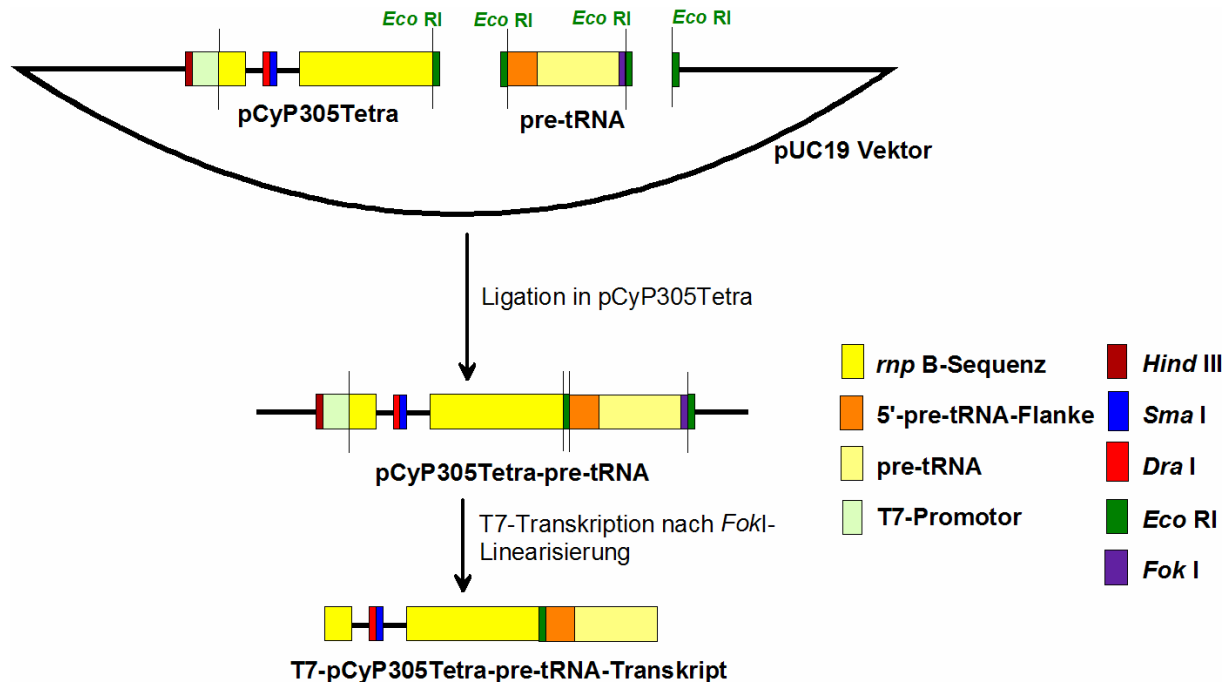


Abb. 4-29: Konstruktion der Plasmide pT7CyP305Tetra-pre-tRNA

Alle dargestellten zirkular permutierten RNase P-RNAs (gelb) unterscheiden sich in der 5'-Flankenlänge (orange) der konjugierten pre-tRNAs (vanille). Die einzelnen Konstrukte werden durch Angabe der Flankenlänge und Art der konjugierten pre-tRNA benannt: z.B. pT7CyP305Tetra15Tyr. Die Anordnung der zur Transkription wichtigen Sequenz-Elemente T7-Promotor (hellgrün) und *FokI*-Schnittstelle (violett) ist der Abbildung zu entnehmen. Zusätzlich sind alle weiteren für die Klonierung der pT7CyP305Tetra-pre-tRNA-Konstrukte (pT7CyP305Tetraxxx) entscheidenden Restriktionsschnittstellen berücksichtigt.

Von den so hergestellten Plasmiden pT7CyP305Tetra35Glu, pT7CyP305Tetra15Tyr, pT7CyP305Tetra17Tyr und pT7CyP305Tetra19Tyr wurden präparativ T7-Transkripte erstellt (3.5.2.). In einigen präparativen Transkriptions-Ansätzen wurde der Reaktion 50 μCi [$\alpha^{32}\text{P}$]-rGTP zugesetzt, um das T7-Transkript radioaktiv zu markieren und so eine spätere Produkt-Detektion zu erleichtern.

4.10.3. Funktionelle Charakterisierung von cpCyRPR-pre-tRNA

4.10.3.1. Ribozymeigenschaften von cpCyRPR-pre-tRNAs

Alle Ansätze zur *in vitro* Prozessierung von cpCyRPRs wurden nach 3.12.1. durchgeführt. Dabei zeigten die cpCyRPR-Konstrukte - wie CyRPR - unter keiner der getesteten Bedingungen nachweisbare Ribozymaktivität (Abb. 4-30):

cpCyRPRxxx	Reaktionsbedingungen												
	Denaturierung (10 min; 65 °C)	ja			ja			ja			nein		
	Temperatur	37 °C			37 °C			42 °C			72 °C		
	Zeit	1 h			12 h			6 h			2 h		
		Puffer											
	Zusätze	(Zusammensetzung 3.12.1.; pH-Werte 6,0; 7,0 und 8,0)											
		P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
cpCyRPR35Glu	kein Zusatz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,1 % (w/v) SDS	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
	0,05 % (v/v) NP40	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
	SDS + NP40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CpCyRPR15Tyr	kein Zusatz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,1 % (w/v) SDS	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
	0,05 % (v/v) NP40	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
	SDS + NP40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CpCyRPR17Tyr	kein Zusatz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,1 % (w/v) SDS	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
	0,05 % (v/v) NP40	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
	SDS + NP40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CpCyRPR19Tyr	kein Zusatz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,1 % (w/v) SDS	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
	0,05 % (v/v) NP40	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
	SDS + NP40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abb. 4-30: Zusammenstellung der für cpCyRPRs getesteten Ribozym-Bedingungen

Angegeben sind die verwendeten Puffer (3.12.1.), Zusätze zu diesen Puffern, Reaktionstemperaturen und -zeiten. "-" steht für nicht nachweisbare Produktbildung; für "0" wurde die entsprechende Reaktion nicht durchgeführt.

Hohe Reaktionstemperaturen (72 °C) und der Ersatz von Mg²⁺ durch Mn²⁺ führten ohne erkennbare spezifische Produktbildung zur vollständigen Degradation der eingesetzten RNA.

4.10.3.2. Heterologe Rekonstitution von cpCyP305Tetra-pre-tRNA und SynPP

Die heterologe Rekonstitution des Holoenzym aus rekombinatem SynPP und cpCyRPR-pre-tRNA wurde, wie unter 3.12.2. beschrieben, in Puffer F durchgeführt. Im Vergleich zu Rekonstitutionen mit CyRPR (4.5.1.) mussten die Bedingungen für eine erfolgreiche Prozessierungsreaktion (3.12.3.1.) drastisch verändert werden (Abb. 4-31):

cpCyRPRxxx	Denaturierung von	Reaktionsbedingungen									
		--		cpCyRPRxxx				cpCyRPRxxx SynPP			
	Temperatur	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C	37 °C
	Zeit	1 h	12 h	1 h	12 h	1 h	12 h	1 h	12 h	2 h	2 h
		SynPP [nM]									
		100	500	100	500	100	500	100	500	100	500
cpCyRPR35Glu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
cpCyRPR15Tyr		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
cpCyRPR17Tyr		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
cpCyRPR19Tyr		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Abb. 4-31: Test der Rekonstitutionsbedingungen für cpCyP305Tetra-pre-tRNA und SynPP

Die Rekonstitutionen wurden bei je 50 nM cpCyP305Tetra-pre-tRNA durchgeführt. Die Denaturierung für cpCyRPRxxx wurde bei 65 °C bzw. bei 42 °C für SynPP durchgeführt (je 10 min). Wurde nur cpCyRPRxxx denaturiert, wurde die Untereinheit langsam auf Reaktionstemperatur abgekühlt und erst dann mit SynPP rekonstituiert; wurden beide Untereinheiten denaturiert, erfolgte die Rekonstitution bei 42 °C mit nachfolgender Abkühlung auf Reaktionstemperatur.

Abbildung 4-32 zeigt die erfolgreiche Prozessierung von cpCyRPRP15Tyr, cpCyRPRP17Tyr und cpCyRPRP19Tyr nach Rekonstitution mit SynPP. Zusätzlich ist die Bildung mehrerer unspezifischer Produkte zu erkennen. Unter keiner der getesteten Bedingungen konnte mit cpCyRPRP35Glu Prozessierungsaktivität generiert werden.

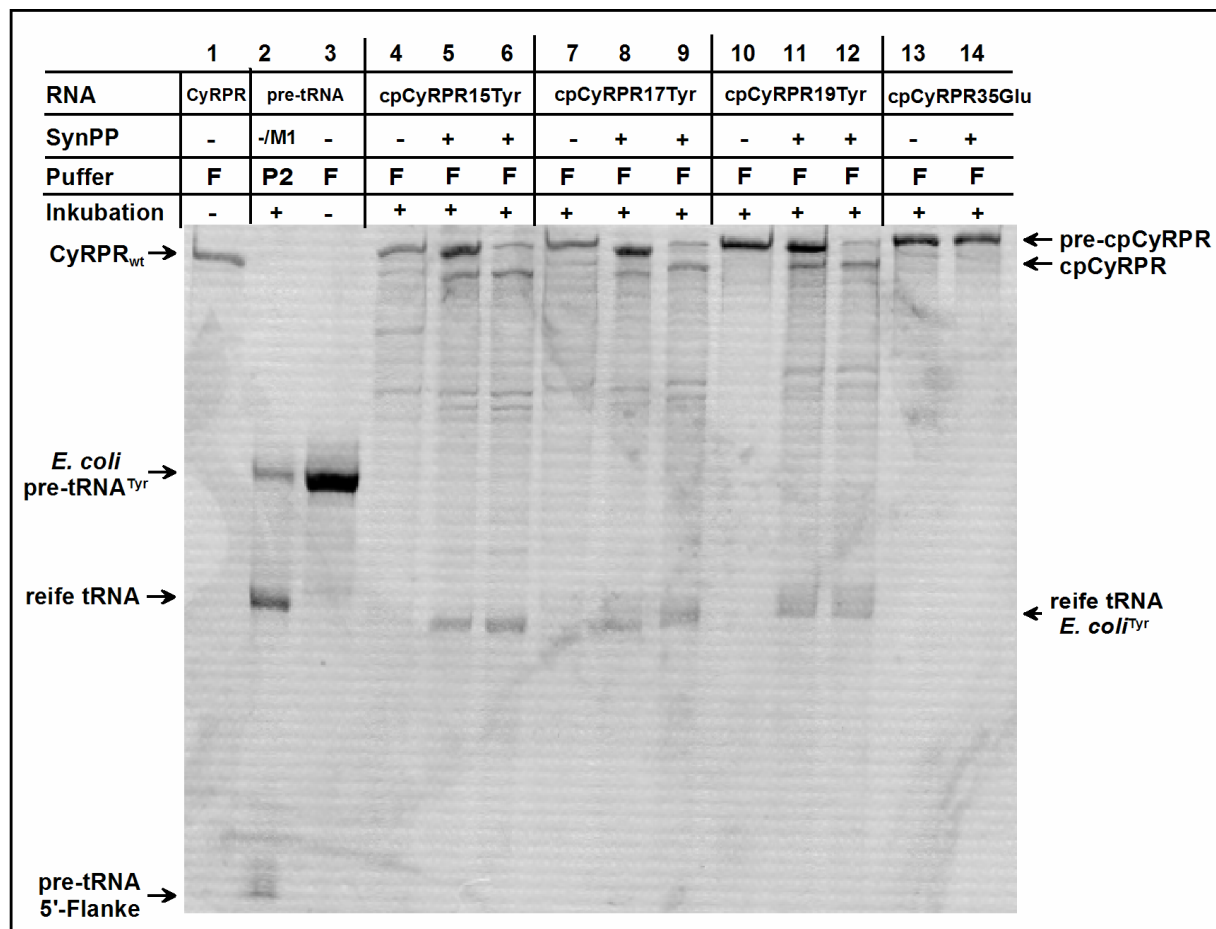


Abb. 4-32: Prozessierungsaktivität von cpCyRPR-pre-tRNA/SynPP

Auf der linken Seite der Abbildung sind die Positionen der als Längenstandard verwendeten RNAs angegeben (Spur 1: CyRPR_{wt}; Spur 2: *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} in P2 mit M1-RNA prozessiert; Spur 3: pre-tRNA^{Tyr}). Am rechten Rand sind die Positionen der cpCyRPR-Konstrukte angezeigt. Die Reaktionsprodukte wurden durch ein 8 % PAA-Gel aufgetrennt. Die Prozessierungsprodukte wurden nach ihrer Auftrennung mit Toluidinblau angefärbt (3.1.3.3.).

1	CyRPR _{wt}		
2	<i>E. coli</i> pre-tRNA ^{Tyr} prozessiert mit M1 in P2		
3	<i>E. coli</i> pre-tRNA ^{Tyr}		
4	cpCyRPR15Tyr [50 nM]	Pufferkontrolle	
5		SynPP	100
6		[nM]	500
7	cpCyRPR17Tyr [50 nM]	Pufferkontrolle	
8		SynPP	100
9		[nM]	500
10	cpCyRPR19Tyr [50 nM]	Pufferkontrolle	
11		SynPP	100
12		[nM]	500
13	cpCyRPR35Glu [50 nM]	Pufferkontrolle	
14		SynPP [nM]	500

Prozessierungsaktivität wurde, wie in Abbildung 4-31 zusammengefasst, nur erreicht, wenn sowohl RNA als auch Protein-Untereinheit bei 65 bzw. 42 °C vor der Rekonstitution denaturiert worden waren. Die Rekonstitution erfolgte bei 42 °C in Puffer F, anschließend wurde der Ansatz langsam auf Reaktionstemperatur (37 °C) abgekühlt. Für cpCyRPR35Glu konnte auch unter diesen Bedingungen keine Aktivität generiert werden (Abb. 4-32).

4.10.3.3. Inhibition der cpCyP305Tetra-pre-tRNA-Prozessierungsreaktion

Um den intramolekularen Charakter der cpCyP305Tetra-pre-tRNA-Prozessierungsreaktion zu beweisen, wurde der Einfluss reifer tRNAs auf die Prozessierung untersucht. Die angenommene intramolekulare Reaktion sollte dabei keiner Produkthemmung unterliegen. Zum Vergleich wurde eine Versuchsreihe mit heterolog rekonstituiertem CyRPR/SynPP-Holoenzym gegenüber gestellt. Den Prozessierungsreaktionen wurden hierzu je 0, 100, 500, 1000 und 2000 ng Hefe-tRNA/ μ l zugegeben. Als Reaktionsbedingungen für cpCyRPR19Tyr wurden die unter 4.10.3.2. ermittelten Parameter gewählt (2 h, 37 °C). Für das CyRPR/SynPP-Holoenzym wurde Cyanellen-pre-tRNA^{His} als Substrat verwendet (30 min, 37 °C; Abb. 4-33 B).

Zur Ermittlung der Produktinhibition durch den Zusatz der Hefe-tRNAs wurde der relative Umsatz der einzelnen Reaktionsansätze ermittelt und gegen Hefe-tRNA-Konzentration aufgetragen (Abb. 4-33A)

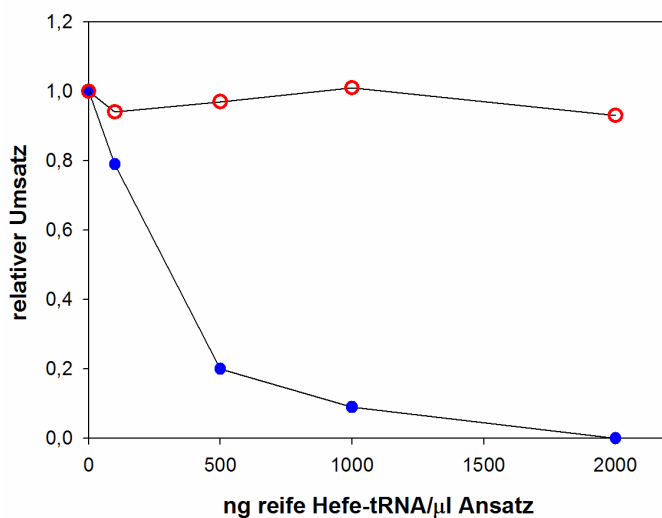


Abb. 4-33A:

Einfluss reifer tRNAs auf die Prozessierungseffizienz

Aufgetragen ist der relative Umsatz der Prozessierungsreaktionen von cpCyRPR19Tyr und CyRPR/SynPP gegen die Konzentration an zugesetzter reifer tRNA.



Abb. 4-33B zeigt die Prozessierung von Cyanellen-pre-tRNA^{His} durch CyRPR/SynPP (Spuren 1-5) unter Inhibition durch reife Hefe-tRNAs. In der Mitte des Gels sind Kontrollen zur Hefe-tRNA-Präparation (6), zum Puffer (7) und eine Prozessierungskontrolle (8; M1 in P2; 3.12.1.) aufgetragen. Spur 9 zeigt nicht rekonstituiertes pre-cpCyRPR-19Tyr-Konstrukt, die Spuren 10-14 pre-cpCyRPR-19Tyr/Synpp Ansätze mit Hefe-tRNA-Zusatz.

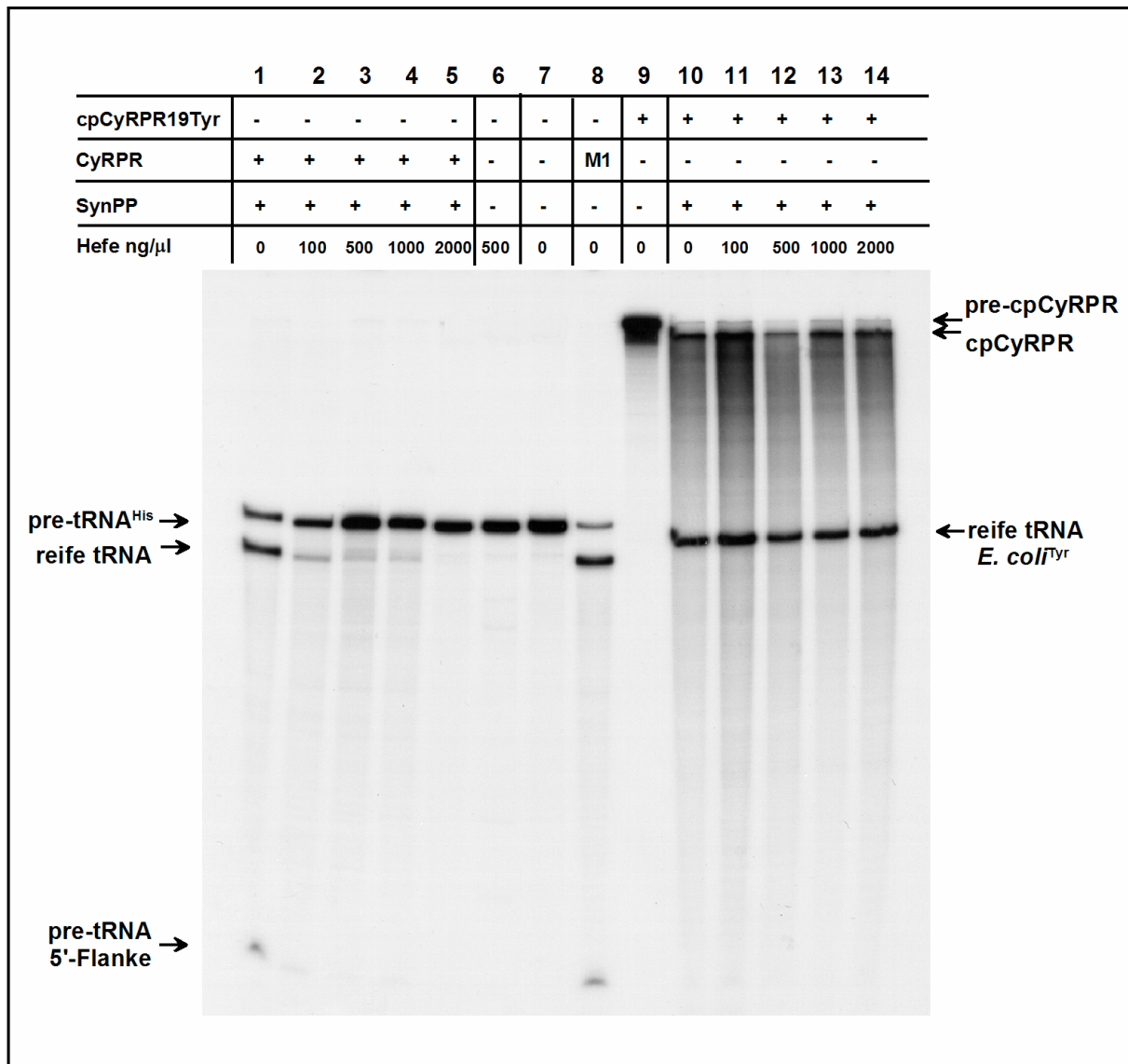


Abb. 33B: Einfluss von reifen tRNAs auf die Prozessierungseigenschaften von CyRPR/SynPP und pre-cpCyRPR-19Tyr

Die Positionen der als Substrate verwendeten RNAs sind am linken und rechten Rand durch Pfeile markiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch ein 8 %-PAA-Gel aufgetrennt.

4.11. Charakterisierung des RNase P Holoenzym aus den Cyanellen von *C. paradoxa* durch Ultrazentrifugation im Glyceringradienten

Um die Proteinzusammensetzung des RNase P Holoenzym aus *C. paradoxa* Cyanellen zu charakterisieren, wurde Cyanellen-S100-Extrakt durch Ultrazentrifugation im Glyceringradienten fraktioniert. Ziel war es, die RNase P-Aktivität von unspezifischen Nukleasen zu trennen und eine Massenbestimmung des RNase P-Holoenzym durchzuführen.

Die Glyceringradienten (10 - 30 %) wurden jeweils, wie unter 3.10.2. beschrieben, gegossen. Pro Gradienten-Röhrchen wurden 250 μ l (2,8 - 3,5 mg) frisch hergestellter Cyanellen-S100-Extrakt (4.7.; 3.10.3.) aufgetragen. Um eine optimale Auftrennung der als Molekulargewichtsstandard verwendeten Proteine zu gewährleisten, wurden pro Gradienten-Röhrchen jeweils nur zwei Proteine möglichst unterschiedlicher Masse (je 250 μ g pro Protein) aufgetrennt: Phosphorylase A (92 kD) und β -Amylase (200 kD); Alkohol-Dehydrogenase (150 kD) und Apoferritin (443 kD). Neben diesen beiden Gradienten-Röhrchen mit Standardproteinen diente ein Ansatz mit *E. coli* S100-Extrakt (250 μ l; 1,5 - 2,5 mg) als weiterer Vergleichswert. Alle verwendeten Extrakte mussten sich in einem glycerinfreien Puffersystem befinden.

Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 141 000 g (Beckmann L8-55; SW 41 Rotor; 28 000 Upm, 4 °C). Die Zentrifugationszeit wurde zwischen 34 und 38 h variiert; für den im Folgenden ausführlich beschriebenen Ansatz betrug sie 38 h. Der Gradient wurde vom Boden des Röhrchens her durch Einführen einer Kapillare und Abpumpen (0,5 ml/ml) in 20 Fraktionen zu je 0,5 ml aufgeteilt. Die Fraktionen wurden vom Röhrchenboden an absteigend nummeriert, das heißt: je größer das Molekulargewicht der Proteine einer Fraktion desto höher die Fraktionsnummer. Der Brechungsindex jeder einzelnen Fraktion wurde am Refraktometer bestimmt. Die Glycerinkonzentration wurde aus einer Eichgeraden, welche aus dem Brechungsindex der zum Gießen des Gradienten verwendeten Glycerinlösungen erstellt wurde, ermittelt.



Abb. 4-34: *C. paradoxa* Cyanellen S100-Extrakt nach Ultrazentrifugation im Glyceringradienten (10–30 %)

Der Proteingehalt aller Fraktionen wurde nach Bradford (3.8.2.1.) bestimmt. Um Messfehler durch Konzentrationsbestimmungen nahe der Nachweisgrenze und unterschiedliche Glycerinkonzentrationen zu minimieren, wurden 100 μ l (für Protein-Standards) bzw. 20 μ l (Cyanellen-Extrakt) entnommen und die Proteine mit Methanol/Aceton ausgefällt (3.8.1.4.). Das Protein-Präzipitat wurde in ddH₂O aufgenommen und anschließend vermessen (Abb. 4-35 und 4-36).

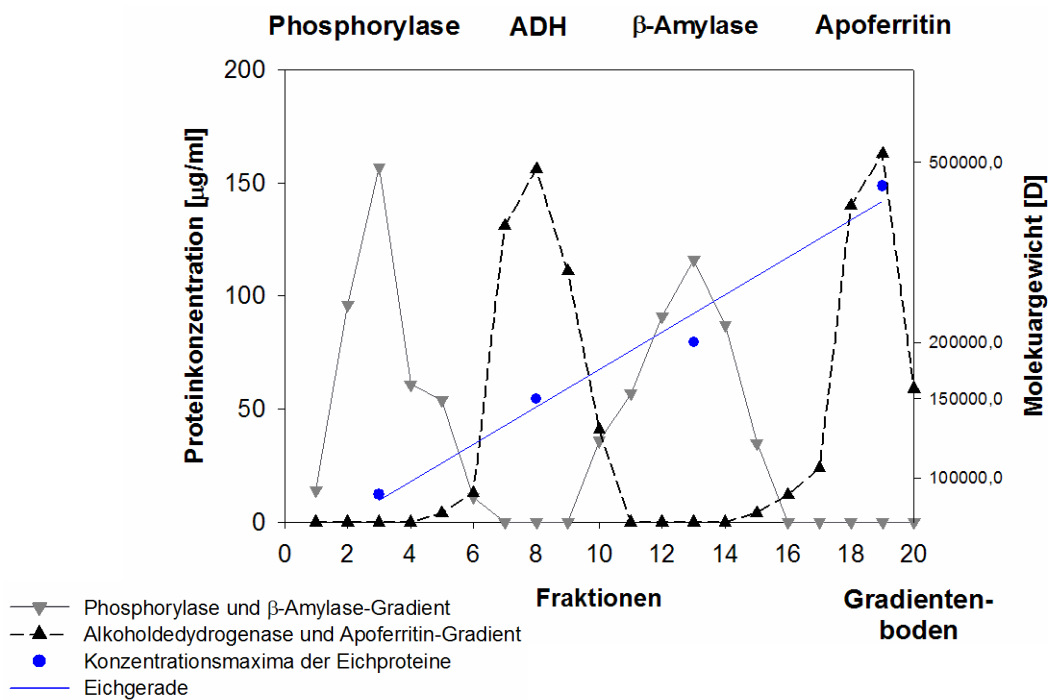


Abb. 4-35: Fraktionierung der Standardproteine im Glyceringradienten (10-30 %)

Aufgetragen ist die Proteinkonzentration der in zwei separaten Ansätzen aufgetrennten Standardproteine Phosphorylase A (92 kD) und β-Amylase (200 kD) in grau, Alkohol-Dehydrogenase (150 kD; ADH) und Apoferritin (443 kD) in schwarz gegen die Fraktionen. Aus dem Logarithmus des Molekulargewichts dieser Standardproteine und der Lage ihrer Konzentrationsmaxima wurde die Eichgerade (blau) ermittelt. Das Molekulargewicht ist am rechten Rand logarithmisch dargestellt (D).

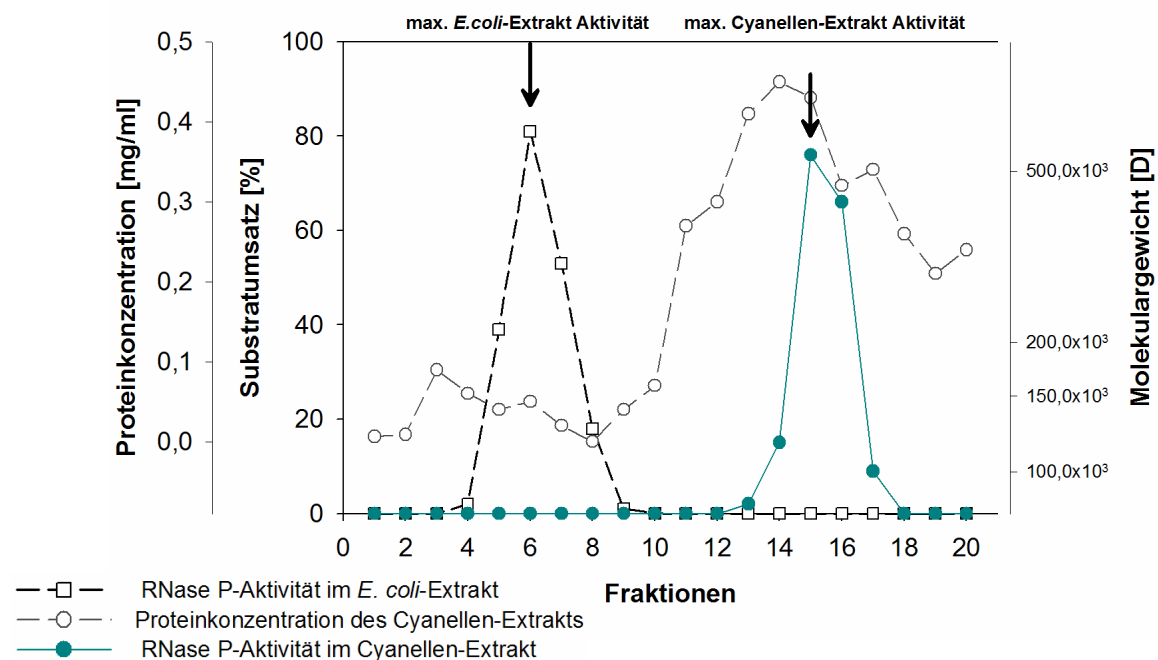


Abb. 4-36: Fraktionierung von Cyanellen-S100-Extrakt im Glyceringradienten (10-30 %)

Aufgetragen ist die Proteinkonzentration (grau), der Substratumsatz (RNase P-Aktivität) für Cyanellen (grün) und *E. coli* S100-Extrakt (schwarz) gegen die Fraktionsnummern. Die Aktivitätsmaxima für *E. coli* und Cyanellen-Extrakt sind durch Pfeile angezeigt. Das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine ist am rechten Rand logarithmisch dargestellt (D).

4.11.1. 5'-Prozessierungsaktivität in den Gradienten-Fractionen

Für den Aktivitätstest wurden direkt nach der Fraktionierung des Gradienten pro Fraktion 50 μ l gegen Puffer F+ dialysiert und durch Ultrafiltration (3.8.1.2.) auf ein Volumen von etwa 10 μ l reduziert. Diese konzentrierte Lösung wurde vollständig zur Prozessierungsreaktion mit Cyanellen-pre-tRNA^{His} bei 32 °C für 20 min eingesetzt (3.12.3.2.). Längere Reaktionszeiten führten zu übermäßig starker Degradation und unspezifischer Hydrolyse der eingesetzten pre-tRNA

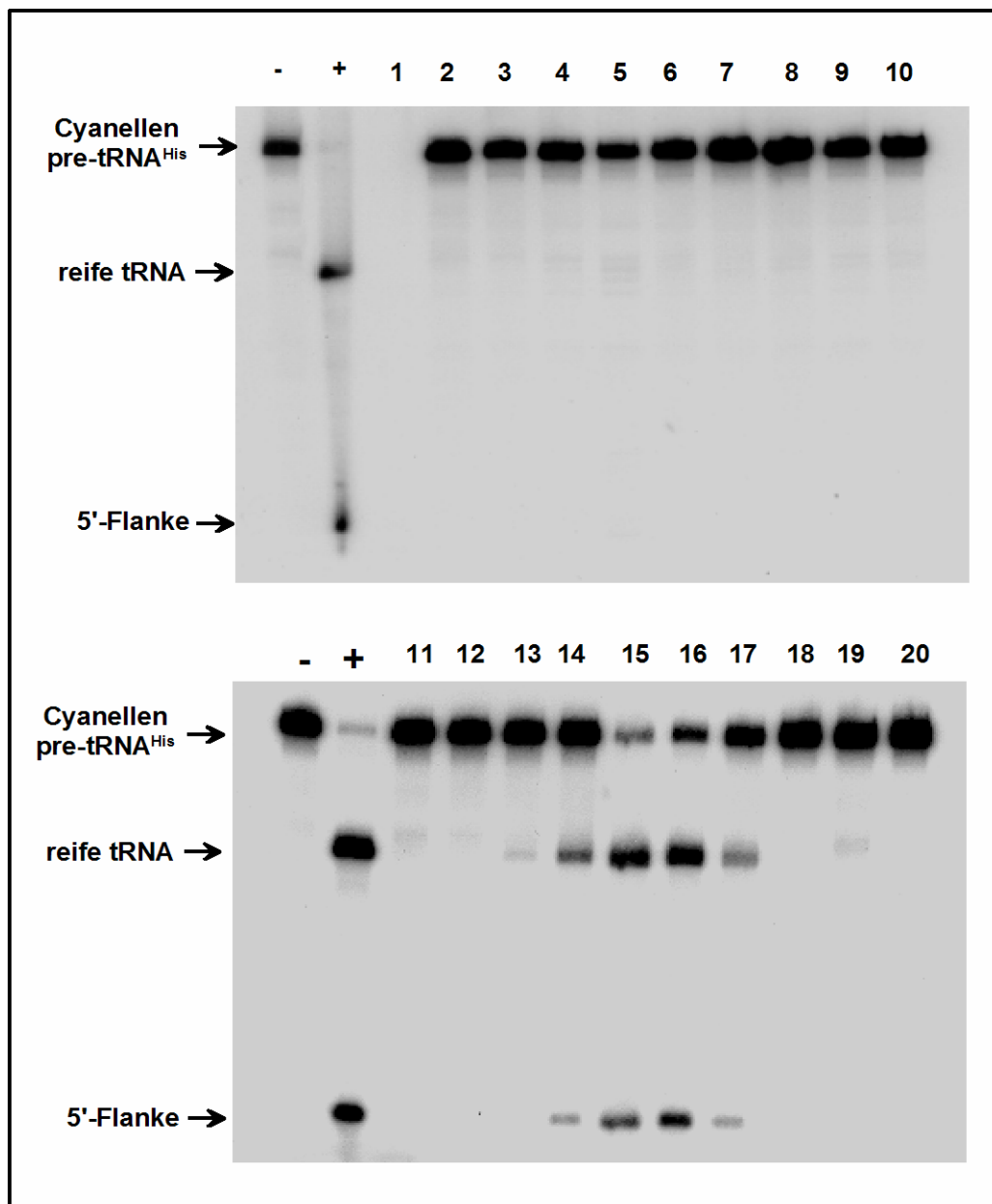


Abb. 4-37: RNase P-Aktivität der Cyanellen-Gradientenfractionen 1-20

Zusätzlich zur RNase P-Aktivität der einzelnen Fraktionen sind Puffer ("-")- und Produktkontrolle ("+"; M1-RNA in Hochsalzpuffer; 3.12.1.) gezeigt. Die Nummerierung entspricht den Gradientenfractionen.

Die Fraktionen 13-17 zeigten RNase P-Aktivität (Abb. 4-37). Nach der Lokalisierung der RNase P-Aktivität in diesen Fraktionen wurde alle weiteren Charakterisierungsschritte auf die Fraktionen 11-20 beschränkt.

4.11.2. Nachweis der Cyanellen-RNase P-RNA

Zur Isolierung der RNA wurden von jeder zu analysierenden Fraktion 200 µl phenolisiert. Da die CyRPR-Untereinheit sowohl durch RT-PCR (3.4.2.) als auch durch *Northern-Blot* Hybridisierung (3.2.2.) nachgewiesen werden sollte, wurde die wässrige Phase nach ihrer Abnahme in zwei Aliquots zu 20 (für RT-PCR; 4.11.2.1.) und 180 µl (*Northern-Blot*; 4.11.2.2.) aufgeteilt. In beiden Ansätzen wurden die Nukleinsäuren durch EtOH präzipitiert (3.3.1.).

4.11.2.1. Identifizierung der Cyanellen RNase P-RNA durch RT-PCR und Southern-Blot

Um die prozessierungsaktiven Fraktionen 13-17 (Abb. 4-37) auf Vorhandensein der CyRPR-Untereinheit zu überprüfen und gleichzeitig eine bakterielle Verunreinigung des verwendeten Cyanellen-S100-Extrakts auszuschließen, wurde eine reverse Transkription mit anschließender PCR durchgeführt.

Die RT-PCR wurde jeweils aus einer Gesamt-RNA-Präparation der zu untersuchenden Fraktionen (4.11.2.) und den Oligostartnukleotiden Cprp5'-anti und Cprp3'-anti (Anhang I) nach 3.4.2. durchgeführt. Nach der Auftrennung der RT-Ansätze in einem 1,0 % Agarosegel (3.1.1.1.) wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe des alkalischen Abwärtstransfers auf eine Nylonmembran (Biodyne B, *Pall*) übertragen (3.2.1.2.) und die fixierten Nukleinsäuren bei 50 °C mit [³²P]-markiertem (3.2.5.) CyGSP2 hybridisiert (3.2.3.). Die Waschtemperatur mit der höchsten Stringenz betrug 55 °C.

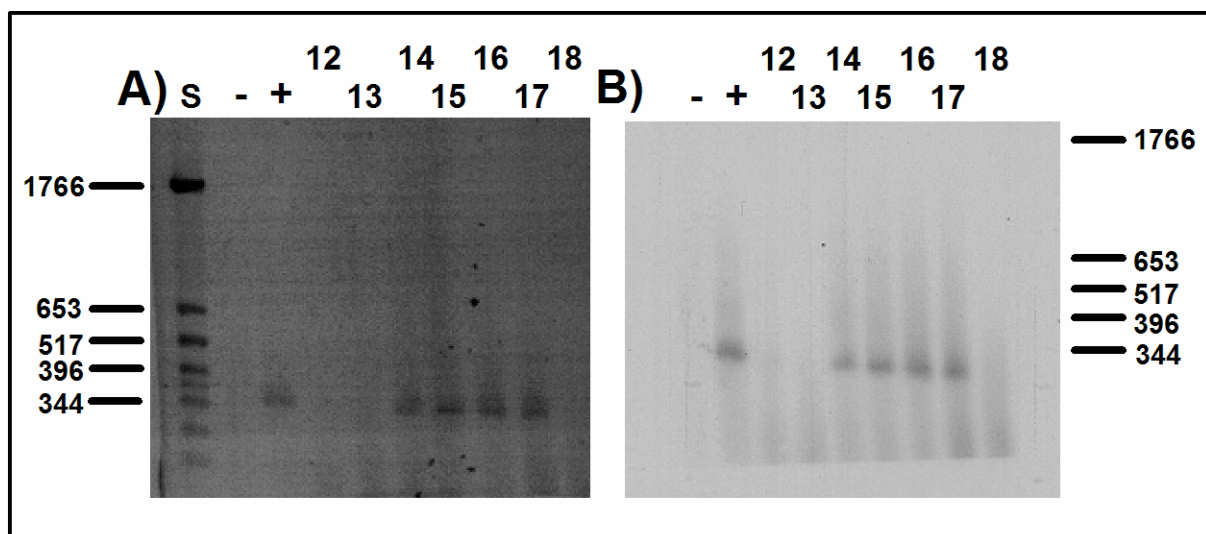


Abb. 4-38: (A) *In vitro*-Amplifikation von RNase P-RNA-Fragmenten

Die Nummerierung in beiden Abbildungen entspricht jeweils den Gradientenfraktionen. Die RT-PCR-Ansätze wurden in einem 1,0 % Agarosegel aufgetrennt. Neben den RT-PCR-Ansätzen der prozessierungsaktiven Fraktionen sind eine PCR-Pufferkontrolle ("-") und eine Positivkontrolle mit CyRPR-T7-Transkript ("+") gezeigt. Die Fragmentgrößen (bp) des DNA-Längenstandards (pBR325/*Hinf*I) sind links angegeben.

(B) *Southern-Blot* Hybridisierung mit der Sonde CyGSP2

Nach dem Transfer auf eine Nylonmembran wurde diese 2 h bei 50 °C mit CyGSP2 hybridisiert. Der am rechten Rand angegebene Standard entspricht dem Agarose-Gel-Längenstandard und wurde durch Gel-Membranabgleich übertragen.

Die in den prozessierungsaktiven Fraktionen 14-17 (Abb. 4-37) amplifizierte Fragmente entsprachen in ihrer Größe (ca. 350 nt) dem CyRPR-T7-Transkript (351 nt). Da cyanobakterielle RNase P-RNAs eine

sehr heterogene Größe besitzen (Vioque, 1997), konnte eine cyanobakterielle Verunreinigung der Ausgangspräparation ausgeschlossen werden.

4.11.2.2. Nachweis der Cyanellen RNase P-RNA durch *Northern-Blot*

Je 200 µl jeder Fraktion wurden phenolisiert und die präzipitierten Nukleinsäuren auf einem 8 % PPA-Gel aufgetrennt. Das entspricht für die Fraktionen mit der höchsten RNase P-Aktivität etwa 0,2 mg Cyanellen-Extrakt. Die Hybridisierung für die Fraktionen 11-20 wurde mit der [³²P]-markierten (3.2.5.) Sonde Cprp5'-anti (siehe Anhang I) nach 3.2.2. durchgeführt. Die Waschttemperatur mit der höchsten Stringenz betrug 65 °C.

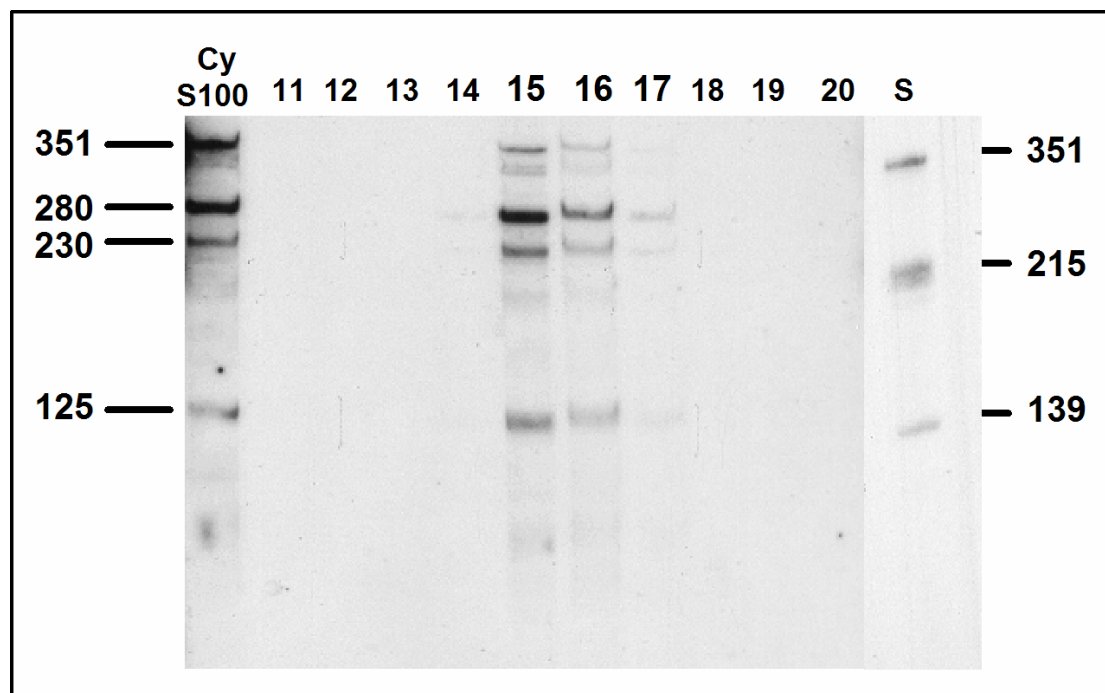


Abb. 4-39: Northern-Blot Hybridisierung mit der Sonde Cprp5'-anti

Links aufgetragen ist eine RNA-Gesamtpräparation aus 100 µg frisch hergestelltem Cyanellen-S100-Extrakt. Die Nummerierung der Spuren entspricht den Gradientenfraktionen. Die Zahlen auf der rechten Seite geben Größe und Position des Längenstandards (nt) an (S = RNA-Längenstandard). Der gezeigte Standard wurde einem Film mit wesentlich kürzerer Expositionszeit entnommen. Die Zahlen auf der linken Seite weisen auf RNA-Fragmente der entsprechenden Länge hin.

Die CyRPR-Hybridisierungssignale der Spuren 14-17 korrelieren mit der Prozessierungsaktivität (Abb. 4-37). Die RNA-Fragmentierung entspricht dem von Cordier und Schön (1999) für mit RNasin geschützter Cyanellen RNase P-RNA gefundenem Muster. Der RNA-Längenstandard zeigt eine Vielzahl von Banden, die auf Degradation zurückzuführen sind.

4.11.3. Proteinzusammensetzung

Zur Analyse der Proteinzusammensetzung wurden je 20 µl pro Fraktion mit Methanol/Aceton gefällt (3.8.1.4.), der Niederschlag in Probenpuffer aufgenommen und durch ein 12,5-18 % SDS-PAGE-Gel (3.8.3.) aufgetrennt. Je nach Proteingehalt der Fraktion wurden etwa zwischen 10 und 20 µg Protein pro Gelspur aufgetrennt. Das Gel wurde nach 3.8.4.2. silbergefärbt. Dabei konnten keine mit der RNase P-Aktivität korrelierenden Proteine identifiziert werden (Abb. 4-40).

Von einer 2D-Gel elektrophoretischen Auftrennung wurde Abstand genommen, da alle bekannten cyanobakteriellen RNase P-Proteine einen ausgesprochen basischen Charakter besitzen (isoelektrischer Punkt > pH 11). Eine isoelektrische Fokussierung in der ersten Dimension der Elektrophorese ist somit kaum möglich.

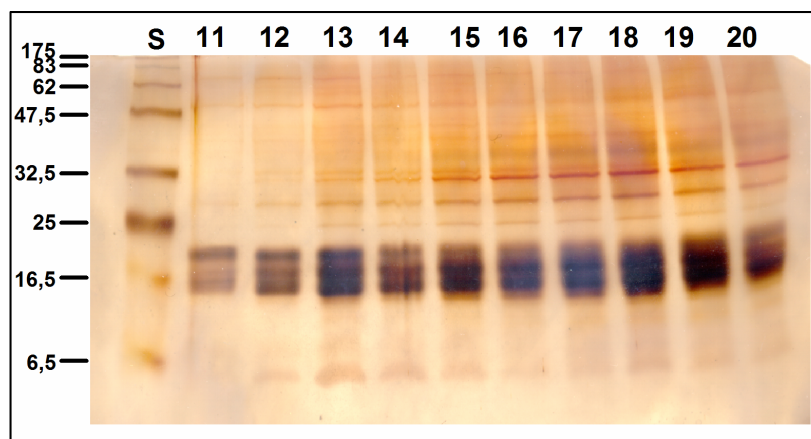


Abb. 4-40: SDS-PAGE-Analyse der Gradientenfractionen 11-20

Die Proteine wurden in einem 12,5-18 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt und durch Silberfärbung nachgewiesen. Die Nummerierung entspricht den Gradientenfractionen. S = Protein-Längenstandards I.

4.11.4. Charakterisierung prozessierungsaktiver Fraktionen durch immunologische Methoden

Da der Cyanobakterien-spezifische Antikörper α -SynPP-AB sowohl positive Kreuzreaktionen mit Cyanellen-S100-Extrakt zeigt (4.8.), als auch zur Immunopräzipitierung von RNase P-Aktivität aus Cyanellen-S100-Extrakten (4.9.) verwendet werden kann, sollte überprüft werden, ob die 5'-Prozessierungsaktivität des Extrakts nach seiner Auftrennung im Glyceringradienten mit den unter 4.8. und 4.9. beschriebenen Beobachtungen korreliert.

4.11.4.1. Enzymgekoppelter immunologischer Nachweis

Je 100 µl der Gradientenfractionen wurden mit Methanol/Aceton gefällt (3.8.1.4.), in Probenpuffer aufgenommen und durch ein 12,5-18 % SDS-PAGE-Gel (3.8.3.) aufgetrennt. Nach der Übertragung auf eine Nitrocellulose-Membran (3.8.5.) wurden die Proteine durch eine gekoppelte Immunreaktion mit α -SynPP-AB (1:1000) nachgewiesen (3.8.7.). Die Immundetektion erfolgte durch Sekundärantikörper-gekoppelte Alkalische Phosphatasereaktion (1:5000 Verdünnung; 3.8.7.2.).

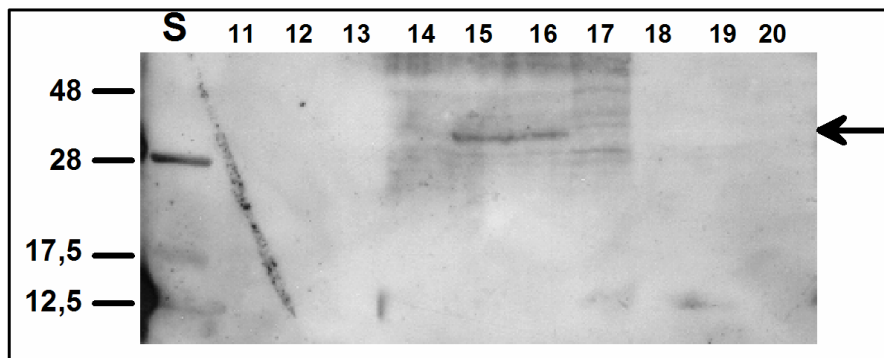


Abb. 4-41: Western-Blot mit α -SynPP-AB

Je nach Proteingehalt der Fraktion wurden zwischen 30 und 50 μ g pro Spur aufgetragen und durch ein 12,5-18 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran wurden immunologisch verwandte Proteine durch die Bindung SynPP-spezifischer Antikörper nachgewiesen. Der Pfeil markiert die Laufhöhe des auch unter 4.8. detektierten spezifischen Signals. Am linken Rand sind die Molekulargewichte des mitaufgetragenen Protein-Längenstandards IV angegeben.

4.11.4.2. Immunopräzipitation aus RNase P-aktiven Fraktionen mit α -SynPP-AB

Für die Immunopräzipitation von Proteinen aus 5'-prozessierungsaktiven Fraktionen mit α -SynPP-AB wurden nur Aliquots der Fraktionen 15 und 16 gewählt. Sie zeigten die höchste RNase P-Aktivität (Abb. 4-37) und ergaben im Western-Blot mit α -SynPP-AB die deutlichsten Signale (Abb. 4-41). Je 200 μ l dieser Fraktionen wurden mit Methanol/Aceton gefällt (3.8.1.4.) und das Proteinsediment in Puffer F+ aufgenommen. Die Proteinlösung wurde mit an Protein A-Sepharose (20 mg) gekoppeltem anti-SynPP-Antikörper (3.8.8.1.) inkubiert, anschließend mehrfach gewaschen (3.8.8.2.) und die gebundenen Proteine nach 3.8.8.3. eluiert. Die Eluate wurden mit Methanol/Aceton gefällt (3.8.1.4.) und auf einem 12,5 % SDS-PAA-Gel analysiert (3.8.3.).

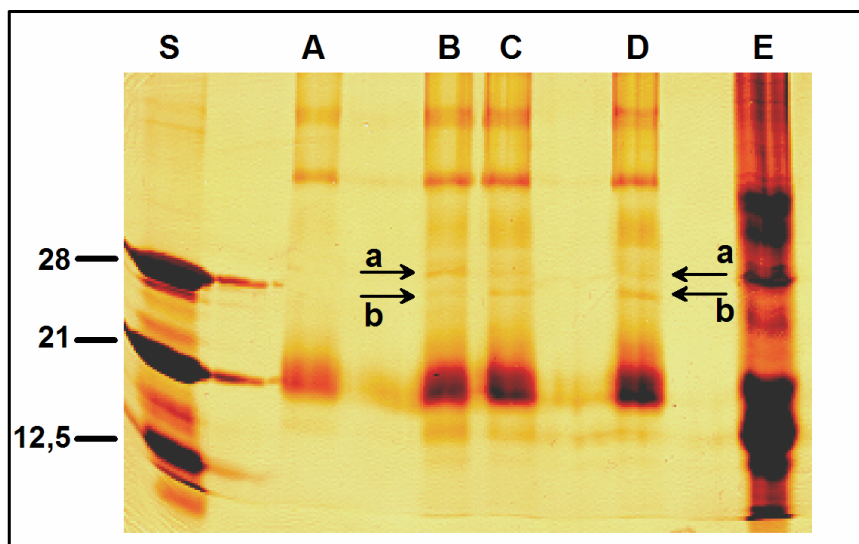


Abb. 4-42: Immunopräzipitation aus den prozessierungsaktiven Fraktionen 15 und 16

Die Proben wurden durch ein 12,5 % SDS PAA-Gel aufgetrennt und silbergefärbt. Die Pfeile markieren die Position von zwei immunopräzipitierten Proteinen von etwa 30 kD (a) und 28 kD (b) Größe. Am linken Rand ist ein Protein-Längenstandard angegeben.

S	Protein-Längenstandard II (kD)	C	Immunopräzipitation aus Fraktion 15 (ca. 100 μ g)
A	Protein A Sepharose mit gekoppeltem α -SynPP-AB	D	Immunopräzipitation aus Fraktion 16 (ca. 100 μ g)
B	Immunopräzipitation aus Cyanellen S100-Extrakt (100 μ g)	E	Cyanellen-S100-Extrakt (25 μ g)

Im Cyanellen-S100-Extrakt und den prozessierungsaktiven Fraktionen 15 und 16 (Abb. 4-37) konnten mit an Protein-A-Sepharose gekoppelten α -SynPP-AB zwei Proteine von 30 kD und 28 kD präzipitiert werden (Abb. 4-42).

4.11.5. Größenabschätzung des *C. paradoxa* Cyanellen RNase P-Holoenzym

Abbildung 4-43 fasst die Ergebnisse zur Charakterisierung des Cyanellen-RNase P Holoenzym durch Ultrazentrifugation im Glyceringradienten zusammen. Aus der Position des RNase P-Aktivitätsmaximums und den anderen beschriebenen Experimenten erfolgte eine Molekulargewichtsabschätzung für das Holoenzym:

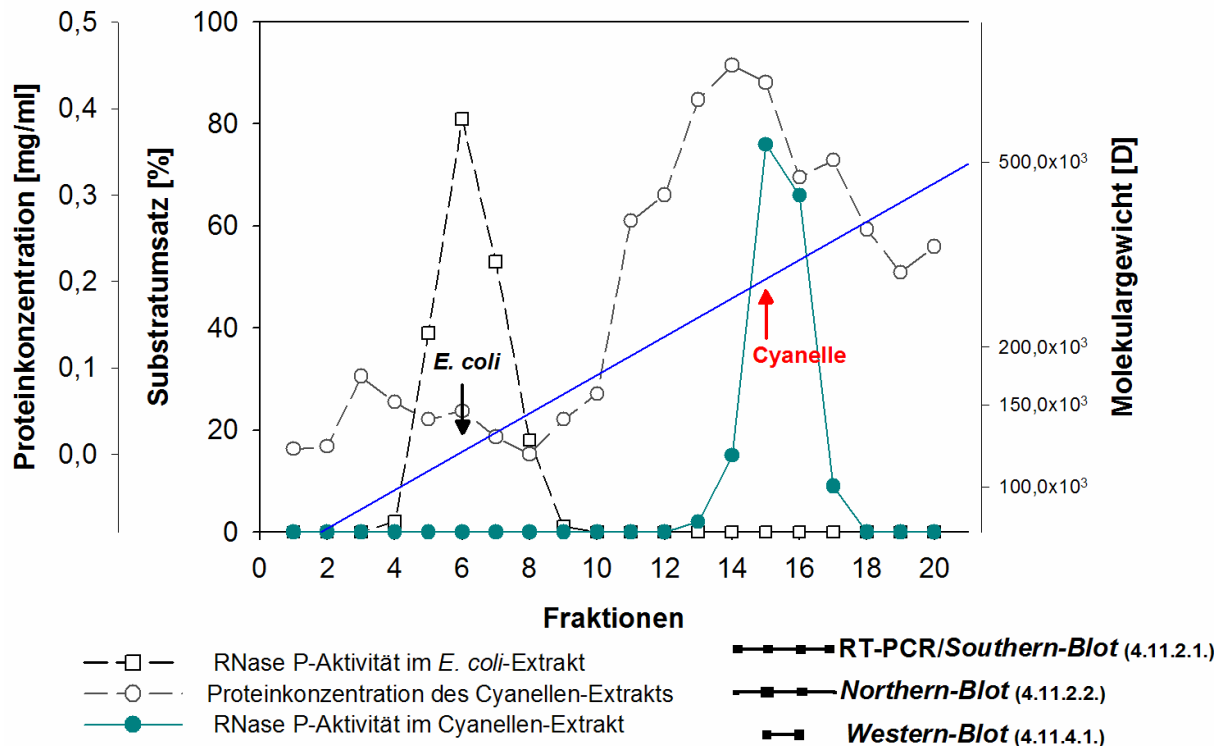


Abb. 4-43: Größenabschätzung des *C. paradoxa* Cyanellen-RNase P-Holoenzym

Aufgetragen ist die Proteinkonzentration (grau), der Substratumsatz (RNase P-Aktivität) für *C. paradoxa* Cyanellen (grün) und *E. coli*-S100-Extrakt (schwarz) gegen die Fraktionsnummern. Unterhalb des Graphen sind die Ergebnisse der Versuche zur Charakterisierung der RNA- und Protein-Untereinheiten in den RNase P-aktiven Fraktionen zusammengefasst. Relativ zur Fraktionsnummer stellen die schwarzen Balken jeweils ein positives Ergebnis dar (Abb. 4-37 - 4-41); die Größe der Quadrate symbolisiert die Signalintensität. Die Größeneichgerade, welche durch den Logarithmus des Molekulargewichts der Standardproteine bestimmt wurde, ist blau dargestellt (Abb. 4-35). Die Pfeile geben die Lage der RNase P-Aktivitätsmaxima für *E. coli* (schwarz) Cyanelle (rot) relativ zur Eichgerade wieder.

Das Molekulargewicht des *E. coli* RNase P-Holoenzym wurde zu etwa 120 kD bestimmt; rechnerisch ergibt sich für dieses Enzym ein Wert von 130 kD. Die Methode der Ultrazentrifugation liefert folglich hinreichend genaue Ergebnisse zur Molekulargewichtsbestimmung.

Für das *C. paradoxa* Cyanellen-RNase P Holoenzym wurde Molekulargewicht von etwa 280 kD bestimmt.

4.12. Erstellung einer *C. paradoxa* cDNA-Bibliothek in Uni-ZAP XR

Zum Anlegen einer cDNA-Bibliothek aus *C. paradoxa* wurde zunächst nukleocytoplasmatische Gesamt-RNA isoliert und daraus die mRNA angereichert. Aus dieser wurde anschließend mittels Reverser Transkription die doppelsträngige cDNA synthetisiert. Als Ausgangsmaterial zur Erstellung der cDNA-Bibliothek wurden 20 µg reine mRNA benötigt, für deren Isolierung 500 µg Gesamt-RNA extrahiert werden mußten.

4.12.1. Isolierung der Gesamt RNA und Anreicherung der mRNA

Aus der nukleocytoplasmatischen Fraktion einer 6 l *C. paradoxa* Suspensionskultur (3.11.4.) konnten durch Phenol-Extraktion (3.3.5.1.) 2,5 mg Gesamt-RNA isoliert werden, die zu Aliquots von 500 µg aufgeteilt und bei -20 °C gelagert wurden.

Zur Isolierung der mRNA wurden 500 µg Gesamt-RNA mit 5 M NaCl-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,5 M NaCl eingestellt, 10 min bei 70 °C inkubiert und auf eine vorbereitete Oligo (dT)Cellulose-Säule (MobiCol) aufgetragen (3.3.5.3.). Um ein vollständiges Hybridisieren der mRNA an Oligo(dT) zu gewährleisten, wurde die Lösung mit Hilfe einer sterilen Spritze insgesamt dreimal durch die Säule gepresst. Unspezifisch gebundene RNA-Moleküle wurden in fünf Waschschritten mit Bindungspuffer entfernt. Die Elution erfolgte mit zweimal 200 µl Elutionspuffer, wonach die Qualität der ethanolpräzipitierten (3.3.1.) mRNA durch ein Formaldehyd-Agarosegel (3.1.1.2.) überprüft wurde (Abb. 4-44).

Aus 500 µg Gesamt-RNA wurden in den beiden Elutionsfraktionen 20-25 µg angereicherte mRNA isoliert, deren A_{260}/A_{280} -Quotient bei 1,9 lag. Abbildung 4-44 (Spur 1) zeigt die Auftrennung der Gesamt-RNA vor der mRNA-Anreicherung (3.3.5.2.). Die nicht an die Oligo(dT)Cellulose-Säule bindenden ribosomalen RNAs, insbesondere die 18 S-rRNA (1,9 kb) sind in Spur 2 deutlich erkennbar (siehe Pfeil). Dabei enthält ein Aliquot des ersten Waschschritts (Spur 3) einen deutlich höheren Anteil an ribosomalen RNAs als die Gesamt-RNA (Spur 5). Die aufgetragenen Elutions-Fraktionen zeigen RNA-Fragmente über einen weiten Längenbereich. Der Anteil der ribosomalen RNA ist weit geringer als vor der Anreicherung.

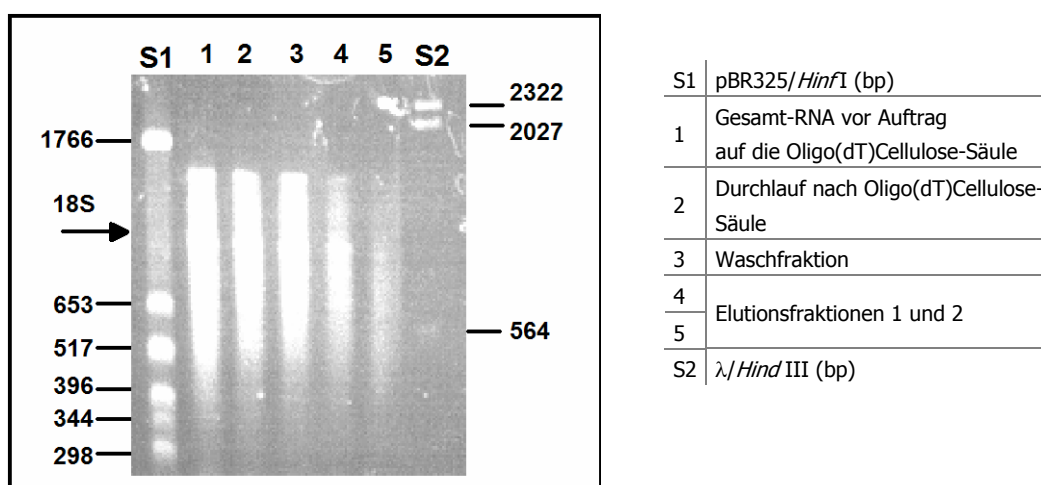


Abb. 4-44: mRNA-Anreicherung aus Gesamt-RNA durch Chromatographie an Oligo(dT)-Cellulose

Die mRNA wurde durch ein 1 % Formaldehyd-Agarosegel analysiert. Die 18S-rRNA ist deutlich zu erkennen (Pfeil). Das Agarosegel wurde im UV-Durchlicht aufgenommen. S1 und S2 = dsDNA-Längenstandards (bp).

4.12.2. Präparation der cDNA für die gerichtete Klonierung

Die Synthese der cDNA wurde mit Hilfe des *ZAP-cDNA Synthesis Kits* nach Herstellervorschrift durchgeführt (Abb. 4-45). Wie aus Abbildung 4-44 ersichtlich ist, konnte durch die Aufreinigung der Gesamt-RNA über die Oligo(dT)-Cellulose die ribosomale RNA nicht vollständig abgetrennt werden. Deshalb wurden zur Synthese des ersten cDNA Stranges 10 µg angereicherte mRNA statt, wie vom Hersteller angegeben, 5 µg reine mRNA eingesetzt. Die reverse Transkription wurde von MMLV-RT (reverse Transkriptase aus Moloney Maus Leukämie Virus) in Anwesenheit einer Startsequenz durchgeführt, welche aus Oligo(dT)Sequenz und einer *Xho*I-Erkennungsstelle aufgebaut ist (3.13.). Durch die Verwendung einer Nukleotidmischung, die anstelle von dCTP 5-Methyl-dCTP enthält, liegen alle Cytosine im ersten Strang der cDNA methyliert vor (Abb. 4-45). Die Methylierung des Cytosins führt in allen nachfolgenden Klonierungsschritten zum Schutz der cDNA vor Restriktionshydrolyse.

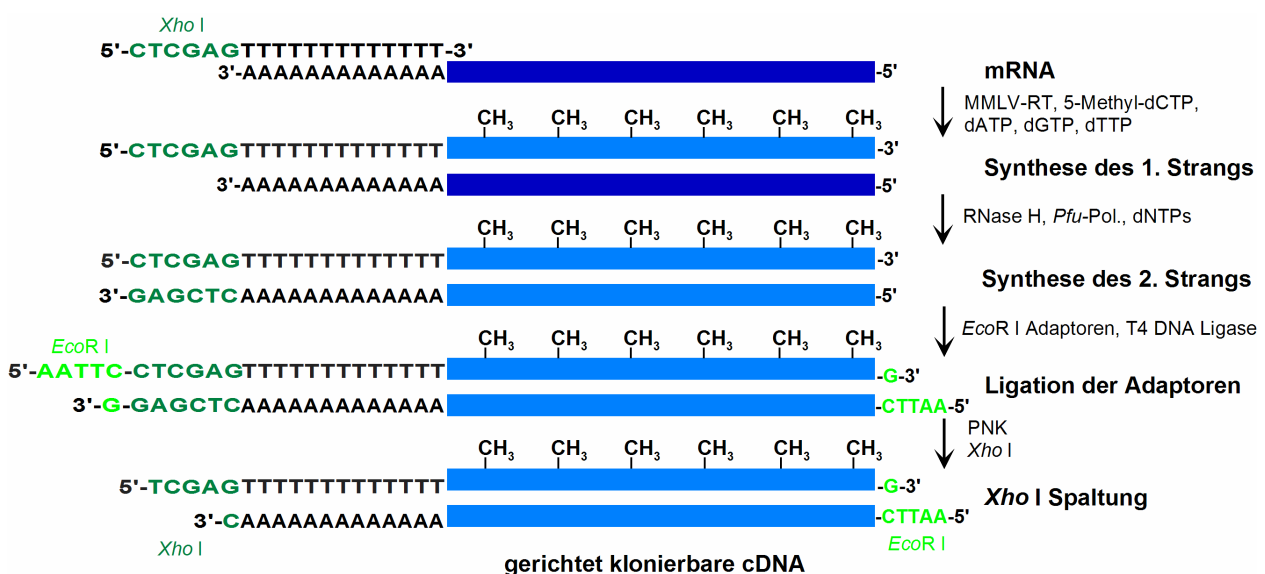


Abb. 4-45: Flussdiagramm zur cDNA-Synthese (nach *Stratagene cDNA Cloning Kit*)

Die Synthese des Gegenstranges wurde anschließend mit DNA-Polymerase in Anwesenheit ausschließlich unmethylierter dNTPs durchgeführt. Eine Inhibierung nachfolgender Reaktionen durch Doppelstrang-Methylierung sollte hierdurch verhindert werden. Als Startsequenzen dienten hierbei kurze RNA-Fragmente, die beim Abbau der mRNA durch beigefügte RNase H entstanden. Überhängende cDNA-Enden wurden anschließend mit *Pfu*-DNA-Polymerase aufgefüllt (3.13.1.). Durch Vergleich mit einem Längenstandard konnte die Größe der synthetisierten cDNAs aus Erst- und Zweitstrang-Synthese zu 0,3 bis 10 kb bestimmt werden.

4.12.3. Ligation der Adaptoren und Größenfraktionierung

Nach Phenolextraktion und Ethanol-fällung wurden an die cDNAs Adaptormoleküle ligiert, welche eine bereits geschnittene *Eco*RI-Erkennungssequenz enthalten (vgl. Abb. 4-45). Durch Phosphorylierung ihrer 5'-Enden mit T4-Polynukleotidkinase und anschließende *Xho*I-Spaltung wurden die Enden der cDNAs für eine gerichtete Klonierung vorbereitet (3.13.2.).

Um die Klonierungseffizienz zu erhöhen, wurden nicht eingebaute Oligonukleotide durch Gelfiltration (Sephacryl S-400) abgetrennt und die cDNAs in Fraktionen unterschiedlicher Längenbereiche aufgetrennt. Die Längenbestimmung der cDNAs der einzelnen Fraktionen erfolgte durch PAA-Elektrophorese. cDNA, deren Länge mehr als 0,2 kbp betrug, war ausschließlich in den ersten sieben Fraktionen anzutreffen. Aufgrund dessen wurden die Fraktionen 1 - 2 (**A**), 3 - 5 (**B**) und 6-7 (**C**) vereinigt, präzipitiert und zur Erstellung der cDNA-Bibliothek eingesetzt. In den Fraktionen 8 und 9 waren nur sehr geringe Mengen an cDNA vorhanden, deren Länge weit unterhalb 200 bp lag. Sie wurden deshalb nicht berücksichtigt.

Die Quantifizierung der cDNA wurde mit Hilfe von Ethidiumbromid-Platten durchgeführt (3.3.2.2.). Für Fraktion **A** wurde eine cDNA-Konzentration von weniger 10 ng/μl ermittelt, während für **B** und **C** eine cDNA-Konzentration von etwa 10 - 20 ng/μl ermittelt wurde. Insgesamt betrug die cDNA-Ausbeute der ersten sieben Fraktionen ungefähr 150 ng.

4.12.4. Ligation der cDNA in λ-Uni-ZAP XR-Vektor und Titration der primären λ-cDNA-Bibliothek

Größere DNA-Fragmente können im Bakteriophagen λ kloniert werden. Das allgemeine Verfahren zur Klonierung von DNA in den Bakteriophagen λ beruht auf zwei Schlüsselmerkmalen des λ-Genoms. Zum einen ist ungefähr ein Drittel des Genoms entbehrlich und kann durch Fremd-DNA ersetzt werden, und zum anderen wird die Phagen-DNA nur dann in infektiöse Phagenpartikel verpackt, wenn sie eine Länge von 40 bis 50 kbp aufweist. In den λ-Klonierungsvektoren wurden diese nicht essentiellen Gene und bestimmten Restriktionsschnittstellen entfernt. Um für die Verpackung zu Phagenpartikeln dennoch eine ausreichende Größe zu besitzen, enthalten diese Vektoren anstelle der eliminierten Gene ein "Füll-DNA-Fragment". Dieses Füllfragment wird bei Klonierungsexperimenten durch Fremd-DNA ersetzt. Rekombinante Phagen-Genome werden aber nur zu infektiösen Phagenpartikeln verpackt, wenn sie ein Fremd-DNA-Fragment geeigneter Größe enthalten.

Der in dieser Arbeit verwendete Uni-ZAP® XR Vektor leitet sich vom beschriebenen λ-Phagen ab (Abb. 4-46; 3.13.). Er wird vom Hersteller (*Stratagene*) bereits *EcoRI* und *XhoI*-gespalten geliefert.

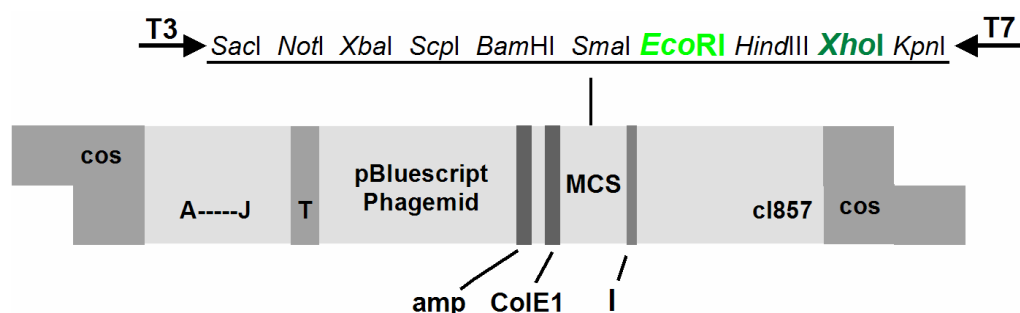


Abb. 4-46: Schematische Darstellung des Lambda ZAPII-Vektors

cos: Sequenzen, die zur Zirkularisierung der Phagen-DNA benötigt werden; *A-λ*: Phagengene; *I*, *T*: Initiation und Termination der Phagemid-Exzision; *MCS*: Multiple Klonierungsschnittstelle; *amp*: Ampicillin-Resistenzgen; *ColE1*: Replikationsursprung des Phagemids; *cI857*: Mutation im *cI*-Gen, welche bewirkt, dass Lysogenie nur unterhalb von 30 °C auftritt.

Durch die *Eco*RI-Erkennungssequenz am 5'-Ende und die 3'-*Xho*I-Sequenz erfolgte ein gerichteter Einbau der aufgereinigten cDNA in den vorbereiteten λ -UNi-ZAP XR-Vektor. Zur Ligation wurden 10 ng cDNA aus Fraktion **A** und je 20 ng aus Fraktionen **B** und **C** eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 4 °C über 48 h durchgeführt. Jeweils 1/5 der Ligationsansätze wurde anschließend mit Hilfe des *ZAP-cDNA Gigapack III Gold Kit* zu Phagenpartikeln verpackt (**A₁**, **B₁** und **C₁**). Diese Kontrollansätze wurden zur Bestimmung der Anzahl an unabhängigen Klonen innerhalb der cDNA-Bibliothek, angegeben in *plaque forming units (pfu)*, und zur Ermittlung der Anzahl an nicht rekombinanten blaugefärbten Plaques verwendet (3.13.3.-3.13.5.). Dazu wurden je 1 μ l der Suspension sowie einer 1:10-Verdünnung in SM-Puffer zu 200 μ l einer *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellsuspension (mit 10 mM MgSO₄ auf OD₆₀₀=0,5 eingestellt; 7 d bei 4 °C lagerbar) pipettiert und 15 min bei 37 °C inkubiert, um die Anheftung der Phagenpartikel an die Zellen zu ermöglichen. Anschließend wurden diese Ansätze mit IPTG, X-Gal und 3 ml Top-Agar (42 °C) gemischt und auf vorgewärmte LB-Platten (\varnothing 8,3 cm) gegossen (3.13.2.). Nach 7-9 h Inkubation bei 37 °C wurde die Anzahl der gebildeten Plaques bestimmt.

Fraktion	A₁	B₁	C₁
Phagentiter (<i>pfu</i> /1 ml)	6×10^4	$1,5 \times 10^6$	2×10^5
Leervektorenanteil (%)	0,1	0,7	0,55

Abb. 4-47: Titerbestimmung und Leervektorenanteil der Phagensuspensionen **A₁**, **B₁** und **C₁**

4.12.5. Amplifikation und Titration der sekundären λ -cDNA-Bibliothek

Da primäre λ -Bibliotheken instabil sind, wurde die erstellte cDNA-Bibliothek amplifiziert (3.13.3.). Aufgrund des relativ geringen Phagentiters der Kontrollansätze wurden die verbleibenden 4/5 der drei Ligationsansätze komplett in Phagen verpackt (**A₂**, **B₂** und **C₂**) und für die Amplifikation der sekundären λ -cDNA-Bibliothek eingesetzt.

Hierfür wurden insgesamt 35 Ansätze mit je 7 ml Top-Agar (42 °C) gemischt und sofort auf große (\varnothing 14,5 cm) vorgewärmte LB-Platten gegossen. Das Volumen an Phagensuspension wurde dabei jeweils so gewählt, dass etwa 5×10^4 *pfu* pro Ansatz resultierten. Nach 7-9 h Inkubation bei 37 °C wurden Plaques sichtbar. Nachdem sie einen Durchmesser von etwa 1-2 mm erreicht hatten, wurden die Platten mit 8-10 ml SM-Puffer überschichtet und über Nacht vorsichtig geschüttelt. Nach der Abnahme und Aufarbeitung der Phagen-Suspension erfolgte eine erneute Titration. Hierzu wurden Verdünnungen zwischen 1:10³ bis 1:10⁷ hergestellt, "frische" *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen mit je 1 μ l der Verdünnungen infiziert und ausplattiert. Die Bestimmung des Phagentiters wurde auf LB-Platten ausgeführt, wobei abermals der Anteil an Leervektoren bestimmt wurde. Abbildung 4-48 fasst die Mittelwerte der Titerbestimmung zusammen.

Fraktion	A₂	B₂	C₂
Phagentiter (<i>pfu</i> /ml)	7×10^5	$2,5 \times 10^8$	$3,5 \times 10^6$
Leervektorenanteil (%)	0,2	0,8	0,6

Abb. 4-48: Titerbestimmung und Leervektorenanteil der Phagensuspensionen **A₂**, **B₂** und **C₂**

Ein Phagentiter von 7×10^5 - $2,5 \times 10^8$ pfu/ml für die angelegte cDNA-Bibliothek aus *C. paradoxa* wurde als ausreichend angesehen, um im anschließenden Immunoscreening dieser cDNA-Bibliothek mit anti-SynPP-Antikörpern oder CyRPR interagierende Phagenklone zu detektieren.

4.13. Screening der *C. paradoxa* λ -cDNA-Bibliothek

4.13.1. Suche nach RPP-codierenden Phagen-Klonen über Antikörperbindung

In *Western-Blot* (4.8.) und Immunopräzipitierungs-Experimenten (4.9.3.) konnte eine spezifische Bindung des anti-SynPP-Antikörpers mit einem etwa 30 kD großen Protein aus *C. paradoxa* S100-Extrakt nachgewiesen werden. Es wurde deshalb erwartet, im Rahmen eines Expressions-Screenings der *C. paradoxa* λ -cDNA-Bibliothek spezifische Signale zu erhalten und die entsprechenden cDNA-Klone isolieren zu können. In vorbereitenden Experimenten sollte das immunologische *Screening*-Verfahren mit α -SynPP-AB optimiert werden.

Als Kontrolle wurde ein Phagen-Klon eingesetzt, welcher für das *Synechocystis* RNase P-Protein codiert. Zur Erstellung des Klons war das *mnpA*-Gen durch PCR amplifiziert und in Uni ZAP XR kloniert worden (λ SynPP; G.Grimmer). Zusätzlich zu diesem "Positivklon" wurde ein "Negativ-Phagen-Klon" verwendet, der nicht zur Proteinexpression fähig ist (pBR322 Test-Insert; λ pBR; A. Meisner).

Um das Signal-Hintergrundverhältnis zu verbessern, wurden α -SynPP-AB mit *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellfragmenten behandelt (3.8.9.3.). Durch Variation der α -SynPP-AB Verdünnungen (1 : 500 - 50 000) und des Sekundärantikörpers (1 : 1000-10 000) war es nicht möglich, die Signal-Intensität zwischen λ SynPP und λ pBR zugunsten des λ SynPP zu verstärken (Abb. 4-49).

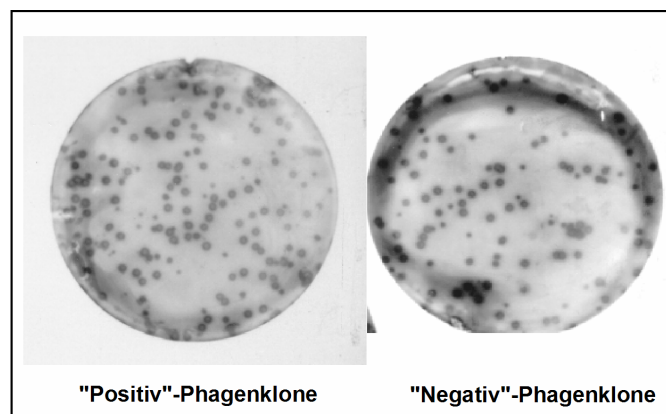


Abb. 4-49: Fluorographien von Nitrocellulose-Membranen mit Phagen-Klonen nach Inkubation mit α -SynPP-AB

Während die "Positiv"-Plaques λ SynPP nach IPTG-Induktion das zu α -SynPP-AB spezifische Antigen (SynPP) exprimieren, können die "Negativ"-Plaques λ pBR kein Fremd-Protein exprimieren.

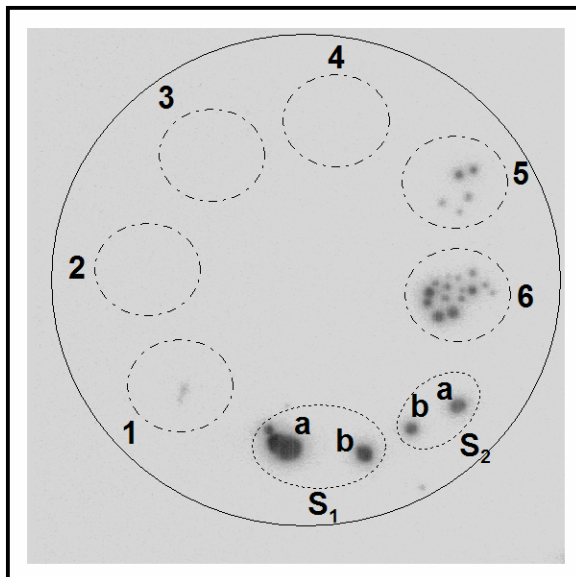
Die Versuche zum Immuno-*Screening* der *C. paradoxa* λ -cDNA-Bibliothek mit α -SynPP-AB wurden deshalb nicht weiterverfolgt.

4.13.2. Suche nach Phagen-Klonen, welche RNA-bindende Proteine exprimieren

Für das *Screening* der λ -cDNA-Bibliothek über Protein-RNA-Interaktion mit CyRPR wurden *E. coli* XL1-Blue MRF⁻-Zellen mit $40 - 50 \times 10^3$ pro LB-Platte (\varnothing 14,5 cm) infiziert.

Nach der IPTG-induzierten Expression (3.13.7.) wurden die Nitrocellulose-Membranen abgezogen und gewaschen. Durch die Blockierung mit Hefe-RNA (3.13.9.1.) wurden unspezifische RNA-Bindungsstellen abgedeckt, während spezifische CyRPR-Bindungsstellen durch Binden von Vollängen-CyRPR-Transkripten detektiert werden sollten (3.13.9.2.). Als Positiv-Kontrolle für eine erfolgreiche Bindung wurde in ersten Ansätzen stets rekombinantes SynPP an markierter Position auf die Membran aufgebracht (1 μ g - 10 ng; Abb. 4-50).

Je 10 μ l der "Positiv"/"Negativ"-Plaquesuspensionen wurden in verschiedenen Verdünnungen auf eine LB/Top-Agar-Platte aufgetragen, inkubiert, auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und IPTG induziert (3.13.7.). Zur Kontrolle auf eine erfolgreiche RNA-Bindung wurden rekombinantes SynPP und Pm9511PP in verschiedenen Verdünnungen an markierten Positionen auf die Membran aufgetragen. Die Hybridisierung erfolgte bei 4 °C für 16 h. Die Membran wurde viermal mit Puffer SRP-A unter leichtem Schütteln bei 4 °C gewaschen, getrocknet und am PhosphoImager exponiert.



1	"Negativ"-Plaques λ pBR	1:10 (v/v)
2		1:100 (v/v)
3		1:1000 (v/v)
4	"Positiv"-Plaques λ SynPP	1:1000 (v/v)
5		1:100 (v/v)
6		1:10 (v/v)
S ₁	SynPP a/b (1 μ g/10 ng)	
S ₂	Pm9511PP a/b (1 μ g/10 ng)	

Abb.: 4-50: Test zur Bindung von [³²P]-markierter-CyRPR an Phagen-Plaques

Der Umriss der Membran und die Auftragspositionen der Phagensuspensionen sind durch Linien angedeutet. Die Verdünnungen der Phagen-Suspensionen sind angegeben.

4.13.2.1. Charakterisierung der erhaltenen Klone

Insgesamt wurden 450×10^3 pfu auf Interaktion mit Vollängen-CyRPR untersucht. Elf Signale wurden als potentiell positiv eingestuft, die entsprechenden Plaques isoliert (3.13.10) und einer weiteren Screening-Runde unterzogen (3.13.11.). Neun der ursprünglich elf Signale konnten hierbei bestätigt werden, in einer dritten *Screening*-Runde reduzierte sich ihre Zahl auf sechs. Abb. 4-51 zeigt Beispiele der Isolierung und Anreicherung positiver Signale.

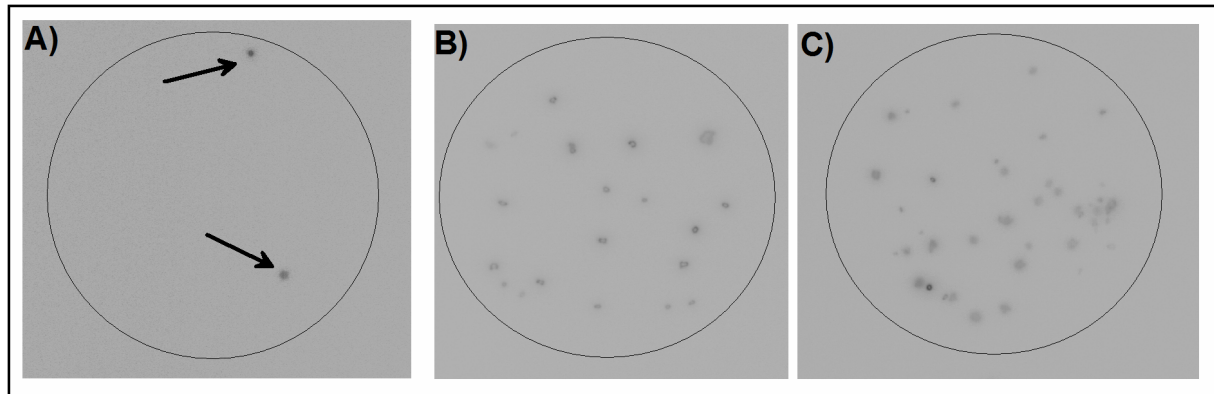


Abb. 4-51: Screening einer *C. paradoxa* cDNA-Bibliothek in λ -Uni-ZAP XR durch CyRPR-Bindung

A) Identifizierung positiver Phagenklone in der ersten *Screening*-Runde. Die exemplarisch gezeigte Platte (\varnothing 14,5 cm) trug etwa 45 - 50 000 Plaques. Positive Signale, welche für eine zweite *Screening*-Runde verwendet wurden, sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

B) Anreicherung von positiven Phagen-Klonen in der zweiten *Screening*-Runde für den exemplarisch gezeigten Klon CycDNA2 (2 "Positiv"-Plaques : 3 "Negativ"-Plaques).

C) Bestätigung der positiven Phagenklone in der dritten *Screening*-Runde (4 "Positiv"-Plaques : 1 "Negativ"-Plaques).

Der Umriss der Membranen ist jeweils durch Linien angedeutet.

4.13.2.2. *In vivo*-Exzision des Phagemids aus isolierten λ -Klonen und Charakterisierung der klonierten cDNAs

Die Isolierung der als positiv eingestuften Inserts wurde dadurch ermöglicht, dass λ ZAP ein *Phagemid* enthält. Nach der Isolierung der *Phagemids* (3.13.12.) wurde dieses in SOLR-Zellen transformiert und durch Inkubation auf Ampicillin-haltigen LB-Platten selektiert. Mit je einem diskreten Klon dieser Ansätze wurde eine Plasmid-DNA-Präparation im analytischen Massstab durchgeführt (3.3.4.1.).

Aliquots dieser Plasmide wurden durch Spaltung mit *Eco*RI/*Xho*I und Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 5-52), anschließend wurde alle sechs Klone mit den Primern M13(-20) und M13(rev) sequenziert (3.6.).

Für pCycDNA1 und pCycDNA3 wurden als Inserts nur Vektorfragmente gefunden. pCycDNA6 kann weder durch *Eco*RI/*Xho*I-Restriktionsspaltung noch durch die Sequenzierung mit den Standardprimern sequenziert werden. Es ist deshalb davon auszugehen, dass während der Klonierung sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende Mutationsereignisse stattgefunden haben.

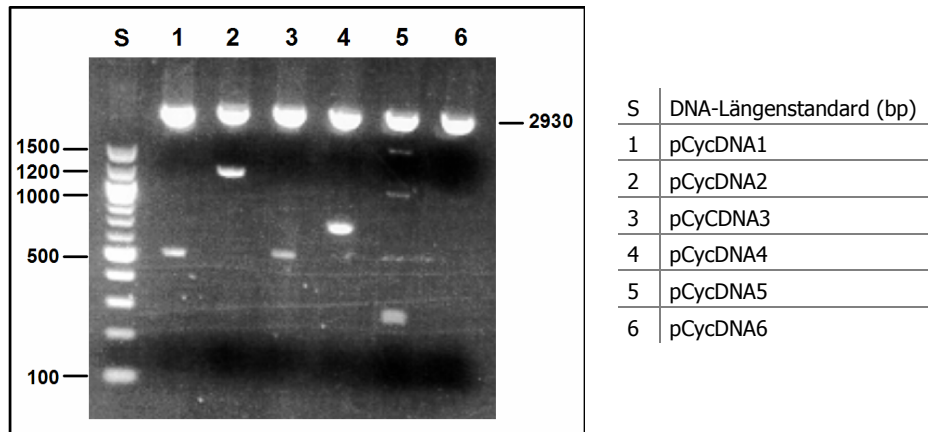


Abb. 4-52: EcoRI/XhoI-Restriktionsverdau der isolierten λ-Klone

Am linken Rand ist ein DNA-Längenstandard angegeben (bp), am rechten Rand die Größe des pBluescript-*Phagemids* nach *EcoRI/XhoI*-Restriktionsverdau.

Für pCycDNA2, pCycDNA4 und pCycDNA5 können nach einem Datenbankabgleich der erhaltenen Sequenzen Homologien auf Proteinebene zu eukaryotischen Organismen gefunden werden (3.14.1.):

pCycDNA2:

Die klonierte cDNA besitzt eine Größe von etwa 1300 Basenpaaren (Abb. 5-52). Nach Sequenzierung mit den *Primern* M13(-20) und M13(rev) wurde abermals mit den spezifischen internen *Primern* Cy2F und Cy2Rev sequenziert. Durch Datenbankabgleich auf Proteinebene (3.14.1. & 3.14.2.) konnte eine Homologie zu dem Wat1/Pop3 *WD-Repeat*-Protein aus *S. pombe* und einem *WD-Repeat* Protein aus Reis (*Oryza sativa*) gefunden werden.

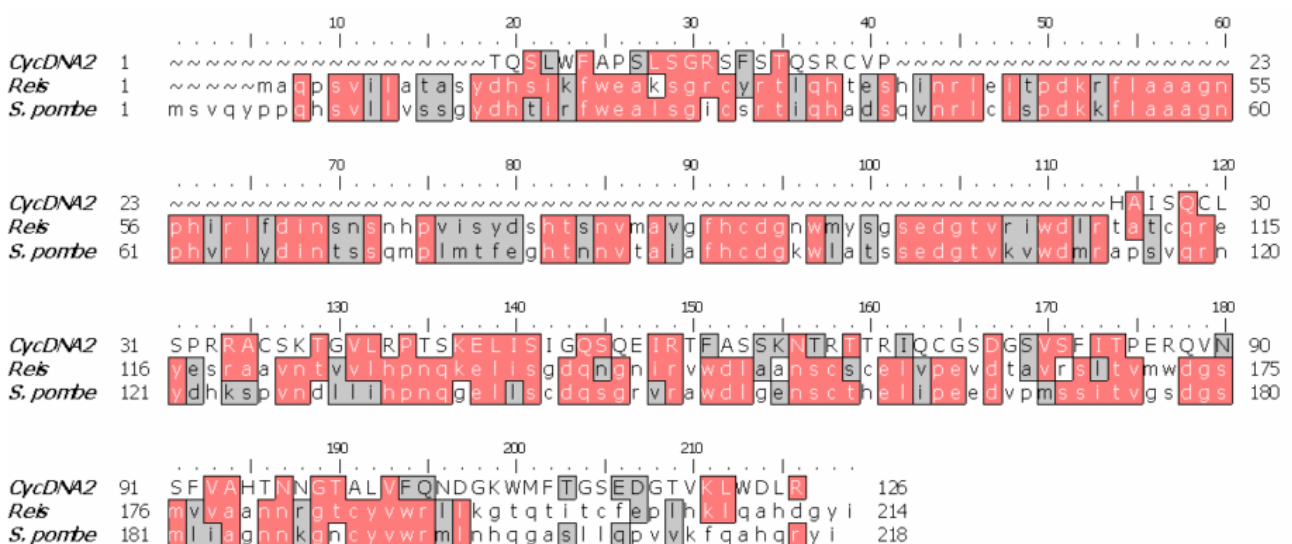


Abb. 4-53: Aminosäure-Aligment von pCycDNA2

Identische Aminosäuren sind rot, vom Charakter konservierte Aminosäuren grau hinterlegt.

pCycDNA4:

Es konnte nur eine geringe Homologie zu zwei nicht näher charakterisierten Proteinen mit hypothetischer RNA-Bindungsfunktion in *Drosophila melanogaster* und *Xenopus laevis* gefunden werden. Auf eine ausführlichere Charakterisierung des Klons wurde daraufhin verzichtet.

pCycDNA5:

Nach Sequenzierung des Inserts mit den *Primern* M13(-20) und M13(rev) wurde abermals mit den *Primern* Rpl18f und Rpl18rev sequenziert. Es konnte eine große Homologie zum Protein rpl18 aus Arabidopsis und Reis gezeigt werden (Abb. 4-54; 3.14.1. & 3.14.2.). Die Abweichung am Carboxyterminus des CycDNA-5-Proteins ist dabei auf eine mögliche Leserasterverschiebung innerhalb einer schwer auswertbaren Sequenzregion zurückzuführen.

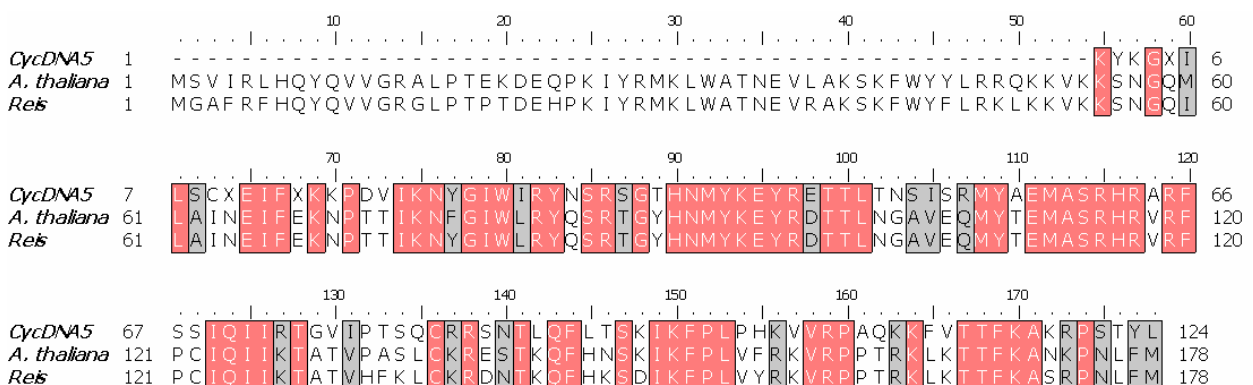


Abb. 4-54: Aminosäure-Alignment von pCycDNA5

Identische, von pCycDNA5 codierte, Aminosäuren sind rot, vom Charakter konservierte Aminosäuren grau hinterlegt.

4.14. Nukleäre RNase P aus Pflanzen

Über den Aufbau der RNase P aus höheren Pflanzen liegen bis heute kaum Daten vor. Für *Arabidopsis thaliana* als einziger Pflanze mit vollständig sequenziertem nukleärem Genom konnte die RNase P Proteinuntereinheit ATPOP1p durch Sequenzvergleiche identifiziert werden. Hierzu wurden entsprechende Expressionsklone konstruiert und rekombinantes Protein für die Produktion polyklonaler Antikörper eingesetzt (Menzel, 2002). Letztendlich sollen die erhaltenen anti-ATPOP1p-Antikörper bei entsprechender Qualität zur Immunopräzipitation der Weizen-RNase P eingesetzt werden.

4.14.1. Analyse des *ATpop1*-Spleiß-Musters

Die Expressionsklone pRSETATpop1 und pRSETATpop1ΔI codieren beide für das Protein ATPOP1p aus *A. thaliana*, unterscheiden sich jedoch am C-Terminus.

Alle ursprünglich aus *A. thaliana* mRNA-Präparationen generierten cDNAs besaßen einen von Datenbanken als Intron identifizierten Sequenzabschnitt. Insgesamt wurden dabei 21 unabhängige cDNA-Klone generiert, welche alle das Intron enthielten. Aus denselben mRNA-Präparationen wurden jedoch auch andere, korrekt gespleißte cDNAs isoliert (G. Grimmer). Um beide Spleiß-Varianten zur Verfügung zu haben, wurde neben dem Expressionsvektor mit der ungespleißten cDNA

(pRSETATpop1) durch Mutagenese auch die gespleißte cDNA-Variante erstellt (pRSETATpop1ΔI; N. Menzel, 2002). Während in der ungespleißten Form ein Stopcodon im Intron (Position 454) zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führt, wird die Translation in der gespleißten Variante erst in Position 666 beendet (Abb. 4-55). Die resultierenden Proteine besitzen daher ein Molekulargewicht von 17,1 kD bzw. 21,5 kD.

Um das Spleiß-Muster von ATPOP1 abschließend zu klären, sollte die Größe der ATpop1-mRNA in einer frischen *A. thaliana* mRNA-Gesamt-Präparation durch *Northern-Blot*-Hybridisierung (4.14.1.2.) geklärt werden.

4.14.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung der Gesamt-RNA mit Hilfe des *RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)* wurde in zwei verschiedenen Ansätzen mit jeweils 100 mg Blattmaterial durchgeführt. Die Extraktion wurde mit Puffer RLC nach Herstellervorschrift durchgeführt. In einem Ansatz wurde dem Puffer hierbei DNase I zugesetzt. Aus 100 mg Pflanzenmaterial wurden zwischen 60 und 70 µg Gesamt-RNA bei einem A_{260}/A_{280} -Quotienten von 1,9 isoliert.

1	ATGGCTACTA CTGCGAATGG AAACCTAAG AAAAGAGATG GTGGTCTATC GTCGCTTGCC CCTCGCAAAA TCAACGTGCA
81	GAAATTCTCA GAGGCTCGAG CACCAGAGCT CGAATCTCTT CACTCCATFG TGTCTGAGCG TTTGAACAAG GACTTTTCGAT
161	CAAAGAGGAA TAAGAGGAGA AGGACCAATT CTTACAATAA TCAACCTGCG AAGAAGCGTA ATATAAAGAG GCAAAAATCA
241	CAGTCATTGA TTGGTCAAGT ATCAGGAGGA GACCATGAAG TAAAGATCAC TAGACGAGTT AAGAGAAGAA TGGAACTTAA
320	AGGGAACCCT GAAACTGGGT TTTGTACTTC TGGTGATGGA ACTAAGAGGC TGAGAACACA TGTTTGGCAC GCTAAACGAT
401	TCACATGAC TAAGCTTTGG GGTFTTCACC TTCCTCTTGG TTTACACGGA AGG TAAATT CAAATTTGCA GTGTTT TGA
481	TTCTGATAGG TTACAAAAA GTTAAGAGTC TTTTGAATC TTAAGGTTGT TTTTGTATG GTTCTAGAGG AAGGGGATCT
561	AGGGATGTCT TGAAGCAGTC TCGCAAGGT GTTCTTGTTC ATGATGCAAG CTATCACATT GCTGTGCAAT TGGAGGGTCC
641	AGAGGCAGGC ATTCACACTT ATTCT TGA

Abb. 4-55: *ATpop1*-cDNA Sequenz

Das Intron ist gelb unterlegt, die Stopcodons rot. Gezeigt sind außerdem die für die *Northern-Blot*-Hybridisierung verwendeten Oligonukleotide Pop1Gsp2 und AtpopIntr.

4.14.1.2. *Northern-Blot* Hybridisierung zur Größen-Bestimmung von *ATpop1*-mRNA

Die unter (4.14.1.1.) isolierten Gesamt-RNA-Präparationen wurden mit EtOH präzipitiert (3.3.1.) und in Probenpuffer (3.1.1.2.) aufgenommen. Nach der Aufteilung der beiden Ansätze in Aliquots zu jeweils 10 und 50 µg Gesamt-RNA erfolgte die Auftrennung über ein denaturierendes 1 % Agarosegel (3.1.1.2.). Als Längenstandards wurden Transkripte von ATpop1 und ATpop1ΔI aufgetragen, die durch T7-Transkription (3.5.2.) der Expressionsplasmide pRSETATpop1 und pRSETATpop1ΔI hergestellt wurden. Der Übertrag auf die Nylonmembran (*Porablot NY plus*) erfolgte durch Kapillartransfer (3.2.2.).

Die *Northern-Blot* Hybridisierung wurde nach 3.2.3. mit 35×10^6 cpm [^{32}P]-markiertem POP1GSP2 (3.2.5.) 15 h bei 50 °C durchgeführt. Die stringente Waschtemperatur betrug 55 °C (3.2.3.).

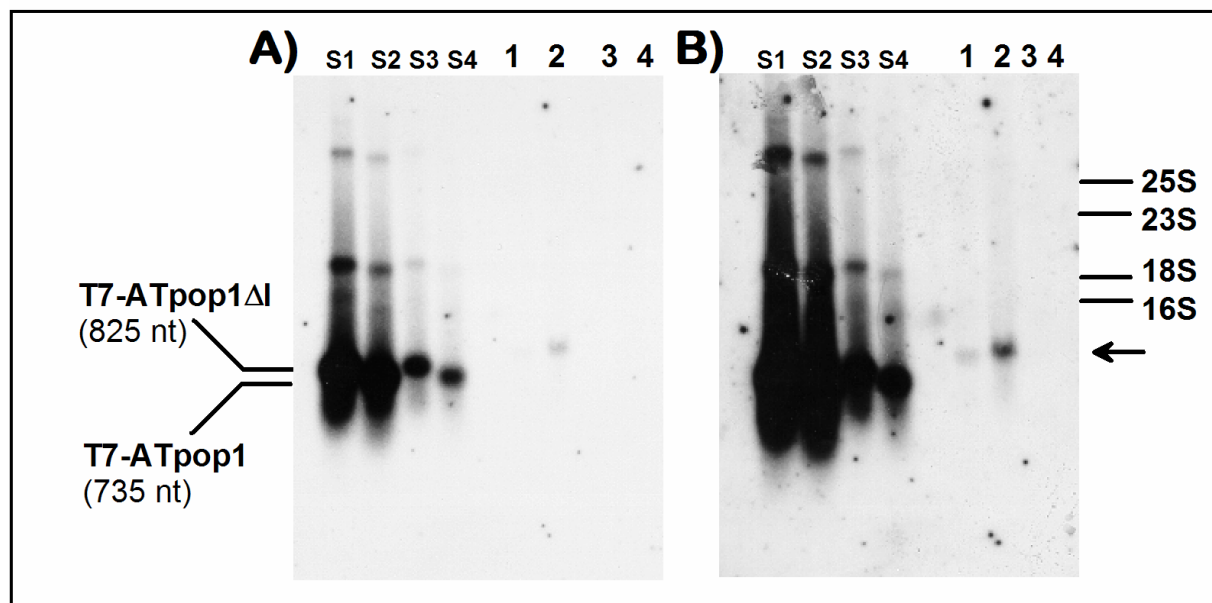
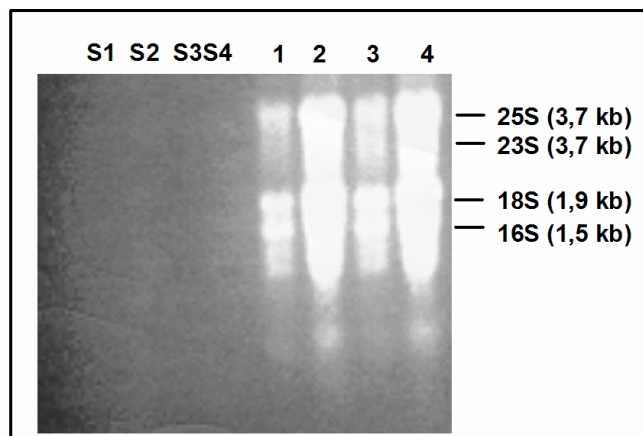


Abb. 4-56: Arabidopsis Gesamt-RNA-Präparation

Die Gesamt-RNA-Präparation wurde durch ein denaturierendes 1 % Formaldehyd-Agarosegel (3.1.1.2.) aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen (3.2.1.1.): S1/S3 : 100/1 ng T7-ATpop1-Transkript; S2/S4 : 100/1 ng T7-ATpop1Δ-Transkript; Spuren 1 und 2 mit 10 bzw. 50 µg Gesamt-RNA-Präparation (+ DNase I-Behandlung); 3 und 4 mit 10 bzw. 50 µg Gesamt-RNA-Präparation (- DNase I). Gut zu erkennen sind die rRNAs des Kerns und der Chloroplasten von *Arabidopsis*. Die Nylon-Membran wurde nach dem Kapillartransfer im UV-Durchlicht fotografiert.

Abb. 4-57: Northern-Blot Hybridisierung mit der Sonde POP1GSP2

Die Abbildungen **A** und **B** zeigen vorsensibilisierte Röntgenfilme unter Verwendung von Verstärkerfolie nach 3 bzw. 18 Tagen Exposition bei -80 °C (3.1.3.3.). Die Spuren entsprechen Abb. 4-56. Der Pfeil zeigt die Laufhöhe der detektierten mRNA an. Die Position der rRNAs wurde durch Film-Membran-Abgleich übertragen. Eine Hybridisierung fand nur in der Gesamt-RNA-Präparation mit DNase I-Behandlung statt.

4.14.2. Expression und Aufreinigung von ATPOP1p/ATPOP1ΔIp

Für eine präparative Expression von ATPOP1p und ATPOP1ΔIp in *E. coli* BL21 Star wurden je 500 ml-Kulturen (LB-amp) aus einer 5 ml Vorkultur in einer 1:1000 Verdünnung angesetzt (3.9.3.3.). Nach Er-

reichen einer $OD_{600} = 0,6$ erfolgten Induktion und Expression unter standardisierten Bedingungen (1 mM IPTG, 37 °C, 4 h). Aus 500 ml Kultur wurden durchschnittlich 2 g Zellsediment gewonnen. Da ATPOP1 und ATPOP1 Δ I nur als Größenstandards in *Western-Blots* (4.14.3.) verwendet werden sollten, wurden sie nicht vollständig aufgereinigt. Nach der Lyse der Zellen mit Puffer A wurde der Protein-Rohextrakt jeweils im *batch*-Verfahren an eine Ni²⁺-Agarose-Matrix gebunden und mit je 20 Volumen Puffer B, C und D gewaschen (3.10.1.1.). Die Elution wurde mit imidazolhaltigem Puffer E solange durchgeführt, bis im Eluat nach Bradford-Analyse (3.8.2.1.) kein Protein mehr detektiert werden konnte. Nach Vereinigung der proteinhaltigen Fraktionen wurden durchschnittlich 1,5 mg ATPOP1p- und ATPOP1 Δ Ip-Präparation aus 500 ml Kultur isoliert. Zur Lagerung bei -20 °C wurden die Protein-Präparationen gegen Puffer F mit 50 % (v/v) Glycerin dialysiert (3.8.1.1.). Unter diesen Bedingungen waren die Präparationen mehrere Wochen stabil.

4.14.3. Aufreinigung der anti-ATPOP1p-Antikörper (α -ATPOP1p-AB)

Die polyklonalen Antikörper waren gegen ATPOP1p - das kleinere Protein, welches von mRNAs mit Intron translatiert wird - erstellt worden. Mit Hilfe der Bradford-Methode (3.8.2.1.) und Extinktionsberechnungen (3.8.9.2.) wurde für die durch Ammoniumsulfat-Fällung (3.8.9.2.) aus Kaninchenserum aufgereinigte Antikörper-Präparation eine durchschnittliche Protein-Konzentration von 17,3 mg/ml bestimmt.

E. coli-spezifische Antikörper, wie sie in jeder polyklonalen Antikörper-Präparation aus Kaninchen vorkommen, wurden nach 3.8.9.3. entfernt. Dieser Schritt war notwendig, da die ATPOP1p- und ATPOP1 Δ Ip-Präparationen nicht bis zur Homogenität aufgereinigt worden waren (4.14.2.) und deshalb noch *E. coli*-Proteine enthielten. Durch die Entfernung der *E. coli*-spezifischen Antikörper konnten für die folgenden Immunreaktionen *E. coli*-spezifische Signale ausgeschlossen werden.

4.14.4. Test auf Spezifität der Antikörper durch enzymgekoppelten immunologischen Nachweis

Der *Western-Blot* wurde wie unter 3.8.5. beschrieben durchgeführt. Hierzu wurden je 0,5 μ g der angereicherten rekombinanten Proteine ATPOP1p und ATPOP1 Δ Ip (4.14.2.) und je 200 μ g eines Weizenkeim S23- (WG)- und eines *Arabidopsis* S100-Extrakts durch ein 12,5-18 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Nach Übertragen auf die Nitrocellulose-Membran und Blockieren wurde aufgereinigter α -ATPOP1p-AB (4.14.3.) in einer 1:1500-Verdünnung als Primärantikörper verwendet. Der Nachweis der Bindung wurde mit einem Merrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (1:5000) durchgeführt (3.8.7.1.)

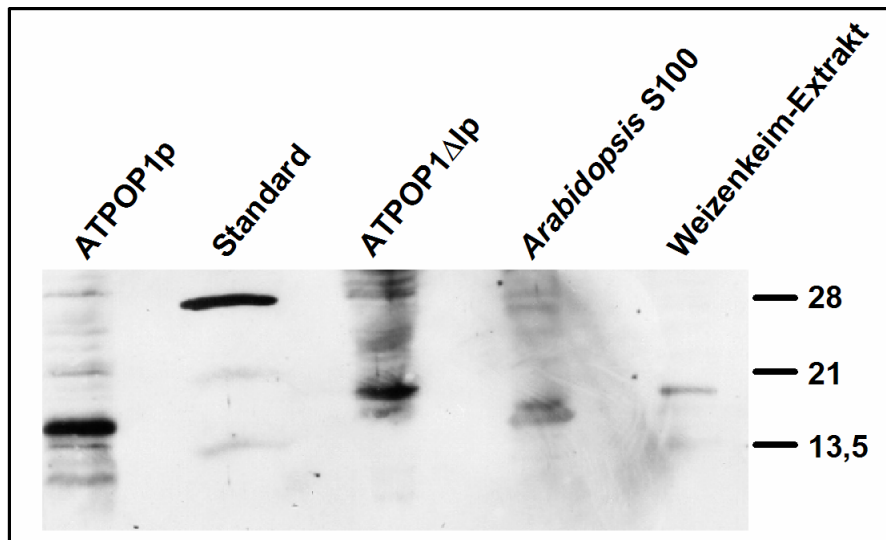


Abb. 4-58: Nachweis von ATPOP1p-homologen Proteinen durch Immunoblot

Je 200 µg der Extrakte aus *Arabidopsis* und Weizenkeim, sowie die rekombinanten Proteine ATPOP1p und ATPOP1ΔIp (je 0,5 µg) wurden auf einem 12,5-18 % SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und durch *Western-Blot*-Analyse nachgewiesen. Am rechten Rand sind die Molekulargewichte des Protein-Längenstandards angegeben (kD).

4.14.5. Immunopräzipitation der *T. aestivum*-RNase P-Aktivität mit α -ATPOP1p-AB

Unspezifisch an Protein-A-Sepharose bindende Proteine des Weizenkeim-S23-Extrakts (WG) wurden entfernt und der Extrakt (500 μ g; 21,3 mg/ml) anschließend mit den an die Protein-A-Sepharose gekoppelten α -ATPOP1p-AB inkubiert (3.8.8.1. & 3.8.8.2.).

Nach Inkubation und mehreren Waschschritten wurden die Protein-A-Sepharose-Kügelchen direkt in RNase P-Aktivitäts-Tests (3.12.3.2.) eingesetzt. Als Substrat wurde *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} verwendet und nach der Reaktion auf einem 10 % PAA-Gel aufgetrennt. Die Produktkontrolle (Spur 3) wurde mit M1-RNA als Ribozymreaktion in Puffer P2 durchgeführt (3.12.1.).

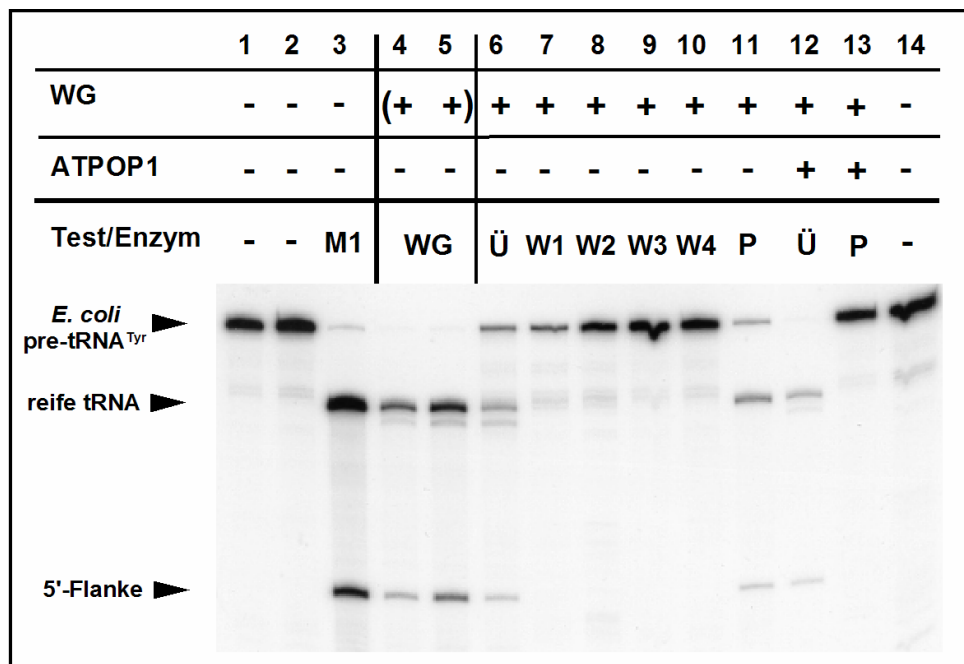


Abb. 4-59: Heterologe Immunopräzipitation der Weizenkeim RNase P-Aktivität

Nachweis der RNase P-Aktivität in verschiedenen Fraktionen der Immunopräzipitation (Ü = Überstand; P = Protein-A-Sepharose-Sediment, W = Waschfraktion).

1	Pufferkontrollen <i>E. coli</i> pre-tRNA ^{Tyr} -	7	
2	Substrat	8	
3	Produktkontrolle mit M1-Ribozymreaktion	9	Waschfraktionen nach Antikörper-Bindung
4	Kontrollen zur Prozessierungsaktivität des	10	
5	Weizenkeim-Extrakts	11	Antikörper-gebundene RNase P-Aktivität im Sediment
6	Überstand nach Antikörper-Bindung	12	Kontrollreaktionen mit Antikörpern, welche mit homologem
		13	Antigen (ATPOP1p) vorinkubiert wurden
		14	an Protein-A-Sepharose gekoppelter anti-SynPP-Antikörper

Abb. 4-59 zeigt die Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität aus Weizenkeimextrakt mit gereinigtem α -ATPOP1p-AB (4.14.3). Als Substrat zur Detektion der RNase P-Aktivität wurde [³²P]-markierte *E. coli* pre-tRNA^{Tyr} (3.5.3.) verwendet und auf einem 10 % PAA-Gel analysiert (3.1.2.). Die Spuren 1-3 zeigen Kontrollen der als Aktivitätsnachweis verwendeten pre-tRNA-Prozessierung: Spur 1 zeigt frisches unbehandeltes Substrat, Spur 2 enthält Substrat, welches in Puffer F den Prozessierungsbedingungen unterworfen wurde. Als Produktkontrolle wurde eine M1-Ribozym-Reaktion in Puffer P2 (3.12.1.) durchgeführt (Spur 3). Kontrollen zur Prozessierungsaktivität des Weizenkeim-Extrakts sind durch die Reaktionen 4 und 5 berücksichtigt. Während 4 die RNase P-Aktivität in frisch aus flüssigem Stickstoff

aufgetautem S100-Extrakt zeigt, wurde Reaktion 5 mit Extrakt durchgeführt, der den gleichen Bedingungen (Temperatur, Dauer der Inkubation) ausgesetzt war, wie der Extrakt während des Immunpräzipitations-Vorgangs. Die Aktivität des Überstandes nach Bindung an Protein-A-Sepharose gekoppelte Antikörpern wurde in Reaktion 6 detektiert. Da hier deutlicher Substratumsatz zu erkennen ist, kann davon ausgegangen werden, dass keine quantitative Präzipitation des RNase P-Holoenzym stattgefunden hat. Die Überstände aller vier Waschschriffe des Protein-A-Sepharose-Pellets zeigten keine Prozessierungsaktivität (Spuren 7-10). Spur 11 zeigt deutlich die durch Antikörperbindung präzipitierte RNase P-Aktivität aus Weizenkeim-Extrakt. Für diesen Aktivitätstest wurde die Sepharose-Matrix mit gekoppeltem Antikörper bzw. gebundenem RNase P-Holoenzym direkt in einer Prozessierungsreaktion nach Standardbedingungen eingesetzt (3.12.3.). Wurde der verwendete Antikörper vor der Immunpräzipitation mit homologem Antigen (ATPOP1p) inkubiert, so fand keine Präzipitation des WG-Holoenzym statt (Spur 13). Die RNase P-Aktivität wurde vollständig im Überstand detektiert (Spur 12).

Eine Verunreinigung der verwendeten Antikörper-Präparation mit unspezifischen Nukleasen konnte ausgeschlossen werden (Spur 14).

5. Diskussion

Das ubiquitär vorkommende Magnesium-abhängige Enzym Ribonuklease P (RNase P) ist für die 5'-Reifung der Vorläufer-tRNA (pre-tRNA) verantwortlich. Die essentielle Endonuklease hydrolysiert die Phosphodiesterbindung zwischen 5'-Flanke und reifer tRNA des tRNA-Primärtranskriptes (Altman und Smith, 1971; Robertson *et al.*, 1972). Das bakterielle Holoenzym besteht aus einer Protein- und einer RNA-Untereinheit. *In vitro* ist die RNA bei hohen Ionenstärken in der Lage, als *trans*-agierendes Ribozym zu fungieren (Guerrier-Takada *et al.*, 1983).

Der Ausgangspunkt für die Untersuchung der RNase P aus den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa* war die Frage nach dem Aufbau der RNase P in den Chloroplasten höherer Pflanzen. Da die heutigen Cyanobakterien und Plastiden auf eine gemeinsame Wurzel zurückgehen, kann angenommen werden, dass RNase P aus möglichst ursprünglichen Pflanzen derjenigen aus Cyanobakterien am ähnlichsten sein sollte. Der im Rahmen dieser Arbeit wichtigste Modellorganismus ist daher die einzellige Alge *C. paradoxa*, deren primitive photosynthetischen Organellen, die Cyanellen, noch starke Ähnlichkeit mit Cyanobakterien aufweisen und deshalb als primitives Chloroplastenmodell angesehen werden (1.6.3.). Um direkte vergleichende Funktions- und Strukturuntersuchungen zu ermöglichen, erfolgte hierbei eine Konzentration auf die experimentell relativ leicht zugängliche Evolutionslinie von Cyanobakterien zu Chloroplasten.

5.1. RNase P aus Cyanellen und Cyanobakterien

5.1.1. RNase P-RNA in Cyanobakterien und Cyanellen

Die Cyanellen von *C. paradoxa* sind die ersten photosynthetischen Organellen, für die eine RNase P-RNA nachgewiesen werden konnte (Baum und Schön, 1996). Sie besitzt trotz ihrer großen Homologie zu cyanobakteriellen RNase P-RNAs keine Ribozym-Aktivität. Dennoch wird *C. paradoxa* RNase P-RNA strukturell bakteriellen RNase P-RNAs zugeordnet (Baum *et al.*, 1996). Ebenso wie die Mehrzahl der cyanobakteriellen RNase P-RNAs verfügt die Cyanellen RNA nicht über das GGU-Motiv als "CCA-Bindungsstelle". Substrate mit 3'-CCA-Ende werden von *C. paradoxa* RNase P wie auch von RNase P-RNA aus dem Cyanobakterium PmCCMPP1375 effizienter umgesetzt als Substrate ohne CCA-Ende (Gimple, 1999; Gimple und Schön, 2001). Weitere auffällige strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen RNase P-RNAs aus Cyanellen und Cyanobakterien sind die Ausbildung einer großen asymmetrischen Schleife in der P15/16-Region und die Fähigkeit, eine Helix P6 mit sechs oder mehr Basenpaaren auszubilden. Die *C. paradoxa* P16-Helix wird durch eine U•U "Paarung" unterbrochen (Anhang I). Dieser *Bulge* ist auch typisch für eine Reihe von Cyanobakterien (Abb. 5-1). *P. marinus* CCMP1375 RNase P-RNA, für welche im Rahmen dieser Arbeit Mutationsanalysen durchgeführt wurden (4.3.), wird in diesem Sekundärstrukturbereich von drei aufeinanderfolgenden U•U "Basenpaaren" unterbrochen, die jedoch eine stabile Doppelstrang-Struktur bilden (Anhang II; Gimple, 1999).

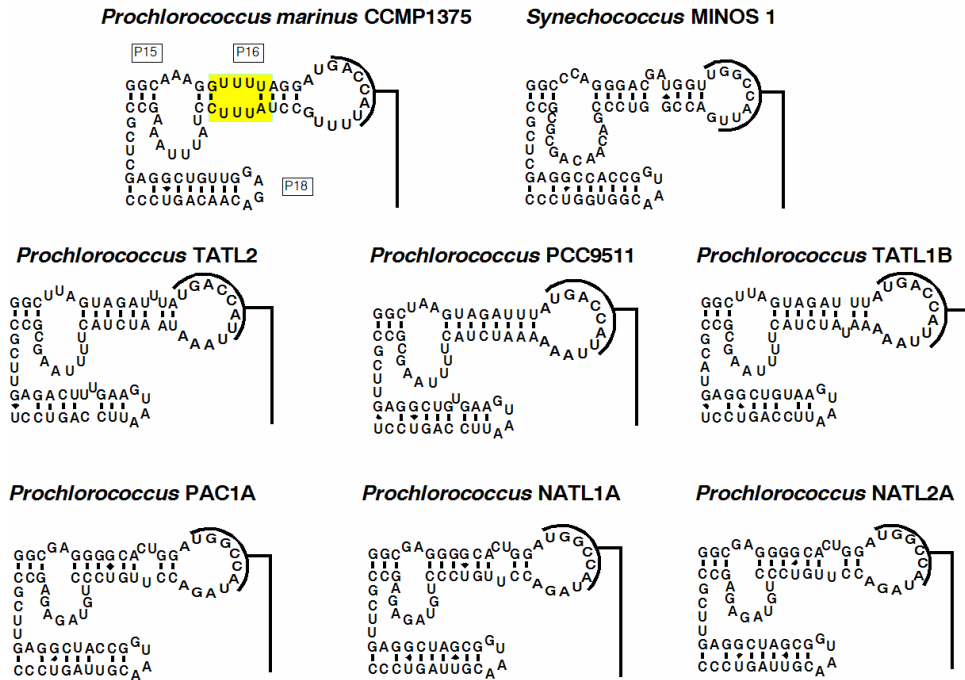


Abb. 5-1: Strukturvergleich der P15/P16 Helices verschiedener cyanobakterieller RNase P-RNAs.

Die charakteristischen U•U Basenpaare in *P. marinus* sind gelb hinterlegt. Die an P6 beteiligten Nukleotide in L16 sind durch schwarze Halbbögen dargestellt (aus Schön *et al.* 2001).

Die P16-Helix von *P. marinus* PCC9511 RNase P-RNA besitzt im Gegensatz hierzu eine vollständig gepaarte P16-Helix. P6 wird in dieser RNA, wie in *C. paradoxa* RNase P-RNA, durch sieben Basenpaare gebildet.

Diese Vielzahl von typischen Sequenzmerkmalen machen cyanobakterielle RNase P-RNA zu einem geeigneten Modell für die Evolution der Plastiden-RNAs (Schön *et al.*, 2001).

5.1.2. Cyanobakterielle RNase P-Proteine

Bakterielle RNase P-Proteine (*rnpA*) sind kleine, basische Peptide, die nur etwa 10 % zur Gesamt-Enzymmasse beitragen (1.3.4.). Sie weisen untereinander Ähnlichkeiten in Größe, Struktur und Gesamtladung auf, eine längere Aminosäure-Konsensussequenz lässt sich jedoch nicht formulieren. Lediglich ein kurzer, an basischen Aminosäuren reicher Abschnitt ist hoch konserviert ("RNR-Motiv"; Abb. 5-3). Für diese Region wurde eine Funktion als RNase P-RNA-Bindungsdomäne nachgewiesen (Tsai *et al.*, 2003). Dieses einzige konservierte Motiv interagiert dabei mit Domäne II (P3, P4, J18/2, J2/4) der RNase P-RNA (Abb. 1-3). Trotz ihrer außerordentlich hohen Sequenzvariabilität weisen alle bakteriellen RNase P-Proteine dieselbe charakteristische Struktur auf (Stams *et al.*, 1998; Spitzfaden *et al.*, 2000): drei α -Helices und ein β -Faltblatt ($\alpha_1\beta_2\beta_3\beta_4\alpha_2\beta_4\alpha_3$). Ihre Funktion besteht sowohl in der Ladungsabschirmung, als auch einer Verbesserung der Substratbindung durch Interkalation konservierter Aromaten in die 5'-Flanke des Substrats (Niranjanakumari *et al.*, 1998). Die Protein-Untereinheiten leisten jedoch keinen Beitrag zur Katalyse.

Durch Sequenz-Alignment mit RNase P-Proteinen von experimentell bestimmter Struktur (Stams *et al.*, 1998; Spitzfaden *et al.*, 2000; Kazantsev *et al.*, 2003) konnte für das *Synechocystis* RNase P-Protein (SynPP) als erstem cyanobakteriellem RNase P-Protein ein räumliches Modell erstellt werden (Abb. 5-2).

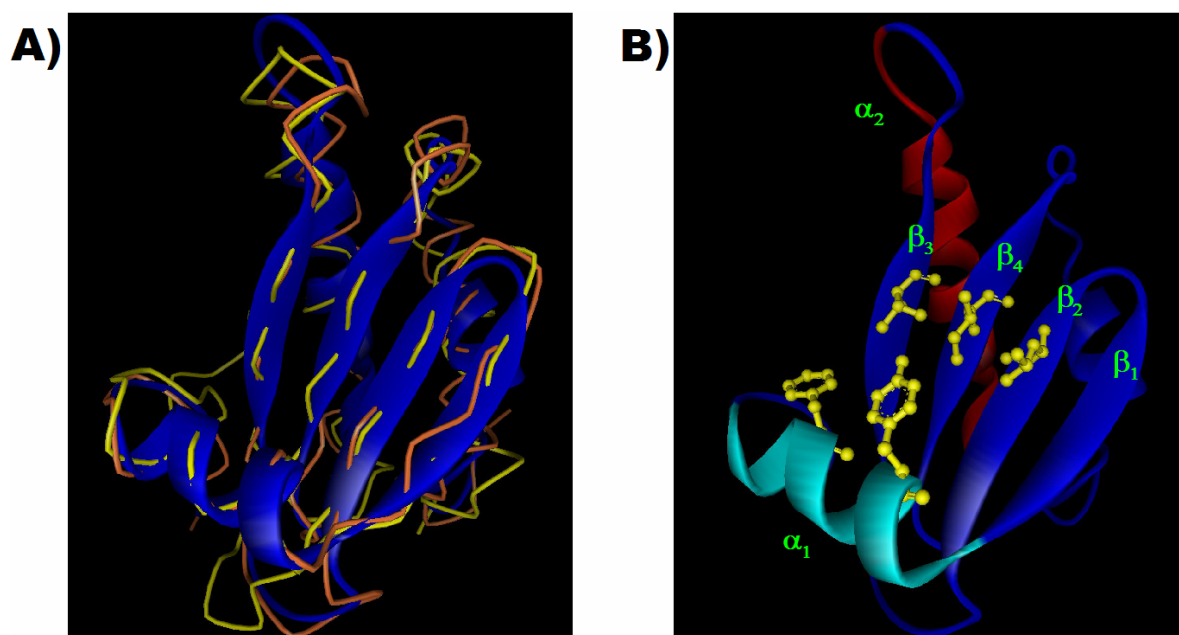


Abb. 5-2: Modellierte 3D-Struktur des *Synechocystis* PCC6803 RNase P-Proteins

A) Das 3D-Modell des *Synechocystis* RNase P-Proteins (blau) wurde durch Struktur-Alignment mit SWISS-Model erstellt (3.14.3). Sekundärstruktur-Elemente sind als Bändermodell dargestellt. Gezeigt sind außerdem die Peptidbindungsrückgrate der RNase P-Proteine aus *B. subtilis* (gelb) und *S. aureus* (orange), welche als Strukturmatrize für die Berechnung dienen.

B) Die funktionell entscheidenden Domänen von SynPP sind farblich hervorgehoben. Helix α_1 (türkis) bildet mit dem gegenüberliegenden β -Faltblatt ($\beta_1 - \beta_4$) ein Strukturelement zur Bindung der pre-tRNA 5'-Flanke. Dabei entscheidende, konservierte Aminosäuren sind in gelb hervorgehoben. Helix α_2 , welche neben einer Vielzahl basischer Aminosäuren das in allen bakteriellen RNase P-Proteinen konservierte "RNR-Motiv" enthält, ist in rot gezeigt. Zu beachten ist das *left-handed* $\beta_3\alpha_2\beta_4$ *crossover*-Strukturmotiv, welches im fortlaufenden Text ausführlicher diskutiert wird.

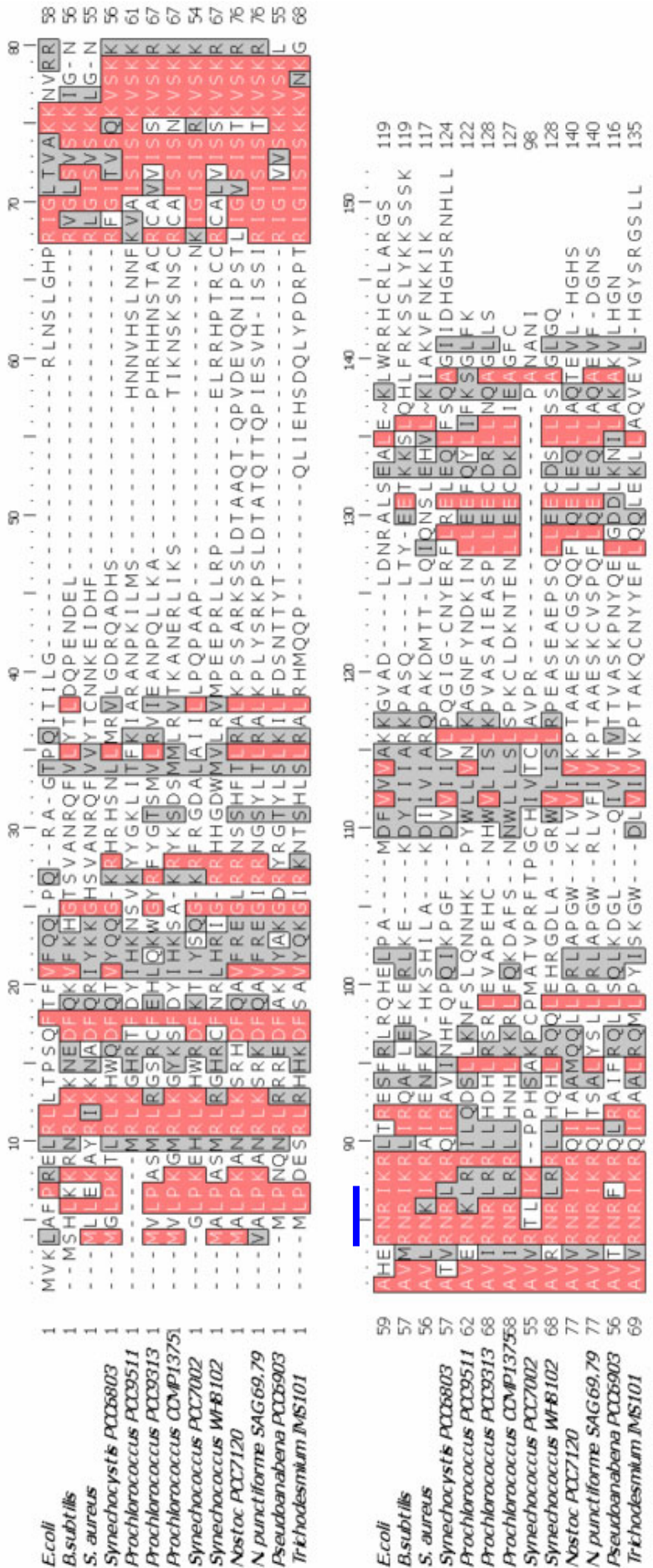


Abb. 5-3: Sequenzvergleich cyanobakterieller RNase P-Proteine

Die Aminosäure-Sequenzen der bekannten cyanobakteriellen RNase P-Proteine wurde den Proteinen aus *E. coli* und den Protein-Untereinheiten mit bekannter Struktur aus *B. subtilis* und *St. aureus* gegenübergestellt. Hoch konservierte Aminosäuren sind rot unterlegt; Aminosäuren verwandten Typs sind grau unterlegt. Das hochkonservierte "RNR-Motiv" ist durch einen blauen Balken markiert. Das Alignment wurde in *ClustalW* erstellt und von Hand nacheditiert (3.14.2.). Die Sequenzen wurden der RNase P Database (Brown *et al.*, 2001) oder aus <http://genome.ornl.gov/Blast/> entnommen. Angegeben sind die Sequenzen von *Escherichia coli* (M11056); *Bacillus subtilis* (X62539); *Staphylococcus aureus* (AF135268); *Synechocystis PCC6803* (X81989); *Prochlorococcus marinus* PCC9511 (NC005072); *Prochlorococcus marinus* PCC9313 (NC005071); *Prochlorococcus marinus* CCMP1375 (NC00504275); *Synechococcus PCC7002* (NC003488); *Synechococcus WH8102* (BX548020); *Nostoc PCC7120* (NC003272); *Nostoc punctiforme* (AAAY00000000); *Pseudoanabaena PCC6903* (AJ000513); *Trichodesmium erythraeum* IMS101 (AABK00000000).

Die modellierte Struktur zeigt für SynPP alle auch für das *B. subtilis* RNase P-Protein funktionell diskutierten Domänen (Abb. 1-6): Eine pre-tRNA-Bindungsdomäne wird durch α -Helix 1 mit dem gegenüberliegenden β -Faltblatt gebildet. In der so ausgebildeten Tasche wird die 5'-Flanke der pre-tRNAs durch Basenstapelung (Niranjanakumari *et al.* 1998; Abb. 1-7) gebunden. Von besonderem Interesse ist das von α -Helix 2 ("RNR-Motiv") und den β -Faltblattelementen β_3 und β_4 gebildete *left-handed* $\beta\alpha\beta$ *crossover*-Strukturmotiv. Dieses Strukturmotiv findet sich bei minimaler Sequenzhomologie (< 13 %) sonst nur für das carboxyterminale Ende des ribosomalen Proteins S5 (Ramakrishnan und White, 1992) und der Domäne IV des Elongationsfaktors G (EF-G; Abb. 5-4; Czworkowski *et al.*, 1994). Dabei wird für S5 ein mit 16S rRNA interagierender Argininrest diskutiert, während Domäne IV von EF-G während der Translokation mit ribosomaler RNA wechselwirkt (Nissen *et al.*, 1995; Czworkowski und Moore, 1997). Aus phylogenetischer Sicht ist dabei die strukturelle Verwandtschaft des RNase P-Proteins zu EF-G besonders bemerkenswert. In *E. coli* prozessiert das RNase P-Holoenzym pre-4.5S RNA (Peck-Miller und Altman, 1991). Die gereifte 4.5S RNA bindet nach erfolgter Translokation an das Ribosom und löst dabei EF-G von der 23S RNA der großen ribosomalen Untereinheit ab. Für das RNase P-Protein und EF-G wird aufgrund der strukturellen, aber auch der funktionellen Verwandtschaft im Rahmen der Translokation ein gemeinsamer evolutiver Ursprung diskutiert (Hansen *et al.*, 1985; Stams *et al.*, 1998).

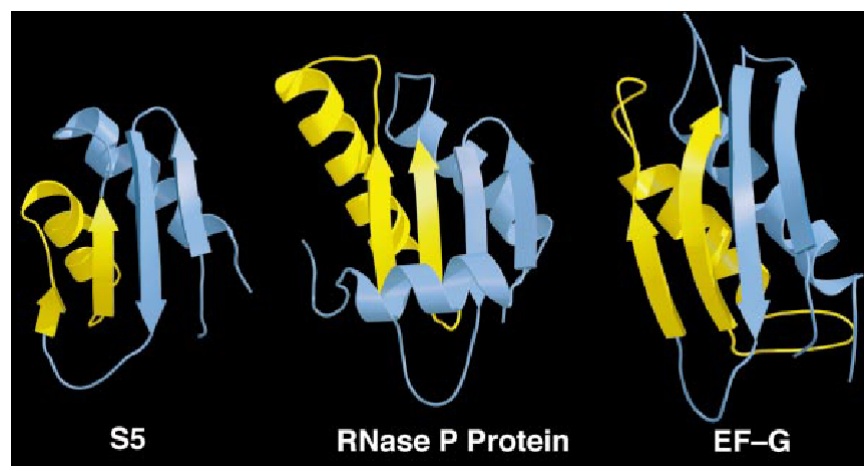


Abb. 5-4: Strukturvergleich des *B. subtilis* RNase P-Proteins mit topologisch verwandten Proteinen

Gezeigt sind die carboxyterminale Domäne des ribosomalen Proteins S5 (PDB-Code 1PKP) und die Domäne IV der ribosomalen Translokase EF-G (PDB-Code 1DAR). Das äußerst seltene *left-handed* $\beta\alpha\beta$ *crossover*-Strukturmotiv ist jeweils gelb dargestellt. Die hohe topologische Ähnlichkeit der Proteine bzw. Domänen lässt einen gemeinsamen evolutiven Ursprung vermuten (Abb. aus Stams *et al.*, 1998).

Das *Prochlorococcus marinus* (PCC9511) RNase P-Protein (Pm9511PP) unterscheidet sich von anderen bakteriellen Proteinuntereinheiten durch ein zusätzliches etwa zehn Aminosäuren langes Fragment (Lys41-His50), welches zwischen den β -Faltblattstrukturelementen β_2 und β_3 liegt (Abb. 5-2 & Abb. 5-3). Da RNase P-Proteine aus Cyanobakterien mit pre-tRNA-3'-CCA-Bindungsmotiv (z.B. *Synechocystis* und *Pseudoanabaena*) dieses Sequenzelement nicht besitzen, wird durch diese zusätzliche Aminosäuresequenz möglicherweise das fehlende 3'-CCA-Bindungsmotiv der zugehörigen RNase P-RNA kompensiert (1.3.2.2.). Stams *et al.* (1998) postulieren in *B. subtilis* für den β_2 - β_3 verbindenden *Loop* eine Metallionen-Bindungsfunktion. Der Unterschied in der Primärstruktur von Pm9511PP führt

vermutlich zu einer vom bakteriellen Strukturkonsensus abweichenden Faltung des Proteins. Die Erstellung eines räumlichen Modells von *P. marinus* PCC9511PP (Pm9511PP) mit SWISS-Model konnte deshalb nur für eine einzelne Domäne durchgeführt werden: das *left-handed* $\beta\alpha\beta$ crossover-Strukturmotiv, für welches eine RNase P-RNA-Bindungsfunktion diskutiert wird (Abb. 5-5). Das in allen bakteriellen RNase P-Proteinen konservierte "RNR-Motiv" ist in Helix α_2 lokalisiert.

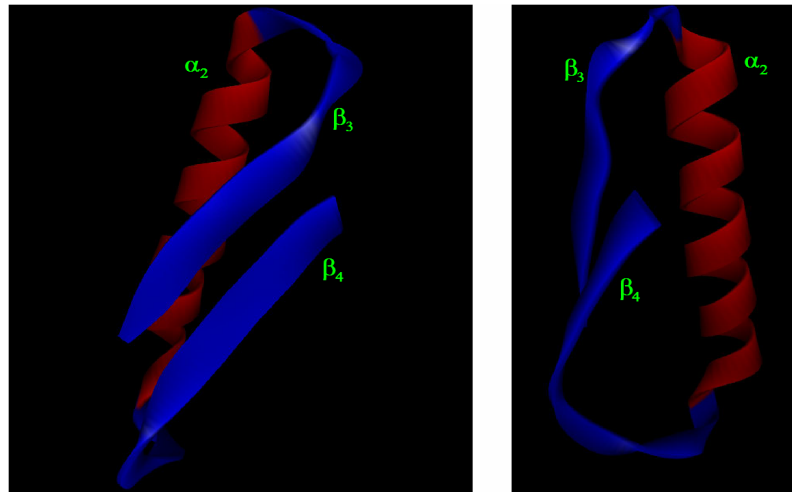


Abb. 5-5: Modellierter 3D-Struktur des *left-handed* $\beta\alpha\beta$ crossover-Strukturmotivs des *P. marinus* PCC9511 RNase P-Proteins

Das 3D-Modell von Pm9511PP zeigt das *left-handed* $\beta\alpha\beta$ crossover-Strukturmotiv in zwei unterschiedlichen Orientierungen (90°-Drehung im Uhrzeigersinn). Zur Erstellung des Modells wurde die *P. marinus* Aminosäuresequenz per Hand voreditiert und erst hiernach modelliert (3.14.3). Die Benennung der Sekundärstrukturelemente entspricht der für SynPP (Abb. 5-2).

Eine Modellierung weiterer Domänen scheiterte am Kalkulationsansatz des Programms: Die ersten Schritte der Modellierung beruhen auf einem Sequenz- mit anschließendem Struktur-Alignment zu gelösten Strukturen. Hierfür werden Sequenzabschnitte von mindestens 20 Aminosäuren benötigt, die zudem minimal 25 % Übereinstimmung aufweisen müssen. Diese Bedingungen sind für Pm9511PP im Vergleich zu den bekannten Strukturen aus *B. subtilis*, *S. aureus* und *T. maritima* nicht erfüllt.

5.2. Funktionelle Charakterisierung der RNase P-RNA aus den Plastiden von *C. paradoxa* und *G. nostochinearum*

Glaucocystis nostochinearum ist ein photoautotropher Einzeller, der wie *C. paradoxa* zur Familie der *Glaucophyceae* gezählt wird (Abb. 1-16). Die Organisation der Plastome von *C. paradoxa* und *G. nostochinearum* gleicht sich im RNase P-RNA codierenden Bereich und lässt daher auf eine enge evolutive Verknüpfung von CyRPR und GlauRPR schließen (Abb. 5-6).

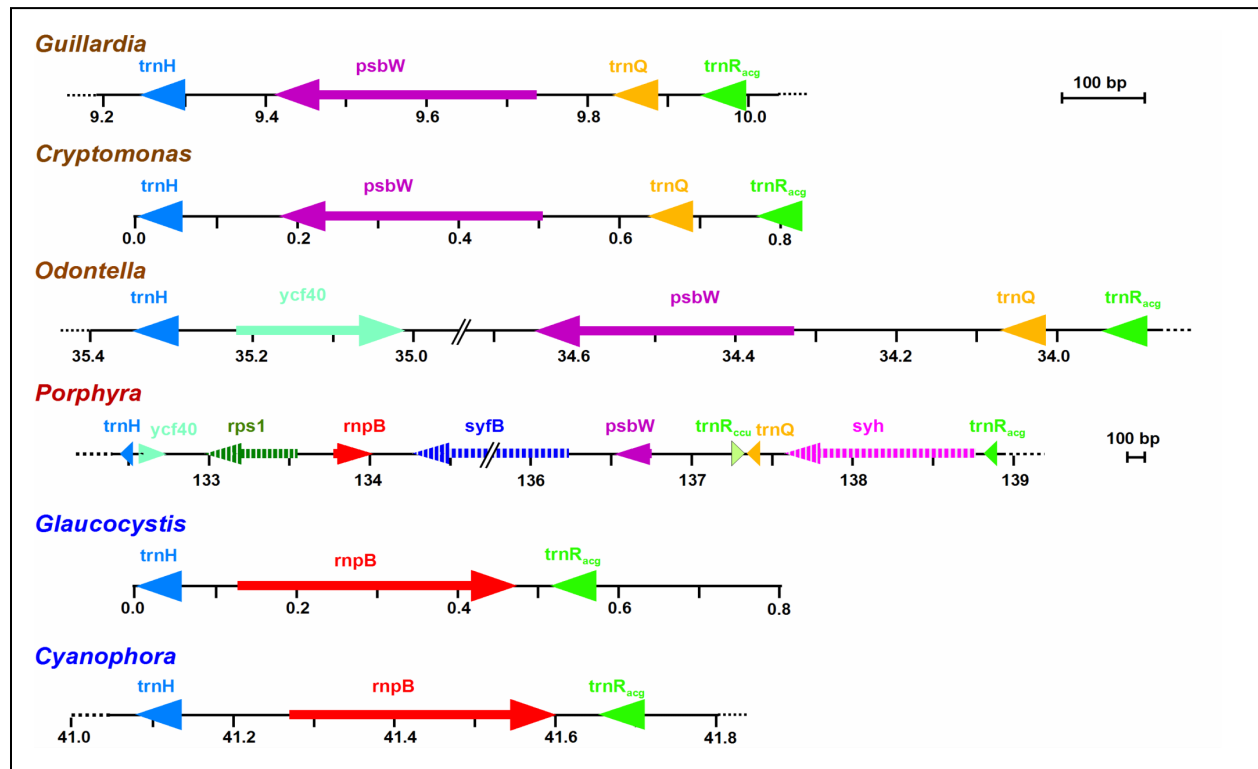


Abb. 5-6: Evolution der *rnpB* codierenden Region in den Plastomen nicht-grüner Algen

Das Schema zeigt die Genorganisation zwischen den tRNA codierenden Abschnitten *trnH* und *trnR_{ACG}* in *Guillardia theta* (NC000926), *Cryptomonas* sp. (Schön, nicht veröffentlicht), *Odontella sinensis* (NC001713), *Porphyra purpurea* (NC000925), *Glaucocystis nostochinearum* (Schön, nicht veröffentlicht) und *Cyanophora paradoxa* (NC001675). Größe und Orientierung der Gene werden durch die Pfeillänge bzw. -richtung berücksichtigt. *Porphyra* besitzt neben *rnpB* eine Reihe weiterer zwischen *trnH* und *trnR_{ACG}* lokalisierter Gene und repräsentiert daher das ursprünglichste Genom. Für *G. nostochinearum* und *C. paradoxa* gingen im betrachteten Sequenzraum alle codierenden Abschnitte außer *rnpB* verloren.

5.2.1. Besitzt GlauRPR Ribozymeigenschaften?

Wie CyRPR zeigt GlauRPR unter keiner der getesteten 144 unterschiedlichen Reaktionsbedingungen Ribozymaktivität (4.5.2.1.). Die RNA weicht im Gegensatz zur *C. paradoxa* nur an Position A213 vom bakteriellen Konsensus ab und besitzt außerdem nur eine rudimentäre Helix P13 (Abb. 4-16). Zusätzlich weicht GlauRPR, wie CyRPR, im hochkonservierten Primärstrukurelement CR V (Abb. 1-1) vom bakteriellen Konsensus ab. Für *E. coli* RNase P-RNA wird in diesem Sequenzabschnitt eine essentielle Bedeutung von G350 für die Bindung von Mg²⁺-Ionen in direkter Nähe zum katalytischen Zentrum diskutiert (Rasmussen und Nolan, 2002). Eine Koordination von Mg²⁺-Ionen über das Sauerstoffatom 6 (O6) von Guanosin-Basen konnte durch Kristallstruktur-Studien für tRNAs (Jovine *et al.*, 2000), Gruppe I Intron RNA (Cate und Doudna, 1996) und die Hepatitis Delta Ribozym-RNA

(Ferrè-d'Amrè *et al.*, 1998) eindeutig gezeigt werden. Andere ribozymaktive RNase P-RNAs, wie die aus *P. marinus* oder *Synechocystis*, besitzen an der entsprechenden Position ebenfalls dieses, in Eubakterien zu 92 % konservierte, Guanosin (Abb. 1-1). GlauRPR bzw. CyRPR verfügen an der entsprechenden Position über ein Adenosin. Aufgrund des HSAB-Prinzips (*hard and soft acids and bases*) besitzt dessen NH₂-6-Gruppe keine so stark ausgeprägte Affinität und somit Koordinierungseigenschaften zu Mg²⁺-Ionen wie O6 des Guanosin. Die deshalb verringerten Fähigkeiten von GlauRPR bzw. CyRPR zur Koordination von essentiellen Mg²⁺-Ionen in direkter räumlicher Nähe zum katalytischen Zentrum könnten für die fehlenden Ribozymeigenschaften der Cyanellen-RNase P-RNAs verantwortlich sein. Zusätzlich tritt das diskutierte Guanosin nach Harris *et al.* (1994) in *Crosslink*-Experimenten mit der pre-tRNA in Kontakt.

Mit einer von sechs Basenpaaren und einer U-C Fehlpaarung gebildeten Helix P2 unterscheidet sich GlauRPR in einem weiteren Sekundärstrukturelement von der bakteriellen Konsensusstruktur. In allen katalytisch aktiven eubakteriellen RNase P-RNA-Untereinheiten finden sich in diesem Bereich sieben Basenpaare (Haas *et al.*, 1994). Für die katalytisch inaktiven RNase P-RNA-Untereinheiten von Hefen und einigen Archaeobakterien findet man einen gepaarten Abschnitt aus nur sechs Basenpaaren (Zimmerly *et al.*, 1990; Nieuwland *et al.*, 1991; LaGrandeur *et al.*, 1993; Tranguch *et al.*, 1993). Auch die RNase P-RNA aus HeLa Zellen weicht mit vier Basenpaaren in dieser Region von den Verhältnissen in den Eubakterien ab (Bartkiewicz *et al.*, 1989). Die Abweichung von GlauRPR in P2 von der eubakteriellen Ribozym-Konsensusstruktur könnte einen Hinweis zur Erklärung der fehlenden Prozessierungsfähigkeit geben. Der Verlust der Ribozymaktivität kann jedoch nicht vollständig dieser Fehlpaarung zu geschrieben werden, da CyRPR in Übereinstimmung mit dem eubakteriellen Konsensus über sieben Basenpaare in P2 verfügt.

5.2.2. Heterologe Rekonstitution von Plastiden RNase P-RNA mit cyanobakteriellen RNase P-Proteinen

Die geringe Dichte des *C. paradoxa* Holoenzym und Ergebnisse aus Gelfiltrationen lassen im Gegensatz zu Bakterien einen Protein-Molekulargewichtsanteil von über 50 % erwarten (Cordier, 1998; Cordier und Schön, 1999). Da die beiden Nukleotid-Abweichungen vom bakteriellen Konsensus (Abb. 1-17) sowie das Fehlen des CCA-Erkennungsmotivs in J15/16 als alleinige Ursache für den fehlenden Ribozymcharakter von CyRPR ausgeschlossen werden können (Cordier 1998; Hess *et al.*, 1998), stellt sich die Frage, ob die offensichtlich größere Protein-Untereinheit der Cyanellen-RNase P essentielle Funktionen der RNA-Komponente übernommen hat oder ob sie dieselbe Rolle spielt wie im bakteriellen Enzym.

Zur Lösung dieser Fragestellung wurde im Rahmen dieser Arbeit die beiden cyanobakteriellen RNase P-Proteine SynPP und Pm9511PP überexprimiert und denaturierend aufgereinigt (4.1.). Für die beiden Proteine wurde ein Renaturierungsgrad von 70 % (Abb. 4-3) bzw. 30 % (4.1.2) erreicht. Dabei zeigte Pm9511PP neben der deutlich geringeren Fähigkeit zur Renaturierung auch eine stark erhöhte Neigung zur Degradation. Ein Grund hierfür könnte in dem zusätzlichen zehn Aminosäuren langen Abschnitt Lys41-His50 liegen (5.1.2.). Diese Aminosäuren bilden kein stabiles Sekundärstrukturelement aus und liegen als Schleife frei exponiert vor.

Kole *et al.* (1980) zeigten, dass beim Mischen von *E. coli* RNase P-RNA und der Protein-Untereinheit *in vitro* katalytisch aktives Holoenzym entsteht. Das rekonstituierte Enzym zeigte dabei dieselben Prozessierungseigenschaften wie natürliche RNase P. Für die Erkennung zwischen Protein- und RNA-Untereinheit wird sowohl eine Interaktion dreidimensionaler Strukturelemente als auch basischer Aminosäuren mit dem Phosphatrückgrat der RNA postuliert (1.3.4.; Tsai *et al.*, 2003). Diese Hypothesen werden durch die Tatsache gestützt, dass *in vitro* eine Reihe bakterieller RNase P-RNAs mit bakteriellen RNase P-Proteinen heterolog zum aktiven Holoenzym rekonstituiert werden können (Baer *et al.*, 1988; Brown *et al.*, 1993). Guerrier-Takada *et al.* (1983) wiesen für *E. coli* und *B. subtilis* eine Kompatibilität von RNase P-Protein und RNA-Untereinheit nach. Trotz unterschiedlicher Struktur der RNA-Untereinheiten (RNase P-RNA Typ A bzw. Typ B; Abb. 1-2) können sie beliebig kombiniert werden. Ein beliebiger Austausch der RNase P-Untereinheiten konnte auch für *E. coli* und das Cyanobakterium *Synechocystis* gezeigt werden (Pascual und Vioque, 1996). Die erfolgreiche Rekonstitution von RNA aus Archaea mit *B. subtilis* Protein ist ebenfalls möglich (Pannucci *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* katalytisch inaktive Cyanellen-RNase P-RNA mit den cyanobakteriellen RNase P-Proteinen SynPP bzw. Pm9511PP effektiv zum katalytisch aktiven, chimären Holoenzym rekonstituiert werden kann (4.5.). Hingegen ist dies mit *B. subtilis* RNase P-Protein nur äußerst uneffizient (Daten nicht gezeigt) bzw. mit *E. coli* RNase P-Protein (C5) gar nicht möglich (Cordier, 1998).

Die heterologe Rekonstitution des chimären RNase P-Holoenzym aus rekombinantem SynPP (4.1.1.) und T7-Transkripten der *C. paradoxa* Cyanellen-RNase P-RNA (4.5.1.1.) wurde nach Bestimmung des Protein-Renaturierungsgrades für SynPP (Abb. 4-3) im molaren Verhältnis 2:1 durchgeführt (Abb. 4-12). Der Befund, dass cyanobakterielle Proteine zur funktionellen Rekonstitution chimärer RNase P-Holoenzyme mit plastidären RNase P-RNAs fähig sind, konnte für Pm9511PP (4.1.2.) bestätigt und erweitert werden (4.5.1.3.). Die Rekonstitution wurde für dieses Protein im molaren Verhältnis 5:1 zu CyRPR durchgeführt (Abb. 4-14).

Dagegen wurde mit *E. coli* C5-Protein unter keiner der verwendeten Rekonstitutionsbedingungen ein prozessierungsaktives Holoenzym erhalten.

Die erfolgreiche *in vitro* Rekonstitution von cyanobakterieller Protein-Untereinheit und katalytisch inaktiver Organellen RNase P-RNA zum prozessierungsaktiven Komplex konnte für die RNA aus den Plastiden von *Glaucozystis nostochinearum* bestätigt werden. GlauRPR kann mit SynPP zum prozessierungsaktiven Holoenzym rekonstituiert werden (4.5.2.2.). Es bleibt allerdings zu klären, warum hierzu reproduzierbar wesentlich höhere Konzentrationen an Protein und RNA eingesetzt werden müssen.

Vor dem Hintergrund der Ergebnisse aus den Rekonstitutions-Experimenten von Cyanellen RNase P-RNA mit cyanobakteriellem RNase P-Protein zum heterologen Holoenzym (4.5.) kann die Existenz einer entsprechenden Protein-Untereinheit in Cyanellen postuliert werden. Dabei kann beim heutigen Kenntnisstand nicht entschieden werden, welchen Beitrag die Protein-Untereinheit dabei für Substratbindung und -erkennung bzw. zur Mg²⁺-Bindung leistet. Kurz und Fierke (2002) diskutieren für die

bakterielle RNase P-Protein-Untereinheit aus *B. subtilis* eine deutlich erhöhte, durch die Protein-Untereinheit vermittelte Affinität des RNase P-Substrat-Komplexes zu Mg^{2+} -Ionen. Die Protein-Untereinheit übt dabei einerseits durch Interaktion mit der pre-tRNA eine stabilisierende Wirkung auf den Enzym-Substrat-Komplex aus, andererseits wird aber auch die Bindung der für die Katalyse essentiellen Mg^{2+} -Ionen erleichtert. Eine solche kombinierte Aufgabe ist auch für die cyanobakteriellen Proteine SynPP und Pm9511PP im chimären Cyanellen Holoenzym denkbar.

Da im vollständig sequenzierten *C. paradoxa* Cyanellen-Genom keine zum bakteriellen *mpA*-Gen homologe Sequenz gefunden werden konnte (Stirewalt *et al.*, 1995), muss die codierende Region, soweit sie nicht eine vollständig vom Konsensus abweichende Sequenz besitzt, wie der Großteil der Plastiden-Gene während der Evolution in den Nukleus gewandert sein (Löffelhardt *et al.*, 1997; Schön, 1999).

5.2.3. Einfluss der CyRPR-Nukleotide A22 und A213 auf die Prozessierungseigenschaften des chimären Holoenzym

Um den Einfluss der vom bakteriellen Konsensus abweichenden Nukleotide A22 und A213 auf die Funktion des Holoenzym zu überprüfen, wurden Mutationen, die den bakteriellen Konsensus herstellen, eingeführt: CyRPR G22, CyRPR G213, CyRPR G22-G213, CyRPR C79-G213 und CyRPR G22-C79-G213 (Anhang I). Die heterologe Rekonstitution zeigte für keine der Mutanten im Vergleich zu CyRPR_{wt} höhere Umsatzraten (Abb. 4-12). Bis auf die Mutante CyRPR G22-C79-G213 sinkt die Aktivität der chimären Holoenzyme deutlich ab (Abb. 4-13). Dabei zeigen sich zwischen den beiden Einzel- und den beiden Doppelmутanten keine signifikanten Unterschiede. Da die mit Cyanellen-RNase P-RNA_{wt} und der den bakteriellen Konsensus herstellenden Dreifach-Mutante rekonstituierten Holoenzyme deutlich höhere Prozessierungsaktivitäten zeigen als die Einzel- und Doppelmутanten, kann auf eine Coevolution dieser Positionen innerhalb der Cyanellen-RNA spekuliert werden. Es bleibt zu klären, ob sich die Mutationen A22 und A213 in CyRPR_{wt} gegenseitig bedingen, um so eine RNA-Struktur mit ähnlichen Prozessierungseigenschaften wie die des bakteriellen Konsensus auszubilden. Für die räumliche Umgebung des in allen RNase P-RNAs hochkonservierten Nukleotids G22 wird eine Mg^{2+} -Bindungsstelle angenommen (Otter, persönliche Kommunikation). Die den Positionen A22 bzw. A213 entsprechenden Guanosine im *E. coli* 3D-RNase-Modell sind in räumlicher Nähe zu 5'- und 3'-Flanke des Substrats lokalisiert, so dass ihre direkte Beteiligung an Substratbindung bzw. Mg^{2+} -Koordination diskutiert werden kann (Massire *et al.*, 1998). Mutationen in diesem Sequenzabschnitt könnten Auswirkungen auf die Metallbindung haben und so ein verändertes bzw. reduziertes Katalyse-Verhalten bewirken.

Pm9511PP übt im Vergleich zu SynPP einen weniger deutlichen Einfluss auf die Prozessierungsaktivität der rekonstituierten chimären Holoenzyme aus (Abb. 4-13 & 4-15). Die Umsätze der mit den verschiedenen CyRPR-Mutanten rekonstituierten Holoenzyme liegen 10 – 20 % höher als die der entsprechenden SynPP-Holoenzyme. Lediglich für die Doppelmутante CyRPRG22G213 zeigt sich ähnlich wie bei der Rekonstitution mit SynPP eine reduzierte Prozessierungsaktivität (Abb. 4-13 & 4-15). Insgesamt lässt sich spekulieren, ob Aspekte der Substratbindung oder der Produktfreisetzung hierbei eine Rolle spielen. *P. marinus* PCC9511 codiert wie das *C. paradoxa* Cyanellen-Genom, aber im Gegensatz zu *Synechocystis* PCC6803, nicht für eine RNase P-RNA mit CCA-Erkennungsmotiv. Es ist denkbar, dass

Aufgaben einer nicht auf dem CCA-Ende basierenden Substraterkennung oder Produktfreisetzung auf Pm9511PP übergegangen sind. Im Vergleich zu SynPP erfolgt deshalb die effektivere Umsetzung von pre-tRNAs.

Um den Einfluss der Nukleotide A22 und A213 auf die Mg^{2+} -Ionenbindung bzw. auf die Katalyse weiter zu untersuchen, wurden für die ribozymaktive *P. marinus* PCC1375 RNase P-RNA (Pm1375RPR) die Konsensusnukleotide G20 und G240 gegen die "Cyanellen-Nukleotide" A20 und A240 durch bidirektionale Mutagenese ausgetauscht (4.3.1.). C79 wurde zu T79 mutiert, um das Basenpaar A240-T79 wieder herzustellen. Alle erstellten Mutanten (Pm1375 RPR A20, A240, A20-A240, T79-A240 und A20-T79-A240) zeigten Ribozym-Aktivität (Abb. 4-9A). Nur die an zwei Positionen vom bakteriellen Konsensus abweichende Doppelmutante Pm1375RPR A20-A240 zeigt eine um etwa 20 % erniedrigte Prozessierungsaktivität gegenüber der Wildtyp-RNA (Abb. 4-9B). Der Pm1375RPR-Wildtyp und alle fünf Mutanten erreichen für etwa 60 mM Mg^{2+} ihr Aktivitätsmaximum (Abb. 4-10). Die Doppelmutante Pm1375RPR A20-A240 erreicht wiederum nicht den Umsatz der anderen Ribozyme. Da keine der Einzelmutanten Pm1375RPR A20 und Pm1375RPR A240 eine erniedrigte Ribozym-Aktivität besitzen, bleibt, ähnlich wie für CyRPR, zu klären, inwieweit beide Mutationen im Zusammenspiel die Prozessierung beeinflussen. A240 könnte Einfluss auf die räumliche Orientierung von Helix P5 besitzen und somit Einfluss auf die Bindung des 3'-CCA-pre-tRNA-Endes nehmen (Gimple; nicht publiziert). Für A20 kann eine Mg^{2+} -Bindungsfunktion vermutet werden (Otter; nicht publiziert); um dies für Pm1375RPR zu klären steht eine Pb^{2+} -Spaltung noch aus.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die beiden im bakteriellen Konsensus vollständig konservierten Nukleotide G20 und G240 keinen essentiellen Einfluss auf die Katalyse ausüben.

5.2.4. Substratspezifität chimärer Holoenzyme

Das 3'-CCA-Ende der tRNAs ist bei vielen Eubakterien im Genom codiert und spielt bei der Ribozymreaktion bakterieller RNase P-RNAs eine wichtige Rolle (Oh und Pace, 1994; Svärd *et al.*, 1996; Tallsjö *et al.*, 1996; Oh *et al.*, 1998; Pascual und Vioque, 1999). In *E. coli* gehen die Diskriminatorbase (für die meisten tRNAs ein Purin), C74 und C75 dabei Watson-Crick-Basenpaarungen mit G292, G293 und U294 der M1-RNA ein (Abb. 1-4 & 1-5). Insbesondere die Wechselwirkung zwischen Diskriminatorbase und U294 hat einen großen Einfluss auf die Produktfreisetzung und die exakte Schnittstellenauswahl (Tallsjö *et al.*, 1996; Brännvall *et al.*, 2003). Durch die Basenpaarung zwischen pre-tRNA und M1-RNA kommt es zu einer partiellen Entfaltung des Akzeptorstammes und damit zu einer leichten Zugänglichkeit der Schnittstelle (Kirsebom und Svärd, 1994). *P. marinus* RNase P-RNA prozessiert Substrate mit 3'-CCA-Ende besser als solche ohne, obwohl die RNA über kein CCA-Bindungsmotiv verfügt (Hess *et al.*, 1998). Oh *et al.* (1998) postulieren zusätzlich zur Substratbindung einen wichtigen Beitrag des 3'-CCA-Endes zur Katalyse. Der 2'-Hydroxylgruppe des 3'-distalen C-Nukleotids (3'-CCA) wird bei der Koordination eines für die Katalysereaktion entscheidenden Mg^{2+} -Ions eine wichtige Rolle zugeschrieben (Perreault und Altman, 1992).

Da für *E. coli* Knock-out Mutanten (*cca*⁻) des posttranskriptional 3'-CCA-Enden anfügenden Enzyms (tRNA-Nukleotidyltransferase) eine Anreicherung von am 5'-Ende nicht prozessierten tRNAs beobachtet werden kann, postulieren Seidman *et al.* (1975), dass das 3'-CCA-Ende für die Prozessierungsaktivität des bakteriellen RNase P-Holoenzym *in vivo* ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Paradoxerweise ist die Anwesenheit des CCA-Endes für die Effektivität des *E. coli* Holoenzym *in vitro* nicht entscheidend (Guerrier-Takada *et al.*, 1984; Oh und Pace, 1994). Als Ursache für die *in vivo*- und *in*

in vitro-Systemen abweichende Substratspezifität werden unterschiedliche stöchiometrische Verhältnisse von Enzym und Substrat oder eine *in vivo*-Konkurrenz mit anderen biosynthetischen Stoffwechselwegen diskutiert (Oh *et al.*, 1998).

Um den Einfluss des 3'-CCA-Endes auf die Substratspezifität im chimären Holoenzym zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit CyRPR mit den cyanobakteriellen Proteinen SynPP und Pm9511PP zum chimären Holoenzym rekonstituiert und die Prozessierungseffektivität für die Substrate pre-tRNA^{Arg} und pre-tRNA^{Arg}ΔCCA verglichen (4.6.2. & 4.6.3.).

Dabei zeigte sich sowohl für das CyRPR/SynPP- als auch das CyRPR/Pm9511PP-Holoenzym kein wesentlicher Unterschied des Substratumsatzes für tRNAs mit und ohne CCA-Ende. Allerdings zeigte sich für beide Holoenzyme stets eine leichte Bevorzugung der tRNAs mit CCA-Ende. Dies steht im Einklang für die Daten, welche für natives *C. paradoxa*-Holoenzym zur Verfügung stehen (Cordier, 1998; Gimple und Schön, 1998).

Die Substraterkennung und -bindung durch die Cyanellen-RNase P muß also über andere Mechanismen als bei bakteriellen RNase P-RNAs mit CCA-Bindungsstelle stattfinden. Obwohl die Sekundärstruktur der Cyanellen RNase P-RNA einen den cyanobakteriellen Ribozymen ähnlichen Substraterkennungsmechanismus vermuten lässt, kann zur Zeit nicht entschieden werden, welchen jeweiligen Beitrag RNA- und Protein-Untereinheiten zur Substraterkennung bzw. -bindung leisten. Die Protein-Komponente ist wie in eukaryotischen Holoenzymen wahrscheinlich maßgeblich daran beteiligt oder sogar alleine dafür zuständig: Für nukleäre HeLa-RNase P-RNA kann im Gegensatz zu *E. coli* RNase P-RNA kein Photo-Addukt mit pre-tRNA erzeugt werden. True und Celandier (1998) schlossen hieraus, dass HeLa-RNase P-RNA kein Substrat binden kann und diese Funktion auf eine der Protein-Untereinheiten übergegangen ist. Für nukleäre RNase P aus *S. cerevisiae* ist bekannt, dass Substratbindung und Katalyse getrennte Funktionen sind (Nichols *et al.*, 1988). Die eigentliche Katalyse wird durch die RNase P-RNA durchgeführt, während die Substratbindung auf die Protein-Untereinheit übergegangen ist. Das 3'-CCA-Ende hat dabei kaum noch Bedeutung für den Vorgang der Substraterkennung oder -bindung.

5.2.5. Konstruktion und funktionelle Charakterisierung zirkular permutierter Cyanellen-RNase P-RNAs

Als einer der möglichen Gründe für die fehlende Ribozymaktivität der Organellen-RNase P-RNAs wird die fehlende Fähigkeit der Substratbindung diskutiert (Baum *et al.*, 1996). Eine Möglichkeit, die Substratbindung als ersten essentiellen Schritt der intermolekularen Ribozymreaktion zu umgehen, liegt in der kovalenten Verknüpfung von RNase P-RNA und pre-tRNA-Substrat, um so ein sich selbst prozessierendes Ribozym zu erstellen. Kikuchi *et al.* (1993) zeigten, dass direkt mit dem 3'- bzw. 5'-Ende der RNase P-RNA verknüpfte pre-tRNAs dennoch hauptsächlich durch eine intermolekulare Reaktion prozessiert werden. Die intramolekulare Reaktion hingegen ist ineffizient und liefert ungenau prozessierte tRNAs. Die Ineffizienz der Eigenspaltung ist dabei wahrscheinlich auf sterische Gründe zurückzuführen. 3'- und 5'-Termini der RNase P-RNA, mit welchen die pre-tRNA verknüpft ist, befinden sich nicht in räumlicher Nähe zum katalytischen Zentrum des Ribozyms (Abb. 1-4; Massire *et al.*, 1998). Anders als die relativ frei zugängliche tRNA eines zweiten Moleküls hat die intramolekulargekoppelte tRNA einen erschwerten Zugang zum katalytischen Zentrum und wird deshalb nur verzögert prozessiert. Um dieses Problem zu umgehen, wäre prinzipiell eine Verlängerung der

Nukleotidsequenz zwischen pre-tRNA und RNase P-RNA denkbar. Diese Modifikation würde allerdings weiterhin die intermolekulare Prozessierung gegenüber der intramolekularen Reaktion bevorzugen. Stattdessen wurde eine zirkular permutierte Cyanellen-RNase P-RNA, deren Substrat in der Nähe des aktiven Zentrums fixiert ist, erstellt (4.10.; Anhang III; Frank *et al.*, 1994).

Die zirkular permutierte Cyanellen-RNase P-RNA pCyP305Tetra wurde so konstruiert, dass die nativen 3'-und 5'-Enden der CyRPR_{wt} durch eine acht Nukleotide lange Sequenz, welche einen stabilen *Tetra-loop* ausbilden, verbunden wurden (Abb. 4-25). Da für die ribozymaktiven bakteriellen RNase P-RNAs das katalytische Zentrum in Helix P4 lokalisiert ist, wurde die Verknüpfungsstelle zwischen pre-tRNA und der Cyanellen RNase P-RNA in räumlicher Nähe zu diesem Sekundärstrukturelement gewählt (LaGrandeur *et al.*, 1994; Christian *et al.*, 2002). Das *rnpB*-Gen wurde hierzu dimerisiert, anschließend an Nukleotidposition 305 gespalten (4.10.1.) und die pre-tRNA codierende Region über ihre 5'-Flanke mit dem 3'-Ende von pCyP305Tetra verknüpft (4.10.2.; Abb. 4-29). Um sterische Probleme weitgehend auszuschließen, wurden sowohl die pre-tRNAs als auch ihre Flankenlänge variiert (Abb. 4-28). Insgesamt wurden vier zirkular permutierte Cyanellen-RNase P-RNAs mit kovalent verknüpfter pre-tRNA unter Kontrolle des T7-Promotors konstruiert (4.10.; Abb. 4-25; Anhang III): cpCyRPR35Glu, cpCyRPR15Tyr, cpCyRPR17Tyr und cpCyRPR19Tyr.

Entsprechende Transkripte weisen unter keiner der getesteten Bedingungen Ribozymaktivität auf (4.10.3.; Abb. 4-30). Eine spezifische Selbstspaltung wird nicht beobachtet.

In heterologen Rekonstitutionsexperimenten mit SynPP war es hingegen unter bestimmten Bedingungen möglich, Prozessierungsaktivität für die Konstrukte cpCyRPR15Tyr, cpCyRPR17Tyr und cpCyRPR19Tyr nachzuweisen (Abb. 4-32). Voraussetzung hierfür war, dass sowohl das zirkular permutierte Konstrukt (bei 65 °C) als auch die RNase P-Protein-Untereinheit (42 °C) zuvor denaturiert bzw. erwärmt, langsam abgekühlt und bei 42 °C rekonstituiert wurden (Abb. 4-31). Frank *et al.* (1994) beschreiben für zirkular permutierte *E. coli* RNase P-RNA-pre-tRNA-Konstrukte einen vergleichbaren Effekt auf die Ribozymreaktion. Da bakterielle RNase P ihre Substrate überwiegend über tertiäre RNA-RNA Interaktion als spezifische Watson-Crick Basenpaarungen erkennt (Christian *et al.*, 2002), bietet die Denaturierung den Untereinheiten die thermodynamische Voraussetzung, die für die Katalyse entscheidende Konformation einnehmen zu können. SynPP erfährt bei 42 °C vermutlich keine Denaturierung, könnte aber insbesondere im Bezug auf die Aminosäureketten seiner Schleifen (konserviertes "RNR"-Motiv zwischen Faltblatt β_3 und Helix α_2 ; Abb. 5-2) eine höhere Flexibilität als bei 37 °C aufweisen.

Die fehlende Prozessierungsfähigkeit des Konstrukts cpCyRPR35Glu, auch unter den für die Tyrosin-Konstrukte erfolgreichen Rekonstitutionsbedingungen, weist auf eine mögliche Blockierung der Proteinbindungsstelle(n) aufgrund der verlängerten Flanke hin.

Um die Möglichkeit einer denkbaren intermolekularen Reaktion möglichst auszuschließen, wurde der Einfluß reifer tRNAs auf die Prozessierung überprüft (4.10.3.3.). Zur Durchführung des Experiments wurde der Rekonstitutionsansatz neben pre-tRNA als Substrat mit reifen Hefe-tRNAs versetzt. Die Verwendung von Hefe-tRNAs sollte dabei keinen maßgeblichen Einfluß auf das Ergebnis haben, da RNase P-Enzyme verschiedenster Organismen pre-tRNAs aus anderen Organismengruppen prozessieren. Für die getesteten RNase P-RNA-pre-tRNA-Konstrukte zeigt sich, dass die Rekonstitutionsansätze mit und

ohne tRNA-Zusatz kaum Unterschiede im Substratumsatz zeigen (Abb. 4-33A & 4-33B). Produktinhibition ist eine weit verbreitete Regulation enzymatischer Reaktionen. Auch die Prozessierung durch native Cyanellen-RNase P ist mit reifen tRNAs sehr effektiv hemmbar (Cordier, 1998). Da die Prozessierung der zirkular permutierten RNase P-RNA mit kovalent verknüpftem Substrat aber keiner Hemmung unterliegt, kann davon ausgegangen werden, dass die Reaktion einem intramolekularem Mechanismus folgt. Im Gegensatz hierzu wurde in einem parallel durchgeführten Ansatz die Aktivität von rekonstituiertem CyRPR_{wt}/SynPP-Holoenzym auf Hemmung durch reife tRNAs überprüft (Abb. 4-33A & 4-33B). Wie für eine intermolekulare Reaktion zu erwarten, wird das chimäre Holoenzym schon bei geringen tRNA-Mengen in seiner Aktivität gehemmt; beim Zusatz höherer tRNA-Mengen tritt wie beim nativen Holoenzym eine absolute Inhibierung des Enzyms ein.

Für eine intramolekulare Prozessierungsreaktion der cpCyRPR-Tyr-Konstrukte spricht weiterhin, dass für cpCyRPR35Glu unter keiner der getesteten Bedingungen Prozessierungsaktivität generiert werden konnte. Im Falle einer intermolekularen Reaktion hätten aber die für die Tyrosin-Konstrukte zur Prozessierung führenden Reaktionsbedingungen ebenfalls zu Umsatz führen müssen.

Das Prozessierungsverhalten der zirkular permutierten RNase P-RNA-pre-tRNA-Konstrukte weist somit darauf hin, dass den Cyanellen RNase P-RNAs neben der Fähigkeit zur Substratbindung bzw. -erkennung noch eine weitere Funktion bakterieller RNase P-RNA fehlt.

5.3. *In vitro* Substratspezifität des RNase P Holoenzym aus *P. marinus*

Für die RNase P-RNA aus *P. marinus* PCC1375 ist bekannt, dass durch sie pre-tRNAs und pre-tmRNAs mit 3'-CCA-Ende *in vitro* besser am 5'-Ende zur reifen tRNA prozessiert werden, als Substrate ohne 3'-CCA-Ende (Hess *et al.*, 1998; Gimple und Schön, 2001). Dieser Befund ist unerwartet, da tRNAs in *P. marinus*, wie in den meisten Cyanobakterien, nicht mit dem 3'-CCA-Ende codiert sind und die RNase P-RNA keine CCA-Bindungsstelle besitzt.

Um die Substratspezifität von *P. marinus* RNase P im Holoenzym genauer zu untersuchen, wurde *P. marinus* PCC1375 RNase P-RNA (4.3.) mit Pm9511PP (4.1.2.) rekonstituiert und mit diesem Holoenzym die Substrate pre-tRNA^{Arg} und pre-tRNA^{Arg}ΔCCA prozessiert (4.6.1.). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied im Substratumsatz zwischen diesen beiden Substraten festgestellt werden (Abb. 4-19).

Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Oh und Pace (1994), die für das *E. coli* Holoenzym ebenfalls keinen Einfluss des 3'-CCA-Endes auf die Substratspezifität feststellen konnten. Pascual und Vioque (1999) postulieren für das cyanobakterielle *Synechocystis* Holoenzym sogar eine verringerte Substrataffinität zu Substraten mit CCA-Ende. Für *E. coli* ist bekannt, dass die J15/16-Schleife in enger räumlicher Nähe zum Akzeptorstamm des Substrats steht und über das GGU-Motiv mit dem 3'-CCA-Ende interagiert (Kirsebom und Svård, 1994; Chen *et al.*, 1998; Massire *et al.*, 1998). Von einer *E. coli* gleichenden 3D-RNase P-RNA-Struktur ausgehend, werden wegen der in *Synechocystis* größeren J15/16-Schleife sterische Aspekte im Holoenzym für die verringerte Affinität zu pre-tRNAs mit CCA-Ende verantwortlich gemacht (Vioque, 1997). Die beschriebene Substratspezifität kann für das

Synechocystis-Ribozym nicht so deutlich bestätigt werden. Insgesamt scheint die J15/16-Schleife der RNase P-RNA in der großen Mehrzahl der Cyanobakterien einen weniger entscheidenden Beitrag zur Prozessierung von pre-tRNAs zu leisten wie in *E. coli*. Dies würde auch erklären, warum Cyanobakterien im Vergleich zu anderen Bakterien eine auffällig große Sequenz- und Strukturvielfalt im Bereich der J15/16-Schleife aufweisen (Abb. 5-1; Schön *et al.*, 2001).

Die Cyanellen-RNAs CyRPR und GlauRPR sind ebenfalls durch große J15/16-Schleifen ohne CCA-Erkennungsmotiv charakterisiert. Dabei weist CyRPR im Rohextrakt schon nach kurzer Zeit insbesondere in diesem Sekundärstrukturbereich eine starke Fragmentierung auf, ohne dass das Holoenzym wesentlich an Prozessierungsaktivität verliert (Cordier, 1998). In Einklang mit den bereits erwähnten Ergebnissen von Hess *et al.* (1998) müssen in Cyanobakterien, ähnlich wie in Cyanellen und Eukaryoten, folglich andere Mechanismen der Substraterkennung bzw. -bindung greifen. Entsprechende Untersuchungen zur Identifizierung solcher Interaktionsmotive werden zur Zeit durchgeführt. Bisherige Ergebnisse deuten auf mehrere tRNA-spezifische Bindungsstellen cyanobakterieller RNase P-RNA hin (Gimple, persönliche Mitteilung).

5.4. Immunologische Verwandtschaft zwischen cyanobakteriellem und Cyanellen-RNase P-Protein

Um die Proteinzusammensetzung der RNase P aus Cyanellen zu untersuchen, wurde ein prozessierungsaktiver Cyanellen-Extrakt hergestellt. Dieser S100-Extrakt (4.7.) bildete das Ausgangsmaterial für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen. Die RNase P-Aktivität des Extrakts war bei -80 °C-Lagerung über einige Monate stabil.

Obwohl die Cyanellen-RNase P einen deutlich höheren Proteinanteil als das bakterielle Enzym besitzt (Cordier, 1998; Cordier und Schön, 1999), lässt sich die RNA-Komponente mit cyanobakteriellem RNase P-Protein zum aktiven Holoenzym rekonstituieren (4.5.1.). Da deshalb angenommen werden kann, dass plastidäre und cyanobakterielle RNase P-Proteine strukturelle Ähnlichkeit aufweisen (5.1.), wurde die Spezifität von α -SynPP-AB (4.2.) gegen natives Cyanellen-Holoenzym untersucht (4.8.).

Polyklonale Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit dem cyanobakteriellen SynPP erhalten (4.2.1.). α -SynPP-AB wurde durch Ammoniumsulfat-Fällung des Serums aufgereinigt (4.2.2.) und zeigt eine hohe Spezifität (4.2.3.).

Immunoblots mit α -SynPP-AB als Primärantikörper zeigen spezifische Signale im homologen *Synechocystis* PCC 6803 und im *C. paradoxa* S100-Extrakt, jedoch keinerlei Bindung an das RNase P Protein aus *E. coli* (4.8.). Wegen der Eigenfluoreszenz von Cyanellen-Proteinen in einem den bakteriellen RNase P-Proteinen vergleichbaren Größenbereich (15-17 kD), kann eine Überdeckung von Antikörper-spezifischen RNase P-Protein-Signalen in diesem Größenbereich nicht ausgeschlossen werden (Abb. 4-22). Das im Cyanellen-Extrakt spezifisch detektierte Protein besitzt eine Größe von etwa 30 kD. Nach einer von Cordier (1998) durchgeführten Molekularsieb-Chromatographie an Superdex^R 200 korreliert ein Protein dieser Größe mit der RNase P-Aktivität des Cyanellen-Extrakts.

Für die Cyanellen aus *G. nostochinearum* wird im *Western-Blot* kein Signal erhalten (nicht gezeigt). Da die *G. nostochinearum*-Zellen nur direkt aufgeschlossen und dieser Gesamtzell-Aufschluss, anders als für die *C. paradoxa*-Cyanellen beschrieben, ohne weitere Voraufreinigung, durch SDS-PAGE aufge-

trennt wurde, kann das fehlende Signal auf einen relativ geringeren Anteil der Cyanellen-Proteine am Protein-Gesamtlysat zurückgeführt werden.

Das in Cyanellen-Extrakt detektierte Protein ist in seiner Größe vergleichbar einer von Thomas *et al.* (2002) für die Spinat-Chloroplasten postulierten RNase P-Proteinuntereinheit. Eine vollständige Isolierung bzw. Charakterisierung dieses RNase P-Proteins aus Chloroplasten steht allerdings noch aus.

Die hohe Spezifität von α -SynPP-AB für RNase P-Holoenzyme aus Cyanobakterien und Cyanellen kann durch Immunopräzipitations-Experimente bestätigt werden (4.9.). RNase P-Aktivität kann durch kovalent an Protein-A-Sepharose gekoppelten α -SynPP-AB präzipitiert werden (Abb. 4-23 & 4-24). Die Bindung von RNase P-Holoenzym an matrixgekoppelte Antikörper kann durch Konkurrenz mit dem homologen Antigen SynPP inhibiert werden. Während die Inhibierung für die Präzipitation aus dem zum Antikörper homologen *Synechocystis*-Extrakt nicht vollständig ist, findet für Cyanellen-Extrakt keine detektierbare Bindung und damit Präzipitation des RNase P-Holoenzym statt. Dieses Ergebnis spricht, wie zu erwarten, für eine größere Affinität des anti-SynPP-Antikörpers zum homologen Protein als zum Cyanellen-RNase P-Protein: Während im *Synechocystis*-Extrakt die RNase P-Protein-Untereinheit des Holoenzym in Gleichgewichtsreaktionen mit rekombinantem SynPP um die Antikörper-Bindung konkurriert, ist dies im Cyanellen-Extrakt nicht der Fall.

Mit spezifischen Antikörpern gegen das *E. coli* RNase P-Protein ist weder eine spezifische Detektion von Proteinen noch die Immunopräzipitierung von RNase P-Aktivität aus Cyanellen-Extrakt möglich (Pascual und Vioque, 1999). Neben den nur schwach bzw. gar nicht vorhandenen Fähigkeiten der RNase P-Proteinuntereinheiten aus *B. subtilis* und *E. coli* zur heterologen Rekonstitution lässt dies auf funktionelle und strukturelle Unterschiede zwischen dem Cyanellen-Enzym und dem bakteriellen Prototyp der RNase P schließen. Die positiven Ergebnisse zur Rekonstitution prozessierungsaktiver Holoenzyme aus cyanobakteriellen RNase P-Proteinen und CyRPR (5.2.2.) und die offensichtliche immunologische Ähnlichkeit der RNase P-Proteine unterstreichen hingegen die enge phylogenetische Verwandtschaft von Cyanobakterien und Cyanellen.

5.5. Holoenzymaufbau und Identifizierung von Proteinkomponenten der *C. paradoxa* Cyanellen RNase P

Um die Korrelation des in Cyanellen detektierten 30 kD-Proteins mit der RNase P-Aktivität bzw. der RNA-Untereinheit zu überprüfen, wurde eine Ultrazentrifugation im Glyceringradienten durchgeführt (4.11.). Diese Methode ermöglicht eine schonende native Aufreinigung von Komplexen. Pro Ansatz wurden dabei bis zu 3,5 mg *C. paradoxa* S100-Extrakt aufgetrennt und anschließend zu 20 Aliquoten fraktioniert (Abb. 4-35).

Eine cyanobakterielle Verunreinigung der Cyanellen-Präparation konnte durch *in vitro* Amplifikation der RNase P-Fragmente, Auftrennung über ein Agarose-Gel und anschließende *Southern-Blot* Hybridisierung ausgeschlossen werden (4.11.2.1.). Die in den prozessierungsaktiven Fraktionen 14-17 (Abb. 4-47) amplifizierten Fragmente entsprachen in ihrer Größe dem CyRPR-T7-Transkript. Wegen der stark heterogenen Größe cyanobakterieller RNase P-RNAs (Vioque, 1997) wäre für den Fall einer Verunreinigung keine diskrete Bande zu erwarten gewesen.

Für die Fraktionen 14-16 konnte eine Korrelation von RNase P-Aktivität (4.11.1.) und *Northern*-Blot-Signalen (4.11.2.2.) der Cyanellen RNase P-RNA-Untereinheit nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte für die Fraktionen mit der höchsten Prozessierungsaktivität (15 und 16) das bereits beschriebene 30 kD-Protein (5.4.) in *Western*-Blots detektiert werden (4.11.4.1.).

Das Molekulargewicht des *C. paradoxa* RNase P-Holoenzym konnte über eine Eichgerade, welche durch native Standardproteine erstellt wurde (Abb. 4-35), zu etwa 280 kD bestimmt werden (Abb. 4-43). Diese durch Auftrennung im Glyceringradienten ermittelte Größe steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Cordier (1998; Cordier und Schön, 1999). Er schätzte das Molekulargewicht für das Cyanellen-Enzym über Molekularsieb-Chromatographie auf 600 kD. Da bei der Molekularsieb-Chromatographie der Stoke'sche Radius eines Moleküls bestimmt wird, die Eichgerade aber ausschließlich mit Proteinen definiert wird, kommt es prinzipiell zur Überschätzung des Molekulargewichts für Ribonukleoproteinkomplexe. Erschwerend hinzu kommt, dass die Molekulargröße der Cyanellen-RNase P offensichtlich außerhalb der Trennleistung der von Cordier verwendeten Säule (200 kD) liegt. Die Größenbestimmung des Cyanellen-Holoenzym im Glyceringradienten umgeht dieses Problem und sollte deshalb den genaueren Wert liefern. Dies bestätigt sich für das *E. coli*-Holoenzym (367 nt; C5-Protein 13,8 kD). Das rechnerisch 130 kD schwere Makromolekül wurde im Glyceringradienten experimentell zu 120 kD bestimmt (Abb. 4-43).

Da durch Immunreaktionen mit α -SynPP-AB nur ein 30 kD-Protein detektiert wurde, kann vermutet werden, dass sich das Cyanellen RNase P-Holoenzym (164 kD Protein-Molekulargewichtsanteil; 351 nt RNase P-RNA entsprechen etwa 116 kD) aus mehreren verschiedenen Protein-Untereinheiten zusammensetzt. Thomas *et al.* (2000) postulieren für Chloroplasten aus Spinat neben dem bereits erwähntem 30 kD-Protein ebenfalls mehrere weitere Protein-Untereinheiten, welche mit der RNase P-Aktivität korrelieren. Leider finden sich hier keine weiteren Angaben zum Gesamt-Molekulargewicht des Enzyms noch zu den postulierten Protein-Untereinheiten.

Mit dem Ziel der Isolierung des 30 kD-Proteins wurde eine Immunopräzipitation aus den prozessierungsaktiven Fraktionen 15 und 16 durchgeführt. Nach der Elution des Komplexes von Protein-A-Sepharose, wurde das Eluat über SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt (4.11.4.2.; Abb. 4-42). Für beide Fraktionen konnten dabei in äußerst geringer Menge zwei Proteine mit den Größen 28 kD und 30 kD nachgewiesen werden. Dabei steht das schwächere der beiden Signale in Einklang mit der im *Western-Blot* detektierten Bande; das 28 kD-Protein wird dort nicht detektiert. Wurde der Protein-Nachweis direkt aus Cyanellen-S100-Extrakt geführt, sind ebenfalls beide Banden bei 28 kD und 30 kD, mit umgekehrtem Intensitätsverhältnis, zu erkennen. Es bleibt ungeklärt, in welchem Zusammenhang das Cyanellen RNase P-Holoenzym und das 28 kD-Protein stehen. Es ist denkbar, dass es sich hierbei um eine weitere RNase P-Protein-Untereinheit handelt. Das Protein wird vom anti-SynPP-Antikörper nicht direkt erkannt, aber durch die Immunopräzipitation des Holoenzym ebenfalls sedimentiert. Acht der nukleären RNase P-Proteine aus *S. cerevisiae* besitzen ein Molekulargewicht zwischen 15 und 33 kD. Dabei interagiert neben Pop1p (100,5 kD) nur Pop4p (32,8 kD) direkt mit der RNA-Untereinheit (Xiao *et al.*, 2002). Die in allen Spuren sichtbaren Banden bei 21-22 und 55 kD sind auf kleine und große IgG-Untereinheiten des anti-SynPP-Antikörpers zurückzuführen.

Um weitere Protein-Untereinheiten eindeutig zu identifizieren, müssten neben der Präparation eines S100-Extrakts und dem Glyceringradienten weitere Aufreinigungsschritte einer Cyanellen-RNase P-Präparation mit anschließender Mikrosequenzierung potentieller RNase P-Proteine durchgeführt werden. Aufgrund der relativ geringen Menge des zur Verfügung stehenden Enzyms und seiner

Empfindlichkeit während der Aufreinigung gestaltet sich dieser Ansatz in der Durchführung als nicht trivial. Niedrige Proteinkonzentrationen, sowie hohe Salzkonzentrationen, wie sie etwa bei der Elution von Ionenaustausch-Säulen auftreten, führen innerhalb kürzester Zeit zum Zerfall des Holoenzym und so zum Verlust der RNase P-Aktivität. Eine Detektion der Protein-Untereinheiten ist aber nur über den katalytisch aktiven Komplex möglich. Eine Möglichkeit zur weiteren Aufreinigung der RNase P-Präparation könnte eine Affinitätschromatographie an immobilisierten tRNAs bieten. Aufgrund der hohen Substrataffinität kann eine Bindung des Holoenzym an die Säule angenommen werden. Der gebundene Komplex wird dann durch einen (pre-)tRNA-haltigen Puffer eluiert.

Versuche zur 2D-elektrophoretischen Auftrennung prozessierungsaktiver Gradientenfraktionen mit anschließender *Western-Blot*-Analyse oder Silberfärbung wurden nicht weiter verfolgt, da es in keinem Fall gelang, diskrete Banden zu erhalten. Die Auftrennung bakterieller RNase P-Proteine (IEP > 11) ist praktisch kaum möglich, da mit kommerziell erhältlichen Systemen in diesem Bereich keine isoelektrische Fokussierung erreicht werden kann.

5.6. Phylogenetische Stellung der Cyanellen RNase P

Die phylogenetische Verwandtschaft der *C. paradoxa*-Cyanellen zu Cyanobakterien (Abb. 1-16) würde eine kleine Cyanellen-RNase P-Protein-Untereinheit vom bakteriellen Typus vermuten lassen. Die durchgeführte Molekulargewichtsbestimmung erfüllt diese Erwartung nicht. Mit einem Molekulargewicht von etwa 116 kD trägt die Cyanellen RNase P-RNA-Untereinheit (351 nt) nur 40 % zur Masse des Holoenzym bei, während der Protein-Anteil bei 60 % (bzw. 164 kD) liegt. Die Gesamtmasse des Holoenzym und dessen Proteinanteil sind damit deutlich größer als dies für Cyanobakterien der Fall ist. Einschränkend ist denkbar, dass das Cyanellen-Holoenzym wie das *B. subtilis*-Enzym als Tetramer auftritt (Fang *et al.*, 2001). Das postulierte 30 kD-Cyanellen-RNase P-Protein und die 112 kD große RNA-Untereinheit würden als Tetramer etwa den 280 kD Molekulargewicht entsprechen, welches für das Cyanellen-Holoenzym bestimmt wurde (Abb. 4-43). Diese Dimerisierung der Holoenzyme zum Tetramer ist allerdings nur für *B. subtilis* bekannt, kann durch die native Auftrennung im Glyceringradienten allerdings für das Cyanellen-Enzym nicht generell ausgeschlossen werden. Die von Cordier (1998) mit 1,28 g/ml bestimmte Schwebbedichte des Cyanellen-Holoenzym in Cs₂SO₄ unterstützt den Befund eines größeren Anteils der Protein-Untereinheit(en) am Molekulargewicht des Holoenzym. Für Bakterien liegt das Massenverhältniss der RNase P-Untereinheiten bei rund 90 % RNA- zu 10 % Protein-Anteil. *Footprint*-Analysen des Cyanellen-Holoenzym zeigen eine in großem Ausmass vor Nukleasen-Zugriffen geschützte RNA-Untereinheit. Die Ergebnisse gleichen eher denen, wie sie für das nukleäre RNase P-Enzym aus Hefe erhalten werden (Tranguch *et al.*, 1994; Cordier und Schön, 1999), als den bakteriellen Enzymen.

Die trotz der großen Homologie zu bakteriellen RNase P-RNAs fehlende Ribozymaktivität von CyRPR spricht für weitergehende Aufgaben der Cyanellen RNase P-Protein-Untereinheit(en) (CyPP), als dies für das bakterielle Protein der Fall ist. Da die heterologe Rekonstitution von CyRPR und cyanobakteriellem RNase P-Protein zum prozessierungsfähigen Holoenzym möglich ist, muss dennoch davon ausgegangen werden, dass keine essentiellen Katalyseaufgaben auf die CyPP-Protein-Komponente(n) übergegangen sind. Neben einer Chaperon-Funktion, welche die Faltung von CyRPR zur katalytisch aktiven Konformation unterstützt, sind die bereits diskutierten Aufgaben bei der Substrat- oder der

Mg²⁺-Ionenbindung denkbar (Niranjanakumari *et al.*, 1998; Kurz und Fierke, 2002). Solche Funktionen werden auch für die eukaryotischen Protein-Untereinheiten diskutiert (True und Celandier, 1998). Sie konnten für *T. thermophila* und humane RNase P die räumliche Nähe von Protein-Untereinheit(en) zum pre-tRNA-Substrat durch Photo-Crosslinks nachweisen. Für einige Protein-Untereinheiten aus *S. pombe* und *S. cerevisiae* konnte ebenfalls eine Interaktion mit der pre-tRNA gezeigt werden (Zimmerly *et al.*, 1993; Nichols *et al.*, 1988). Diese Lokalisierung eukaryotischer Protein-Untereinheiten in räumlicher Nähe zum Substrat bestärkt die Hypothese, dass ihre Hauptaufgabe die Substratbindung ist.

Die Übertragung einer Funktion von einer RNA-Untereinheit auf eine Protein-Untereinheit, wie die der Substratbindung von der bakteriellen RNase P-RNA auf Protein-Untereinheiten innerhalb des Cyanellen- oder eukaryotischen RNase P-Komplexes, kann für einen weiteren katalytisch aktiven Ribonukleoprotein-Komplex beobachtet werden. Das durch das Gen *cyt-18* codierte Protein steigert die katalytische Aktivität von Gruppe I Intron RNAs, welche keine endogene stabilisierende Domäne besitzen, um ein Vielfaches (Mohr *et al.*, 1992; Mohr *et al.*, 1994).

Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese zur Evolution der Biokatalysatoren: von einer ursprünglichen, multifunktionellen RNA ausgehend, fand eine Verschiebung der Aufgabenteilung von der RNA- zur Proteinuntereinheit statt. So werden die katalytisch aktiven Ribozyme, als letzte Vertreter einer ursprünglichen RNA-Welt, in einigen Aufgaben von den heute die Welt der Biokatalysatoren dominierenden Proteinen unterstützt.

Unter Berücksichtigung aller für das Cyanellen-Holoenzym bekannter Daten, ähnelt das Enzym in seinen Eigenschaften weniger den bakteriellen als eher den eukaryotischen RNase P-Enzymen, welche über mehrere Protein-Untereinheiten verfügen (Xiao *et al.*, 2002).

5.7. Screening der *C. paradoxa* λ-cDNA-Expressionsbibliothek

Die immunologische Kreuzreaktion zwischen dem Antikörper α-SynPP-AB und *C. paradoxa* Proteinen, welche mit RNase P-Aktivität korrelieren (4.11.), eröffnet die Möglichkeit des Immuno-Screenings einer cDNA-Bank zur Identifikation von *C. paradoxa* RNase P-Proteinen. Hierzu wurde eine λ-cDNA-Bibliothek aus der nukleocytoplasmatischen Fraktion von *C. paradoxa* angelegt (4.12.), da die Protein-Untereinheiten der Cyanellen RNase P vermutlich kerncodiert sind (5.2.1.).

Die Erstellung einer repräsentativen cDNA-Bibliothek erfordert eine effiziente reverse Transkription aller vorhandenen mRNA-Spezies eines Gewebetyps in cDNA und deren Klonierung. Somit ist die Qualität der mRNA-Präparation entscheidend für die Qualität der Genbank. Nach der mRNA-Anreicherung über Oligo(dT)-Cellulose wurden mRNAs von 0,6 - 3,3 bp Länge erhalten (Abb. 4-44). Häufig vorkommende mRNAs nehmen einen Anteil von 50 bis 90 % der Gesamt-mRNA innerhalb einer Zelle ein. Seltene mRNAs machen hingegen weniger als 0,5 % der mRNA-Population aus; im Extremfall existiert nur eine einzige Kopie pro Zelle. Da RNase P durch ihre Beteiligung an der tRNA-Reifung ein essentielles Enzym des Zellstoffwechsels darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass die RNase P-Proteine codierenden mRNAs in mehrfacher Kopie in der Zelle vorliegen. Dennoch muss die Anzahl unabhängiger Klone in der *C. paradoxa*-λ-cDNA-Bank entsprechend hoch sein.

Beachtet werden müssen in diesem Zusammenhang die drei verschiedenen Leserahmen der Translation, wovon nur ein Genprodukt der zellulären Form entspricht. Zu bedenken ist auch, dass nur selten Vollängen-cDNAs kloniert werden können, da bei der Synthese des 1. und 2. Stranges der cDNA häufig Abbruchprodukte entstehen. Aus diesen Gründen sollte die Anzahl der unabhängigen Klone innerhalb einer cDNA-Bibliothek mindestens 10^6 betragen (*Stratagene*; Herstellervorschrift des *cDNA Synthesis Kit*). Die Klonierung der cDNAs in den λ -Vektor Uni-ZAP XR[®] (4.12.2. & 4.12.3.) und anschließende Verpackung zu Phagenpartikeln resultierte in $1,8 \times 10^6$ unabhängigen Klonen (4.12.4.; Abb. 4-47). Die Anzahl der Leervektoren wurde durch Blau-Weiß-Selektion bestimmt und betrug durchschnittlich 0,7 %. Die λ -Expressions-Bibliothek aus *C. paradoxa* ist damit repräsentativ. Da die Gesamtzahl der Klone und das Verhältnis rekombinanter Vektoren zu Leervektoren den Anforderungen entsprach, erfolgte die Amplifikation zur sekundären λ -cDNA-Bibliothek (4.12.5.) mit anschließendem *Screening* der cDNA-Expressionsbibliothek.

5.7.1. Suche nach RNase P-Protein-codierenden Phagen-Klonen über Antikörperbindung

Vor dem eigentlichen Immuno-*Screening* der *C. paradoxa* λ -cDNA-Bibliothek mit α -SynPP-AB sollte das Signal-Hintergrund-Verhältnis optimiert werden. Hierzu standen die λ SynPP und λ pBR zur Verfügung (4.13.1.). Die unspezifische Bindung des Primär-Antikörpers an die Membran konnte durch Behandlung der Antikörper-Lösung mit *E. coli* XL1-Blue MRF¹-Zellfragmenten aufgehoben werden. Offenbar enthielt die Primärantikörper-Lösung einen hohen Anteil an *E. coli* spezifischen Antikörpern, welche so abgetrennt wurden. Allerdings zeigten alle Plaques, sowohl "Negativ"-, als auch "Positiv"-Kontrollen, so starke Signale, dass eine Identifizierung positiver Phagen-Klone im Rahmen des *Screenings* kaum möglich gewesen wäre (Abb. 4-49). In weiteren Experimenten konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Signale der "Negativ"-Kontrolle auf das Phosphatase-gekoppelte Detektionssystem bzw. den verwendeten Zweit-Antikörper zurückzuführen waren. Möglicherweise ist der verwendete polyklonale SynPP-spezifische Antikörper in der Lage, ein Phagen-spezifisches Protein zu erkennen. Um die Phagen-spezifischen Antikörper abzutrennen, wäre es denkbar, die Antikörper-Lösung analog zur Behandlung mit abgetöteten Zellen mit Phagen-Lysat zu behandeln und dann abermals ein *Screening* durchzuführen. Harlow und Lane (1988) beschreiben außerdem, dass Antikörper durchaus effektiver an Epitope der denaturierten Protein-Form als an Epitope des nativen Proteins binden können. Dies würde die deutlichen Signale des 30 kD-Proteins im *Western*-Blot nach denaturierender SDS-PAGE-Elektrophorese im Vergleich zu den Signalen des λ SynPP-"Positiv-Klons" erklären.

Die Versuche zum Immuno-*Screening* der *C. paradoxa* λ -cDNA-Bibliothek mit α -SynPP-AB wurden deshalb nicht weiterverfolgt.

5.7.2. Suche nach Phagen-Klonen, welche RNA-bindende Proteine exprimieren

Mit der verwendeten *Screening*-Methode können Bindungsaffinitäten von etwa 10^{-8} M detektiert werden (Sägesser *et al.*, 1997). Liegt die Dissoziationskonstante der gesuchten Wechselwirkung zwischen CyRPR und RNA-bindenden Proteinen über 10^{-8} , kann sie folglich möglicherweise nicht detektiert werden. Da schwächere Wechselwirkungen von Sägesser *et al.* nicht untersucht wurden, können über die Nachweisgrenze der Methode keine genaueren Angaben gemacht werden. Vioque *et al.* (1988) bestimmten die Dissoziationskonstante für das *E. coli* RNase P-Holoenzym zu 5×10^{-8} M. Für

Pop3p aus *S. cerevisiae* wurde ein Wert von $16,3 \times 10^{-9}$ M für die Bindungsaffinität zur RNA-Untereinheit ermittelt (Brusca *et al.*, 2001), obwohl bis jetzt keine direkte Interaktion der beiden Untereinheiten nachgewiesen werden konnte. Da gezeigt werden konnte, dass die rekombinanten cyanobakteriellen Proteine SynPP und Pm9511PP im verwendeten *Screening*-Verfahren heterolog CyRPR binden können (Abb. 4-50), kann davon ausgegangen werden, dass sich auch die Bindungsaffinitäten der Untereinheiten im homologen Cyanellen-System in einer Größenordnung befinden, die vom Detektionsbereich der verwendeten Methode abgedeckt werden.

Insgesamt wurden 450×10^3 *pfu* der λ -Expressions-Bibliothek auf eine Wechselwirkung mit CyRPR untersucht, wobei nach drei *Screening*-Runden sechs positive Plaques identifiziert werden konnten (4.13.2.1.). Durch *in vivo*-Exzision wurden die *Phagemids* der sechs λ -Klone isoliert und durch *Eco*RI/*Xho* I-Restriktions-Hydrolyse sowie Sequenzanalyse charakterisiert (4.13.2.2.).

Für drei der exprimierten Proteine konnte dabei eine Homologie zu eukaryotischen RNA-bindenden Proteinen festgestellt werden, von welchen zwei durch Genbanksuche genauer charakterisiert werden konnten (4.13.2.2.): pCycDNA2 zeigt Homologie zu dem *WD-Repeat*-Protein Wat1/Pop3 aus *S. pombe* und Reis (Abb. 4-53). Das Wat1/Pop3-Protein greift in die mRNA-Reifung ein (Ochotonera *et al.*, 2001). WD-Proteine besitzen eine sich mehrmals wiederholende Tryptophan-Aspartat-Sequenz, welche zur Ausbildung einer propellerartigen Sekundärstruktur führt. pCycDNA5 codiert mit hoher Homologie zu Reis und Arabidopsis für das ribosomale Protein L18 der 60S Untereinheit (Abb. 4-54). Eine RNA-bindende Funktion von L18 konnte eindeutig bestätigt werden (Woestenenk *et al.*, 2002). Bei beiden identifizierten *C. paradoxa* Proteinen handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit kerncodierte Proteine.

Das *Screening* der *C. paradoxa* λ -cDNA-Expressions-Bibliothek mit CyRPR als Vollängentranskript zeigt die Eignung der Methode zur Bahndlung dieser Fragestellung. Im Rahmen dieser Arbeit konnten neben den beschriebenen RNA-bindenden Proteinen keine RNase P-Proteine identifiziert werden.

Für weitere *Screening*-Runden sind aber mehrere Optimierungen denkbar:

Die Größe der zum *Screening* verwendeten RNA-Moleküle hat nach Sägesser *et al.* (1997) bei RNA-Molekülen von 50-380 Nukleotiden Länge keinen Einfluss auf die Sensivität. Um bei weiteren *Screening*-Ansätzen spezifischere Ergebnisse zu erzielen, wäre es daher denkbar, ausgewählte CyRPR-Regionen anstelle des Vollängentranskripts als Sonde zu verwenden. Von besonderem Interesse könnten hier die hochkonservierten Helices P4, P3 und P15 sein. Für das *E. coli* Holoenzym konnte für diese Sekundärstrukturabschnitte eine Interaktion mit der RNA-Untereinheit nachgewiesen werden (Abb. 1-8; Tsai *et al.*, 2003). Für P3 konnte diese Wechselwirkung auch für eukaryotische RNase P bestätigt werden (Xiao *et al.*, 2002). Bei der Wahl weiterer Cyanellen-spezifischer RNA-Sonden könnten die *Footprinting*-Ergebnisse (Abb. 1-17) von Cordier (1998) Anhaltspunkte geben, auch wenn aus ihnen nicht abgeleitet werden kann, ob der Schutz von Sequenzbereichen auf 3D-RNA-Wechselwirkungen oder auf Interaktion mit Protein-Untereinheiten beruht.

Die Zugabe von Metall-Ionen (Mn^{2+} , Zn^{2+}) und von Detergenzien (z.B. Nonident P-40) im Puffer reduziert die Intensität von Hintergrundsignalen erheblich (Sägesser *et al.*, 1997). Das eigentliche *Screening* wird bei einer Temperatur von 4 °C, welche die größtmögliche Stabilität der Proteine auf

der Membran gewährleisten soll, ausgeführt. Möglicherweise liegt CyRPR bei dieser Temperatur aber nicht in seiner nativen, zur Interaktion mit dem/den RNase P-Protein(en) fähigen, Konformation vor. Um die richtige Faltung von CyRPR während des *Screenings* zu unterstützen bzw. gewährleisten, könnte dem *Screening*-Puffer in nachfolgenden Experimenten Mg^{2+} -Ionen zugesetzt bzw. Mn^{2+} -Ionen gegen Mg^{2+} -Ionen ausgetauscht werden.

Die Interaktion der Cyanellen-RNA mit dem rekombinanten Protein könnte nicht nur an der Sekundärstruktur der RNA, sondern auch an jener des Proteins scheitern. Durch die Expression der pflanzlichen Proteine in einem heterologen, bakteriellen System könnten die Konformationen sowie die posttranslationalen Modifikationen der Genbank-Proteine Unterschiede zu den *in vivo* vorhandenen Proteine aufweisen und so eine Wechselwirkung mit der Cyanellen-RNA verhindern.

5.8. Nukleäre RNase P aus höheren Pflanzen

Nukleäre RNase P ist wesentlich komplexer aufgebaut als das bakterielle Enzym: in Hefen und Menschen wurden neben der essentiellen RNA-Untereinheit neun verschiedene Proteine identifiziert (vgl. 1.4.). Die bekannten Sequenzen dieser eukaryotischen RNase P-Proteine ermöglichten zusammen mit der inzwischen publizierten Totalsequenz des Genoms von *A. thaliana* eine neue Strategie zur Identifizierung der RNase P-Komponenten höherer Pflanzen: trotz der außerordentlich geringen Homologie konnten Sequenzabschnitte und ESTs (*expressed sequence tags*) identifiziert werden, welche Ähnlichkeit zu einigen der in Säugern und Hefen bekannten RNase P-Proteinen aufweisen (Schön, unveröffentlicht).

5.8.1. Das RNase P-Protein ATPOP1 aus *A. thaliana*

Für die weiteren Studien sollte ein zu POP1 homologes *Arabidopsis* Protein (Anhang IV) rekombinant hergestellt werden, da für yPOP1p als einzigem der *S. cerevisiae* RNase P-Proteine eine definierte Wechselwirkung zur RPR1-RNase P-RNA-Untereinheit bekannt ist (Ziehler *et al.*, 2001; Xiao *et al.*, 2002). Basierend auf diesem Ansatz konnte Menzel (2002) ein zu hPOP1p und yPOP1p homologes *Arabidopsis*-Protein überexprimieren und spezifische Antikörper produzieren. Da keine Klarheit über das Spleiß-Muster der ATPOP1p codierenden mRNA bestand, stehen aus dieser Arbeit zwei Expressionsklone (pRSETATpop1 und pRSETATpop1ΔI) zur Verfügung: Aus *A. thaliana* mRNA-Präparationen wurden ausschließlich cDNA-Klone mit einer in der Genbank als Intron identifizierten Sequenz erhalten (4.14.1.; Abb. 4-55). Deshalb sollte das Spleiß-Muster der ATpop1-mRNA näher untersucht werden. Hierzu wurden *Northern-Blot*-Analysen einer *A. thaliana* Gesamt-RNA-Präparation mit spezifischen Sonden für die codierende Region bzw. postuliertes Intron durchgeführt (4.14.1.2.). Durch Vergleich mit geeigneten Längenstandards kann die Größe der ATpop1-mRNA hinreichend abgeschätzt werden. Hierfür stehen, neben den rRNAs aus *Arabidopsis*, die T7-Transkripte der Expressionsklone pRSETATpop1 und pRSETATpop1ΔI zur Verfügung, deren Größe sich zu 825 und 735 nt (pop1 663 nt, pop1ΔI 573 nt, + je 162 nt vom T7-Promotor bis zum Translationsstart; Abb. 4-57) ergibt. Die Größe der ATpop1-mRNA kann damit zu etwa 1000 Nukleotiden bestimmt werden. Der Unterschied zur berechneten Größe kann zum Teil auf das 50-120 nt lange 3'-poly-(A)-Ende eukaryotischer mRNAs zurückgeführt werden. Ein zugehöriger Polymerase II-Promotor, welcher Aufschluss über die zusätz-

liche 5'-nicht-codierende-Region der ATpop1-mRNA geben würde, konnte im *A. thaliana*-Genom bis jetzt nicht eindeutig identifiziert werden.

Durch Hybridisierung mit einer intronspezifischen Sonde konnte die Anwesenheit des Introns in ATpop1-mRNA bestätigt werden (nicht gezeigt). Auch bei der Expression von ATPOP1p scheint die codierende mRNA mit Intron stabil. Es wird ausschließlich das kurze Protein exprimiert. Die Translation endet am ersten Stopcodon (UAA) im Intron (Abb. 4-55). Das größere ATPOP1 Δ I-Protein wird in *E. coli* nur dann exprimiert, wenn die Deletion des Introns bereits auf Vektor-Ebene erfolgte (Abb. 4-58). Western-Blots mit α -ATPOP1p-AB detektieren in *Arabidopsis* S100-Extrakt jedoch ausschließlich ein Protein mit der Größe von ATPOP1p (Abb. 4-58), also 17,1 kD.

Unter Berücksichtigung aller Daten kann davon ausgegangen werden, dass das ATPOP1p-Protein *in planta* von der ungespleißten mRNA exprimiert wird und daher ein Molekulargewicht von 17,1 kD besitzt.

5.8.2. RNase P aus Weizen

Die polyklonalen α -ATPOP1p-AB erkennen in prozessierendem Weizenkeimextrakt spezifisch ein Protein mit etwa 20 kD Molekulargewicht (Abb. 4-58). Arends (1996) konnte in ihren Arbeiten zur Proteinzusammensetzung der RNase P aus Weizen in partiell aufgereinigten RPP-Präparationen ein Protein entsprechender Größe nicht detektieren (Arends und Schön, 1997). Dennoch konnte mit α -ATPOP1p-AB RNase P-Aktivität aus Weizen-S23-Extrakt präzipitiert werden (Abb. 4-59). So sollte geprüft werden, ob eine spätere präparative Immunopräzipitation mit α -ATPOP1p-AB zur Isolierung von RNase P-Proteinen aus Weizen erfolgsversprechend ist. Die Genomsequenz des Weizens kann zur Identifizierung von POP1p-Homologen nicht direkt verwendet werden, da der Weizen als Kulturpflanze durch Züchtung hexaploid ist und sein Genom nur unvollständig sequenziert vorliegt. Die Frage einer erfolgreichen homologen Immunopräzipitation von RNase P aus *Arabidopsis* durch α -ATPOP1p-AB konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die *Arabidopsis* S100-Extrakte enthielten in großer Menge Nukleasen, so dass eine reproduktive Durchführung von RNase P-Aktivitätstests nicht möglich war. Trotz Verkürzung der Reaktionszeiten auf 10 min kam es zu starker bis vollständiger Degradation des eingesetzten Substrats.

Das durch Genbanksuche identifizierte ATPOP1-Protein konnte durch diesen indirekten experimentellen Nachweis als erstes RNase P-Protein aus *A. thaliana* in seiner funktionellen Identität bestätigt werden.

Das die RNase P-RNA codierende Gen in *A. thaliana* ist im Gegensatz zu dem der RNase MRP-RNA noch unbekannt. Ähnlich wie diese nukleäre RNase P ist RNase MRP aus einer RNA-Untereinheit und mehreren Protein-Untereinheiten aufgebaut (1.4.4.). Für Hefe ist bekannt, dass acht der neun Protein-Untereinheiten dieser beiden Ribonukleoproteine identisch sind (Houser-Scott *et al.*, 2002). POP1p zählt zu diesen identischen Untereinheiten. RNase P-Protein-spezifische Antikörper präzipitieren folglich neben RNase P auch RNase MRP. Dieses Vorgehen führte für RNase P-Proteinuntereinheiten aus Mensch und Hefe, neben dem humanen hPop1-Protein, bereits zur Identifizierung mehrerer neuer Protein-Untereinheiten (Lygerou *et al.*, 1996; van Eenennaam *et al.*, 1999; van Eenennaam *et al.*, 2001). Der Nachweis der RNase MRP-RNA-Untereinheit durch RT-PCR im Immunopräzipitat ist daher

der endgültige Beweis für die Spezifität der Immunopräzipitation. Entsprechende Versuche für die abschließende Verifizierung des ATPOP1p-Proteins befinden sich in Vorbereitung.

Erweist sich dies als erfolgreich, kann durch präparative Immunpräzipitation neben RNase P-Protein-Untereinheiten für *A. thaliana* und Weizen auch die RNase P-RNA aus *Arabidopsis* identifiziert werden.

5.9. Ausblick

Den Ausgangspunkt für diese Arbeit bildete die RNase P aus den Chloroplasten höherer Pflanzen, deren Zusammensetzung bis heute ungeklärt ist. Um einen Beitrag zu diesen Untersuchungen zu leisten, wurde die RNase P aus den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa* als primitivem Chloroplastenmodell und potentieller Zwischenstufe der Chloroplastenevolution charakterisiert.

Die ungelöste Frage der Substraterkennung durch die CyRPR-Untereinheit könnte durch Quervernetzungsexperimente zum Substrat gelöst werden. Die Verwendung bipartiter Substrate und die Suche nach einem Minimalsubstrat würden diese Arbeiten unterstützen. In diesem Zusammenhang bieten sich weitere Mutationsanalysen der RNA-Untereinheit an. Quervernetzungsversuche zwischen CyRPR und cyanobakteriellem Protein könnten weiteren Aufschluß über die Bedeutung der Protein-Untereinheit für die Katalyse bieten.

Durch das langsame Wachstum von *C. paradoxa* ist die Ausbeute an Cyanellen sehr gering und alle klassischen Enzymaufreinigungswege stellen sich als äußerst erschwert bis unmöglich dar. Das abermalige *Screening* der *C. paradoxa* λ -cDNA-Expressionsbibliothek unter optimierten Bedingungen scheint deshalb weiterhin eine Möglichkeit, Protein-Untereinheiten der Cyanellen RNase P-RNA zu identifizieren.

Der Schwerpunkt künftiger Arbeiten sollte aber sicher auf der Identifizierung neuer nukleärer RNase P-Untereinheiten aus Pflanzen liegen. Durch die offensichtlich hohe Spezifität bereits vorhandener Antikörper scheint dies auch präparativ durch Immunopräzipitierung möglich. Mit den so isolierten pflanzlichen RNase Ps könnten durch Funktionstests nicht nur das Verständnis über Substraterkennung und Prozessierung der tRNAs in höheren Pflanzen erweitert, sondern auch Aufbau und Funktionsweise dieser Enzyme aufgeklärt werden. Das gewonnene Wissen kann des weiteren zur bereits erwähnten Optimierung des λ -cDNA-*Screenings* beitragen.

6. Zusammenfassung

Ribonuklease P (RNase P) ist eine essentielle Endonuklease, welche die 5'-Flanke von pre-tRNAs entfernt. In nahezu allen bisher untersuchten Organismen und Organellen besteht das Holoenzym aus einer RNA-Untereinheit und einer Protein-Komponente. Nur die Zusammensetzung des Enzyms in den Chloroplasten und Mitochondrien mehrzelliger Eukaryonten scheint unklar. Eine RNA-Untereinheit konnte hier bis jetzt nicht nachgewiesen werden. Um den Aufbau der RNase P aus photosynthetischen Organellen zu klären, wurde die RNase P aus den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa* untersucht. Das Enzym enthält eine RNA, welche im Gegensatz zu bakteriellen RNase P-RNAs nicht in der Lage ist, die pre-tRNA-Prozessierung unter *in vitro*-Bedingungen durchzuführen, obwohl sie eindeutig dem cyanobakteriellen Strukturtyp zugeordnet werden kann.

Die Cyanellen-RNase P-RNA aus *C. paradoxa* kann mit rekombinanten cyanobakteriellen RNase P-Proteinen zum katalytisch aktiven Holoenzym rekonstituiert werden. Das chimäre Holoenzym zeigt keinen erhöhten Umsatz von pre-tRNAs mit 3'-CCA-Ende. Das Einführen der hochkonservierten Nukleotide G22 und G213 in die Cyanellen-RNase P-RNA führt nicht zu signifikanten Unterschieden im Prozessierungsverhalten des heterologen Holoenzym.

Durch Mutationsanalyse einer cyanobakteriellen RNase P-RNA an den entsprechenden Positionen wurde gezeigt, dass diese Konsensus-Nukleotide keinen essentiellen Einfluss auf die Katalyse ausüben. Das rekonstituierte cyanobakterielle Holoenzym zeigt, anders als das entsprechende Ribozym, keine signifikant erhöhte Affinität für Substrate mit 3'-CCA-Ende.

Die funktionelle Charakterisierung der RNase P-RNA aus den Cyanellen von *G. nostochinearum* bestätigt die Ergebnisse für *C. paradoxa*. Die RNA besitzt keine Ribozym-Aktivität und kann mit cyanobakteriellen RNase P-Proteinen zum aktiven Holoenzym rekonstituiert werden.

Um zu klären, ob die fehlende Ribozym-Aktivität der Cyanellen-RNase P-RNAs auf das Fehlen der Fähigkeit zur Substratbindung zurückzuführen ist, wurden zirkular permutierte Cyanellen-RNase P-RNAs mit kovalent verknüpfter pre-tRNA konstruiert. Die Flankenlängen der Substrate wurden dabei variiert, um sterische Probleme möglichst auszuschließen. Entsprechende Transkripte weisen keine Ribozymaktivität auf, können aber mit cyanobakteriellem RNase P-Protein zum aktiven Komplex rekonstituiert werden. Die Reaktion läuft intramolekular, da die Prozessierungsreaktion mit zirkular permutierten Konstrukten nicht durch reife tRNAs gehemmt wird.

Zur Identifizierung der Protein-Untereinheit(en) aus Cyanellen-RNase P wurden polyklonale Antikörper gegen das rekombinate RNase P-Protein aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* PCC 6803 gewonnen. Immunoblots zeigen spezifische Signale im homologen und im Cyanellen-Extrakt, jedoch keinerlei Bindung des RNase P Proteins aus *E. coli*. Die hohe Spezifität der Antikörper für ein Cyanellen-RNase P-Protein konnte durch Immunopräzipitations-Experimente bestätigt werden. Da im vollständig sequenzierten Cyanellen-Genom keine zu RNase P-Proteinen homologe Sequenz identifiziert werden kann, muss das Cyanellen RNase P-Protein im Kern codiert sein.

Um die Proteinkomponente der Cyanellen-RNase P zu klonieren, wurde eine cDNA-Expressionsbank für *Cyanophora paradoxa* angelegt. Versuche zum Immuno-Screening wurden aufgrund eines schlechten Signal : Hintergrund-Verhältnisses nicht weiter verfolgt. Durch Screening der cDNA-Expressionsbank mit Cyanellen-RNase P-RNA konnten zwei *Cyanophora*-Proteine mit hoher Homologie zu eukaryontischen RNA-bindenden Proteinen identifiziert werden.

Das Molekulargewicht des *C. paradoxa*-Holoenzym wurde durch Ultrazentrifugation im Glyceringradienten zu etwa 280 kD bestimmt. RNase P-Aktivität und RNase P-RNA-Untereinheit korrelieren im

Gradienten mit einem 30 kD-Protein, welches im Immunoblot mit cyanobakteriellen RNase P-Protein-Antikörpern spezifisch erkannt wird.

Das Cyanellen-Holoenzym zeigt in wesentlichen Merkmalen eine Übereinstimmung mit eukaryontischer RNase P. Dennoch scheint die katalytische Aktivität in der RNA-Untereinheit lokalisiert zu sein, da die native, relativ große Cyanellen-Protein-Untereinheit ohne Funktionsverlust gegen sehr viel kleinere cyanobakterielle Protein-Untereinheiten ausgetauscht werden kann. Die Protein-Komponente der Cyanellen RNase P scheint deshalb trotz ihrer Größenzunahme im Vergleich zu ihren evolutiven, bakteriellen Vorfahren, keine weiteren essentiellen Aufgaben übernommen zu haben.

Eukaryontische RNase P ist aus bis zu zehn Protein-Untereinheiten aufgebaut. Durch Genom-Analyse konnte in *Arabidopsis thaliana* das potentielle RNase P-Protein Pop1 identifiziert werden. Mit der experimentell bestätigten Identität dieses Proteins wurde erstmals ein RNase P-Protein aus *A. thaliana* eindeutig identifiziert. Durch spezifische Antikörper gegen dieses Protein kann RNase P-Aktivität aus Weizen-Extrakt präzipitiert werden.

Summary

The essential tRNA-processing enzyme ribonuclease P (RNase P) is a striking example for evolution of an RNP enzyme. It is a ribonucleoprotein in bacteria, archaea, and eukaryotic nuclei. No RNA component is found in mitochondria and chloroplasts of multicellular organisms to date, posing the question of enzyme evolution in these organelles of bacterial descent. The plastids (cyanelles) of some primitive algae, such as *Cyanophora paradoxa* and *Glaucocystis nostochinearum*, are intermediates in the evolution from cyanobacteria to chloroplasts and are an ideal model system to study the evolution of structure and function of RNase P from organelles.

C. paradoxa RNase P has an essential RNA component which conforms to the bacterial consensus except for two highly conserved positions. The naked RNA has no ribozyme activity. Recombinant RNase P-proteins from different cyanobacteria can form an active chimaeric holoenzyme with the catalytically inactive cyanelle RNase P-RNA. The reconstituted holoenzyme shows no preference for pre-tRNAs with 3'-CCA-end. Restoration of the bacterial consensus does not increase substrate turnover in the corresponding heterologous holoenzyme.

Mutational analysis of cyanobacterial RNase P-RNA ribozyme proved that these two consensus nucleotides have no essential influence on catalysis. In contrast to the *P. marinus* PCC1375 ribozyme, the reconstituted Pm1375RPR/Pm9511PP cyanobacterial holoenzyme shows no increased substrate affinity for pre-tRNA-substrates possessing a 3'-CCA-end.

The results for *C. paradoxa* RNase P-RNA could be confirmed by analysis of *G. nostochinearum* RNase P-RNA. This RNA can form an active holoenzyme with cyanobacterial RNase P proteins, but shows no ribozyme activity either.

To establish whether the lack of substrate binding ability is the reason for the missing ribozyme activity of cyanelle RNase P-RNA, circularly permuted RNase P-RNAs were designed in which the RNase P-RNA is covalently linked to pre-tRNA substrates with variable flank lengths. Corresponding transcripts showed no ribozyme activity, but could be reconstituted with cyanobacterial protein.

Cleavage of these tethered substrates is not inhibited by an excess of mature tRNAs, proving that it is an intramolecular reaction.

To facilitate identification of cyanelle RNase P protein(s), polyclonal antibodies were generated against the recombinant cyanobacterial RNase P-protein from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. Immunoblots show specific signals in homologous and cyanelle extracts, but no binding of *E. coli* RNase P protein. The high specificity of these antibodies is supported by immunoprecipitation of RNase P activity from the same preparation. As no sequence similarity to bacterial-type RNase P proteins can be identified in the cyanelle genome, this RNase P protein must be encoded in the nucleus or is of a completely new type.

With the aim of isolating the cyanelle RNase P protein subunit, a *C. paradoxa* cDNA-expression-library was constructed. Due to a poor signal-to-background ratio, immuno-screening experiments were not embarked on. Screening the expression library using labelled cyanelle RNase P-RNA resulted in cDNAs for two cyanelle proteins showing significant homology to eukaryotic RNA binding proteins.

The molecular weight of the cyanelle holoenzyme was determined to 280 kD by ultracentrifugation in glycerol gradients. RNase P activity and the RNase P-RNA subunit correlate with a 30 kD-protein, which is specifically recognised in immunoblots by antibodies against cyanobacterial RNase P protein. Although the overall composition of cyanelle RNase P seems more similar to the eukaryote- than to the bacterial-type enzymes, the catalytic activity still seems to reside in the RNA subunit as the sizeable protein complement of the native cyanelle RNase P can be functionally replaced by the much smaller cyanobacterial protein subunit. Therefore it can be concluded that the cyanelle protein subunit has not gained significant additional functions if compared to its bacterial ancestor.

Eukaryotic nuclear RNase P is composed of one RNA and up to ten protein subunits. Genomic analysis of *A. thaliana* revealed at least five protein subunits similar to those found in humans and yeast. Antibodies against the Pop1p-homolog from *A. thaliana* specifically recognize a single protein in a variety of plant species and can immunoprecipitate RNase P activity from a wheat germ preparation. Thus, ATPOP1p is the first known RNase P-protein of *A. thaliana* which has been verified by direct experimental evidence. The antibodies specific for this protein will facilitate the purification of RNase P from wheat extracts.

7. Literaturverzeichnis

- Aitken, A. und Stanier, R.Y. (1979). Characterization of peptidoglycan from cyanelles of *Cyanophora paradoxa*. *J. Gen. Microbiol.* **212**, 218-223.
- Alifano, P., Rivellini, F., Piscitelli, C., Arraiano, C.M., Bruni, C.B. und Carlomagno, M.S. (1994). Ribonuclease E provides substrates for ribonuclease P-dependent processing of polycistronic mRNA. *Genes Dev.* **8**, 3021-2031.
- Altman, S. (1971). Isolation of tyrosine tRNA precursor molecules. *Nature New Biol.* **229**, 19-21.
- Altman, S. (1990). Nobel lecture. Enzymatic cleavage of RNA by RNA. *Biosci. Rep.* **10**, 317-337.
- Altman, S., Kirsebom, L. und Talbot, S. (1993). Recent studies of ribonuclease P. *FASEB J.* **7**, 7-14.
- Altman, S., Wesolowski, D. und Puranam, R.S. (1993). Nucleotide sequences of the RNA subunit of RNase P from several mammals. *Genomics* **18**, 418-422.
- Andrews, A.J., Hall, T.A. und Brown, J.W. (2001). Characterization of RNase P Holoenzymes from *Methanococcus jannaschii* and *Methanothermobacter thermoautotrophicus*. *Biol. Chem.* **382**, 1171-1177.
- Arends, S. (1996). Charakterisierung der nukleären RNase P aus Weizen. Dissertation, Institut für Biochemie, Universität Würzburg.
- Arends, S. und Schön, A. (1997). Purification and characterization of wheat germ ribonuclease P. *Eur. J. Biochem.* **244**, 635-645.
- Baer, M.F., Reilly, R.M., McCorkle, G.M., Hai, T.-Y., Altman, S. und RajBhandary, U.L. (1988). The recognition by RNase P of precursor tRNAs. *J. Biol. Chem.* **263**, 2344-2351.
- Bartkiewicz, M., Gold, H. und Altman, S. (1989). Identification and characterization of an RNA molecule that copurifies with RNase P activity from HeLa cells. *Genes Dev.* **3**, 488-499.
- Baum, M., Cordier, A. und Schön, A. (1996). RNase P from a photosynthetic organelle contains an RNA homologous to the cyanobacterial counterpart. *J. Mol. Biol.* **257**, 43-52.
- Baum, M. und Schön, A. (1996). Localization and expression of the closely linked cyanelle genes for RNase P RNA and two transfer RNAs. *FEBS Lett.* **382**, 60-64.
- Beebe, J.A. und Fierke, C.A. (1994). A kinetic mechanism for cleavage of precursor tRNA(Asp) catalyzed by the RNA component of *Bacillus subtilis* ribonuclease P. *Biochemistry* **33**, 10294-10304.
- Beebe, J.A., Kurz, J.C. und Fierke, C.A. (1996). Magnesium ions are required by *Bacillus subtilis* RNase P RNA for both binding und cleaving precursor tRNA^{Tyr}. *Biochemistry* **33**, 10294-10304.
- Behlen, L.S., Sampson, J.R., DiRenzo, A.B. und Uhlenbeck, O.C. (1990). Lead-catalyzed cleavage of yeast tRNA^{Phe} mutants. *Biochemistry* **29**, 2515-2523.
- Beier, H. und Gross, H.J. (1991) Sequence analysis of RNA. In Brown, T.A., (ed.) *Essential Molecular Biology - A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, Vol. II, pp. 221-236.
- Biswas, R., Ledman, D.W., Fox, R.O., Altman, S., Gopalan, V. (2000). Mapping RNA-protein interactions in ribonuclease P from *Escherichia coli* using disulfide-linked EDTA-Fe. *J. Mol. Biol.* **296**, 19-31.
- Blount, K.F. und Uhlenbeck, O.C. (2002). The hammerhead ribozyme. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 1119-1122.
- Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J. (1987). Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bohnert, H.J., Crouse, E.J., Pouyet, J., Mucke, H. und Löffelhardt, W. (1982). The subcellular localization of DNA components from *Cyanophora paradoxa*, a flagellate containing endosymbiotic cyanelles. *Eur. J. Biochem.* **126**, 381-388.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brannvall, M., Pettersson, B.M. und Kirsebom, L.A. (2003). Importance of the +73/294 interaction in *Escherichia coli* RNase P RNA substrate complexes for cleavage and metal ion coordination. *J. Mol. Biol.* **325**, 697-709.
- Brown, J.W. (1998). The ribonuclease P database. *Nucleic Acids Res.* **26**, 351-352.
- Brown, J.W. (1999). The ribonuclease P database. *Nucleic Acids Res.* **27**, 314.
- Brown, J.W., Haas, E.S., James, B.D., Hunt, D.A. und Pace, N.R. (1991). Phylogenetic analysis and evolution of RNase P RNA in proteobacteria. *J. Bacteriol.* **173**, 3855-3863.
- Brown, J.W., Haas, E.S. und Pace, N.R. (1993). Characterization of ribonuclease P RNAs from thermophilic bacteria. *Nucleic Acids Res.* **21**, 671-679.
- Brown, J.W., Nolan, J.M., Haas, E.S., Rubio, M.A.T., Major, F. und Pace, N.R. (1996). Comparative analysis of ribonuclease P RNA using gene sequences from natural microbial populations reveals tertiary structural elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 3001-3006.
- Brusca, E.M., True, H.L. und Celander, D.W. (2001). Novel RNA-binding properties of Pop3p support a role for eukaryotic RNase P protein subunits in substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **276**, 42543-52548.
- Burgin, A.B. und Pace, N.R. (1990). Mapping the active site of ribonuclease P RNA using a substrate containing a photoaffinity agent. *EMBO J.* **9**, 4111-4118.
- Burkard, U., Willis, I. und Söll, D. (1988). Processing of Histidine Transfer RNA Precursors. *J. Biol. Chem.* **263**, 2447-2451.
- Carbon, P. und Krol, A. (1991). Transcription of the *Xenopus laevis* selenocysteine tRNA^{(Ser)^{Sec}} gene: a system that combines an internal B box and upstream elements also found in U6 snRNA genes. *EMBO J.* **10**, 599-606.
- Carrara, G., Calandra, P., Fruscoloni, P., Doria, M. und Tocchini-Valentini, G.P. (1989). Site selection by *Xenopus laevis* RNAase P. *Cell* **58**, 37-45.
- Carrara, G., Calandra, P., Fruscoloni, P. und Tocchini-Valentini, G.P. (1995). Two helices plus a linker: A small model substrate for eukaryotic RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 2627-2631.
- Cate J.H. und Doudna, J.A. (1996). Metal-binding sites in the major groove of a large ribozyme domain. *Structure* **4**, 1221-1229.
- Chamberlain, J.R., Lee, Y., Lane, W.S. und Engelke, D.R. (1998). Purification and characterization of the nuclear RNase P holoenzym complex reveals extensive subunit overlap with RNase MRP. *Genes Dev.* **12**, 1678-1690.
- Chen, Y., Li, X. und Gegenheimer, P. (1997). Ribonuclease P catalysis requires Mg²⁺ coordinated to the pro-RP oxygen of the scissile bond. *Biochemistry* **36**, 2425-2438.
- Chen, J.-L., Nolan, J.M., Harris, M.E. und Pace, N.R. (1998). Comparative photocross-linking analysis of the tertiary structure of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* RNase P RNAs. *EMBO J.* **17**, 15515-15525.
- Chen, J.-L. und Pace, N.R. (1997). Identification of the universally conserved core of RNase P RNA. *RNA* **3**, 557-560.
- Cherayil, B., Krupp, G., Schuchert, P., Char, S. und Söll, D. (1987). The RNA components of *Schizosaccharomyces pombe* RNase P are essential for cell viability. *Gene* **60**, 157-161.
- Chomczynski, P. (1992). One-Hour Downward Alkaline Capillary Transfer for Blotting of DNA und RNA. *Anal. Biochem.* **201**, 134-139.
- Christian, E.L., Zahler, N.H., Kaye, N.M. und Harris, M.E. (2002). Analysis of substrate recognition by the ribonucleoprotein endonuclease RNase P. *Methods* **28**, 307-322.

- Chu, S., Zengel, J.M. und Lindahl, L. (1997). A novel protein shared by RNase MRP and RNase P. *RNA* **3**, 382-391.
- Ciesiolka J., Hardt, W.D., Schlegel, J., Erdmann, V.A. und Hartmann, R.K. (1994). Lead-ion-induced cleavage of RNaseP RNA. *Eur. J. Biochem.* **219**, 49-56.
- Cline, J., Braman, J.C. und Hogrefe, H.H. (1996). PCR fidelity of *pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3546-3551.
- Collins, L.J., Moulton, V. und Penny, D. (2000). Use of RNA secondary structure for studying the evolution of RNase P and RNase MRP. *J. Mol. Evol.* **51**, 194-204.
- Cooley, L., Appel, B. und Söll, D. (1982). Post-transcriptional nucleotide addition is responsible for the formation of the 5' terminus of histidine tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 6475-6479.
- Cordier, A. (1998). Strukturelle und funktionelle Eigenschaften der RNase P aus den Cyanellen von *Cyanophora paradoxa*. Dissertation, Institut für Biochemie, Universität Würzburg.
- Cordier, A. und Schön, A. (1999). Cyanelle RNase P: RNA structure analysis and holoenzyme properties of an organellar ribonucleoprotein enzyme. *J. Mol. Biol.* **289**, 9-20.
- Crary, S.M., Niranjanakumari, S. und Fierke, C.A. (1998). The protein component of *Bacillus subtilis* ribonuclease P increases catalytic efficiency by enhancing interactions with the 5' leader sequence of pre-tRNA^{Asp}. *Biochemistry* **37**, 9409-9416.
- Czworkowski, J. und Moore, P.B. (1997). The conformational properties of elongation factor G and the mechanism of translocation. *Biochemistry* **36**, 10327-10334.
- Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T.A. und Moore, P.B. (1994). The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J.* **13**, 3661-3668.
- Dang, Y.L. und Martin, N.C. (1993). Yeast mitochondrial RNase P: Sequence of the RPM2 gene and demonstration that its product is a protein subunit of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **268**, 19791-19796.
- Darr, S.C., Brown, J.W. und Pace, N.R. (1992). The varieties of ribonuclease P. *Trends Biochem. Sci.* **17**, 178-182.
- Darr, S.C., Pace, B. und Pace, N.R. (1990). Characterization of ribonuclease P from the Archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *J. Mol. Biol.* **265**, 12927-12932.
- Darr, S.C., Zito, K., Smith, D. und Pace, N.R. (1992). Contributions of phylogenetically variable structural elements to the function of the ribozyme ribonuclease P. *Biochemistry* **31**, 328-333.
- Dichtl, B. und Tollervey, D. (1997). Pop3p is essential for the activity of the RNase MRP and RNase P ribonucleoproteins *in vivo*. *EMBO J.* **16**, 417-429.
- Doherty, E.A. und Doudna, J.A. (2001). Ribozyme structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 457-475.
- Doolittle, W.F. (1982) Molecular Evolution. In Carr, N.G. und Whitton, B.A., (eds.) *The Biology of Cyanobacteria*. Blackwell Scientific, Oxford, Vol. **12**, pp. 307-331.
- Doria, M., Carrara, G., Calandra, C. und Tocchini-Valentini, G. (1991). An RNA molecule copurifies with RNase P activity from *Xenopus laevis* oocytes. *Nucleic Acids Res.* **19**, 2315-2320.
- Easterwood, T.R. und Harvey, S.C. (1997). Ribonuclease P RNA: Models of the 15/16 bulge from *Escherichia coli* and the P15 stem loop of *Bacillus subtilis* RNA **3**, 577-585.
- Eder, P.S., Kekuda, R., Stolc, V. und Altman, S. (1997). Characterization of two scleroderma autoimmune antigens that copurify with human ribonuclease P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 1101-1106.
- Fang, X.W., Yang, X.J., Littrell, K., Niranjanakumari, S., Thyagarajan, P., Fierke, C.A., Sosnick, T.R. und Pan, T. (2001). The *Bacillus subtilis* RNase P holoenzyme contains two RNase P RNA and two RNase P protein subunits. *RNA* **7**, 233-241.

- Farabaugh, P.J., Schmeissner, U., Hofer, M. und Miller, J.H. (1978). Genetic studies of the lac repressor. VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in the lacI gene of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **126**, 847-857.
- Ferre-D'Amare, A.R., Zhou, K. und Doudna, J.A. (1998). Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature* **395**, 567-574.
- Fields, S. und Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**, 245-246.
- Fingerhut, C. und Schön, A. (1998). Sequence and functional characterization of RNase P RNA from the chl a/b containing cyanobacteria *Prochlorothrix hollandica*. *FEBS Lett.* **428**, 161-163.
- Forster, A.C. und Altman, S. (1990). Similar cage-shaped structures for the RNA components of all ribonuclease P and ribonuclease MRP enzymes. *Cell* **62**, 407-409.
- Frank, D.N., Adamidi, C., Ehringer, M.A., Pitulle, C. und Pace, N.R. (2000). Phylogenetic-comparative analysis of the eukaryal ribonuclease P RNA. *RNA* **6**, 1895-1904.
- Frank, D.N., Harris, M.E. und Pace, N.R. (1994). Rational design of self-cleaving pre-tRNA-ribonuclease P RNA conjugates. *Biochemistry* **33**, 10800-10808.
- Frank, D.N. und Pace, N.R. (1998). Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 153-180.
- Gardiner, K.J., Marsh, T.L. und Pace, N.R. (1985). Ion dependence of the *Bacillus subtilis* RNase P reaction. *J. Biol. Chem.* **260**, 5415-5419.
- Gegenheimer, P. (1995). Structure, mechanism and evolution of chloroplast transfer RNA processing systems. *Mol. Biol. Rep.* **22**, 147-150.
- Gilbert, W. (1986). The RNA World. *Nature* **319**, 618.
- Gimple, O. (1999). Struktur und Substratspezifität der RNase P-RNA von *Prochlorococcus marinus*. Diplomarbeit, Institut für Biochemie, Universität Würzburg.
- Gimple, O. und Schön, A. (2001). *In vitro* and *in vivo* processing of cyanelle tmRNA by RNase P. *Biol. Chem.* **382**, 1421-1429.
- Giovannoni, S.J., Turner, S., Olsen, G.J., Barns, S., Lane, D.J. und Pace, N.R. (1988). Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* **170**, 3584-3592.
- Glemarec, C., Kufel, J., Foldesi, A., Maltseva, T., Sandstrom, A., Kirsebom, L.A. und Chattopadhyaya, J. (1996). The NMR structure of 31mer RNA domain of *Escherichia coli* RNase P RNA using its non-uniformly deuterium labelled counterpart. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2022-2035.
- Gopalan, V., Baxevanis, A.D., Landsman, D. und Altman, S. (1997). Analysis of the functional role of conserved residues in the protein subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **267**, 818-829.
- Gopalan, V., Golbik, R., Schreiber, G., Fersht, A.R. und Altman, S. (1997). Fluorescence properties of a tryptophan residue in an aromatic core of the protein subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **267**, 765-769.
- Gray, M.W. (1989). The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet.* **5**, 294-299.
- Gray, M.W., Lang, B.F., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Brossard, N., Delage, E., Littlejohn, T.G., Plante, I., Rioux, P., Saint-Louis, D., Zhu, Y. und Burger, G. (1998). Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucleic Acids Res.* **26**, 865-878.
- Green, C.J., Rivera-Leon, R. und Vold, B.S. (1996). The catalytic core of RNase P. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1497-1503.

- Groom, K.R., Dang, Y.L., Gao, G.J., Lou, Y.C., Martin, N.C., Wise, C.A. und Morales, M.J. (1996). Genetic and biochemical approaches for analysis of mitochondrial RNase P from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **264**, 86-99.
- Gruber, A. und Zingales, B. (1995). Alternative method to remove antibacterial antibodies from antisera used for screening of expression libraries. *BioTechniques* **19**, 28-30.
- Guerrier-Takada, C. und Altman, S. (1992). Reconstitution of enzymatic activity from fragments of M1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 1266-1270.
- Guerrier-Takada, C. und Altman, S. (1984). Structure in solution of M1 RNA, the catalytic subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **23**, 6327-6334.
- Guerrier-Takada, C., van Belkum, A., Pleij, C.W. und Altman, S. (1988). Novel reactions of RNAase P with a tRNA-like structure in turnip yellow mosaic virus RNA. *Cell* **53**, 267-272.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N. und Altman, S. (1983). The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* **35**, 849-857.
- Guerrier-Takada, C., Haydock, K., Allen, L. und Altman, S. (1986). Metal ion requirement and other aspects of the reaction catalyzed by M1 RNA, the RNA subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **25**, 1509-1515.
- Guerrier-Takada, C., McClain, W.H. und Altman, S. (1984). Cleavage of tRNA precursors by the RNA subunit of *E. coli* ribonuclease P (M1 RNA) is influenced by 3'-proximal CCA in the substrates. *Cell* **38**, 219-224.
- Guerrier-Takada, C. und Altman, S. (1992). Reconstitution of enzymatic activity from fragments of M1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 1266-1270.
- Güssow, D. und Clackson, T. (1989). Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17**, 4000.
- Guex, N. und Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* **18**, 2714-2723.
- Haas, E.S., Armbruster, D.W., Vucson, B.M. Daniels, C.J. und Brown, J.W. (1996). Comparative analysis of ribonuclease P RNA structure in Archaea. *Nucleic Acids. Res.* **24**, 1252-1259.
- Haas, E.S., Brown, J.W., Pitulle, C. und Pace, N.R. (1994). Further perspectives on the catalytic core and secondary structure of ribonuclease P RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 2527-2531.
- Haas, E.S. und Brown, J.W. (1998). Evolutionary variation in bacterial RNase P RNAs. *Nucleic Acids Res.* **26**, 4093-4099.
- Haas, E.S., Morse, D.P., Brown, J.W., Schmidt, F.J. und Pace, N.R. (1991). Long-range structure in ribonuclease P RNA. *Science* **254**, 853-856.
- Hall, T.A. und Brown, J.W. (2002). Archaeal RNase P has multiple protein subunits homologous to eukaryotic nuclear RNase P proteins. *RNA* **8**, 296-306.
- Hallick, R.B., Hong, L., Drager, R.G., Favreau, M.R., Monfort, A., Orsat, B., Spielmann, A. and Stutz, E. (1993). Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3537-3544.
- Han, S.J., Lee, B.J. und Kang, H.S. (1998). Purification and characterization of the nuclear ribonuclease P from *Aspergillus nidulans*. *Eur. J. Biochem.* **251**, 244-251.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanic-Joyce, P.J. und Gray, M.W. (1990). Processing of transfer RNA precursors in a wheat mitochondrial extract. *J. Biol. Chem.* **265**, 13782-13791.
- Hansen, F.G., Hansen, E.B. und Atlung, T. (1985). Physical mapping and nucleotide sequence of the rnpA gene that encodes the protein component of ribonuclease P in *Escherichia coli*. *Gene* **38**, 85-93.

- Hansen, A., Pfeiffer, T., Zuleeg, T., Limmer, S., Ciesiolka, J., Feltens, R. und Hartmann, R.K. (2001). Exploring the minimal substrate requirements for trans-cleavage by RNase P holoenzymes from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol* **41**, 131-143.
- Hardt, W.-D., Schlegl, J., Erdmann, V.A. und Hartmann, R.K. (1995). Kinetics and thermodynamics of the RNase P RNA cleavage reaction: Analysis of tRNA 3'-end variants. *J. Mol. Biol.* **247**, 161-172.
- Hardt, W.-D., Warnecke, J.M., Erdmann, V.A. und Hartmann, R.K. (1995). R_p-phosphorothioate modifications in RNase P RNA that interfere with tRNA binding. *EMBO J.* **14**, 2935-2944.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988). Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Harris, J.K., Haas, E.S., Williams, D., Frank, D.N. und Brown, J.W. (2001). New insight into RNase P RNA structure from comparative analysis of the archaeal RNA. *RNA* **2**, 220-232.
- Harris, M.E., Kazantsev, A.V., Chen, J.-L. und Pace, N.R. (1997). Analysis of the tertiary structure of the RNase P ribozyme-substrate complex by site-specific photoaffinity crosslinking. *RNA* **3**, 561-576.
- Harris, M.E., Nolan, J.M., Malhotra, A., Brown, J.W., Harvey, S.C. und Pace, N.R. (1994). Use of photoaffinity crosslinking and molecular modeling to analyze the global architecture of ribonuclease P RNA. *EMBO J.* **13**, 3953-3963.
- Harris, M.E. und Pace, N.R. (1995). Identification of phosphates involved in catalysis by the ribozyme RNase P RNA. *RNA* **1**, 210-218.
- Harris, M.E. und Pace, N.R. (1996). Analysis of the tertiary structure of bacterial RNase P RNA. *Mol. Biol. Rep.* **22**, 115-123.
- Hartmann, R., Heinrich, J., Schlegl, F. und Schuster, H. (1995). Precursor of C4 antisense RNA of bacteriophages P1 and P7 is a substrate for RNase P of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5822-5826.
- Herdman, M. und Stanier, R.Y. (1977). The cyanelle: Chloroplast or endosymbiotic prokaryote? *FEMS Microbiol. Lett.* **1**, 7-12.
- Hess, W.R., Fingerhut, C. and Schön, A. (1998). RNase P RNA from *Prochlorococcus marinus*: The contribution of substrate domains to recognition by a cyanobacterial ribozyme. *FEBS Lett.* **431**, 138-142.
- Heubeck, C. (1999). Überproduktion, Aufreinigung und funktionelle Charakterisierung eines cyanobakteriellen RNase P-Proteins. Diplomarbeit, Institut für Biochemie, Universität Würzburg.
- Heubeck, C. und Schön, A. (2001). Cyanelle ribonuclease P: isolation and structure-function studies of an organellar ribonucleoprotein enzyme. *Methods Enzymol.* **342**, 118-134.
- Hiratsuka, J., Shimada, H., Whittier, R., Ishibashi, T., Sakamoto, M., Mori, M., Kondo, C., Honji, Y., Sun, C.-R., Meng, B.-Y., Li, Y.-Q., Kanno, A., Nishizawa, Y., Shinozaki, K. und Sugiura, M. (1989). The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: Intermolecular recombination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* **217**, 185-194.
- Hollingsworth, M.J. und Martin, N.C. (1986). RNase P activity in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* depends on both mitochondrion and nucleus-encoded components. *Mol. Cell Biol.* **6**, 1058-1064.
- Holm, P.S. und Krupp, G. (1992). The acceptor stem in pre-tRNAs determines the cleavage specificity of RNase P. *Nucleic Acids Res.* **20**, 421-423.
- Houser-Scott, F., Xiao, S., Millikin, C.E., Zengel, J.M., Lindahl, L. und Engelke, D.R. (2002). Interactions among the protein and RNA subunits of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear RNase P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2684-2689.
- Jacobson, M.R., Cao, L.G., Wang, Y.L. und Pederson, T. (1995). Dynamic localization of RNase MRP RNA in the nucleolus observed by fluorescent RNA cytochemistry in living cells. *J. Cell Biol.* **131**, 1649-1658.

- Jaeger, L., Michel, F. und Westhof, E. (1994). Involvement of a GNRA tetraloop in long-range RNA tertiary interactions. *J. Mol. Biol.* **236**, 1271-1276.
- James, B.D., Olsen, G.J., Liu, J. und Pace, N.R. (1988). The secondary structure of ribonuclease P RNA, the catalytic element of a ribonucleoprotein enzyme. *Cell* **52**, 19-26.
- Jarrous, N. und Altman, S. (2001). Human ribonuclease P. *Methods Enzymol.* **342**, 93-100.
- Jarrous, N., Eder, P.S., Guerrier-Takada, C., Hoog, C. und Altman, S. (1998). Autoantigenic properties of some protein subunits of catalytically active complexes of human ribonuclease P. *RNA* **4**, 407-417.
- Jarrous, N., Reiner, R., Wesolowski, D., Mann, H., Guerrier-Takada, C. und Altman, S. (2001). Function and subnuclear distribution of Rpp21, a protein subunit of the human ribonucleoprotein ribonuclease P. *RNA* **7**, 1153-1164.
- Jayanthi, G.P. und Van Tuyle, G.C. (1992). Characterization of Ribonuclease P Isolated from Rat Liver Cytosol. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**, 264-270.
- Jiang, T., Guerrier-Takada, C. und Altman, S. (2001). Protein-RNA interactions in the subunits of human nuclear RNase P. *RNA* **7**, 937-41.
- Jovine L., Djordjevic S. und Rhodes, D. (2000). The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 2.0 Å resolution: cleavage by Mg(2+) in 15-year old crystals. *J. Mol. Biol.* **301**, 401-414. Erratum in: *J. Mol. Biol.* **303**, 113.
- Kahle, D., Wehmeyer, U., Char, S. und Krupp, G. (1990). The methylation of one specific guanosine in a pre-tRNA prevents cleavage by RNase P and by the catalytic M1 RNA. *Nucleic Acids Res.* **18**, 837-844.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirose, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**, 109-136.
- Karwan, R. (1993). RNase MRP/RNase P: a structure-function relation conserved in evolution? *FEBS Lett.* **319**, 1-4.
- Kassenbrock, C.K., Gao, G.-J., Groom, K., Sulo, P., Douglas, M.G. und Martin, N.C. (1995). RPM2, independently of its mitochondrial RNase P function, suppresses an ISP42 mutant defective in mitochondrial import and is essential for normal growth. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 4764-4770.
- Kazakov, S. und Altman, S. (1991). Site-specific cleavage by metal ion cofactors and inhibitors of M1 RNA, the catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 9193-9197.
- Kazantsev, A.V., Krivenko, A.A., Harrington, D.J., Carter, R.J., Holbrook, S.R., Adams, P.D. und Pace, N.R. (2003). High-resolution structure of RNase P protein from *Thermotoga maritima*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 7497-7502.
- Kikuchi, Y., Sasaki-Tozawa, N. und Suzuki, K. (1993). Artificial self-cleaving molecules consisting of a tRNA precursor and the catalytic RNA of RNase P. *Nucleic Acids Res.* **21**, 4685-4689.
- Kikuchi, Y. und Suzuki-Fujita, K. (1995). Synthesis and self-cleavage reaction of a chimeric molecule between RNase P-RNA and its model substrate. *J. Biochem.* **117**, 197-200.
- Kim, S. und Lee, Y. (1997). Function of the repeated sequence in the 3' flanking region of the *Escherichia coli* *rnpB* gene on transcription termination and RNA processing. *FEBS Lett.* **407**, 353-356.
- Kirsebom, L.A. (1995). RNase P - a 'Scarlet Pimpernel'. *Mol. Microbiol.* **17**, 411-420.
- Kirsebom, L.A. und Altman, S. (1989). Reaction in vitro of some mutants of RNase P with wild-type and temperature-sensitive substrates. *J. Mol. Biol.* **207**, 837-840.

- Kirsebom, L.A. und Svärd, S.G. (1992). The kinetics and specificity of cleavage by RNase P is mainly dependent on the structure of the amino acid acceptor stem. *Nucleic Acids Res.* **20**, 425-432.
- Kirsebom, L.A. und Svärd, S.G. (1994). Base pairing between *Escherichia coli* RNase P RNA and its substrate. *EMBO J.* **13**, 4870-4876.
- Kirsebom, L.A. und Vioque, A. (1996). RNase P from bacteria. Substrate recognition and function of the protein subunit. *Mol. Biol. Rep.* **22**, 99-109.
- Kiss, T., Marshallsay, C. und Filipowicz, W. (1992). 7-2/MRP RNAs in plant and mammalian cells: association with higher order structures in the nucleolus. *EMBO J.* **11**, 3737-3746.
- Kline, L., Nishikawa, S. und Söll, D. (1981). Partial purification of RNase P from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **256**, 5058-5063.
- Kole, R., Baer, M., Stark, B. und Altman, S. (1980). *E. coli* RNase P has a required RNA component in vivo. *Cell* **19**, 881-887.
- Komine, Y., Kitabake, M., Yokogawa, T., Nishikawa, K. und Inokuchi, H. (1994). A tRNA-like structure is present in 10Sa RNA, a small stable RNA from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 9223-9227.
- Kowallik, K.V. (1997). Origin and evolution of chloroplasts: Current status and future perspectives. In: Eukaryotism and Symbiosis (Schenk H.E.A., Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E. und Schwemmler, W., Eds.), pp. 3-23. Springer, Berlin, Germany.
- Krasilnikov, A.S., Yang, X., Pan, T. und Mondragon, A. (2003). Crystal structure of the specificity domain of ribonuclease P. *Nature* **421**, 760-764.
- Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E. und Cech, T.R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell* **31**, 47-157.
- Krupp, G., Cherayil, B., Frendewey, D., Nishikawa, S. und Söll, D. (1986). Two RNA species co-purify with RNase P from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **5**, 1697-1703.
- Kufel, J. und Kirsebom, L.A. (1996). Residues in *Escherichia coli* RNase P RNA important for cleavage site selection and divalent metal ion binding. *J. Mol. Biol.* **263**, 685-698.
- Kunzmann, A., Brennicke, A. und Marchfelder, A. (1998). 5' end maturation and RNA editing have to precede tRNA 3' processing in plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 108-113.
- Kurz J.C. und Fierke, C.A. (2002). The affinity of magnesium binding sites in the *Bacillus subtilis* RNase P - pre-tRNA complex is enhanced by the protein subunit. *Biochemistry* **41**, 9545-9558.
- Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-209.
- LaGrandeur, T.E., Darr, S.C., Haas, E.S. und Pace, N.R. (1993). Characterization of the RNase P RNA of *Sulfolobus solfataricus*. *J. Bacteriol.* **175**, 5043-5048.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LaGrandeur, T.E., Hüttenhofer, A., Noller, H.F. und Pace, N.R. (1994). Phylogenetic comparative chemical footprint analysis of the interaction between RNase P RNA and tRNA. *EMBO J.* **13**, 3945-3952.
- Lambert, D.H., Bryant, D.A., Stirewalt, V.L., Dubbs, J.M., Stevens, S.E. Jr. und Porter, R.D. (1985). Gene map for the *Cyanophora paradoxa* cyanelle genome. *J. Bacteriol.* **164**, 659-664.
- Lang, B.F., Burger, G., O'Kelly, C.J., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M. und Gray, M.W. (1997). An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* **387**, 493-497.

- Lawrence, N., Wesolowski, D., Gold, H., Bartkiewicz, M., Guerrier-Takada, C., McClain, W.H. und Altman, S. (1987) Characteristics of ribonuclease P from various organisms. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Cold Spring Harbor Press, Vol. **52**, pp. 233-238.
- Lee, J.-Y. und Engelke, D.R. (1989). Partial characterization of an RNA component that copurifies with *Saccharomyces cerevisiae* RNase P. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2536-2543.
- Lee, J.-Y., Evans, C. und Engelke, D.R. (1991). Expression of RNase P RNA in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by an unusual RNA polymerase III promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 6986-6990.
- Lee, J.-Y., Rohlman, C.E., Molony, L.A. und Engelke, D.R. (1991). Characterization of RPR1, an essential gene encoding the RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear RNase P. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 721-730.
- Lee, Y.C., Lee, B.J., Hwang, D.S. und Kang, H.S. (1996). Purification and characterization of mitochondrial Ribonuclease P from *Aspergillus nidulans*. *Eur. J. Biochem.* **235**, 289-296.
- Lee, Y.C., Lee, B.J. und Kang, H.S. (1996). The RNA component of mitochondrial ribonuclease P from *Aspergillus nidulans*. *Eur. J. Biochem.* **235**, 297-303.
- Li, X., Frank, D.N., Pace, N., Zengel, J.M. und Lindahl, L. (2002). Phylogenetic analysis of the structure of RNase MRP RNA in yeasts. *RNA* **8**, 740-751.
- Li, K., Smagula, C.S., Parsons, W.J., Richardson, J.A., Gonzalez, M., Hagler, H.K. und Williams, R.S. (1994). Subcellular partitioning of MRP RNA assessed by ultrastructural and biochemical analysis. *J. Cell Biol.* **124**, 871-882.
- Lindahl, L., Fretz, S., Epps, N. und Zengel, J.M. (2000). Functional equivalence of hairpins in the RNA subunits of RNase MRP and RNase P in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **6**, 653-658.
- Lindahl, L. und Zengel, J.M. (1995). RNase MRP and rRNA processing. *Mol. Biol. Rep.* **22**, 69-73.
- Liu, M.H., Yuan, Y. und Reddy, R. (1994). Human RNaseP RNA and nucleolar 7-2 RNA share conserved 'To' antigen-binding domains. *Mol. Cell. Biochem.* **130**, 75-82.
- Löffelhardt, W. et al. (1997). The complete sequence of the cyanelle genome of *Cyanophora paradoxa*: The genetic complexity of a primitive plastid. In: Eukaryotism and Symbiosis (Schenk, H.E.A., Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E. und Schwemmler, W., Eds.), pp. 40-48. Springer, Berlin, Germany.
- Loria, A., Niranjanakumari, S., Fierke, C.A. und Pan, T. (1998). Recognition of a pre-tRNA substrate by the *Bacillus subtilis* RNase P holoenzyme. *Biochemistry* **37**, 15466-15473.
- Loria, A. und Pan, T. (1996). Domain structure of the ribozyme from eubacterial ribonuclease P. *RNA* **2**, 551-563.
- Loria, A. und Pan, T. (1998). Recognition of the 5' leader and the acceptor stem of a pre-tRNA substrate by the ribozyme from *Bacillus subtilis* RNase P. *Biochemistry* **37**, 10126-10133.
- Loria, A. und Pan, T. (1997). Recognition of the T stem-loop of a pre-tRNA substrate by the ribozyme from *Bacillus subtilis* ribonuclease P. *Biochemistry* **36**, 6317-6325.
- Lundberg, U. und Altman, S. (1995). Processing of the precursor to the catalytic RNA subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *RNA* **1**, 327-334.
- Lundberg, K.S., Shoemaker, D.D., Adams, M.W., Short, J.M., Sorge, J.A. und Mathur, E.J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **108**, 1-6.
- Lygerou, Z., Mitchell, P., Petfalski, E., Seraphin, B. und Tollervey, D. (1994). The POP1 gene encodes a protein component common to the RNase MRP and RNase P ribonucleoprotein. *Genes Dev.* **8**, 1423-1433.
- Lygerou, Z., Pluk, H., van Venrooij, W.J. und Seraphin, B. (1996). hPop1: an autoantigenic protein subunit shared by the human RNase P and RNase MRP ribonucleoproteins. *EMBO J.* **15**, 5936-5948.

- Maier, R.M., Neckermann, K., Igloi, G.L. und Kössel, H. (1995). Complete sequence of the maize chloroplast genome: Gene content, hotspots of divergence and fine tuning of genetic information by transcript editing. *J. Mol. Biol.* **251**, 614-628.
- Manam, S. und van Tuyle, G.C. (1987). Separation and characterization of 5'- and 3'- tRNA processing nucleases from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **262**, 10272-10279.
- Mans, R.M., Guerrier-Takada, C., Altman, S. und Pleij, C.W. (1990). Interaction of RNase P from *Escherichia coli* with pseudoknotted structures in viral RNAs. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3479-3487.
- Marchfelder, A. und Brennicke, A. (1994). Characterization and partial purification of tRNA processing activities from potato mitochondria. *Plant Physiol.* **105**, 1247-1254.
- Marion-Poll, A., Hibbert, C., Radebaugh, C. und Hallick, R. (1988). Processing of mono-, di- and tricistronic transfer RNA precursors in a spinach or pea chloroplast soluble extract. *Plant Mol. Biol.* **11**, 45-56.
- Martin, N.C. und Lang, B.F. (1997). Mitochondrial RNase P: the RNA family grows. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 42-44.
- Massire, C., Jaeger, L. und Westhof, E. (1997). Phylogenetic evidence for a new tertiary interaction in bacterial RNase P RNAs. *RNA* **3**, 553-556.
- Massire, C., Jaeger, L. und Westhof, E. (1998). Derivation of the three-dimensional architecture of bacterial ribonuclease P RNAs from comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* **279**, 773-793.
- Mattsson, J.G., Svård, S.G. und Kirsebom, L.A. (1994). Characterization of the *Borrelia burgdorferi* RNase P RNA gene reveals a novel tertiary interaction. *J. Mol. Biol.* **241**, 1-6.
- McClain, W.H., Guerrier-Takada, C. und Altman, S. (1987). Model substrates for an RNA enzyme. *Science* **238**, 527-530.
- Meinzel, T. und Blanquet, S. (1995). Maturation of pre-tRNA^{Met} by *Escherichia coli* RNase P is specified by a guanosine of the 5'-flanking sequence. *J. Biol. Chem.* **270**, 15908-15914.
- Michel, F. und Westhof, E. (1990). Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* **216**, 585-610.
- Mierendorf, R.C., Percy, C. und Young, R.A. (1987). Gene isolation by screening lambda gt11 libraries with antibodies. *Methods Enzymol.* **152**, 458-469.
- Miller, D.L. und Martin, N.C. (1983). Characterization of the yeast mitochondrial locus necessary for tRNA biosynthesis: DNA sequence analysis and identification of a new transcript. *Cell* **34**, 911-917.
- Milligan, J. und Uhlenbeck, O. (1989) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. In: Dahlberg, J. und Abelson, J., (eds.) *Meth. Enzymol* Academic Press Inc., Vol. 180, pp. 51-62.
- Mohr, G., Caprara, M.G., Guo, Q. und Lambowitz, A.M. (1994). A tyrosyl-tRNA synthetase can function similarly to an RNA structure in the *Tetrahymena* ribozyme. *Nature* **370**, 147-150.
- Mohr, G., Zhang, A., Gianelos, J.A., Belfort, M. und Lambowitz, A.M. (1992). The neurospora CYT-18 protein suppresses defects in the phage T4 td intron by stabilizing the catalytically active structure of the intron core. *Cell* **69**, 483-494.
- Morales, M.J., Dang, Y.L., Lou, Y.C., Sulo, P. und Martin, N.C. (1992). A 105-kDa protein is required for yeast mitochondrial RNase P activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 9875-9879.
- Morales, M.J., Wise, C.A., Hollingsworth, M.J. und Martin, N.C. (1989). Characterization of yeast mitochondrial RNase P: an intact RNA subunit is not essential for activity *in vitro*. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6865-6881.
- Myers, T.W. und Gelfand, D.H. (1991). Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30**, 7661-7666.
- Naß, A. (1997). Spleißen und Modifizieren von tRNA^{Tyr}-Vorläufermolekülen in Pflanzen. Dissertation, Insitut für Biochemie, Universität Würzburg.

- Nichols, M., Söll, D. und Willis, I. (1988). Yeast RNase P: Catalytic activity and substrate binding are separate functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 1379-1383.
- Nieuwlandt, D.T., Haas, E.S. und Daniels, C.J. (1991). The RNA component of RNase P from the archaeobacterium *Haloferax volcanii*. *J. Biol. Chem.* **266**, 5689-5695.
- Niranjanakumari, S., Kurz, J.C. und Fierke, C.A. (1998). Expression, purification and characterization of the recombinant ribonuclease P protein component from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3090-3096.
- Niranjanakumari, S., Stams, T., Crary, S.M., Christianson, D.W. und Fierke, C.A. (1998). Protein component of the ribozyme ribonuclease P alters substrate recognition by directly contacting precursor tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 15212-15217.
- Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Polekhina, G., Reshetnikova, L., Clark, B.F. und Nyborg, J. (1995). Crystal structure of the ternary complex of Phe-tRNAPhe, EF-Tu, and a GTP analog. *Science* **270**, 1464-1472.
- Ochotorena, I.L., Hirata, D., Kominami, K., Potashkin, J., Sahin, F., Wentz-Hunter, K., Gould, K.L., Sato, K., Yoshida, Y., Vardy, L. und Toda, T. (2001). Conserved Wat1/Pop3 WD-repeat protein of fission yeast secures genome stability through microtubule integrity and may be involved in mRNA maturation. *J. Cell Sci.* **114**, 2911-2920.
- Oh, B-K. und Pace, N.R. (1994). Interaction of the 3'-end of tRNA with ribonuclease P RNA. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4087-4097.
- Oh B.K., Frank, D.N. und Pace, N.R. (1998). Participation of the 3'-CCA of tRNA in the binding of catalytic Mg²⁺ ions by ribonuclease P. *Biochemistry* **37**, 7277-7283.
- Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S.I., Inokuchi, H. und Ozeki, H. (1986). Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of Liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* **322**, 572-574.
- Orellana, O., Cooley, L. und Söll, D. (1986). The additional guanylate at the 5' terminus of *Escherichia coli* tRNA^{His} is the result of unusual processing by RNase P. *Mol. Cell Biol.* **6**, 525-529.
- Pace, N.R. und Brown, J.W. (1995). Evolutionary perspective on the structure and function of ribonuclease P, a ribozyme. *J. Bacteriol.* **177**, 1919-1928.
- Pace, N.R., Reich, C., James, B.D., Olsen, G.J., Pace, B. und Waugh, D.S. (1987). Structure and catalytic function in ribonuclease P. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Pace N.R. und Smith, D. (1990). Ribonuclease P: function and variation. *J. Biol. Chem.* **265**, 3587-3590.
- Pagan-Ramos, E., Lee, Y. und Engelke, D.R. (1996). Mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear RNase P: randomization of universally conserved positions in the RNA subunit. *RNA* **2**, 441-451.
- Pagan-Ramos, E., Lee, Y. und Engelke, D.R. (1996). A conserved RNA motif involved in divalent cation utilization by nuclear RNase P. *RNA* **2**, 1100-1109.
- Palenik, B. und Haselkorn, R. (1992). Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyll b-containing prokaryotes. *Nature* **355**, 205-267.
- Pan, T., Loria, A. und Zhong, K. (1995). Probing of tertiary interactions in RNA: 2'-hydroxyl-base contacts between the RNase P RNA and pre-tRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 12510-12514.
- Pannucci, J.A., Haas, E.S., Hall, T.A., Harris, J.K. und Brown, J.W. (1999). RNase P RNAs from some Archaea are catalytically active. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 7803-7808.
- Pascual, A. und Vioque, A. (1996). Cloning, purification and characterization of the protein subunit of ribonuclease P from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* **241**, 17-24.
- Pascual, A. und Vioque, A. (1999). Functional reconstitution of RNase P activity from a plastid RNA subunit and a cyanobacterial protein subunit. *FEBS Lett.* **442**, 7-10.

- Pascual A. und Vioque, A. (1999). Substrate binding and catalysis by ribonuclease P from cyanobacteria and *Escherichia coli* are affected differently by the 3' terminal CCA in tRNA precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 6672-6677.
- Peck-Miller, K.A. und Altman, S. (1991). Kinetics of the processing of the precursor to 4.5 S RNA, a naturally occurring substrate for RNase P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **221**, 1-5.
- Peitsch, M. C. (1995). Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology* **13**, 658-660.
- Perreault, J-P. und Altman, S. (1992). Important 2'-hydroxyl groups in model substrates for M1 RNA, the catalytic subunit of RNase P from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **226**, 399-409.
- Pfeiffer, T., Tekos, A., Warnecke, J.M., Drainas, D. und Engelke, D.R. (2000). Effects of phosphorothioate modifications on precursor tRNA processing by eukaryotic RNase P enzymes. *J. Mol. Biol.* **298**, 559-565.
- Picard, V., Ersdal-Badju, E., Lu, A. und Bock, C.S. (1994). A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using *Pfu* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2587-2591.
- Pitulle, C., Garcia-Paris, M., Zamudio, K.R. und Pace, N.R. (1998). Comparative structure analysis of vertebrate ribonuclease P RNA. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3333-3339.
- Pluk, H., van Eenennaam, H., Rutjes, S.A., Pruijn, G.J. und van Venrooij, W.J. (1999). hPop1: an autoantigenic protein subunit shared by the human RNase P and RNase MRP ribonucleoproteins. *EMBO J.* **15**, 5936-5948.
- Pomeranz Krummel, D.A. und Altman, S. (1999). Verification of phylogenetic predictions *in vivo* and the importance of the tetraloop motif in a catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11200-11205.
- Porath, J. (1992). Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* **3**, 263-281.
- Puranam, R.S. und Attardi, G. (2001). The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 548-561.
- Ramakrishnan, V. und White, S.W. (1992). The structure of ribosomal protein S5 reveals sites of interaction with 16S rRNA. *Nature* **358**, 768-771.
- Rasmussen, T.A. und Nolan, J.M. (2002). G350 of *Escherichia coli* RNase P RNA contributes to Mg²⁺ binding near the active site of the enzyme. *Gene* **294**, 177-185.
- Reich, C., Olsen, G.J., Pace, B. und Pace, N.R. (1988). Role of the protein moiety of ribonuclease P, a ribonucleoprotein enzyme. *Science* **239**, 178-181.
- Reilly, T.H. und Schmitt, M.E. (1995). The yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, RNase P/MRP ribonucleoprotein endoribonuclease family. *Mol. Biol. Rep.* **22**, 87-93.
- Reimer, G., Raska, I., Scheer, U. und Tan, E.M. (1988). Immunolocalization of 7-2-ribonucleoprotein in the granular component of the nucleolus. *Exp. Cell Res.* **176**, 117-128.
- Reith, M. und Munholland, J. (1995). Complete Nucleotide Sequence of the *Porphyra pupurea* Chloroplast Genome. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**, 333-335.
- Reith, M. und Munholland, J. (1995). A High-Resolution Gene Map of the Chloroplast Genome of the Red Alga *Porphyra purpurea*. *Plant Cell* **5**, 465-475.
- Rivera-Leon, R., Green, C.J. und Vold, B. (1995). High-Level Expression of Soluble Recombinant RNase P Protein from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 2564-2566.
- Robertson, H.D., Altman, S., Smith, J.D. (1972). Purification and properties of a specific *Escherichia coli* ribonuclease which cleaves a tyrosin transfer ribonuclein acid precursor. *J. Biol. Chem.* **247**, 5243-5251.
- Roby, P., Carbon, P., Westhof, E., Ehresmann, C., Ebel, J.P., Ehresmann, B. und Giege, R. (1987). Importance of conserved residues for the conformation of the T-loop in tRNAs. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **5**, 669-687.

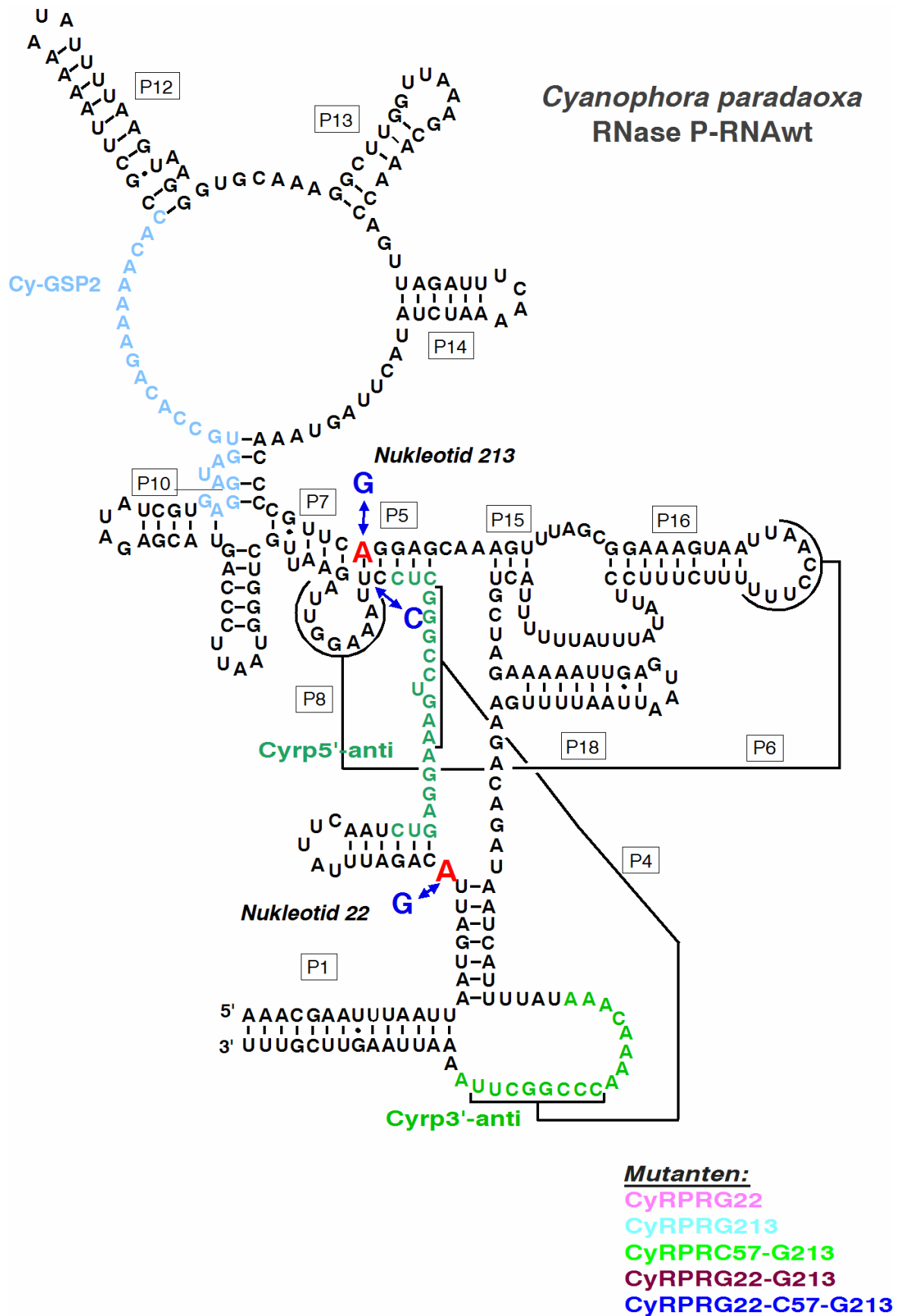
- Rossmannith, W., Tullo, A., Potuschak, T., Karwan, R. und Sbisà, E. (1995). Human mitochondrial tRNA processing. *J. Biol. Chem.* **270**, 12885-12981.
- Rossmannith, W. und Karwan, R.M. (1998). Characterization of human mitochondrial RNase P: Novel aspects in tRNA processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 234-241.
- Rossmannith, W. und Karwan, R.M. (1998). Impairment of tRNA processing by point mutations in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) associated with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.* **433**, 269-274.
- Rossmannith, W. und Potuschak, T. (2001). Difference between mitochondrial RNase P and nuclear RNase P. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8236-8237.
- Sägesser, R., Martinez, E., Tsagris, M. und Tabler, M. (1997). Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of cDNA expression library. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3816-3882.
- Salavati, R., Panigrahi, A.K. und Stuart, K.D. (2001). Mitochondrial ribonuclease P activity of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **115**, 109-117.
- Sambrook, J. und Russel, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed., CHS Press, Cold Spring Harbor NY.
- Schmitt, M.E. (1999). Molecular modeling of the three-dimensional architecture of the RNA component of yeast RNase MRP. *J. Mol. Biol.* **292**, 827-836.
- Schmitt, M.E., Bennett, J.L., Dairaghi, D.J. und Clayton, D.A. (1993). Secondary structure of RNase MRP RNA as predicted by phylogenetic comparison. *FASEB J.* **7**, 208-213.
- Schmitt, M.E. und Clayton, D.A. (1994). Characterization of a unique protein component of yeast RNase MRP: an RNA-binding protein with a zinc-cluster domain. *Genes Dev.* **8**, 2617-2628.
- Schmitz, M. und Tinoco, I. Jr. (2000). Solution structure and metal-ion binding of the P4 element from bacterial RNase P RNA. *RNA* **6**, 1212-1225.
- Schön, A. (1999). Ribonuclease P: the diversity of a ubiquitous RNA processing enzyme. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 391-406.
- Schön, A. (2000). RNase P from cyanobacteria and chloroplasts: A key to the understanding of ribozyme evolution? In: *Ribozymes: Biochemistry and Biotechnology*. Krupp, G. and Gaur, R. K. (eds). Eaton Publishing, Natick, MA., pp. 133-148.
- Schön, A., Fingerhut, C. und Hess, W.R. (2002). Conserved and variable domains within divergent RNase P RNA gene sequences of *Prochlorococcus* strains. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**, 1383-1389.
- Schön, A., Krupp, G., Gough, S., Berry-Lowe, S., Kannangara, C.G. und Söll, D. (1986). The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature* **322**, 281-284.
- Schwede T., Kopp J., Guex N. und Peitsch M.C. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3381-3385.
- Seidman, J.G. und McClain, W.H. (1975). Three steps in conversion of large precursor RNA into serine and proline transfer RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 1491-1495.
- SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S. und Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8496-8501.
- Shinozaki, K., Ohme, M., Tanaka, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubayashi, T., Zaita, N., Chungwongse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torozawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. und Sugiura, M. (1986). The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J.* **5**, 2043-2049.
- Shiraishi, H. und Shimura, Y. (1988). Functional domains of the RNA component of ribonuclease P revealed by chemical probing of mutant RNAs. *EMBO J.* **7**, 3817-3821.

- Shu, H.-H., Wise, C.A., Clark-Walker, G.D. und Martin, N.C. (1991). A gene required for RNase P activity in *Candida (Torloopsis) glabrata* mitochondria codes for a 227-nucleotide RNA with homology to bacterial RNase P RNA. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1662-1667.
- Siegel, R.W., Banta, A.B., Haas, E.S., Brown, J.W., und Pace N.R. (1996). *Mycoplasma fermentans* simplifies our view of the catalytic core of ribonuclease P RNA. *RNA* **2**, 452-462.
- Simanis, V. und Lane, D.P. (1985). An immunoaffinity purification procedure for SV40 large T antigen. *Virology* **144**, 88-100.
- Smith, D., Burgin, A.B., Haas, E.S. und Pace, N.R. (1992). Influence of metal ions on the ribonuclease P reaction. Distinguishing substrate binding from catalysis. *J. Biol. Chem.* **267**, 2429-2436.
- Smith, D. und Pace, N.R. (1993). Multiple magnesium ions in the ribonuclease P reaction mechanism. *Biochemistry*. **32**, 5273-5281.
- Spitzfaden, C., Nicholson, N., Jones, J.J., Guth, S., Lehr, R., Prescott, C.D., Hegg, L.A. und Eggleston, D.S. (2000). The structure of ribonuclease P protein from *Staphylococcus aureus* reveals a unique binding site for single-stranded RNA. *J. Mol. Biol.* **295**, 105-115.
- Sprinzel, M., Horn, C. Brown, M., Ioudovitch, A. und Steinberg, S. (1998). Compilation of tRNA und tRNA gene sequences. *Nucleic Acid Res.* **264**, 148-153.
- Stams, R., Niranjanakumari, S., Fierke, C.A. und Christianson, D.W. (1998). Ribonuclease P protein structure: evolutionary origins in the translational apparatus. *Science* **280**, 752-755.
- Stark, B., Kole, R., Bowman, E.J. und Altman, S. (1978). Ribonuclease P: An enzyme with an essential RNA component. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 3717-3721.
- Starnes, S.M., Lambert, D.H., Maxwell, E.S., Stevens, S.E., Porter, R.D. und Shively, J.M. (1985). Cotranscription of the large und small subunit genes of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in *Cyanophora paradoxa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**, 165-169.
- Stathopoulos, C., Kalpaxis, D.L. und Drainas, D. (1995). Partial purification and characterization of RNase P from *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* **228**, 976-980.
- Steebhorn, C., Steinberg, S., Hübel, E. und Sprinzi, M. (1995). Compilation of tRNA und tRNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **24**, 68-72.
- Steitz, T.A. und Steitz, J.A. (1993). A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 6498-6502.
- Stirewalt, V.L., Michalowski, C.B., Löffelhardt, W., Bohnert, H.J. und Bryant, D.A. (1995). Nucleotide Sequence of the Cyanelle Genome from *Cyanophora paradoxa*. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**, 327-332.
- Stolc, V. und Altman, S. (1997). Rpp1, an essential protein subunit of nuclear RNase P required for processing of precursor tRNA und 35S precursor rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**, 2926-2937.
- Stribinskis, V., Gao, G.-J., Sulo, P., Dang, Y.L. und Martin, N.C. (1996). Yeast mitochondrial RNase P RNA synthesis is altered in an RNase P protein subunit mutant: insight into the biogenesis of a mitochondrial RNA-processing enzyme. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3429-3436.
- Stribinskis, V., Gao, G.J., Ellis, S.R. und Martin, N.C. (2001). Rpm2, the protein subunit of mitochondrial RNase P in *Saccharomyces cerevisiae*, also has a role in the translation of mitochondrially encoded subunits of cytochrome c oxidase. *Genetics* **158**, 573-585.
- Stribinskis, V., Gao, G.J., Sulo, P., Ellis, S.R. und Martin, N.C. (2001). Rpm2p: separate domains promote tRNA und Rpm1r maturation in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **29**, 3631-3637.
- Sulo, P., Groom, K.R., Wise, C., Steffen, M. und Martin, N. (1995). Successful transformation of yeast mitochondria with RPM1: an approach for in vivo studies of mitochondrial RNase P RNA structure, function und biosynthesis. *Nucleic Acids Res.* **23**, 856-860.

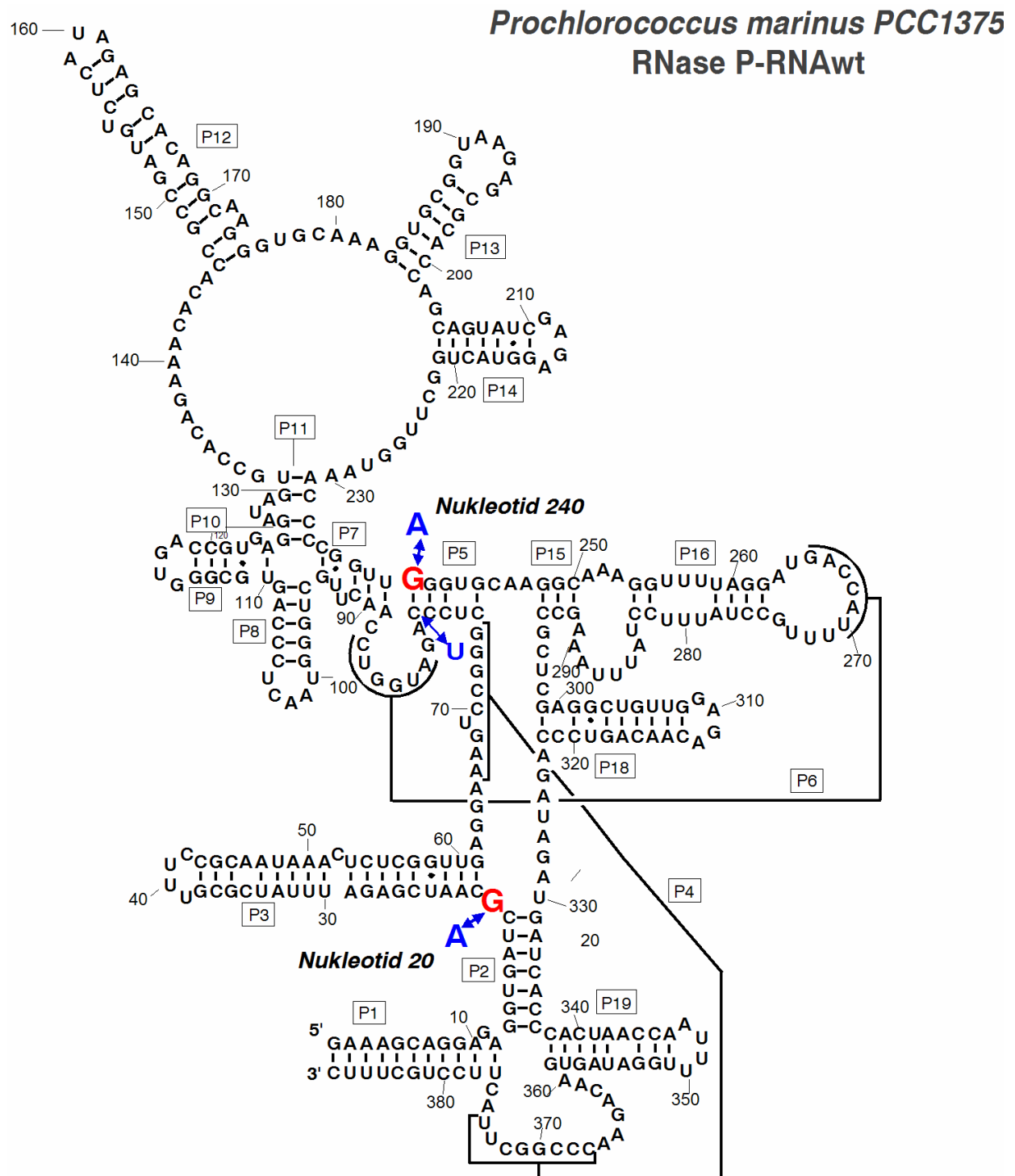
- Svärd, S.G. und Kirsebom, L.A. (1992). Several regions of a tRNA precursor determine the *Escherichia coli* RNase P cleavage site. *J. Mol. Biol.* **227**, 1019-1031.
- Svärd, S.G. und Kirsebom, L.A. (1993). Determinants of *Escherichia coli* RNase P cleavage site selection: a detailed *in vitro* and *in vivo* analysis. *Nucleic Acids Res.* **21**, 427-434.
- Svärd, S.G., Kagardt, U. und Kirsebom, L.A. (1996). Phylogenetic comparative mutational analysis of the base-pairing between RNase P RNA and its substrate. *RNA* **2**, 463-472.
- Szybalski, W. (1985). Universal restriction endonucleases: designing novel cleavage specificities by combining adapter oligodeoxynucleotide and enzyme moieties. *Gene* **40**, 169-173.
- Talbot, S.J. und Altman, S. (1994). Gel retardation analysis of the interaction between C5 protein and M1 RNA in the formation of the ribonuclease P holoenzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 1399-1405.
- Tallsjö, A., Kufel, J. und Kirsebom, L.A. (1996). Interaction between *Escherichia coli* RNase P RNA and the discriminator base results in slow product release. *RNA* **2**, 299-307.
- Tanner, M.A. und Cech, T.R. (1995). An important RNA tertiary interaction of group I and group II introns is implicated in gram-positive RNase P RNAs. *RNA* **1**, 349-350.
- Thomas, B.C., Li, X.Q. und Gegenheimer, P. (2000). Chloroplast ribonuclease P does not utilize the ribozyme-type pre-tRNA cleavage mechanism. *RNA* **6**, 545-553.
- Thomas, B.C., Chamberlain, J., Engelke, D.R. und Gegenheimer, P. (2000). Evidence for an RNA-based catalytic mechanism in eukaryotic nuclear ribonuclease P. *RNA* **6**, 554-562.
- Tobian, J.A., Drinkard, L. und Zasloff, M. (1985) tRNA nuclear transport: Defining the critical regions of human tRNA^{Met} by point mutagenesis. *Cell* **43**, 415-422.
- Tollervey, D. (1995). Genetic and biochemical analyses of yeast RNase MRP. *Mol. Biol. Rep.* **22**, 75-79.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.
- Tranguch, A.J. und Engelke, D.R. (1993). Comparative structural analysis of nuclear RNase P RNAs from yeast. *J. Biol. Chem.* **268**, 14045-14055.
- Tranguch, A.J., Kindelberger, D.W., Rohman, C.E., Lee, J.Y. und Engelke, D.R. (1994). Structure-sensitive RNA footprinting of yeast nuclear ribonuclease P. *Biochemistry* **33**, 1778-1778.
- True, H.L. und Celander, D.W. (1996). Ribonuclease P of *Tetrahymena thermophila*. *J. Biol. Chem.* **271**, 16559-16566.
- True, H.L. und Celander, D.W. (1998). Protein components contribute to active site architecture for eukaryotic ribonuclease P. *J. Biol. Chem.* **273**, 7193-7196.
- Tsai, H.Y., Masquida, B., Biswas, R., Westhof, E. und Gopalan, V. (2003). Molecular modeling of the three-dimensional structure of the bacterial RNase P holoenzyme. *J. Mol. Biol.* **325**, 661-675.
- Turmel, M., Otis, C. und Lemieux, C. (1999). The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Nephroselmis olivacea*: insights into the architecture of ancestral chloroplast genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10248-10253.
- Underbrink-Lyon, K., Miller, D.L., Ross, N.A., Fukuhara, H. und Martin, N.C. (1983). Characterization of a yeast mitochondrial locus necessary for tRNA biosynthesis. Deletion mapping and restriction mapping studies. *Mol. Gen. Genet.* **191**, 512-518.
- van den Hoek, C., Jahns, H.M. und Mann, D.G. (1993). Algen. Thieme Verlag, Stuttgart.
- van Eenennaam, H., Pruijn, G.J. und van Venrooij, W.J. (1999). hPop4: a new protein subunit of the human RNase MRP and RNase P ribonucleoprotein complexes. *Nucleic Acids Res.* **27**, 2465-2472.

- van Eenennaam, H., Lugtenberg, D., Vogelzangs, J.H.P., van Venrooij, W.J. und Pruijn, G.J.M. (2001). hPop5, a protein subunit of the human RNase MRP and RNase P endoribonucleases. *J. Biol. Chem.* **276**, 31635-31641.
- Vioque, A. (1992). Analysis of the gene encoding the RNA subunit of ribonuclease P from cyanobacteria. *Nucleic Acid Res.* **20**, 6331-6337.
- Vioque, A. (1997). The RNase P RNA from cyanobacteria: Short tandemly repeated repetitive sequences are present within the RNase P RNA gene in heterocyst-forming cyanobacteria. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3471-3477.
- Vioque, A., Arnez, J. und Altman, S. (1988). Protein-RNA interactions in the RNase P holoenzyme from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **202**, 835-848.
- Wakasugi, T., Tsudzuki, J., Ito, S., Shibata, M. und Sugiura, M. (1994). A physical map and clone bank of the black pine (*Pinus thunbergii*) chloroplast genome. *Plant Mol. Biol. Rep.* **12**, 227-241.
- Wang, M.J., Davis, N.W. und Gegenheimer, P. (1988). Novel mechanisms for maturation of chloroplast transfer RNA precursors. *EMBO J.* **7**, 1567-1574.
- Warnecke, J.M., Fürste, J.P., Hardt, W.D., Erdmann, V.A. und Hartmann, R.K. (1996). Ribonuclease P (RNase P) RNA is converted to a Cd²⁺-ribozyme by a single R_p-Phosphothioate modification in the precursor tRNA at the cleavage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 8924-8928.
- Warnecke, J.M., Held, R., Busch, S. und Hartmann, R.K. (1999). Role of metal ions in the hydrolysis reaction catalyzed by RNase P RNA from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* **290**, 433-445.
- Waterbury, J.B. und Stanier, R.Y. (1981). Isolation and growth of cyanobacteria from marien and hypersaline environments. In *The Prokaryotes*, vol.1, pp.247-256. Springer, Heidelberg.
- Waugh, D.S. und Pace, N.R. (1993). Gap-scan deletion analysis of *Bacillus subtilis* RNase P RNA. *FASEB J.* **7**, 188-195.
- Weiner, M.P., Costa, G.L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. und Bauer, J.C. (1994). Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* **151**, 119-123.
- Westhof, E. und Altman, S. (1994). Three-dimensional working model of M1 RNA, the catalytic subunit of ribonuclease P from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5133-5137.
- Westhof, E., Wesolowski, D. und Altman, S. (1996). Mapping in three dimensions of regions in a catalytic RNA protected from attack by an Fe(II)-EDTA reagent. *J. Mol. Biol.* **258**, 600-613.
- Wise, C.A. und Martin, N.C. (1991). Dramatic size variation of yeast mitochondrial RNAs suggests that RNase P RNAs can be quite small. *J. Biol. Chem.* **266**, 19154-19157.
- Woestenenk, E.A., Gongadze, G.M., Shcherbakov, D.V., Rak, A.V., Garber, M.B., Hard, T. und Berglund, H. (2002). The solution structure of ribosomal protein L18 from *Thermus thermophilus* reveals a conserved RNA-binding fold. *Biochem. J.* **363**, 553-561.
- Xiao, S., Scott, F., Fierke, C.A. und Engelke, D.R. (2002). Eukaryotic Ribonuclease P: A Plurality of Ribonucleoprotein Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 165-189.
- Yuan, Y., Tan, E. und Reddy, R. (1991). The 40-kilodalton to autoantigen associates with nucleotides 21 to 64 of human mitochondrial RNA processing/7-2 RNA in vitro. *Mol. Cell. Biochem.* **11**, 5266-5274.
- Yuan, Y. und Altman, S. (1995). Substrate recognition by human RNase P: identification of small, model substrates for the enzyme. *EMBO J.* **14**, 159-168.
- Zasloff, M. (1983). tRNA transport from a nucleus in a eukaryotic cell: carrier-mediated translocation process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 6436-6440.
- Ziehler, W.A., Yang, J., Kurochkin, A.V., Sandusky, P.O., Zuiderweg, E.R. und Engelke, D.R. (1998). Structural analysis of the P10/11-P12 RNA domain of yeast RNase P RNA and its interaction with magnesium. *Biochemistry* **37**, 3549-3557.

- Ziehler, W.A., Morris, J., Scott, F.H. Milikin, C. und Engelke, D.R. (2001). An essential protein-binding domain of nuclear RNase P RNA. *RNA* **7**, 565-575.
- Zimmerly, S., Gamulin, V., Burkard, U. und Söll, D. (1990). The RNA component of RNase P in Schizosaccharomyces species. *FEBS Lett.* **271**, 189-193.
- Zimmerly, S., Drainas, D., Sylvers, L.A. und Söll, D. (1993). Identification of a 100-kDa protein associated with nuclear ribonuclease P activity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* **217**, 501-507.
- Zuleeg, T., Hansen, A., Pfeiffer, T., Schubel, H., Kreutzer, R., Hartmann, R.K. und Limmer, S. (2001). Correlation between processing efficiency for ribonuclease P minimal substrates and conformation of the nucleotide -1 at the cleavage position. *Biochemistry* **40**, 3363-3369.



CyRPR-Sekundärstruktur mit Zusammenfassung aller zu RNA verwendeten Oligonukleotide und Mutanten. Die Zuordnung der Farben entspricht der für alle Graphen und Abbildungen verwendeten.

**Mutanten:**

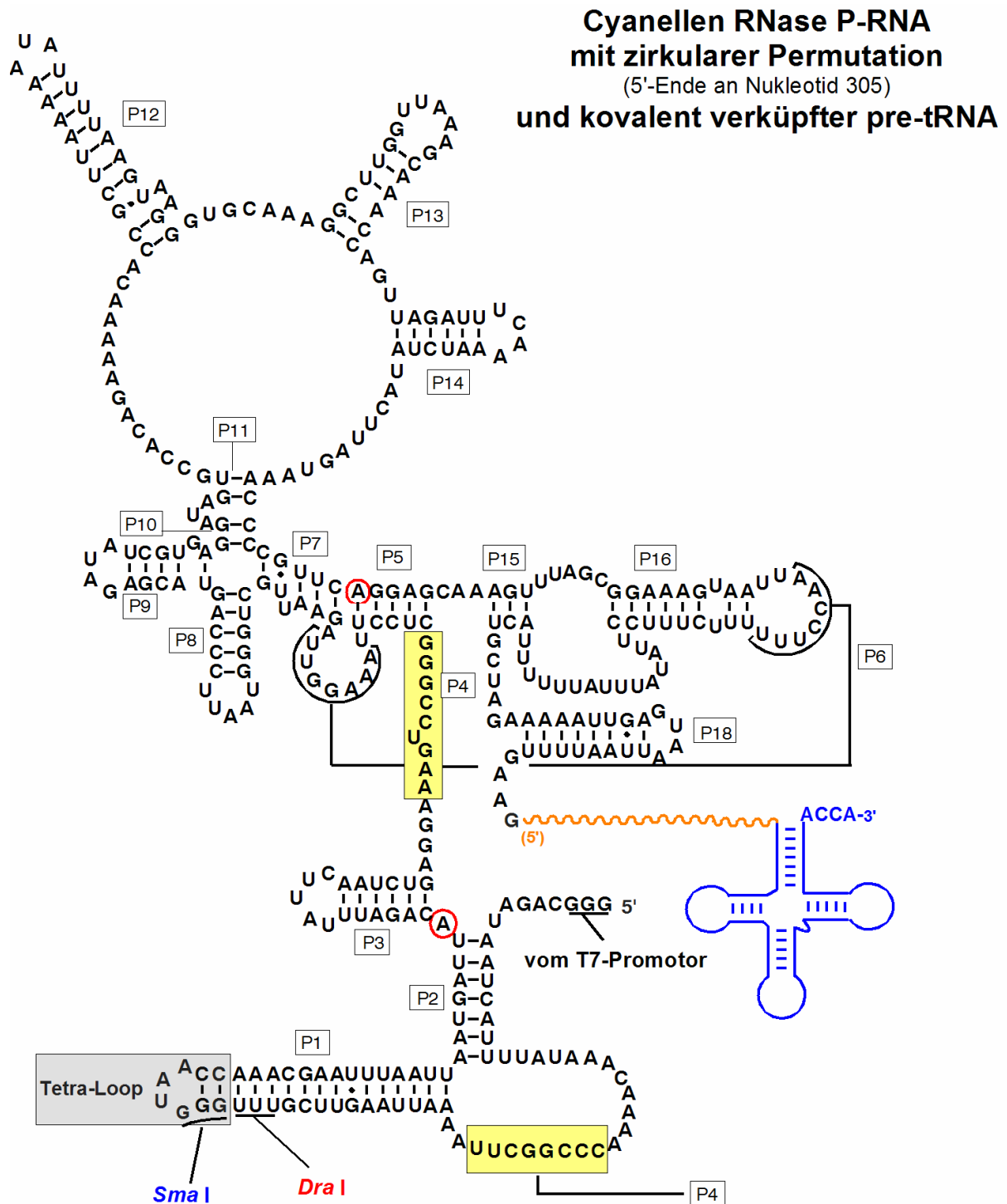
Pm1375RPRA20

Pm1375RPRU240

Pm1375RPRU79-A240

Pm1375RPRA20-A240

Pm1375RPRA20-U79-A240



Die in der Sekundärstruktur nur schematisch dargestellten pre-tRNA Flankenlängen sind in der Sequenz ausgeschrieben. Die Flanke ist in orange dargestellt, das 5'-Ende der reifen tRNA in blau. Alle Konstrukte verfügen über ein 3'-CCA-Ende.

	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Hsap	NKYPRMLGP	VTFVWKSQT	PGDPSESRQL	KIWLHITLTKQ	DILEEIKAAC	QCVEPLKSAV	CIADPLPTPS	QKKSQTEIPD	EITGKKRK	DDGENAKPIK
Mmus	NKYPRMLGP	VTFVWKSMT	PEDASEDRQL	KIWLHITLTKL	AVLEEIKTTC	HCSEPVKNSI	CMPDPLTTPA	PEDIQAGIAG	DITLSKRRK	DDGESVSRAK
Dmel	---	NRVRRRAA	QVW---	---	---	---	---	---	---	---
Spom	LP-----	THLWVCKRA	HMIN----	AGYAT	---	---	---	---	EKPT	---
Scer	LP-----	THVWNAKRS	HNMK----	NGYQMV	---	---	---	---	WAPT	QCCKLTHL
Atha	---	THVWNAKRF	TMTK----	WGFHLE	---	---	---	---	LGHG	---
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Hsap	KIIGDGTREP	CLPYWISPT	TGITISDLTM	EMNR--FRL	IIGLSSHILT	EAIKASVHT	VGEDTEETPH	RWVIETCKKP	DSVSLHCRQE	ATFELLGGIT
Mmus	KTIGDGTREA	CQPRSWRSP	TGITVSDLTM	EMNR--FRL	IIGLSHCILT	SALRAAPVHT	GEEDAETPH	HWWTDTCRSS	DGRSLHCRQE	AVFELLGGIS
Dmel	---	STTT	ATSTSRLG--	DLFRP--PT	DIL---	YSS	---	TAARE	FATK---	RQLLVNVQ--
Spom	---	YPT	HRAAFRK--	DAAAFMSY	EPL---FCI	SGEY	---	EELKEK	FGNSFANGLP	PVFLMSSR
Scer	---	SDGAL	CMDSYIG--	TIIVVKDKN	DSEGDFLKSI	IIGKIT	---	AERANLRK	YREGQVLFQG	LIYSFNEENG
Atha	---	GSRIV	LK-QSRQ--	GVLVHDASY	HIA---VQL	ESGE	---	AGIHT	YS	---
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
Hsap	SPAELAGTI	LGLTVGPRI	NLPQKSKAL	PNPEKQDNE	KVRQQLLEGV	PVECTHSFI	NODICKSVTE	NKISDQDLNR	MSELLVPGS	QLILGPHESK
Mmus	SPAELAGTI	LGLTVRPRV	NLPPQRSRAL	PDPERYQANE	RVQQLLEGV	PVACAHSFI	DQDICRSVTE	NKLLDQDLNR	MSELLVPGS	QLDLGARESK
Dmel	---	---	---	QSQ---	---	---	---	---	---	---
Spom	LQWNNTE--	---	DKK	QTP----	VKNPTEC--	---	VQLVIRLH	PSAFLO--	ANL	NYLSGIAVLD
Scer	IIRLHSIYT	---	QVFNI	LLOHKEKLTV	QDCRYSLASV	TLKGAKALES	LASCLRSTEV	SKSPEQPKMV	SMITDHNALP	QCTPAFEAI
Atha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
Hsap	IPILLIQPG	KVTGEDRLGW	GSGWDVLEPK	GWGMFWLIPF	IYRGVAVGGL	K-SAVHSQY	KRSPVPGDF	PDPCAGMLFA	EQAKN-LLE	KYRRRPPAKR
Mmus	IPILLIQPG	KVTGEDRLGW	GSGWDVLEPK	GWGMFWLIPF	IYRGAVGGL	K-BATVHSQY	RRSPNIPGDF	PDRCRAGVLA	EDQAK-LLE	KYRRRPPAKR
Dmel	---	DTSEGR--	---	RFAVAFY	HC---ATLP	---	---	---	---	---
Spom	DDVELDEAG-	-KVVQSIISNY	SS--ACLPM	GASISVKALV	NTR--CDKNL	S-SRGEKSL	DSABNSLPAS	ANQYSTHFRY	WERQE--TP	SFAVFENKNR
Scer	PKKLNDQRK	TVNSDDILSL	HEN----	YDQ	DEINAVFNEL	CDPES	HTQSY	NNQNTLKEIS	ARRYKLLTAT	PNSINKTTVP
Atha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
Hsap	PNYVKLGTLA	PFCCPWEQLT	QDWESRVQAY	EPPSVASSPN	GKESDLRRSE	VPCAPMPKKT	HQPSDEVGTS	IEHPREAEV	MDAGQESAG	PERITDQEAS
Mmus	PNYVKLGTLA	PFCCPWEQLT	RDWESRVHAQ	EAAIASMPG	AQETDPRR--	LGVPVCPKEI	COLSNEAGIA	ENQPKKPE--	-VTGQAOQEG	TKVAMEWNAS
Dmel	---	---	---	---	SATYID	DDE-VPDP--	---	EASCSSTAS	SKEMPKKR--	---
Spom	HTHEKKSSEK	EVIPVYITYR	KEWNG----	---	LTVILPW	DYAKFVWR--	---	KMM	YQKGIRFGGL	ENLHQIAF--
Scer	-DWIVVLPWF	WLLPLWHLLN	RIPRMHYHGL	RQFQQIQYEN	KQLYFPDDYP	FTQLGYIENS	FYKKEASKTK	WDRKPMGKRI	NFKIKIDHIN	TKLPAYSGBI
Atha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
Hsap	ENHVAATGSH	CVLRSRKLK	KQLSAWCGPS	SEDSRGGRRR	PGRGQQLTR	EACLSILGHF	PRALVWVSL	LLSKSPPEPH	TMICVPAKED	FLQLHEDWHY
Mmus	EAHMATTGSQ	CVVRSRKLK	KQLSSWCGPS	SE----IRRA	PCRAQQLTS	NVCLSILNDF	PRALVWVSL	LLRKSPPEPH	TMICVPSKED	LHRLSQDQCY
Dmel	---	E-Q	EELA---IK	NSIN--E---	---	---	---	---	---	---
Spom	---	TISGQ	CEEE-ERKKR	NEDS-WK---	---	RRP	PAKRVNYQKF	GDNFSEIG-N	PFCCDWVYLN	EMVKASRD--
Scer	GDFFSDDWRF	QILLRNGIDY	LQRNDKTLEL	MD-----	SK	KTGFNAQGV	RDINCVDNVL	EFCKDYEAKT	KAMSLIIEEN	--IPVALCKN
Atha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
Hsap	CGPQEKHSD	PFRSKIKQK	EKKKREKRQK	PGRASSDGPA	GEEFVAGQEA	TLGLWSGEL	PR----VTL	HCSRTLLEFV	IQDEFMAVG	CEALGFVSL
Mmus	HGPWESRHS	PFKSLIKKEK	EKKKREKRQD	GEHRASEGQA	AGPPIAGQEA	LTQGLWSGEL	PG----LTS	HCSRLLEFV	IQDEFMAAG	CEALGFVSM
Dmel	LGEAKT-ELT	ALKLRLNAA	G-----	---	TDEMVO-	---	---	---	---	---
Spom	LVQRG-LOD	RARIYCSDD	E-----	---	LS	KWKTIIYKEN	---	---	---	---
Scer	ISVNS-SFSL	TFFPROCIIV	SCTLLERGH	KD-NARIYQV	PEKDLHHLWQ	IAKGVYRPN	RKDHDLKIPL	PEVHDLIIFT	ISSTYHLNCC	NMGIGFIDH
Atha	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	1010	1020	1030							
Hsap	TGLDMLSSQ	PAAQRGLVLL	RPPASLQYRF	ARIAIEV						
Mmus	TGLEMLSSQ	SAAMRGLVLL	RPPTSLOQYRF	ARITIEV						
Dmel	RKFLAEAHND	SSLKE--LGL	HPSANLHLTN	ADDQ--						
Spom	KTIKNEKSGY	CIIRN--VGC	SVPRLAOWKF	NQSH--						
Scer	HAAIRQFTRY	VLIRN--VGT	NTYRLGEWSK	ISV---						
Atha	---	---	---	---						

Alignment der ersten 500 Aminosäuren der pop1p-Untereinheiten von Mensch (Hsap), Maus (Mmus), *Drosophila melanogaster* (Dmel), *Saccharomyces pombe* (Spom), *Saccharomyces cerevisiae* (Scer), *Arabidopsis thaliana* (Atha). Rot unterlegt sind konservierte Aminosäuren, grau schattierte Aminosäuren haben konservierten chemischen Charakter. Auffällig ist, daß pop1p in *Drosophila* fast keine Homologie zu den übrigen Eukaryoten zeigt (Schön; nicht veröffentlicht).

Abkürzungen

α -ATPOP1p-AB	anti-ATPOP1p-Antikörper
α -SynPP-AB	anti-SynPP-Antikörper
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
AcOH	Essigsäure
A_x	Absorption bei Wellenlänge x nm
ADH	Alkoholdehydrogenase
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Albumin aus Rinderserum
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
C5	<i>E. coli</i> RNase P-Protein
Ci	Curie
CIP	alkalische Phosphatase
cpm	counts per minute
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetan-3,2'-(5'-Chloro) Tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] Decan}-4-yl Phenylphosphat
Cy	Cyanelle
D	Dalton
d	Tag(e)
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DMP	Dimethylpimelimidat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
Ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (ethylene diamine tetraacetic acid)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Femto-, 10 ⁻¹⁵
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
G	Guanin
Glau	<i>Glauocystis nostochinearum</i>
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	1-Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
I	Inosin
Δ I	herausgespleißtes Intron (= ohne Intron)
kb	Kilobase(n)
kbp	Kilobasenpaar(e)
kd	Kilodalton
l	Liter
lx	Lux
M	molar (mol/l)
M1	<i>E. coli</i> RNase P-RNA
MA	Miliampere
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute(n)

ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MRNA	mesenger-RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Nano-, 10 ⁻⁹
nm	Wellenlänge in Nanometer
nt	Nukleotid(e)
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
OAc	Acetat
³² p	radioaktives Phosphorisotop
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction; Polymerase Kettenreaktion
<i>pfu</i>	Plaque forming unit
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Pm	Prochlorococcus marinus
PMSF	Phenylmethansulfonylchlorid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
PNK	Polynukleotidkinase
PP	RNase P-Protein
PP	Polypropylen
pre-tRNA	tRNA-Vorläufer
RNase	Ribonuklease
PS	Polystyrol
PVP	Polyvinylpyrrolidin
RT	Raumtemperatur
RPP	RNase P-Holoenzym
RPR	RNase P-RNA
ss	einzelsträngig
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodiumdodecylsulfate)
Syn	<i>Synechocystis</i> PCC6803
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
U	Uracil
UV	Ultraviolett
V	Volt
% (v/v)	Volumenprozente (volume per volume)
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vol.	Volumen
W	Watt
% (w/v)	Gewichtsprozente (weight per volume)
X-Gal	5'-Brom-4'-Chlor-3'-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid

- 1-1: Minimale Konsensusstruktur der eubakteriellen RNase P-RNA (Seite 3)
 - 1-2: Schematische Sekundärstruktur-Darstellung von Typ A und Typ B RNase P-RNAs (4)
 - 1-3: Kristallstruktur der Domäne I aus *B. subtilis* (5)
 - 1-4: *E. coli* und *B. subtilis* RNase P-RNA-Raumstrukturmodelle (6)
 - 1-5: Wechselwirkung der 3'-CCA-pre-tRNA-Flanke mit bakterieller RNase P-RNA (8)
 - 1-6: Synthetische Minimalsubstrate für *E. coli* RNase P (9)
 - 1-7: Mechanismus der RNase P-Reaktion nach Guerrier-Takada *et al.* (1986) (10)
 - 1-8: Struktur des RNase P-Proteins in *Bacillus subtilis* (13)
 - 1-9: Wechselwirkung der 5'-pre-tRNA-Flanke mit dem RNase P-Protein (14)
 - 1-10: Modell des *E. coli* RNase P-Holoenzym (14)
 - 1-11: Ausgewählte RNase P-Holoenzyme aus allen drei Königreichen und Zellkompartimenten (16)
 - 1-12: Zusammensetzung der nukleären RNase P aus Hefe und Mensch (18)
 - 1-13: Interaktionsmodell für das nukleäre *S. cerevisiae* RNase P Holoenzym (20)
 - 1-14: RNase P-RNA Sekundärstrukturen der Archaea *M. thermoautotrophicus* und *M. jannaschii* (21)
 - 1-15: *C. paradoxa* Zellen und ihre Cyanellen im Durch- und Fluoreszenzlicht (25)
 - 1-16: Phylogenetische Stellung von *Cyanophora paradoxa* (26)
 - 1-17: Sekundärstruktur der *C. paradoxa* RNase P-RNA (27)
 - 3-1 Schematischer Aufbau des Kapillarblots nach *Southern* (43)
 - 3-2 Schematischer Aufbau des Semi-Dry-*Western*-Blots (69)
 - 3-3 Flussschema zur Ermittlung der optimalen Expressionsbedingungen in *E. coli* (79)
 - 3-4 Zur Selektion auf positive Klone verwendete Zusätze (87)
 - 3-5 pBluescript-Exzision mit Hilfe des ExAssist-Helferphagen (101)
 - 4-1: Vergleich der Expression von SynPP in LB- und Minimalmedium (103)
 - 4-2: Aufreinigung von SynPP durch Ni²⁺-Agarose und DEAE-Chromatographie (104)
 - 4-3: Stöchiometrie von SynPP und SynRPR im Holoenzym (105)
 - 4-4: Expressionsbedingungen für Pm9511PP (106)
 - 4-5: Ausbeute an Pm9511PP (107)
 - 4-6: Aufreinigung von rekombinantem Pm9511PP (107)
 - 4-7: Test auf Spezifität von α -SynPP-AB (109)
 - 4-8: Darstellung der Plasmide zur T7-Transkription von PmRPR-Mutanten (110)
 - 4-9: A) Ribozymtest von PmRPR und Mutanten (111) B) Quantifizierung (111)
 - 4-10: Abhängigkeit der Ribozym-Aktivität mutierter Pm1375RPRs von der Mg²⁺-Konzentration (112)
 - 4-11: Zur T7-Transkription eingesetzte Plasmide (114)
 - 4-12: Rekonstitution katalytisch aktiver Holoenzyme aus CyRPR und SynPP (116)
 - 4-13: Vergleich der Prozessierungsaktivität der heterolog rekonstituierten Holoenzyme (117)
 - 4-14: Rekonstitution katalytisch aktiver Holoenzyme aus CyRPR und Pm9511PP (118/119)
 - 4-15: Quantifizierung (119)
 - 4-16: Sekundärstruktur der RNase P-RNA aus *G. nostochinearum* (120)
 - 4-17: Zusammenstellung der für GlauRPR getesteten Ribozym-Bedingungen (121)
 - 4-18: Rekonstitution von chimärem Holoenzym aus GlauRPR und SynPP (122)
 - 4-19: Prozessierung von pre-tRNA^{Arg} mit PmRPR/Pm9511PP Holoenzym (123)
 - 4-20: Prozessierung von pre-tRNA^{Arg} mit CyRPR/Pm9511PP Holoenzym (123)
 - 4-21: Prozessierung von pre-tRNA^{Arg} mit CyRPR/SynPP-Holoenzym (124)
 - 4-22: Immunoblot von RNase P-Proteinen (125)
-

- 4-23 Immunopräzipitation von RNase P-Aktivität aus *Synechocystis* S100-Extrakt mit anti-SynPP-Antikörpern (127)
 - 4-24 Immunopräzipitation der *C. paradoxa* Cyanellen-RNase P-Aktivität mit anti-SynPP-Antikörpern (128)
 - 4-25 Zirkular permutierte *C. paradoxa* RNase P-RNA. (130)
 - 4-26 Klonierung von pCyP305Tetra (131)
 - 4-27 Herstellung der pre-tRNAs-Inserts (132)
 - 4-28 Zur Fusion mit pCyP305Tetra vorbereitete pre-tRNA-Gene (132)
 - 4-29 Konstruktion der Plasmide pT7CyP305Tetra-pre-tRNA (133)
 - 4-30 Zusammenstellung der für cpCyRPRs getesteten Ribozym-Bedingungen (134)
 - 4-31 Zusammenstellung der Rekonstitutionsbedingungen für cpCyP305Tetra-pre-tRNA und SynPP (135)
 - 4-32 Prozessierungsaktivität von cpCyRPR-pre-tRNA/SynPP (136)
 - 4-33 A/B) Einfluss reifer tRNAs auf die Prozessierungseffizienz (137/138)
 - 4-34 *C. paradoxa* Cyanellen S100-Extrakt nach Ultrazentrifugation im Glyceringradienten (10–30 %) (139)
 - 4-35 Fraktionierung der Standardproteine im Glyceringradienten (10-30 %) (140)
 - 4-36 Fraktionierung von Cyanellen-S100-Extrakt im Glyceringradienten (10-30 %) (140)
 - 4-37 RNase P-Aktivität der Cyanellen-Gradientenfraktionen 1-20 (141)
 - 4-38 A) *In vitro*-Amplifikation von RNase P-RNA-Fragmenten B) *Southern*-Blot Hybridisierung mit der Sonde CyGSP2 (142)
 - 4-39 *Northern*-Blot Hybridisierung mit der Sonde Cprp5'-anti (143)
 - 4-40 SDS-PAGE-Analyse der Gradientenfraktionen 11-20 (144)
 - 4-41 *Western*-Blot mit anti-SynPP-Antikörpern (145)
 - 4-42 Immunopräzipitation aus den prozessierungsaktiven Fraktionen 15 und 16 (145)
 - 4-43 Größenabschätzung des *C. paradoxa* Cyanellen RNase P-Holoenzym (146)
 - 4-44 mRNA-Anreicherung aus Gesamt-RNA durch Chromatographie an Oligo(dT)-Cellulose (147)
 - 4-45 Flussdiagramm zur cDNA-Synthese (148)
 - 4-46 Schematische Darstellung des λ ZAPII-Vektors (149)
 - 4-47 Titerbestimmung und Leervektorenanteil der Phagensuspensionen A₁, B₁ und C₁ (150)
 - 4-48 Titerbestimmung und Leervektorenanteil der Phagensuspensionen A₂, B₂ und C₂(150)
 - 4-49 Nitrocellulose-Membranen mit Phagen-Klonen nach Inkubation mit anti-SynPP-Antikörpern (151)
 - 4-50 Test zur Bindung von [³²P]markierter-CyRPR an Phagen-Plaques (152)
 - 4-51 *Screening* einer *C. paradoxa* cDNA-Bibliothek in λ -Uni-ZAP XR mit durch CyRPR-Bindung (153)
 - 4-52 *Eco* RI / *Xho* I-Restriktionsverdau der isolierten λ -Klone (154)
 - 4-53 Aminosäurealignment von pCycDNA2 (154)
 - 4-54 Aminosäurealignment von pCycDNA5 (155)
 - 4-55 ATpop1-cDNA Sequenz (156)
 - 4-56 *Arabidopsis* Gesamt-RNA-Präparation (157)
 - 4-57 *Northern*-Blot Hybridisierung mit der Sonde POP1GSP2 (157)
 - 4-58 Nachweis von ATPOP1p-homologen Proteinen durch Immunoblot (159)
 - 4-59 Heterologe Immunopräzipitation der Weizenkeim RNase P-Aktivität (160)
 - 5-1 Strukturvergleich der P15/16-Helices verschiedener cyanobakterieller RNase P-RNAs (163)
 - 5-2 Modellierter 3D-Struktur des *Synechocystis* PCC6803 RNase P-Proteins (164)
 - 5-3 Sequenzvergleich cyanobakterieller RNase P-Proteine (165)
 - 5-4 Strukturvergleich des *B. subtilis* RNase P-Proteins mit topologisch verwandten Proteinen (166)
 - 5-5 Modellierter 3D-Struktur des *left-handed* $\beta\alpha\beta$ -Strukturmotivs des *P. marinus* PCC9511 RNase P-Proteins (167)
 - 5-6 Evolution der *rnpB*-codierenden Region in den Plastomen nicht-grüner Algen (168)
-

Lebenslauf

Persönliche Daten

- Name: Christian Günther Heubeck
- Geburtsdatum: 25. September 1973
- Geburtsort: Würzburg
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

- 9/1980-7/1984 Grundscheule Scheinfeld, Bayern
- 9/1984-5/1993 Gymnasium Scheinfeld, Bayern
- 7/1993 Allgemeine Hochschulreife

Akademische Ausbildung

- 10/1993-7/1999 Studium der Chemie (Diplom) an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 11/1995 Diplom-Vorprüfung
- 8/1998 Diplom-Prüfung
- 8/1998-7/1999 Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, unter Anleitung von PD Dr. Astrid Schön mit dem Thema "Überexpression, Isolierung und funktionelle Charakterisierung eines cyanobakteriellen RNase P-Proteins"
- seit 9/1999 Anfertigung der Dissertation am Institut für Biochemie, Bayerische-Julius-Maximilians-Universität Würzburg, unter Anleitung von PD Dr. Astrid Schön mit dem Thema "Zusammensetzung eukaryotischer RNase P aus pflanzlichen Zellkernen und Plastiden"

Die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse waren Gegenstand von acht Postern und einer Veröffentlichung. Zwei weitere Veröffentlichungen sind in Vorbereitung.

1999 Mai: Fourth Annual Meeting of the RNA Society, Madison, Wisconsin, USA.

2000 April: 18.tRNA Workshop, Cambridge, UK.

2001 April: 52. Mosbacher Kolloquium, Mosbach.

Mai: Sixth Annual Meeting of the RNA Society, Banff, Alberta, Canada.

September: Jahrestagung der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie e.V. (GBM), Bochum.

2002 Juli: Workshop der Studiengruppe "RNA-Struktur, Funktion, Evolution, Applikation" der GBM, Blaubeuren.

August: EMBO-Workshop "Ribozymes und RNA catalysis", Dundee, UK.

2003 Oktober: 20.tRNA Workshop, Banz.

Veröffentlichung

Heubeck, C. and Schön, A. (2001) Cyanelle RNase P: Isolation and studies on function and structure of an organellar ribonucleoprotein enzyme. *Meth. Enzymol.* **342**, 118-134.

Heubeck, C. and Schön, A. "Functional and immunological relationship between plant and vertebrate rp". *In Vorbereitung*