Beteiligung des nukleär kodierten Mrs2 Proteins an der Katalyse des mitochondrialen Gruppe II Ribozyms aI5γ aus *Saccharomyces cerevisiae*

Vorgelegt von
Diplom Ingenieurin (FH)
Karola Lehmann
aus Berlin

Von der Fakultät III für Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung der akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. L. W. Kroh
Erster Berichter: Prof. Dr. U. Stahl
Zweiter Berichter: Prof. Dr. K. Wolf (RWTH Aachen)

Tag der Wissenschaftlichen Aussprache: 13.02.04

Berlin 2004
D 83

Hiermit bedanke ich mich bei allen, die mich in meiner Arbeit unterstützt haben.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Ulf Stahl, dem Leiter der Abteilung Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Berlin für die Möglichkeit, meine Promotion in seinem Institut anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Klaus Wolf danke ich für die Bereitschaft die Arbeit zu begutachten.

Bei Herrn Dr. Udo Schmidt bedanke ich mich besonders herzlich für die wissenschaftliche Betreuung, sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie die vielen schönen Arbeitsstunden in seiner Arbeitsgruppe.

Oliver Goldenberg und Ulrike Mittmann möchte für ihre Hilfe im Labor danken, und dass sie den Mut gefunden haben, ihre Diplomarbeit bei mir anzufertigen.

Bei Doris Rindermann und Carolina Vilches bedanke ich mich für angenehme Zusammenarbeit und bei allen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie und Genetik für die wertvollen Anregungen und die freundliche Atmosphäre.

Für ihre Geduld möchte ich mich bei den Lektoren Angelika Brückmann, Claudia Güldner, Karin Marbach, Bianka Prinz, Anja Kühn und Maren Henneken bedanken.

Dem Evangelischen Studienwerk Villigst e.V. danke ich für die finanzielle Unterstützung und die äußerst informativen Treffen.

Nicht zuletzt danke ich auch meiner Familie und meinen Freunden, die mir immer ein offenes Ohr und viel Geduld geschenkt haben.

Ein Problem zeigt sich des Angriffs wert,
wenn es sich dagegen wehrt.

Piet Hein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis IV
Häufig verwendete Abkürzungen für Gene und deren kodierte Proteine V
Abbildungsverzeichnis VI
Tabellenverzeichnis VI

1 Theoretischer Teil 1
1.1 Einleitung 1
1.2 Gruppe I Introns 2
1.2.1 Gruppe I Intron kodierte Proteine 3
1.2.2 Nukleär kodierte Spleißproteine von Gruppe I Introns 6
1.3 Gruppe II Introns 15
1.3.1 Gruppe II Intron kodierte Proteine 16
1.3.2 Nukleär kodierte Spleißproteine von Gruppe II Introns 22
1.4 Zusammenfassung und Ausblick 31

2 Problemstellung 33
2.1 Gruppe II Introns und ihre Spleißfaktoren in *S. cerevisiae* 33
2.2 Das Mrs2 Protein 34
2.2.1 Putative Domänen der RNA-Bindung im Mrs2p 38
2.3 Zielsetzung 40

3 Material und Methoden 41
3.1 Stämme 41
3.2 Plasmide 42
3.2.1 pRS416 42
3.2.2 pRS426 42
3.2.3 pRSET A 42
3.2.4 pGEX-2T 42
3.2.5 pJD20 42
3.2.6 pSUB1-1 43
3.3 Verwendete Chemikalien und Biochemikalien 43
3.3.1 Oligonukleotide 43
3.4 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken 44
3.5 Nährmedien, Kulturbedingungen und Stammhaltung 45
3.5.1 *E. coli* 45
3.5.2 *S. cerevisiae* 45
3.5.3 Cytoduktion 46
3.5.4 Atmungstest 46
3.6 DNA-Isolierungen 47
3.6.1 Plasmid-DNA-Schnellaufarbeitung aus *E. coli* (MiniPräp) 47
3.6.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli* (Nucleobond) 47

3.6.3 DNA-Einzelstrang-Isolation ... 47
3.6.4 Plasmid-DNA-Schnellaufarbeitung aus *S. cerevisiae* ... 48
3.7 *In vitro* DNA Techniken ... 48
3.7.1 Ethanol-Präzipitation ... 48
3.7.2 Restriktionen ... 48
3.7.3 Ligationen ... 49
3.7.4 Alkalische Phosphatase Behandlung ... 49
3.7.5 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden ... 49
3.7.6 Annealing von Oligonukleotiden ... 49
3.7.7 *In vitro* Mutagenese ... 49
3.7.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Genomed) ... 50
3.7.9 Polymerase-Ketten-Reaktion ... 50
3.7.10 Reinigung von PCR-Produkten (Genomed) ... 51
3.7.11 Einzelstrang-Isolierung aus PCR amplifizierter DNA ... 51
3.7.12 DNA-Sequenzierung (Pharmacia) ... 51
3.7.13 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren ... 52
3.8 Gelelektrophorese ... 52
3.8.1 DNA-Agarosegele ... 52
3.8.2 DNA-Polyacrylamidgele ... 52
3.8.3 Sequenzgele ... 53
3.9 Transformationen ... 53
3.9.1 *E. coli*-Transformation nach der Kationen-Methode ... 53
3.9.2 *S. cerevisiae*-Transformation nach der Kationen-Methode ... 53
3.10 RNA-Techniken ... 54
3.10.1 RNA-Isolation ... 54
3.10.2 Formaldehyd-Gele ... 54
3.10.3 Denaturierende Polyacrylamidgele ... 55
3.10.4 Northern Blot und Hybridisierung ... 55
3.10.5 Rehybridisierung von Filtern ... 55
3.10.6 *In vitro* Transkription ... 55
3.10.7 Reinigung von *in vitro* Transkripten ... 56
3.10.8 RT-PCR ... 56
3.11 Protein-Methoden ... 57
3.11.1 Proteinexpression in *E. coli* Bl21 DE3 mit pRSET A Konstrukten ... 57
3.11.2 Proteinexpression in *E. coli* NM522 mit pGEX-2T Konstrukten ... 57
3.11.3 His-Tag-Affinitätschromatographie ... 58
3.11.4 GST-Affinitätschromatographie ... 58
3.11.5 TCA-Fällung ... 58
3.11.6 Dialyse ... 59
3.11.7 Gelfiltration ... 59
3.11.8 SDS-Proteingel ... 59
3.11.9 Coomassie-Färbung ... 59
3.11.10 Proteinbestimmung nach Breadford ... 60

3.12 Spezielle Methoden 60
3.12.1 Mitochondrienisolation aus *S. cerevisiae* 60
3.12.2 Magnesiumbestimmung 61
3.12.3 Gel-Shift-Experimente für Transkripte des Introns aI5γ 61

4 Ergebnisse 63
4.1 Genetische Analyse funktioneller Strukturelemente des Mrs2p *in vivo* 63
4.1.1 Erstellung eines *in vivo* Spleißsystems 63
4.1.2 Auswirkungen von Deletionen im *MRS2* Gen auf den Atmungs- und Spleißphänotyp . 65
4.1.3 Mutagenese der hydrophilen Domäne 68
4.1.4 Mutagenese der Suppressor-Domäne 71
4.1.5 Bestimmung der Magnesiumkonzentration in den Mitochondrien 73
4.2 Nachweis einer RNA/Protein Interaktion *in vitro* 75
4.2.1 Überexpression des gesamten Mrs2p 75
4.2.2 Überexpression von Teilbereichen des Mrs2p 76
4.2.3 Bereitstellung der RNA 78
4.2.4 Gelretardierung der verschiedenen RNA Untereinheiten mit His-getaggten Peptiden ... 80
4.2.5 Überexpression von GST-Fusionsproteinen 81
4.2.6 Gelretardierung mit GST-getaggten Proteinen 82
4.2.7 Analyse von mutierten Peptiden 85

5 Diskussion 90
5.1 Die Spleißfunktion des Mrs2 Proteins ist nicht auf seine Funktion in der Magnesiumhomeostase beschränkt 90
5.2 Unterschiedliche Teilbereiche des Mrs2 Proteins sind für die Spleißfunktion von Bedeutung 93
5.2.1 Die hydrophile Domäne des Mrs2 Proteins 94
5.2.2 Die Suppressor-Domäne des Mrs2 Proteins 96
5.3 Potentielle Wirkungsweise des Mrs2p 99

6 Zusammenfassung 102

7 Literaturverzeichnis 103

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
aI5γ	Gruppe II Intron (ohne ORF) aus dem Gen *COXI*
Amp^r	Ampicillinresistenz
ARS	autonom replizierende Sequenzen
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	„bovine serum albumine“ (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CEN	Centromerregion aus nukleärer Hefe-DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EBS	Exon-Bindestelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
FOA	5-Fluororotsäure
G	Guanin
Hepes	(Hydroxyethyl)-piperazin-ethansulfonsäure
IBS	Intron-Bindestelle
IGS	„internal guide sequence”
Ip	Isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
LTR	„long terminal repeat“
M	Molar
mit-	mitochondriale Punktmutation
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
mtDNA	mitochondriale DNA
nt	Nukleotide
ORF	„open reading frame“ (offener Leserahı
Ori	Replikationsursprung
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymera Ketten-Reaktion)
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
S	Svedberg-Einheit
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	„small nuclear RNA“
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Unit
U	Uracil
U/min	Umdrehungen pro Minute
UMP	Uridinmonophosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactop
ρ°	ohne mtDNA

Häufig verwendete Abkürzungen für Gene und deren kodierte Proteine

ADE2	Phosphoribosylaminoimidazol Carboxylase
aaRS	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
COB	Apoprotein des Cytochrom b
COXI	1. Untereinheit des Cytochrom-c-Oxidase Komplexes
CBP (2)	COB prä-RNA prozessierendes Protein
CYT18	mitochondriale Tyrosyl-tRNA-Synthetase
GST	Gluthathion-S-Transferase
HIS4	Histidinoldecarboxylase
KAR1	beteiligt an der Verdoppelung der Zentromere und der Karyogamie
LacZ'	kodiert für das α-Peptid der β-Galaktosidase
MAT (a, α)	Paarungstyp a oder α
MIP1	mitochondriale DNA Polymerase
MRF1	mitochondrialer Releasing Faktor für Polypeptidketten
MRH4	„mitochondrial RNA helicase"
MRS (1; 2; 3; 4; 5; 11)	„mitochondrial RNA splicing"
MSK1	mitochondriale Lysyl-tRNA-Synthetase
MSS (18; 116)	„mitochondrial splicing system"
MST1	mitochondriale Treonyl-tRNA-Synthetase
NAM (1; 2; 7; 8)	„nuclear accomodation of mitochondria"
PET54	translationaler Aktivator der 3. Untereinheit der Cytochrome-c-Oxidase
PUS	Pseudouridin-Synthase
PTH	peptidyl-tRNA-Hydrolase
URA3	Orotidin-5′-phosphat Decarboxylase

Gene werden durch kursiv geschriebene Großbuchstaben dargestellt (*XXX*). Die Darstellung des zum Gen gehörenden Proteins erfolgt nicht kursiv, den ersten Buchstaben groß und die folgenden Buchstaben klein geschrieben mit einem kleinem p dahinter (Xxxp).

Ausnahmen sind die folgenden rekombinanten Proteine des Mrs2p.

SDp	unveränderte Suppressor-Domäne mit GST-Tag
His-SDp	unveränderte Suppressor-Domäne mit His-Tag
SDp-L232F	Suppressor-Domäne mit Aminosäureaustausch Leucin zu Penylalanin auf Position 232
HDp	unveränderte hydrophile Domäne mit GST-Tag
His-HDp	unveränderte hydrophile Domäne mit His-Tag
HDp-R403-405A	hydrophile Domäne mit Aminosäureaustauschen Arginin zu Alanin auf den Positionen 403-405

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Sekundärstruktur eines Gruppe I Introns. 3
Abb. 2. Schematische Darstellung verschiedener Tyrosyl-tRNA-Synthetasen. 7
Abb. 3. Schematische Darstellung des Cbp2p. 10
Abb. 4. Schematische Darstellung des Nam2p. 11
Abb. 5. Sekundärstruktur des Gruppe II Introns aI5γ. 16
Abb. 6. Struktur und Organisation eines typischen Protein-kodierenden Gruppe II Introns. 17
Abb. 7. Schematische Darstellung des Crs1p. 28
Abb. 8. Punktmutationen in der Domäne V des Introns aI5γ. 35
Abb. 9. Aminosäuresequenz des *MRS2* Gens aus dem Hefestamm DBY 947. 37
Abb. 10. Übersicht über ARMs aus verschiedenen Organismen. 39
Abb. 11. Fließschema der geplanten Arbeit 40
Abb. 12. Erstellung eines spleißnegativen *MRS2* Deletionstammes. 64
Abb. 13. Deletionsanalyse des Mrs2 Proteins. 67
Abb. 14. Mutationsanalyse der hydrophilen Domäne. 70
Abb. 15. Mutationsanalyse der Suppressor-Domäne. 73
Abb. 16. Bestimmung der Magnesiumkonzentration in den Mitochondrien. 75
Abb. 17. Schema der Klonierung und der Aufreinigung der Peptide. 78
Abb. 18. Schematische Darstellung der Aufteilung des Introns aI5γ. 79
Abb. 19. Gel-Retardierung der RNA D456 mit den Proteinen His-SDp, His-HDp und BSA. 80
Abb. 20. Schema der Klonierung und der Aufreinigung der GST-Fusionsproteine. 82
Abb. 21. Gelretardierung der RNA D456 mit den GST Fusionsproteinen SDp und HDp. 83
Abb. 22. Kompetition mit verschiedenen Teilbereichen des Mrs2p und den Untereinheiten des Introns aI5γ. 84
Abb. 23. Gelretardierung mit den Peptiden des Mrs2p und einer Kontroll-RNA. 85
Abb. 24. Kompetition mit verschiedenen Peptiden der hydrophilen Domäne und den Domänen des Introns aI5γ. 86
Abb. 25. Kompetition mit verschiedenen Peptiden der Suppressor-Domäne und den Domänen des Introns aI5γ 87
Abb. 26. Kompetitions Versuch der RNA D456 mit SDp und SDp-L232F. 88

Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Übersicht über kernkodierte Spleißfaktoren für Gruppe II Introns in *S. cerevisiae*. 34
Tab. 2. Auflistung der verwendeten Hefestämme 41
Tab. 3. Verwendete PCR-Programme 50
Tab. 4. Nachweis des Aminosäureaustausches in der hydrophilen Domäne des *MRS2* Gens 68

1 Theoretischer Teil

1.1 Einleitung

Nach der vollständigen Sequenzierung des menschlichen Genoms zeigte sich überraschenderweise, dass die Anzahl der vorhandenen Gene weit unter dem erwarteten Wert lag. Der Mensch besitzt nicht mehr als die dreifache Menge der Gene der Fruchtfliege. Das führt zu der Frage, was den Unterschied zwischen der Fliege und einem Menschen ausmacht und wie die enorme Vielfältigkeit erreicht wird? Nach neuesten Erkenntnissen besteht der Unterschied in der größeren Variabilität des menschlichen Genoms, bewirkt durch die extrem hohe Anzahl an Introns. Introns sind Sequenzen, die in die eigentliche Geninformation (den sogenannten Exons) eingeschoben sind und die, bevor ein Genprodukt realisiert werden kann, aus der RNA entfernt werden müssen, ein Vorgang, der als Spleißen bezeichnet wird. Dabei ist es durch den Mechanismus des sog. „Alternativen Spleißens“ möglich, dass eine Neukombination der Geninformation erfolgen kann. Durch diesen Vorgang können aus wenig genetischer Information unzählige Genprodukte hergestellt werden, wodurch die Introns in den Mittelpunkt von Forschungsarbeiten gerückt sind.

Das Spleißen ist ein sehr komplexer Vorgang, der im Zellkern von sechs „small nuclear“ RNAs (snRNAs) sowie über 100 Proteinen ausgeübt wird. Dabei werden zwei Umesterungsschritte vollzogen, aus dem die ligierten Exons, d.h. die zur Translation bereite RNA, und das Intron als Lassostruktur entlassen werden. Die snRNAs scheinen bei diesem Prozess eine wesentliche Rolle in der Katalyse auszuüben. Es handelt sich hier um einen echten Ribonukleoproteinkomplex (RNP), der Spleißosom genannt wird. Daraus ergeben sich weitere Fragen: Woher stammen die Introns, sind sie Reste einer vergangenen RNA Welt und wie konnte dieses komplexe Zusammenspiel von RNA und Protein entwickelt werden?

Mögliche Antworten zu dieser Fragen bringen die selbstspleißenden Introns, die im Genom von Mitochondrien und Chloroplasten, sowie diversen Bakterien, gefunden wurden. Wie ihr Name schon sagt, handelt es sich hierbei um prinzipiell autokatalytische Introns, die aufgrund ihrer Reaktionsart und struktureller Unterschiede in zwei Gruppen eingeteilt werden können, die Gruppe I und Gruppe II Introns. Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass diese Introns in der Lage sind, sich in einem umgekehrten Spleißvorgang wieder in die RNA und auch in DNA zu inserieren, wodurch es zu einer Verbreitung der Introns kommen kann.

Dabei konnte gezeigt werden, dass diese Introns in unterschiedlichem Umfang abhängig von Proteinen sind, wodurch sie wertvolle Untersuchungsobjekte darstellen, um einen möglichen Weg von der rein katalytischen RNA zum angepassten Spleißosom zu verfolgen.
Im Folgenden sollen die Proteine, die für das Spleißen von Gruppe I und Gruppe II Introns eine Bedeutung haben, genauer dargestellt werden. Vorangestellt ist jeweils ein kurzer Überblick über die Eigenschaften der Introngruppe.

1.2 Gruppe I Introns

Gruppe I Introns sind weit verbreitete Ribozyme, die mit Ausnahme von höheren Eukaryonten in fast allen Organismengruppen zu finden sind. Sie zeichnen sich durch eine gemeinsame Sekundärstruktur aus, wodurch die benachbarten Exons in räumliche Nähe zueinander gebracht werden und so in zwei Umesterungsschritten miteinander verbunden werden können. Das Intron geht dabei aus dieser Reaktion als lineares Molekül hervor, das durch eine weitere Umesterung in ein zirkuläres Molekül umgewandelt werden kann. Da es sich bei diesem Vorgang um Umesterungsschritte handelt, ist prinzipiell für den Vorgang keine weitere Energie erforderlich. Allerdings wird als Nukleophil zusätzlich Guanosin benötigt.
Die Katalyse ist von der Sekundärstruktur abhängig, die durch Basenpaarungen gebildet wird. Die dadurch entsehenden „loop“ und Helixstrukturen werden nach den ausgebildeten Paarungen P1 bis P9 durchnummeriert. Das katalytische Zentrum der RNA wird durch tertiäre Interaktionen der Domänen P4-P5-P6 und P3-P7-P8 gebildet, die sich koaxial zusammenlagern und die katalytische Spalte bilden (Abb. 1, grau umrandete Domänen). Das aktive Ribozym entsteht allerdings erst durch Assoziation mit der 5′-Domäne, die aus P1 und P2 gebildet wird (Weeks und Cech, 1995a, b).

Das katalytische Zentrum ist relativ kompakt und in der Lage, sich selbstständig zusammenzufinden und eine Autokatalyse durchzuführen. Trotzdem haben die meisten Gruppe I Introns in den peripheren Bereichen zusätzliche Strukturen erworben, die das katalytische Zentrum stabilisieren. Diese peripheren Bereiche sind sehr variabel und können an den unterschiedlichsten Stellen lokalisiert sein, wodurch die Einteilung der Gruppe I Introns in weitere Subgruppen möglich ist (Übersicht Inoue und Ikawa 2000). In ihnen finden sich aber nicht nur stabilisierende RNA Strukturen, sondern auch offene Leserahmen (ORF), die für Proteine kodieren können, die an der Mobilität und am Spleißvorgang der Introns beteiligt sind (Übersicht in Cech 1990; Golden et al. 1998; Cech und Golden 1999; Ikawa und Inoue 2000).

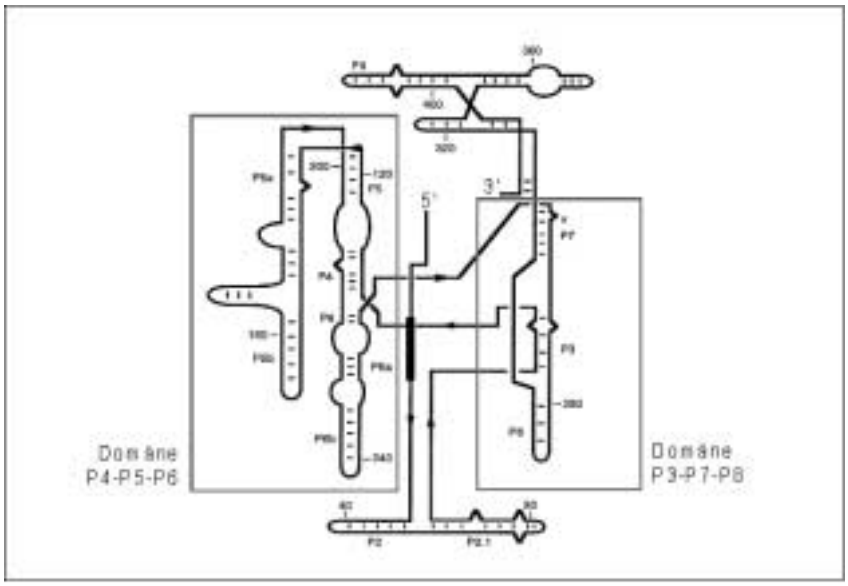


Abb. 1. Sekundärstruktur eines Gruppe I Introns. Die Domänen, die die katalytische Spalte bilden sind grau umrahmt. Die Guanosin Bindestelle ist mit einem Stern gekennzeichnet und die „internal guide sequence“ ist als dicke Linie im Intron dargesellt.

1.2.1 Gruppe I Intron kodierte Proteine

Gruppe I Introns kodieren häufig für eine sequenzspezifische DNA Endonuklease, ein Enzym, das sowohl in der Mobilität als auch im Spleißen der Introns involviert ist (Lambowitz und Belfort 1993; Belfort und Roberts 1997; Lambowitz et al. 1999). Dieses Enzym wird in ca. 30 % der Introns gefunden, dabei ist die Lokalisation der ORFs variabel. Ihnen gemein ist allerdings, dass sie generell in den äußeren „loops“ der RNA zu finden sind, wo sie das katalytische Zentrum der Introns nicht stören. Dabei können zwei verschiedene Arten an ORFs beobacht werden: Einige dieser ORFs sind freistehend, andere dagegen sind mit den 5’-Exons fusioniert. In den letzteren Fällen wird das Protein zunächst als Fusionsprotein translatiert und anschließend proteolytisch gespalten (Guo et al. 1993).

Die Hauptaufgabe dieser Endonukleasen liegt in der sequenzspezifischen Insertion des Introns in ein intronloses Allel, ein Prozess, der als „Homing“ bezeichnet wird (Übersicht in Belfort und Roberts 1997; Edgell et al. 2000; Chevalier und Stoddard 2001). Dabei initiiert die Endonuklease einen Doppelstrangbruch in der rezipienten DNA nahe der Insertionsstelle. Durch einen Doppelstrangbruch Reparatur Mechanismus (DSBR) wird der Transfer des Introns mit flankierenden Exonsequenzen durchgeführt (Dujon et al. 1989). Eine weitere Möglichkeit des

Homing besteht darin, zunächst das Intron revers zu transkribieren und dann die entstandene cDNA in die DNA über homologe Rekombination zu integrieren. Voraussetzung dafür ist eine reverse Spleißreaktion, bei der zunächst nur einige Nukleotide (4-6 nt) der Ziel RNA mit einigen Nukleotiden im Intron interagieren, die als „internal guide sequence“ (IGS) bezeichnet werden. Dabei ist nicht nur ein Homing möglich, sondern auch ein Transfer des Introns zu ektopischen Sequenzen, also Sequenzen, die zwar eine Ähnlichkeit mit der ursprünglichen Insertionsstelle besitzen, aber nie zuvor ein Intron beinhaltet haben (Mohr und Lambowitz 1991; Lambowitz und Belfort 1993; Roman und Woodson 1998; Edgell 2000).

Da die Endonukleasen an sehr unterschiedlichen Stellen in den Gruppe I Introns lokalisiert sein können und außerdem verschiedenen Gruppen zugeordnet werden können, ist die gängigste Hypothese, dass es sich hierbei um erworbene Proteine handelt, die in präexsistierende Gruppe I Introns inseriert wurden. Dort unterstützen Gruppe I Introns die Verbreitung der Endonukleasen, ohne die Funktion des Wirtsorganismus wesentlich zu behindern (Lambowitz und Belfort 1993; Sellem und Belcour 1997; Duan et al. 1997).

Die Endonukleasen können aufgrund konservierter Sequenzmotive in vier Hauptgruppen eingeteilt werden: His-Cys; H-N-H; GIY-YIG und LAGLIDADG (Belfort und Roberts 1997; Chevalier und Stoddard 2001). Dabei wurde für die ersten drei Gruppen nur eine Endonuklease Aktivität dokumentiert, während für die LAGLIDADG Endonukleasen auch eine sog. Maturase Funktion nachgewiesen werden konnte, eine Funktion, bei der das Protein an der Excision des Introns beteiligt ist.

LAGLIDADG Endonukleasen sind zur Zeit die einzigen Gruppe I Intron kodierten Endonukleasen, die am Spleißprozess beteiligt sind. Sie können das LAGLIDADG Motiv ein oder zweimal im Protein beinhalten. Proteine, die ein Motiv enthalten bilden Homodimere und die, welche zwei Motive besitzen, sind als Monomer funktionell. Die Maturase Funktion konnte allerdings bis jetzt nur in Proteinen gezeigt werden, die das Motiv zweimal enthalten (Lambowitz und Belfort 1993; Schäfer et al. 1994; Belfort und Perlman 1995; Ho et al. 1997; Ho et al. 1999; Chevalier und Stoddard 2001).

Der erste Nachweis einer Maturase Funktion gelang auf genetischen Wege bei den *Saccharomyces cerevisiae* Introns bI2, bI3 und bI4, die im Gen für das Apoprotein des Cytochrom b (*COB*) lokalisiert sind. Interessanterweise sind die gefundenen Maturase Funktionen in der Regel

spezifisch für das korrespondierende Intron, was darauf schließen lässt, dass die Proteine spezifische Strukturen des Introns erkennen. Eine Ausnahme bildet die Maturase des Intron bI4, die auch das strukturell verwandte Intron aI4α im Gen der ersten Untereinheit der Cytochrom-c-oxidase (*COX1*) spleißen kann (Übersicht Lambowitz und Perlman 1990, Lambowitz et al. 1999).

Eine der zur Zeit am besten untersuchten LAGLIDADG Endonukleasen/Maturasen ist die des *COB* Introns von *Aspergillus nidulans* (Ancob), die heterolog in *E. coli* exprimiert und zu *in vitro* Spleißassays benutzt wurde. Mit ihrer Hilfe konnte gezeigt werden, dass die Maturase als Monomer auf direktem Wege das Spleißen deutlich beschleunigt (Ho et al. 1997). Dabei bindet das Protein sehr schnell an die RNA ($k_{on} \sim 3x10^9$ M/min) und bleibt fest mit ihr verbunden ($k_{off} <$ 0,04 M/min). Das Protein erfüllt hierbei eine Chaperon-ähnliche Aufgabe, indem es die Faltung einiger tertiärer Strukturen und sogar einiger unvollständiger Sekundärstrukturen der RNA erleichtert. Mit Hilfe der Chaperon-Funktion kann die normalerweise für die *in vitro* Spleißreaktion notwendige Magnesiumkonzentration von 150 mM auf bis zu 3 mM herabgesetzt werden (Ho et al. 1999). Überraschenderweise konnte keine Hauptbindestelle für das Protein ermittelt werden. Vielmehr werden mehrere Stellen in der RNA simultan gebunden, sodass sich schon geringfügige strukturelle Veränderungen des Introns negativ auf die Proteinbindung auswirken. Dies wird darauf zurückgeführt, dass die Maturase nur in einem späten Stadium der Faltung des Introns binden kann und somit geringe Veränderungen schon die Ausbildung der zur Bindung notwendigen tertiären Struktur verhindern (Geese und Waring 2001).

Während die Maturase/Endonuklease des Ancob Introns als einzelnes Protein agiert, benötigen einige andere Maturasen für den Spleißprozess weitere Proteine. Beispielsweise arbeitet die Maturase/Endonuklease des Introns bI4 als Endonuklease ohne weitere Hilfsfaktoren, zeigt aber eine Maturase Aktivität nur in Kombination mit dem Nam2p, bei dem es sich um eine Leucyl-tRNA-Synthetase handelt (Li et al. 1996; Rho und Martinis 2000). Bei der Maturase des Introns bI3 dagegen ist die Endonuklease Aktivität vollkommen verlorengegangen und nur mit der Hilfe des Mrs1p (s.u.) kann es eine Spleißfunktion erfüllen (Bassi et al. 2002).

Bei den letztgenannten Beispielen kann eine Adaptierung der mobilen Gruppe I Introns an den Spleißprozess in Eukaryonten beobachtet werden. Je weiter diese Adaptierung fortschreitet, desto mehr werden auch nukleäre Spleißfaktoren in den Vorgang involviert, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

1.2.2 Nukleär kodierte Spleißproteine von Gruppe I Introns

1.2.2.1 Das Cyt18 Protein

Einer der am besten untersuchten nukleär kodierten Gruppe I Intron Spleißfaktoren ist das Cyt18p. Es handelt sich um die Tyrosyl-tRNA-Synthetase von *Neurospora crassa*, die durch das Gen *cyt 18* kodiert wird und primär für die Aminoacylierung der mitochondrialen (mt) $tRNA^{Tyr}$ erforderlich ist (Akins und Lambowitz 1987). Bezüglich seiner Spleißfunktion ist das Cyt18p in der Lage, spezifisch nahe dem katalytischen Zentrum des Gruppe I Introns zu binden und die Formation einer aktiven Struktur zu unterstützen (Guo und Lambowitz 1992; Mohr et al. 1992; Caprara et al. 1996a,b). Im Gegensatz zu den bekannten Maturasen spleißt das Cyt18p, die unterschiedlichsten Gruppe I Introns (LSU, ND1, cob-I2 von *N. crassa*, so wie verschiedene Gruppe I Introns von anderen Organismen), obwohl diese nur eine geringe Sequenzkonservierung aufweisen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Erkennung des Introns durch das Cyt18p hauptsächlich über die tertiäre Struktur erfolgt (Mohr et al. 1993; Wallweber et al. 1997). Detaillierte biochemische und genetische Studien führten zu folgendem Modell: Zunächst bindet das Cyt18p sehr schnell an die partiell gefalteten Domänen P4-P6 des Introns, um dann in einem relativ langsamen Vorgang diese Faltung zu vervollständigen. Anschließend werden weitere Kontakte zu den Domänen P3-P9 vermittelt, um die Orientierung dieser Domänen zu stabilisieren und das katalytisch aktive Zentrum des Introns zu bilden (Caprara et al. 1996a,b; Saldanha et al. 1996; Chen et al. 2000; Caprara et al. 2001, Webb et al. 2001).

Die Art der Interaktion des Proteins mit dem Intron ist der Schlüssel zum Verständnis der Evolution des genannten Vorgangs. Deshalb fokussieren sich die neuesten Untersuchungen auf die genaue Art der Interaktion und die Struktur des Proteins. Jod „footprinting“ Untersuchungen des Phosphodiester Skeletts bestätigten, dass das Protein genau gegenüber der aktiven Spalte an die RNA bindet. D.h. die Bindungsstellen befinden sich hauptsächlich in dem Bereich der Domänen P4-P6, vorwiegend bei den beiden zusammengelagerten Helices (vgl. Abb. 1), sowie den Bereichen P3-P9 und einigen wenigen Nukleotiden in den Domänen P8 und P9. Neben diesen „allgemeinen“ Bindungsstellen konnten weitere intronspezifische Bindungsstellen festgestellt werden. Sie umfassen im Intron LSU die Bereiche P7.1/P7.1a sowie in der Verlängerung P6b. Im Gegensatz dazu gibt es im Intron ND1 Interaktionen in den Bereichen P5[3’] und in P8, die nicht im LSU Intron zu finden sind (Caprara et al. 1996a; 1996b; Chen et al. 2000).

Mittels „computer modeling“ und vergleichenden Analysen zwischen den Bindungsstellen, die in beiden Introns vorhanden sind, stellte sich bemerkenswerterweise heraus, dass eine weitreichende dreidimensionale Übereinstimmung der $tRNA^{Tyr}$ mit dem hochkonservierten katalytischen

Zentrum des Gruppe I Introns existiert. Dabei weisen die beiden zusammengelagerten Helices P4-P6 eine auffallende Ähnlichkeit zum D-Anticodon Arm, P7 zum variablen Bereich und P9 zum Akzeptor Arm der tRNA auf. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Erkennung des Introns über eine tRNA ähnliche Struktur im katalytischen Zentrum erfolgt. Durch diese auffallenden strukturellen Ähnlichkeiten scheint das Cyt18p gerade dazu prädestiniert zu sein, für das Spleißen von Gruppe I Introns adaptiert zu werden (Caprara et al. 1996b; Myers et al. 2002).

Beim Cyt18p handelt es sich um eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase (aaRS) der Klasse I, eine Gruppe von aaRS, die in Bakterien schon eingehend untersucht wurde (Abb. 2). Die $aaRS^{Tyr}$ weist eine typische N-terminale Nukleotid-Binderegion (NTB) auf, welche die Bildung des Tyrosyl-Adenylat katalysiert und den tRNA Akzeptorarm bindet. Der folgende Abschnitt des Proteins enthält eine α-helikale Dimerisierungs-Domäne (αH), gefolgt von einer C-terminalen Domäne, welche in der Lage ist, die tRNA über den „stem-loop“ des Antikodon Arms zu binden (Pintar et al. 1999; Guez et al. 2000).

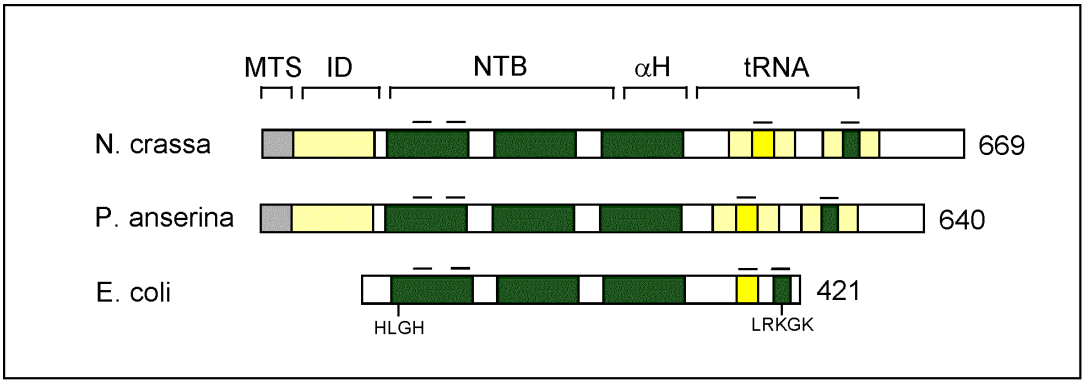


Abb. 2. Schematische Darstellung verschiedener Tyrosyl-tRNA-Synthetasen. Der graue Block stellt die mitochondriale Targeting-Sequenz (MTS) dar, grüne Bereiche sind Bereiche starker Homologie, gelbe von mittelmäßiger Homologie, hellgelbe Bereiche sind Bereiche guter Homologie zwischen den Proteinen von *N. crassa* und *P. anserina*. ID: Idiosynkratische Region; NTB: Nukleotid Binde Domäne; αH: Dimerisierungs-Region; tRNA: tRNA-Binderegion. Die Balken über den schematisch dargestellten Proteinen stellen basischen Cluster dar (näheres siehe Text). Die beiden Aminosäuresequenzen sind im Einbuchstaben Kode wiedergegeben.

Die Bindung der bakteriellen aaRS an die tRNA erfolgt als α_2-Homodimer. Dabei wird die tRNA über das ganze Dimer gebunden. An dieser Bindung sind im Wesentlichen vier konservierte Cluster basischer Aminosäuren beteiligt, die über das ganze Protein verteilt sind. Cluster 1 befindet sich am Anfang der N-terminalen Nukleotid-Binderegion, Cluster 2 am Ende der N-terminalen Binderegion und Cluster 3 und 4 befinden sich in der C-terminalen Domäne. Diese

Cluster, sowie eine Interaktion als Dimer, konnten auch in dem Cyt18p als wichtige Elemente der RNA-Bindung identifiziert werden (Saldanha et al. 1996). Trotz dieser Gemeinsamkeiten aller aaRS sind nur das Protein aus *N. crassa* und das nah verwandte Protein aus *Podospora anserina* in der Lage, eine Spleißfunktion zu erfüllen. Damit müssen die beiden aus Pilzen stammenden Proteine eine entscheidende Anpassung besitzen, die bei den anderen Homologen nicht zu finden ist (Cherniack et al. 1990; Kämper et al. 1992).

Tatsächlich finden sich bei dem Cyt18p von *N. crassa* und *P. anserina* eine N-terminale und C-terminale Verlängerung des Proteins (Abb. 2), wobei die N-terminale Erweiterung als idiosynkratische Region bezeichnet wird. Mutationsanalysen zeigten, dass die C-terminale Verlängerung für das Intron ND1 kaum eine Bedeutung hat. Veränderungen der idiosynkratischen Region wirken sich dagegen stark auf den Spleißphänotyp aus, während die ^{Tyr}RS Funktion kaum betroffen ist. In dieser Domäne sind drei α Helices lokalisiert (H0, H1 und H2) auf die je ein sehr kurzer Bereich einer β Faltblatt Struktur (βA und βB) folgt. Die Helices H1 und H2 sind auch in anderen ^{Tyr}RS zu finden. Die genauere Analyse zeigte, dass H1 und H2 jeweils am Spleißprozess und an der Acylierung beteiligt sind. Dagegen lässt sich für die Helix H0 zwar eine Beteiligung am Spleißvorgang, nicht aber an der Acylierung nachweisen. Überraschenderweise wirkt sich die Veränderung dieser Region auf verschiedene Introns unterschiedlich aus. So ist eine Mutante von *N. crassa,* der im Cyt18p die H0 Domäne fehlt, bezüglich des Introns ND1 vollkommen spleißinhibiert, während beim LSU Intron noch ein sehr schwacher Spleißphänotyp vorhanden ist. Umgekehrt konnte nachgewiesen werden, dass eine Mutante, der eine RNA-Bindestelle in der C-terminalen Domäne des Cyt18p fehlt, das Spleißen des LSU Introns vollständig inhibiert, aber einen geringen Spleißphänotyp beim ND1 Intron erhält (Cherniack et al. 1990; Kittle et al. 1991; Nair et al. 1997; Mohr et al. 2001). Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass das Cyt18p zwar generell die gleiche Grundstruktur im Gruppe I Intron erkennt, aber das Spleißen über weitere intronspezifische Interaktionen unterstützt. Gleichzeitig bestätigen sie auch die Daten von Caprara et al. (1996a; b), die unterschiedliche Bindungsstellen für die beiden Introns LSU und ND1 nachweisen konnten.

1.2.2.2 Das Cbp2 Protein

Das Cbp2p ist ein weiteres gut untersuchtes Protein, das am Spleißprozess vom *S. cerevisiae* Intron bI5 des *COB* Gens beteiligt ist. Wie im Fall des Cyt18p können auch mit Hilfe des Cbp2p

verschiedene Gruppe I Introns gespleißt werden, so u.a. das *Tetrahymena* Intron LSU und das T4 Phagen Intron nrdB, die beide zur Gruppe I Intronsubgruppe A1 gehören. Weiterhin ist nur ein sehr geringer Einfluss des Cbp2p auf die restlichen in der Hefe befindlichen Gruppe I Introns beschrieben worden (Weeks und Cech 1995a, b; 1996; Shaw und Lewin 1997). Dem zu Folge lässt sich auch kein weiterer Effekt auf das Wachstum der Hefe beobachten, wenn sowohl das *CBP2* Gen aus dem Genom als auch das Intron bI5 aus dem Mitochondrien entfernt wurden (Hill et al. 1985). Interessanterweise ist die Bindung an das ursprüngliche Intron bI5 mit einem K_d von ~ 50 pM deutlich besser als an die anderen untersuchten Introns, die nur mit einem K_d von ~ 10-100 nM binden, was vermuten lässt, dass auch bei dieser Interaktion die Intron Substruktur die Bindung beeinflusst (Weeks und Cech 1995a; 1996).

Bei dem Cbp2p handelt es sich um ein 73,9 kDa Protein, das offensichtlich nur in Hefe zu finden ist, da es keine Homologie zu anderen bis jetzt bekannten Proteinen aufweist (McGraw und Tzagoloff 1983; Li et al. 1996). Die Zugabe dieses Proteins zu *in vitro* Spleißassays beschleunigt die Katalyse der Introns um ca. das 1000-fache und gleichzeitig kann die Magnesiumkonzentration im Ansatz deutlich reduziert werden (bis auf 5nM), ohne die Effektivität des Spleißprozesses zu beeinträchtigen. Dabei wirkt das Cbp2p als Monomer und kann die Domänen P3-8 und P7.1-P7.1a simultan binden. Interessanterweise befinden sich die Bindestellen für das Cbp2p und das Cyt18p nicht an den gleichen Stellen des Introns, sondern auf genau den gegenüberliegenden Seiten des katalytischen Zentrums (Gampel et al. 1989; Weeks und Cech 1995a;b; Buchmueller et al. 2000).

Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass die Faltung des Introns bI5 in zwei Schritten verläuft. Aus einer offenen Struktur faltet sich zunächst ein relativ stabiles Intermediat, das dann weiter zum katalytisch aktiven Ribozym gefaltet wird. Dabei unterstützt das Cbp2p den Übergang von der vorgefalteten RNA zur katalytischen Struktur und induziert so den Spleißvorgang, wobei man davon ausgeht, dass das Protein wichtige tertiäre RNA-RNA Interaktionen in einem einzigen Schritt vermittelt. Es ist allerdings auch in der Lage an die ungefaltete RNA zu binden. Dabei entsteht ein RNA-Proteinkomplex, der nicht mehr in eine katalytische Form umgewandelt werden kann. In diesem Fall spielt die Magnesiumkonzentration wieder eine entscheidende Rolle. Die Faltung des Introns in diese erste vorgefaltete Struktur ist wesentlich von dem vorhandenen Magnesiumspiegel abhängig (> 5mM), denn eine schnelle Faltung in diesen stabilen Zustand verhindert dann eine Fehlfaltung durch das Protein. In diesem Rahmen konnte nachgewiesen werden, dass das zum Spleißprozess notwendige Guanosin keinen Einfluss auf die Bindung des

Proteins an die RNA hat (Weeks und Cech 1995b; Lewin et al. 1995; Buchmueller et al. 2000; Webb et al. 2001).

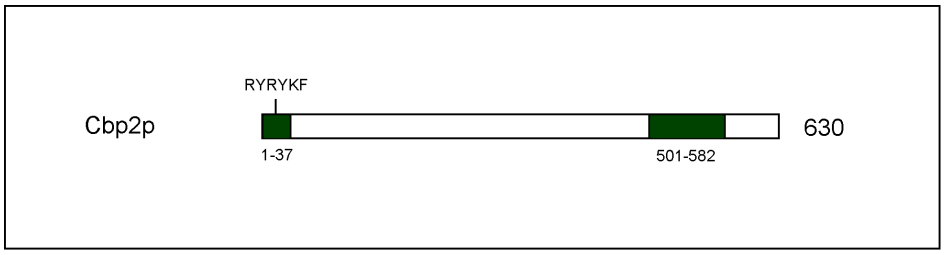


Abb. 3. Schematische Darstellung des Cbp2p. Grüne Bereiche sind die Bereiche für eine RNA-Bindung, deren Lage durch die Aminosäurezahl angezeigt wird. Das ermittelte Bindemotiv in der N-terminalen Domäne ist im Einbuchstaben-Kode dargestellt.

Untersuchungen des Proteins durch „UV crosslinking“ Studien identifizierten im 630 Aminosäuren langen Cbp2p zwei RNA-Hauptbindestellen (Abb. 3). Die erste dieser RNA-Bindestellen befindet sich im N-terminalen Bereich des Proteins (Aminosäure 1-37), die andere relativ weit im C-terminalen Bereich (Aminosäure 501-582). Durch Mutationsanalysen des N-terminalen Bereiches konnte gezeigt werden, dass der gezielte Austausch von Aminosäuren den Spleißvorgang partiell oder vollständig inhibiert. Dabei zeigen einige der mutierten Proteine, die den Spleißprozess deutlich einschränken, trotzdem eine unverändert gute Bindung an die RNA. Aus den Mutationsdaten konnte ein neues RNA-Bindemotiv ermittelt werden, das aus alternierenden basischen und aromatischen Aminosäuren besteht, das RYRYKF Motiv. Die genauere Untersuchung dieses Motivs ergab, dass die Arginine von großer Bedeutung sind, aber ein Spleißvorgang im geringen Umfang noch möglich ist, auch wenn diese ausgetauscht wurden. Ein Verlust der aromatischen Aminosäuren führt hingegen zu einer kompletten Blockierung der Spleißreaktion. Damit sind die basischen Aminosäuren möglicherweise für eine relativ unspezifische Interaktion mit dem Zuckerphosphatskelett zuständig, während die aromatischen Aminosäuren spezifisch mit bestimmten Basen interagieren (Tirupati et al. 1999).

1.2.2.3 Das Spleißsystem des Nam2 Proteins

Das *NAM2* Gen aus *S. cerevisiae* kodiert für die mitochondriale Leucyl-tRNA-Synthetase, eine typische Klasse I aaRS, die neben ihrer normalen Aufgabe noch am Spleißprozess der Gruppe I Introns bI4 und aI4α beteiligt ist. Anders als das Cyt18p ist die Leucyl-tRNA-Synthetase allerdings nicht in der Lage, alleine den Spleißprozess zu übernehmen. Dafür ist ein konzertantes

Zusammenspiel mit der Maturase des Introns bI1 notwendig (Dujardin et al. 1983; Labouesse et al. 1987; Herbert et al. 1988; Labouesse et al. 1990; Li et al. 1996). Das *NAM2* Gen („nuclear accommodation of mitochondria“) wurde im Rahmen eines Screenings auf Suppressoren für Spleißdefekte gefunden, die durch das Fehlen der bI4 Maturase ausgelöst wurden (Dujardin et al. 1980; Groudinsky et al. 1981). Bei der Suppression wird die normalerweise inaktive Maturase des Introns aI4α aktiviert, die dann die Aufgabe der Maturase das Introns bI4 übernimmt. Über den genauen Mechanismus dieser Suppression ist jedoch bisher nichts bekannt (Dujardin 1983; Labouesse et al. 1987).

Um das 894 Aminosäuren lange Nam2p in seiner Wirkung genauer zu untersuchen, wurden hauptsächlich Mutationsanalysen durchgeführt und *in vivo* analysiert. Kompliziert wurden diese Untersuchungen dadurch, dass das Nam2p als mt aaRS wirkt und es damit einen essentiellen Faktor für die mitochondriale Proteinsynthese darstellt. D.h., bei einem Verlust der aaRS Aktivität wird auch die Bildung der Maturase in den Mitochondrien blockiert. Deshalb wurden die meisten Analysen in einem System durchgeführt, bei dem die Maturase im Kern kodiert ist, im Zytoplasma synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien transportiert wird (Labouesse et al. 1990). Durch die Anwendung dieses Systems konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, durch Mutationen die aaRS Aktivität partiell von der Spleißaktivität in der ^{Leu}RS zu trennen. Hierbei konnte eine Region C-terminal zu dem tRNA-Bindemotiv KMSKS gefunden werden, die in anderen ^{Leu}RS nicht zu finden ist und für die eine eindeutige Beteiligung an der Suppessoraktivität als auch an der normalen Spleißaktivität nachgewiesen werden konnte (Abb. 4).

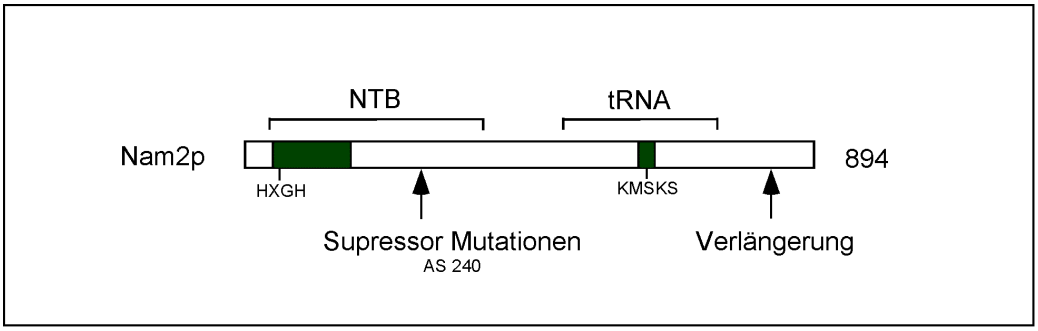


Abb. 4. Schematische Darstellung des Nam2p. Grüne Bereiche sind Bereiche die starke Homologie zu anderen aaRS aufweisen und bei denen es sich um mögliche RNA-Bindestellen handelt (NTB: Nukleotid Binde Domäne; tRNA: tRNA-Binderegion). Die beiden konservierten Aminosäuresequenzen in diesen Regionen sind im Einbuchstaben-Kode dargestellt. Wichtige Bereiche für die Spleißreaktion sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Ein weiterer interessanter Bereich für die Spleißreaktion liegt im Bereich um die Aminosäure 240, in der die Veränderungen gefunden wurden, die zur Suppressor-Aktivität des Proteins führen.

Gezielte Aminosäure-Austausche in diesem Bereich führten zu folgendem Ergebnis: Der Austausch von Glycin gegen eine räumlich größere Aminosäure wie z.B. Alanin, Valin oder Leucin führt zur Suppression, aber eine aromatische oder basische Aminosäure ist dazu nicht in der Lage (Labouesse et al. 1987; Li et al. 1996; Dujadarn und Herbert et al. 1996). Es blieb aber bisher unklar, ob das Nam2p nur die Maturase aktiviert, oder ob beide Proteine direkt am Spleißvorgang beteiligt sind.

Neueste Untersuchungen konnten dieses Problem mittels eines „three hybrid systems" lösen, bei dem das Intron mit flankierenden Exonsequenzen als „bait" und die Maturase und das Nam2p (kodiert auf Plasmiden) als „prey" bereitgestellt wurden. In diesen Versuchen konnte deutlich gezeigt werden, dass sowohl das Nam2p als auch die Maturase direkt mit dem Intron interagieren. Dabei stellt die RNA die Verbindung zwischen den beiden Proteinen her, die untereinander nicht zu interagieren scheinen (Roh und Martines 2000, Roh et al. 2002). Daraus ergibt sich folgendes Gesamtbild: Die Leucyl-tRNA-Synthetase und die Maturase sitzen auf gegenüberliegenden Stellen am Intron, vergleichbar zu Cyt18p und dem Cbp2p, die ebenfalls an unterschiedlichen Stellen am Intron binden. Der Mechanismus zur Aktivierung der aI4α Maturase kann dann möglicherweise durch eine leicht veränderte Struktur oder Vorfaltung des Introns hervorgerufen werden, die durch die Suppressor Nam2 Proteine veranlasst wird.

Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass die ^{Leu}RS aus anderen Organismen die Aufgabe des Nam2p heterolog übernehmen können. So kann die ^{Leu}RS des Menschen und auch die aus dem *Mycobacterium tuberculosis* das Nam2p ersetzen. Damit ist hier die Spleißfunktion scheinbar generell latent vorhanden. Möglicherweise wurde aufgrund fortschreitender Degeneration der Maturase Funktion in der Hefe das Protein für den Spleißvorgang nur zusätzlich requiriert (Houman et al. 2000).

1.2.2.4 Das Spleißsystem des Mrs1 Proteins

Bei dem Mrs1 Protein („mitochondrial RNA splicing") aus *S. cerevisiae* handelt es sich um ein Protein, das am Spleißvorgang des Introns bI3 aus dem *COB* Gen beteiligt ist. Auch dieses Protein ist, ähnlich wie das Nam2p, nicht allein in der Lage den Spleißvorgang zu induzieren. Nur in Verbindung mit der vom Intron bI3 kodierten Maturase kann das Spleißen beobachtet werden.
Ursprünglich wurde das *MRS1* Gen als Suppressor für eine Mutation, die einen Spleißdefekt des Gruppe I Introns bI3 bewirkt, isoliert (Kreike et al. 1986). In diesem Zusammenhang konnte

nachgewiesen werden, dass es außerdem an der Excision eines weiteren Gruppe I Introns, dem aI5ß des *COX1* Gens, beteiligt ist (Kreike et al. 1987; Bosquet et al. 1990; Herbert et al. 1992).
Die stärkste Homologie zeigt das Protein zu dem nukleär kodierten mitochondrialen Protein Cce1, das an der Öffnung von „holliday junctions“ beteiligt ist. Damit kann das Mrs1p in die Familie der RNase H ähnlichen, dimeren, DNA Kreuzungen auflösenden Enzyme eingeordnet werden. Diese Enzyme besitzen insgesamt vier konservierte Sequenzmotive, ansonsten weisen sie aber nur eine sehr geringe Homologie zueinander auf. Allerdings fehlt dem Mrs1p das erste Motiv, wodurch eine Beteiligung an der Hydrolyse von DNA Kreuzungen unwahrscheinlich ist (Aravind et al. 2000; Wardleworth et al. 2000). Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass das Mrs1p tatsächlich nicht in der Lage ist, „holliday junctions“ zu spalten. Trotzdem kann es sehr effizient mit dem Gruppe I Intron bI3 interagieren. Dabei liegt es in Lösung als Dimer vor, wobei zwei Dimere notwendig sind, um an die RNA zu binden. Durch den tetrameren Mrs1p Komplex kann allerdings noch kein Spleißprozess ausgelöst werden. Erst in Verbindung mit der Maturase des bI3 Introns in einem 420 kDa großen Komplex sind Spleißprodukte nachweisbar. Interessanterweise konnte bei der Maturase des bI3 Introns, trotz aller erforderlichen Sequenzmotive für eine Endonuklease, keine Endonuklease Aktivität nachgewiesen werden (Bassi et al. 2002). Damit handelt es sich bei dem RNP Komplex des Introns bI4 um einen echten Spleißkomplex, dessen Proteinanteile spezifisch an den Spleißvorgang adaptiert wurden und ihre ursprüngliche Aufgabe verloren haben.

1.2.2.5 Weitere Spleißfaktoren für Gruppe I Introns

Neben den oben erwähnten Spleißproteinen konnte eine Reihe weiterer Gene identifiziert werden, deren Mutationen einen Spleißdefekt bewirken und die auf Grund des daraus folgenden Atmungsdefektes isoliert wurden. Eine eingehende Charakterisierung der Gene und der daraus resultierenden Proteine steht zur Zeit allerdings noch aus. Zu dieser Gruppe von Genen gehört das *MSS18* Gen („mitochondrial splicing system“), dessen Genprodukt am Spleißen des Gruppe I Introns aI5β des *COX1* Gens aus *S. cerevisiae* beteiligt ist (Seraphin et al. 1988). Neben seiner Spleißfunktion postulieren Dang und Martin (1993) eine weitere bis jetzt unbekannte Funktion des Gens. Ebenfalls am Spleißprozess des Introns aI5β beteiligt ist das *PET54* Genprodukt (PET steht für „Petit“, d.h., dass diese Gene einen Atmungsdefekt auslösen, wodurch die Hefen nur kleine Kolonien auf Vollmedium bilden), das weitere Aufgaben in der Translation des *COX3* Gens erfüllt (Valencik et al. 1989; Valencik und McEwen 1991, Constanzo und Fox 1993). Neben diesen beiden Genprodukten und dem Mrs1p konnte noch ein viertes Protein identifiziert werden, das am Spleißvorgang des aI5β Introns beteiligt ist. Es handelt sich hierbei um das Suv3p, eine NTP

abhängige RNA Helikase, die eine Untereinheit des mitochondrialen 3'-5'-Exonuklease Degradationskomplexes darstellt. Es wird vermutet, dass das Protein eine indirekte Wirkung besitzt, indem es den Abbau der Intron RNA erleichtert und die gebundenen Spleißfaktoren recycelt (Conrad-Webb et al. 1990; Margossian et al. 1993).

Für einen Spleißdefekt des Gruppe I Intron bI2 des *COB* Gens aus *S. cerevisiae,* der die Maturase nicht beeinflusst, konnten verschiedene Suppressoren für isoliert werden.
So z.B. das *NAM1* Gen, dass allerdings nur supprimiert, wenn es auf einem „high copy"-Plasmid lokalisiert ist. Aus diesem Grund wird eine unspezifische Spleißfunktion vermutet, da das kodierte Protein normalerweise für die Synthese und die Stabilisierung bzw. für die korrekte Prozessierung der *COX1*, *COB* und *ATP6* prä-mRNA benötigt wird. Möglicherweise bedingt die Überexpression eine längere Halbwertzeit der RNA, die dann zur Suppression führt. Trotzdem kann eine direkte Interaktion mit der RNA nicht ausgeschlossen werden, zumal das Nam1p als ein mitochondriales Matrixprotein identifiziert werden konnte (Ben Asher et al. 1989; Groudinsky et al. 1993; Wallis et al. 1994).

Des Weiteren wird die gleiche Mutation im bI2 auch durch die Proteine der Gene *NAM7* und *NAM8* supprimiert (Ben Ascher et al. 1989). Beide Gene wirken ebenfalls nur als „high copy"-Suppressoren. Dabei zeigt das *NAM7* Genprodukt, das identisch mit dem Upf1p („up frameshift") ist, im N-terminalen Bereich zwei Zinkfinger-Strukturen, wie sie für DNA bindende Proteine bekannt sind, während der zentrale Bereich Homologien zu Helikasen aufweist. Durch detaillierte *in vitro* Studien konnte die Helikase Funktion bestätigt werden, sowohl für DNA als auch für RNA. Neben der putativen Spleißfunktion ist das Protein für den Abbau von Nonsenscodon-haltiger mRNA verantwortlich, wobei die Aufgabe des Nam7p ähnlich zu der des Suv3p sein könnte (Ben Asher et al. 1989; Altamura et al. 1992; Leeds et al. 1992, 1993; Cui et al. 1995; Czaplinski et al. 1995).

Das Nam8 Protein besitzt ein typisches RNA-Bindemotiv, mit dessen Hilfe es eine direkte Spleißfunktion erfüllen könnte. Es konnte überraschenderweise als eine der Proteinkomponenten des U1 snRNP im Kern identifiziert werden (Gottschalk et al. 1998), ein RNP, das an der Erkennung der 5'-Spleißstelle und dem sich aufbauenden Spleißosom beteiligt ist. Allerdings ist das *NAM8* Gen nicht essentiell, da eine Zerstörung des Gens zu keiner Veränderung des Phänotyps führt. Zudem besitzt es keine Leadersequenz, wodurch es nicht effizient in die Mitochondrien transportiert wird. Andererseits könnte dies eine Erklärung dafür liefern warum es nur als „high

copy“-Suppressor wirkt. Durch die starke Anreicherung des Proteins im Zytoplasma könnte auch etwas in die Mitochondrien gelangen, wo es dann seine Wirkung entfalten könnte. Es wird deshalb vermutet, dass die Suppression der Mutation in dem Intron bI2 nur durch einen unspezifischen Effekt hervorgerufen wird, der aber trotzdem durchaus direkter Natur sein kann (Tanaka und Isono 1992; Ekwall et al. 1992).

Abschließend soll ein weiteres sehr interessantes Ergebnis erwähnt werden. So konnte die Suppression eines Spleißdefektes in der P7 Domäne des td Introns des T4 Phagen durch die *E. coli* ribosomalen Proteine StpA und S12 beobachtet werden, denen eine Chaperon-Funktion zugeschrieben wird. Hier könnte die Suppression durch eine Faltung des Introns erfolgen, ohne das im Gegensatz zu den bisher untersuchten Proteinen eine stabile Bindung mit der RNA ausgebildet werden muss, bzw. bestehen bleibt (Coetzee et al. 1994; Herschlag 1995; Zhang et al. 1995).

1.3 Gruppe II Introns

Zur Zeit sind mehr als 100 Gruppe II Introns bekannt. Sie werden in rRNA, tRNA und mRNA der Organellen von Pflanzen, Pilzen und Protisten, sowie in der mRNA von Bakterien und Archaebakterien gefunden (Übersicht Martinez-Abarca und Toro 2000; Toor et al. 2001, Dai und Zimmerly 2002, Dai und Zimmerly 2003, Dai et al. 2003). Es handelt sich hierbei um Ribozyme mit gemeinsamer Sekundär- und Tertiärstruktur, die von sechs typischen Helices geformt wird (Domäne I bis VI, Abb. 5), welche untereinander weitere Interaktionen eingehen (in Abb. 5 mit griechische Buchstaben dargestellt). Dabei bilden die Domänen I und V das katalytische Zentrum des Ribozyms, wodurch sich gerade in diesen Bereichen auch die wenigen konservierten Nukleotide finden. Das für den Spleißvorgang ebenfalls wichtige „branchpoint“ Adenosin befindet sich in der Domäne VI. Die anderen Domänen sind für die reine Katalyse von untergeordneter Bedeutung. Sie stabilisieren die Intronstruktur bzw. sind mögliche Bindungsstellen für Proteine. In der Domäne IV kann sogar ein ORF „ausgeloopt“ sein.
Durch die Struktur des Introns werden auch hier die Exons in eine räumliche Nähe zueinander gebracht. Im Gegensatz zu den Gruppe I Introns ist die Konsensus-Sequenz an den Spleißstellen der Gruppe II Introns allerdings gut konserviert. Sie weist mit der Sequenz GUGYG...AY eine Homologie zu der Sequenz der Spleißstelle von Kern Introns auf. Aber nicht nur die Spleißstelle zeigt Ähnlichkeiten zu den Kern Introns, sondern die gesamte Spleißreaktion ist mit der der Kern

Introns vergleichbar. Sie besteht aus zwei Umesterungsschritten, bei der die 2'-OH Gruppe des „branchpoint" Adenosins der Domäne VI als Nukleophil für die erste Umlagerung dient, wodurch die typische Lassostruktur der Introns durch die 2'-5'-Verbindung entsteht, gefolgt von der zweiten Umesterung bei der die 3'-OH Gruppe des 5'-Exons als Nukleophil verwendet wird und es zur Verbindung der beiden Exons kommt (Übersicht in Michel und Ferat 1995; Lambowitz et al. 1999; Jacquier und Chanfreau 2000; Bonen und Vogel 2001).

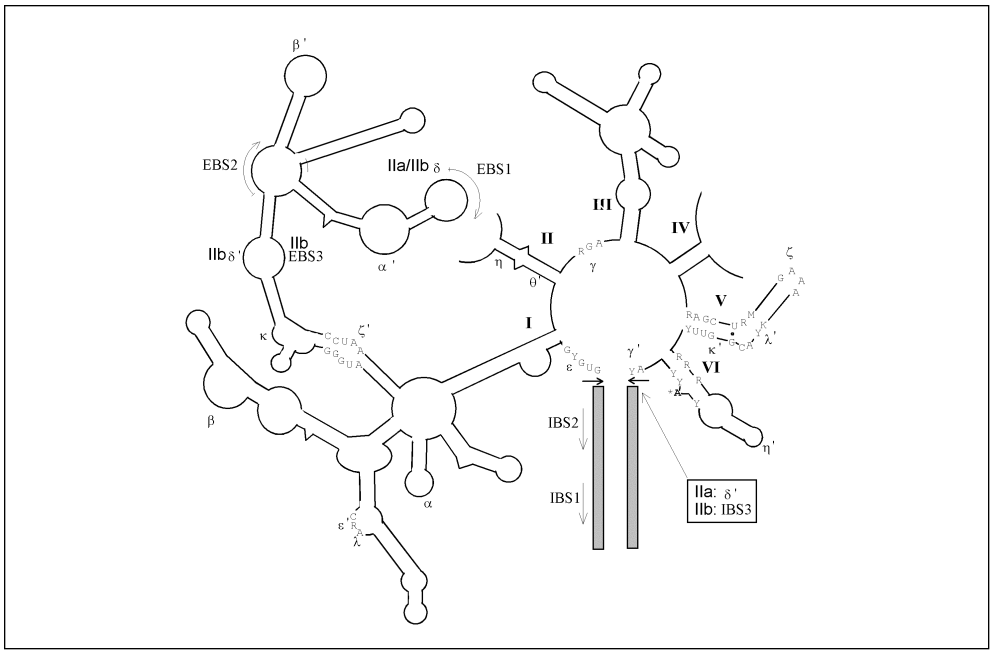


Abb. 5. Sekundärstruktur des Gruppe II Introns aI5γ. Die grauen Boxen symbolisieren die Exons, die Pfeile die Spleißstellen. Die Großbuchstaben zeigen die Konsensus-Sequenzen für Gruppe II Introns (R = Purinbase, Y = Pyrimidinbase, M = A oder C, K = G oder U). Tertiäre Interaktionen werden mit griechischen Buchstaben angezeigt. EBS und IBS sind die Exon-Bindestelle und die Intron-Bindestelle. Römische Zahlen weisen auf die sechs strukturellen Domänen von Gruppe II Introns hin. Der Stern zeigt das ungepaarte A für die Lariat Bildung.

Für einige der Gruppe II Introns konnte gezeigt werden, dass *in vitro* eine Autokatalyse möglich ist. Da allerdings das Selbstspleißen nur unter relativ unphysiologischen Bedingungen abläuft, werden verschiedene Proteine für die *in vivo* Reaktion benötigt, die - soweit bekannt - im Folgenden vorgestellt werden sollen.

1.3.1 Gruppe II Intron kodierte Proteine

Viele der bekannten Gruppe II Introns besitzen einen ORF, der wahrscheinlich für ein Protein kodiert. Die ORF sind im Gegensatz zu denen der Gruppe I Introns, die an unterschiedlichen Stellen lokalisiert sein können, immer in der für den Spleißvorgang unbedeutenden Domäne IV zu finden. Die Domäne IV ist deshalb in ihrer Sequenz eine der variabelsten Domänen von Gruppe II

Introns. Der Leserahmen des Introns ist dabei häufig freistehend mit einem eigenen Promotor, wie z.B. für das *Lactococcus lactis* Intron ltrB, dass eine eigene Shine Delgarno Sequenz in der Domäne IV besitzt. Er kann aber auch, wie bei vielen Organellen-Introns, in Phase mit dem stromaufwärts gelegenen Exon liegen. In diesem Fall wird ein chimäres Translationsprodukt aus Exon- und Intronsequenzen gebildet. Da allerdings bisher nur kürzere funktionelle Proteine nachgewiesen werden konnten, muss das primäre Translationsprodukt durch Proteasen weiter prozessiert werden (Carignani et al. 1983, 1986; Bergantino und Carignani 1990; Moran et al. 1994, van Dyck et al.1998; Toor et al. 2001).

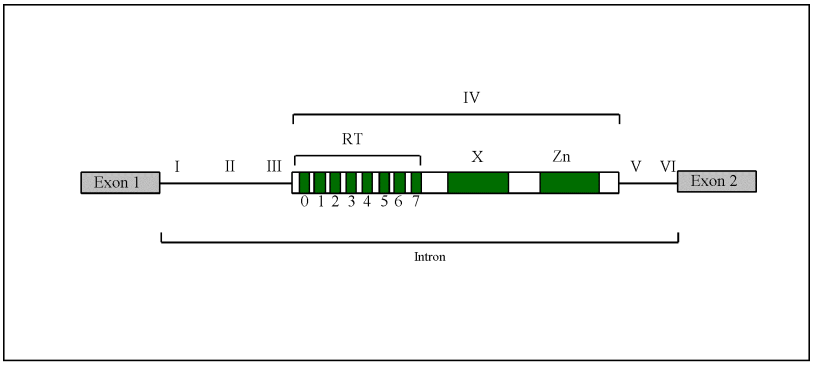


Abb. 6. Struktur und Organisation eines typischen Protein-kodierenden Gruppe II Introns (nach Toor et al. 2001). Römische Zahlen stehen für die verschiedenen Domänen des Introns. Das Intron kodierte Protein wird durch den Balken im Intron dargestellt. Wichtige Domänen innerhalb dieses Proteins sind grün dargestellt. Die arabischen Zahlen zeigen die Polymerase Domänen der Reversen Transkriptase. Domäne 0 stellt die frühere Domäne Z dar, da sie eine N-terminale Verlängerung des Reverse Transkriptase Motivs darstellt und gut in Non-LTRs konserviert ist (Malik et al. 1999)

Die ORFs nahezu aller Gruppe II Introns sind miteinander verwandt und zeigen einen ähnlichen strukturellen Aufbau (Abb. 6). So finden sich in einem typischen Gruppe II Intron ORF sieben konservierte Aminosäureblöcke, die Polymerase Domänen einer Reversen Transkriptase darstellen. Diese weisen eine starke Homologie zu eukaryontischen retrotransponierbaren Elementen ohne „long terminal repeats“ (Non-LTR) auf. An den Reverse Transkriptase Bereich schließt sich eine stark konservierte Proteindomäne an, die als X bezeichnet wird (Mohr et al. 1993) und der die Matura sefunktion zugeordnet werden konnte (Kapitel 1.3.1.2). Nahe dem C-terminalen Ende des ORFs wird häufig eine Domäne gefunden, die für eine Zink-Finger artige Struktur kodiert, neben der ein typisches Motiv für eine DNA Endonuklease zu finden ist (siehe Kapitel 1.3.1.3) (McClure 1991; Zimmerly 1995a,b).

1.3.1.1 Entwicklungsgeschichte der Gruppe II Introns und ihrer Proteine

Die einheitliche Struktur, sowie die Lokalisation der ORFs der Gruppe II Introns, führte zu der Vermutung, dass eine Koevulotion von Intron und Protein vorliegt (Fontain et al. 1997; Toor et. al. 2001). D.h. die Verbreitung der Gruppe II Introns erfolgte erst nach dem Erwerb des ORFs als Retroelement-ähnliche Struktur, deren Mobilität durch das Protein vermittelt wurde (Curcio und Belfort 1996; Toor et al. 2001). Demnach wurden die ORFs verhältnismäßig früh in der Entwicklungsgeschichte dieser Introns in vollkommen unabhängige katalytische RNA inseriert (Lambowitz und Belfort 1993; Wank et al. 1999). Anschließend erfolgte dann eine weite Verbreitung der Introns in den Bakterien aufgrund ihrer Retroelement-artigen Eigenschaften. Mit der Entstehung der Chloroplasten und Mitochondrien durch Endosymbiose trennten sich dann die Entwicklungswege der Introns und ihrer korrespondierenden ORFs. Dabei war in den Mitochondrien anfangs noch ein unabhängiger horizontaler Transfer der Introns möglich. Mit zunehmender Anpassung an den Wirtsorganismus aber ging die ORF Aktivität verloren, wodurch nur noch ein vertikaler Transfer möglich war. Gute Beispiele hierfür liefern die Mitochondrien höherer Pflanzen oder die Chloroplasten der Spezies *Euglena* (Ehara et al. 2000; Zimmerly et al. 2001). Mit Bezug auf diese Hypothese des Stammbaums der Gruppe II Introns und ihrer Proteine lassen sich interessante Unterschiede zwischen Bakterien und Organellen beobachten. So steht in den Bakterien scheinbar auch heute noch die Mobilität im Vordergrund, da trotz der großen Anzahl der bakteriellen Introns keine funktionellen Introns identifiziert werden konnten, die keinen ORF besitzen. Das Spleißen ist von untergeordneter Bedeutung, da sich die Gruppe II Introns bei Bakterien nicht in essentiellen Genen befinden (Roberts et al. 2000; Martinez-Abarca et al. 2000; Yeo et al.; Munoz et al. 2001; Übersicht Edgell et al. 2000; Dai und Zimmerly 2002).
In Gegensatz dazu befinden sich die Gruppe II Introns der Organellen praktisch immer in essentiellen Genen. Somit steht hier die Spleißreaktion im Vordergrund, während die Mobilität und damit die Verteilung der Introns in den Hintergrund tritt. Durch die Notwendigkeit des Spleißens wurden von der Wirtszelle vermutlich weitere Spleißfaktoren adaptiert, die diesen Vorgang sicherstellen. Dadurch verlor der ORF in den Eukaryonten mehr und mehr an Bedeutung, so dass hier häufig degenerierte ORF oder sogar Introns ohne ORF gefunden werden (Lambowitz und Perlman 1990; Lambowitz et al. 1999; Zimmerly et al. 2001; Dai und Zimmerly 2002).

1.3.1.2 Die Maturase Funktion

Die Maturase Domäne ist die am stärksten konservierte Domäne des Intron kodierten Proteins. Das kann mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückgeführt werden, dass die Spleißfunktion sowohl für die mobilen als auch für die mittlerweile ortständigen Introns die wichtigste Funktion darstellt.

Für die ersten beiden Introns aI1 und aI2 des *COX1* Gens aus *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass die Domäne X den Bereich mit der Maturase Funktion umfasst. Dies gelang in Kreuzungsversuchen, bei denen nachgewiesen werden konnte, dass das Intron kodierte Protein *trans* rezessiv in der Lage ist, einen Defekt in der Domäne X des homologen Introns zu komplementieren (Carignani et al. 19983; Moran et al. 1994).

Neuere Untersuchungen konnten zweifelsfrei für das Protein des *L. lactis* Introns ltrB zeigen, dass die Domäne X entscheidend am Spleißprozess beteiligt ist und dass das Protein direkt mit der RNA interagiert (Matsuura et al. 1997; Saldanha et al. 1999). Die primäre Bindestelle des Proteins befindet sich in der Domäne IV des Introns, in der auch der Translationsstart für das Protein lokalisiert ist. Dadurch ist eine Bildung der Maturase autoregulatorisch möglich: Zunächst erfolgt die Transkription der Exon- und Intronsequenzen. Da anfänglich aber keine Maturase vorhanden ist, die das Intron aus der prä-RNA spleißt, wird das Intron Protein translatiert, im Falle des Ll.ltrB ausgehend von der Shine-Delgardo-Sequenz in der Domäne IV. Nach der Translation bindet dann die Maturase sehr spezifisch an den Bereich der Shine-Delgarno-Sequenz, inhibiert so die eigene Translation und fördert aber gleichzeitig auf diese Art und Weise den Spleißvorgang (Wank et al. 1999; Zhou et al. 2000; Singh et al. 2002). Ähnliches wurde auch schon früher für die in Phase liegenden Proteine beschrieben, bei denen aus der ungespleißten RNA ein Fusionsprotein gebildet wird, das nach weiteren Reifungsschritten zur funktionellen Maturase prozessiert wird. Diese katalysiert dann das Ausschneiden des Introns, was wiederum die Maturasebildung einschränkt (Lazowska et al. 1980). Neuste Untersuchungen am Hefe aI2 zeigen allerdings, dass die Bindung der Maturase in der Domäne IV essentiell für das Homing ist, aber das das Spleißen (wenn auch reduziert) auch ohne die Bindungsstelle möglich ist (Huang et al. 2003).

Die zur Zeit am besten untersuchte Maturase ist die des Ll.ltrB Introns. Sie konnte heterolog in *E. coli* exprimiert und zu *in vivo* und *in vitro* Studien verwendet werden. In diesem System wurde gezeigt, dass die Maturase nicht nur eine Bindung mit der RNA eingeht, sondern dass neben der primären starken Bindungsstelle weitere wesentlich schwächere Bindungen zu den Domänen I, II, V und VI vermittelt werden (Wank et al. 1999; Zhou et al. 2000). Dabei ist die Maturase *in vitro* in der Lage 130-fach schneller als unter optimalen Spleißbedingungen bei 5 mM $MgCl_2$ tertiäre Interaktionen der intronischen RNA auszubilden. In diesem Rahmen konnte gezeigt werden, dass die Interaktionen δ-δ'; ε-ε'; κ-κ'; λ-λ' und ξ-ξ', die normalerweise erst unter Hochsalz-Bedingungen (150 mM $MgCl_2$) ausgeformt werden schon bei 5 mM $MgCl_2$ nachweisbar sind und dass unter diesen Bedingung die η-η' Interaktion durch die Maturase stabilisiert wird (Matsuura et al. 2001). Neueste „UV crosslinking" Studien zeigen, dass bis zu 17 RNA-Protein-Kontaktstellen

ausgebildet werden können, die mit zunehmender Magnesiumkonzentration nicht mehr alle benötigt werden (Noah und Lambowitz 2003).
Daraus wurde der Schluss gezogen, dass das Protein über die primäre Bindungsstelle zunächst fest an die RNA bindet und anschließend die Ausbildung tertiärer Interaktionen vermittelt. Diese Interaktionen, die unter Niedrigsalz-Bedingungen normalerweise noch nicht ausgebildet werden können, stabilisieren dann das Intron in der aktiven Form. Zudem wird vermutet, dass die schwächeren Bindungen bei den Rearrangements der RNA für den zweiten Spleißschritt hilfreich sind (Matsuura et al. 2001, Noah und Lambowitz 2003).
Über die Art der Bindung der Maturase mit RNA ist bis zum heutigen Zeitpunkt kaum etwas bekannt. Allerdings zeichnet sich die Domäne X durch eine für Nukleinsäure-Bindeproteine häufig typische hohe Anzahl an basischen Aminosäuren aus, die aber kaum Homologien zu bekannten RNA-Bindemotiven erkennen lassen (Mohr et al. 1993, Wank et al. 1999).

1.3.1.3 Reverse Transkriptase und Endonuklease Funktion

Die Spleißfunktion ist nicht die einzige Aufgabe des Intron kodierten Proteins. Wie schon erwähnt (Kapitel 1.3.1), besitzen einige Gruppe II Introns die Fähigkeit zur Mobilität, die sowohl in der Form des Homings als auch in der Form der ektopischen Transposition erfolgen kann (s. auch Kapitel 1.2.1). Entscheidende Faktoren dazu sind, neben der Maturase Funktion, die Funktion des Proteins als Reverse Transkriptase (RT) und Endonuklease (Übersicht in Lambowitz et al. 1999; Lehmann und Schmidt 2003).

Die RT Domäne besteht aus acht konservierten Aminosäureblöcken, die mit ca. 250-300 Aminosäuren den größten Teil des ORFs umfassen. Dabei beinhaltet der Block V (Abb. 6) das für Retroviren und anderen Retroelemente hochkonservierte RT Motiv YXDD, welches bei der RT des HIV-1 Virus nachweislich einen Teil des aktiven Zentrums bildet (Steitz et al. 1993). Dabei scheinen die RT-Domänen innerhalb der bakteriellen Introns, wie an Hand phylogenetischer Vergleiche festgestellt wurde, gut konserviert zu sein. Bei den eukaryontischen Introns hingegen werden verschieden starke Degenerationen und Verluste der konservierten Sequenzblöcke beobachtet, die auf eine fortschreitende evolutionäre Entwicklung der Introns in den Organellen zurückzuführen ist (Zimmerly et al. 2001; Toor et al. 2001; Dai und Zimmerly 2002).
Der erste Nachweis für die Funktionalität des Proteins gelang für die Introns aI1 und aI2 des mitochondrialen *COX1* Gens von *S. cerevisiae* (Kennell et al. 1993). Danach konnte noch für verschiedene weitere Intron kodierten Proteine eine RT Aktivität nachgewiesen werden: So für das *COXI* I1 von *P. anserina* (Fassbender et al. 1994); das Intron lrtB von *L. lactis*, welches sich im

Gen für eine konjugative Relaxase befindet (Matsuura et al. 1997); das RMlnt1 aus *Sinorhizobium meloti*, das im Insertionselement der Gruppe IS630 sitzt (Martinez-Abarca et al. 2000) und das Xln6 aus *Pseudomonas alcaligenes*, das stromabwärts von einem „hairpin loop“ eines Rho unabhängigen Terminators liegt (Yeo et al. 2001).
Analysen der Proteine ergaben, dass die RT Aktivität essentiell für das Homing ist (Übersicht Lambowitz et al. 1999; Eskes et al. 2000), bei dem unter normalen Umständen das Protein zusammen mit dem Intron als echtes RNP die endogene Intron RNA revers transkribiert. Durch Veränderungen in der Intronstruktur, etwa durch falsche Faltung des Introns aufgrund von Mutationen, können unspezifische Reaktionen der RT ausgelöst werden. Hierzu gehören z.B. eine reverse Transkription von intronlosen Allelen oder das sog. „template switch“, bei dem die RT vom 5’-Ende des Introns zum 3’-Ende einer vollkommen anderen exogenen RNA springen kann (Zimmerly et al. 1999; Sellem et al. 2000; Morozova et al. 2002).

Für die Zink-Finger ähnliche Domäne des Intron ORF konnte eine Endonuklease-Funktion nachgewiesen werden. Dieser Bereich wird aufgrund der konservierten Aminosäuren als EX_1HH-HX_3H (Gorbalenya 1994) oder kurz HNH Motiv bezeichnet (Shub et al. 1994; Moran et al. 1994; Zimmerly et al. 1995a; Matsuura et al. 1997, San Filippo und Lambowitz 2003). Die Endonuklease-Funktion ist bei der Mobilität von Gruppe II Introns für die Insertion des Introns durch gezielte Schnitte in der DNA im Bereich der „Spleißstelle“ verantwortlich (Mohr et al. 2000; Singh und Lambowitz 2001). Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass diese Funktion zwar die Mobilität erleichtert aber keineswegs essentiell zu sein scheint. Denn diese Domäne weist eine vergleichsweise geringe Sequenzkonservierung auf und fehlt sogar bei einigen Bakterien trotz nachgewiesener Mobilität (Martinez-Abarca und Toro 2000b; Cousineau et al. 2000, Jiménez-Zurdo et al. 2003).
Die Endonuklease-Aktivität kann sich nur entfalten, wenn das Protein mit der Intron RNA verbunden ist. Das Protein wirkt demgemäß als ein echter RNP Komplex, wobei das Intron, ähnlich wie bei der RT Funktion, für die Spezifität des Vorganges verantwortlich ist (Eskes et al. 2000; Mohr et al. 2000; Singh und Lambowitz 2001, Huang et al. 2003).

1.3.2 Nukleär kodierte Spleißproteine von Gruppe II Introns

Maturasen sind nicht die einzigen Proteine, die am Spleißprozess von Gruppe II Introns beteiligt sind. Ein Indiz hierfür ist, dass auch selbstspleißende Introns ohne ORF, wie z.B. aI5γ und bI1 aus *S. cerevisiae*, die keine bekannten Maturasen zum Spleißen benötigen (Hensgens et al. 1983), *in vitro* unter annähernd physiologischen Bedingungen extrem langsam aus der prä-mRNA gespleißt werden. Das deutet darauf hin, dass diese Introns zum Spleißen *in vivo* zusätzlich Proteine als transagierende Faktoren benötigen. Diese Proteine werden im Cytoplasma synthetisiert und dann üblicherweise mit Hilfe von Leadersequenzen in die Mitochondrien oder Chloroplasten transportiert (Pfanner et al. 1997).

Zur Identifizierung der kernkodierten Spleißproteine werden hauptsächlich drei verschiedene, grundlegende Strategien verfolgt:

1. Die Isolierung mutierter Allele nukleärer Gene, die aufgrund ihrer Mutation in den Mitochondrien einen atmungsdefekten Phänotyp verursachen oder in den Chloroplasten die Photosynthese stören. Durch weiterführende Untersuchungen wird dann geklärt, ob die Effekte durch einen Spleißdefekt hervorgerufen werden.

2. Es werden sogenannte mit$^-$ Stämme von *S. cerevisiae* verwendet, die durch eine Punktmutation auf der mtDNA atmungsdefekt sind. In diesem speziellen Fall werden Mutationen gewählt, die in Introns lokalisiert sind und zu Spleißdefekten führen. Ein solcher Spleißdefekt kann dann z.B. durch einen nukleären Suppressor in der Regel partiell aufgehoben werden, so dass der Stamm wieder atmungskompetent wird. Nach Erstellung einer Genbank kann dann durch Komplementation des Spleißdefektes das entsprechende Gen identifiziert werden.

3. Neuerdings erfolgt die Isolierung von RNP Komplexen, von deren Intron RNA die Proteine isoliert und dann weiter analysiert werden. Dieser Lösungsansatz scheint sehr vielversprechend zu sein, da direkt mit dem Intron agierende Proteine untersucht werden.

1.3.2.1 Kernkodierte Spleißfaktoren in Mitochondrien

Zur Zeit werden kernkodierte Spleißfaktoren für mt Gruppe II Introns ausschließlich in der Hefe *S. cerevisiae* untersucht. Der Grund hierfür ist, dass Hefen die Atmungsdefekte die durch die Spleißdefekte ausgelöst werden, überleben. Zudem lassen sich diese Atmungsdefekte einfach auf nicht vergärbaren Kohlenstoffquellen nachweisen.

Bis jetzt konnten drei funktionelle Gruppen von Genen bzw. Proteinen isoliert werden, die am Spleißvorgang von Gruppe II Introns beteiligt sind. Hierzu gehören die RNA-Helikasen, die

Maturase-beeinflussenden Enzyme und die MRS Proteine, die hauptsächlich Transportfunktionen besitzen.

1.3.2.1.1 RNA Helikasen

Helikasen stellen eine sehr interessante Gruppe putativer mt Spleißproteine dar, da auch einige am Kernspleißen beteiligte Proteine zu dieser Gruppe gezählt werden. Sie entwinden die RNA unter ATP-Verbrauch und machen sie so für weitere Spleißfaktoren zugänglich, bzw. überführen so die RNA in andere funktionelle Strukturen (Lüking et al. 1998; Reed 2000).

Zu dieser Gruppe gehört das vom *MSS116* Gen kodierte Protein, bei dem es sich um eine DEAD Box Helikase handelt, benannt nach der hochkonservierten Aminosäuresequenz Asp-Glu-Ala-Asp. Es wurde durch eine Mutation identifiziert, die zu einer Blockierung der Spleißreaktion mehrerer Gruppe I und Gruppe II Introns führt (Seraphin et al. 1987, 1989). Zwar konnte für das Mss116p noch nicht die typische ATP abhängige Helikaseaktivität gezeigt werden, wie sie bei anderen DEAD-Box Proteinen typisch ist, *in vitro* jedoch ist das Wildtyp-Protein aus einem Mitochondrien Extrakt in der Lage das Gruppe II Intron bI1 unter ATP Verbrauch zu spleißen. Dies könnte ein Indiz für eine direkte Beteiligung am Spleißvorgang sein. Einen Hinweis auf eine Intronspezifität der Helikase ergab sich dadurch, dass es nicht gelang, das mit bI1 verwandte Gruppe II Intron aI5γ mit Hilfe desselben Mitochondrien-Extraktes zu spleißen (Niemer et al. 1995).
Neueste Untersuchungen zeigen, dass das Mss116 Protein neben seiner Spleißaktivität für eine effiziente Translation der mRNA von *COX1* und *COX3* benötigt wird. Der „knock out“ des *mss116* Gens führt darüberhinaus zu einer Blockierung des Spleißvorganges in einem Stamm in dem die mitochondriale Translation inhibiert wurde, so dass eine direkte Funktion beim Spleißvorgang wahrscheinlich ist (P. S. Perlman, persönliche Mitteilung).

Eine andere kürzlich beschriebene Helikase ist die vom *MRH4* Gen kodierte mitochondriale RNA Helikase. Auch hier handelt es sich um eine DEAD Box Helikase, die aber bis auf die typischen konservierten Helikase Signaturen nur Homologe in anderen Hefen und *N. crassa* besitzt. Das Mrh4p wurde als schwacher „low copy“-Suppressor für einen Spleißdefekt identifiziert, der im Intron aI5γ durch einen A zu U Austausch in der basalen Helix der Domäne V ausgelöst wird. Untersuchungen des Proteins ergaben, dass es in der Matrix der Mitochondrien lokalisiert ist. Ein „knock out“ des Gens führt zu einem Verlust der mitochondrialen DNA, was typisch für Mutanten von *S. cerevisiae* ist, die in der mitochondrialen Proteinbiosynthese behindert sind (Myers et al. 1985). Des Weiteren ergaben Datenbankanalysen möglicherweise eine Assoziation des Mrh4p mit

der großen Untereinheit der mt rRNA. Die bisherigen Daten lassen daher keine Rückschlüsse zu, ob das Protein am Spleißen beteiligt ist oder nicht (Schmidt et al. 2002). Möglicherweise stellt aber das Mrh4p den Counterpart zum Mss116p dar und übernimmt für das Intron aI5γ eine ähnliche Aufgabe wie das Mss116p für das Intron bI1.

1.3.2.1.2 Maturase beeinflussende Proteine

Die zweite Gruppe von Proteinen die am Spleißprozess von Gruppe II Introns beteiligt sind, stellen die Maturase beeinflussenden Proteine dar. Hierzu gehört u.a. das Mrf1p bei dem es sich um einen „mitochondrial release factor“ für Peptidketten handelt. Es beeinflusst die Translation der Maturasen der Gruppe II Introns aI1 und aI2, sowie die einiger Gruppe I Introns. Zudem ist die *COX1* Expression in einem intronlosen Allel bei der Disruption des *MRF1* Gens stark vermindert und das Translationsprodukt des *COX2* Gens, das natürlicherweise keine Introns besitzt, lässt sich praktisch nicht nachweisen. Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass dieses Protein nicht direkt am Spleißen beteiligt ist, sondern dass die beobachteten Spleißdefekte auf eine fehlende Maturase Expression zurückzuführen sind (Pel et al. 1992a, b).

Vorrangig Spleißdefekte durch fehlende Maturasen werden auch durch Mutationen im Mss51p („mitochondrial splicing system“) ausgelöst. Durch die Mutation dieses Proteins kommt es zu Spleißdefekten der Introns aI1 und aI2, sowie des Gruppe I Introns aI3. Zurückzuführen ist dies auf die fehlende Aktivierung der Translation der *COXI* mRNA, an der das Mss51p maßgeblich beteiligt ist (Simon und Faye 1984, Decosta et al. 1990).

Die mitochondrialen Threonyl- und Lysyl-tRNA-Synthetasen (Mst1p und Msk1p) wirken ebenfalls auf die beiden Maturasen, die von den Gruppe II Introns aI1 und aI2 kodiert werden (Pape et al. 1985; Gatti und Tzagoloff 1991). Der beobachtete Effekt ist wiederum indirekt, da die Translation durch die fehlenden tRNAs empfindlich gestört wird.

Trotzdem kann ein zusätzlicher direkter Effekt für alle oben genannten Proteine nicht ausgeschlossen werden. Gerade in den Fällen der Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRS) kann ein direkter Effekt nicht vollständig ausgeschlossen werden, da es sich mit Hinsicht auf die Funktion, welche die aaRS beim Spleißen von Gruppe I Introns einnehmen (Kapitel 1.2.2.1, 1.2.2.3), um sehr interessante putative Spleißproteine handelt.

1.3.2.1.3 Das *MRS2* Gen und seine Suppressoren

Das Mrs2 Genprodukt ist eines der wenigen bekannten Spleißproteine, die scheinbar spezifisch auf Gruppe II Introns wirken. Es wurde als Suppressor für eine mitochondriale Mutation in der

Domäne III des Gruppe II Introns bI1 identifiziert, bei dem eine –1 Deletion in einer Abfolge von fünf Adenosinresten vorliegt, die zu einem Spleißdefekt führt (Schmelzer et al. 1983). Die Wirkung als Suppressor ist allerdings nur auf einem „high copy"-Plasmid zu beobachten. Durch eine Zerstörung des Gens konnte gezeigt werden, dass das Mrs2 Protein für den Spleißvorgang aller Gruppe II Introns essentiell ist, während Gruppe I Introns nicht oder kaum beeinflusst werden (Wiesenberger et al. 1992). Neben seiner Funktion beim Spleißen muss es allerdings eine vom Spleißen unabhängige Funktion erfüllen, da eine Zerstörung des Gens in intronlosen Stämmen zum Verlust der Atmung führt. Da Isolate, die ein defektes *MRS2* Gen tragen, kein Cytochrom aa3 und nur geringe Mengen an Cytochrom b ausbilden, obwohl alle mitochondrialen Translationsprodukte gebildet werden, wird vermutet, dass dieses Gen eine essentielle Funktion im Bereich der Biogenese der Mitochondrien besitzt und möglicherweise am Zusammenbau der Cytochrome beteiligt ist. Über den genauen Wirkmechanismus bezüglich des Cytochromzusammenbaus des Mrs2 Proteins ist bisher allerdings nichts bekannt (Wiesenberger et al. 1992, Waldherr et al. 1993).

In neueren Untersuchungen konnte das *MRS2* Gen auch als „low copy"-Suppressor, für verschiedene Spleißdefekte im Intron aI5γ ermittelt werden. Es handelt sich hierbei um Mutationen in der basalen Helix und in der „bulge" Region der Domäne V des Introns. Die Suppressor-Mutationen im Mrs2p wurden alle in dem gleichen Bereich des 470 Aminosäuren langen Proteins (Aminosäuren L213M; T230I und L232F) gefunden, wodurch eine direkte Interaktion mit der Intron RNA nahe liegt. Interessant in diesen Zusammenhang ist die Tatsache, dass Suppressor-Mutationen einen temperatursensitiven Phänotyp auslösen, d.h. die Hefen atmen nicht bei 36 °C, obwohl sie effizient spleißen. Es handelt sich somit um eine Entkopplung des Spleißphänotyp von der Funktion des Mrs2p in der Atmung.

Aus der Analyse der Suppressorregion ergab sich, dass dieser Bereich entfernt einem Helix-Turn-Helix Motiv ähnelt, bei dem es sich um eine potentielle RNA-Bindestelle handeln könnte. Darüber hinaus konnte ein weiterer putativer Bereich für eine RNA-Bindung identifiziert werden, der am C-terminalen Ende des Proteins liegt. Er zeichnet sich durch seine hohe Anzahl an basischen Aminosäuren aus, die eine starke Homologie zu ARMs („arginine rich motifs") aufweisen. Diese beiden möglichen RNA-Bindedomänen werden von zwei Transmembran-Domänen getrennt, die sich beide in der Nähe des C-terminalen Endes des Proteins befinden und nur durch wenige Aminosäuren voneinander getrennt sind (Schmidt et al. 1998).

Aktuelle Befunde weisen dem Mrs2p eine Funktion im Magnesiumhaushalt der Mitochondrien zu (Bui et al. 1999). Dabei zeigen „knock out" Stämme des *MRS2* Gens eine niedrigere Magnesiumkonzentration in den Mitochondrien als der Wildtyp. Bestimmte Mutationen im N-terminalen Bereich des Mrs2p sind zudem in der Lage die Magnesiumkonzentration um eindrittel

zu erhöhen. Auf diese weise gelag es auch Spleißdefekte im Intron bI1 aufzuheben (Gregan et al. 2001b). Durch komplementations Versuche konnte gezeigt werden, dass das Magnesiumtransporter Protein CorA aus *Salmonella typhimurium* teilweise die Funktion des Mrs2p übernehmen kann. Dabei liegen die Homologien zwischen diesen beiden Proteinen nur in der ersten Transmembran-Domäne und beschränken sich auf ein kurzes Sequenzmotiv (YGMN) (Bui et al. 1999). Damit könnten die beobachteten Spleißdefekte sowie das veränderte Spektrum an Cytochromen möglicherweise durch die Veränderung der Magnesiumkonzentration bedingt sein. Allerdings ist der größte Teil des Mrs2p in Richtung Matrix gerichtet und könnte dort eine Spleißfunktion wahrnehmen.

Aktuelle Daten unterstützen beide Hypothesen. So wurden mehrere Homologe zum *MRS2* Gen identifiziert, die alle in der Lage sind, den niedrigen Magnesiumspiegel, der durch die *MRS2* Disruption ausgelöst wird, zu kompensieren. Hierzu gehören das Lpe10p aus *S. cerevisiae* (Gregan et al. 2001a), das Mrs2 Homolog aus *Schizosaccharomyces pombe* (Lehmann et al. in Vorbereitung) und das aus *Arabidopsis thaliana* (Schock et al. 2000), sowie das humane Mrs2p (Zsurka et al. 2001). Trotz der Restaurierung des Magnesiumspiegels durch die Homologe findet aber nur eine sehr ineffiziente Spleißreaktion statt, die ausschließlich mittels RT-PCR nachweisbar ist. Somit müssen noch weitere Faktoren einen Einfluss auf die Spleißreaktion haben. In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, dass das Mrs2p aus *S. cerevisiae* eine C-terminale Verlängerung besitzt, die in den anderen Homologen nicht zu finden ist und in der sich das putative ARM befindet. Durch die Konstruktion eines Fusionsproteins aus dem Homolog aus *S. pombe* und der C-terminalen Region des *MRS2* aus *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, das die Spleißreaktion durch diese C-terminale Verlängerung deutlich stimuliert werden kann (Lehmann et al. in Vorbereitung).

Zusammen mit dem *MRS2* Gen wurden die Gene *MRS3* und *MRS4* als Suppressor Gene für die Mutation in der Domäne III des Gruppe II Introns bI1 identifiziert und isoliert (Söllner et al. 1987; Schmidt et al. 1987, Wiesenberger et al. 1991). Beide Gene sind nahezu strukturgleich und gehören einer Gruppe mitochondrialer ATP/ADP Carrierproteine an, zu denen mittlerweile auch Homologe im menschlichen Genom identifiziert werden konnten (Li et al. 2001). Sie beeinflussen das Spleißen offenbar indirekt, da sie nur wirken, wenn sie auf einem „high copy"-Plasmid lokalisiert sind. Dabei ist die Suppressor-Funktion dieser Membranproteine vermutlich auf eine gesteigerte Translokation von Kationen, wie z.B. Magnesium oder Polyaminen, zurückzuführen. Ihre Zerstörung führt zu keinem phänotypischen Defekt, was darauf hindeutet, dass sie nicht essentiell für Hefe sind (Wiesenberger et al. 1991). Die Gene *MRS3* und *MRS4* sind beide in der Lage,

Spleißdefekte, die durch die Zerstörung des *MRS2* Gens hervorgerufen werden, in einem gewissen Umfang zu beheben, während die Biogenese Funktion nicht restauriert wird (Waldherr et al. 1993).

Zehn weitere Gene konnten bei einem Genbank-Screening nach neuen „multicopy"-Suppressoren identifiziert werden, bei dem eine DNA Bibliothek aus einem Stamm verwendet wurde, in der die drei schon bekannten Gene *MRS2*, *MRS3* und *MRS4* disruptiert waren (Waldherr et al. 1993). Die neu gefundenen Gene lassen sich in zwei Gruppen einteilen:
1. Gene, die eine Restauration der Atmung mit allen Introns ermöglichen. Dazu gehören die Gene *MRS5*, *MRS7*, *MRS11*, *MRS12* und *MRS13*.
2. Gene, die nur in der Lage sind, den Atmungsphänotyp des intronlosen Stammes wiederherzustellen. Hierzu zählen die Gene *MRS6*, *MRS14*, *MRS15*, *MRS16* und *MRS17*.

Drei der Gene, die das Spleißen komplementieren sind bisher genauer untersucht worden.
Das *MRS12* Gen kodiert für ein Carrierprotein, das möglicherweise DNA Bausteine in die Mitochondrien transportiert. Es wurde außerdem mit der Genbezeichnung *RIM2* als Suppressor für einen temperatursensitiven Wachstumsdefekt identifiziert, der durch das Fehlen einer mitochondrialen DNA Helikase ausgelöst wird, die für die Reparatur, Rekombination und Stabilität der mtDNA verantwortlich ist. Es wird vermutet, dass die Art der Suppression ähnlich zu der des *MRS3* und *MRS4* Gens ist (Van Dyck et al. 1995).
Die beiden anderen gut untersuchten Gene sind *MRS5* (*TIM12*) und *MRS11* (*TIM10*). Sie kodieren für essentielle mitochondriale Transportproteine des Intermembranraums, die am Transfer von großen integralen Carrierproteinen in die innere Membran beteiligt sind (Jarosch et al. 1996; Jarosch et al. 1997; Sirrenberg et al. 1998). Gegenwärtig erscheint es möglich, dass die Suppression durch Tim10p und Tim12p auf einen vermehrten Transport der Proteine Mrs3p und Mrs4p in die innere Membran zurückzuführen ist. Dadurch könnte es zu einem Effekt kommen, der der ursprünglichen „high copy"-Suppression der Mrs3p und Mrs4p ähnlich ist.

1.3.2.2 Kernkodierte Spleißproteine in Chloroplasten

Neben den bisher untersuchten kernkodierten mitochondrialen Spleißfaktoren konnten kürzlich Kerngene identifiziert werden, welche die Spleißreaktion von Gruppe II Introns in Chloroplasten beeinflussen.

Genetische Screens in Mais führten zu der Entdeckung von zwei nukleären Genen, die durch ihre Mutation einen Spleißdefekt von Gruppe II Introns in den Chloroplasten auslösen. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden diese Gene als *CRS* Gene („chloroplast RNA splicing“) bezeichnet.

Die Mutation im nukleären *CRS1* Gen von Mais führt zu einem spezifischen Block in der Spleißreaktion eines einzigen Introns, das Gruppe IIA Intron im plastidären *atpF* Gen (Jenkins et al. 1997). Es kodiert für ein 77kDa Protein mit einer 4kDa Leadersequenz, das zu einer Familie von Pflanzenproteinen gehört, die ebenfalls in Eubakterien und Archea zu finden sind. Auffallend an dieser Gruppe von Proteinen ist der hohe Anteil basischer Aminosäuren, denen eine mögliche RNA-Bindung zugeschrieben wird. Im Crs1p konnten drei Wiederholungen des gleichen Sequenzmotivs identifiziert werden, die vermutlich durch Duplikation des in Bakterien nur einfach vorkommenden Sequenzmotivs entstanden sind. In ihnen ist jeweils ein KH Motiv (IGrxG) lokalisiert, das als eine typische RNA-Bindestelle bekannt ist (Abb. 7). Die Kofraktionierung von Intron und Protein als RNP im Saccharosegradienten lässt vermuten, dass eine direkte Beteiligung am Spleißprozess möglich ist. Eine Disruption des Gens führt zu einem vollständigen Verlust der atpF RNA, was auf eine zweite Funktion des Proteins hindeutet, die möglicherweise in der Stabilisierung der RNA oder der Translation liegt. Damit handelt es sich beim Crs1p um ein bifunktionelles Protein, so wie es für viele Spleißproteine gezeigt werden konnte (Till et al. 2001).

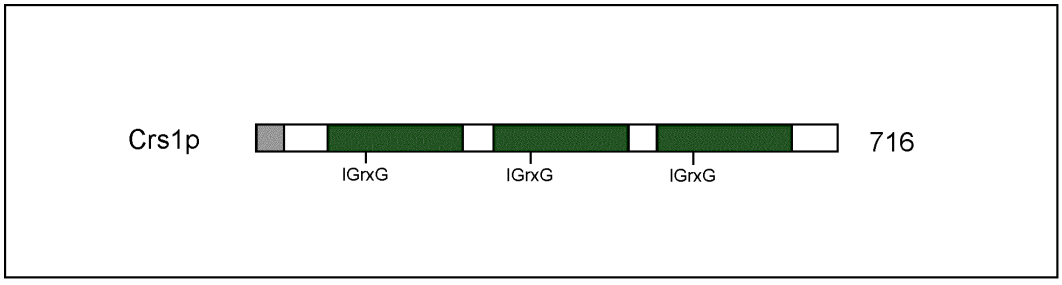


Abb. 7. Schematische Darstellung des Crs1p. Der graue Bereich kennzeichnet die Chloroplasten Targeting Sequenz. Die grünen Bereiche stellen die Sequenzwiederholungen dar, die jeweils ein KH-Motiv (lGrxG) enthalten.

Im Gegensatz zum *CRS1* Genprodukt ist das CRS2p nicht nur für die Speißreaktion eines, sondern mehrerer Gruppe II Introns essentiell. Die betroffenen Introns gehören ausschließlich zur Subgruppe IIB, was darauf hindeutet, dass das Crs2p strukturelle Eigenschaften dieser Gruppe spezifisch unterstützt (Jenkins et al. 1997). Datenbankanalysen ergaben, dass das Protein Homologie zu einer Peptidyl-tRNA-Hydrolase (PTH) aufweist. Allerdings konnte keine PTH

Funktion im *E. coli* System nachgewiesen werden, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass einzelne Aminosäuren in den konservierten Bereichen des Proteins fehlen. Trotzdem konnte wiederum durch Kofraktionierung im Saccharosegradienten gezeigt werden, dass eine spezifische RNA-Bindung stattfindet. Die Analyse der Spleißkomplexe ergab, dass neben dem Crs2p und den Gruppe II B Introns weitere, bisher nicht bekannte Proteine involviert sind. Interessanterweise besitzt die PTH eine C-terminale Verlängerung, die in anderen PTHs nicht zu finden ist. In diesem Bereich des Proteins konnte die Sequenz VQKYKF lokalisiert werden, die dem RNA bindendenden Motiv RYRYKF des Cbp2p von *S. cerevisiae* ähnelt (Kapitel 1.2.2.2) (Jenkins et al. 2001).

In *Chlamydomonas reinhardtii* ist das plastidäre *psaA* Gen, welches für ein Protein im Hauptreaktionszentrum des Photosystems I kodiert, von zwei ungewöhnlichen Gruppe II Introns unterbrochen. Es handelt sich um transspleißende Introns, die aus drei separaten Transkripten zusammengesetzt werden (Goldschmid-Clermont et al. 1991). An der Spleißreaktion dieser Introns sind mindestens 14 verschiedene Proteine beteiligt, deren Gene durch nukleäre Mutationen identifiziert werden konnten. Diese Gene lassen sich in drei Kategorien einteilen, je nachdem, ob sie für die Excision des ersten (Klasse C), des zweiten (Klasse A) oder beider Introns (Klasse B) erforderlich sind (Rochaix et al. 1996).

Zwei dieser Gene konnten mittlerweile näher charakterisiert werden. Das vom *RAA2* Gen („RNA maturation of psaA“, früher *MAA2* „maturation of psaA“) kodierte Protein ist für die Reifung der Exons E2 und E3 notwendig, womit es ein Klasse A Spleißprotein darstellt. Es handelt sich um ein bifunktionelles Protein, das zum einen die Spleißfunktion erfüllt, zum anderen als Pseudouridin-Synthase (PUS) fungiert. Es konnte durch Mutationsanalysen gezeigt werden, dass die Spleißfunktion nicht mit der PUS Funktion gekoppelt ist. Interessanterweise konnte das Protein in der „low density“ Membran Fraktion der Chloroplasten lokalisiert werden, einer Fraktion, die der inneren Membran der Thylakoidstapel entspricht. Allerdings erfolgt die Assoziation mit der Membranfraktion nicht über Transmembran-Domänen, sondern über ionische Interaktionen. Ein direkter Nachweis einer Protein-RNA-Bindung konnte bisher zwar nicht erbracht werden, aber es wurde nachgewiesen, dass sich die RNP Spleißkomplexe der psaA RNA ebenfalls in der „low density“ Membran Fraktionen befinden. Indem die Magnesiumkonzentration abgesenkt wird, kann dann das Protein aus dem RNP Komplex befreit werden, was auf eine Destabilisierung des Introns zurückgeführt wird (Perron et al. 1999).

Das andere bisher untersuchte Gen ist das *RAA3* Gen. Das Genprodukt wird zum Spleißen der Exons E1 und E2 benötigt (Klasse C). Das kodierte Protein ist 176 kDa groß und zeigt kurze Sequenzhomologien zu Pyridoxamin-5'-Phosphatoxidasen. Der funktionelle Nachweis einer solchen Aktivität steht bisher noch aus. Ebenso wenig konnten bisher spezielle RNA-Bindestellen ermittelt werden. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die stark basische Struktur des Proteins, mit seinen vielen Arginin- und Serinresten für eine RNA-Bindung in Frage kommt. Das Raa3p konnte im Stroma der Chloroplasten lokalisiert werden, wo es sich in einem 1700 kDa großen Komplex zusammen mit der psaA RNA und der *in trans* benötigten tscA RNA befindet. Damit erinnert dieser Komplex entfernt an das Spleißosom, da es sich hier ebenfalls um ein transgespleißtes Intron handelt und zum Spleißen ein nukleär adaptiertes Protein benötigt wird (Rivier et al. 2001).

Ein vollkommen anderer Ansatz zur Isolation von Gruppe II Intron Spleißfaktoren wurde folgendermaßen durchgeführt (Bunse et al. 2001): Das Gruppe II Intron der Grünalge *Scenedesmus obliquus* rI1 wurde in die Chloroplasten von *C. reinhardtii* in das tscA Gen transferiert und zusätzlich mit einem Nukleotid Austausch in Position eins versehen. Dadurch reichern sich in den Chloroplasten Spleißprodukte und Spleißintermediate des sonst gut spleißbaren Introns an. Es gelang diese RNA/Protein-Komplexe zu extrahieren und sie zu Komplementationsversuchen einzusetzen. Auf diese Weise konnten zwei Proteine identifiziert werden, die spezifisch mit einer RNA interagieren, die aus den Domänen IV, V und VI besteht. Es handelt sich dabei um ein 31 kDa und ein 61 kDa Protein. In weiterführenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass das 61 kDa Protein mit der Domäne V des Intron interagiert, während das 31 kDa Protein zusätzlich auch an andere Domänen bindet. Der Nachweis, um welche Proteine es sich hierbei handelt, steht noch aus und ist Gegenstand von aktuellen Untersuchungen.

1.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die *in vitro* autokatalytisch aktiven Introns haben *in vivo* eine Vielzahl verschiedener Anpassungsformen durchlaufen. So gibt es alle Stufen der Entwicklung von Introns als mobile Elemente, die eine Urform darstellen, bis hin zu aufgesplitteten Introns, die bereits eher an Kernintrons als an die anfängliche Ribozymform erinnern.

Für alle diese Stadien sind entsprechende Proteine angepasst worden. So reicht das Spektrum von dem Einprotein-Spleißsystem, wie bei den Maturasen, dem Cbp2p und Cyt18p, über Mehrprotein-Komplexe, wie z.B. beim Nam2p/Maturase Komplex, bei dem beide Proteine noch ihre ursprüngliche Aufgabe erfüllen können, über den Mrs1p/Maturase Komplex, bei dem beide Proteine ihre ursprüngliche Funktion verloren haben, bis hin zu den großen Komplexen der Chloroplasten, bei denen, z.B. im Fall vom Raa3p, verschiedene Proteine und verschiedene RNAs für den Spleißvorgang notwendig sind.

So unterschiedlich diese Entwicklungsstufen sind, so vielfältig scheinen auch die Bindungsmechanismen zu sein. Besonders gut ist dies bei den Gruppe I Intron Spleißproteinen zu beobachten, bei denen die Maturase des Ancob Introns vollkommen andere Bindungscharakteristika als das Cbp2p aufweist, und beide wiederum vollkommen unterschiedliche Mechanismen zum Cyt18p zeigen. Ihnen gemeinsam scheint einzig und allein die Stabilisierung bzw. die Überführung der Intron RNA in die katalytische Form zu sein, wobei die Proteine an der Katalyse selbst nicht teilnehmen. Das Gleiche scheint sich auch für Gruppe II Introns heraus zu kristallisieren, da den Maturasen dieser Introns ähnliche Aufgaben zugeordnet werden konnten.

In diesen Zusammenhang wurde von Atsumi et al. (2001) ein wichtiger Versuch gemacht. Sie deletierten die stabilisierende Domäne eines Gruppe I Introns und ersetzten diese durch zwei spezifische ARM Akzeptoren aus HIV Rev und λN. Anschließend konstruierten sie ein Protein mit den entsprechenden ARM am jeweiligen Ende. Sie konnten zeigen, dass die durch die Deletion ausgelösten Spleißdefekte effektiv durch das Protein supprimiert werden, in dem es einfach die zerstörte Struktur ersetzt.

Auch hier zeigt sich der mögliche Verlauf der Evolution. Die anfänglich selbstständigen mobilen Elemente verloren, sobald sie in die Zellen eingewandert waren, ihre Autonomie, z.B. durch den Verlust einzelner Domänen. Da sie aber zumeist in essentiellen Genen lokalisiert sind, mussten Proteine an diesen Vorgang adaptiert werden. Vorzugweise wurden dazu Proteine herangezogen, die von vornherein eine RNA-Bindekapazität besitzen, wie z.B. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Peptidyl-tRNA-Hydrolasen oder RNA-Helikasen. In einigen Fällen erfolgte die Anpassung offensichtlich auch durch eine N- oder C-terminale Verlängerung des Proteins, wie z.B. beim

Cyt18p, Nam2p, dem Crs2p und möglicherweise dem Mrs2p. In diesen Fällen sind vermutlich weitere RNA-Bindedomänen generiert worden, die dabei helfen, die RNA durch das konzertante Zusammenspiel der verschiedenen RNA-Bindestellen in die aktive Struktur zu überführen.

In nächster Zeit werden sicherlich weitere Proteine identifiziert und analysiert, die an den Spleißprozessen der Gruppe I und II Introns beteiligt sind. Besonders auf dem Gebiet der Gruppe II Introns konnten bis jetzt wenig konkrete Spleißkomplexe analysiert werden. Dies ist jedoch aus evolutionsbiologischer Sicht besonders interessant, da eine enge verwandtschaftliche Beziehung dieser Introns zu den Kernintrons besteht.
Ein weiterer aufregender Aspekt ist, dass ein besseres Verständnis der Spleißreaktion von Gruppe I und II Ribozymen dazu führen kann, dass regulierbare Systeme entwickelt werden können, die in der Lage sind spezifisch DNA und RNA zu spalten. Erste Erfolge auf diesem Gebiet wurde von Guo und Kollegen (2000) erreicht, die gezielt durch die katalytische Aktivität eines Gruppe II Introns die RNA eines HIV Virus *in vivo* spalten konnten.

2 Problemstellung

2.1 Gruppe II Introns und ihre Spleißfaktoren in *S. cerevisiae*

Gruppe II Introns sind weit verbreitet, trotzdem wurden sie erst in den 80iger Jahren entdeckt, da sie kaum gemeinsame Primärsequenzen aufweisen (vergleiche Kapitel 1.3). Erst über ihre Sekundärstruktur und ihr Spleißverhalten und lassen sie sich zu einer gemeinsamen Gruppe zusammenfassen (Michel et al. 1982, Dai und Zimmerly 2002). Dabei sind viele der Gruppe II Introns in der Lage die Spleißreaktion *in vitro* vollkommen selbstständig durchzuführen. Somit handelt es sich bei Gruppe II Introns um echte Ribozyme.

Die Besonderheit dieser natürlich vorkommenden Ribozyme besteht darin, dass sie die gleichen Umesterungsschritte während der Spleißreaktion durchlaufen, wie Kernintrons mit dem Spleißosom, wobei sie ebenfalls als Lariat aus dieser Reaktion hervorgehen. Aufgrund dieser Homologien in der Spleißreaktion wird davon ausgegangen, dass die Gruppe II Introns Vorläufer der Kernintrons sind oder dass beide Introngruppen zu mindestens aus einem gemeinsamen Vorfahren hervorgingen. Eine der interessantesten Hypothesen geht davon aus, dass es sich bei Gruppe II Introns ursprünglich grundsätzlich um mobile Elemente handelte. Im Verlauf der Evolution verloren dann viele der Introns abhängig von ihrer Lokalisation (Kapitel 1.3.1.1) nach und nach ihre Fähigkeit zur Mobilität und zunehmend die Fähigkeit selbst zu spleißen. Parallel dazu erfolgte die Adaption zelleigener Proteine, die als Spleißfaktoren fungieren. Möglicherweise ging die Entwicklung so weit, dass mit der Zeit Introns sogar fragmentiert wurden und aus diesen ursprünglichen Retroelementen die heutigen Kernintrons hervorgingen.

In *Saccharomyces cerevisiae* sind insgesamt vier Gruppe II Introns vorhanden, die alle in den Mitochondrien lokalisiert sind, - aI1, aI2 und aI5γ im *COX1* Gen, das für die erste Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase kodiert, und bI1, im COB Gen, welches das Apoprotein des Cytochrom B kodiert. Für alle Introns konnte *in vitro* Autokatalyse nachgewiesen werden. Diese Reaktionen laufen aber nur unter relativ unphysiologischen Bedingungen ab. Typische Standardspleißbedingungen sind z.B. 45 °C und mehr als 100 mM Magnesium. Darüber hinaus kommen auch andere Zusätze wie Spermidin und monovalente Kationen zum Einsatz. Damit ist es scheint es erwiesen, dass diese Gruppe II Introns *in vivo,* wie Kernintrons, Proteinfaktoren zur Spleißreaktion benötigen.

Die Introns aI1 und aI2 besitzen einen eigenen Leserahmen dessen Protein als Maturase (Kapitel1.3.1.2) wirkt. Außerdem ist es in der Lage als Reverse Transkriptase und als DNA Endonuklease zu arbeiten und so die Intronmobilität zu ermöglichen.

Die Introns bI1 und aI5γ hingegen können keinen ORF aufweisen. D.h. sie müssen sich anderer Spleißfaktoren bedienen, von denen bekannt ist, dass es sich nicht um mitochondriale sondern um kern-kodierte Proteine handelt (Hensgens et al. 1983). Damit stellen diese Introns möglicherweise eine evolutionäre Zwischenstufe dar, bei denen der ORF verlorengegangen ist und andere Proteine zur Unterstützung der Spleißreaktion adaptiert wurden.

Bisher konnten drei kern-kodierte Proteinfaktoren in *S. cerevisiae* identifiziert werden, die möglicherweise direkt mit der Intron RNA interagieren (Tab. 1).

Gen	Lokalisation	beeinflusste Introns	Andere Funktionen	Referenz
MSS116	Matrix	Gruppe I, Gruppe II (aI1, bI1)	RNA-Helikase (DEAD-box)	Seraphin et al. 1989 ; Niemer et al. 1995;
MRH4	Matrix	Gruppe II (aI5γ)	RNA-Helikase (DEAD-box)	Schmidt et al. 2002
MRS2	innere Mitochondrien Membran	Gruppe II (aI5γ, bI1)	mt Biogenese, Mg Transport	Wiesenberger et al. 1992; Schmidt et al. 1998; Bui et al. 1999

Tab. 1. Übersicht über kernkodierte Spleißfaktoren für Gruppe II Introns in *S. cerevisiae*. Die in Klammern stehenden Introns wurden genauer im Zusammenhang mit dem Protein untersucht.

Bei den Proteinen Mss116 und Mrh4 handelt es sich um mitochondriale RNA-Helikasen, die als Matrixproteine vermutlich an der Transkription bzw. Translation beteiligt sind. Sie besitzen somit RNA-Bindestellen und könnten eine Spleißfunktion adaptiert haben, wie es für die meisten anderen nukleären Spleißfaktoren beschrieben wurde (siehe: Theoretischer Teil 1.2.2, 1.3.2). Dagegen handelt es sich bei dem Mrs2 Protein um ein Membranprotein, in dem bisher keine speziellen RNA-Bindemotive nachgewiesen werden konnten und über dessen genaue Aufgabe in der Mitochondrienbiogenese bisher nur spekuliert wird.

2.2 Das Mrs2 Protein

Das Mrs2p wurde ursprünglich als ein „high copy"-Suppressor für eine spleißdefekte Mutante des Gruppe II Introns bI1 im Stamm DBY747 entdeckt (Wiesenberger et al. 1992). Interessanterweise beeinflusst der „knock out" des *MRS2* Gens das Spleißen aller Gruppe II Introns, nicht jedoch das Spleißen der Gruppe I Introns. Damit scheint es sich um ein Protein zu handeln, das spezifisch am Spleißvorgang der Gruppe II Introns beteiligt ist. Bestätigt werden konnte dies durch die Analyse von Hefestämmen (DBY947), die aufgrund von Punktmutationen in der Domäne 5 des Introns aI5γ spleißdefekt sind. Hier konnten spontane Revertanten isoliert werden (Abb. 8), die das

Spleißen restaurieren. Die Untersuchung von einem Teil der Revertanten ergab, dass es sich um Isolate handelt bei denen das *MRS2* Gen verändert wurde. (Boulanger et al. 1995, Schmidt et al. 1998). Die Sequenzierung von drei Suppressor *MRS2* Genen ergab, dass es sich um Missense-Mutationen handelt, die alle in der gleichen Region des Proteins liegen, weshalb dieser Bereich auch als „Suppressor-Domäne“ bezeichnet wird. Dabei erfolgte der Aminosäureaustausch für die B-loop Mutation auf Position 232 von Phenylalanin zu Leucin (Mrs2-F232L), für die Intronmutation C4A mit$^-$ auf Position 230 von Treonin zu Isoleucin (Mrs2-T230I) und für die Intronmutation G3A mit$^-$ auf Position 213 von Leucin zu Methionin (Mrs2-L213M). Diese Suppressor-Mutationen restaurieren alle einen glycerinpositiven Phänotyp, der allerdings temperatursensitiv ist, d.h. bei 36 °C erfolgt kein Wachstum auf Glycerinagar. Interessanterweise wird diese Temperatursensitivität nicht von einem Spleißdefekt ausgelöst, sondern durch eine Störung einer anderen spleißunabhängigen Funktion, da die Excision des Introns aI5γ in den Suppressor-Stämmen auch bei 36 °C sehr effizient erfolgt.

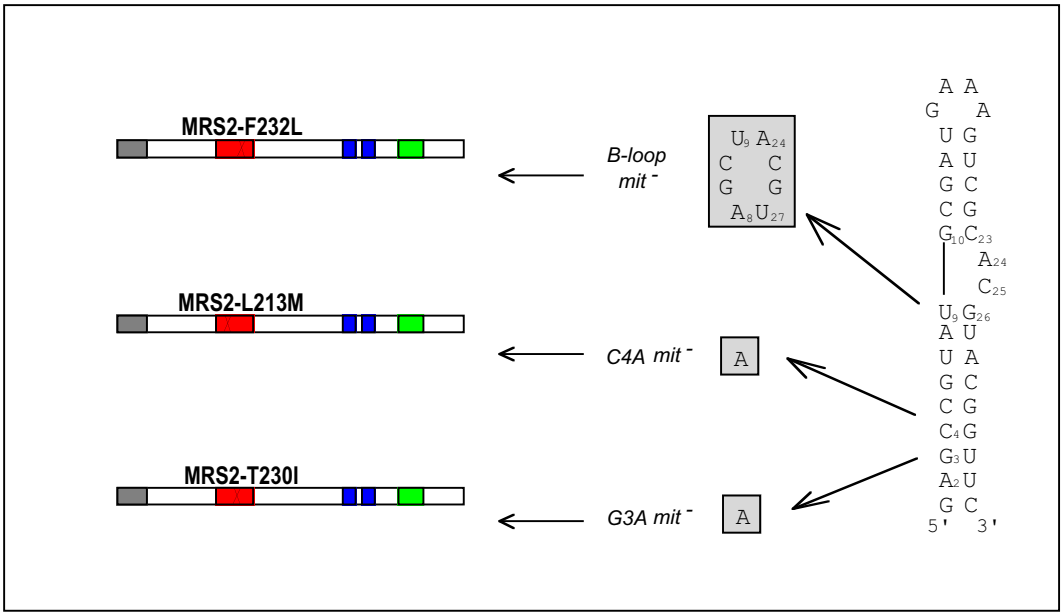


Abb. 8. Punktmutationen in der Domäne V des Introns aI5γ, die zu einer Blockierung der Spleißreaktion *in vivo* führen, und zugehörige Revertanten, bei denen der Spleißdefekt durch eine Kernsuppression im Mrs2p aufgehoben wurde. Bei den hellgrau unterlegten Basen handelt es sich um die in der Domäne V mutierten Bereiche; korrespondierende Mutanten sind kursiv dargestellt. Das Mrs2p der drei Revertanten ist schematisch dargestellt: Grau: mitochondriale Targeting-Sequenz; Blau: Transmembran-Domänen; Grün: hydrophile Domäne; Rot: Suppressor-Domäne. Die in der Suppressor-Domäne gefundenen Aminosäureaustausche, die zur Wiederherstellung des Spleißphänotyps führen, sind im Einbuchstabenkode angegeben.

Neben der Temperatursensitivität zeigen die Suppressor-Mutanten eine erhöhte Stabilität des Mrs2 Proteins, das sich in den Mitochondrien anreichert. Die Anreicherung des Proteins ist jedoch nicht

die alleinige Ursache für die Wiederherstellung des Spleißphänotyps, da eine Überexpression des Wildtyp-Proteins auf eine des Suppressor-Proteins vergleichbare Konzentration nur zu einer schwachen Spleißreaktion führt. Damit scheinen die Suppressor-Proteine einen stärkeren Einfluss auf den Spleißphänotyp zu besitzen als das Wildtyp-Protein (Schmidt et al. 1998).

Da der „knock out" des *MRS2* Gens auch in Hefestämmen ohne Gruppe II Introns zu einem Verlust der Atmung führt, muss das Mrs2p eine weitere Aufgabe unabhängig vom Spleißen erfüllen. Dabei wird eine Beteiligung an der Biogenese der Mitochondrien favorisiert, speziell an der Cytochromsynthese, da kein Cytochrom aa3 und nur geringe Mengen an Cytochrom b ausgebildet werden, obwohl alle mitochondrialen Translationsprodukte vorhanden sind (Wiesenberger et al. 1992).

Weiterführende Datenbankanalysen ergaben, dass es sich bei dem Mrs2p um ein 470 Aminosäuren langes mitochondriales Protein handelt, das im Kern kodiert und im Zytoplasma translatiert wird. Über die N-terminal lokalisierte mitochondriale Targeting-Sequenz (MTS) erfolgt der Transport des Proteins in die Matrix der Mitochondrien. Anschließend wird das Protein in die innere Mitochondrienmembran inseriert, wobei das C- und N-terminale Ende des Proteins in den Matrixraum ragen. Dabei liegen die Transmembran-Domänen dicht beieinander (AS 315-336 und AS 346-362), so dass nur acht Aminosäuren im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert sind und der größte Teil des Proteins zum Matrixraum gerichtet ist (Abb. 9).

Am Ende der ersten Transmembran-Domäne befindet sich ein F/YGMN-Motiv, das in Bakterien als typisches Mg^{2+}-Transportsignal bekannt ist. Bis auf dieses kurze Motiv besteht allerdings kaum Homologie zu den bakteriellen Mg^{2+}-Transportern, die zudem üblicherweise drei und nicht nur zwei Transmembran-Domänen besitzen (Smith und Maguire 1998). Trotzdem konnte gezeigt werden, dass ein „knock out" in der Hefe zu einer Verminderung des Magnesiumspiegels in den Mitochondrien führt, der durch das Magnesiumtransport Protein CorA aus *Salmonella typhimurium* komplementiert werden kann (Bui et al. 1999). Mittlerweile konnte diese Mg^{2+}-Transporterfunktion bestätigt werden, da auch andere *MRS2* Homologe in der Lage sind, die Magnesiumkonzentration in den Mitochondrien zu restaurieren. Hierzu gehören: das humane *MRS2* Homolog (vom Chromosom 6, p22.1-p22.3) (Zsurka et al. 2000), das Homolog aus *Arabidopsis thaliana* (AtMRS2-1) (Schock et al. 2000), das Homolog aus *Schizosaccharomyces pombe* (SpMRS2) (Lehmann et al. in Vorbereitung) und sogar ein Homolog der Hefe *S. cerevisiae* selbst; das Lpe10 Protein (Gregan et al. 2001). Dabei zeigen die letztgenannten Homologe im Gegensatz zum CorAp nicht nur eine kurze Übereinstimmung in der ersten Transmembran-

Domäne, sondern eine starke Sequenzkonservierung über den gesamten Proteinbereich, die zwischen 30 % und 80 % liegt. Da die geringe Sequenzübereinstimmung des CorAp schon zu einer Komplementation der Magnesiumkonzentration ausreicht, wird vermutet, dass die Transmembran-Domänen hauptsächlich für die Mg^{2+}-Transportfunktion verantwortlich sind. Damit könnte der große zum Matrixraum gerichtete Proteinanteil weitere Aufgaben, unabhängig vom Magnesiumtransport erfüllen, wie Biogenese oder Spleißen.

Besonderer Beachtung sollte dabei der Tatsache geschenkt werden, dass die Transkription und Translation in den Mitochondrien ebenfalls an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (Fox 1996), wodurch eine räumliche Nähe zwischen RNA und Mrs2p denkbar ist. Dies unterstützt die Idee einer direkten Interaktion von Protein und Intron RNA im Spleißvorgang.

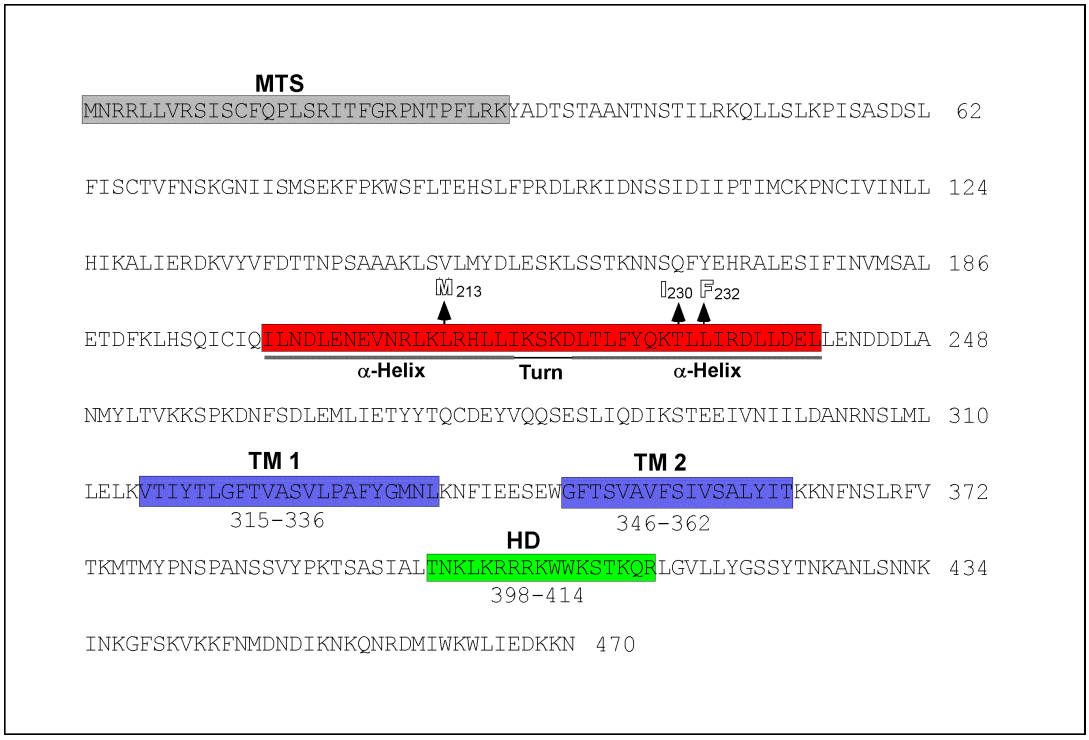


Abb. 9. Das Mrs2p. Gezeigt ist die Aminosäuresequenz des *MRS2* Gens aus dem Hefestamm DBY947. Die unterlegten Aminosäuren entsprechen den funktionellen Bereichen des Proteins: Grau: mitochondriale Targeting-Sequenz; Rot: Suppressor-Domäne, die Suppressor-Mutationen sind durch die Pfeile und den weißen Buchstaben angedeutet; Blau: Transmembran-Domänen eins und zwei (TM1 und TM2) (nach Bui et al. 1999); Grün: hydrophile Domäne (HD).

Die beobachteten Spleißeffekte könnten jedoch auch indirekter Natur sein, und ursächlich mit der Magnesiumkonzentration in den Mitochondrien zusammenhängen, da das Spleißen von Gruppe II Introns Magnesium abhängig ist.

Allerdings besitzen Gruppe I Introns prinzipiell die gleichen Anforderungen an die Magnesiumkonzentration wie Gruppe II Introns. Deshalb sollte ein Effekt, der durch eine zu geringe Magnesiumkonzentration ausgelöst wird, nicht nur Gruppe II Introns, sondern auch Gruppe I Introns beeinflussen.

Des Weiteren kann das Homolog aus der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (SpMRS2) zwar die Magnesiumkonzentration weitgehend normalisieren, aber nur in extrem geringen Umfang die Spleißreaktion des Mrs2p von *S. cerevisiae* übernehmen (Lehmann et al. in Vorbereitung).

Damit kann die Spleißfunktion des Mrs2p nicht nur durch die Beeinflussung der Magnesiumkonzentration erklärt werden, sondern das Protein muss weitergehende Aufgaben im Spleißprozess erfüllen.

2.2.1 Putative Domänen der RNA-Bindung im Mrs2p

Geht man davon aus, dass das Mrs2p direkt in den Spleißprozess involviert ist, so muss es mit der RNA interagieren und demgemäß auch RNA-Bindedomänen besitzen. Hierfür gibt es zwei putative Bereiche: Die Suppressor-Domäne und die hydrophile Domäne.

2.2.1.1 Die Suppressor-Domäne

Ein Bereich für eine potentielle RNA-Bindung ist die Suppressor-Domäne, da hier die genannten Reversionen zur Aufhebung der Spleißdefekte des Introns aI5γ gefunden wurden. Dieser Bereich des Proteins ist relativ hydrophil, zeigt leider aber keine Übereinstimmung zu einem der bekannten typischen RNA-Bindemotive. Allerdings bildet dieser Bereich ein putatives „helix-turn-helix"-Motiv (DSC structure prediction program; King und Sternberg 1996), wie es häufig für die Homo- oder Heterodimerisierung von Proteinen gefunden wird. Es besteht aus den Aminosäureresten 200-218 und 223-241, welche die helikalen Bereiche bilden und dazwischen einem vier Aminosäure langem „turn". Möglicherweise stören die Suppressor-Mutationen eine Dimerisierung des Proteins, wodurch dann eine verbesserte RNA-Bindung stattfinden könnte (Schmidt et al. 1998).

2.2.1.2 Die hydrophile Domäne

Ein weiterer interessanter Bereich ist eine C-terminale Verlängerung des Proteins von *S. cerevisiae* um 50-60 Aminosäuren, die in keinem der anderen Homologen zu finden ist. Besonders interessant ist ein Bereich, der auffällig viele positivgeladene Aminosäuren enthält (Aminosäure 398 bis 414). In diesem kurzen Abschnitt sind vier Arginine und fünf Lysine

lokalisiert, die in einer α-helikalen Struktur angeordnet sind. Diese positiv geladenen Aminosäuren bilden ein putatives „arginine-rich-motif“ (Abb. 10) (Schmidt et al. 1998). ARMs sind RNA-Bindemotive, die über ihre positive Ladung in den Bereichen mit der RNA interagieren können, in denen die Struktur der „major groove“ gestört ist, wie z.B. in der Nähe von „bulges“ oder „loops“. Dabei spielen die Arginine eine entscheidene Rolle. Sie binden die RNA über die geladene Guanidinium Gruppe, die sich flexibel an einer langen aliphatischen Seitengruppe befindet, nicht nur über Wasserstoffbrücken, sondern auch über van der Waals und schwach polare Interaktionen. Typische Beispiele für dieses ARMs sind die Bakteriophagen Antiterminatoren λ und ϕ21, das Hepatitis Delta Antigen und die Proteine HIV Tat und Rev. ARMs sind allerdings nicht auf Viren beschränkt, sondern sie sind ubiquitär verbreitet. Sie finden sich auch in Säugerzellen, wie z.B. im Translations Initiations Faktor eIF-4B (Übersicht Weiß und Narayana 1999).

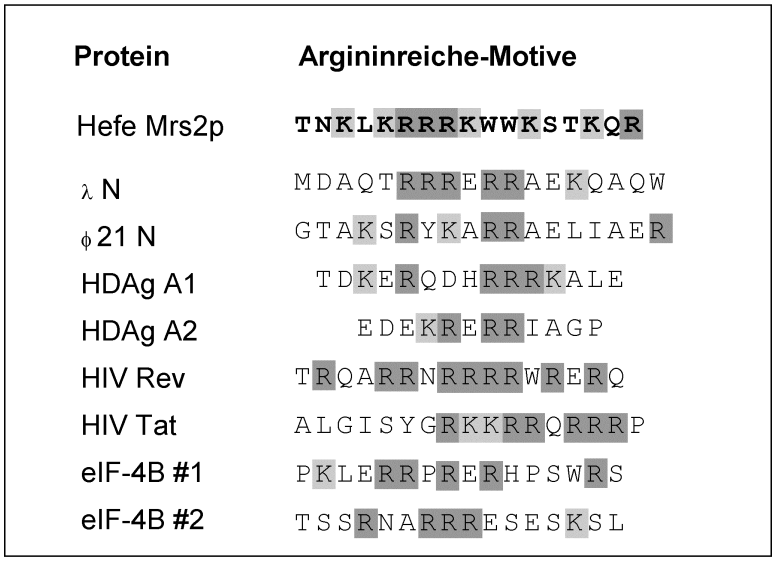


Abb. 10. Übersicht über ARMs aus verschiedenen Organismen. Arginine sind dunkelgrau unterlegt Lysine sind hellgrau.

Auffällig ist, dass sich das putative ARM des Mrs2p in einem Bereich des Proteins befindet, der in den homologen Proteinen nicht vorhanden ist. Dieses könnte ein Hinweis darauf sein, dass das Mrs2p speziell für den Spleißvorgang in *S. cerevisiae* angepasst wurde. In den anderen Organismen, in denen Mrs2 Homologe gefunden wurden, ist die Spleißfunktion des Proteins möglicherweise nicht erforderlich, zumal hier keine ORF-losen Gruppe II Introns vorhanden sind.

2.3 Zielsetzung

Das Intron aI5γ der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt keinen ORF und somit keine Maturase. Es stellt damit nach der aktuellen Hypothese (Kapitel 1.3 und 2.1) eine evolutionäre Stufe dar, in der das Intron an zelluläre Verhältnisse adaptiert wurde, in denen zelleigene Proteine die Spleißfunktion übernommen haben. Eines dieser Proteine ist das Mrs2p dem eine grundlegende Funktion in der Katalyse von Gruppe II Introns zugeschrieben wird.

In der vorliegenden Arbeit soll die Funktion des Mrs2p bezüglich seiner Spleißfähigkeit eingehender charakterisiert werden. Dazu werden die potentiell funktionellen Bereiche des Proteins, die für den Spleißvorgang notwendig sind, durch Deletionen und anschließenden Atmungs- und Spleißtest *in vivo* analysiert. Eine detailliertere Analyse des Proteins durch Punktmutationen wird angeschlossen.

Eine Magnesiumbestimmung von ausgewählten Mutanten soll anschließend klären, ob die beobachteten Effekte auf eine Veränderung des Magnesiumspiegels zurückzuführen sind.

Um die Matrix Anteile des Mrs2p auf ihre Fähigkeit zur RNA-Bindung zu überprüfen, wird das Protein heterolog exprimiert und zusammen mit der *in vitro* transkribierten RNA zu Bindungsstudien mittels Gelretardation verwendet.

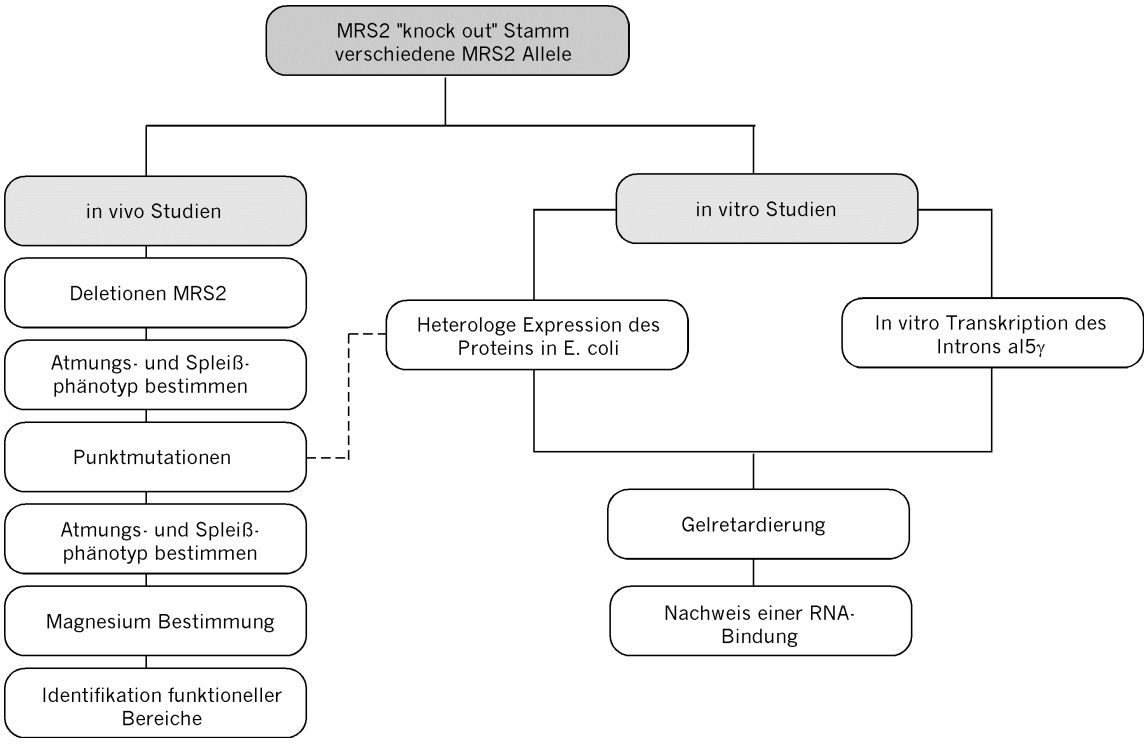


Abb. 11. Fließschema der geplanten Arbeit

3 Material und Methoden

3.1 Stämme

Folgende *Escherichia coli* Stämme wurden verwendet:

E. coli NM522	*supE thi-1* Δ(*lac-proAB*) Δ(*mcrB-hsdSM*)*5* (*rk*$^-$ *mk*$^-$) [F'*proAB lacI*^{q} ZΔ*M15*]
E. coli CJ236	*dut*$^-$ *ung*$^-$ *thi-1 rel A1*[pCJ 105 Cam^r F']
E. coli Bl21(DE3)	*E. coli* B F$^-$ *dcm ompT hsdS* (rB- mB-) *gal* λ (DE3)

Folgende Hefestämme wurden verwendet:

S. cerevisiae DBY947	*MAT*α *ade2-101 ura3-52*
S. cerevisiae MY375	*MATa kar1-1 ura3-52 his4*

Beide Stämme besitzen das gleiche mitochondriale Genom, dessen *COX1* Gen allerdings nur drei der zehn für dieses Gen bekannten Introns enthält. Dabei handelt es sich um die beiden Gruppe I Introns aI3α und aI4α, sowie das Gruppe II Intron aI5γ. Nach diesem einzigen in der mtDNA befindlichen Gruppe II Intron wurde dieser Genomtyp als GII5γ bezeichnet.
Folgende von dem Stamm DBY947 GII5γ abstammenden Mutanten und „knock out" Stämme wurden verwendet:

Stamm	Charakterisierung	Eigenschaften
DBY947 B-loop mit$^-$	Durch Insertion der Nukleotide G und C in der Domäne V des Introns zwischen den Positionen 8 und 9 entstand ein interner „Loop"	Atmungs- und Spleißdefekt
DBY947 B-AC*	Enthält einen Nukleotidaustausch von CG zu AC in der „bulge region" der Domäne V des Intron aI5γ in Position 25 und 26	Atmungskompetent und Spleißreduziert
DBY947 mrs2::	Hier wurde ein „knock out" des gesamten ORF des MRS2 Gens durchgeführt	Atmungskompetent und Spleißreduziert
DBY947 mrs2:: B-AC*	Besteht aus einer Kombination des „knock out" und des veränderten Introns B-AC*	Atmungs- und Spleißdefekt

Tab. 2. Auflistung der Eigenschaften der verwendeten Hefestämme

Zusätzlich standen von den Hefestämmen ρ° Isolate (ohne mtDNA) zur Verfügung, die als Kontrollen und Kreuzungspartner eingesetzt wurden.

3.2 Plasmide

3.2.1 pRS416

Dieser *E. coli/S. cerevisiae* Shuttlevektor (Stratagene) trägt das *LacZ'* Gen von *E. coli*, in das ein Polylinker integriert wurde. Dadurch können rekombinante *E. coli* Klone in Gegenwart von X-Gal und IPTG mittels Blau/Weiß Screening identifiziert werden. Dies basiert auf α-Komplementation in *E. coli* Stämmen, die im *LacZ* Gen die M15-Deletion enthalten. Der Polylinker wird von T7- und T3-RNA-Promotoren flankiert. Darüber hinaus enthält das Plasmid einen *E. coli* Replikationsursprung und ein Ampicillinresistenz-Gen (*Amp*). Für die Vermehrung in Hefe verfügt das Plasmid über eine autonom replizierende Sequenz (*ARS*), sowie über die Centromerstruktur des Chromosoms VI (*CEN6*). Sie ermöglicht eine niedrige Kopienzahl (1-2 Kopien) in der Hefezelle und eine stabile Verteilung der Plasmide auf die Tochterzellen. Als Selektionsmarker für Hefe befindet sich das Orotidin-5′-phosphat Decarboxylase Gen (*URA3*) auf dem Plasmid (Sikorski und Hieter, 1989).

3.2.2 pRS426

Das Plasmid pRS426 ist ein strukturgleicher Shuttlevektor zum pRS416, bei dem die *ARS*-Sequenz und die Centromerstruktur gegen einen Teil der 2µm DNA ausgetauscht wurde. Sie ermöglicht eine hohe Kopienzahl (ca. 20) in der Zelle (Christianson et al., 1992). Dieser Vektor wurde uns freundlicherweise von Dr. Sommer, Max-Delbrück-Centrum, Berlin zur Verfügung gestellt.

3.2.3 pRSET A

Bei dem *E. coli* Expressionsvektor pRSET A (Invitrogen) wird zur Expression der T7-Promoter verwendet. Er befindet sich stromaufwärts des ATG, der Kodierung eines 6xHis-Tags, einer Enterokinase-Schnittstelle, sowie einer „multiple cloning site“. Als Selektionsmarker wird das Ampicillinresistenz Gen verwendet.

3.2.4 pGEX-2T

Dieses Plasmid ist ein *E. coli* Expressionsvektor (Amersham/Pharmacia), bei dem der IPTG induzierbare Tac-Promoter zur Expression genutzt wird. Er ist vor dem Glutathion-S-transferase Gen (GST) lokalisiert, an das sich eine Codierung für eine Trombin-Spaltstelle und eine „multiple cloning site“ anschließt. So lässt sich das gewünschte Genprodukt als GST-Fusionsprotein exprimieren. Ein Lac I Gen erzeugt den Repressor für den Tac-Promotor, so dass eine vorzeitige Expression unterdrückt wird. Als Selektionsmarker wird das Ampicillinresistenz Gen verwendet.

3.2.5 pJD20

Das Plasmid pJD20 (Jarrell et al. 1988) basiert auf dem pBlueskript KS Vektor, in dessen „multiple cloning site“ das Intron aI5γ kloniert wurde dabei wurden 296 bp vom 5’-Exon und 335 bp vom 3’-Exon mit eingeführt. Durch den T7-RNA-Polymerase Promotor ist es möglich die Exon/Intron Sequenzen *in vitro* zu transkribieren, nachdem das Plasmid mit HindIII linearisiert wurde. Als Selektionsmarker dient das Ampicillinresistenz Gen. Das Plasmid pJD20 wurde uns freundlicherweise von Prof. Perlman (SWMC, Dallas) zur Verfügung gestellt.

3.2.6 pSUB1-1

pSUB1-1 besteht aus dem Vektor pGMT in den das β-Galaktosidase Gen (Uid1) von *E. coli* kloniert wurde. Es wurde als Template für die PCR mit den Oligonukleotiden GEMSEQII/UID1 verwendet. Aus dieser PCR erhält man ein Amplifikat von 491 bp. Wenn dieses Fragment zur einer *in vitro* Transkription mit der T7 Polymerase genutzt wird, entsteht ein 217 nt großes RNA Fragment. Dieses Plasmid wurde uns freundlicherweise von Dipl.-Ing. D. Müller von der TU Berlin zur Verfügung gestellt.

3.3 Verwendete Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalien, Medien:	Hefeextrakt für Hefeanzuchten, Difco
	YNB ohne Aminosäuren, Difco
	Casamino Acids, Difco
	Pepton, Difco
	Agarose ME, Seakem, rein
	IPTG, ultra rein, American Biorganics, Inc.
	X-Gal, American Biorganics, Inc.

Alle weiteren Chemikalien wurden von Aldrich, Merck, Oxoid, Roth, Serva oder Sigma analysenrein bezogen.

Enzyme:	Roche, Gibco, Fermentas und Biolabs
Fotografisches Material:	Röntgenfilme, Kodak
Radioaktive Nukleotide:	Desoxyadenosin 5' (α-^{35}S) Triphosphat, Amersham
	Desoxyadenosin 5' (γ-^{32}P) Triphosphat, Amersham
	Uridin 5'(α-^{32}P) Triphosphat, Amersham
Reaktionskits:	Plasmidisolierungskit, Nucleobond
	T7-Sequenzierungskit, Pharmacia
	PCR-Reinigungs-Kit, Genomed
	DNA-Gel-Elutions-Kit, Genomed
	Streptavidin gekoppelte Beads, Promega

3.3.1 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von Metabion bezogen. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in 5' → 3' Richtung angegeben:

3'Exon:	CCT AAA ATT TGA GGA CTT C	RT-Reaktion/ PCR aI5γ
3'Splice:	GAT AAT ACA TAG TAT CCC G	PCR für IVT
BamHI-1:	GCG GGA TCC GTG ACA AAG ATG ACC	5'PCR HD (Klonierung)
D3/4 revers:	TAT ACT ATA GGT GAT ATG	PCR für IVT
E4:	ACC CTG TAC CAG CAC CTG	Sonde f. COXI Exon4
GEMSEQII	AAAGGAGCGGGCGCTAGG	PCR β-Galactosidase
K406A:	GAT TTC CAC CAG GCC CGC CTT CGC	Mutagenese
L232A:	CTC TAA TAG CTA AAG TTT TTT GG	Mutagenese
L232A-Ko:	CCA AAA AAC TTT AGC	Kontrolle der Mutagenese
L401A:	GCC TTC GCT TGG CCT TAT TTG TCA G	Mutagenese
M13:	GTA AAC GCG GCC AGT Sequenzierung/PCR	
M13 reverse:	GGA AAC AGC TAT GAC CAT G	Sequenzierung/PCR
MRS2.1:	B-CGG GAT CCA AGA CAA GAA AGT TC	5'PCR MRS2

MRS2.2:	GAA TTC AAG GAG AAG CTT TCC	3'PCR MRS2/HD
MRS2.3:	GCT AAT AAT ATT GTA TAG	Sequenzierung
MRS2.4:	GGG CAA TAG ACG CTG	Sequenzierung
MRS2.5:	CCC AAC GTG TAG ATG G	Sequenzierung
MRS2.6:	GTT CAT CTA ATA GAT CTC	Sequenzierung
MRS2.7:	CTT GGT GGA GGA CAA C	Sequenzierung
MRS2.8:	GGA AAC TTC TCG GAC	Sequenzierung
MRS2.9:	ACG GAT CCA AGA ATT AAA ATT T	3'PCR
MRS2.10:	GGA TCC ATG GAA TTT CTA TTT GCG TC	3'PCR SD BamHI
MRS2.14:	GAA TTC CAA CAA CAT TAA GGA ATT	3'PCR SD EcoRI
MRS2.15:	GTC CGA GAA GTT TCC	Sequenzierung
MRS2.16:	GAG ATC TAT TAG ATG AAC	Sequenzierung
MRS2.17:	CTA AAG CGA AGG CGG	Kontrolle der Mutagenese
-MTS (21AS):	GCG GAT CCG GAA GAC CAA ACA CG	5'PCR MRS2/SD (-21AS)
OLI2:	GGT AAT GGT GTA CCA GCA GG	Ballancierung der RNA
R210A:	CAG TTT AAG TGC ATT GAC CTC GTT	Mutagenese
R210A-Ko:	AAC GAG GTC AAT GC	Kontrolle der Mutagenese
R403-405A (HD1):	GGT TGA TTT CCA CCA CTT GGC AGC TGC CTT TAG TTT ATT TGT CAG	Mutagenese
R404,405A (HD2):	TCC ACC ACT TGG CAG CTC GCT TTA GTT T	Mutagenese
R405A (HD3):	TCC ACC ACT TGG CCC TTC GCT TTA G	Mutagenese
R405K:	CAC CAC TTC TTC CTT CGC TTT	Mutagenese
SNAB:	GTT TTA TTC TGT TTT ATC	PCR für IVT/Intron Sonde
T230A:	CTA ATA AAT AAA GCC TTT TGG TAA AAA AG	Mutagenese
T230A-Ko:	CTT TTT TAC CAA AAG G	Kontrolle der Mutagenese
T398A:	TAG TTT ATT TGC CAG GGC AAT	Mutagenese
T411A:	CCG CTG CTT GGC CGA TTT CCA CC	Mutagenese
T7-3'Splice:	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT AAT ACA TAG TAT CCC G	PCR für IVT aI5γ revers
T7-D1/2:	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT AAA ACA GAA TAA ACC	PCR für IVT D23
T7-D3/4:	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAT ATA CTA TAG GTG ATA TG	PCR für IVT D456
T7-USI5γ:	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG GGT GGT TTA ACT GGT G	PCR für IVT D1/aI5γ
UID1	ATATCTGCATCGGCGAACTG	PCR β-Galactosidase
USI5γ:	GGG TGG TTT AAC TGG TG	PCR aI5γ (+ 5'Exon)
USII5γ:	GCG GTC TGA AAG TTA TCA	PCR aI5γ (- 5'Exon)
W408A:	GGT TGA TTT GGC CCA CTT CCG C	Mutagenese

Das mit B gekennzeichnete Oligonukleotid MRS2.1 ist am 5'-Ende biotinyliert. Bei den unterstrichenen Sequenzen handelt es sich um eingeführte Restriktionsschnittstellen.

3.4 Verwendete Computerprogramme und Datenbanken

Zur Analyse der DNA- und Aminosäuresequenzen wurden folgende Programme und Datenbanken verwendet:

Programme: NIH Imager Version 1.6.1
MacMolly Tetra (Version 2.5), Soft Gene GMBH
Top Pred II (Version 1.3), Claros und Heijne

Datenbanken: Datenbank für MacMolly Tetra (Version 2.5.1)
Martinsried Institute for Protein Sequences (MIPS)
Adresse: http://speedy.mips.biochem.mpg.de
Protein Information Resource Database (PIR)
Adresse: http://www.gdb.org/Dan/proteins/pir.html
Saccharomyces Genom Database (SGD)
Adresse: http://genome-www.stanford.edu
Yeast Protein Database (YPD)
Adresse: http://www.proteome.com/YPDhome.html

3.5 Nährmedien, Kulturbedingungen und Stammhaltung

3.5.1 *E. coli*

LB
Die *E. coli* Kulturen wurden, soweit nicht anders angegeben, in LB-Vollmedium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,2) angezüchtet. Für Festkulturen wurde dem Medium 1,5 % Agar zugesetzt.
Ein Blau/Weiß-Screening war durch Zugabe von 1 mM IPTG und 20 mM X-Gal zum Agar möglich.

LBG
Zur Expession von Proteinen in *E. coli* wurde LBG-Medium verwendet. Hierzu wurde LB-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl, pH 7,2), mit 1 % Glucose versetzt, verwendet.

Anzucht
Die Anzucht der *E. coli* erfolgte über Nacht bei 37 °C (Flüssigkulturen, Rundschüttler 180 U/min).

Stammhaltung
Die Stammhaltung der Kulturen erfolgte als Gefrierkultur bei -70 °C in LB-Medium mit 20 % Glycerin (v/v).

Selektion
Zur Selektion wurden je nach Bedarf 60 µg/ml Ampicillin, 20 µg/ml Tetracyclin oder 20 µg/ml Chloramphenicol hinzugegeben.

3.5.2 *S. cerevisiae*

YEPD
Als Vollmedium wurde für die Anzucht der Hefestämme YEPD-Medium (2 % Glucose, 0,5 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, pH 6,3) verwendet. Festkultuten wurden mit dem Zusatz von 1,5% Agar angezüchtet.

YEPG
Die Kontrolle auf Atmungskompetenz erfolgte auf YEPG-Agar (3 % Glycerin, 0,5 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 1,5 % Agar, pH 6,3). Die Anzucht wurde, soweit nicht anders angegeben, bei 30 °C für 3-5 Tage durchgeführt.

YNB
Als Minimalmedium wurde YNB (Yeast-Nitrogen-Base) verwendet. Es wurden 6,7 g YNB ohne Aminosäuren (Difco) mit 10 g Glucose und 10 g Casamino Acids (Difco) in 1 l gelöst und autoklaviert. Festmedium wurde mit 1,5% Agar angesetzt. Falls erforderlich, wurde das Medium folgendermaßen supplementiert: Adenin 40 mg/l, Uracil 40 mg/l, Histidin 40 mg/ml. Die Anzucht erfolgte bei 30 °C für 3-5 Tage.

YNBraff
Für RNA-Isolierungen und Mitochondrien-Isolationen wurden die Hefen auf YNBraff angezüchtet. Dieses Medium enthält 6,7 g YNB ohne Aminosäuren und 10 g Casamino Acids und

als nicht reprimierende Kohlenstoffquelle 10 g Raffinose. Um ein Anwachsen der Zelle zu erleichtern wurde das Medium mit 0,1% Glucose versetzt. Die Supplementation erfolgte nach Bedarf (s. YNB).

FOA
Um die Hefen von *URA3* tragenden Plasmiden zu befreien, wurden sie auf FOA-Agar angezogen. Für den Agar wurde 1 g FOA (5-Fluor-Orotsäure) in 500 ml H_2O bei 55 °C gelöst und steril filtriert. Gleichzeitig wurden in 400 ml H_2O 10 g Casamino Acids, 20 g Glucose und 15 g Agar und in 100 ml H_2O 6,7 g YNB ohne Aminosäuren autoklaviert. Die heißen Lösungen wurden vereint, anschließend wurden 70 mg/l Adenin und 20 mg/l Uracil hinzugefügt, anschließend wurde der Agar gegossen.
Die Anzucht erfolgte bei 30 °C für 3 Tage.

Anzucht
Das Wachstum von Hefen in Flüssigkultur erfolgte 1-2 Tage bei 30 °C auf einem Horizontalschüttler mit 120 U/min. Festkulturen wurden mit Zusatz von 1,5 % Agar 2-3 Tage bei 30 °C bebrütet.

Stammhaltung
Die Stammhaltung erfolgte als Gefrierkultur bei -70 °C in YEPD mit 20 % Glycerin (v/v).

3.5.3 Cytoduktion

Unter Cytoduktion versteht man das gerichtete Einbringen eines Cytoplasmas (mit einem definierten mitochondrialen Hintergrund) in eine Empfängerzelle. Dies ist durch die kar1 Mutation von *S. cerevisiae* möglich. Die kar1 Mutation resultiert in einem teilweisen Defekt der Karyogamie nach der Fusion zweier haploider Zellen unterschiedlicher Kreuzungstypen (Mat a / Mat α), da keine Kernspindeln mehr ausgebildet werden. Durch die fehlende Karyogamie kommt es im Verlauf der weiteren Vermehrung dieser Zellen zur Segregation der Kerne, so dass wieder zwei unterschiedliche haploide Zellen entstehen, die aber nun ein Heteroplasmon besitzen. Im Fall der Kombination eines ρ^0 Stammes mit einem mit^- Stamm besitzen nach einer erfolgreichen Kar-Kreuzung die Kreuzungsprodukte alle die Mitochondrien des mit^- Stammes.
Zur Cytoduktion verwendet man einen Stamm, der die kar1 Mutation besitzt. Der zweite Stamm braucht diese Mutation nicht zu besitzen, da der Anteil an diploiden Zellen in diesem System vergleichsweise gering ist. Zur Durchführung der Kar-Kreuzung werden die Zellen des Stammes auf dessen Kernmarken selektiert werden soll, in etwa 10-fachen Überschuss auf eine YEPD Platte auf ca. 1 cm^2 verteilt. Die Zellen des zweiten Stammes werden in einfacher Konzentration ebenfalls auf diesen Fleck verteilt und alle Zellen werden gut durchmischt. Die Platte wird 6 h bei 30 ° C bebrütet und anschließend erfolgt ein Verdünnungsausstrich auf entsprechend supplementiertes Minimalmedium. Nachdem die Platte bebrütet wurde, werden die Einzelkolonien abgenommen, angereichert und auf verschiedene Medien genotypisch und phänotypisch charakterisiert.

3.5.4 Atmungstest

Der Atmungstest ist die einfachste Methode um in Hefe die Spleißfähigkeit des Introns aI5γ zu überprüfen, da es das letzte Intron der ersten Untereinheit des Cytochrom-c-oxidase Gens (COX1) ist. Die Blockierung der Spleißreaktion zeigt sich somit direkt in dem Verlust der Atmungskompetenz. Dabei muss immer beachtet werden, dass ein Verlust der Atmung auch auf anderen Ursachen beruhen kann. Für den Atmungstest werden die Hefen auf einer nicht vergärbaren

Kohlenstoffquelle, wie z.B. Glycerin angezüchtet. Für den Test wurden 50 µl steriles Aqua dest in eine 96er-Mikrotieter-Platte pipettiert. Dann wurde mit einem sterilem Zahnstocher ein etwa Stecknadelkopf großer Anteil der zu testenden Hefekolonie in diesen 50 µl resuspensiert (Doppelansatz). Danach wurde in gleicher Weise mit positiv und negativ Kontrollen verfahren. Nachdem alle gewünschten Kolonien in der Titerplatte angeimpft waren, wurden sie mit dem zuvor mit Alkohol abgeflammten Stempel auf eine YEPG Platte übertragen (Als Kontrolle eine YEPD Platte stempeln). Die Platte wird einen Moment getrocknet und anschließend 3-5 Tage bei 30° C bebrütet.

3.6 DNA-Isolierungen

3.6.1 Plasmid-DNA-Schnellaufarbeitung aus *E. coli* (MiniPräp)

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Schnellaufarbeitung für Plasmid DNA aus *E. coli* nach Birnboim und Doly (1979). Die *E. coli* Zellen einer 1,5 ml Übernachtkultur wurden geerntet [Tischzentrifuge, 5000 U/min (2000 g), 5 min] und in 80 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 150 µl frisch angesetztem alkalischen Lysepuffer (0,125 M NaOH, 0,625 % SDS). Nach Schütteln und 10 min Inkubation erfolgte die Renaturierung der Plasmid-DNA und das Ausfällen der Proteine sowie der "Chromosomalen-DNA" durch Zugabe von Neutralisationslösung (0,5 M NaCl, 0,7 M Na-Acetat, pH 4,9; frisch angesetzt). Nach Mischen und 10 min Inkubation auf Eis wurden Zelltrümmer, Proteine und chromosomale DNA durch Zentrifugation [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g), 5 min, 4 °C] abgetrennt. Der Überstand wurde mit 750 µl Isopropanol versetzt und 10 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Plasmide durch Zentrifugation (s.o.) abgetrennt. Das Pellet wurde einmal mit 70 %igen Ethanol gewaschen, um die Salze zu entfernen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 50 µl H_2O gelöst. Von dieser Lösung wurden 3 µl zur Restriktion eingesetzt.

3.6.2 Präparative Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli* (Nucleobond)

Die Zellen einer 100 ml Übernachtkultur wurden geerntet [GSA-Rotor, Sorvall, 5000 U/min (4000 g), 10 min, 4 °C] und nach der Vorschrift des Fa. Nukleobond behandelt. Die DNA wurde anschließend in 250 µl Aqua dest gelöst.

3.6.3 DNA-Einzelstrang-Isolation

Die Einzelstrang-Isolation nach Veira et al. (1987) diente als Ausgangsmaterial für die *in vitro* Mutagenese (s. Kapitel 3.7.7). Zunächst wurde das Plasmid von dem die Einzelstrang DNA gewonnen werden sollte und das einen f1-Ori besitzen muss, in einen F^+ *E. coli* transformiert. Ein Transformand wurde dann in 10ml LB-Medium unter Selektionsdruck (60 µg/ ml Ampicillin) mit 1 µl Helferphagen-Suspenion VCS M13 (ca. 5 x 10^7 Phagen/ ml) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde zur Selektion auf die mit dem Helferphagen infizierten Zellen 6 µg/ ml Kanamycin zu der Kultur gegeben und weiter bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren von 1,5 ml Zellkultur [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g), 5 min] wurde 1ml zellfreier Überstand mit 75 µl 40 % (w/v) PEG_{6000} Lösung und mit 75 µl % M NaCl versetzt und 15 min auf Eis gehalten. Die aus der Lösung ausgefällten Phagen wurden durch Zentrifugation [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g), 5 min, 4 °C] konzentriert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 400 µl 0,3 M Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 6,0 aufgenommen. Eine anschließende Extraktion mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und Zentrifugation [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g), 2 min] hatte zum Ziel die Phagenproteine aus der Lösung zu entfernen. Die

wässrige Phase wurde mit 1 ml Ethanol gefällt [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g), 15 min, 4 °C]. Der Ethanol wurde dann verworfen, das Pellet getrocknet und anschließend in 20 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Die Kontrolle der DNA erfolgte auf einem Agarosegel.

3.6.4 Plasmid-DNA-Schnellaufarbeitung aus *S. cerevisiae*

Die Anzucht der Hefen erfolgte in einer 2 ml Übernachtkultur. Nach der Zellernte [Tischzentrifuge, 5000 U/min (2000 g), 5 min] wurden die Zellen in 100 µl Zymolyaselösung [2 mg/ml Zymolyase 20T (aus *Arthobacter luteus*, WAK Chemie Medical GmbH) Zymolyasepuffer (1 M Sorbit, 100 mM Natriumcitrat, 60 mM EDTA, pH 7,0)] resuspendiert und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zelllyse durch Zugabe von 150 µl frisch angesetztem alkalischen Lysepuffer (0,125 M NaOH, 0,625 % SDS). Nach Schütteln und 10 min Inkubation erfolgte die Renaturierung der Plasmid-DNA und das Ausfällen der Proteine und der genomischen DNA durch Zugabe von Neutralisationslösung (0,5 M NaCl, 0,7 M Na-Acetat, pH 4,9; frisch angesetzt). Nach weiteren 10 min auf Eis wurden Zelltrümmer, Proteine und genomische DNA durch Zentrifugation [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g), 5 min, 4 °C] abgetrennt. Der Überstand wurde mit 750 µl Isopropanol versetzt und 10 min auf Eis gehalten. Anschließend wurden die Plasmide durch Zentrifugation (s.o.) abgetrennt. Das Pellet wurde mit 70 %igen Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 20 µl H_2O gelöst. Der gesamte Ansatz wurde zur Transformation in *E. coli* verwendet.

3.7 *In vitro* DNA Techniken

3.7.1 Ethanol-Präzipitation

DNA aus wässrigen Lösungen wurde mittels der Ethanol-Präzipitation aufkonzentriert. Dazu wurden zur DNA-Probe 0,1 Volumen 3M NaAcetat pH 4,8 und 2,5 Volumen 96% Ethanol gegeben, gemischt und 10 min auf Eis gehalten. Alle Volumina beziehen sich auf das Anfangsprobenvolumen. Danach wurde die DNA pelletiert [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g), 10 min, 4 °C]. Der Überstand wurde vollständig verworfen und das Pellet mit 2 Volumen mit 70% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde dann in einer geringen Menge Aqua dest gelöst. Bei geringen DNA-Konzentrationen wurde der Fällung 1 µl t RNA (10 mg/ml) zugesetzt.

3.7.2 Restriktionen

Als Standard-Restriktionsansatz zu analytischen Zwecken wurden 100-200 ng DNA, 1 µl 10-fach Restriktionspuffer und 2 U Restriktionsenzym (soweit nicht anders angegeben) auf 10 µl Endvolumen eingesetzt. Für präparative Zwecke erfolgte ein proportionales Scale up des Standard Restriktionsansatzes. Die Restriktionsansätze wurden 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdau wurde anschließend entweder mit 0,1-0,2 Volumen Stopplösung (60 % Saccharose, 0,025 % Bromphenolblau, 20 mM EDTA, pH 7,0), 20 mM EDTA oder durch Einfrieren bei -20 °C gestoppt. Als Restriktionspuffer wurden die Einheitspuffer nach Sambrook et al. (1989) verwendet. Ausgenommen waren EcoRI und BamHI Restriktionen, die mit "one phor all"-Puffer (Pharmacia) durchgeführt wurden.

3.7.3 Ligationen

Die Ligationen wurden mit Hilfe von T4-DNA-Ligase (Roche) durchgeführt. Sie katalysiert das Zusammenfügen von glatten oder kompatiblen überhängenden Enden doppelsträngiger DNA mit 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden. Es wurden 20-500 ng Plasmid-DNA mit 20-500 ng Insert-DNA in 17 µl H_2O 90 Sekunden bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 10 min auf Eis gehalten. Danach wurden sie mit 2 µl 10-fach Ligasepuffer (Roche) und mit 1 U T4-DNA-Ligase in 20 µl Endvolumen bei 14 °C über Nacht inkubiert.

3.7.4 Alkalische Phosphatase Behandlung

Die Alkalische Phosphatase entfernt 5'-Phosphatreste von DNA-Fragmenten. Damit werden Rezirkularisierungen von Plasmidmolekülen bei der Ligation verhindert.
1 µg gefällte DNA wurde mit 2,5 µl 10-fach Alkalischem Phosphatasepuffer (Roche) und 2 U Alkalischer Phosphatase aus Kälbermägen (Roche) in 25 µl Endvolumen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung erfolgte durch Zugabe von 25 mM EDTA und anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion.

3.7.5 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Synthetische Oligonukleotide sind normalerweise nicht am 5'-Ende phosphoryliert. Dies ist aber notwendig, wenn sie zur Klonierung verwendet werden sollen. Dagegen können nicht phosphorylierte Oligonukleotide direkt zur 5'-Endmarkierung mit $\gamma[^{32}P]$dATP eingesetzt werden. Zur Phosphorylierung wurden in einen 10 µl Ansatz 15-20 pmol Oligonukleotid, 1 µl Kinase Puffer (Biolabs), 1 µl 10 mM dATP (oder je nach Bedarf 1-4 µl $\gamma[^{32}P]$dATP), sowie 2 U Polynukleotid Kinase (Biolabs) hinzu gegeben und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte bei 65 °C für 10 min. Danach konnten die phosphorylierten Oligonukleotide sofort weiter verwendet werden oder bei –20 °C gelagert werden.

3.7.6 Annealing von Oligonukleotiden

Das Annealing von Oligonukleotiden erfolgte bei der *in vitro* Mutagenese (s. Kapitel 3.7.7) und bei der Klonierung von Oligonukleotiden. Dazu wurden in einem 10 µl Ansatz 1 µl 500 mM NaCl und gleiche molare Mengen der zu annealenden phosphorylierten Oligonukleotide (20 pmol) gemischt, bzw. 2 µl Einzelstrang DNA (ebenfalls ca. 20 pmol) plus 20 pmol des phosphorylierten Oligonukleotides. Anschließend wurde die Probe in 500 ml 70 °C warmes Wasser gestellt und so lange inkubiert bis das Wasser auf 30 °C abgekühlt war. Der Ansatz wurde dann direkt weiter verwendet oder bei –20 °C gelagert.

3.7.7 *In vitro* Mutagenese

Die *in vitro* Mutagenese diente zur gezielten Veränderung von einzelnen Nukleotiden in klonierter DNA. Diese Austausche hatten zum Ziel, dass Restriktionsendonuklease Schnittstellen hinzugefügt oder entfernt wurden, bzw. dass bei dem späteren Translationsproduktes des Gens, einzelne Aminosäuren verändert wurden.
Verwendet wurde hier die Methode nach Kunkel et al. (1991). Zunächst wurde das zu verändernde Plasmid, das einen f1-ori enthalten sollte, in den *E. coli* CJ236 (dut^-, ung^-) transformiert (s. Kapitel 3.9.1). In diesem Stamm ist durch die dut^--Mutation (fehlende dUTPase) die Menge an dUTP in der Zelle erhöht, das dadurch vermehrt in die DNA eingebaut wird. Durch die fehlende Uracil-N-Glykosylase (ung^-) wird das Uracil nicht mehr aus der DNA entfernt, wodurch es zur Synthese einer Uracil haltigen DNA kommt.

Das Plasmid konnte nun mit Hilfe eines Helfer Phagen (VCS M13) als Einzelstrang verpackt und isoliert werden (Kapitel 3.6.3). An die einzelsträngige DNA wurde anschließend das Oligonukleotid, das die gewünschte Veränderung trug anhybridisiert (Kapitel 3.7.6). Die Zweitstrang-Synthese und die Ligation erfolgten anschließend in einem Schritt. Dazu wurde zu dem Annealing Ansatz 2 µl Puffer (400 mM Tris; pH 7,5; 40 mM $MgCl_2$; 50 mM DTT), 4 µl 2,5 mM dNTP's, 2 µl 10 mM ATP, 3,5 U T4 DNA-Polymerase (Biolabs) und 3 U T4 Ligase (Roche) gegeben und mit Aqua dest auf 20 µl aufgefüllt. Die Synthesereaktion fand für 15 min bei Raumtemperatur und die Ligation für 2 h bei 37 °C statt. Danach wurde der Ansatz mit der Heteroduplex-DNA in *E. coli* NM522 transformiert (Kapitel 3.9.1). Hier wird nun vorwiegend der mutagenisierte Strang amplifiziert, da die Uracil-N-Glykosylase (dut^+) das Uracil aus dem Template entfernt und so die DNA-Synthese dieses Stranges hemmt. Damit finden sich vorwiegend die gewünschten Plasmide in den transformierten Zellen.

3.7.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Genomed)

Die 5-10 kb großen DNA-Fragmente wurden anhand eines DNA-Längenstandards aus dem Agarosegel geschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und ausgewogen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer A1 ($NaClO_4$, TBE, Na-Acetat) und 10 µl Jetsorb-Suspension hinzugegeben und gemischt. Bei größeren Gelstückchen wurde ein proportionales Scale up durchgeführt. Durch eine 15 min Inkubation bei 50 °C, bei der sich die Agarose auflöste, wurde die DNA an die Jetsorb-Partikel (Bindungsvermögen: 7,5 µg DNA pro 10 µl Jetsorb-Suspension) adsorbiert. Während der Inkubation wurde einmal gemischt und anschließend in der Tischzentrifuge bei 12000 U/min (10000 g) für 30 Sekunden abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen mit Puffer
A1, wurde das Pellet zweimal mit Puffer A2 (Ethanol, NaCl, EDTA, Tris-HCl) gewaschen. Danach wurde das Pellet getrocknet und in 40µl Aqua dest aufgenommen. Die DNA wurde dann durch eine 15 min Inkubation bei 50 °C von den Jetsorb-Partikeln gelöst. Nach der Zentrifugation konnte der DNA haltige Überstand direkt weiter verwendet werden.

3.7.9 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient der enzymatischen Amplifizierung von DNA-Fragmenten. Als Template wurden 100-500 ng chromosomale DNA, 0,5-5,0 ng Plasmid DNA, oder zum Nachweis des Introns eine geringe Menge Zellen einer Hefekolonie eingesetzt. Zur Kolonie-PCR aus *E. coli* wurde mit einer gelben Pipettenspitze Zellen einer Kolonie abgenommen und in 20 µl Aqua dest resuspendiert. Von dieser Suspension wurde 1 µl in folgenden PCR Ansatz eingesetzt: je 200 ng flankierende Primer, 2,5 mM Desoxynukleotide, 2,5 mM $MgCl_2$, 5 µl 10-fach Polymerasepuffer (Gibco) und 2,5 U Taq-Polymerase (Gibco). Der Ansatz wurde mit H_2O auf 50 µl aufgefüllt und mit Mineralöl überschichtet, um das Verdampfen der Probe während der Amplifizierung im Thermocycler (LEP Scientific, Biozym) zu verhindern.
Nach einem einmaligem Denaturierungsschritt der Template-DNA für 3 min bei 94 °C, wurde 30 mal der gleiche Zyklus wiederholt:

Amplifizierung	Annealing	Elongation	Denaturieren
MRS2	1,5 min; 55 °C	1,5 min; 72 °C	1,5 min; 94 °C
aI5γ	1,5 min; 42 °C	2,0 min; 72 °C	1,5 min; 94 °C
Kontrolle Mutagenese SD	1,5 min; 50 °C	1,5 min; 72 °C	1,5 min; 94 °C
Kontrolle Mutagenese HD	1,5 min; 50 °C	1,5 min; 72 °C	1,5 min; 94 °C

Tab. 3. Verwendete PCR-Programme

Während dieser Zyklen kommt es zur exponentiellen Vermehrung des durch die Primer flankierten DNA-Bereichs.

3.7.10 Reinigung von PCR-Produkten (Genomed)

Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte nach der Arbeitsvorschrift des Herstellers (Genomed).

3.7.11 Einzelstrang-Isolierung aus PCR amplifizierter DNA

Die DNA-Einzelstrang-Isolierung erfolgte mit Hilfe von Dynabeads M280 (Dynal Inc.). Es handelt sich hierbei um paramagnetische Polysterenpartikel, die mit Streptavidin beladen sind. Streptavidin besitzt eine hohe Affinität zu Biotin, so dass biotinylierte Produkte spezifisch an die Dynabeads gebunden werden und unter Ausnutzung der paramagnetischen Eigenschaften der Partikel isoliert werden können.
Zur DNA-Einzelstrang-Isolierung wurden 20 µl Dynabead-Suspension (0,2 mg Dynabeads) mit 20 µl BW-Puffer (5 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7,5) gewaschen und in 40 µl zweifach BW-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 M NaCl, pH 7,5) aufgenommen. Anschließend wurde bis zu 4 µg gereinigtes PCR-Amplifikat, welches an einem der 5'-Enden biotinyliert ist, in 40 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) hinzugegeben und 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Das gebundene Amplifikat wurde mit 40 µl BW-Puffer gewaschen, danach erfolgte die Denaturierung der DNA mit 8 µl 0,1 M NaOH für 10 min bei Raumtemperatur. Dabei blieben die biotinylierten DNA-Einzelstränge - im Gegensatz zu den nicht biotinylierten Gegensträngen - an den Dynabeads gebunden. Die binotinylierten Einzelstränge wurden mit 50 µl 0,1 M NaOH, danach mit 40 µl BW-Puffer und anschließend mit 50 µl TE gewaschen, wodurch die Gegenstränge entfernt wurden. Zum Schluss wurden die Dynabeads in 9,5 µl H_2O aufgenommen und anschließend zur Sequenzierung eingesetzt.

3.7.12 DNA-Sequenzierung (Pharmacia)

Die Sequenzierungen wurden nach der Didesoxymethode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Für die Sequenzierungen wurde sowohl Einzelstrang-DNA aus der PCR, als auch Plasmid-Doppelstrang-DNA eingesetzt.

DNA-Einzelstrang-Sequenzierung:
Die Konzentration der zu sequenzierenden DNA wurde auf 1-2 µg/10µl eingestellt. Zu dieser Lösung wurden 2 µl Annealingpuffer und 2 µl Primer (5-50 ng) hinzugefügt. Das Annealing der Primer erfolgte bei 37 °C für 20 min. Anschließend wurde für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden dann entweder bei -20 °C aufbewahrt oder direkt zur Sequenzierung eingesetzt. Für die Sequenzreaktion wurden 3 µl Labelling-Mix (dNTP's), 1 µl ^{35}S-dATP (ca. 600 Ci/mmol) und 2 µl T7-Polymerase (1,5 U/µl) zugesetzt. Der Ansatz wurde gemischt und je nach gewünschter Kettenlänge bis zu 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden je 4,5 µl dieses Reaktionsansatzes zu 2,5 µl A-, T-, C-, oder G-Mix gegeben. Diese Nukleotidlösungen enthalten jeweils ein Didesoxynukleotid, das für den Kettenabbruch der durch die T7-DNA-Polymerase katalysierten DNA-Synthese verantwortlich ist. Die DNA-Synthese erfolgte für 5 min bei 37 °C. Danach wurde die Reaktion mit 5 µl Stoppmix beendet. Die Proben wurden entweder bei -20 °C gelagert oder direkt bei 80 °C für 2 min denaturiert. 2,5 µl der denaturierten Probe wurden auf das Gel gegeben.

DNA-Doppelstrang-Sequenzierung:
Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 2-10 µg DNA in Abhängigkeit von der Plasmidgrösse verwendet. 8 µl DNA-Lösung wurden mit 2 µl 2 M NaOH versetzt und 10 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Die denaturierte, partiell einzelsträngige DNA wurde nun mit 3 µl 3 M Na-Acetat, pH 4,9, 7 µl H_2O und 60 µl Ethanol gefällt. Dazu wurde die Probe 10 min auf Eis gehalten und anschließend zentrifugiert [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g), 5 min, 4 °C]. Das Pellet wurde mit 70 %igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl H_2O aufgenommen. Die weitere Bearbeitung erfolgte wie bei der Einzelstrang-Sequenzierung.

3.7.13 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA- bzw. RNA-Konzentration wurde über die Extinktion bei 260 nm im Fotometer bestimmt. Dabei entspricht eine Extinktion von 1,0 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Einen Aufschluss über die Reinheit der DNA bzw. RNA gibt der Quotient der Extinktionen von 260 nm/280 nm an. Je näher der Quotient an 2,0 liegt, desto reiner ist die DNA oder RNA.

3.8 Gelelektrophorese

3.8.1 DNA-Agarosegele

Je nach Größe der zu trennenden DNA wurden 0,7-1,2 %ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde mit entsprechender Menge Wasser in einen Kolben gegeben und in einem Mikrowellengerät aufgekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Anschließend wurde die gelöste Agarose mit 0,33 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, um die DNA während des Laufs anzufärben. Als Puffersystem wurde 0,5-fach TAE-Puffer (20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10 mM Na-Acetat, mit Eisessig auf pH 8,3 eingestellt) verwendet. Das Gel wird gegossen, wenn es handwarm ist. Die Proben wurden dann mit 0,1 Volumen Stopper (60 % Saccharose, 0,025 % Bromphenolblau, 20 mM EDTA, pH 7,0) versetzt und auf das fertige Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in Horizontalelektrophorese-Apparaturen von Biorad (MiniSub™ und MiniSub™ wide. Die Laufzeit variierte von 30 min bis zu 2 Stunden bei 100 V. Die Gele wurden anschließend mit einem Video-Dokumentations-System (Cream GDS, Fa. Intras/Göttingen) aufgenommen.

3.8.2 DNA-Polyacrylamidgele

Zur Auftrennung von DNA unter 500 bp wurden Polyacrylamidgele (PAA-Gele) benutzt. Die Konzentration des PAA-Gels wurde ebenfalls nach der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente gewählt und lag zwischen 3,5 – 10 %. Es wurden 50 ml Lösung aus einer 30 %igen PAA-Stammlösung (Vernetzungsgrad 29:1) bereitet. Als Puffersystem diente hier 1-fach TBE-Puffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3), das aus einer 10-fach Stammlösung entnommen wurde. Die Polymerisation wurde durch 300 µl 10 % APS und 15 µl TEMED gestartet. Die Auspolymerisation des Gels (ca. 30 min) erfolgte im Gelträger (zwei Glasplatten (18 x 20 cm), Spacer 1 mm dicke, abgedichtet mit Agarose). Danach wurde das Ganze in eine Zabona-Vertikalapparatur gespannt. Die Proben wurden dann mit 1/10 Stopper (60 % Saccharose, 0,025 % Bromphenolblau, 0,025 % Xylencyanol, 20 mM EDTA, pH 7,0) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt mit 1-fach TBE bei 200 V für ein bis zwei Stunden. Anschließend wurde das Gel für 10 min in Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ ml 1-fach TBE) angefärbt und mit dem Video-Dokumentations-System (s.o.) aufgenommen.

3.8.3 Sequenzgele

Zur Auftrennung sequenzierter DNA wurden 40 bzw. 60 cm lange Polyacrylamidgele (Dicke 0,4 mm) verwendet, deren "Ohrenplatte" vor der Gelbereitung mit Dichlordimethylsilan behandelt wurde. Es wurden 50 ml Polyacrylamidlösung [8 % Polyacrylamid:Bisacrylamid (38:2), 8 M Harnstoff, in TBE-Puffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3)] verwendet. Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 450 µl 10 %igem Ammoniumpersulfat und 18 µl TEMED gestartet. Zur Polymerisation wurde der Haifischzahnkamm zunächst mit der glatten Seite in das Gel gesteckt, vor dem Lauf wurde dann der Kamm umgedreht, sodass die Zähne die Taschen bilden. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer verwendet.
Der Lauf erfolgte bei 40 cm langen Gelen mit 1500 V (konst.), 50 W und bei 60 cm langen Gelen bei 2900 V, 50 W (konst.) in Vertikalapparaturen (Fa. Renner). Um eine gute Wärmeverteilung zu gewährleisten, wurde hinter das Gel eine Aluminiumplatte geklemmt. Die Läufe wurden je nach Bedarf nach 2-12 h gestoppt. Die Ohrenplatte wurde entfernt und das Gel für 20 min in 10 % Essigsäure mit 10 % Methanol fixiert, wobei auch ein Teil des Harnstoffs entfernt wurde. Danach wurde das Gel auf Filterpapier (Whatman 3MM) aufgezogen, mit Frischhaltefolie abgedeckt und für 45-60 min auf dem Geltrockner (Zabona) bei 80 °C getrocknet. Die Exposition auf dem Röntgenfilm erfolgte für 24-52 Stunden bei -70 °C.

3.9 Transformationen

3.9.1 *E. coli*-Transformation nach der Kationen-Methode

Diese Transformations-Methode beruht auf einer Vorschrift von Himeno et al. (1984). Aus einer 20 ml Übernachtkultur wurden 200 ml LB-Medium 1 %ig angeimpft und bei 37 °C bis zu einer Extinktion von 0,4-0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm kultiviert. Die Zellen wurden geerntet [GSA-Rotor, Sorvall, 5000 U/min (4000 g), 5 min, 4 °C], zunächst mit 100 ml eiskalter $MgCl_2$-Lösung (100 mM MgCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6) und danach mit 50 ml eiskalter $CaCl_2$-Lösung (100 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 8 ml gekühlter $CaCl_2$-Lösung resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis waren die Zellen kompetent.
Für die Transformationsansätze wurden 200 µl kompetente Zellen, 100 µl 8 % PEG_{2000}, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl, pH 7,6 und bis zu 20 µl DNA-Lösung zusammen gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Dabei wurde gelegentlich geschüttelt. Nach einem 1,5 min Hitzeschock bei 42 °C, der die DNA Aufnahme in die Zellen induziert, wurde 1 ml LB-Medium zum Ansatz gegeben und die Zellen wurden für 60-90 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 100 µl unverdünnter, 1:10 und 1:100 verdünnter, sowie der gesamte restliche Transformationsansatz auf Selektivagar ausplattiert. Die Bebrütung erfolgte bei 37 °C über Nacht.
Nicht benötigte kompetente Zellen wurden mit Glycerin gemischt (200 µl Zellsuspension mit 40 µl Glycerin), aliquotiert und bei -70 °C aufbewahrt. Die eingefrorenen kompetenten Zellen können, nachdem sie auf Eis aufgetaut wurden, direkt zur Transformation eingesetzt werden.

3.9.2 *S. cerevisiae*-Transformation nach der Kationen-Methode

Von einem frisch angewachsenen Hefestamm wurde eine Impföse Zellmaterial in 1 ml sterilem Aqua dest resuspensiert. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit 1 ml Lithiumacetat-Lösung (100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), [Hettich, 5000 U/min (4000 g), 5 min, 4 °C] in 0,5 ml Lithiumacetat-Lösung resuspendiert.

Pro Transformationsansatz wurden 5 µl DNA (1-5 µg), 100 µl Zellsuspension, 5 µl Heringssperma DNA (10 mg/ml) und 600 µl PEG Lösung (40 % PEG_{4000}, 100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl, 1m M EDTA, pH 8,0) zugegeben, gemischt und für 30 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert [Tischzentrifuge, 5000 U/min (2000 g), 5 min] und in 1 ml H_2O aufgenommen. Es wurden 100 µl unverdünnter und der restliche Transformationsansatz auf YNB Agar ausplattiert.

3.10 RNA-Techniken

3.10.1 RNA-Isolation

Die Methode dient zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Hefe. Dazu wurden die Zellen in YNBraff angezogen, bei dem Raffinose als Kohlenstoffquelle verwendet wurde, ein Zucker der die Atmung nicht reprimiert. Aus einer 20 ml Vorkultur wurde eine 50 ml Hauptkultur beimpft und über Nacht bis zu einer OD_{600} von 0,6 – 1,9 kultiviert. Nach der Zellernte [GSA-Rotor, Sorvall, 5000 U/min (4000 g), 10 min, 4 °C] wurden die Zellen in 10 ml Citratpuffer (1,2 M Sorbit, 20 mM K_2PO_4, 20 mM Na-Citrat, 1 mM EDTA, pH 5,8) resuspensiert und mit frisch angesetztem „yeast lytic enzyme“ (ICN, 15 mg/100 µl Citratpuffer) 20 – 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Überführen der Suspension in SS34 Röhrchen und Zentrifugation [SS34-Rotor, Sorvall, 5000 U/min (3500 g), 5min, 4 °C] wurden die angedauten Zellen in 5 ml Denaturierungslösung (250g Guanidinisothiocyanat + 293 ml DEPC H_20 + 17,6 ml 0,75 M Na-Citrat + 26,4 ml 10 % Sarkosyl) durch vortexen (1 min) aufgeschlossen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,5 ml 2M Na-Acetat, pH 4, sowie 5 ml Phenol und 1 ml Chloroform : Isoamylalkohol (24:1), wobei nach jeder Zugabe vorsichtig durch Inversion des Röhrchens gemischt wurde. Nach 10 s Vortexen und einer 15 min Inkubation bei 4 °C wurde zur Phasentrennung zentrifugiert [SS34-Rotor, Sorvall, 12000 U/min (10000 g), 20 min, 4 °C]. Der wässrige Überstand (ca. 5 ml) wurde vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt und die darin enthaltene RNA wurde mit gleichem Volumen Isopropanol bei – 20 °C mindestens für eine Stunde gefällt, abzentrifugiert [SS34-Rotor, Sorvall, 12000 U/min (10000 g), 20 min, 4 °C], mit 2 ml 80 % Ethanol gewaschen und 5 min im Speed Vac getrocknet. Das Pellet wurde dann in 300 µl DEPC H_2O gelöst. Die so gewonnene RNA wurde anschließend bei – 20 °C aufbewahrt.

3.10.2 Formaldehyd-Gele

Zur Auftrennung von Gesamt-RNA wurden denaturierende 1,2 %ige Formaldehyd-Gele verwendet. Die Agarose wurde zusammen mit DEPC H_2O in einen sterilen Kolben gegeben und aufgekocht. Nachdem die Lösung sich auf ca. 60 °C abgekühlt hatte, wurde 0,1 Volumen 10-fach MOPS-Puffer (0,2 M 3-[N Morphelino] Propansulfonsäure; 0,05 M Na-Acetat; 0,01 M EDTA; pH 7,0), 5,5 % Formaldehyd (37 %ig) und 6,6 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben, gemischt und anschließend in eine Horizontalapparatur gegossen (Biorad MiniSub™ oder MiniSub™ wide, bzw. 120 ml Gel Volumen Apparatur aus Bochum). Die RNA-Proben (ca. 4 µg RNA) wurden vor dem Auftragen mit 2-fach RNA-Stopper (750 µl Formamid; 225 µl Formaldehyd; 225 µl Glycerin; 300 µl 10x MOPS; 0,025 % Bromphenolblau; 0,025 % Xylencyanol) versetzt und 5 min bei 65 °C inkubiert, auf Eis gestellt und sofort aufgetragen. Der Gellauf erfolgte mit 1-fach MOPS-Puffer bei 100V für 1-2 h über Tag oder 40 mA über Nacht. Das RNA-Gel konnte direkt mit dem Video-Dokumentations-System aufgenommen werden. Das Gel wurde anschließend, falls erforderlich, direkt zum Northern Blot verwendet.

3.10.3 Denaturierende Polyacrylamidgele

Denaturierende Polyacrylamidgele dienten zur Auftrennung von *in vitro* transkribierter RNA bzw. zur Kontrolle von Oligonukleotiden. Je nach RNA Größe wurden 3,5 oder 5 %ige Gele verwendet. Die Gelbereitung erfolgte analog zu Standard-Polyacrylamidgelen (siehe auch Kapitel 3.8.2), mit dem Unterschied, dass den Gelen 8% Harnstoff zugesetzt wurde, um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Als RNA-Stopper wurde eine Lösung mit 80 % Formamid; 10 mM Tris pH 7,6 ; 0,025 % Bromphenolblau; 0,025 % Xylencyanol verwendet. Der Gellauf erfolgte bei 200 V für 1 bis 3 h.

3.10.4 Northern Blot und Hybridisierung

Diese Methode dient zur Übertragung der RNA aus Formaldehydgelen auf eine Nylonmembran und einem anschließenden spezifischen Nachweis von RNA. Zur Übertragung wurde ein Posiblot Pressure Blotter von Stratagene verwendet. Es erfolgte folgende Schichtung auf die untere Kammer: Eine Schicht Whatman 3MM, getränkt in 10x SSC (1,5 M NaCl; 0,15 M Natriumcitrat; pH 8,0), darauf wurde die Nylonmembran (Hybond N, positiv geladen), getränkt in 10xSSC, gelegt, an den Rändern ca. 0,5 cm gößer als das RNA-Gel. Eine Maske (oder Frischhaltefolie) deckte die restliche Fläche des Posi Blotters vollständig ab und überlappte die Nylonmembran mit ca. 0,5 cm. Dann wurde auf die Nylonmembran das RNA-Gel gelegt. Anschließend wurde die Apparatur verschlossen und ein Druck von 75 mm Hg für 2 h angelegt. Nach der Übertragung wurde die RNA im UV-Stratalinker kovalent an der Nylonmembran gebunden.
Die Prä-Hybridisierung erfolge in Rapid-Hyb Puffer (Amersham) für 20 min bei 42 °C. Als Sonde wurden Oligonukleotide benutzt, die am 5'-Ende radioaktiv markiert waren (Phosphorylierung von Oligonukleotiden 3.7.5). Die markierten Oligonukleotide wurden in den Prä-Hybridisierungs Puffer gegeben und für 2 h bis über Nacht bei 42 °C inkubiert. Überschüssige Oligonukleotide wurden durch einmaliges waschen bei Raumtemperatur für 20 min in 5x SSC, 0,1 % SDS und zweimaligen waschen bei 42 °C für 15 min entfernt. Danach wurde die Nylonmembran auf einem Röntgenfilm bei –70 °C exponiert.
Diese Methode wurde üblicherweise zum Nachweis der *in vivo* Spleißfähigkeit verwendet. Dazu wurden 4 µg RNA auf ein Formaldehydgel gegeben, aufgetrennt und geblottet. Zur Bestimmung der Mengenverhältnisse mitochondrialer RNA in den einzelnen Proben wurde der Filter zunächst mit dem ATPase1 spezifischen Primer Oli2 hybridisiert und auf Röntgenfilm exponiert. Der Röntgenfilm wurde gescannt und mit Hilfe des Computerprogramms NIH Imager wurde der Anteil mitochondrialer RNA ermittelt. Auf grund dieser Daten konnte dann ein zweites Formaldehydgel mit gleichen Mengen mt RNA derselben Proben gemacht werden. Der resultierende Blot wurde zunächst mit dem exonspezifischen Primer E4 und nach Entfernung dieser Sonde mit dem intronspezifischen Primer SnaB hybridisiert.

3.10.5 Rehybridisierung von Filtern

Bevor die Rehybridisierung des Filters durchgeführt werden kann, muss die Sonde vom Hybrisierungsfilter entfernt werden. Deshalb wurde der Filter in einem Hybridisierungsröhrchen mit ca. 10 ml Rehybridisierungslsg (2,5x SSC; 50% Formamid) für 30 min bei 65 °C gewaschen. Dann wurde zweimal für 15 min bei 65 °C mit 2x SSC gewaschen. Wenn sich auf dem Filter keine Radioaktivität nachweisen ließ, konnte eine weitere Hybridisierung angeschlossen werden.

3.10.6 *In vitro* Transkription

Die *in vitro* Transkription dient zur Herstellung größerer Mengen spezifischer RNA. Dazu benötigt man ein Template mit einen Promotor für die RNA-Polymerase. In den durchgeführten Versuchen

wurde der T7-Promotor verwendet. Er war in dem Transkriptionsplasmid pJD20 vorhanden oder wurde mittels PCR in die zu transkribierenden DNA-Fragmente eingeführt. Wenn Plasmid DNA zur Transkription verwendet wurde, musste die DNA am 3'-Ende restringiert und mit Phenol/Chloroform extrahiert sein. Die PCR-Fragmente wurden nach der oben beschriebenen Methode (3.7.10) gereinigt.
Für den Transkriptionsansatz wurden in der angegebenen Reihenfolge bei RT ein 20 µl Ansatz wie folgt pipettiert: x µl DEPC Aqua dest; 4 µl Transkriptionspuffer (5x MBI); 1 µl RNAsin (20 U); 4 µl 2.5 mM rNTPs; x µl DNA (bis zu 2 µg); x µl 20-40 µCi $\alpha[^{32}P]$UTP (3000Ci/mmol); 1 µl T7 RNA Polymerase (20 U/µl, MBI). Die Reaktion wurde 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Der Stopp der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA oder 10 µl RNA-Stopper (80 % Formamid; 10 mM Tris pH 7,6 ; 0,25 % Bpb; 0,25 % XC). Die Proben wurden anschließend über ein denaturierendes PAA-Gel gereinigt.

3.10.7 Reinigung von *in vitro* Transkripten

Die *in vitro* transkribierten Proben wurden mit 0,5 Volumen RNA-Stopper (80 % Formamid; 10 mM Tris pH 7,6; 0,025 % Bromphenolblau; 0,025 % Xylencyanol) versetzt, für 2 min bei 82 °C denaturiert und auf ein denaturierendes PAA-Gel aufgetragen (für die Transkripte D23, D456 5 %ig und für D1 und pJD20 3,5 %ig). Der Gellauf erfolgte in einer Zabona-Apparatur bei 400 V, 40 mA für 1-3 h.
Wenn die Transkripte radioaktiv markiert waren, wurde die obere Glasplatte entfernt und das Gel mit der unteren Glasplatte in Frischhaltefolie eingewickelt. Dann wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und dessen Position auf dem Gel markiert. Je nach Strahlung wurde nach 10-60 min der Röntgenfilm entwickelt. Mit Hilfe des Röntgenfilms konnten nun die Banden auf dem Gel sichtbar gemacht, heraus geschnitten und aus den Gel eluiert werden.
Wenn die Transkripte nicht radioaktiv markiert waren, wurde ein UV-Shadowing durchgeführt. Dazu wurde das Gel mit Hilfe von Frischhaltefolie von der Glasplatte genommen und auf eine Verstärkerfolie (Kodak Nr.: III) gelegt. Unter Benutzung einer UV-Auflichtlampe bei 254nm zeigten sich die Transkripte als dunkle Banden, die aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert wurden. Zur Kontrolle wurde das Gel mit Ethidiumbromid angefärbt.
Die Elution der Transkripte erfolgte durch Zugabe von 400 µl Elutionspuffer (0.5 M Ammonium-Acetat; 0.1 mM EDTA; 0.1 % SDS) über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Danach wurde die RNA mit 2-3 Vol. 96%ig Ethanol gefällt, gewaschen, getrocknet und in 40-100µl DEPC Aqua dest gelöst. Der Erfolg der Reinigung und die Ausbeute der transkribierten RNA wurde auf einem Formaldehydgel kontrolliert (2 µl). Die Lagerung der Transkripte erfolgte bei – 20 °C.

3.10.8 RT-PCR

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase PCR lassen sich spezifische RNA Sequenzen amplifizieren. Ihr kommt besondere Bedeutung zu, wenn seltene Transkripte nachgewiesen werden sollen, da diese Methode erheblich sensitiver als der Northern Blot ist.
Für die RT-PCR muss zunächst eine Revese Transkriptase Reaktion durchgeführt werden. Dazu wurde 1-5 µg Gesamt-RNA verwendet, die zweimal mit Chloroform extrahiert und anschließend mit Ethanol präzipitiert wurde. Nach Zugabe von 15-20 pmol sequenzspezifischen Primern wurde der Ansatz 5 min bei 65 °C inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Zu dem Ansatz wurden in folgender Reihenfolge 4 µl 5x RT Puffer (MBI), 2 µl 10 mM dNTP-Mix und 40 U Ribonuklease Inhibitor (MBI) gegeben und auf 19 µl mit DEPC Wasser aufgefüllt. Nach 5 min Inkubation bei 37 °C wurden 20 U MMuLV Reverser Transkriptase (MBI) hinzugegeben. Die Reverse Transkriptase Reaktion erfolgte bei 37 °C für 60 min. Gestoppt wurde die Reaktion durch 10 min Inkubation bei 70 °C, danach wurden 2 µl dieses Ansatzes zur PCR verwendet (Kapitel 3.7.9).

3.11 Protein-Methoden

3.11.1 Proteinexpression in *E. coli* Bl21 DE3 mit pRSET A Konstrukten

Das Prinzip der Überexpression beruht darauf, dass in dem *E. coli* Bl21 DE3 die T7-RNA-Polymerase hinter dem IPTG induzierbaren Lac-Promotor kloniert wurde. Damit wird durch Induktion mit IPTG die RNA-Polymerase produziert, wodurch es zu einer extrem hohen Transkriptionsrate des Gens kommt, das hinter dem Promoter der T7-RNA-Polymerase im pRSETA kloniert wurde.
Für die Expression wurde eine Vorkultur mit einer frisch transformierten Kolonie beimpft (100 ml LBG mit Ampicillin) und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Hauptkulturen (6x 200 ml LBG + Ampicillin) wurden dann mit insgesamt 15 ml Vorkultur beimpft. Die Kolben wurden bei 120 U/min bei 37°C geschüttelt und zur Wachstumskontrolle wurde alle 30 min die OD_{600} bestimmt. Wenn eine OD von > 0,6 erreicht war, erfolgte die Probennahme der uninduzierten Probe für das Proteingel: Dazu wurde 1 ml Probe abgenommen und 5 min zentrifugiert [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g)], der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 µl ESB (2 % SDS; 10 % Glycerin; 1,5 % DTT; 80 mM Tris; pH 6,8; 0,1 mg/ml Bromphenolblau) aufgenommen und eingefroren. Nach der Probennahme wurde sofort induziert: Transformanden mit HD-Konstrukten mit 0,1 mM IPTG und alle anderen Transformanden mit 1 mM IPTG. Es wurde weiterhin alle 30 min die OD_{600} bestimmt und in einer Wachstumskurve festgehalten. Die Ernte erfolgte in der Regel für die Transformanden mit den HD-Konstrukten nach 1 h, da danach die OD_{600} abzufallen begann. Die anderen Transformanden wurden nach 3 h geerntet (ggf. früher falls die OD stark anstieg oder abfiel). Direkt vor der Ernte wurde als Kontrolle der Induktion 1 ml Probe abgenommen und 5 min zenrtifugiert [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g)], der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 µl ESB (2 % SDS; 10 % Glycerin; 1,5 % DTT; 80 mM Tris; pH 6,8; 0,1 mg/ml Bromphenolblau) aufgenommen und ebenfalls für ein Proteingel eingefroren. Die Ernte selber wurde folgendermaßen durchgeführt: Zunächst den GSA Becher auswiegen, Zentrifugation der Kultur [GSA-Rotor, Sorvall, 5000 U/min (4000 g), 5 min, 4 °C], Überstand verwerfen und das Feuchtgewicht bestimmen. Die Pellets wurden dann bis zur Proteinreinigung bei –20 °C eingefroren.
Die Behandlung der Kontrollen für das Proteingel wurde folgendermaßen durchgeführt: Die Proben wurden 5 min bei 98 °C aufgekocht und so aufgetragen, dass eine OD_{600} von 1 einem Volumen von 20 µl entspricht.

3.11.2 Proteinexpression in *E. coli* NM522 mit pGEX-2T Konstrukten

Eine transformierte Kolonie wurde in 5 ml Vorkultur LB mit Ampicillin übertragen und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Hauptkultur (LB+A) wurde 2 %ig aus der Vorkultur beimpft und bei 37 °C geschüttelt. Während dieses Wachstums wurde die OD_{600} alle 30 min kontrolliert. Bei einer OD_{600} von 0,5 für den Vektor (pGEX-2T), bzw. bei einer OD_{600} von 0,8 - 1,0 für die *MRS2*-Konstrukte wurde induziert.
Vor der Induktion wurde zunächst 1 ml Probe abgenommen und 5 min zentrifugiert [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g)], der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 µl ESB (2 % SDS; 10 % Glycerin; 1,5 % DTT; 80 mM Tris; pH 6,8; 0,1 mg/ml Bromphenolblau) aufgenommen und eingefroren. Diese Probe wurde als uninduzierte Kontrolle auf ein Proteingel gegeben. Die Induktion selber erfolgte für Transformanden mit dem pGEX-2T mit 1 mM IPTG und für Transformanden mit *MRS2*-Konstrukten mit 0,1 mM IPTG. Die Proben wurden dann weiter bei 37 °C geschüttelt (pGEX-2T für 3 h, *MRS2*- Konstrukte für 1 h). Die Kontrolle der OD_{600} wurde bis zur Ernte der Zellen weitergeführt.
Vor der Ernte wurde als Kontrolle der Induktion 1 ml Probe abgenommen und 5 min zentrifugiert [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g)], der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 80 µl

ESB (2 % SDS; 10 % Glycerin; 1,5 % DTT; 80 mM Tris; pH 6,8; 0,1 mg/ml Bromphenolblau) aufgenommen und ebenfalls eingefroren (für ein Proteingel). Von den pGEX-2T Transformanden wurden 12 ml Portionen abzentrifugiert [Tischzentrifuge, 4000 U/min (1800 g), 5 min]. Von den Transformanden mit den *MRS2* Konstrukten wurden 33 ml Portionen abzentrifugiert (Greiner Röhrchen mit spitzem Ende) [Hermle, 4000 U/min (2000 g), 10 min]. Die erhaltenen Pellets wurden bei - 20 °C eingefroren und konnten nun zur Proteinreinigung verwendet werden.
Die abgenommenen Kontrollen für ein Proteingel wurden wie in Kapitel 3.11.1 beschrieben behandelt.

3.11.3 His-Tag-Affinitätschromatographie

Die Überexpession im *E. coli* Stamm Bl21 (DE3) erfolgte wie in Kapitel 3.11.1 beschrieben. Das eingefrorene Pellet wurde aufgetaut. Nach der Bestimmung des Feuchtgewichts (1-2 g/200 ml Kultur) wurde das Pellet in 4 ml 6 M Guanidinumhydrochlorid-Lsg (6 M Guanidiniumhydrochlorid; 100 mM NaH_2PO_4; 10 mM Tris; pH 8,0) pro g Zellen resuspensiert und 20 min bei RT geschwenkt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt [GSA-Rotor, Sorvall, 10000 U/min (8000 g), 10 min, 4 °C]. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen gegeben und mit 1 ml vorgewaschener Nickel-NT-Agarose (mindestens 2 x mit 1 ml 6 M Guanidinum-hydrochlorid-Lsg.) 45 min bei RT geschüttelt (Bindung der His-getaggten Proteine an die Nickel-NT-Agarose). Anschließend wurde die Agarose pelletiert [Tischzentrifuge, 4000 U/min (1800 g), 3 min, RT]. Der Überstand wurde TCA gefällt (Kapitel 3.11.4) und zur Kontrolle mit auf ein Proteingel gegeben. Das Pellet wurde in 4 ml 8 M Harnstoff-Lsg. (8M Harnstoff; 100 mM NaH_2PO_4; 10 mM Tris; pH 8,0) gelöst. Anschließend wurde wieder zentrifugiert (s.o.) und die OD_{280} des Überstandes bestimmt. Diese Waschgänge wurden so lange wiederholt, bis die $OD_{280} < 0{,}01$ war. Anschließend erfolgte die Elution: Dazu wurde 1 ml Imidazol-Harnstoff-Lsg (250 mM Imidazol; 8M Harnstoff; 100 mM NaH_2PO_4; 10 mM Tris; pH 6,3) zum Pellet gegeben, geschwenkt und zentrifugiert [Tischzentrifuge, 4000 U/min (1800 g), 3 min]. Der Überstand wurde abgenommen und es schlossen sich weitere 6 Elutionsschritte an. Zur Kontrolle wurde aus jeder Fraktion 10 µl auf ein Proteingel gegeben. Die Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.11.4 GST-Affinitätschromatographie

Die Überexpression im *E. coli* Stamm NM522 erfolgte wie in Kapitel 3.11.2 beschrieben. Die Pellets wurden aufgetaut und in je 600 µl PBS resuspendiert. Für den Zellaufschluss wurden 6 µl Lysozym (10 mg/ml) zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert und anschließend für ca. 15 min bei -20 °C eingefroren. Danach wurden die Proben wieder aufgetaut und mit 0,03 % SDS versetzt. Um eine möglichst vollständige Zellzertrümmerung zu erreichen, wurde eine Ultraschallbehandlung (30 s, 80 %) auf Eis durchgeführt. Da die Proben sehr viskos waren, wurde 12 µl DNAse (5 mg/ml) hinzugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zelltrümmer abgetrennt [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g), 10 min, 4 °C]. Der Überstand wurde nach Vorschrift des Herstellers (Amersham/Pharmacia) auf vorbereitete GST-Säulen gegeben (maximal 600 µl) und aufgereinigt. Aus den Eluaten wurden je 5 µl zum Proteingel und zur Proteinbestimmung verwendet. Die Lagerung der Eluate erfolgte bei –20°C.

3.11.5 TCA-Fällung

Die Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) diente zur Aufkonzentrierung von Proteinproben für ein Proteingel, bzw. zum Pufferwechsel bei Guanidiniumhydrochlorid-haltigen Proben, da diese im SDS-Puffer des Proteingels ausfallen würden. Zur TCA-Fällung wurden 100 µl Probe mit der gleichen Menge 10 % TCA (frisch angesetzt) gemischt und für 20 min bei 4 °C inkubiert.

Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g), 5 min, 4 °C]. Das Pellet wurde dann mit 100 µl eiskaltem Ethanol gewaschen und getrocknet. Danach wurde das Pellet in 50 µl ESB (2 % SDS; 10 % Glycerin; 1,5 % DTT; 80 mM Tris; pH 6,8; 0,1 mg/ml Bromphenolblau) gelöst und auf ein Proteingel aufgetragen.

3.11.6 Dialyse

Die Dialyse von Proteinen diente zum Pufferwechsel in den gewonnenen Proteinfraktionen. Dazu wurden die Dialysemembranen (Visking Dialysis Membrane Typ 8, Biomol) mit einem Ausschlussvolumen von 12-14 kDa, in ca. 5cm lange Stücke geschnitten, in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) eingeweicht, mehrmals gewaschen und anschließend autoklaviert. Danach wurden die vorbereiteten Dialysemembranen mit sterilen Renaturierungspuffer (10 mM HEPES; pH 7,4; 150 mM NaCl; 2 mM $MgCl_2$; 5 % Glycerin; 0,5 mM PMSF) gespült und mit 200 µl bis 1 ml Proteinlösung befüllt. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei 4 °C.

3.11.7 Gelfiltration

Die Gelfiltration diente dem Pufferwechsel der erhaltenen Proteineluate. Dazu wurden ca. 1,6 ml Sephadex-G25 (Amersham/Pharmacia) (10 g/ 100 ml TE-Puffer), 3 h gequollen, autoklaviert) in eine Pasteurpipette gefüllt. Die Säule wurde dann mit 4 ml Renaturierungspuffer (10 mM Hepes; pH 7,4; 150 mM NaCl; 2 mM $MgCl_2$; 5 % Glycerin; 0,5 mM PMSF) equilibriert. Danach wurden 200 µl Proteinlösung aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Renaturierungspuffer in 100 µl Fraktionen. Der Verlauf der Elution wurde mittels Breadford Proteinbestimmung ermittelt. Die Proteinfraktionen wurden bei –20 °C gelagert.

3.11.8 SDS-Proteingel

Zur Auftrennung der Proteine wurde die Methode nach Schäggar und Jagow (1987) verwendet. Dazu wurden 30 ml Trenngellösung wie folgt pipettiert: 10 ml einer 30 %igen PAA-Stammlösung (Vernetzungsgrad 29:1); 10 ml Pufferlösung (3 M Tris; pH 8,45; 0,3 %SDS); 3 ml 99 % Glycerin; 7,0 ml Aqua dest (zur Trennung der Peptide der hydrophilen Domäne wurde ein 15 % iges Gel bereitet). Die Polymerisation wurde mit 150 µl 10 % APS und 30 µl TEMED gestartet, die Lösung zwischen zwei Glasplatten gefüllt (1 mm Spacer, 18 x 20 cm) und mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet: 1,6 ml einer 30 %igen PAA-Stammlösung (Vernetzungsgrad 29:1); 3 ml Pufferlösung (3 M Tris; pH 8,45; 0,3 %SDS); 7,8 ml Aqua dest. Gestartet wurde die Polymerisation durch 75 µl 10 % APS und 15 µl TEMED. Nach der Auspolymerisation (ca. 30 min) wurde das Gel in eine Zabona-Vertikalapperatur gespannt und Anodenpuffer (0,2 M Tris; pH 8,9) und Kathodenpuffer (0,1 M Tris; 0,1 M Tricine; 0,1 M SDS; kein pH eingestellt) eingefüllt. Die Proben wurden dann mit ESB (2 % SDS; 10 % Glycerin; 1,5 % DTT; 80 mM Tris; pH 6,8; 0,1 mg/ml Bromphenolblau) versetzt und direkt vor dem Auftragen 5 min bei 98 °C gekocht. Die Elektrophorese erfolgte für 1 h bei 40 V und anschließend bei 150 V für 3-5 h. Das Gel wurde Coomassie gefärbt und getrocknet.

3.11.9 Coomassie-Färbung

Das Proteingel wurde für 30 min bis 1 h in Coomassie Lösung (0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250; 30 % Methanol; 10 % Essigsäure) gefärbt und danach die überschüssige Farbe durch schwenken in Entfärberlösung (30 % Methanol; 10 % Essigsäure) mit einen Filterbeutelchen mit Aktivkohle entfernt. Anschließend wurde des Gel zwischen zwei Cellulanfolien (Promega) getrocknet.

3.11.10 Proteinbestimmung nach Breadford

Die quantitative Bestimmung der Proteine erfolgte mit dem Micro Protein Assay Kit von BioRad nach Vorschrift des Herstellers. Die Kalibriergerade wurde mit γ-Globulin erstellt (0-20 µg). Es wurden 5-10 µl der Eluate der Proteinreinigung eingesetzt. Die Messung erfolgte bei 595 nm im Fotometer (Uvikon 860, Kontron Instruments) gegen einen Blindwert.

3.12 Spezielle Methoden

3.12.1 Mitochondrienisolation aus *S. cerevisiae*

Die Voranzucht der Zellen erfolgte in einer 50 ml YNB-Raff (+0,1% Glucose +AS) Medium bei 30°C im Schikanekolben. Die Hauptkultur wurde für Glycerin positive 1-2 %ig und für Glycerin-negative Kolonien 10 %ig in 500 ml YNB-Raff in einen 2000 ml Kolben mit maximaler Belüftung (Rundschüttler 210 U/min) bei 30 °C 16 h angezüchtet. Die OD_{600} sollte sich im Bereich von 2-6 befinden. Die Zellen wurden zunächst geerntet [GS-3-Rotor, Sorvall, 5000 U/min (4000 g), 5 min, RT] und dann einmal mit Aqua dest gewaschen. Anschließend wurde das Feuchtgewicht bestimmt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis unter Verwendung gekühlter Lösungen. Die Zellen wurden einmal mit 30-50 ml eisgekühltem MI-Puffer (0,6 M Sorbitol; 20 mM HEPES-KOH pH 7,4; 0,5 mM PMSF; PMSF kurz vorher hinzugegeben) gewaschen [GSA-Rotor, Sorvall, 4000 U/min (3500 g), 5 min, 4 °C]. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml/g Zellmasse in eiskaltem MI-Puffer resuspendiert und in ein SS34 Röhrchen überführt in dem 2 g Glasperlen/g Zellmasse eingewogen waren. Die Zellen wurden nun durch dreimaliges Wirlen (maximale Stufe), für eine min (zwischendurch 1 min auf Eis inkubieren) aufgebrochen. Die Zellsuspension wurde in ein anderes SS34 Röhrchen überführt und zentrifugiert [SS34-Rotor, Sorvall, 3500 U/min (1500 g), 5 min, 4 °C]. Der Überstand wurde in ein neues SS34 Röhrchen gegeben und das Pellet in eiskaltem MI-Puffer (1ml/g Zellmasse) resuspensiert. Es wurden Glasperlen hinzugeben und nochmals aufgeschlossen. Die beiden Überstände wurden vereinigt und zentrifugiert [SS34-Rotor, Sorvall, 10000 U/min (11000 g), 10 min, 4 °C]. Der resultierende Überstand enthielt die cytoplasmatischen Proteine (0,5 ml Probe zur Kontrolle entnehmen, bei -70˚C einfrieren), das Pellet die Rohmitochondrien. Das Rohmitochondrien-Pellet wurde vorsichtig in 2 ml/g Zellmasse eiskaltem MI-Puffer mit Hilfe einer Gilsonpipette gelöst (0,25ml Probe, bei -70˚C einfrieren). Die Suspension wurde nochmals zentrifugiert [SS34-Rotor, Sorvall, 3500 U/min (4000 g), 3 min, 4 °C]. Hierdurch pelletierte präzipitiertes PMSF und aggregiertes Protein, die Mitochondrien blieben im Überstand. Der Überstand wurde in ein weiteres SS34-Röhrchen überführt, um die Mitochondrien zu pelletieren [SS34-Rotor, Sorvall, 10000 U/min (10000 g), 10 min, 4 °C]. Das Pellet wurde nun vorsichtig in 5 ml eiskalten Flotation-Puffer mit 20 % Saccharose gewaschen [SS34-Rotor, Sorvall, 12000 U/min (17000 g), 20 min, 4 °C]. Das Pellet wurde anschließend in 2 ml eiskalter 80%iger Saccharose (gelöst in Flotation-Puffer) aufgenommen und mit einen Handhomogenisator vorsichtig, aber vollständig resuspensiert und in ein vorgekühltes Ultrazentrifugen-Röhrchen (Beckmann, Ultra-Clear™, No.:344059, nicht steril, für SW41 Rotor) überführt. Der Gradient wurde nun folgendermaßen vorsichtig überschichtet: 4 ml 55% Saccharose in Flotation-Puffer, 4 ml 45% Saccharose in Flotation-Puffer, 2 ml 20% Saccharose in Flotation-Puffer. Die Separation der Mitochondrien erfolgte im Ausschwingrotor SW41 (Dupon) für 1h 45 min bei 35000 U/min und 4°C (Beschleunigung: N, Bremsen: 5). Die Mitochondrien sollten als braune Bande in der Interphase zwischen 45 und 55% Saccharose sichtbar sein (ein brauner Schmier in der 55% Phase ist ein Hinweis auf Zerstörung vieler Mitochondrien im Verlauf der Präparation). Die Mitochondrienbande wurde vorsichtig mit einer Gilsonpipette abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt (maximal 750µl Portionen). Zur Verdünnung der Saccharoselösung

wurden die Mitochondrien nun mit 1-2 Volumen MI-Puffer ohne PMSF versetzt und pelletiert [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g), 10 min, 4 °C]. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Mitochondrien-Pellet wurde in 0,5 - 1 ml MI-Puffer ohne PMSF aufgenommen. Nach der Proteinbestimmung (Breadford) wurden die Mitochondrien aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

3.12.2 Magnesiumbestimmung

Für die Magnesiumbestimmung wurden 100 µg hoch gereinigte Mitochondrien pellettiert [Tischzentrifuge, 12000 U/min (10000 g), 10 min, 4 °C] und in 100 µl Aqua dest aufgenommen. 10 µl dieser Suspension wurden mit 90 µl Aqua dest aufgefüllt. Nach Zugabe von 900 µl 0,1 N Salpetersäure wurden die Proben im Atomabsorptionsspektrofotometer (Perkin Elmer 5100 PC) gemessen. Parallel dazu wurde die Proteinkonzentration der verbleibenden Mitochondrienlösung bestimmt.

3.12.3 Gel-Shift-Experimente für Transkripte des Introns aI5γ

Die Gel-Shift-Experimente dienen dem Nachweis einer RNA/Protein Interaktion *in vitro*. Dazu mussten zunächst die Proteine der Suppressor-Domäne und der hydrophilen Domäne isoliert und gereinigt werden (s. Proteinmethoden). Die Experimente wurden mit radioaktiv markierter oder unmarkierter RNA durchgeführt, die durch *in vitro* Transkription (Kapitel 3.10.6) erhalten werden. Ein 30 µl Ansatz wurde in folgender Reihenfolge pipettiert: x µl DEPC Aqua dest; 6µl 5x Binding-Puffer (50 mM HEPES pH 7,4; 500 mM KCl; 5 mM $MgCl_2$; 5 mM EDTA; 5 mM DTT; 25 % Glycerin); x µl 1-6 µg Protein (50-200 pmol); x µl 10-50 ng RNA ggf. markiert mit $\alpha[^{32}P]$UTP (100-800 pmol), die zuvor 2 min bei 82 °C denaturiert wurde (außer bei D1). Die Zugabe von 3µl 5mg/µl Heparin erhöhte die Spezifität des Gel-Shifts. Die Bindung erfolgt auf Eis für 30 min bei gelegentlichem Schütteln. Danach wurden die Proben auf ein 5 %iges (D23, D456) bzw. auf ein 3,5 %iges (D1) natives PAA Gel (29:1 vernetzt) gegeben das 30 min bei 8 °C (100V, 20mA) vorgelaufen war. Die Trennung erfolgte über Nacht für 10 h bei 100 V, 20 mA und 8 °C. Wenn die Proben radioaktiv markiert waren, wurde das Gel auf Filterpapier (Whatman 3MM) aufgezogen, mit Frischhaltefolie abgedeckt und für 45-60 min auf dem Geltrockner (Zabona) bei 80 °C getrocknet. Die Exposition auf dem Röntgenfilm erfolgte für 1-3 d bei -70 °C. Nicht radioaktiv markierte Proben wurden mittels Elektroblot übertragen (Kapitel 3.12.3.3) und anschließend mit dem Antisense-Transkript von aI5γ hybridisiert.

3.12.3.1 Kompetitionstests

Kompetitionsanalysen wurden durchgeführt um die Spezifität der RNA-Protein-Bindung nachzuweisen. Dabei konkurriert entweder eine spezifische oder eine unspezifische RNA (Kompetitor) mit der spezifischen RNA um das Protein.
Für die Kompetitionstests wurden jeweils 1 ng spezifische radioaktiv markierte RNA und 20 ng Protein verwendet, der Ansatz erfolgte wie oben beschrieben. Die negativ Kontrolle wurde ohne Protein nur mit Renaturierungspuffer angesetzt. Für die positiv Kontrolle wurde nur die radioaktiv markierte RNA und Protein verwendet.
Als spezifischer Kompetitor wurden die entsprechenden Domänen von aI5γ (unmarkiert) in einer 0,5-, 1- und 5-fachen Menge (0,5 ng; 1 ng; 5 ng) zum Ansatz hinzugegeben. Als unspezifischer Kompetitor diente t RNA in einer 10-, 100- und 1000-fachen Menge (10 ng; 100 ng; 1000 ng). Der Kompetitor wurde jeweils vor der spezifischen markierten RNA in den Ansatz gegeben. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen (s.o.).

3.12.3.2 Native PAA-Gele

Zur Auftrennung der RNA-Protein „Shifts“ wurden native Polyacrylamidgele (PAA-Gele) benutzt. Die Konzentration des PAA-Gels wurde ebenfalls nach der Größe der zu trennenden RNA-Fragmente gewählt und lag zwischen 3,5-5 %. Für das Gel wurden 30 ml Lösung in einem sterilen Kolben bereitet: 6 ml PAA (Vernetzungsgrad 29:1), 3 ml TBE-Puffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,3 aus 10-fach Stammlösung, die mit DEPC Aqua dest angesetzt war); aufgefüllt auf 30 ml mit DEPC Aqua dest.. Die Polymerisation wurde durch 250 µl 10 % APS und 15 µl TEMED gestartet. Die weitere Behandlung des Gels wurde wie bei DNA-PAA Gelen durchgeführt (Kapitel 3.8.2). Die Elektrophorese erfolgte mit sterilen 1-fach TBE-Puffer. Vor dem Probenauftrag wurde ein Prälauf von 30 min bei 100 V, 20 mA und 8 °C durchgeführt.
Den Proben wurde kein Stopper zugesetzt, da sie schon Glycerin enthielten. Zur Kennzeichnung der Lauflänge wurden rechts und links der Proben 1x Binding-Puffer (s.o.) mit 0,025 % Bromphenolblau und 0,025 % Xylencyanol aufgetragen. Der Hauptlauf erfolgte dann für 10 h bei 100 V, 20 mA und 8 °C. Das Gel wurde, wenn die Proben radioaktiv markiert waren, getrocknet und exponiert. Bei einem nicht radioaktiven Gel wurde ein Elektroblot und eine Hybridisierung angeschlossen.

3.12.3.3 Elektroblot

Der Elektroblot wurde zur Übertragung von RNA bzw. Protein aus einem PAA-Gel auf eine Membran genutzt. Speziell nicht radioaktiv markierte Gel Shift Proben wurden so auf eine Nylonmembran geblottet. Dazu wurde das Gel auf Whatman Papier geben und 10min in 1x TBE inkubiert. Für den Elektroblot wurden nun mit TBE befeuchtetes Whatman Papier (5 Lagen), die mit TBE befeuchtete Nylonmembran (Hybond N, Amersham/Pharmacia), das Gel und nochmals 5 Schichten Whatman Papier auf die Anode des Elektroblotters (Stratagene) geschichtet. Das Blotting erfolgte für 2 h bei 140 mA im Kühlraum. Anschließend schloss sich ein „UV-chrosslinking“ (UV-Stratalinker, automatische Einstellung) an, um die RNA/Protein Komplexe an die Membran zu binden. Zur Hybridisierung wurde das Antisense-Transkript von aI5γ eingesetzt.

4 Ergebnisse

1.1 Genetische Analyse funktioneller Strukturelemente des Mrs2p *in vivo*

4.1.1 Erstellung eines *in vivo* Spleißsystems

Bei dem Mrs2p handelt es sich um ein Protein, das am Spleißvorgang des Gruppe II Introns aI5γ beteiligt ist (Kapitel 1.3.2.1.3 und 2.2). Im Stamm DBY 747 führt der „knock out" des *MRS2* Gens zu einer vollständigen Blockierung der Spleißreaktion, allerdings scheint dieser Stamm eher ein Einzelfall zu sein (persönliche Mitteilung R. J. Schweyen). Denn im Stamm DBY 947 führt der „knock out" (DBY mrs2::) nicht zu einer vollständigen Blockierung der Spleißreaktion, sondern nur zu einer Reduktion um etwa 60 % (Abb. 12). Der verbleibende Anteil an gespleißter RNA reicht zur Atmung aus, so dass eine Differenzierung zwischen dem „knock out" Stamm und dem Stamm, der das Mrs2p trägt, durch Wachstum auf Glycerinmedium nicht möglich ist. Um die direkte Wirkung des Mrs2p auf den Atmungs- bzw. Spleißphänotyp beobachten zu können, musste zunächst ein geeignetes Testspleißsystem entwickelt werden, mit dem es möglich ist, einfach und schnell funktionelle Bereiche des Mrs2p *in vivo* zu identifizieren. Aus diesem Grund wurde zunächst ein *MRS2* „knock out" Hefestamm konstruiert, bei dem keine Spleißreaktion nachweisbar ist.

Um eine vollständige Blockierung der Spleißreaktion im DBY mrs2:: zu erhalten, wurde das Wildtyp-Intron aI5γ gegen ein mutiertes Intron (B-AC*) mit verminderter Spleißeffizienz ausgetauscht (ca. 30 % vom Wildtyp). Das mutierte Intron weist einen Nukleotidaustausch von ACG zu AAC in der „bulge/wobble region" auf Position 24-26 der Domäne V des Introns aI5γ auf. Dadurch verlagert sich der „bulge" um ein Basenpaar näher zur Basis dieser Domäne (Abb. 12) (Schmidt et al. 1996).
Die Neukombination erfolgte durch Cytoduktion (Material und Methoden 3.5.3). Dazu wurde zunächst der Stamm α DBY B-AC* mit dem Stamm a MY 375 ρ^0 gekreuzt. Anschließend wurden die Cytoduktanden a MY 375 B-AC* selektiert, die wiederum in einem weiteren Cytoduktionsversuch mit den Stamm α DBY 947 mrs2:: ρ^0 verwendet wurden. Die aus dieser Kreuzung hervorgegangenen Cytoduktanden werden im folgenden als DBY 947 mrs2:: B-AC* bezeichnet.

Dieser neu gewonnene Stamm wurde zunächst auf den Atmungsphänotyps getestet (Material und Methoden 3.5.4). Dabei führt die Kombination des spleißreduzierten Introns mit dem spleißreduzierten „knock out" Stamm zu einem negativen Glycerinphänotyp. D.h., der neue Stamm DBY 947 mrs2:: B-AC* ist ohne *MRS2* Gen nicht in der Lage zu atmen. Dann wurde durch RNA-

Isolation und Nothernblot Experiment der Spleißphänotyp bestimmt, indem einmal mit der intronspezifischen Sonde SnaB und einmal mit der exonspezifischen Sonde E4 hybridisiert wurde (Material und Methoden 3.10.1 und 3.10.4). Zum Vergleich wurde die RNA der Stämme DBY 947 GII5γ, DBY 947 mrs2:: und DBY 947 B-AC* ebenfalls ausgetestet, gleiche Mengen an mitochondrialer RNA wurden durch Ballanzierung der RNA Proben mit der Sonde Oli2 gewährleistet.

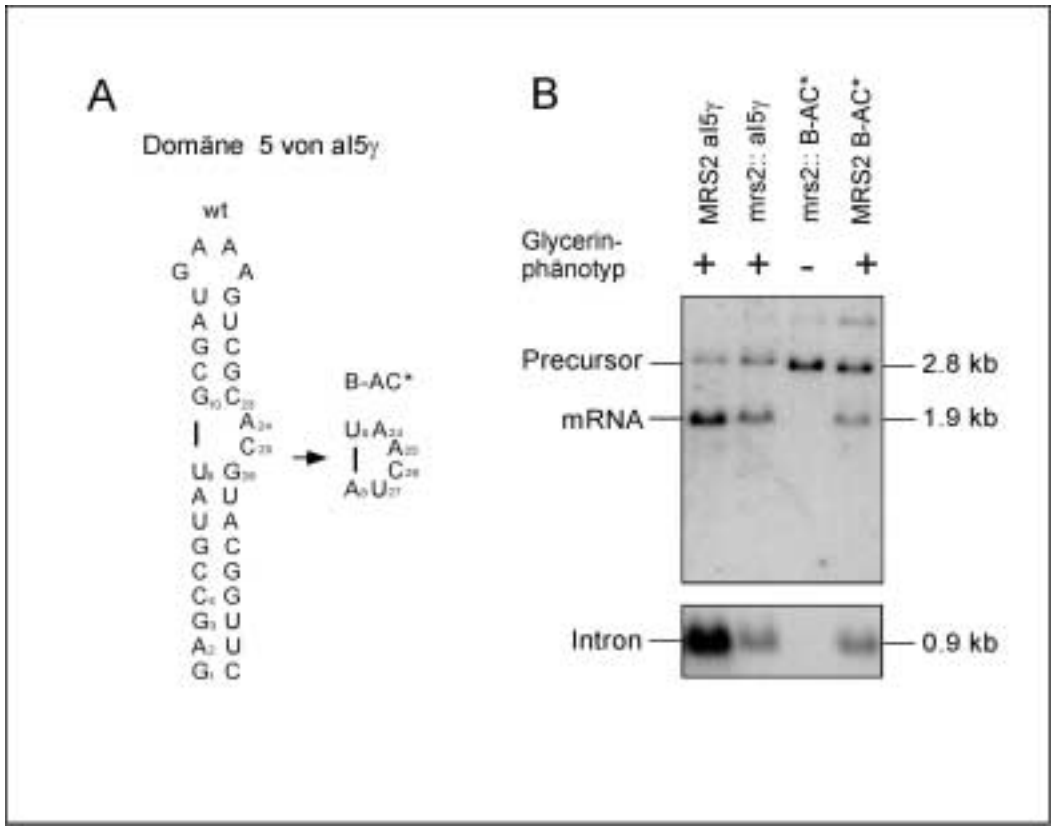


Abb. 12. A: Veränderungen in der Domäne 5, der Nukleotidaustausch von ACG zu AAC in der „bulge/wobbleregion" 24, 25, 26, führten zu einer Verschiebung des „bulge" um ein Basenpaar näher zur Basis. B: Glycerin- und Spleißphänotypen der verschiedenen Hefestämme. Der Nothernblot wurde mit den Sonden der exonspezifischen Sonde E4 (oberer Teil) und der intronspezifischen Sonde SnaB (unterer Teil) durchgeführt.

In Abb. 12 B ist deutlich zu erkennen, dass der „knock out" Stamm DBY 947 mrs2:: sowie der Stamm DBY 947 B-AC*, wie erwartet, eine deutlich reduzierte Spleißeffizienz aufweisen. Die Kombination dieser beiden Stämme, was dem Stamm DBY 947 mrs2:: B-AC* entspricht, führt dagegen zu einem vollständigen Block der Spleißreaktion. Dieses Ergebnis konnte durch RT-PCR bestätigt werden (Material und Methoden 3.10.8). Dabei lassen sich mit dem Primerpaar USI5γ/ 3'-Exon bei den Stämmen DBY 947 mrs:: und DBY 947 B-AC* Amplifikate bei 1043 bp (Exon- und Intronsequenzen) und 156 bp (nur Exonsequenzen) nachweisen, während bei dem Stamm DBY mrs2:: B-AC* nur das große DNA-Fragment detektierbar ist (nicht dargestellt).

Anschließend wurde kontrolliert, ob eine plasmidale Kopie des *MRS2* Gens im DBY 947 mrs2:: B-AC* in der Lage ist den Spleißdefekt zu komplementieren. Dazu wurde das *MRS2* Gen mit Hilfe der PCR unter Verwendung der Primer MRS2.1 und MRS2.2 aus der genomischen DNA des Stammes DBY 947 GII5γ amplifiziert und über die mit den Primern eingefügten Restriktionsschnittstellen BamHI und EcoRI in das „low copy"-Plasmid pRS416 und das „high copy"-Plasmid pRS426 kloniert. Die Primer wurden so gewählt, dass Promotor und Terminator des *MRS2* Gens auf dem klonierten DNA Abschnitt lokalisiert sind, sodass eine Expression unter den *MRS2* eigenen regulatorischen Elementen möglich ist. Die *MRS2* tragenden Plasmide wurden in den Stamm DBY 947 mrs2:: B-AC* transformiert. Anschließend wurden die Transformanden auf Atmungskompetenz (Kapitel 3.5.4) und Spleißfähigkeit (Kapitel 3.10.4) überprüft. Es zeigte sich, dass beide plasmidalen *MRS2* Kopien in der Lage sind, den negativen Atmungsphänotyp des DBY mrs2:: B-AC* zu komplementieren (Abb. 13). Weitere Analysen der Transformanden ergaben, dass die erhöhte Kopienanzahl des *MRS2* Gens („high copy"-Konstrukt) eine geringfügig bessere Restauration des Spleißphänotyps ergibt, als die niedrige Kopienzahl des *MRS2* Gens („low copy"-Konstrukt). Somit stand nun ein System zur Verfügung, mit dessen Hilfe im Weiteren Veränderungen im *MRS2* Gen und deren Auswirkungen auf das Spleißen direkt genetisch analysiert werden konnten.

4.1.2 Auswirkungen von Deletionen im *MRS2* Gen auf den Atmungs- und Spleißphänotyp

Um erste Hinweise zu erhalten, welche Bereiche des Mrs2p am Spleißvorgang beteiligt sind, wurden größere Deletionen im *MRS2* Gen analysiert. So wurden 13 Aminosäuren der Suppressor-Domäne des Mrs2p durch Deletion von 39 Basen entfernt, die zwischen den zwei Bgl II-Schnittstellen 658 bp und 697 bp stromabwärts vom ATG lokalisiert sind (ΔSD).

Des Weiteren wurden zwei veränderte Mrs2p eingehender analysiert, die bereits im Verlauf einer Diplomarbeit (Astrid Wersuhn, TU Berlin 1996) herstellt worden waren. Im ersten dieser Konstrukte wurden die Transmembran-Domänen des Mrs2p entfernt, indem mit Hilfe der PCR zwei Nco I-Schnittstellen kreiert wurden. Hierdurch konnte der Bereich zwischen den Aminosäurepositionen 308 und 378, der die Transmembran-Domänen umfasst, entfernt werden. Bedingt durch die Einführung der Nco I-Schnittstelle änderte sich die Aminosäuresequenz an Position 306 und 307 von Methionin und Asparaginsäure zu Asparagin und Serin (ΔTM).

Das zweite Konstrukt umfasste die hydrophile Domäne. Hier wurde der gesamte C-terminale Teil des Proteins deletiert. Erreicht wurde dies, indem mittels PCR Nco I-Schnittstellen eingeführt wurden, durch die die letzten 92 Aminosäuren entfernt werden konnten. Aufgrund der verbliebenen

Nco I-Schnittstelle veränderte sich die letzte Aminosäure im Mrs2p von Asparaginsäure zu Tyrosin (ΔHD).

Die *MRS2* Deletionen wurden sowohl in pRS416 als auch in pRS426 kloniert. Anschließend wurden die Konstrukte in den Stamm DBY 947 mrs2:: B-AC* transformiert und auf Atmungs- und Spleißfähigkeit überprüft. Alle Transformanden mit einem Deletionskonstrukt weisen einen negativen Atmungsphänotyp auf. Dabei ist es unerheblich, ob das Konstrukt sich im „low"- oder im „high copy"-Plasmid befindet (Abb. 13). Die Überprüfung des Spleißphänotyps der Transformanden bestätigt den Atmungsphänotyp. Keines der untersuchten Deletionskonstrukte ist in der Lage, den Block der Spleißreaktion des Introns aI5γ zu restaurieren (Abb. 13).

Damit könnten alle Bereiche des Mrs2p an der Spleißfunktion teilnehmen. Es kann dabei nicht unterschieden werden, ob der beobachtete Spleißphänotyp auf der Deletion der Proteindomäne oder lediglich auf einer falschen Faltung des Proteins beruht. Um die Möglichkeit einer falschen Faltung des Proteins zu minimieren, wurden im Folgenden einzelne Aminosäuren in der Suppressor- und der hydrophilen Domäne ausgetauscht und die Wirkung der Austausche auf den Spleißphänotyp analysiert.

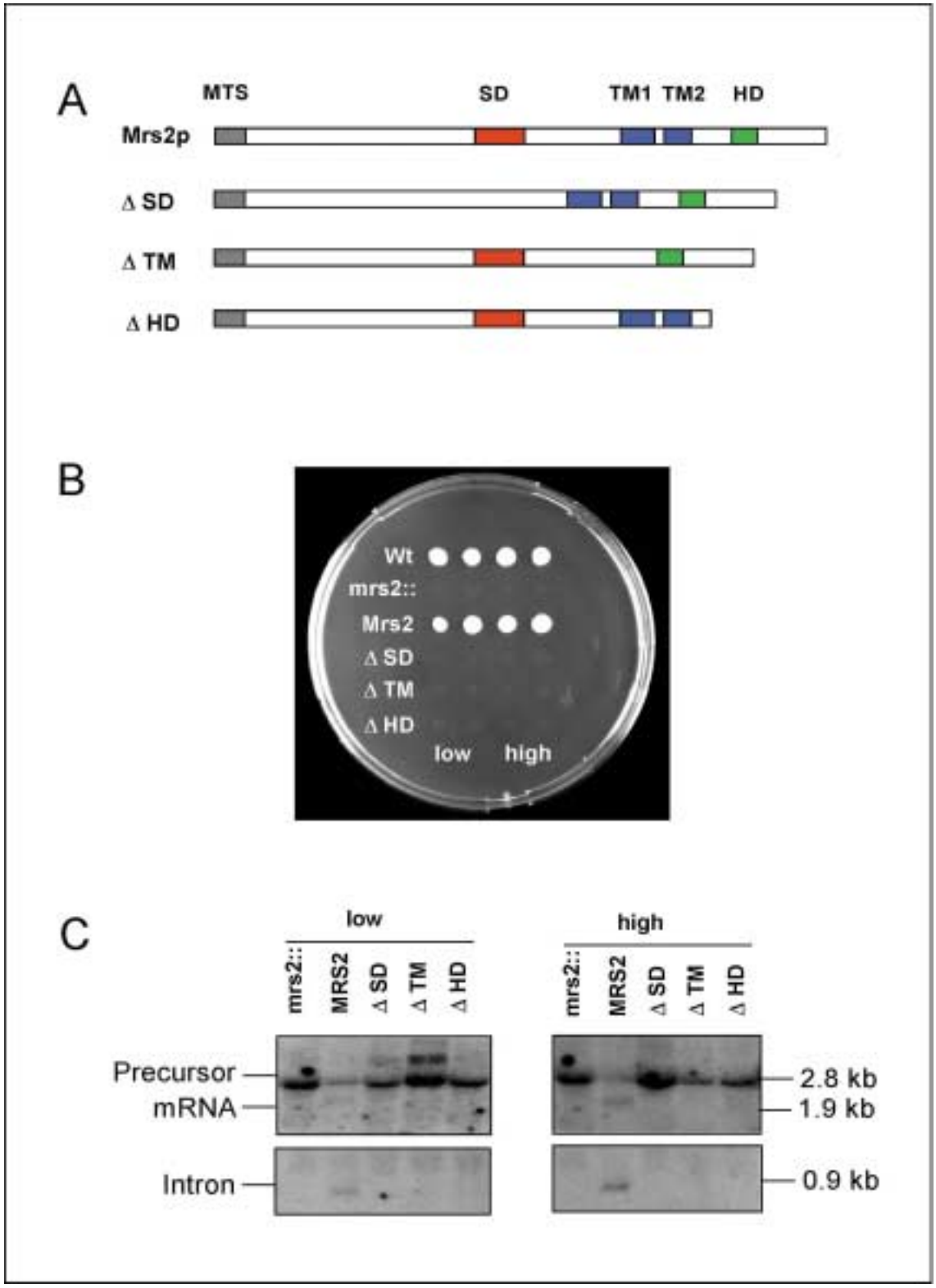


Abb. 13. Deletionsanalyse des Mrs2 Proteins. A: Schema der deletierten Bereiche im Mrs2p. MTS: mitochondriale Targeting-Sequenz; SD: Suppressor-Domäne; TM1, TM2: Transmembran-Domänen 1 und 2; HD: hydrophile Domäne; B: Glycerinphänotyp der Transformanden mit verschiedenen *MRS2* Deletionskonstrukten auf „low"- und „high copy"-Plasmiden. C: Spleißphänotyp der Transformanden. Die Hybridisierung erfolgte mit der exonspezifischen Sonde E4 (oberer Teil) und der intronspezifischen Sonde SnaB (unterer Teil). Als Kontrollen wurden jeweils der Ausgangsstamm DBY 947 GII5γ und der Deletionsstamm DBY 947 mrs2:: B-AC* verwendet.

4.1.3 Mutagenese der hydrophilen Domäne

Da die Deletion der hydrophilen Domäne die Funktion des Mrs2p vollständig inhibiert, erschien es sinnvoll, durch den Austausch einzelner Aminosäuren die Bedeutung dieser Domäne näher zu analysieren. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Argininreste dieser Domäne gelegt, da sie häufig in den sogenannten Arginin-reichen-Motiven (ARM) die RNA-Bindung vermitteln (vergl. Kapitel 2.2.1). Dabei erfolgt die Bindung hauptsächlich über die Ladung des Arginins. Unterstützt wird die Bindung durch die Struktur des Arginins, die besonders gut in die große Furche der helikalen Bereiche der RNA passt.

Um die potentielle Bindung nachzuweisen, wurden mittels *in vitro* Mutagenese die Arginine in folgenden Kombinationen gegen Alanin ausgetauscht: die Arginine 403 bis 405 (R403-405A), 404, 405 (R404,405A) und das Arginin 405 (R405A) (Material und Methoden 3.7.7). Alanin wurde zum Austausch ausgewählt, da es eine sehr kurze und ungeladene Seitenkette besitzt und so die Struktur des Proteins nur unwesentlich verändert.

Ziel dieses Versuchs war es, nachzuweisen, ob der Verlust der Arginine zu einem Verlust der Spleißfähigkeit führt und die Arginine somit zu einem ARM gehören. Durch die vorgenommenen Austausche wurden aber auch immer Ladungsträger entfernt, die möglicherweise als Signal für die korrekte Lokalisation des Proteins in den Mitochondrien dienen. Deshalb wurde als Kontrolle zusätzlich das Arginin 405 durch Lysin (R405K) ersetzt. Hierdurch bleibt die Ladung erhalten, während Lysin trotz gleicher Ladung nicht effektiv die Bindung übernehmen kann.

Neben den Argininen wurden weitere Aminosäuren der hydrophilen Domäne des Mrs2p gegen Alanin ausgetauscht. Das Lysin an Position 406 (K406A) wurde substituiert, um zu ermitteln, welche Auswirkung der Verlust einer positiven Ladung in dieser Region auf das Mrs2p hat. Des Weiteren wurde das Tryptophan an Position 408 gegen Alanin (W408A) ausgetauscht. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob es sich bei diesem Tryptophan um den hydrophoben Teil eines RNA-Bindemotives handelt, der häufig an der Sequenzspezifität beteiligt ist (Weiss und Narayana 1999).

AS-Austausch	Oligonukleotid	Identifikation der Mutation
R403-405°	R403-405A (HD1)	Esp1396I
R404,405A	R404,405A (HD2)	PCR MRS2.17 /MRS2.2
R405A	R405A (HD3)	PCR MRS2.17 /MRS2.2
R405K	R405K	PCR MRS2.17 /MRS2.2
K406A	K406A	HaeIII
W408A	W408A	HaeIII

Tab. 4. Nachweis des Aminosäureaustausches in der hydrophilen Domäne des *MRS2* Gens.

Wie aus Tab. 4 zu ersehen ist, wurden die erzeugten Mutationen entweder durch die Einführung der zusätzlichen Restriktionsschnittstelle HaeIII oder durch PCR mit Hilfe der Primer MRS2.17 und MRS2.2 identifiziert.
Nach der Identifikation der gewünschten Klone wurde die Plasmid DNA isoliert und sequenziert. Die entstandenen Plasmide wurden in den Stamm DBY947 mrs2:: B-AC* transformiert und die Transformanden auf ihre Atmungs- und Spleißfähigkeit überprüft (Abb. 14).

Alle getesteten Transformanden zeigen einen atmungskompetenten Phänotyp. Im Gegensatz zu den anderen Transformanden weist die Transformande mit der Mutation W408A allerdings ein deutlich schlechteres Wachstum auf Glycerinmedium auf.
Die Überprüfung des Spleißphänotyps ergab, dass grundsätzlich alle Transformanden in der Lage sind zu spleißen. Bei genauerer Betrachtung zeigen sich jedoch deutliche Unterschiede in der Stärke der Spleißreaktion (Abb. 14). So ist der Austausch R403-405A um ca. 50 % spleißreduziert, während die Austausche R404,405A und R405A eine etwa zum Wildtyp-Protein vergleichbare Spleißeffizienz aufweisen. Damit beeinflussen die Argenine zwar den Spleißvorgang, denn der Dreifachaustausch spleißt weniger gut als der Zweifach- und der Einfachaustausch, die für ein ARM erwarteten Effekte (d.h. der Verlust der Spleißfunktion) trat aber nicht auf.
Im Gegensatz zum Austausch R405A führt der Austausch R405K in der Transformande zu einer reduzierten Spleißreaktion. Damit kann eine verminderte Spleißreaktion nicht auf den Verlust einer Nettoladung in diesem Bereich zurückgeführt werden. Dass die Ladung nicht essentiell ist, zeigt sich ebenfalls im Spleißverhalten der Transformande mit der Substitution K406A. Sie zeigt eine gute Spleißreaktion (Abb. 14) trotz des Verlustes einer positiven Ladung.
Ein überraschendes Ergebnis ergab sich aus dem Spleißverhalten der Transformande mit dem Konstrukt W408A. Diese Transformande, die auf Glycerinmedium ein sehr schlechtes Wachstum aufweist, zeigt trotzdem eine vierfach bessere Spleißreaktion als der Wildtyp (siehe MRS2 WT und W408A, Abb. 14). Damit kommt dem Tryptophan eine besondere Stellung zu, da es in der Lage ist, den Spleiß- und Atmungsphänotyp nahezu zu entkoppeln.

Als Resümee folgt, dass einem ARM vergleichbarer Effekt nicht festgestellt werden konnte, obwohl der Austausch aller drei Arginine zu einer Schwächung der Spleißreaktion führt. Dabei spielt die Ladung eine untergeordnete Rolle, wie die Austausche R405A und R405K zeigen, vielmehr scheint die Struktur von Bedeutung zu sein. Dabei bleibt die Frage offen, ob die Effekte auf eine strukturelle Veränderung des Proteins, eine indirekte Beeinflussung oder möglicherweise eine schwache direkte RNA-Bindung zurückzuführen ist. Um Hinweise zu sammeln, die zur

Beantwortung dieser Fragen führen, wurden Gelretardierungen mit der hydrophilen Domäne durchgeführt (Kapitel 4.2.7.1).

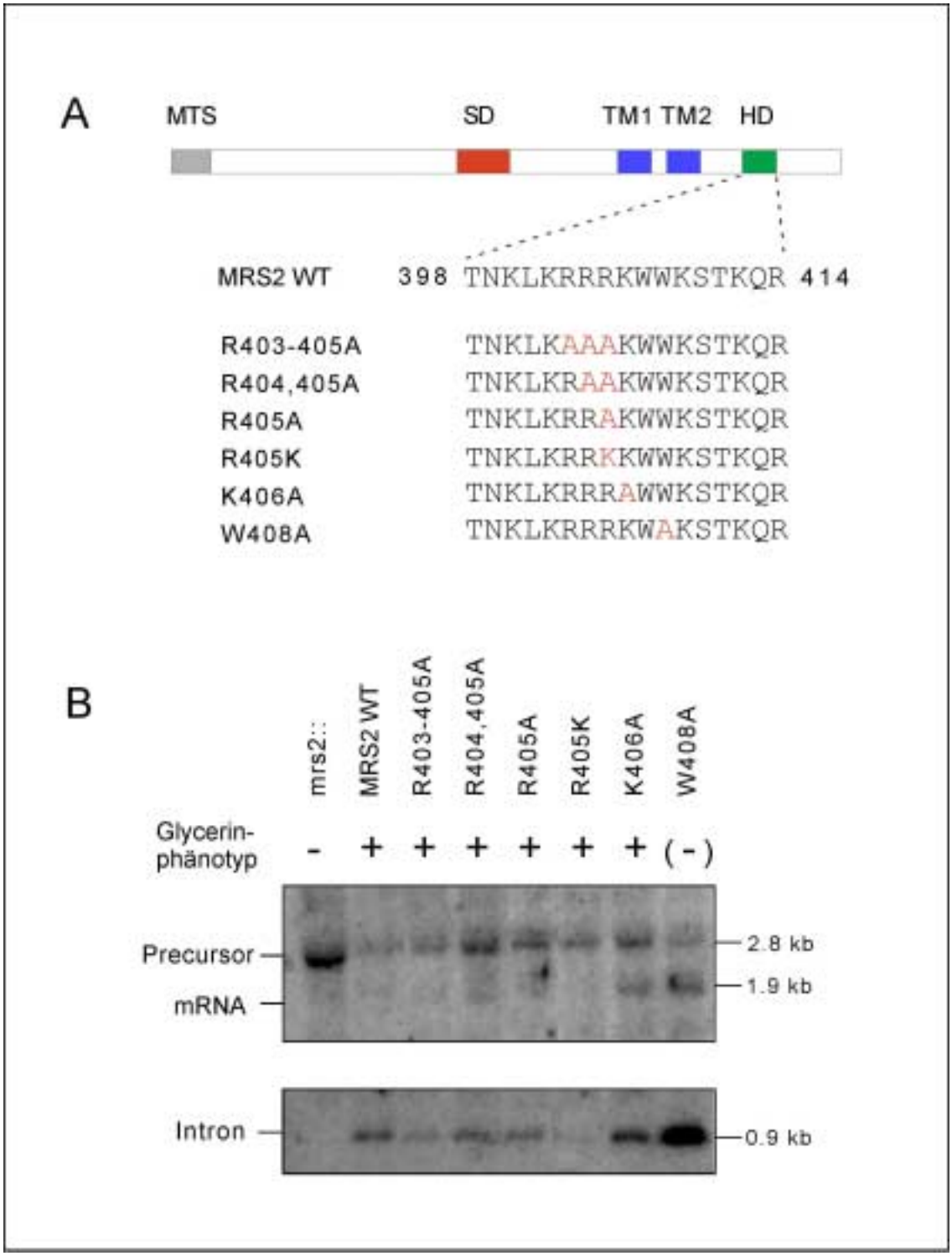


Abb. 14. Mutationsanalyse der hydrophilen Domäne. A: Schema der ausgetauschten Aminosäuren in der hydrophilen Domäne. B: Glycerin- und Spleißphänotyp der Transformanden mit dem *MRS2* Gen und den Mutationskonstrukten auf dem „low copy"-Plasmid pRS416. Die Hybridisierung erfolgte mit der exonspezifischen Sonde E4 (oberer Teil) und der intronspezifischen Sonde SnaB (unterer Teil).

4.1.4 Mutagenese der Suppressor-Domäne

Der zweite Bereich für eine mögliche RNA-Bindung ist die Suppressor-Domäne (Aminosäuren 174-260). In diesem Bereich sind die Reversionen lokalisiert, welche die Spleißfähigkeit einiger spleißdefekter Gruppe II Introns restaurieren (Schmidt et al. 1998). Allerdings wurde diese Proteinregion auch als ein Bereich beschrieben, bei dem bestimmte Mutationen zu einer erhöhten Magnesiumkonzentration in den Mitochondrien führen, wodurch ebenfalls eine geringe Spleißreaktion ausgelöst wird (Gregan et al. 2001).

Um diese Proteinregion bezüglich ihres Spleißverhaltens *in vivo* genauer zu untersuchen, wurden die beiden Suppressor-Mutationen, die in den Hefestämmen DBY947 B-loop [Mrs2-L232F (Leucin zu Phenylalanin)] und DBY947 G3A [Mrs2-T230L (Tyrosin zu Leucin)] gefunden wurden, eingehender analysiert (Kapitel 2.2.1). Durch diese Reversionen könnte das Mrs2p eine zusätzliche Spleiß- oder RNA-Bindefunktion erlangt haben. Eine weitere Wirkungsweise könnte darin bestehen, dass eine schon vorhandene RNA-Bindung durch eine Änderung der Proteinstruktur verbessert wird.

Um dies zu charakterisieren, wurde die Aminosäuren Leucin 232 und Tyrosin 230 gegen Alanin ausgetauscht. Ziel dieser Austausche war es herauszufinden, ob es sich um eine spezifische neu erworbene Spleißfunktion des Mrs2p handelt. In diesem Fall sollte Alanin an diesen Positionen zu einem Verlust der Spleißfähigkeit führen.

Zunächst wurden die Aminosäureaustausche L232A und T230A im Mrs2p auf DNA Ebene mittels *in vitro* Mutagenese eingefügt. Um zu kontrollieren, ob möglicherweise jede Veränderung in dieser Proteinregion zu einer Verbesserung der Spleißreaktion führt, wurde zusätzlich die Aminosäure Arginin auf Position 210 zu Alanin ausgetauscht (R210A). Um die erfolgreich mutagenisierten Transformanden zu identifizieren, wurden jeweils 6 Transformanden direkt zu einer Kolonie-PCR eingesetzt (Material und Methoden 3.7.9). Hierzu wurden jeweils die Primer MRS2.2 und die entsprechenden Gegenprimer R210A-Ko, T230A-Ko und L232A-Ko verwendet. Die Primer waren so konstruiert, dass sie an ihrem 3'-Ende genau mit der mutagenisierten Stelle übereinstimmten. Somit konnte eine erfolgreiche Einführung der Mutationen durch ein DNA Amplifikat von etwa 980 kb nachgewiesen werden. Von den positiv identifizierten Klonen wurde einer ausgewählt, die Plasmid DNA isoliert und sequenziert. Es konnte gezeigt werden, dass die Austausche L232A und R210A basengenau erfolgt waren. Der Austausch T230A war zwar ebenfalls inseriert, zusätzlich wurde jedoch ein Basenaustausch von G zu T in Position 696 stromabwärts vom ATG

nachgewiesen, wodurch wiederum der Austausch von Leucin 232 zu Phenylalanin bewirkt wurde (T230A/L232F).
Diese veränderten *MRS2* Gene wurden nun in den Stamm DBY 947 mrs2:: B-AC* transformiert und die Transformanden wurden auf Atmungs- und Spleißfähigkeit überprüft. Als Kontrolle wurde der Suppressor Mrs2-L232F (Schmidt et al. 1998) auf seine Spleißreaktion getestet (Abb. 15).
Ein Vergleich der Transformanden auf Glycerinmedium ergab, dass der Suppressor L232F und die Mutationen R210A und L232A ein ebenso gutes Wachstum bewirkt, wie das Wildtyp-Mrs2p. Die Transformande mit der Doppelmutation T230A/L232F ist jedoch nicht in der Lage, auf Glycerinmedium zu wachsen.

Die Analyse des Spleißphänotyps ergab, dass die Transformande mit dem Austausch R210A genauso gut wie die Wildtyp-Transformande spleißt (Abb. 15). Eine Veränderung des Proteins in dieser Region scheint daher ohne Bedeutung zu sein. Die Spleißreaktionen der anderen Transformanden sind dagegen deutlich gesteigert (Exonhybridisierung, Abb. 15). Die Intron Hybridisierung bestätigte die gesteigerte Spleißreaktion, allerdings ist die Intronbande im Vergleich zur Exonbande stark überrepräsentiert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der Abbau des Introns verlangsamt ist. Dies könnte verschiedene Ursachen haben: Denkbar wäre beispielsweise, dass das Mrs2p am Abbau der Introns beteiligt ist und dieser nun durch die Mutationen im Mrs2p gestört wird. Möglicherweise lagert sich auch das Protein durch die Mutationen verstärkt an die Intron RNA, oder es kann sich nicht von der RNA lösen und schützt sie so vor dem Abbau.
Da die Mutationen T230A/L232F und L232A zum gleichen Spleißphänotyp führen wie der Suppressor L232F, scheint hier eher eine Veränderung der Proteinstruktur vorzuliegen, durch die es zu einer besseren Spleißreaktion kommt.
Bemerkenswert ist darüber hinaus die Diskrepanz zwischen dem negativen Atmungsphänotyp und dem positiven Spleißphänotyp der Transformande mit dem Mrs2p T230A,L232F. Hier beruht der Verlust der Atmung offensichtlich auf dem Verlust der Biogenese-Funktion des Mrs2p. Im Falle dieses doppelten Aminosäureaustausches können sich scheinbar zwei geringe Störungen in der Proteinstruktur aufsummieren, so dass kein Wachstum auf Gycerinmedium mehr möglich ist.

Anhand der Mutagenese-Ergebnisse der Suppressor-Domäne des Mrs2p konnte gezeigt werden, dass es sich um eine Proteinregion handelt, die an der Biogenese-Funktion und dem Spleißen beteiligt ist. Dabei lässt sich durch die eingeführten Mutationen die Spleißreaktion verbessern. Auf Grund der extrem hohen Stabilität der gespleißten Intron RNA, liegt die Vermutung nahe, dass eine direkte Interaktion zwischen Protein und RNA vorliegt. Dabei könnte die verbesserte

Spleißreaktion möglicherweise durch eine verbesserte RNA-Bindung erfolgen. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass eine veränderte Magnesiumkonzentration für die beobachteten Effekte verantwortlich ist.

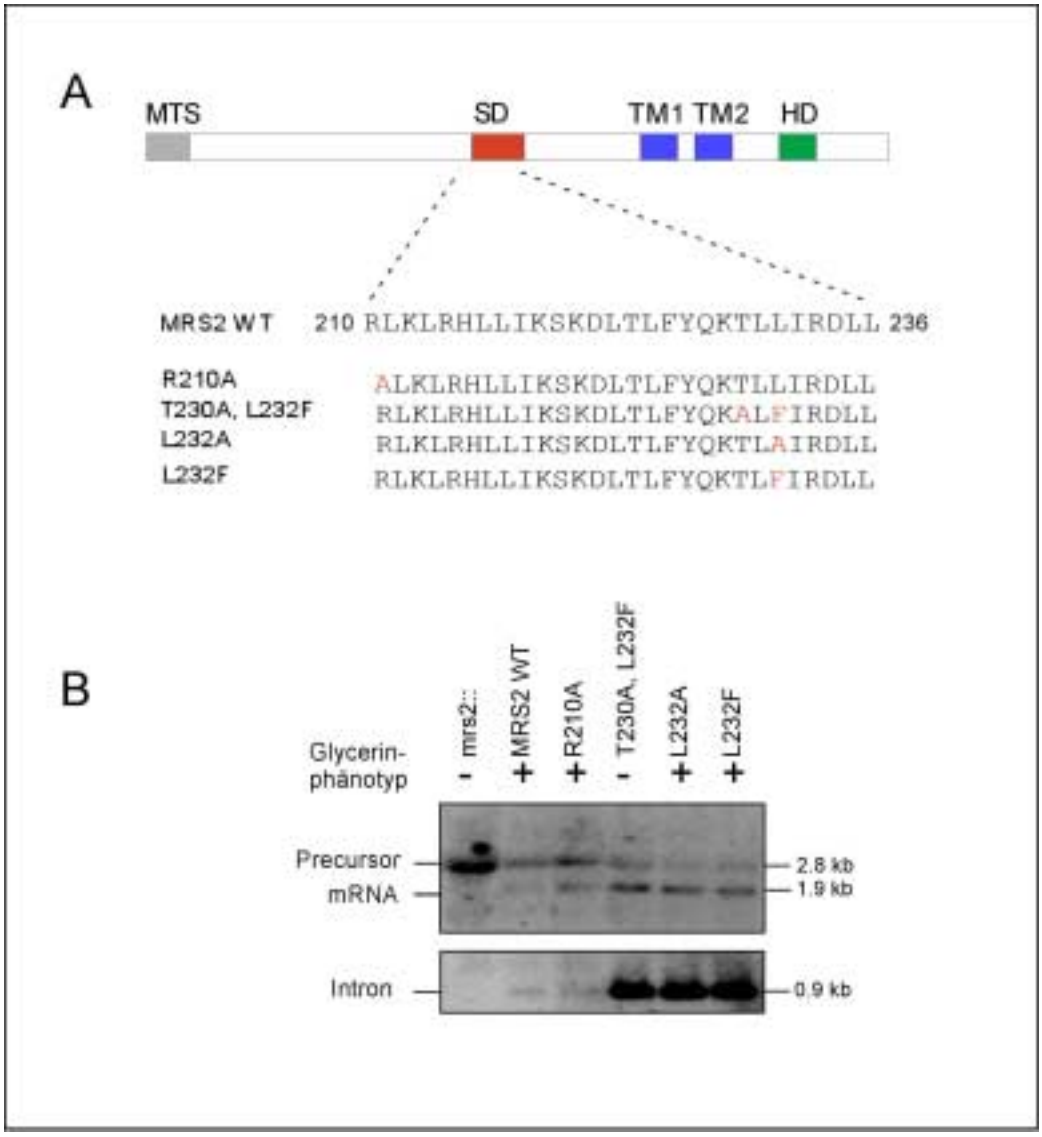


Abb. 15. A: Mutationsanalyse der Suppressor-Domäne. Schema der ausgetauschten Aminosäuren in der Suppressor-Domäne. B: Glycerin- und Spleißphänotyp der Transformanden mit dem *MRS2* Gen und den Mutationskonstrukten auf dem „low copy"-Plasmid pRS416. Die Hybridisierung erfolgte mit der exonspezifischen Sonde E4 (oberer Teil) und der intronspezifischen Sonde SnaB (unterer Teil).

4.1.5 Bestimmung der Magnesiumkonzentration in den Mitochondrien

Das Mrs2p besitzt im Bereich seiner Transmembran-Domänen eine Y/F-G-M-N Signatur, wie sie bei dem Magnesiumtransporter CorAp aus *E. coli* bekannt ist. Auch für das Mrs2p konnte eine solche Magnesiumtransportfunktion nachgewiesen werden (Bui et al. 1999). Es war nun essentiell herauszufinden, ob die Unterschiede in der Spleißreaktion der Transformanden auf verschiedene Magnesiumkonzentrationen zurückzuführen waren. Deshalb wurde die Magnesiumkonzentration in

den Mitochondrien des Wildtyp-Stammes DBY 947 B-AC*, der Mutante DBY 947 mrs2:: B-AC* und von vier der Transformanden bestimmt.

Die vier Transformanden enthalten:

1.) Das unveränderte *MRS2* Gen (pRS-WTH).
2.) Eine Veränderung in der hydrophilen Domäne (*MRS2*-R403-405A), die eine reduzierte Spleißreaktion bewirkt.
3.) Den Austausch W408A in der hydrophilen Domäne, der zu einer gesteigerte Spleißreaktion führt.
4.) Die Mutation in der Suppressor-Domäne *MRS2*-L232F, welche ebenfalls eine gesteigerte Spleißreaktion bewirkt.

Zunächst wurden diese Stämme auf Raffinosemedium angezüchtet, die Mitochondrien über einen Saccharosegradienten aufgereinigt und die Proteinkonzentration bestimmt. Anschließend wurde die Magnesiumkonzentration in den Mitochondrien bestimmt, die als 5-fach Bestimmung mittels Atomabsorptionsspektrophotometrie durchgeführt wurde (Material und Methoden 3.11.10, 3.12.1, 3.12.2).

Die Magnesiummessung des Wildtyp DBY 947 B-AC* ergab als Normalwert eine Konzentration von 57 nmol Magnesium pro mg mitochondriales Protein. Der Vergleich mit dem „knock out" Stamm bestätigt, dass die Magnesiumkonzentration vom Mrs2p abhängt, da diese fast um die Hälfte reduziert ist und nur noch 35 nmol Mg^{2+}/mg mt Protein beträgt.

Die Transformanden hingegen zeigen Magnesiumkonzentrationen, die gleich oder höher sind als beim Wildtyp. So restauriert das klonierte *MRS2* Gen die Magnesiumkonzentration in den Mitochondrien auf den ursprünglichen Wert (59 nmol Mg^{2+}/mg mt Protein) (Abb. 16), genauso wie das *MRS2* Gen mit dem Austausch W408A in der hydrophilen Domäne (60 nmol Mg^{2+}/mg mt Protein). Dabei ist die Spleißeffizienz in der Transformande mit Mrs2-W408A deutlich erhöht.

Der Austausch R403-405A und der Suppressor-Austausch im Mrs2p führen zu einer erhöhten Magnesiumkonzentration (74 nmol Mg^{2+}/mg mt Protein und 83 nmol Mg^{2+}/mg mt Protein). Auch hier kann kein einheitliches Spleißverhalten beobachtet werden. So spleißt die Transformande mit dem Austausch R403-405A etwas schlechter als der Wildtyp, während der Suppressor eine deutlich verbesserte Spleißreaktion aufweist.

Damit führen gleiche Magnesiumkonzentrationen nicht unbedingt zu identischen Spleißreaktionen und erhöhte Magnesiumkonzentrationen nicht zwangsläufig zu guten Spleißphänotypen.

Demgemäß besteht kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Magnesiumkonzentration und dem Spleißphänotyp, solange ein bestimmter Magnesiumwert nicht unterschritten wird.

Zusammenfassend lässt sich bemerken, dass Magnesium zweifelsfrei wichtig für den Spleißvorgang ist. Die beobachteten Effekte lassen sich aber nicht generell auf eine Veränderung im Magnesiumspiegel zurückführen, sondern haben eindeutig auch andere Gründe, wie z.B. eine direkte Interaktion. Da sowohl die Magnesiumkonzentration, als auch eine direkte Interaktion für die beobachteten Spleißeffekte verantwortlich sein könnten, wurde das Mrs2p aufgereinigt und auf seine Bindungseigenschaften mit der Intron RNA überprüft.

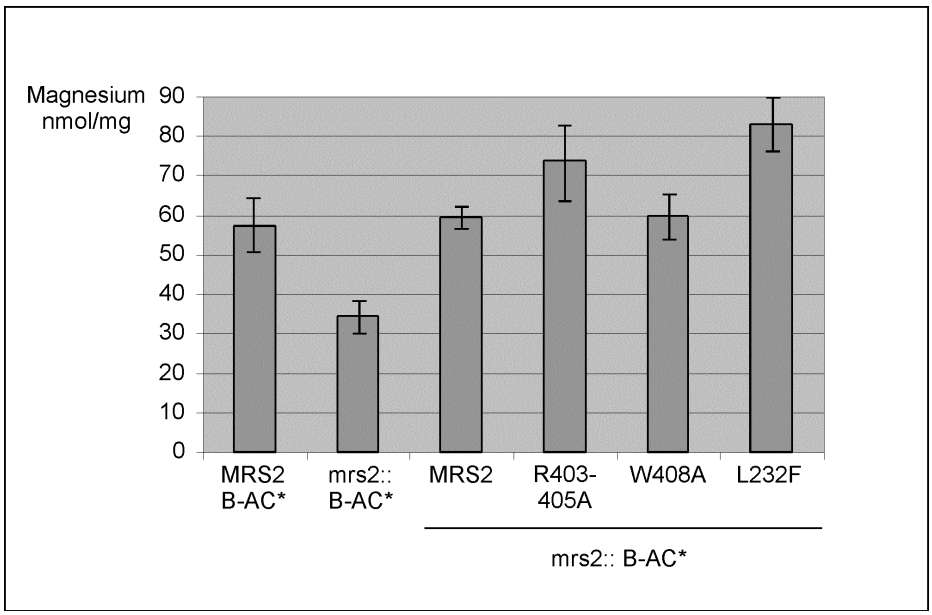


Abb. 16. Bestimmung der Magnesiumkonzentration in den Mitochondrien. Als Kontrolle wurde der Stamm DBY 947 B-AC*, der das chromosomale *MRS2* Gen trägt (*MRS2* B-AC*) und der „knock out" Stamm DBY 947 mrs2:: B-AC* (mrs2:: B-AC*) verwendet. Die letzten vier Säulen zeigen den DBY 947 mrs2:: B-AC*, transformiert mit dem *MRS2* Gen (MRS2); das in der hydrophilen Domäne mutierte *MRS2*-R403-405 Gen (R403-405A); das *MRS2*-W408A (W408) und das in der Suppressor-Domäne veränderte *MRS2*-L232F Gen (L232F).

4.2 Nachweis einer RNA/Protein Interaktion *in vitro*

4.2.1 Überexpression des gesamten Mrs2p

Die *in vivo* Analyse der hydrophilen Domäne ergab, dass die Arginine für den Spleißprozess nicht zwingend notwendig sind, möglicherweise aber eine RNA-Bindung vermitteln. Die Suppressor-Domäne scheint mit dem Intron interagieren zu können. Ein Beweis einer solchen Interaktion liegt aber nicht vor, zumal die erhöhte Magnesiumkonzentration oder eine veränderte Proteinstruktur unabhängig von der Bindung für die gute Reaktivität verantwortlich sein könnten.

Deshalb wurde überprüft, ob eine Mrs2p-Intron-Interaktion möglich ist. Dazu wurde das Mrs2p überexprimiert und zusammen mit *in vitro* transkribierter Intron RNA in Gelretardationstests eingesetzt. Eine Expression des Proteins in Hefe erschien ungünstig, da das Protein normalerweise nur in sehr geringen Mengen in der inneren Mitochondrienmembran vorkommt. Bei einer starken Expression ist die Gefahr einer Störung mitochondrialer Funktionen sehr groß, was zu einer Beeinträchtigung des Wachstums führen könnte. Deshalb wurde das *E. coli* Expressionssystem BL 21 DE3 mit dem Vektor pRSETA ausgewählt, bei dem die Aufreinigung des gewünschten Genprodukts nach der Expression über Affinitätschromatographie mit Nickel-Agarose über den 6x-His-Tag möglich war.

Zunächst wurde versucht, das vollständige Mrs2p überzuexprimieren. Dazu wurde das *MRS2* Gen ohne die N-terminale mitochondriale Targeting-Sequenz mittels PCR aus dem Plasmid pRS-WTL amplifiziert. Der 5'-Primer (-MTS) wurde so konstruiert, dass genau die ersten 21 Aminosäuren entfielen und eine BamHI Restriktionsschnittstelle entstand. Als zweiter Primer wurde das Oligonukleotid MRS2.2 verwendet, das eine EcoRI-Schnittstelle am 3'-Ende inseriert. Über die eingeführten Restriktionsschnittstellen wurde das PCR Produkt in den Expressionsvektor kloniert. Nach Ligation und Transformation in *E. coli* NM522, wurden die Transformanden auf eine erfolgreiche Insertion des *MRS2* überprüft. Ein positiver Transformand wurde ausgewählt, die Plasmid DNA (pRSETA-MRS2) isoliert und in *E. coli* BL21 DE3 transformiert. Eine Einzelkolonie wurde dann zur Überexpression genutzt (Material und Methoden 3.11.1). Die Kontrolle der Expression auf einem Proteingel zeigte, dass nach der Induktion keine spezifische Bande zu erkennen war. Die Aufreinigung über Nickel-Agarose (Material und Methoden 3.11.2) führte ebenfalls zu keinem spezifischen Ergebnis. Der Grund hierfür ist vermutlich der Umstand, dass es sich bei dem Mrs2p um ein Membranprotein handelt, das Probleme bei der Überexpression bereiten kann (Rehm 1997). Deshalb wurden im Folgenden nur Teilbereiche des Proteins überexprimiert und genauer analysiert.

4.2.2 Überexpression von Teilbereichen des Mrs2p

Um das Problem der schlechten Expression von Membranproteinen zu vermeiden, wurden Teilpeptide des Mrs2p erzeugt. Es wurde nur der N- und C-terminale Bereich exprimiert, die in den Matrixbereich der Mitochondrien ragen. Diese Teilpeptide sollten auch weiterhin die RNA binden, wenn sie eine RNA-Bindekapazität besitzen, die über bestimmte Sequenzmotive vermittelt wird.

Ausgehend vom pRS-WTL wurde eine PCR mit den Primern -MTS(21AS) und MRS2.10 durchgeführt. Die Primer umfassen auf Proteinebene einen Bereich von Aminosäure 22 bis 309,

also den N-terminalen Bereich des Proteins, in dem sich die Suppressor-Domäne befindet. Durch die PCR wurden BamHI-Restriktionsschnittstellen inseriert, die anschließend zur Klonierung in den Vektor pRSETA verwendet wurden. Nach erfolgreicher Transformation in *E. coli* NM522 wurde aus den positiven Transformanden das Plasmid isoliert, dass im Folgenden mit pRSET-SD bezeichnet wird.

Parallel hierzu erfolgte die PCR des DNA-Bereiches, in dem die hydrophile Domäne lokalisiert ist. Die PCR wurde mit den Primern BamHI-1 und MRS2.2 durchgeführt, die ein Amplifikat von 554 bp ergeben. Das entspricht dem Bereich von Aminosäure 369 bis zum Ende des Proteins und 249 bp der 3'-untranslatierten Region. Durch die Primer wurde eine BamHI und eine EcoRI-Restriktionsschnittstelle eingeführt, die wiederum zur Klonierung in den pRSETA genutzt wurden. Nach der positiven Identifizierung eines Transformanden wurde die Plasmid DNA isoliert, die im Folgenden mit pRSET-HD bezeichnet wird.

Die beiden Plasmide pRSET-SD und pRSET-HD wurden in den *E. coli* Bl21 DE3 transformiert und überexprimiert (Material und Methoden 3.11.1). Auf dem Proteingel ließ sich für beide Proteine eine schwache zusätzliche Bande detektieren (His-HDp ca. 0,5 mg/g Rohextrakt; His-SDp ca. 1 mg/g Rohextrakt). Danach wurden die Proteine über Ni-NT-Agarose gereinigt (Material und Methoden 3.11.2). Die Aufreinigung wurde zur besseren Proteinausbeute denaturierend durchgeführt und, um den gelösten Harnstoff zu entfernen, wurde ein Pufferwechsel angeschlossen. Hierzu wurden die Proteine, die durch das Plasmid pRSET-SD kodiert wurden (His-SDp, 37,5 kDa), mittels Dialyse gereinigt. Dies war bei den durch das Plasmid pRSET-HD kodierten Proteinen (His-HDp, 15,7 kDa) nicht möglich, da das Ausschlussvolumen der Dialysemembran (15 kDa) zu groß war. Deshalb erfolgte hier der Pufferwechsel durch Gelfiltration (Material und Methoden 3.11.7). Die Kontrolle der Reinigungsschritte erfolgte durch Proteinbestimmungen nach Breadford und SDS-Proteingelelektrophorese (Abb. 17). Auf diese Weise ließen sich ausreichende Mengen an Protein, sowohl vom His-SDp (Durchschnittlich 15 µg His-SDp aus 100 ml Kultur, mit einer Ausbeute von 12 % und einer Reinheit von 62 %) als auch vom His-HDp (Durchschnittlich 20 µg His-HDp aus 100 ml Kultur, mit einer Ausbeute von 14 % und einer Reinheit von 65 %) herstellen, die für Gelretardierungs-Experimente eingesetzt wurden.

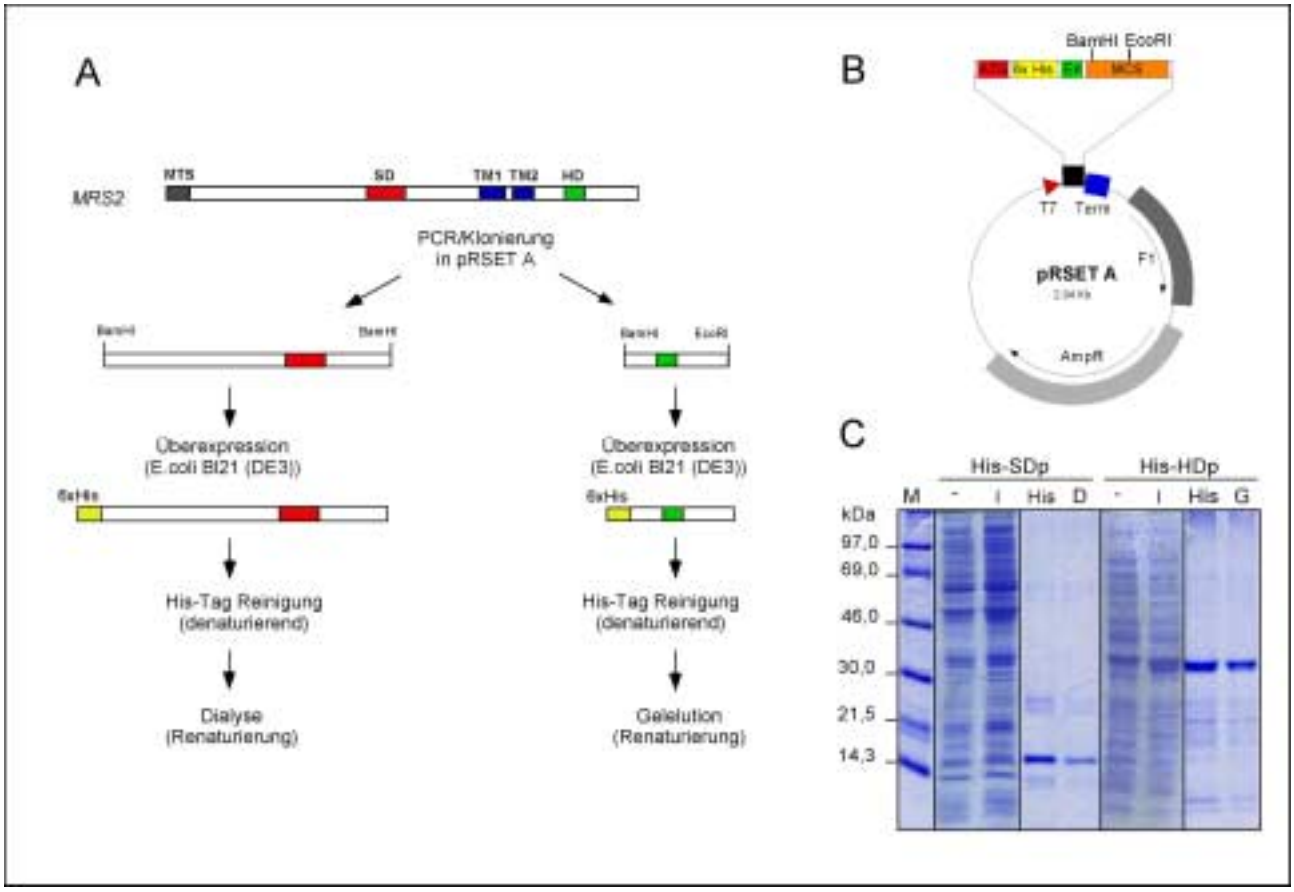


Abb. 17. A: Schema der Klonierung und der Aufreinigung der Peptide. Klonierung der Suppressor-Domäne (SDp) ohne mitochondriale Targeting-Sequenz und ohne Transmembran-Domänen. Klonierung der hydrophilen Domäne (HDp) ohne Transmembran-Domäne. Die Aufreinigung erfolgte denaturierend über einen 6xHis-Tag. Die Renaturierung erfolgte über Dialyse, bzw. Gelelution. B: Plasmidkarte von pRSET A. C: Resultat der Proteinaufreinigung. M: Marker; His-SDp: Suppressor-Domänen Protein, His-HDp: hydrophile Domänen Protein; -: Expression vor Induktion, I: Expression nach Induktion, His: nach His-Tag-Aufreinigung, D: nach Dialyse, G: nach Gelelution.

4.2.3 Bereitstellung der RNA

Um Gelretardierungen durchführen zu können, muss die RNA *in vitro* hergestellt werden. Dabei darf die RNA eine Länge von 500 nt nicht überschreiten, da bei längerer RNA der Laufunterschied zwischen der RNA und dem RNA-Protein-Komplexes nicht mehr detektierbar ist. Das Gruppe II Intron aI5γ, welches in den Shift-Experimenten verwendet werden sollte, ist jedoch 889 nt lang (285 kg/mol). Damit ist das Intron zu groß, um es direkt für Gelretardierungs-Tests einsetzen zu können. Deshalb wurde das Intron in drei funktionelle Untereinheiten unterteilt, die in der Lage sind, sich in katalytisch aktive Strukturen zu falten, wie sie auch für Transspleißassays genutzt werden. Ausgewählt wurden hierzu die Domäne 1 (D1), die Domänen 2 und 3 (D23), sowie die Domänen 4, 5 und 6 (D456) (Abb. 18).

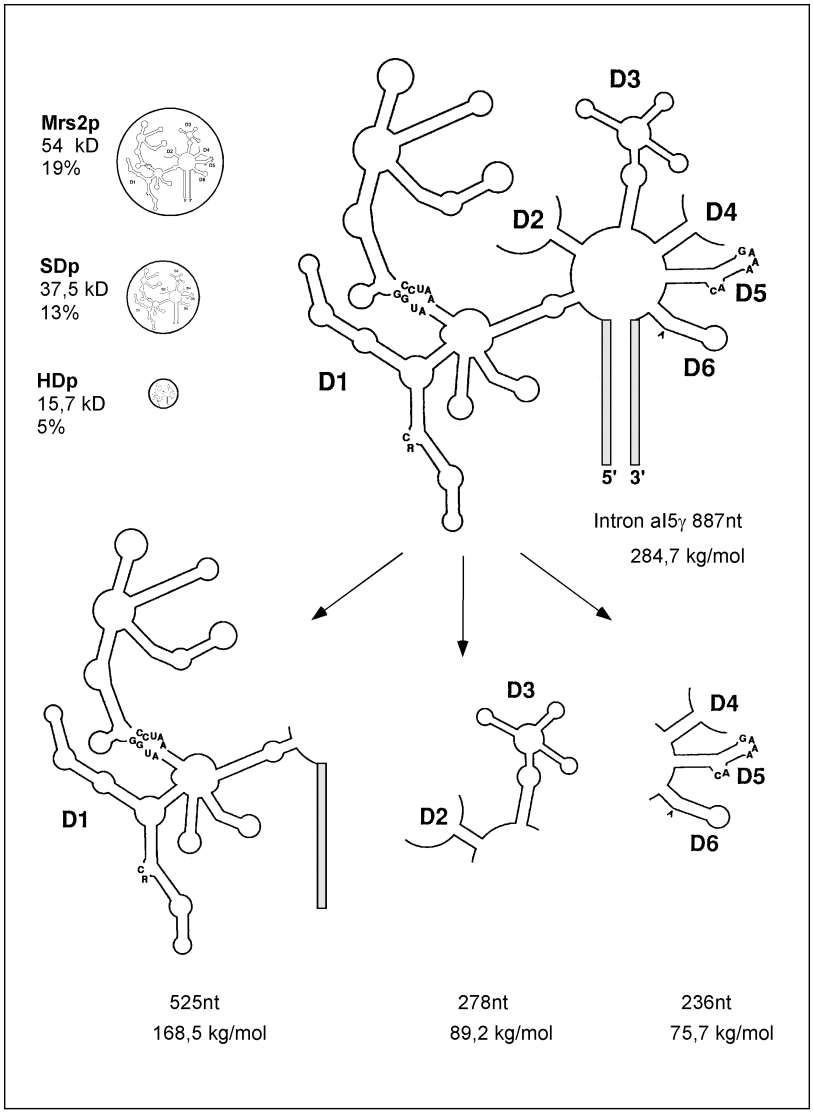


Abb. 18. Schematische Darstellung der Aufteilung des Introns aI5γ. Zur Verdeutlichung wurden die molekularen Verhältnisse zwischen dem Intron und dem Mrs2p sowie den Peptiden SDp und HDp gezeigt.

Die Templates für diese Untereinheiten wurden mittels PCR erzeugt, indem durch die Primer am 5'-Ende ein T7-RNA-Polymerase Promotor in das DNA Fragment eingeführt wurde. Dabei umfasste die RNA-Domäne 1 die ersten 423 nt des Introns und 82 nt des 5'-Exons. Als Primer wurden T7 USI5γ und SNAB verwendet. Die Domänen 2 und 3 schlossen die Nukleotide des Introns von 405 bis 682 ein. Zu ihrer Amplifikation wurden die Primer T7 D1/D2 und D3/4 revers verwendet. Bei den Domänen 4, 5 und 6 erfolgte sie mit den Primern T7 D3/D4 und 3'-Splice, welche 235 nt umfassten.

Nach der Amplifikation der Templates wurden die PCR-Ansätze nach Standardmethoden gereinigt und anschließend zur *in vitro* Transkription (Material und Methoden 3.10.6, 3.10.7) verwendet. Zur Vereinfachung werden im Folgenden die *in vitro* transkribierten RNA Untereinheiten nach ihren Domänen bezeichnet.

4.2.4 Gelretardierung der verschiedenen RNA Untereinheiten mit His-getaggten Peptiden

Um einen ersten Hinweis zu erhalten, ob die Peptide in der Lage sind, mit der RNA zu interagieren, wurde zunächst das Peptid His-SDp (s.o.) mit radioaktiv markierter RNA D456 zur Gelretardierung eingesetzt. Für diesen Test wurden 850 pmol RNA und verschiedene Konzentrationen an His-SDp (0-150 pmol) verwendet. Die Proben wurden, nach 30 min Bindung, auf ein 5 %iges natives PAA-Gel aufgetragen und für 10 h bei 8 °C aufgetrennt und anschließend exponiert.

Wie aus Abb. 19 klar zu erkennen ist, bindet das Teilpeptid His-SDp die eingesetzte RNA. Es bildet sich ein RNA-Protein-Komplex aus, dessen Signal mit zunehmender Peptid Konzentration stärker wird (Spuren 2-4). Ein vergleichbares Resultat kann für das Peptid His-HDp beobachtet werden (mittlere Teil, Abb. 19). Diese Ergebnisse deuten auf eine RNA-Protein-Interaktion für beide Teilbereiche des Mrs2p hin.
Um auszuschließen, dass es sich bei diesen RNA-Protein-Komplexen um eine unspezifische Bindung handelt, wurde BSA in gleichen molekularen Mengen zur Gelretardierung verwendet. Im unteren Teil von Abb. 19 ist deutlich zu erkennen, dass BSA nicht in der Lage ist, die RNA zu binden.

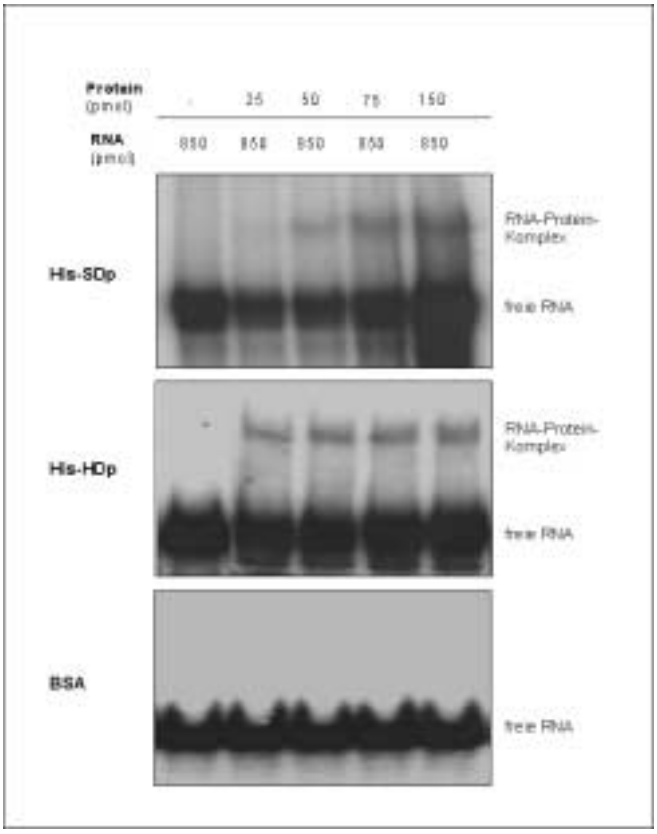


Abb. 19. Gel-Retardierung der RNA D456 mit den Proteinen His-SDp, His-HDp und BSA.

Die beiden Peptide wurden nach diesen ersten erfolgreichen Versuchen zu weiteren Bindungsstudien mit den anderen RNA-Domänen verwendet. Dabei zeigte sich, dass auch eine Bindung an den Domänen D1 und D23 möglich ist (nicht dargestellt).

4.2.5 Überexpression von GST-Fusionsproteinen

Da offensichtlich beide *E. coli* Proteinextrakte His-SDp und His-HDp in der Lage sind, alle ausgetesteten RNA-Domänen zu binden, wurde überprüft, ob die RNA Retardierung nur auf einer unspezifischen Bindung beruht. Eine unspezifische Bindung wird möglicherweise durch die Ladung des N-terminalen His-Tag oder durch Proteine, die in der Affinitätschromatographie koeluieren (Abb. 17 C), hervorgerufen. Deshalb wurde das Gluthation-S-Transferase-System (Amersham/Pharmacia) im Folgendem als Expressions- und Isolationssystem verwendet. Hier erfolgt die Elution des Proteins nicht über den His-Tag, damit ist eine Koelution des gleichen RNA-bindenden Proteins ausgeschlossen. Zudem wurden GST-Fusionsproteine wiederholt erfolgreich bei Gel Retardierungs Experimenten mit RNA verwendet (Anant et al. 1995, Martin et al. 2000).
Um das SDp zu klonieren, wurde vom Plasmid pRS-WTL eine PCR mit den Primern -MTS(21AS) und MRS2.14 durchgeführt (analog zu Kapitel 4.2.2). Allerdings wurde hier in den 3'-Primer eine EcoRI-Schnittstelle inseriert. Das PCR Fragment umfasste auf Proteinebene ebenfalls einen Bereich von Aminosäure 21 bis 309.
Die PCR der hydrophilen Domäne wurde mit den Primern BamHI-1 und MRS2.2 durchgeführt (Kapitel 4.2.2), die den Bereich von Aminosäure 369 bis zum Ende des Proteins und zusätzlich 249 bp der untranslatierten Region einschließen.
Die beiden PCR Fragmente wurden BamHI und EcoRI restringiert und in den BamHI/EcoRI restringierten Vektor pGEX-2T kloniert. Nach der Transformation in den *E. coli* NM522 wurden die Transformanden auf eine Insertion überprüft. Die so gewonnenen Plasmide wurden isoliert und werden nun im weiteren als pGEX-SD und pGEX-HD bezeichnet.

Zur Überexpression der Proteine konnte in diesem Fall der *E. coli* NM522 verwendet werden. Es wurde jeweils eine Transformande mit dem Plasmid pGEX-SD, bzw. pGEX-HD ausgewählt und zur Überexpression eingesetzt (Material und Methoden 3.11.2). Auf dem Proteingel waren die Expressionsprodukte deutlich sichtbar (GST-HDp ca. 1 mg/g Rohextrakt; His-SDp ca. 2 mg/g Rohextrakt). Nach der Überexpression wurden die Proteine über GST-Affinitätschromatographiesäulen gereinigt (Material und Methoden 3.11.4). Es zeigte sich allerdings, dass fast 90 % des spezifischen Proteins ungelöst im Pellet vorlag und nur ein geringer

Teil gelöst war und nativ isoliert werden konnte (Ausbeute: GST-HDp ca. 3,5 %; ca. GST-SDp 3,1 %). Trotz dieser hohen Verlustrate reichte die Proteinkonzentration für Gelretardierungs-Tests aus (GST-HDp durchschnittlich 3,2 µg Protein aus 10 ml Kultur, Reinheit 64 %; GST-SDp 3,0 µg Protein aus 10 ml Kultur, Reinheit 61 %).

Das 26 kDa große GST-Protein wurde ebenfalls isoliert. Es wurde als Negativ-Kontrolle benutzt, um auszuschließen, dass der GST-Tag eine Auswirkung auf die RNA-Bindung hat (GSTp durchschnittlich 31,2 µg aus 10 ml Kultur, Reinheit 81 %).

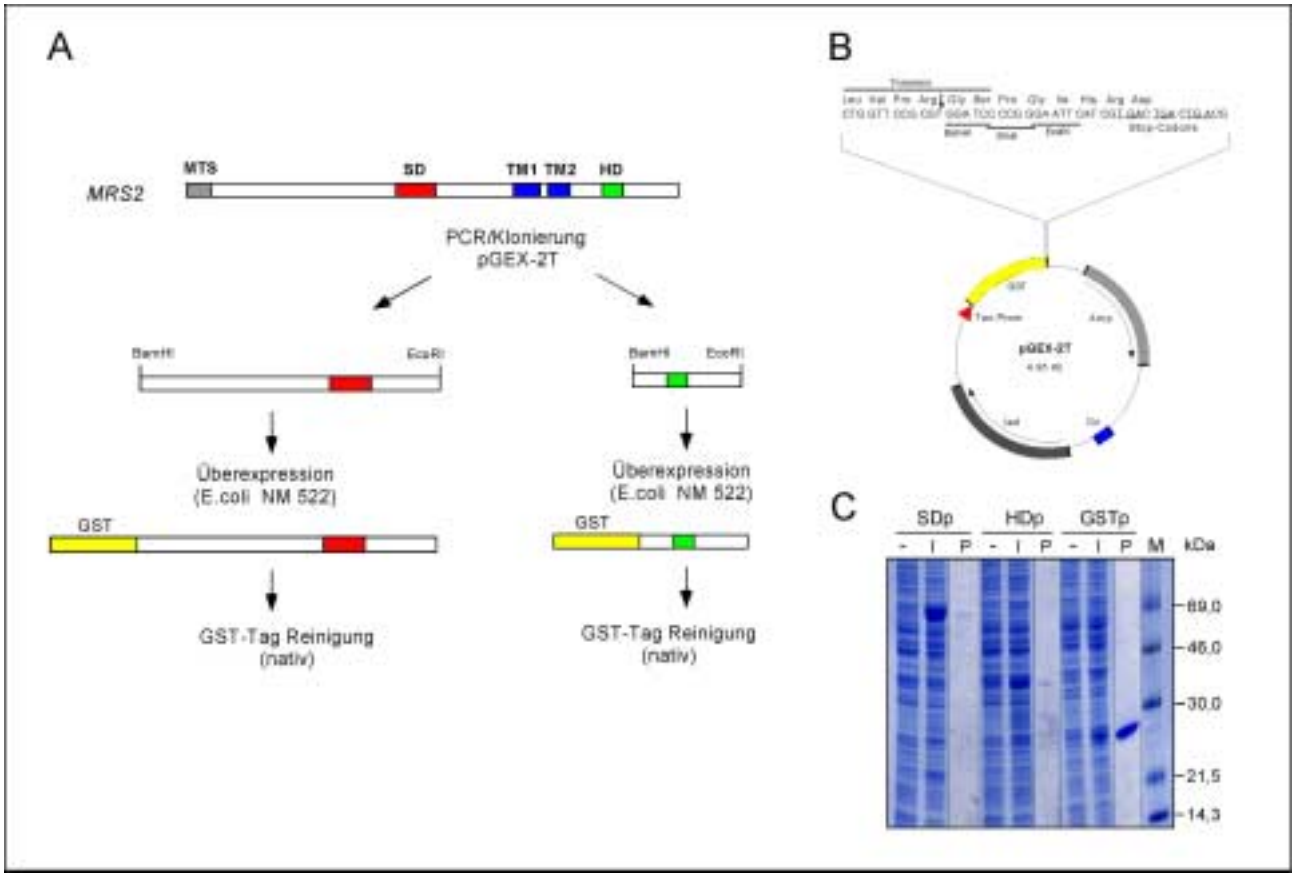


Abb. 20. Schema der Klonierung und der Aufreinigung der GST-Fusionsproteine. A: Klonierung der Suppressor-Domäne (SDp) ohne mitochondriale Targeting-Sequenz und ohne Transmembran-Domänen. Die Klonierung der hydrophilen Domäne (HDp) ohne Transmembran-Domäne. Die Aufreinigung erfolgte nativ über den GST-Tag. B: Plasmidkarte des pGEX-2T C: Resultat der Proteinaufreinigung. M: Marker; SDp: Suppressor-Domänen Protein; HDp: hydrophile Domänen Protein; GSTp: Gluthation-S-Transferase Protein; -: Expression vor Induktion, I: Expression nach Induktion mit 1mM IPTG; P: Protein nach Aufreinigung.

4.2.6 Gelretardierung mit GST-getaggten Proteinen

Zunächst wurde mit den GST-getaggten Proteinen die Bindung zu den einzelnen Domänen überprüft. Es wurden dieselben Bedingungen verwendet, die im Kapitel 4.2.4. beschrieben wurden. Es zeigte sich, dass auch mit diesen Proteinen eine RNA-Retardierung möglich ist. Ein Beispiel dafür ist der RNA Shift zwischen den Peptiden SDp, HDp und GSTp mit der Domänen D456 (Abb.

21). Zum Test wurden jeweils zwei verschiedene Konzentrationen an Protein (20 und 200 ng) mit 20 ng RNA unter Standardbedingungen (Material und Methoden 3.12.3) verwendet.
Es war deutlich zu erkennen, dass ohne Protein keine Gelretradierung auftritt und dass die Peptide SDp und HDp zu einer Verlangsamung der RNA führen. Die Kontrolle mit dem GSTp zeigt im Gegensatz zu den anderen Proteinproben keine Retardierung der RNA. Dadurch wurde die spezifische RNA-Protein-Interaktion bestätigt. Die unterschiedliche Stärke der Retardierungsbanden zwischen SPp und HDp ist auf die verschiedenen molekularen Mengen an eingesetztem Protein zurückzuführen.

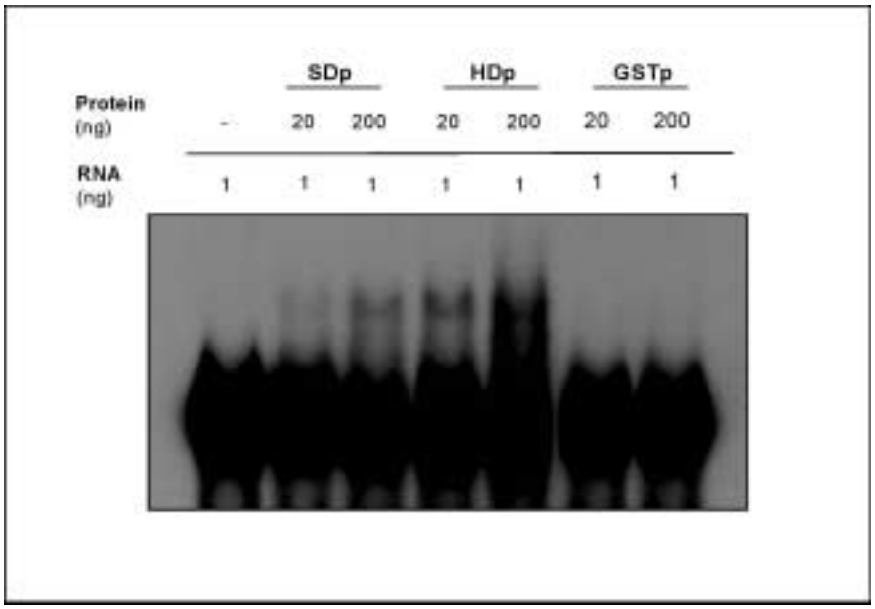


Abb. 21. Gelretardierung der RNA D456 mit den GST Fusionsproteinen SDp und HDp. Als Kontrolle wurde das GSTp verwendet.

Nachfolgende Analysen bestätigten eine Interaktion ebenfalls für die Domänen 1 sowie 23 (vergl. Abb. 22). Somit binden die beiden Mrs2p Teilpeptide an alle getesteten RNA-Domänen. Daraus ergab sich die Frage, ob es sich bei der RNA-Protein-Interaktion um eine spezifische Reaktion handelt. Um die Frage der Spezifität zu klären, wurden sog. Kompetitionstests durchgeführt.

4.2.6.1 Kompetitionstests der Peptide SDp und HDp mit verschiedenen Untereinheiten des Introns aI5γ

Für die Kompetionstests wurde die RNA radioaktiv transkribiert und mit dem Protein und einem Kompetitor inkubiert. Als spezifische Kompetitoren dienten die entsprechenden Domänen der RNA, die nicht radioaktiv markiert waren. Sie wurden in steigender Menge zum Test hinzugefügt, um im Falle einer spezifischen Bindung die radioaktive RNA in zunehmendem Maße aus dem Proteinkomplex zu verdrängen. Als unspezifischer Kompetitor diente tRNA. Im Gegensatz zum

spezifischen Kompetitor sollte die tRNA, wenn eine spezifische Bindung vorliegt, nicht in der Lage sein, die radioaktiv markierte RNA aus dem Proteinkomplex zu ersetzen.

Für die Kompetitionstests wurden 1 ng spezifische radioaktiv markierte RNA und 20 ng Protein verwendet. Der spezifische Kompetitor wurde in 0,5-, 1- und 5-facher Menge hinzugegeben. Die tRNA dagegen wurde in 10-, 100- und 1000-facher Menge verwendet. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen (Material und Methoden 3.12.3).

Für beide Proteine SDp und HDp und für alle getesteten Subdomänen der RNA ergibt sich das gleiche Bild (Abb. 22). In der Negativ-Kontrolle, die nur radioaktive RNA ohne Protein enthielt, wurde keine Bande retardiert. In der Positiv-Kontrolle, die radioaktiv markierte RNA und Protein enthielt, war ein deutlicher Shift der RNA zu erkennen. Mit steigender Menge an spezifischem Kompetitor wird diese Bande schwächer, da die radioaktive RNA aus dem Proteinkomplex verdrängt wird. Mit steigender Menge an unspezifischem Kompetitor bleibt dagegen die verzögerte Bande bis zu einer 100-fachen Konzentration konstant und nimmt erst bei einer 1000-fachen Menge der tRNA leicht ab.

Damit wurde sowohl für die SDp und auch die HDp eine spezifische Interaktion mit allen getesteten Untereinheiten des Introns aI5γ nachgewiesen.

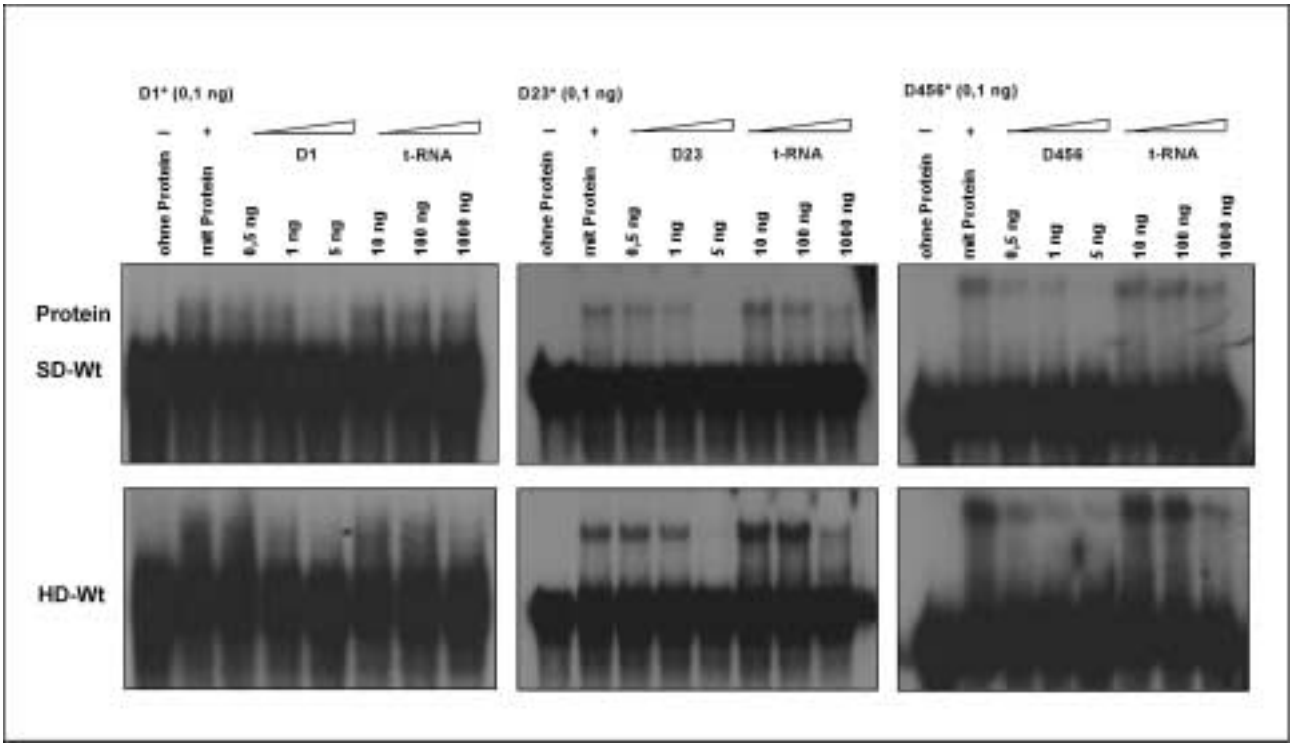


Abb. 22. Kompetition mit verschiedenen Teilbereichen des Mrs2p und den Untereinheiten des Introns aI5γ.

4.2.6.2 Kontrolle mit einer unspezifischen RNA von *E. coli*

Da alle getesteten Proteine mit allen getesteten RNA Untereinheiten spezifisch interagieren, erschien es sinnvoll, herauszufinden, ob eine *in vitro* transkribierte RNA generell für diese Reaktion verantwortlich sein könnte. Deshalb wurde eine RNA generiert, die in Länge und Aufarbeitung genau der *in vitro* transkribierten RNAs des Introns aI5γ entsprach. Dazu wurde mittels PCR ein DNA Fragment mit den Primern T7-GEM SeqII und Uid1 aus dem β-Galaktosidase Gen (UidA) von *E. coli* amplifiziert, das auf dem Plasmid pSUB1-1 kloniert worden war. Durch diese PCR wurde der T7-RNA-Polymerase Promotor inseriert, mit dessen Hilfe eine 243 nt lange RNA transkribiert werden konnte.

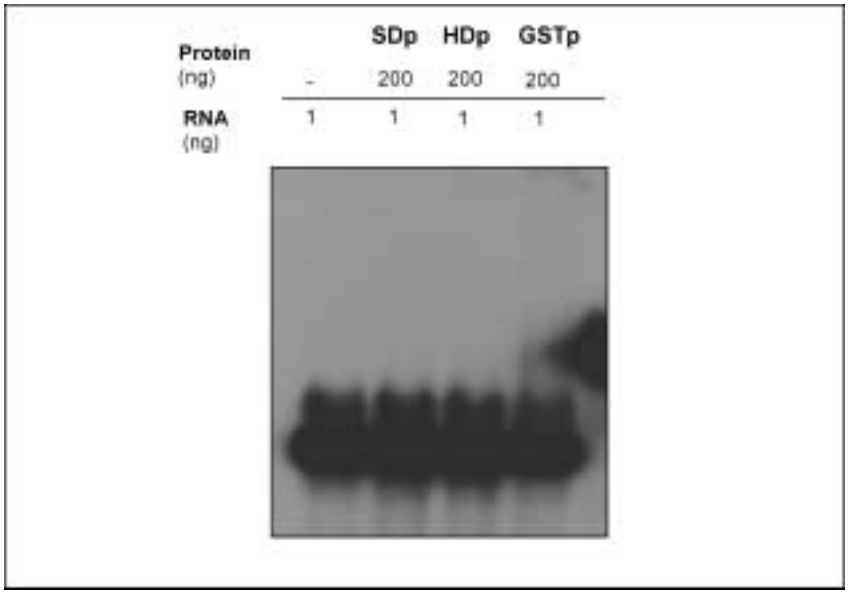


Abb. 23. Gelretardierung mit den Peptiden des Mrs2p und der Kontroll-RNA uid A der β-Galactosidase von *E. coli*.

Es wurde 1 ng uid A RNA und 200 ng Protein zu einer Standardgelretardierung eingesetzt. Verwendet wurden die Proteine SDp, HDp und GSTp. Wie aus Abb. 23 deutlich zu erkennen ist, sind alle drei Proteine nicht in der Lage, die unspezifische β-Galaktosidase RNA zu binden und so ein „band shift“ zu erzeugen. Die genannten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die nachgewiesene Retardierung durch die Mrs2-Teilpeptide für die Intron RNA spezifisch ist.

4.2.7 Analyse von mutierten Peptiden

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob die beobachteten Veränderungen in der Spleißreaktion in Gegenwart veränderter Mrs2 Proteine auf eine veränderte RNA-Protein-Interaktion zurückzuführen ist, wurden die Suppressor-Domäne des L232F und die hydrophile Domäne der R403-405A des Mrs2 Proteins (Kapitel 4.1) ebenfalls in den Expressionsvektor pGEX-2T kloniert und exprimiert.

4.2.7.1 Analyse der hydrophilen Domäne

In der hydrophilen Domäne befinden sich drei Arginine, die durch ihre positiven Ladungen eine RNA-Bindung ermöglichen könnten. In Kapitel 4.1.3 wurde die Erstellung der Mutation *MRS2*-R403-405A (Abb. 14) beschrieben, bei dem die Arginine in Position 403-405 gegen Alanine ausgetauscht wurden. Um eindeutig nachzuweisen, ob diese Arginine an einer RNA-Bindung beteiligt sind oder nicht, wurde der C-terminale Teil dieses mutierten Proteins im pGEX-2T überexprimiert und über GST-Affinitätschromatographie aufgereinigt (vgl. Kapitel 4.2.5). Das Protein, im Weiteren mit HDp-R403-405A bezeichnet, wurde anschließend in einem Kompetitionstest (Kapitel 4.2.6.1) ausgetestet. Es wurden 1 ng spezifische radioaktiv markierte RNA und 20 ng Protein verwendet. Die Negativ-Kontrolle wurde ohne Protein angesetzt. Der spezifische Kompetitor wurde in 0,5-, 1- und 5-facher Menge hinzugegeben, die tRNA wiederum in 10-, 100- und 1000-facher Menge. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen. Zum Vergleich wurde der Kompetionstest mit dem Protein HDp durchgeführt.

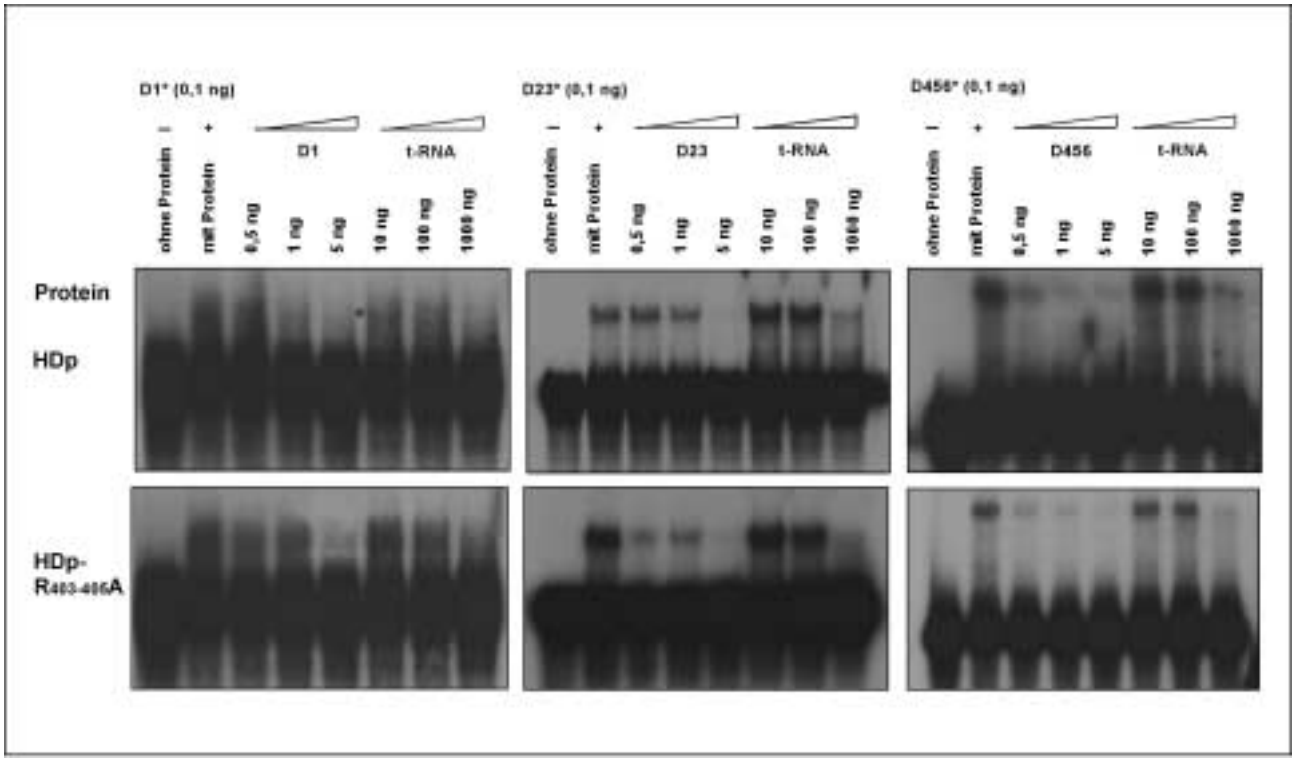


Abb. 24. Kompetition mit verschiedenen Peptiden der hydrophilen Domäne und den Domänen des Introns aI5γ (näheres siehe Text).

Für beide Proteine (HDp und HDp-R403-405A) und für alle getesteten Subdomänen der RNA ergibt sich das gleiche Bild (Abb. 24). Beide Proteine zeigen eine spezifische Bindung zur getesteten RNA, die sich in einer Abnahme der retardierten Bande bei steigender Konzentration an

spezifischem Kompetitor und einer Resistenz des „band shift“ gegen unspezifische RNA äußert. Dabei ließ sich auch keine Abnahme der Affinität des mutierten Proteins zur RNA erkennen.
Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass die drei Arginine für die Bindung der RNA keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Bei einer spezifischen Bindung über die Arginine hätte eine deutlich geminderte oder keine Affinität zur RNA gefunden werden müssen. Somit muss es andere Bereiche in dem mutierten Teilpeptid geben, die für die RNA-Bindung verantwortlich sind oder es besteht eine Gesamtkonformation des Teilpeptids (für Bindung), die nicht durch die Mutationen beeinflusst wird.

4.2.7.2 Analyse der Suppressor-Domäne

In der Suppressor-Domäne wurden die Mutationen gefunden, die zu einer Restaurierung des Spleißphänotyps führen (vergl. Kapitel 2.2.1.1). Zudem ist das gespleißte Intron ungewöhnlich stabil in Stämmen mit dem Suppressor Mrs2p (Kapitel 4.1.4). Damit besteht der Verdacht das es sich bei diesem Bereich des Mrs2p um eine putative RNA-Bindedomäne handelt. Deshalb wurde die Auswirkung der Suppressor-Mutation Leucin 232 zu Phenylalanin (*MRS2*-L232F) auf die RNA-Bindung untersucht. Dazu wurde der N-terminale Teil des Proteins (SDp-L232F) im pGEX-2T überexprimiert und aufgereinigt (vergl. Kapitel 4.2.5).

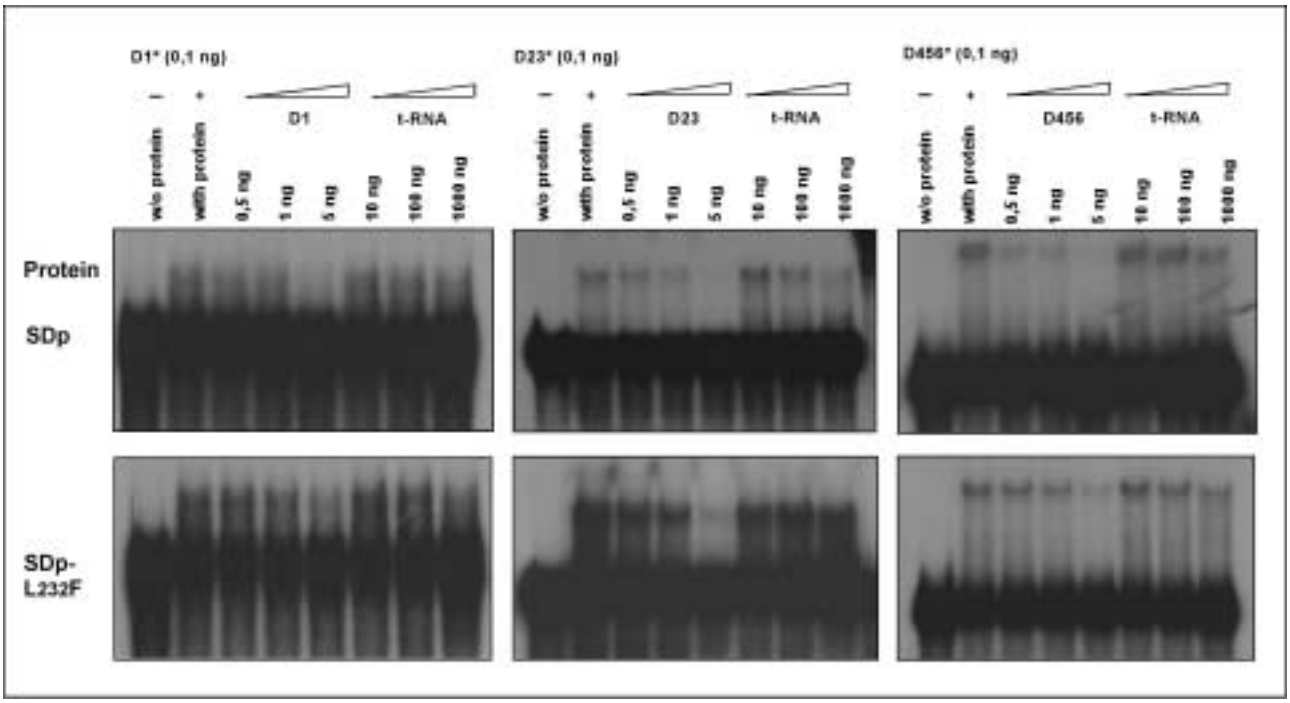


Abb. 25. Kompetition mit verschiedenen Peptiden der Suppressor-Domäne und den Domänen des Introns aI5γ (näheres siehe Text)

Das Protein SDp-L232F wurde anschließend für Standard Kompetitionstests verwendet. Zum Vergleich wurde der Kompetitionstest zusätzlich mit dem Protein SDp durchgeführt (Abb. 25).
Es zeigte sich, dass der spezifische Kompetitor auch bei einem 5-fachen Überschuss nicht in der Lage ist, die radioaktive RNA aus dem Protein SDp-L232F zu verdrängen, wie es im Vergleich mit SDp zu beobachten ist. Dieser Effekt konnte bei allen getesteten RNA-Domänen beobachtet werden. Erklärbar wäre dieser Effekt damit, dass der Austausch von Leucin zu Phenylalanin eine festere Bindung an die RNA bewirkt.

Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurde der Kompetitions Versuch für den spezifischen Kompetitor D456 über einen größeren Konzentrationsbereich bis zu 50 ng (50-facher Überschuss) wiederholt. Als Kontrolle wurde wiederum SDp verwendet. Die Konzentrationen an radioaktiver RNA und Protein stimmten mit den oben genannten Bedingungen überein. Der Kompetitor, hier D456 (nicht markiert), wurde zu den Ansätzen in steigender Konzentration von 0; 1; 2; 6; 12; 25 und 50 ng zugesetzt und unter Standardbedingungen inkubiert, aufgetrennt und exponiert. Als Negativ-Kontrolle wurde die RNA ohne Protein inkubiert (Probe 1). Anschließend wurde der Röntgenfilm gescannt und die relative Schwärzung des „band shift“ mit Hilfe des Programms NIH-Imager aufgenommen und graphisch dargestellt (Abb. 26).

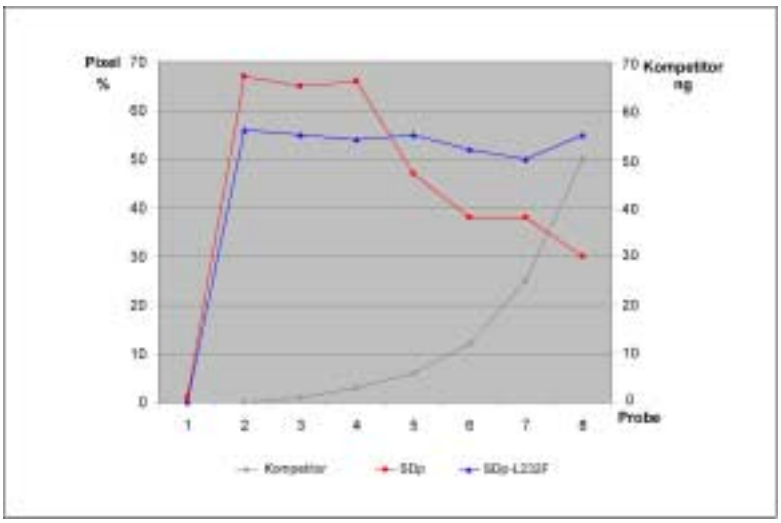


Abb. 26. Kompetitions Versuch der RNA D456 mit SDp und SDp-L232F. Als spezifischer Kompetitor wurde D456 verwendet.

In der Probe ohne Protein war keine retardierte Bande zu erkennen (keine Schwärzung auf Höhe des „band shifts“ = 0 %, stärkste Schwärzung bei der ungebundenen RNA = 100 %) Wie aus Abb. 26 zu sehen ist, ergeben sich mit spezifischer RNA und Protein ohne Kompetitor die stärksten Retardierungen. Mit steigendender Konzentration an Kompetitor sinkt die Intensität der

Schwärzung des „band shifts“ ab (Proben 3-8). Hierbei ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen SDp und SDp-L232F in der Verdrängung der RNA. Während für SDp eine Abnahme von 66 % auf 30 % der Intensität, fällt diese für SDp-L232F von 56 % auf 50 % der Intensität deutlich geringer aus.

Diese Beobachtung führt zu dem Schluss, dass das SDp-L232F die RNA offensichtlich fester bindet, bzw. schlechter von der RNA dissoziiert, als das Wildtyp-Protein. Dieses Ergebnis unterstützt die vorherigen Ergebnisse der *in vivo* Untersuchungen, dass das Intron in Gegenwart eines Suppressors sehr stabil ist. Möglicherweise lässt sich durch die festere RNA-Bindung auch die effizientere Spleißreaktion erklären.

5 Diskussion

Das Mrs2p ist einer der wenigen bekannten kernkodierten Faktoren, die am Spleißen von Gruppe II Introns in den Mitochondrien beteiligt sind. Bisher wurde das Mrs2p in erster Linie in seiner Bedeutung für die mitochondriale Magnesiumhomeostase eingehender analysiert. Um die Bedeutung des Mrs2p für das Gruppe II Spleißen zuklären, wurde das Protein in der vorliegenden Arbeit durch genetische Analysen *in vivo* und RNA-Protein-Bindungsstudien *in vitro* genauer untersucht.

5.1 Die Spleißfunktion des Mrs2 Proteins ist nicht auf seine Funktion in der Magnesiumhomeostase beschränkt

Wiesenberger et al. (1992) konnten zeigen, das die Deletion des *MRS2* Gens im Hefestamm DBY 747 zu einer vollständigen Blockierung der Spleißreaktion aller vorhandenen mitochondrialen Gruppe II Introns und zu einem atmungsdefekten Phänotyp führt. Um die Funktion einzelner Teilbereiche des Proteins *in vivo* analysieren zu können, war daher geplant, durch *in vitro* Mutagenese veränderte Allele des *MRS2* Gens in einen *_mrs2* Stamm zu transformieren, um das Komplementationsverhalten der Allele zu testen. Überraschenderweise zeigte sich aber, dass das *MRS2* „knock out" im verwendeten Stamm DBY 947 nicht zu einer Blockierung sondern nur zu einer Reduzierung der Spleißreaktion von Gruppe II Introns führt. Der Stamm DBY 747 scheint offenbar einer der wenigen Stämme zu sein bei dem die *MRS2* Deletion den Spleißvorgang vollständig inhibiert (R. J. Schweyen, persönliche Mitteilung). Untersuchungen der Euroscarf Deletionsstammsammlung bestätigen, dass der atmungsaktive Phänotyp bezüglich der *MRS2* Deletion kein Einzelfall zu sein scheint, da der *MRS2* „knock out" im Stamm BY 4741 ebenfalls zu keinem negativen Atmungsphänotyp führt (U. Schmidt, persönliche Mitteilung). Die Angaben machen deutlich, dass es sich beim *MRS2* Gen nicht um ein für die Atmung essentielles Gen handelt und die Funktionen des Mrs2p durch ein oder mehrere andere Proteine übernommen werden können.

Eine Funktion ist dabei die Magnesiumhomeostase. Gruppe II Introns sind zwar grundsätzlich zur Autokatalyse fähig, benötigen normalerweise jedoch *in vitro* unphysiologische Magnesiumkonzentrationen zum Spleißen. Es steht daher außer Zweifel, dass auch *in vivo* die Magnesiumkonzentration von Bedeutung ist (Perlman und Podar 1996, Jacquier und Chanfreau 2000). Bislang ist über die natürliche Magnesiumkonzentration, die *in vivo* zum Spleißen benötigt wird, nichts bekannt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass in der Hefe der Magnesiumspiegel in den Mitochondrien vom Mrs2p beeinflusst wird. So bewirkt der *MRS2* „knock out" im Stamm

DBY 747 eine um ca. 50% erniedrigte Magnesiumkonzentration in den Mitochondrien, was eine mögliche Ursache für den Spleißdefekt sein könnte (Bui et al. 1999, Gregan et al. 2001b).
Durch Komplementationsanalysen für das Mrs2p konnten schon vor einiger Zeit Proteine identifiziert werden, die ebenfalls an der Magnesiumhomeostase der Mitochondrien beteiligt sind. Beispielsweise sind die putativen ATP/ADP Transporter Proteine Mrs3p und Mrs4p, wenn sie überexprimiert werden, in geringem Umfang in der Lage, den Spleißdefekt aufzuheben, der durch eine Deletion des *MRS2* Gens hervorgerufen wird (Waldherr et al. 1993). Der suppressorische Effekt wird hier auf die Restaurierung der Magnesiumkonzentration zurückgeführt. Dabei weist der Stamm DBY 747 mit der *MRS2* Deletion eine Magnesiumkonzentration von 155 nmol/mg mt Protein auf, während die „high copy"-Konstrukte vom *MRS3* und *MRS4* in den Mitochondrien die Wiederherstellung des Normalwerts von rund 280 nmol/mg mt Protein bewirken (Gregan et al. 2001b).

Das Mrs12p ist ebenfalls in der Lage, wenn es überexprimiert wird, schwach die Spleißreaktion in einem *MRS2* „knock out" Stamm zu restaurieren. Dabei handelt es sich um ein Carrierprotein, das möglicherweise DNA Bausteine in die Mitochondrien transportiert. Es wird vermutet, dass die Art der Suppression hier ähnlich der des Mrs3p und Mrs4p ist, indem die Magnesiumkonzentration in den Mitochondrien erhöht wird. Magnesiumessungen wurden allerdings nicht durchgeführt (Van Dyck et al. 1995).

Ein weiteres sehr interessantes Protein, das nicht nur an der Magnesiumhomeostase beteiligt ist, ist das Mrs2 Homolog Lpe10p. Wie beim *MRS2* Gen führt die Deletion des *LPE10* Gens zu einer verminderten Spleißreaktion von Gruppe II Introns, einer Anreicherung von Cytochromen sowie zu einer erniedrigten Magnesiumkonzentration im Stamm DBY 747 (140nmol/mg mt Protein). In Komplementationsanalysen in einem Δ*mrs2* Stamm konnte jedoch gezeigt werden, dass das Lpe10p nicht in der Lage ist, die mitochondrialen Funktionen des Mrs2p Proteins effizient zu ersetzen. Allerdings wird die Magnesiumkonzentration, wenn das Lpe10p im *_mrs2* Stamm von DBY 747 überexprimiert wird, deutlich angehoben (502 nmol/mg mt Protein), die Restaurierung der Spleißreaktion erfolgt aber nur im sehr geringen Umfang und ist offensichtlich nur durch RT-PCR nachweisbar. Damit kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass auch hier die beobachteten Defekte die durch ein *lpe10* „knock out" ausgelöst werden, hauptsächlich auf eine gestörte Magnesiumhomeostase zurückzuführen sind. Allerdings wird eine direkte Rolle am Spleißvorgang auch für das Lpe10p nicht ausgeschlossen (Jarosch et al. 2001).

Bezogen auf den oben dargestellten *_mrs2* Phänotyp des Stammes DBY 947 wäre denkbar, dass im Wildtyp dieses Stammes eine vergleichsweise hohe Magnesiumkonzentration vorliegt, die durch eine vermehrte Expression eines der oben genannten Proteine hervorgerufen wird. Aufgrund der erhöhten Magnesiumkonzentration würde dann der *MRS2* „knock out" nicht zu einem vollständigen Block der Spleißreaktion führen. Allerdings sprechen die in dieser Arbeit durchgeführten Magnesiummessungen gegen diese Hypothese. Die Magnesiumkonzentrationen im DBY 947 sind mit 35-83 nmol/mg mt Protein generell vergleichsweise niedrig (Kapitel 4.1.5), ein Unterschied, der vermutlich stammspezifisch ist.

Durch die Kombination des *MRS2* „knock out" mit der Intronmutante aI5γ B-AC* mit reduzierter Spleißreaktion im Stamm DBY 947 wird deutlich, dass es sich bei dem Mrs2p um ein für das Spleißen wichtiges Protein handelt. Dieser Stamm weist einen Block in der Spleißreaktion auf, der durch die Transformation des klonierten *MRS2* Gens aufgehoben wird. D.h. im Fall des mutierten Introns scheinen andere Proteine nicht mehr in der Lage zu sein, die akkumulierten Spleißdefekte aufzuheben, was die zentrale Rolle des Mrs2p am Spleißprozess von Gruppe II Introns illustriert.
Dass die Beteiligung des Mrs2p am Spleißvorgang nicht nur im Rahmen der Magnesiumhomeostase stattfindet, wird durch die folgenden, in dieser Arbeit ermittelten Daten, unterstützt:

1.) Bei der Transformande *MRS2*-R403-405A lässt sich ein erhöhter Magnesiumwert nachweisen, obwohl diese Transformande eine reduzierte Spleißreaktion aufweist.
2.) Die Transformande *MRS2*-W408A spleißt sehr gut, weist aber keine erhöhte Magnesiumkonzentration auf.
3.) Die Transformande *MRS2*-L232F zeigt eine erhöhte Magnesiumkonzentration und eine sehr gute Spleißreaktion. Das entsprechende Teilpeptid SDp-L232F ist *in vitro* in der Lage, eine stärkere RNA-Bindung einzugehen als das Wildtyp-SDp.

Die Daten zeigen, das keine direkte Korrelation zwischen Spleißphänotyp und Magnesiumkonzentration besteht. Unterstützt werden diese Ergebnisse auch durch die bekannten Komplementationsversuche mit den verschiedenen *MRS2* Homologen (Kapitel 1.3.2.1.3 und 2.2), die zwar die Magnesiumkonzentration restaurieren, aber nur ineffektiv den Spleißphänotyp wiederherstellen (Zsurka et al. 2000; Schock et al. 2000, Jarosch et al. 2001). Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, dass bei Einsatz von isolierten Mitochondrien eine erhöhte Magnesiumkonzentration im Puffer zum Spleißen führt, ein Effekt, der nur bei intakten Mitochondrien zu beobachten ist (Gregan et al. 2001b). Somit ist nicht nur Magnesium für die Spleißreaktion von Bedeutung, sondern es wird offensichtlich auch die intakte Struktur der

Mitochondrien benötigt, durch die für die Reaktion wichtigen Proteine und RNA in eine räumliche Nähe zueinander gebracht werden.

5.2 Unterschiedliche Teilbereiche des Mrs2 Proteins sind für die Spleißfunktion von Bedeutung

Durch eine umfangreiche Mutationsanalyse des Mrs2p konnte gezeigt werden, dass größere Deletionen in unterschiedlichen Teilbereichen des Proteins zu einem vollständigen Verlust der Atmungs- und Spleißfähigkeit führen. Damit sind alle Bereiche des Mrs2p entweder direkt funktionell oder es wird durch die Deletion einzelner Domänen eine falsche Konformation des Proteins bewirkt, die zu einem falschen Zusammenspiel der Proteindomänen führt. Unterstützt wird letztere Vermutung durch die Untersuchungsergebnisse der *in vitro* Analyse der Proteinkomponenten, bei denen eine spezifische RNA-Protein-Interaktion sowohl für das SDp als auch für das HDp, sowie allen drei ausgetesteten RNA-Subdomänen, nachgewiesen werden konnte (Kapitel 4.2.6.1).

Zwei oder mehrere RNA-Bindungsstellen in Spleißproteinen von Gruppe I oder Gruppe II Introns sind nicht ungewöhnlich, sondern die Regel. Beispielsweise interagiert das Cyt18p mit den Domänen P5-P4-P6 von Gruppe I Introns (vergl. Abb. 1). Dabei bindet das Cyt18p zunächst sehr effizient an die Intron RNA und vermittelt dann weitere RNA Kontakte (Caprara et al. 1996; Saldanha et al. 1996, Webb et al. 2001). Bei dem Cbp2p, das mit den Domänen P3-P8 und P7.1-P7.1a interagiert, muss das Intron zunächst mit der Faltung beginnen. Erst wenn sich das katalytische Zentrum ausbildet, kann dann das Protein binden. Hier wird davon ausgegangen, dass das Cbp2p Übergangsstrukturen, die sich in einem späten Stadium der Faltung ausbilden, festhält und so die Weiterfaltung erleichtert (Buchmueller et al. 2000; Webb et al. 2001).

Auch bei den Maturasen von Gruppe I Introns konnten multiple RNA-Interaktionen nachgewiesen werden. So benötigt die Maturase des Ancob von *A. nidulans* zur Bindung die Domänen P5ab, P6a; P9 und P9.1 (Abb. 1). Dabei erfolgt die Interaktion über mehrere vorgefaltete tertiäre Strukturen, bei denen allerdings keine Hauptbindungsstelle an der RNA festgestellt werden konnte. Aktuell wird davon ausgegangen, dass die Maturase nicht einen Übergangszustand des Introns stabilisiert, sondern eine lockere aber endgültige Faltung des Introns bindet und so fixiert (Geese et al. 2001).

Bei den Spleißkomplexen der Introns bI3 und bI4 sind mehrere RNA-Bindungsstellen allein durch die Anwesenheit mehrerer Proteinuntereinheiten verfügbar. So bildet das Nam2p mit der Maturase des Gruppe I Introns bI4 einen Spleißkomplex (Rho und Martinis 2000, Rho et al. 2002). Bei dem Intron bI3 wirkt sogar das Mrs1p als Tetramer mit der Maturase zusammen (Bassi et al. 2002, Bassi und Weeks 2003).

Mittlerweile sind neben Gruppe I auch Gruppe II Intron Maturasen bekannt, die an verschiedene RNA-Domänen binden. Dabei besitzt die Maturase des *L. lactis* Intron LtrB eine Hauptproteinbindestelle im „stem-loop" A der Domäne IV. Von hier werden weitere, wesentlich schwächere RNA Interaktionen zu den Domänen I, II, V, und VI vermittelt. Dabei gehen aktuelle Untersuchungen davon aus, dass die Maturase nicht zum korrekten Falten der RNA benötigt wird, sondern dass sich das Intron in seine aktive Struktur faltet und diese labile Struktur durch die Maturase zusammengehalten wird (Wank et al. 1999; Matsuura et al. 2001; Singh et al. 2002).
Kürzlich konnten aus den Chloroplasten von *C. reinhardtii* zwei Proteine isoliert werden, die sich in einem Spleißkomplex befinden und in der Lage sind, das Gruppe II Intron rI1 der Grünalge *S. obliquus* zu spleißen (Kapitel 1.3.2.2). Eines dieser Proteine, das 31 kDa Protein, bindet ebenfalls sehr effizient an der Domäne IV und vermittelt darüber hinaus Bindungen zu anderen RNA-Domänen, darunter Domäne V und VI (Bunse et al. 2001).
Bei all diesen Proteinen sind die Arten der Bindungen sehr unterschiedlich und es können kaum Homologien zwischen den einzelnen Proteinen ermittelt werden. Ihnen gemeinsam ist jedoch, dass sie alle mit mehreren RNA-Domänen interagieren und helfen, das Intron in seine aktive Struktur zu falten oder es in seiner aktiven Struktur festzuhalten. Die Ergebnisse aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen deuten darauf hin, dass das Mrs2p in vergleichbarer Weise das Spleißen unterstützen könnte, da mehr als eine RNA-Bindestelle nachgewiesen werden konnte.

5.2.1 Die hydrophile Domäne des Mrs2 Proteins

Durch Deletion des C-terminalen Teils des Mrs2p konnte gezeigt werden, dass diese Proteinregion essentiell für die Atmungs- und Spleißfunktion ist. Ursprünglich wurde vermutet, dass der funktionelle Teil dieser Region eine hydrophile Domäne (HD) mit einem „arginine-rich-motif" (ARM) ist (Kapitel 2.2.1.2). Dabei können die vorhandenen Arginine über ihre positive Ladung relativ unspezifisch in der Nähe von „bulges" oder „loops" an die „major groove" der RNA binden (Übersicht Weiß und Narayana 1999).
Die Untersuchung der Bedeutung der Arginine in der hydrophilen Domäne durch gezielte Aminosäureaustausche zeigt jedoch, dass sie zwar die Spleißreaktion beeinflussen, aber keinesfalls zwingend benötigt werden. Dieses Ergebnis wird durch die durchgeführten Bindungsstudien bestätigt. Das Teilpeptid HDp-R403-405A weist eine ebenso so gute Affinität zur RNA auf, wie das Wildtyp HDp. Somit kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Argininen im Bereich von Aminosäure 403-405 um ein ARM handelt. Wenn die Arginine für die RNA/Proteininteraktion

verantwortlich wären, müsste bei ihrer Eliminierung eine deutlich verminderte RNA-Bindung oder sogar ein Verlust der Bindung zu beobachten sein.
Die Daten lassen den Schluss zu, dass ein anderer Bereich im HDp für die RNA-Bindung verantwortlich ist.
Bei der bereits im vorherigen Kapitel erwähnten Maturase des Gruppe II Introns Ll.ltrB ist über die Art der Bindung bis zum heutigen Zeitpunkt ebenfalls wenig bekannt. Auch hier zeichnet sich ein Bereich des Proteins (Domäne X) durch eine große Anzahl an basischen Aminosäuren aus, deren Sequenzen kaum Homologien zu bekannten RNA-Bindemotiven erkennen lassen. Es wird vermutet, dass diese basischen Aminosäuren für die Bindung der RNA verantwortlich sind. (Mohr et al. 1993, Wank et al. 1999). Ähnliches gilt für das nukleär kodierte Crs1p aus Mais, dass neben putativen KH-Motiven, einen typischen RNA-Bindemotiv, auch sehr viele basische Aminosäurereste besitzt, die u.a. für die Bindung mit der plastidären atpF RNA verantwortlich gemacht werden (Till et al. 2001). Auch bei dem Raa3p aus *C. reinhardtii* soll die große Anzahl an Argininen und Serinen für RNA-Bindung verantwortlich sein (Rivier et al. 2001).
Im gesamten C-terminalen Bereich des Mrs2p verteilen sich auf 109 Aminosäuren 25 Arginine und Lysine. Damit könnte beim HDp ebenfalls der insgesamt basische Charakter des Proteins, einschließlich der untersuchten Arginin-Region, für die RNA-Protein-Interaktion verantwortlich sein.

Interessanterweise umfasst das HD Teilpeptid auch einen Bereich von etwa 70 bis 95 Aminosäuren, um die das Mrs2p im Vergleich zu seinen Homologen am C-terminalen Ende verlängert ist. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich hier um einen Proteinbereich handelt, der speziell an eine Aufgabe in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* angepasst wurde (Schmidt et al. 1998). Diese Hypothese basiert auf dem Unterschied zwischen dem Mrs2p aus *S. cerevisiae* und den Mrs2p Homologen aus anderen Organismen und deren Gruppe II Introns. Denn in *S. cerevisiae* sind neben den zwei Gruppe II Introns mit ORF, zwei ohne ORF zu finden, während in *A. thaliana* und *S. pombe* nur Gruppe II Introns mit ORF vorhanden sind. In diesen Organismen wird das Mrs2p also nicht zwingend für den Spleißvorgang benötigt, da hier die Intron kodierten Maturasen die Spleißfunktion erfüllen können. In *S. cerevisiae* dagegen ist das Mrs2p an der Spleißreaktion beteiligt. Somit könnte das Mrs2p mit der C-terminalen Verlängerung eine zusätzliche RNA-Bindestelle erworben haben, die möglicherweise die Faltung des Introns unterstützt. Dabei muss allerdings erwähnt werden, dass diese Verlängerung nicht nur dem Spleißen dient, da der Aminosäureaustausch Mrs2-W408A auch die Biogenese-Funktion beeinträchtigt. Der Austausch einer großen hydrophoben Aminosäure wie Tryptophan gegen Alanin an Position 408 unterstützt

zwar die Spleißreaktion, führt aber gleichzeitig zu einem Atmungsdefekt. Die Überprüfung der mitochondrialen Magnesiumkonzentration dieser Mutante zeigt einen dem Wildtyp vergleichbaren Wert. Damit ist die beobachtete Verbesserung der Spleißreaktion offensichtlich nicht auf einen Magnesiumeffekt zurückzuführen. Die Ursache der gesteigerten Spleißreaktion ist möglicherweise eine verbesserte RNA-Protein-Interaktion des veränderten Proteins, die durch die Verringerung einer sterischen Behinderung bedingt sein könnte.

Unterstützt wird die Hypothese einer Beteiligung der C-terminalen Verlängerung am Spleißvorgang durch Versuche mit dem Mrs2p Homolog aus *S. pombe* (SpMrs2p). Das SpMrs2p ist zwar in der Lage, den Magnesiumspiegel in den Mitochondrien des transformierten *MRS2* Deletionstammes DBY 947 etwas anzuheben (44 nmol/mg mt Protein), ein positiver Spleißphänotyp ist allerdings nicht detektierbar. Dagegen erhält man mit einem Hybridprotein bestehend aus dem SpMrs2p und der C-terminalen Verlängerung des *S. cerevisiae* Proteins einen schwach positiven Atmungs- und Spleißphänotyp (Lehmann et al., in Vorbereitung).

5.2.2 Die Suppressor-Domäne des Mrs2 Proteins

Die Suppressor-Domäne im N-terminalen Teil des Mrs2p wurde als zweiter Bereich postuliert, der für die RNA-Protein-Interaktion in Frage kommen könnte. In dieser Domäne konnten zwischen Aminosäureposition 174 und 260 verschiedene Missensemutationen lokalisiert werden, die den Spleißphänotyp einiger spleißdefekter mit$^-$ Mutanten in Gruppe II Introns restaurieren.
Die Suppressor-Mutation Leucin zu Phenylalanin an der Position 232, die den B-loop Defekt des Introns aI5γ restauriert, sowie die Aminosäureaustausche L232A und T230A/L232F, führen zu deutlich gesteigerten Spleißreaktionen der Transformanden mit dem mitochondrialen Hintergrund B-AC*. Auffällig ist dabei die deutliche Überrepräsentation der Intronbande im Vergleich zur ligierten Exonbande (Abb. 15). Offensichtlich ist der Abbau des gespleißten Introns verlangsamt. Dies könnte drei mögliche Ursachen haben:

1.) Das Mrs2p ist am Abbau des Introns beteiligt, welcher nun durch die Mutationen gestört ist.
2.) Durch die Mutationen kommt es zu einer vermehrten Anlagerung des Mrs2p an die Intron RNA.
3.) Das veränderte Protein löst sich nach Anlagerung schlechter von der RNA, auf diese Weise ist das Intron länger vor dem Abbau geschützt.

Eine direkte Interaktion zwischen der RNA und der Suppressor-Domäne konnte durch die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Bindungsstudien bestätigt werden. Dabei zeigte das mutierte

Teilprotein SDp-L232F im Vergleich zum Wildtyp SDp eine deutlich stärkere Bindung zu der RNA, bzw. eine schlechtere Dissoziation aus dem RNA-Protein-Komplex. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass das Protein auch *in vivo* direkt mit der RNA interagiert. Möglicherweise stellt die langsamere Dissoziation des mutierten Proteins von der RNA den suppressorischen Effekt dar. Das Intron wird fester gebunden und andere, schwächere RNA-Bindestellen des Mrs2p können so die RNA-Faltung unterstützen.
Ein derartiges Verhalten ist von den Gruppe II Intron Maturasen bekannt, die nicht nur eine Bindung mit der RNA eingehen, sondern auch neben einer primären starken Bindungsstelle weitere wesentlich schwächere Bindungen zu anderen Domänen ausbilden (Wank et al. 1999; Zhou et al. 2000). Vergleichbares ist auch für das Cyt18p bekannt, das zuerst relativ fest an die RNA bindet und dann weitere RNA Kontakte vermittelt (Caprara et al. 1996; Saldanha et al. 1996, Webb et al. 2001).

Die festere Bindung an die RNA könnte direkt durch den Aminosäureaustausch von Leucin zu Phenylalanin an Position 232 (L232F) bewirkt werden. Möglicherweise verändert das Phenylalanin als sehr große Aminosäure eine gefaltete Proteinstruktur und macht so andere Strukturen des Proteins besser zugänglich. Andererseits wäre auch denkbar, dass Phenylalanin über hydrophobe Wechselwirkungen direkt an der RNA-Bindung teilnimmt, z.B. über eine direkte Interaktion mit den Basen (Weiss und Narayara 1999). Eine direkte RNA-Bindung über diese Aminosäure erscheint allerdings eher unwahrscheinlich, da die Transformanden mit dem Aminosäureaustausch L232A den gleichen Spleißphänotyp, wie die Transformanden mit dem Austausch L232F aufweisen.
Gregan et al. (2001b) konnte ebenfalls vier Suppressor-Mutationen (A174V/L175F, D222N, M250I, D260E) in dieser Proteinregion identifizieren, die in der Lage sind in geringen Umfang das spleißdefekte Intron bI1 mit der Mutation M1301 zu restaurieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Mutationen zu einer erhöhten Magnesiumkonzentrationen im Stamm DBY 747 führen, die um das 1,5-fache höher sind als der Normalwert (von 280 nmol/mg mt Protein auf bis zu 409 nmol/mg mt Protein). Damit liegt die Vermutung nahe, dass die Spleißreaktion durch die erhöhte Magnesiumkonzentration ausgelöst werden könnte.
Demgemäß könnten auch die von uns gefundenen Aminosäureaustausche (L213M, T230I und L232F) eine erhöhte Magnesiumkonzentrationen in den Mitochondrien bewirken, was auch für die Transformande mit dem Suppressor L232F bestätigt werden konnte (von 53 nmol/mg mt Protein auf 83 nmol/mg mt Protein). Allerdings ist beim Stamm DBY 947 nicht generell eine gesteigerte Spleißreaktion bei einer erhöhten Magnesiumkonzentration zu beobachten, denn auch

Veränderungen in der hydrophilen Domäne führen zu erhöhten Magnesiumwerten (74 nmol/mg mt Protein), aber keiner gesteigerten Spleißreaktion.

Ein potentieller Effekt der Aminosäureaustausche in dieser Region könnte also ein Verlust oder Störung einer sonst normalen Faltung des Proteins sein. Darüber hinaus konnte im Bereich der Suppressor-Domäne ein Helix-Turn-Helix Motiv gefunden werden. Diese Motive sind als typische Strukturelemente für RNA-Protein- und Protein-Protein-Interaktionen bekannt (Schmidt et al. 1998). Es wäre denkbar, dass das Mrs2p seine Funktionen normalerweise als Homo- oder Heterodimer, z.B. mit Lpe10p, ausübt. Durch die Suppressor-Mutationen im Mrs2p wird die Protein-Protein-Interaktion möglicherweise gestört, wodurch der Magnesiuminflux und die RNA-Bindung verstärkt wird.

Interessant in diesem Zusammenhang sind auch die Mutationen T230A/L232F, die zu einem mit der Suppressor-Mutation L232F vergleichbaren Spleißphänotyp in den Transformanden führen. Im Gegensatz zu dem einzelnen Aminosäureaustausch ruft die Doppelmutation in der Transformande trotz vorhandener Spleißreaktion einen atmungsdefekten Phänotyp hervor. Dieses Ergebnis, beruht offensichtlich auf einem Verlust der Biogenese-Funktion des Mrs2p in der Doppelmutante. Ähnliche Beobachtungen konnten von Boulanger et al. (1995) gemacht werden: Nukleäre Suppressor-Mutanten eines spleißdefekten Stammes zeigen bei 30°C und bei 36°C eine Restaurierung des Spleißphänotyps, während der Atmungsphänotyp temperatursensitiv ist. Die Mutanten wachsen zwar bei 30°C, nicht aber bei 36°C auf Medien mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle. Es ist denkbar, dass dieser Effekt ebenfalls durch eine veränderte Protein-Protein-Interaktion ausgelöst wird. Die Suppressor-Mutationen führen möglicherweise zu einer Destabilisierung des Proteins oder schwächen eine Dimerisierung, was sich bei erhöhter Temperatur auf die Biogenese- nicht aber auf die Spleißfunktion auswirkt.
Im Fall der Doppelmutation Mrs2-T230A/L232F könnte ein daraus abgeleiteter Effekt vorliegen. Sowohl die Mutation T230A als auch die Mutation L232F führen jeweils einzeln nur zu einem temperatursensitiven Atmungsphänotyp (Schmidt et al. 1998). Wenn nun beide Mutationen kombiniert werden, kommt es zu einer kumulativen Wirkung, wodurch der negative Glycerinphänotyp schon bei 30°C zu beobachten ist.

5.3 Potentielle Wirkungsweise des Mrs2p

Es konnte nachgewiesen werden, das die in den Matrixraum orientierten C- und N-terminalen Bereiche des Mrs2p mit verschiedenen RNA-Domänen interagieren können. Außerdem haben die Aminosäureaustausche in der Suppressor-Domäne eine stärkere RNA-Bindung zur Folge, die möglicherweise eine Protein-Protein-Interaktion stören. Des Weiteren ist das Mrs2p und speziell die Suppressor-Domäne an der Magnesiumhomeostase beteiligt. Darüber hinaus besitzt das Protein eine zusätzliche, unbekannte Funktion in der Biogenese der Mitochondrien.

Daraus ergibt sich als mögliches Szenario: Das Mrs2p sitzt in der inneren Mitochondrienmembran, wo es als Homo- oder Heterodimer (Schmidt et al. 1998) als Magnesiumtransporter fungiert (Bui et al. 1999). Die Proteinanteile, die nicht in der Membran lokalisiert sind, nehmen über eine Protein-Protein-Interaktion am Magnesiumtransport, Spleißen und der Biogenese teil. Durch die Fähigkeit spezifisch Gruppe II Intron RNA binden zu können, werden die Introns nahe der „Magnesiumpore“ gehalten, wo lokal eine erhöhte Magnesiumkonzentration vorliegt, was das Spleißen von Gruppe II Introns erleichtert. Dies ist keinesfalls essentiell, da die Deletion des *MRS2* Gens nur zu einer Reduktion des Spleißphänotyps führt.

Wenn jedoch ein Intron vorhanden ist, das sehr schlecht spleißt oder sogar spleißdefekt ist, bekommt das Mrs2p eine essentielle Funktion. Denn nun kann das Mrs2p, über mehrere Bindungen zur RNA dem Intron helfen sich in seine aktive Struktur zu falten oder es in dieser festzuhalten. Zusätzlich wird die lokal erhöhte Magnesiumkonzentration benötigt um die Faltung des Introns zu unterstützen. Speziell bei den Intronmutanten, die größere strukturelle Defekte besitzen und *in vivo* in der Regel nicht mehr gespleißt werden können, wie z.B. aI5γ B-loop, ist dann eine festere RNA-Bindung notwendig. Die festere Bindung erfolgt möglicherweise vergleichbar zu der Maturase des Introns L.l. ltrB, bei der von einer Hauptbindestelle in der Domäne IV weitere RNA-Bindungen vermittelt werden, die dann das Intron in seiner aktiven Struktur halten (Matsuura et al. 2001). Diese verstärkte Bindung der Intron RNA wird durch die Aminosäureaustausche in der Suppressor-Domäne erreicht. Dabei wird das Protein in seiner ursprünglichen Funktionalität so gestört, dass es zu Ausbildung eines temperatursenitiven Atmungsphänotyps kommt. Möglicherweise ist die festere RNA-Bindung und die Erhöhung der Magnesiumkonzentration auch der Grund, warum in diesem Bereich die Suppressor-Mutationen zu finden sind und warum vielfach das Mrs2p als Suppressor für Spleißdefekte von Gruppe II Introns gefunden wird. Denn schon die Veränderung einer Aminosäure in dieser Region führt zu den genannten Effekten. Damit könnte es sich beim Mrs2p um ein Protein handeln, das sich besser an spleißdefekte Introns adaptieren kann als andere Proteine in *S. cerevisiae*.

Die Adaption eines Proteins an den Spleißvorgang mitochondrialer Introns im Verlauf der Evolution ist nicht ungewöhnlich. Das Cyt18p, das als Thyrosyl-tRNA-Synthetase wirkt, wurde an den Spleißvorgang von Gruppe I Introns adaptiert. Dabei hat dieses Protein sowohl eine C-, als auch eine N-terminale Verlängerung erhalten, die an der spezifischen RNA-Bindung beteiligt sind und in anderen Synthetasen nicht gefunden werden (Cherniack et al. 1990; Kittle et al. 1991; Nair et al. 1997; Mohr et al. 2001) (Kapitel 1.2.2.1).
Vergleichbares gilt auch für das Nam2p, eine Leucyl-tRNA-Synthetase mit einer ungewöhnlichen C-terminalen Verlängerung, die am Spleißvorgang das Introns bI4 beteiligt ist (Labouesse et al. 1987; Li et al. 1996; Dujadarn und Herbert et al. 1996) (Kapitel 1.2.2.3). Im Falle des Mrs1p, das am Spleißen vom Gruppe I Intron bI5 beteiligt ist, ist die ursprüngliche enzymatische Funktion zur Auflösung von „holliday junctions“ sogar vollständig verlorengegangen (Bassi et al. 2002, Bassi und Weeks 2003) (Kapitel 1.2.2.4). Aber nicht nur für Gruppe I Introns sind solche an die Spleißreaktion adaptierten Proteine bekannt. So konnten in den letzten Jahren einige Spleißproteine aus Chloroplasten (Kapitel 1.3.2.2) identifiziert werden. Beispielsweise das Spleißprotein Crs2 aus Mais, das zwar Homologien zu Peptidyl-tRNA-Hydrolasen aufweist, aber offensichtlich, wie das Mrs1p, nicht mehr in der Lage ist, seine ursprüngliche Funktion zu erfüllen (Jenkins und Barkan 2001). Ein weiteres Beispiel ist das Raa2p aus *C. reinhardtii*, das als Gruppe II Spleißprotein und Pseudouridin-Synthetase fungiert. Beide Funktionen existieren parallel nebeneinander, können aber, wie es auch für das Mrs2p beobachtet werden konnte, voneinander getrennt werden. Darüber hinaus ist das Raa2p ein weiteres Beispiel für ein am Spleißvorgang beteiligtes membranassoziiertes Protein. Das Protein ist an der inneren Membran der Thylakoidstapel über ionische Interaktionen fixiert und Teil eines größeren Komplexes, der an der Reifung der RNA beteiligt ist (Perron et al. 1999).

Dass auch größere Protein-RNA-Komplexe an das Spleißen von Gruppe II Introns adaptiert wurden, konnte für das Raa3p gezeigt werden, dass Homologien zu einer Pyridoxamin-5’-Phosphat-Oxidase aufweist. Dieses Protein ist am Spleißvorgang des ersten Gruppe II Introns der psaA RNA in den Chloroplasten von *C. reinhardtii* beteiligt. In diesem Fall konnte nachgewiesen werden, dass sich das Raa3p mit anderen Protein-Faktoren, sowie mit der RNA psaA und der trans-agierenden tscA RNA, in einem Komplex befindet.

Es ist also nicht ungewöhnlich, dass adaptierte Spleißproteine in einem Komplex wirken oder Membran assoziiert sind. Infolgedessen ist auch für das Mrs2p vorstellbar, das es mit anderen Proteinen interagiert. Kandidaten hierfür sind das Mrh4p, eine mitochondriale RNA Helikase, die

auch als Suppressor für einen Spleißdefekt des Introns aI5γ identifiziert werden konnte (Schmidt et al. 2002) oder das Mrs2p Homolog Lpe10p, dass möglicherweise mit dem Mrs2p ein Heterodimer bildet.

Da die meisten adaptierten Proteine von Hause aus auch zur RNA-Protein-Interaktion fähig sind, stellt sich die Frage, ob die bisher nicht genauer charakterisierte Biogenese-Funktion des Mrs2p eine solche Funktion umfasst. Denkbar wäre, beispielsweise eine Beteiligung am Abbau von RNA, was eine Suppression des *MRS2* „knock out" durch Transporter von Nukleotidbausteinen (*MRS6*) oder durch ADP/ATP Carrier (*MRS3/4*) erklären würde.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das in der inneren Membran der Mitochondrien von *S. cerevisiae* lokalisierte Mrs2 Protein für den Spleißvorgang von Gruppe II Introns essentiell ist. Die Analyse der Protein-unterstützten Spleißreaktion des Gruppe II Introns aI5γ ergab, das die in die mitochondriale Matrix ragenden N- und C-terminalen Bereiche des Proteins (Suppressor-Domäne und hydrophile Domäne) von Bedeutung sind.

Die hydrophile Domäne weißt in Teilen Ähnlichkeiten zu sog. Arginin-reichen Motiven (ARM) auf, die als typische RNA-Bindestellen beschrieben sind. Durch gezielte Aminosäureaustausche in diesem Bereich, einer funktionellen Analyse *in vivo* und Bindungsstudien mit Teilpeptiden unter Einsatz von *in vitro* transkribierter Intron RNA konnte die Funktionalität des vermuteten ARM allerdings nicht bestätigt werden. Dennoch konnte zweifelsfrei nachgewiesen werden, dass die gesamte hydrophile Domäne einen Einfluss auf den Spleißphänotyp ausübt.

Der zweite wichtige Bereich im Mrs2p ist eine Region, in der Suppressor-Mutationen für ein spleißdefektes Intron gefunden werden konnten. Durch Aminosäureaustausche in dieser Domäne konnte mittels genetischer Analysen *in vivo* gezeigt werden, dass die Suppression des Spleißdefektes auf einen Verlust bzw. eine Störung der ursprünglichen Proteinstruktur zurückzuführen ist. Darüber hinaus konnte durch Bindungsstudien mit dem Protein einer der Suppressor-Mutanten eine veränderte, stärkere Proteinbindung an die RNA nachgewiesen werden.

Dabei ist das Protein in der Lage über die beiden untersuchten Teilbereiche mindestens drei unterschiedliche Bereiche der Intron RNA zu binden, wobei die Bereiche jeweils in der Domäne 1, in den Domänen 23 und in den Domänen 456 liegen müssen.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte nur indirekter Natur sind, wurden die Magnesiumkonzentrationen in hochaufgereinigten Mitochondrien verschiedener Transformanden bestimmt. Diese Messungen in Verbindung mit den genannten Analysen zur Spleißreaktion bestätigen, dass die Spleißfunktion des Proteins nicht allein mit seiner Rolle in der mitochondrialen Magnesiumhomeostase zu erklären ist.

7 Literaturverzeichnis

Akins R.A., Lambowitz A.M. (1987). A protein required for splicing group I introns in Neurospora mitochondria is mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase or a derivative thereof. Cell. 31;50(3): 331-45.

Altamura N., Groudinsky O., Dujardin G., Slonimski P.P. (1992). NAM7 nuclear gene encodes a novel member of a family of helicases with a Zn-ligand motif and is involved in mitochondrial functions in Saccharomyces cerevisiae. J Mol Biol. 224: 575-587.

Anant S., MacGinnitie A.J., Davidson N.O. (1995) apobec-1, the catalytic subunit of the mammalian apolipoprotein B mRNA editing enzyme, is a novel RNA-binding protein. J Biol Chem. 16;270(24): 14762-7.

Aravind L., Makarova K.S., Koonin E.V. (2000). Survey and summary: holliday junction resolvases and related nucleases: identification of new families phyletic distribution and evolutionary trajectories. Nucleic Acids Res. 15;28(18): 3417-32.

Atsumi S., Ikawa Y., Shiraishi H., Inoue T. (2001). Design and development of a catalytic ribonucleoprotein. EMBO J. 1;20(19): 5453-60.

Bassi G.S., de Oliveira D.M., White M.F., Weeks K.M. (2002). Recruitment of intron-encoded and co-opted proteins in splicing of the bI3 group I intron RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 8;99(1): 128-33.

Bassi G.S., Weeks K.M. (2003). Kinetic and thermodynamic framework for assembly of the six-component bI3 group I intron ribonucleoprotein catalyst. Biochemistry. 26;42(33):9980-8.

Belfort M., Perlman P.S. (1995). Mechanisms of intron mobility. J Biol Chem. 270: 30237-30240.

Belfort M., Roberts R.J. (1997). Homing endonucleases: keeping the house in order. Nucleic Acids Res. 1;25(17): 3379-88.

Ben Asher E., Groudinsky O., Dujardin G., Altamura N., Kermorgant M. Slonimski P.P. (1989). Novel class of nuclear genes involved in both mRNA splicing and protein synthesis in Saccharomyces cerevisiae mitochondria. Mol Gen Genet. 215: 517-528.

Bergantino E., Carignani G. (1990). Antibodies against a fused gene product identify the protein encoded by a group II yeast mitochondrial intron. Mol Gen Genet. 223: 249-257.

Bonen L., Vogel J. (2001). The ins and outs of group II introns. Trends Genet. 17(6): 322-31

Boulanger S.C., Belcher S.M., Schmidt U., Dib-Hajj S.D., Schmidt T., Perlman P.S. (1995). Studies of point mutants define three essential paired nucleotides in the domain 5 substructure of a group II intron. Mol Cell Biol. 15: 4479-4488.

Bousquet I., Dujardin G., Poyton R.O., Slonimski, P.P. (1990). Two group I mitochondrial introns in the cob-box and coxI genes require the same MRS1/PET157 nuclear gene product for splicing. Curr Genet. 18: 117-124.

Buchmueller K.L., Webb A.E., Richardson D.A., Weeks K.M. (2000). A collapsed non-native RNA folding state. Nat Struct Biol. 7(5): 362-6.

Bui D.M., Gregan J., Jarosch E., Ragnini A., Schweyen R.J. (1999). The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane. J Biol Chem. 16;274(29): 20438-43.

Bunse A.A., Nickelsen J., Kuck U. (2001). Intron-specific RNA binding proteins in the chloroplast of the green alga Chlamydomonas reinhardtii. Biochim Biophys Acta. 28;1519(1-2): 46-54

Caprara M.G., Lehnert V., Lambowitz A.M., Westhof E. (1996b). A tyrosyl-tRNA synthetase recognizes a conserved tRNA-like structural motif in the group I intron catalytic core. Cell. 13;87(6): 1135-45.

Caprara M.G., Mohr G., Lambowitz A.M. (1996a). A tyrosyl-tRNA synthetase protein induces tertiary folding of the group I intron catalytic core. J Mol Biol. 5;257(3): 512-31.

Caprara M.G., Myers C.A., Lambowitz A.M. (2001). Interaction of the Neurospora crassa mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase (CYT-18 protein) with the group I intron P4-P6 domain. Thermodynamic analysis and the role of metal ions. J Mol Biol. 27;308(2): 165-90.

Carignani G., Groudinsky O., Frezza D., Schiavon E., Bergantino E., Slonimski P.P. (1983). An mRNA maturase is encoded by the first intron of the mitochondrial gene for the subunit I of cytochrome oxidase in S. cerevisiae. Cell. 35: 733-742.

Carignani G., Netter P., Bergantino E., Robineau S. (1986). Expression of the mitochondrial split gene coding for cytochrome oxidase subunit I in S. cerevisiae: RNA splicing pathway. Curr Genet. 11: 55-63.

Cech T.R. (1990). Self-splicing of group I introns. Annu Rev Biochem. 59: 543-568.

Cech T.R., Golden (1999). In The RNA World 2nd edition (Gesteland R.F., Cech T.R., Atkins J.F. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor NY. pp. 451-485.

Chen X., Gutell R.R., Lambowitz A.M. (2000). Function of tyrosyl-tRNA synthetase in splicing group I introns: an induced-fit model for binding to the P4-P6 domain based on analysis of mutations at the junction of the P4-P6 stacked helices. J Mol Biol. 11;301(2): 265-270.

Cherniack A.D., Garriga G, Kittle J.D. Jr., Akins R.A., Lambowitz A.M. (1990). Function of Neurospora mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase in RNA splicing requires an idiosyncratic domain not found in other synthetases. Cell. 24;62(4): 745-55.

Chevalier B.S., Stoddard B.L. (2001). Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. Nucleic Acids Res. 15;29(18): 3757-74.

Coetzee T., Herschlag D., Belfort M. (1994). Escherichia coli proteins including ribosomal protein S12 facilitate in vitro splicing of phage T4 introns by acting as RNA chaperones. Genes Dev. 1;8(13): 1575-88.

Conrad-Webb H., Perlman P.S., Zhu H., Butow R.A. (1990). The nuclear SUV3-1 mutation affects a variety of post-transcriptional processes in yeast mitochondria. Nucleic Acids Res. 25;18(6): 1369-76.

Costanzo M.C., Fox T.D.(1993). Suppression of a defect in the 5' untranslated leader of mitochondrial COX3 mRNA by a mutation affecting an mRNA-specific translational activator protein. Mol Cell Biol. 13: 4806-4813.

Cousineau B., Lawrence S., Smith D., Belfort M. (2000). Retrotransposition of a bacterial group II intron. Nature. 27;404(6781): 1018-21.

Cui Y., Hagan K.W., Zhang S., Peltz S.W. (1995). Identification and characterization of genes that are required for the accelerated degradation of mRNAs containing a premature translational termination codon. Genes Dev. 9: 423-436.

Curcio M.J., Belfort M. (1996). Retrohoming: cDNA-mediated mobility of group II introns requires a catalytic RNA. Cell. 84: 9-12.

Czaplinski K., Weng Y., Hagan K.W., Peltz S.W. (1995). Purification and characterization of the Upf1 protein: a factor involved in translation and mRNA degradation. RNA. 1: 610-623.

Dai L., Zimmerly S. (2002). Compilation and analysis of group II intron insertions in bacterial genomes: evidence for retroelement behaviour. Nucleic Acids Res. 1;30(5): 1091-102.

Dai L., Zimmerly S. (2003). ORF-less and reverse-transcriptase-encoding group II introns in archaebacteria, with a pattern of homing into related group II intron ORF. RNA. 9: 14-19.

Dai L., Toor N., Olson R., Keeping A., Zimmerly S. (2003). Database for mobile group II introns. Nucleic Acids Res. 1;31(2): 424-426.

Dang Y.L., 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.

Decoster E., Simon M., Hatat D., Faye G. (1990). The MSS51 gene product is required for the translation of the COX1 mRNA in yeast mitochondria. Mol Gen Genet. 224: 111-118.

Dickson L., Huang H.R., Liu L., Matsuura M., Lambowitz A.M., Perlman P.S. (2001). Retrotransposition of a yeast group II intron occurs by reverse splicing directly into ectopic DNA sites. Proc Natl Acad Sci U S A. 6;98(23): 13207-12.

Duan X., Gimble F.S., Quiocho F.A. (1997). Crystal structure of PI-SceI a homing endonuclease with protein splicing activity. Cell. 16;89(4): 555-64.

Dujardin G., Herbert C.J. (1997). Aminoacyl tRNA sythetasees involved in group I splicing. (eds. Green R., Schroeder R.. Ribosomal RNA and group I Introns. Austin Texas: Landes Biocience. pp. 179-198.

Dujardin G., Labuesse M., Netter P., Slonimski P.P. (1983). Genetic and biochemical studies of the nuclear suppressor Nam 2: Extraneous activation of a latent pleiotropic Maturase. In Mitochondria, Nucleo-mitochondrial interactions (ed. Schweyen et al.) Walter de Gruyter Berlin. pp. 233-250.

Dujardin G., Pajot P., Groudinski O., Slonimski P.P. (1980). Long range control circuits within mitochondria and between nucleus and mitochondria. I. Methodology and phenomenology of suppressors. Mol Gen Genet. 179: 469-482.

Dujon B. (1989). Group I introns as mobile genetic elements: facts and mechanistic speculations. Gene. 15;82(1): 91-114.

Edgell D.R. (2002). Selfish DNA: New Abode for Homing Endonucleases. Curr Biol. 16;12(8): 276-8.

Edgell D.R., Belfort M., Shub D.A. (2000). Barriers to intron promiscuity in Bacteria. J Bacteriol 182 (19): 5281-5289.

Ehara M., Watanabe K.I., Ohama T. (2000). Distribution of cognates of group II introns detected in mitochondrial cox1 genes of a diatom and a haptophyte. Gene. 3;256(1-2): 157-67.

Ekwall K., Kermorgant M., Dujardin G., Groudinsky O., Slonimski P.P. (1992). The NAM8 gene in Saccharomyces cerevisiae encodes a protein with putative RNA binding motifs and acts as a suppressor of mitochondrial splicing deficiencies when over expressed. Mol Gen Genet. 233: 136-144.

Eskes R., Liu L., Ma H., Chao M.Y., Dickson L., Lambowitz A.M., Perlman P.S. (2000). Multiple homing pathways used by yeast mitochondrial group II introns. Mol Cell Biol. 20(22): 8432-

Faßbender S., Brühl K.H., Ciriacy M., Kück U. (1994). Reverse transcriptase activity of an intron encoded polypeptide. EMBO J. 13: 2075-2083.

Fontaine J.M., Goux D., Kloareg B., Loiseaux-de Goer S. (1997). The reverse-transcriptase-like proteins encoded by group II introns in the mitochondrial genome of the brown alga Pylaiella littoralis belong to two different lineages which apparently coevolved with the group II ribozyme lineages. J Mol Evol. 44: 33-42.

Fox T.D. (1996). Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. Experientia. 52: 1130-1135.

Gampel A., Nishikimi M., Tzagoloff A. (1989). CBP2 protein promotes in vitro excision of a yeast mitochondrial group I intron. Mol Cell Biol. 9(12): 5424-33.

Gatti D.L., Tzagoloff A. Structure and evolution of a group of related aminoacyl-tRNA synthetases. (1991). J Mol Biol. 5;218(3): 557-68.

Geese W.J., Waring R.B. (2001). A comprehensive characterization of a group IB intron and its encoded maturase reveals that protein-assisted splicing requires an almost intact intron RNA. J Mol Biol. 11;308(4): 609-22.

Golden B.L., Gooding A.R., Podell E.R., Cech T.R. (1998). A preorganized active site in the crystal structure of the tetrahymena ribozyme. Science. 282 (9) : 259-264.

Goldschmidt-Clermont M., Choquet Y., Girard-Bascou J., Michel F., Schirmer-Rahire M. Rochaix J.D. (1991). A small chloroplast RNA may be required for trans-splicing in Chlamydomonas reinhardtii. Cell. 65: 135-143.

Gorbalenya A.E. (1994). Self-splicing group I and group II introns encode homologous (putative) DNA endonucleases of a new family. Protein Sci. 3: 1117-1120.

Gottschalk A., Tang J., Puig O., Salgado J., Neubauer G., Colot H.V., Mann M., Séraphin B., Rosbash M., Lührmann R., Fabrizio P. (1998). A comprehensive biochemical and genetic analysis of the yeast U1 snRNP reveals five novel proteins. RNA. 4: 374-393.

Gregan J., Bui D.M., Pillich R., Fink M., Zsurka G., Schweyen R.J. (2001a). The mitochondrial inner membrane protein Lpe10p a homologue of Mrs2p is essential for magnesium homeostasis and group II intron splicing in yeast. Mol Gen Genet. 264(6): 773-81.

Gregan J., Kolisek M., Schweyen R.J. (2001b). Mitochondrial Mg(2+) homeostasis is critical for group II intron splicing in vivo. Genes Dev. 1;15(17): 2229-37.

Groudinsky O., Bousquet I., Wallis M.G., Slonimski P.P., Dujardin G. (1993). The NAM1/MTF2 nuclear gene product is selectively required for the stability and/or processing of mitochondrial transcripts of the atp6 and of the mosaic cox1 and cytb genes in Saccharomyces cerevisiae. Mol Gen Genet. 240(3): 419-27.

Groudinsky O., Dujardin G., Slonimski, P.P. (1981). Long range circuits within mitochondria and between nucleolus and mitochondria. Genetic and biochemical analysis of suppressors which selectively alleviate the mitochondrial intron mutations. Mol Gen Genet. 184: 493-503.

Guez V., Nair S., Chaffotte A., Bedouelle H. (2000). The anticodon-binding domain of tyrosyl-tRNA synthetase: state of folding and origin of the crystallographic disorder. Biochemistry. 22;39(7): 1739-47.

Guo H.C., De Abreu D.M., Tillier E.R., Saville B.J., Olive J.E., Collins R.A. (1993). Nucleotide sequence requirements for self-cleavage of Neurospora VS RNA. J Mol Biol. 232: 351-361.

Guo H., Karberg M., Long M., Jones J.P. 3rd Sullenger B Lambowitz AM. (2000). Group II introns designed to insert into therapeutically relevant DNA target sites in human cells. Science. 21;289(5478): 452-7.

Guo Q., Lambowitz A.M. (1992). A tyrosyl-tRNA synthetase binds specifically to the group I intron catalytic core. Genes Dev. 6(8): 1357-72.

Hensgens L.A.M., Arnberg A.C., Roosendaal E., van der Horst G., van der Veen R., van Ommen, G.-J.B., Grivell L.A. (1983). Variation, transcription and circular RNAs of the mitochondrial gene for subunit I of cytochrome C oxidase. J Mol Biol. 164: 35-58.

Herbert C. J., Dujardin G., Lambouesse M., Slonimski, P.P. (1988). The Nam2 protein from S. cerevisiae and S. douglasii are mitochondrial leucyl-tRNA synthetases and involved in RNA splicing. EMBO J. 7: 473-483.

Herbert C.J., Macadre C., Becam A.M., Lazowska J., Slonimski, P.P. (1992). The MRS1 gene of S. douglasii: co-evolution of mitochondrial introns and specific splicing proteins encoded by nuclear genes. Gene Expr. 2: 203-214.

Herschlag D. (1995). RNA chaperones and the RNA folding problem. J Biol Chem. 8;270(36): 20871-4.

Hill J., McGraw P., Tzagoloff A. (1985). A mutation in yeast mitochondrial DNA results in a precise excision of the terminal intron of the cytochrome b gene. J Biol Chem. 25;260(6): 3235-8.

Himeno M., Shibata T., Kawahara Y., Hanaoka Y., Komano T. (1984). Effect of polyethylene glycol in plasmid DNA solution on transformation of $CaCl_2$ treated *Escherichia coli* cells. Agric Biol Chem. 48: 657-662.

Ho Y., Kim S.J., Waring R.B. (1997). A protein encoded by a group I intron in Aspergillus nidulans directly assists RNA splicing and is a DNA endonuclease. Proc Natl Acad Sci U S A. 19;94(17): 8994-9.

Ho Y., Waring R.B. (1999). The maturase encoded by a group I intron from Aspergillus nidulans stabilizes RNA tertiary structure and promotes rapid splicing. J Mol Biol. 8;292(5): 987-1001.

Houman F., Rho S.B., Zhang J., Shen X., Wang C.C., Schimmel P., Martinis S.A. (2000). A prokaryote and human tRNA synthetase provide an essential RNA splicing function in yeast mitochondria. Proc Natl Acad Sci U S A. 5;97(25): 13743-8.

Huang H.R., Chao M.Y., Armstrong B., Wang Y., Lambowitz A.M., Perlman P.S. (2003). The D IVa maturase binding site in the yeast group II intron aI2 is essential for intron homing but not for in vivo splicing. Mol Cell Biol. 23 (23): 8809-19.

Ikawa Y., Shiraishi H., Inoue T. (2000). Minimal catalytic domain of a group I self-splicing intron RNA. Nature Structure Biol. 7; (11): 1032-1035.

Inoue T., Ikawa Y. (2000). Activation of the group I intron ribozymes with their peripheral domains. (Krupp G., Gaur R.K. eds) Ribozymes and Biochemistry and Biotechnology. Eaton Publishing Natick, MA; pp. 27-39.

Jacquier A., Chanfreau G. (2000). Analysis of group II intron ribozymes. (Krupp G., Gaur R.K. eds.) Ribozymes and Biochemistry and Biotchnology. Eaton Publishing Natick, MA; pp. 55-85.

Jarrell K.A., Peebles C.L., Dietrich R.C., Romiti S.L., Perlman P.S. (1988). Group II intron self-splicing. Alternative reaction conditions yield novel products. J Biol Chem. 263: 3432-3439.

Jarosch E., Rödel G., Schweyen R.J. (1997). A soluble 12-kDa protein of the mitochondrial intermembrane space Mrs11p is essential for mitochondrial biogenesis and viability of yeast cells. Mol Gen Genet. 255: 157-165.

Jarosch E., Tuller G., Daum G., Waldherr M., Voskova A., Schweyen R.J. (1996). Mrs5p an essential protein of the mitochondrial intermembrane space affects protein import into yeast mitochondria. J Biol Chem. 271: 17219-17225.

Jenkins B.D., Kulhanek D.J., Barkan A. (1997). Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. Plant Cell. 9: 283-296.

Jenkins B.D., Barkan A. (2001). Recruitment of a peptidyl-tRNA hydrolase as a facilitator of group II intron splicing in chloroplasts. EMBO J. 15;20(4): 872-9.

Jiménez-Zurdo J.I., García-Rodriguez F.M., Barrientos-Durán A., Toro N. (2003). DNA target site requirements for homing in vivo of a bacterial group II intron encoding a protein lacking the DNA endonuclease domain. J Mol Biol. 16;326(1): 413-423.

Kämper U., Kück U., Cherniack A.D., Lambowitz A.M. (1992). The mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase of Podospora anserina is a bifunctional enzyme active in protein synthesis and RNA splicing. Mol Cell Biol. 12(2): 499-511.

Kennell J.C., Moran J.V., Perlman P.S., Butow R.A., Lambowitz A.M. (1993). Reverse transcriptase activity associated with maturase-encoding group II introns in yeast mitochondria. Cell. 73: 133-146.

King R.D., Sernberg M.J.E. (1996). Identification and application of the concepts important for accurate and reliable protein secondary prediction. Protein Sci. 5: 2298- 2310.

Kittle J.D. Jr, Mohr G., Gianelos J.A., Wang H., Lambowitz A.M. (1991). The Neurospora mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase is sufficient for group I intron splicing in vitro and uses the carboxy-terminal tRNA-binding domain along with other regions. Genes Dev. 5(6): 1009-21.

Kreike J., Schulze M., Ahne F., Lang B.F. (1987). A yeast nuclear gene, MRS1, involved in mitochondrial RNA splicing: nucleotide sequence and mutational analysis of two overlapping open reading frames on opposite strands. EMBO J. 6: 2123-2129.

Kreike J., Schulze M., Pillar T., Korte A., Rodel, G. (1986). Cloning of a nuclear gene MRS1 involved in the excision of a single group I intron (bI3) from the mitochondrial COB transcript in *S. cerevisiae*. Curr Genet. 11: 185-191.

Labouesse M. (1990). The yeast mitochondrial leucyl-t-RNA synthetase is a splicing factor for the excision of several group I introns. Mol Gen Genet. 224: 209-221.

Labouesse M., Herbert C.J., Dujardin G., Slonimski P.P. (1987). Three suppressor mutations which cure a mitochondrial RNA maturase deficiency occur at the same codon in the open reading frame of the nuclear NAM 2 gene. EMBO J. 6: 713-721.

Lambowitz A. M., Belfort M. (1993). Introns as mobile genetic elements. Annu Rev Biochem. 62: 587-622.

Lambowitz A.M., Caprara M. G., Zimmerly S., Perlman P.S. (1999). Group I and group II ribozymes as RNPs: clues to the past and guides to the future. In The RNA World 2nd edition (Gesteland R.F. Cech T.R. Atkins J.F. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor NY. pp. 451-485.

Lambowitz A.M., Perlman P.S. (1990). Involvement of aminoacyl-tRNA synthetases and other proteins in group I and group II intron splicing. Trends Biochem. Sci. 15: 440-444.

Lazowska J., Jacq C., Slonimski, P.P. (1980). Sequence of introns and flanking exons in wild type and box 3 mutants of cytochrome b reveals an interlaced splicing protein coded by an intron. Cell. 22: 333-348.

Leeds P., Peltz S.W., Jacobson A., Culbertson M.R. (1991). The product of the yeast UPF1 gene is required for rapid turnover of mRNAs containing a premature translational termination codon. Genes Dev. 5: 2303-2314.

Leeds P., Wood J.M., Lee B.S., Culbertson M.R. (1992). Gene products that promote mRNA turnover in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol. 12: 2165-2177.

Lehmann K., Mittmann U., Schmidt U. Analysis of Mrs2 homolog from S. pombe. In preparation.

Lehmann K., Schmidt U. (2002). Group II introns: Structure and catalytic Versatility of large natural ribozymes. Crit Rev Biochem Mol Biol. 38(3): 259-296.

Lewin A.S., Thomas A. Jr.; Tirupati H.K. Cotranscriptional splicing of a group I intron is facilitated by the Cbp2 protein. Mol Cell Biol. 15 (12): 6971-6978.

Li F.Y., Nikali K., Gregan J., Leibiger I., Leibiger B., Schweyen R., Larsson C., Suomalainen A. (2001). Characterization of a novel human putative mitochondrial transporter homologous to the yeast mitochondrial RNA splicing proteins 3 and 4. FEBS Lett. 6;494(1-2): 79-84.

Li G.Y., Becam A.M., Slonimski P.P., Herbert C.J. (1996). In vitro mutagenesis of the mitochondrial leucyl tRNA synthetase of Saccharomyces cerevisiae shows that the suppressor activity of the mutant proteins is related to the splicing function of the wild-type protein. Mol Gen Genet. 28;252(6): 667-75.

Lüking A., Stahl U., Schmidt U. (1998). The protein family of RNA helicases. Crit Rev Biochem Mol Biol. 33: 259-296.

Malik H.S., Burke W.D., Eickbush T.H. (1999). The age and evolution of non-LTR retrotransposable elements. Mol Biol Evol. 16(6): 793-805.

Margossian S.P., Li H., Zassenhaus H.P., Butow R.A., (1996). A DExH box protein Suv3p is a component of a yeast mitochondrial 3'-5' exoribonuclease that suppresses group I intron toxicity. Cell. 84: 199-209.

Martin S.L., Li J., Weisz J.A. (2000). Deletion analysis defines distinct functional domains for protein-protein and nucleic acid interactions in the ORF1 protein of mouse LINE-1. J Mol Biol. 17;304(1): 11-20.

Martinez-Abarca F., Garcia-Rodriguez F.M., Toro N. (2000). Homing of a bacterial group II intron with an intron-encoded protein lacking a recognizable endonuclease domain. Mol Microbiol. 35(6): 1405-12.

Martinez-Abarca F., Toro N. (2000). Group II introns in the bacterial world. Mol Microbiol. 38(5): 917-26.

Martinez-Abarca F., Toro N. (2000b). RecA-independent ectopic transposition in vivo of a bacterial group II intron. Nucleic Acids Res. 1;28(21): 4397-402.

Matsuura M., Noah J.W., Lambowitz A.M. (2001). Mechanism of maturase-promoted group II intron splicing. EMBO J. 17;20(24): 7259-70.

Matsuura M., Saldanha R., Ma H., Wank H., Yang J., Mohr G., Cavanagh S., Dunny G.M., Belfort M., Lambowitz A.M. (1997). A bacterial group II intron encoding reverse transcriptase maturase and DNA endonuclease activities: biochemical demonstration of maturase activity and insertion of new genetic information within the intron. Genes Dev. 11: 2910-2924.

McClure M.A. (1991). Evolution of retrotransposons by acquisition or deletion of retrovirus-like genes. Mol Biol Evol. 8: 835-856.

McGraw P., Tzagoloff A. Assembly of the mitochondrial membrane system. (1983). Characterization of a yeast nuclear gene involved in the processing of the cytochrome b pre-mRNA. J Biol Chem. 10;258(15): 9459-68.

Michel F., Ferat J.L. (1995). Structure and activities of group II introns. Annu Rev Biochem. 64: 435-461.

Michel F., Jacquier A., Dujon B. (1982). Comparison of fungal mitochondrial introns reveals extensive homologies in RNA secondary structure. Biochimie. 64: 867-861.

Mohr G., Lambowitz A.M. (1991). Integration of a group I intron into a ribosomal RNA sequence promoted by a tyrosyl-tRNA synthetase. Nature. 14;354(6349): 164-7.

Mohr G., Perlman P.S., Lambowitz A.M. (1993). Evolutionary relationships among group II intron-encoded proteins and identification of a conserved domain that may be related to maturase function. Nucleic Acids Res. 11;21(22): 4991-7.

Mohr G., Rennard R., Cherniack A.D., Stryker J., Lambowitz A.M. (2001). Function of the Neurospora crassa mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase in RNA splicing. Role of the idiosyncratic N-terminal extension and different modes of interaction with different group I introns. J Mol Biol. 16;307(1): 75-92.

Mohr G., Smith D., Belfort M., Lambowitz A.M. (2000). Rules for DNA target-site recognition by a lactococcal group II intron enable retargeting of the intron to specific DNA sequences. Genes Dev. 1;14(5): 559-73.

Mohr G., Zhang A., Gianelos J.A., Belfort M., 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. 1;69(3): 483-94.

Mohr S., Stryker J.M., Lambowitz A.M. (2002). A DEAD-box protein functions as an ATP-dependent RNA chaperone in group I intron splicing. Cell. 14;109(6): 769-79.

Moran J.V., Mecklenburg K.L., Sass P., Belcher S.M., Mahnke D., Lewin A., Perlman P.S. (1994). Splicing defective mutants of the COXI gene of yeast mitochondrial DNA: initial definition of the maturase domain of the group II intron aI2. Nucleic Acids Res. 22: 2057-2064.

Morozova T., Seo W., Zimmerly S. (2002). Non-cognate template usage and alternative priming by a group II intron-encoded reverse transcriptase. J Mol Biol. 1;315(5): 951-63.

Munoz E., Villadas P.J., Toro N. (2001). Ectopic transposition of a group II intron in natural bacterial populations. Mol Microbiol. ;41(3): 645-52.

Myers A.M., Pape L.K., Tzagoloff A. (1985). Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in Saccharomyces cerevisiae. EMBO J. 4: 2087-2092.

Myers C.A., Kuhla B., Cusack S., Lambowitz A.M. (2002). tRNA-like recognition of group I introns by a tyrosyl-tRNA synthetase. Proc Natl Acad Sci U S A. 5;99(5): 2630-5.

Nair S., Ribas de Pouplana L., Houman F., Avruch A., Shen X., Schimmel P. (1997). Species-specific tRNA recognition in relation to tRNA synthetase contact residues. J Mol Biol. 30;269(1): 1-9.

Niemer I., Schmelzer C., Börner G.V. (1995). Overexpression of DEAD box protein pMSS116 promotes ATP-dependent splicing of a yeast group II intron in vitro. Nucleic Acids Res. 23: 2966-2972.

Noah J.W., Lambowitz A.M. (2003). Effects of maturasebinding and Mg2+ concentration on group II intron RNA folding investigated by UV cross-linking. Biochemistry. 4;42(43): 12466-80.

Pape L.K., Koerner T.J., Tzagoloff A. (1985). Characterization of a yeast nuclear gene (MST1) coding for the mitochondrial threonyl-tRNA1 synthetase. J Biol Chem. 5;260(28): 15362-70.

Pel H.J., Maat C., Rep M., Grivell L.A., (1992a). The yeast nuclear gene MRF1 encodes a mitochondrial peptide chain release factor and cures several mitochondrial RNA splicing defects. Nucleic Acids Res. 20: 6339-6346.

Pel H.J., Tzagoloff A., Grivell L.A., (1992b). The identification of 18 nuclear genes required for the expression of the yeast mitochondrial gene encoding cytochrome c oxidase subunit 1. Curr Genet. 21: 139-146.

Perlman P.S., Podar M. (1996). Reactions catalyzed by group II introns in vitro. Methods Enzymol. 264: 66-86.

Perron K., Goldschmidt-Clermont M., Rochaix J.D. (1999). A factor related to pseudouridine synthases is required for chloroplast group II intron trans-splicing in Chlamydomonas reinhardtii. EMBO J. 15;18(22): 6481-90.

Pfanner N., Craig E.A., Hönlinger A. (1997). Mitochondrial preprotein translocase. Annu Rev Cell Dev Biol. 13: 25-51.

Pintar A., Guez V., Castagne C., Bedouelle H., Delepierre M. (1999). Secondary structure of the C-terminal domain of the tyrosyl-transfer RNA synthetase from Bacillus stearothermophilus: a novel type of anticodon binding domain? FEBS Lett. 5;446(1): 81-5.

Reed R. (2000). Mechanisms of fidelity in pre-mRNA splicing. Curr Opin Cell Biol. 12(3): 340-5.

Rehm H. (1997). Der Experimentator: Proteinchemie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm

Rho S.B., Lincecum T.L. Jr., Martinis S.A. (2002). An inserted region of leucyl-tRNA synthetase plays a critical role in group I intron splicing. EMBO J. 16;21(24): 6874-81.

Rho S.B., Martinis S.A. (2000). The bI4 group I intron binds directly to both its protein splicing partners a tRNA synthetase and maturase to facilitate RNA splicing activity. RNA. 6(12): 1882-94.

Rivier C., Goldschmidt-Clermont M., Rochaix J.D. (2001). Identification of an RNA-protein complex involved in chloroplast group II intron trans-splicing in Chlamydomonas reinhardtii. EMBO J. 2;20(7): 1765-73.

Roberts A.P., Braun V., von Eichel-Streiber C., Mullany P. (2001). Demonstration that the group II intron from the Clostridial Conjugative transposon Tn5397 undergoes splicing In vivo. J Bacteriol. 183(4): 1296-9.

Rochaix J.D. (1996). Post-transcriptional regulation of chloroplast gene expression in Chlamydomonas reinhardtii. Plant Mol Biol. 32: 327-341.

Roman J., Woodson S.A. (1998). Integration of the Tetrahymena group I intron into bacterial rRNA by reverse splicing in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 3;95(5): 2134-9.

San Filippo J., Lambowitz A.M. (2003). Characterization of the C-terminal DNA-binding/DNA endonuclease region of a group II intronencoded protein. J Mol Biol. 324: 933-951.

Saldanha R., Chen B., Wank H., Matsuura M., Edwards J., Lambowitz A.M. (1999). RNA and protein catalysis in group II intron splicing and mobility reactions using purified components. Biochemistry. 13;38(28): 9069-83.

Saldanha R., Ellington A., Lambowitz A.M. (1996). Analysis of the CYT-18 protein binding site at the junction of stacked helices in a group I intron RNA by quantitative binding assays and in vitro selection. J Mol Biol. 9;261(1): 23-42.

Schäfer B., Wilde B., Massardo D.R., Manna F., Del Giudice L., Wolf K. (1994). A mitochondrial group-I intron in fission yeast encodes a maturase and is mobile in crosses. Curr Genet. 25(4): 336-41.

Schmelzer C., Schmidt C., May K., Schweyen R.J. (1983). Determination of functional domains in intron bI1 of yeast mitochondrial RNA by studies of mitochondrial mutations and a nuclear suppressor. EMBO J. 2: 2047-2052.

Schmidt C., Söllner T., Schweyen R.J. (1987). Nuclear suppression of a mitochondrial RNA splice defect: nucleotide sequence and disruption of the MRS3 gene. Mol Gen Genet. 210: 145-152.

Schmidt U., Lehmann K., Stahl U. A novel mitochondrial DEAD box protein (Mrh4) required for maintenance of mtDNA in Saccharomyces cerevisiae. FEMS. 2: 267-276.

Schmidt U., Maue I., Lehmann K., Belcher S.M., Stahl U., Perlman P.S. (1998). Mutant alleles of the MRS2 gene of yeast nuclear DNA suppress mutations in the catalytic core of a mitochondrial group II intron. J Mol Biol. 282: 525-541.

Schmidt U., Podar M., Stahl U., Perlman P.S. (1996). Mutations of the two-nucleotide bulge of D5 of a group II intron block splicing in vitro and in vivo: phenotypes and suppressor mutations. RNA 2: 1161-1172.

Schock I., Gregan J., Steinhauser S., Schweyen R., Brennicke A., Knoop V. (2000). A member of a novel Arabidopsis thaliana gene family of candidate Mg2+ ion transporters complements a yeast mitochondrial group II intron-splicing mutant. Plant J. 24(4): 489-501.

Sellem C.H., Begel O., Sainsard-Chanet A. (2000). Recombinant mitochondrial DNA molecules suggest a template switching ability for group-II-intron reverse transcriptase. Curr Genet. 37(1): 24-8.

Sellem C.H., Belcour L. (1997). Intron open reading frames as mobile elements and evolution of a group I intron. Mol Biol Evol. 14(5): 518-26.

Séraphin B., Boulet A., Simon M., Faye G. (1987). Construction of a yeast strain devoid of mitochondrial introns and its use to screen nuclear genes involved in mitochondrial splicing. Proc Natl Acad Sci. USA 84 : 6810-6814.

Séraphin B., Simon M., Boulet A., Faye G. (1989). Mitochondrial splicing requires a protein from a novel helicase family. Nature. 337: 84-87.

Séraphin B., Simon M., Faye G., (1988). MSS18 a yeast nuclear gene involved in the splicing of intron aI5b of the mitochondrial COX1 transcript. EMBO J. 7: 1455-1464.

Shaw L.C., Lewin A.S. (1997). The Cbp2 protein stimulates the splicing of the omega intron of yeast mitochondria. Nucleic Acids Res. 15;25(8): 1597-604.

Shub D.A., Goodrich-Blair H., Eddy S.R. (1994). Amino acid sequence motif of group I intron endonucleases is conserved in open reading frames of group II introns. Trends Biochem Sci. 19: 402-404.

Simon M., Faye G. (1984). Steps in processing of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I pre-mRNA affected by a nuclear mutation in yeast. Proc Natl Acad Sci USA. 81: 8-12.

Singh N.N., Lambowitz A.M. (2001). Interaction of a group II intron ribonucleoprotein endonuclease with its DNA target site investigated by DNA footprinting and modification interference. J Mol Biol. 1;309(2): 361-86.

Singh R.N., Saldanha R.J., D'Souza L.M., Lambowitz A.M. (2002). Binding of a group II intron-encoded reverse transcriptase/maturase to its high affinity intron RNA binding site involves sequence-specific recognition and autoregulates translation. J Mol Biol. 26;318(2): 287-303.

Sirrenberg C., Endres M., Fölsch H., Stuart R.A., Neupert W., Brunner M. (1998). Carrier protein import into mitochondria mediated by the Tim10/Mrs11 und Tim12/ Mrs5. Nature. 391 (26): 912-915.

Smith R.L., Maguire M.E. (1998). Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. Mol Microbiol. 28 (2): 217-226.

Solem A., Chatterjee P., Caprara M.G. (2002). A novel mechanism for protein-assisted group I intron splicing. RNA. 8(4): 412-25.

Söllner T., Schmidt C., Schmelzer C. (1987). Amplification of the yeast nuclear gene MRS3 confers suppression of a mitochondrial RNA splice defect. Curr Genet. 12(7): 497-501.

Steitz T.A., Smerdon S., Jager J., Wang J., Kohlstaedt L.A., Friedman J.M., Beese L.S., Rice P.A. (1993). Two DNA polymerases: HIV reverse transcriptase and the Klenow fragment of Escherichia coli DNA polymerase I. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 58: 495-504.

Tanaka S., Isono K. (1992). Physical dissection and characterization of chromosomes V and VIII of Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res. 25;20(12): 3011-20.

Till B., Schmitz-Linneweber C., Williams-Carrier R., Barkan A. (2001). CRS1 is a novel group II intron splicing factor that was derived from a domain of ancient origin. RNA. 7(9): 1227-38.

Tirupati H.K., Shaw L.C., Lewin A.S. (1999). An RNA binding motif in the Cbp2 protein required for protein-stimulated RNA catalysis. J Biol Chem. 22;274(43): 30393-401.

Toor N., Hausner G., Zimmerly S. (2001). Coevolution of group II intron RNA structures with their intron-encoded reverse transcriptases. RNA. 7(8): 1142-52.

Valencik M.L., Kloeckener-Gruissem B., Poyton R.O., McEwen J.E. (1989). Disruption of the yeast nuclear PET54 gene blocks excision of mitochondrial intron aI5b from pre-mRNA for cytochrom c oxidase subunit I. EMBO J. 8: 3899-3904.

Valencik M.L., McEwen J.E. (1991). Genetic evidence that different functional domains of the PET54 gene product facilitate expression of the mitochondrial genes COX1 and COX3 in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol. 11: 2399-2405.

van Dyck E., Jank B., Ragnini A., Schweyen R.J. Duyckaerts C. Sluse F. Foury F. (1995). Overexpression of a novel member of the mitochondrial carrier family rescues defects in both DNA and RNA metabolism in yeast mitochondria. Mol Gen Genet. 246: 426-436.

van Dyck L., Neupert W., Langer T. (1998). The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. Genes Dev. 12: 1515-1524.

Waldherr M., Ragnini A., Jank B., Teply R., Wiesenberger G., Schweyen R.J. (1993). A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast. Curr Genet. 24: 301-306.

Wallis M.G., Groudinsky O., Slonimski P.P., Dujardin G. (1994). The NAM1 protein (NAM1p) which is selectively required for cox1 cytb and atp6 transcript processing/stabilisation is located in the yeast mitochondrial matrix. Eur J Biochem. 15;222(1): 27-32.

Wallweber G.J., Mohr S., Rennard R., Caprara M.G, Lambowitz A.M. (1997). Characterization of Neurospora mitochondrial group I introns reveals different CYT-18 dependent and independent splicing strategies and an alternative 3' splice site for an intron ORF. RNA. 3(2): 114-31.

Wank H., SanFilippo J., Singh R.N., Matsuura M., Lambowitz A.M. (1999). A reverse transcriptase/maturase promotes splicing by binding at its own coding segment in a group II intron RNA. Mol Cell. 4(2): 239-50.

Wardleworth B.N., Kvaratskhelia M., White M.F. (2000). Site-directed mutagenesis of the yeast resolving enzyme Cce1 reveals catalytic residues and relationship with the intron-splicing factor Mrs1. J Biol Chem. 4;275(31): 23725-8.

Webb A.E., Rose M.A., Westhof E., Weeks K.M. (2001). Protein-dependent transition states for ribonucleoprotein assembly. J Mol Biol. 22;309(5): 1087-100.

Webb A.E., Weeks K.M. (2001). A collapsed state functions to self-chaperone RNA folding into a native ribonucleoprotein complex. Nat Struct Biol. 8(2): 135-40.

Weeks K.M., Cech T.R. (1995a). Efficient protein-facilitated splicing of the yeast mitochondrial bI5 intron. Biochemistry. 13;34(23): 7728-38.

Weeks K.M., Cech T.R. (1995b). Protein facilitation of group I intron splicing by assembly of the catalytic core and the 5' splice site domain. Cell. 28;82(2): 221-30.

Weeks K.M., Cech T.R. (1996). Assembly of a ribonucleoprotein catalyst by tertiary structure capture. Science. 19;271(5247): 345-8.

Weiss M.A., Narayara N. (1999). RNA recognition by Arginine-rich peptide motifs. Biopolymers. 48: 167-180.

Wiesenberger G., Link T.A., von Ahsen U., Waldherr M., Schweyen R.J. (1991). MRS3 and MRS4 two suppressors of mtRNA splicing defects in yeast are new members of the mitochondrial carrier family. J Mol Biol. 217: 23-37.

Wiesenberger G., Waldherr M., Schweyen R.J. (1992). The nuclear gene MRS2 is essential for the excision of group II introns from yeast mitochondrial transcripts in vivo. J Biol Chem. 267: 6963-6969.

Yeo C.C., Yiin S., Tan B.H., Poh C.L. (2001). Isolation and characterization of group II introns from Pseudomonas alcaligenes and Pseudomonas putida. Plasmid. 45(3): 233-9.

Zhang A., Derbyshire V., Salvo J.L., Belfort M. (1995). Escherichia coli protein StpA stimulates self-splicing by promoting RNA assembly in vitro. RNA. 1(8): 783-93.

Zhou L., Manias D.A., Dunny G.M. (2000). Regulation of intron function: efficient splicing in vivo of a bacterial group II intron requires a functional promoter within the intron. Mol Microbiol. 37(3): 639-51.

Zimmerly S., Guo H., Eskes R., Yang J., Perlman P.S., Lambowitz A.M. (1995a). A group II intron RNA is a catalytic component of a DNA endonuclease involved in intron mobility. Cell. 83: 529-538.

Zimmerly S., Guo H., Perlman P.S., Lambowitz A.M. (1995b). Group II intron mobility occurs by target DNA-primed reverse transcription. Cell. 82: 545-554.

Zimmerly S., Hausner G., Wu X. (2001). Phylogenetic relationships among group II intron ORFs. Nucleic Acids Res. 1;29(5): 1238-50.

Zimmerly S., Moran J.V., Perlman P.S., Lambowitz A.M. (1999). Group II intron reverse transcriptase in yeast mitochondria. Stabilization and regulation of reverse transcriptase activity by the intron RNA. J Mol Biol. 11;289(3): 473-90.

Zsurka G., Gregan J., Schweyen R.J. (2001). The human mitochondrial Mrs2 protein functionally substitutes for its yeast homologue a candidate magnesium transporter. Genomics. 1;72(2): 158-68.