

Intron-kodierte Polypeptide aus Chloroplasten und Mitochondrien

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einführung	1
1. Einleitung	1
2. Intron-kodierte Maturasen sind wichtige Ko-Faktoren beim RNA-Spleißen	2
3. Intron-kodierte Endonukleasen verursachen die Mobilität ihres eigenen Introns	5
3.1 Das <i>omega</i> System	5
3.2 Intron-Mobilität ist ein Merkmal vieler Gruppe I Intronen	6
3.3 Das Initiationsereignis für den Intron-Transfer ist ein Doppelstrang-Bruch	9
4. Intron-kodierte Polypeptide aus Gruppe II Intronen weisen Sequenzähnlichkeiten zu Reversen Transkriptasen auf	11
4.1 Mutmaßliche Intron-kodierte Reverse Transkriptasen verursachen die Transposition oder Deletion von Intronen	13
4.2 Reverse Transkriptase kodierende Intronen können als frei replizierende Plasmide existieren	14
5. Hypothesen über den evolutionären Ursprung Intron-kodierter Polypeptide	17
5.1 Mobile genetische Elemente sind die Vorfahren von Intronen	17
5.2 Präexistierende Intronen haben offene Leserahmen aufgenommen	19
5.2.1 Die Evolution struktureller und kodierender Intron-Regionen erfolgte unabhängig voneinander	19
5.2.2 Endonuklease- und Reverse Transkriptase-Leserahmen kommen auch außerhalb von Intronen vor	20
5.2.3 Intron-kodierte Endonukleasen und Reverse Transkriptasen haben sich sekundär zu Maturasen entwickelt	22
6. Zusammenfassung und Ausblick	23
II. Problemstellung	24
III. Material und Methoden	28
1. Material	28
1.1 Stämme	28
1.2 Nährmedien	28
1.3 Chemikalien	29
1.4 Enzyme	29
1.5 Häufig verwendete Puffer	30
1.6 Plasmide	30
1.7 Oligonukleotide	32

2. Methoden	33
2.1 Kulturbedingungen	33
2.2 Isolierung von Nukleinsäuren	33
2.3 Gelelektrophorese	34
2.4 Transformationen	34
2.5 Southern-Blots und DNA-DNA-Hybridisierungen	34
2.6 Northern-Blots und RNA-DNA Hybridisierungen	34
2.7 Radioaktive Markierung von DNA	35
2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion - PCR	35
2.9 <i>In vitro</i> Rekombination von DNA	35
2.9.1 Klonierung in Plasmide	35
2.9.2 Klonierung von PCR-Fragmenten in Expressions-Vektoren	35
2.10 Oligonukleotidsynthese	35
2.11 DNA-Sequenzierung	35
2.12 Gen-Überexpression in <i>Escherichia coli</i>	35
2.13 <i>In vivo</i> Test zur Überprüfung der Endonuklease-Aktivität Intron-kodierter Polypeptide	36
2.14 <i>In vitro</i> Transkription	36
2.15 <i>In vitro</i> Translation	36
2.16 <i>In vitro</i> -Überprüfung von Endonuklease-Aktivität	37
2.17 Heterologe Genexpression in <i>S. cerevisiae</i>	37
2.17.1 Methodische Grundlagen zur heterologen Genexpression mit dem Ty-System	37
2.17.2 Aufreinigung von Ty Virus-ähnlichen Partikeln (TyVLPs) aus <i>S. cerevisiae</i>	38
2.18 Identifizierung von Proteinen durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern	39
2.19 Reverse Transkriptase-Messung	39
2.20 Geltest zur Darstellung der Reverse Transkriptase-Aktivität	39
2.21 Sicherheitsmaßnahmen	39
IV. Ergebnisse	40
A. Expressions- und Funktionsanalysen Intron-kodierter Endonukleasen	40
1. Nachweis der heterologen Expression des Intron-kodierten Polypeptids aus <i>Chlamydomonas smithii</i> in <i>E. coli</i>	40
1.1 Konstruktion rekombinanter pT7-7 Plasmide zur Überexpression der Intron-kodierten Endonuklease in <i>E. coli</i>	40
1.2 Spezifische Protein-Markierung	42
2. Funktionsanalyse des Intron-kodierten Proteins aus dem mitochondrialen <i>cob</i> -Gen von <i>C. smithii</i>	43
2.1 Klonierung der Erkennungssequenz für die mutmaßliche Intron-kodierte Endonuklease in den Vektor pGP1-2	44
2.2 Expression des Intron-kodierten Proteins mit dem Tabor-System in Anwesenheit der Erkennungssequenz	44
2.3 Funktionsanalyse des <i>in vitro</i> translatierten Intron-kodierten Proteins aus <i>C. smithii</i>	46
2.3.1 <i>In vitro</i> Translation des Intron-kodierten Polypeptids	46
2.3.2 Überprüfung der Endonuklease-Aktivität der <i>in vitro</i> translatierten Intron-kodierten Proteine	47
2.4 Expression der Intron-kodierten Endonuklease aus <i>C. smithii</i> unter der transkriptionellen Kontrolle des <i>trc</i> -Promotors	49
2.5 <i>In vivo</i> Nachweis der Endonuklease-Aktivität des Intron-kodierten Polypeptids aus <i>C. smithii</i> in <i>E. coli</i>	49
3. Endonuklease-Aktivität des Intron-kodierten Polypeptids aus dem plastidären <i>LSUrRNA</i> -Intron von <i>C. reinhardtii</i>	52

3.1 Nachweis der Endonuklease-Aktivität von I- <i>CreI</i> nach Expression unter der Kontrolle des <i>trc</i> -Promotors	52
3.2 Die Aktivität von I- <i>CreI</i> kann durch Expression mit dem pUHE-System gesteigert werden	55
B. Expressions- und Funktionsanalysen Intron-kodierter Reverser Transkriptasen	57
1. Verbreitung des plastidären <i>petD</i> -Intron-Leserahmens in der Algengattung <i>Scenedesmus</i>	57
2. Ein Intron-kodiertes Polypeptid kann mit dem Ty-Expressionssystem in <i>S. cerevisiae</i> heterolog exprimiert werden	58
2.1 Konstruktion der in den Expressionsversuchen eingesetzten Vektoren	58
2.2 Transkriptanalyse des Fusionsgens aus dem TYA-Gen und dem Intron-kodierten Polypeptid in <i>S. cerevisiae</i>	60
2.3 Expression des Intron-kodierten Proteins aus <i>S. obliquus</i> als TYA-Fusionsprotein in <i>S. cerevisiae</i>	61
3. Heterologe Expression putativer Reverser Transkriptasen mit dem TY-Expressionssystem in <i>S. cerevisiae</i>	62
3.1. Klonierung der mutmaßlichen Reversen Transkriptasen in den Hefeexpressionsvektor pFM21IBglII	62
3.1.1 Konstruktion des Plasmids pSOB148	63
3.1.2 Konstruktion der Plasmide pCRB9 und pCRB1I	63
3.1.3 Konstruktion des Plasmids pPA405	64
3.2 Heterologe Expression der verschiedenen mutmaßlichen Reversen Transkriptasen in <i>S. cerevisiae</i>	64
4. Funktionsanalyse der mutmaßlichen Reversen Transkriptasen	66
4.1 Messung der Reverse Transkriptase-Aktivität der überexprimierten Polypeptide	66
4.2 Biochemische Charakterisierung der Reverse Transkriptase-Aktivität des Intron-kodierten Polypeptids aus <i>Podospira anserina</i>	71
4.2.1 Aktivität des Intron-kodierten Enzyms unter Einfluß von N-Ethylmaleimid	71
4.2.2 Effekt von Didesoxythymidin Triphosphat auf die Reverse Transkriptase-Aktivität des Intron-kodierten Proteins	72
4.2.3 Einfluß von Aphidicolin auf die Polymerase-Aktivität des Intron-kodierten Proteins	74
V. Diskussion	76
A. Heterologe Expression und Funktionsanalysen Intron-kodierter Endonukleasen	76
1. Analyse des Intron-kodierten Polypeptids aus dem mitochondrialen <i>cob</i> -Gen von <i>C. smithii</i>	77
1.1 Die Intron-kodierte Endonuklease aus dem Chondriom von <i>C. smithii</i> kann in <i>E. coli</i> heterolog überexprimiert werden	78
1.2 Die Expression des Intron-kodierten Proteins mit dem T7-RNA-Polymerase-Promotorsystem ist für <i>E. coli</i> -Zellen letal, wenn sie die Erkennungssequenz der mutmaßlichen Endonuklease enthalten	79
1.3 Das <i>in vitro</i> translatierte Intron-kodierte Polypeptid aus <i>C. smithii</i> besitzt eine schwache Endonuklease-Aktivität	82
1.4 Die heterolog exprimierte Endonuklease I- <i>CsmI</i> hydrolysiert <i>in vivo</i> das intronfreie <i>cob</i> -Gen aus <i>C. reinhardtii</i>	83

2. Analyse der Intron-kodierten Endonuklease I-CreI aus dem plastidären <i>LSUrRNA</i> -Gen von <i>C. reinhardtii</i>	87
2.1 Die Aktivität der in <i>E. coli</i> überexprimierten Endonuklease I-CreI ist abhängig vom Expressionssystem	87
2.2 Die Erkennungssequenz von I-CreI umfaßt maximal 31 bp	89
B. Heterologe Expression und Funktionsanalyse Intron-kodierter Reverser Transkriptasen	92
1. Der RTase-ähnliche Leserahmen des <i>petD</i> -Introns kommt in fünf verschiedenen <i>Scenedesmus obliquus</i> -Stämmen vor	92
2. Das Ty-System der Bäckerhefe eignet sich zur heterologen Expression Intron-kodierter Reverser-Transkriptasen	93
2.1 Das Fusionsgen aus dem TYA-Gen und dem Intron-kodierten Polypeptid der Alge <i>S. obliquus</i> wird in <i>S. cerevisiae</i> transkribiert und translatiert	94
2.1.1 Transkriptanalyse von Hefetransformanten	95
2.1.2 Immunologischer Nachweis des als TYA-Fusionsprotein überexprimierten Intron-kodierten Proteins aus <i>S. obliquus</i>	96
2.2 Hetrologe Expression verschiedener putativer Reverser Transkriptasen mit dem Ty-System	97
3. Bestimmung der Polymerase-Aktivität der heterolog exprimierten putativen Reversen Transkriptasen	100
3.1 Das Intron-kodierte Polypeptid aus <i>Podospora anserina</i> besitzt eine Reverse Transkriptase-Aktivität	101
3.2 Mögliche Ursachen für die Inaktivität der putativen Reversen Transkriptasen aus <i>S. obliquus</i> und <i>C. reinhardtii</i>	102
3.3 Das Intron-kodierte Protein aus <i>P. anserina</i> weist Charakteristika einer Reversen Transkriptase auf	105
3.3.1 Die Aktivität der pDNA-kodierten Reversen Transkriptase wird durch Mn^{2+} -Ionen inhibiert	105
3.3.2 N-Ethylmaleimid hat eine starke inhibierende Wirkung auf die Polymerase-Aktivität des Intron-kodierten Enzyms	106
3.3.3 Die Aktivität der Intron-kodierten Reversen Transkriptase wird durch Didesoxythymidin Triphosphat gehemmt	107
3.3.4 Die Reverse Transkriptase aus <i>P. anserina</i> ist gegen Aphidicholin resistent	107
C. Mögliche biologische Bedeutung Intron-kodierter Endonukleasen und Reverser Transkriptasen in Chloroplasten und Mitochondrien	108
VI. Zusammenfassung	111
VII. Literatur	113
VIII. Anhang	