

Inhaltsverzeichnis

I. Einführung 1

1. Einleitung 1

2. Extranukleäre Intronen 2

 2.1 Gruppe I-Intronen 2

 2.2 Gruppe II-Intronen 4

 2.2.1 Vorkommen 4

 2.2.2 Sekundärstruktur und tertiäre Wechselwirkungen 6

 2.2.3 *Trans*-Spleißen 8

 2.2.4 Spleißmechanismen 9

 2.3 Gruppe III-Intronen 11

3. *Trans*-Faktoren beim Spleißen von Organellen-Intronen 12

 3.1 Kern-kodierte *trans*-Faktoren 12

 3.2 Intron-kodierte Polypeptide 14

4. Evolution extranukleärer Intronen 16

 4.1 Verbreitung von Gruppe I- und Gruppe II-Intronen 16

 4.2 Sind Gruppe II-Intronen Vorläufer nukleärer mRNA-Intronen? 17

5. Funktionen von Intronen 18

II. Problemstellung 21

III. Material und Methoden 25

1. Material 25

 1.1 Stämme 25

 1.2 Plasmide 25

 1.3 Oligonukleotide 27

 1.4 Chemikalien 29

 1.5 Enzyme 29

 1.6 Medien 29

 1.7 Häufig verwendete Puffer 30

 1.8 Geräte 30

2. Methoden 30

 2.1 Kulturbedingungen 30

 2.2 Biolistische Transformation von *C. reinhardtii*-Chloroplasten 31

 2.3 Isolierung von Nukleinsäuren 31

 2.3.1 Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* 31

 2.3.2 RNA aus *Escherichia coli* 32

 2.3.3 DNA und RNA aus *Chlamydomonas reinhardtii* 32

 2.4 Gelelektrophorese 32

 2.5 Elution von Nukleinsäuren 33

 2.5.1 Elution von DNA aus Agarosegelen 33

 2.5.2 Elution von RNA aus Polyacrylamidgelen 33

2.6	Blotverfahren	33
2.7	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	33
2.8	Hybridisierungen	34
2.8.1	Southern-Hybridisierung	34
2.8.2	Northern-Hybridisierung	34
2.9	"Primer Extension"	34
2.10	"run on"-Transkription	35
2.11	Oligonukleotidsynthese	35
2.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.12.1	<i>In vitro</i> -Mutagenese	36
2.12.2	Subklonierung chimärer <i>tscA</i> -rI1-Gene zur <i>in vitro</i> - Transkription	37
2.12.3	PCR von <i>C. reinhardtii</i> -Gesamt-DNA und -cDNA	37
2.12.4	PCR von <i>E. coli</i> -Plasmid-DNA und -cDNA	37
2.12.5	Asymmetrische PCR	37
2.13	cDNA-Synthese	38
2.14	Klonierung in Plasmide	38
2.15	DNA-Sequenzierung	38
2.16	<i>In vitro</i> -Transkription	38
2.17	<i>In vitro</i> -Spleißen	38
2.18	Quantifizierung von RNA-Mengen und Berechnung relativer Spleißeffizienzen	39
2.19	Sicherheitsmaßnahmen	39
IV.	Ergebnisse	40
1.	Vergleichende Analysen des <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Spleißens	40
1.1	Konstruktion von Plasmiden	40
1.2	Das Intron rI1 wird im Chloroplasten von <i>C. reinhardtii</i> als Lariat gespleißt	41
1.3	Autokatalytisches Spleißen des Introns rI1	43
1.3.1	Das <i>in vitro</i> -Spleißen erzeugt mehrere Exon-Exon- Spleißprodukte	43
1.3.2	Charakterisierung der <i>in vitro</i> verwendeten Spleißstellen	45
1.4	Einfluß von Exon-Intron-Wechselwirkungen auf das Spleißen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	49
2.	Mutationsanalyse <i>cis</i> -wirksamer Elemente	54
2.1	<i>In vitro</i> -Mutagenese zur Erzeugung definierter Intronmutationen	54
2.2	Autokatalytisches Spleißen von Intronmutanten	56
2.2.1	<i>In vitro</i> -Spleißexperimente mit mutierter Intron-RNA	56
2.2.2	Relative <i>in vitro</i> -Spleißeffizienzen mutierter Introns	58
2.3	<i>In vivo</i> -Spleißen von Intronmutanten	60
2.3.1	Spleißaktivität mutierter Introns <i>in vivo</i>	61
2.3.2	Transkriptionsanalysen von <i>C. reinhardtii</i> -Transformanten	64
2.3.3	Nachweis der Exon-Exon-Spleißprodukte <i>in vivo</i>	66

3. Kreuzungsanalyse von <i>C. reinhardtii</i> -Transformanten mit heterologem Intron	70
3.1 Analyse des <i>psaA-trans</i> -Spleißens	70
3.2 Analyse des <i>cis</i> -Spleißens in <i>trans</i> -Spleißdefekten Kreuzungsnachkommen	72
4. RNA-Spleißen in <i>E. coli</i>	75
V. Diskussion	79
1. Das Spleißen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> weist mechanistische Gemeinsamkeiten und prinzipielle Unterschiede auf	79
1.1 <i>Trans</i> -wirksame Faktoren vermitteln das plastidäre Spleißen	79
1.2 <i>In vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Spleißen erfolgen durch Intron-RNA-katalysierte Umesterung	81
1.3 Die Spleißstellenauswahl erfolgt <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> durch unterschiedliche Mechanismen	83
1.3.1 Chimäre <i>tscA-rf1</i> -Transkripte spleißen <i>in vitro</i> inkorrekt	83
1.3.2 Die Spleißstellenauswahl <i>in vivo</i> wird durch <i>trans</i> -Faktoren unterstützt	86
1.4 Exonsequenzen beeinflussen das <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Spleißen	88
1.4.1 Die IBS1 ist als alleinige <i>cis</i> -wirksame Exonsequenz für das Spleißen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> ausreichend	89
1.4.2 Die IBS2 beeinflusst das Spleißen <i>in vitro</i> , jedoch nicht <i>in vivo</i>	90
2. Funktionsanalysen <i>cis</i> -wirksamer Intronsequenzen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	93
2.1 Sekundärstrukturen und tertiäre Wechselwirkungen bestimmen die Spleißaktivität	93
2.1.1 Die Domäne V ist essentiell für das Spleißen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	93
2.1.2 Die Deletion der Domäne VI erlaubt eine inkorrekte <i>in vitro</i> -Spleißreaktion, aber verhindert die Prozessierung <i>in vivo</i>	94
2.1.3 Die γ - γ' -Wechselwirkung bestimmt die 3'Spleißrate	98
2.1.4 Das erste Intronnukleotid ist an beiden Spleißschritten beteiligt	99
2.2 Mutationen der terminalen Intronnukleotide führen <i>in vivo</i> zum Spleißen des Introns ohne Verbindung der Exonen	101
2.3 Intronsequenz und -struktur bestimmen die Stabilität der Intron-RNA <i>in vivo</i>	104
2.4 Die Bedeutung <i>cis</i> -wirksamer Elemente für den Spleißprozeß ist spezifisch für individuelle Intronen	106

3. Sind <i>psaA-trans</i> -Spleißfaktoren am <i>cis</i> -Spleißen des Introns rI1 beteiligt?	110
3.1 <i>C. reinhardtii</i> -Chloroplasten enthalten sämtliche, für das Spleißen des mitochondrialen Introns rI1 notwendigen <i>trans</i> -Faktoren	110
3.2 <i>psaA-trans</i> -Spleißfaktoren modulieren die <i>cis</i> -Spleißaktivität	111
4. Der horizontale Introntransfer ist rezent möglich	114
4.1 Das Intron rI1 wird in <i>E. coli</i> unter Beteiligung von <i>trans</i> -Faktoren gespleißt	114
4.2 Der horizontale Introntransfer erfordert unspezifische Eigenschaften der Intronen und ubiquitär verbreitete <i>trans</i> -Faktoren	115
VI. Zusammenfassung	120
VII. Literatur	123
VIII. Anhang	147