

**Funktionelle In-vivo-Untersuchung der mitochondrialen
RNA-Polymerase des Bakteriophagentyps von Hefe und
*Arabidopsis in Saccharomyces cerevisiae***

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Detlef Wilkens
aus Nordhorn

2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Lisowsky
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 2002

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die mir mit Rat und Tat bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit behilflich waren. Jeden namentlich hier aufführen zu wollen, würde dazu führen, den einen oder den anderen zu vergessen. Deshalb zunächst ein herzliches Dankeschön an alle, die durch ihre Hilfsbereitschaft zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben – sei es durch klugen Rat, sei es durch die bereitwillige Hergabe einer Chemikalienprobe, eines Bakterienstamms oder sonst etwas, was gerade dringend benötigt, aber nicht zur Hand war.

Besonders bedanken möchte ich mich aber bei Herrn Priv.-Doz. Dr. Thomas Lisowsky, unter dessen wissenschaftliche Betreuung diese Arbeit entstand. Seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bei allen Dingen haben viel zum Gelingen beigetragen.

Desweiteren gebührt mein Dank Herrn Prof. Georg Michaelis, in dessen Abteilung die Arbeit entstand. Sein stetes Interesse am Fortgang und die ständige Diskussionsbereitschaft waren mir eine große Hilfe.

Bei Herrn Dr. Karlheinz Esser bedanke ich mich für die vielen großen und kleinen praktischen Tips und Anregungen, die unermüdliche Diskussionsfreude und das mühselige Korrekturlesen dieser Arbeit. Falls hier doch noch ein Fehler steckt, so habe ich vergessen, ihn zu korrigieren.

Ein herzliches Dankeschön auch an Frau Prof. Elke Pratje für ihr stetes Interesse und der fruchtbaren Diskussionen.

Frau Dagmar Leiser war mir stets eine große Hilfe in allen praktischen Dingen des Laboralltags und auch darüber hinaus. Auch hierfür ein herzliches Dankeschön!

Bei allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die gute und unkomplizierte Arbeitsatmosphäre. Bei den Mitarbeitern der Botanischen Institute I und IV bedanke ich mich für die gute nachbarschaftliche Zusammenarbeit, die mir den Laboralltag erleichterte. Insbesondere bedanke ich mich bei Herrn Prof. Peter Westhoff für die große Hilfsbereitschaft und die Übernahme des Korreferats.

Ein herzliches Dankeschön allen Mitarbeitern des Fachbereichs Genetik der Humboldt-Universität Berlin für die freundliche und fürsorgliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die stete Hilfsbereitschaft und das große Interesse an meiner Arbeit. Namentlich erwähnen möchte ich Herrn Prof. Thomas Börner, Herrn Dr. Andreas Weihe, Herrn Dr. Boris Hedtke und Herrn Guntram Christiansen. Der Aufenthalt in Berlin hatte großen Anteil am Gelingen meiner Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis	7
1. EINLEITUNG	9
1.1 Die Hefe als Modellorganismus	9
1.2 Die Mitochondrien – semiautonome Zellorganellen	10
1.3 Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom	11
1.4 Der mitochondriale Transkriptionsapparat	14
1.5 Die Replikation des Mitochondriengenoms	16
1.6 <i>Arabidopsis thaliana</i> als Modellpflanze	17
1.7 Die Transkription in den Plastiden	17
1.8 Problemstellung	18
2. MATERIAL	20
2.1 Chemikalien, Nährstoffe	20
2.2 Enzyme	22
2.3 Antikörper	22
2.4 Sonstige Materialien und Geräte	22
2.5 Puffer	23
2.6 Medien	23
2.7 Hefestämme	24
2.8 E.-coli-Stämme	24
2.9 Plasmide	24
2.10 Primer	25
3. METHODEN	26
3.1 Gelelektrophorese	26
3.1.1 Agarosegele	26
3.1.2 Polyacrylamidgel für die Sequenzierung	26
3.1.3 Verwendung von Polyacrylamid-Fertiggelen	27
3.2 Coomassie-Blue-Färbung	27
3.3 Elektrotransfer von Proteinen und Antikörpernachweis	27
3.4 Kapillartransfer von DNA und RNA auf eine Membran	28
3.4.1 <i>Southern Blot</i> – Transfer von DNA	28
3.4.2 <i>Northern Blot</i> – Transfer von RNA	29
3.5 Hybridisierung von DNA und RNA mit radioaktiv markierten Sonden	29
3.5.1 Herstellung der Sonden	29
3.5.2 Hybridisierungsreaktion	30
3.6 Sequenzierung nach Sanger	30
3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA	31
3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	31

3.9	DNA-Isolierung aus Agarosegelen durch das Dialyseverfahren	32
3.10	DNA-Fällungen	32
3.11	Restriktionen	33
3.12	Ligierungen	33
3.13	Isolierung von Mitochondrien-DNA aus Hefe	33
3.14	Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefe	35
3.15	Isolierung von Plasmid-DNA oder Gesamt-DNA	36
3.16	Plasmidisolierung von <i>E. coli</i>	36
3.17	Genbankherstellung aus Phagen	37
3.18	Transformationen	37
3.18.1	Hefetransformationen	37
3.18.2	<i>E.-coli</i> -Transformationen	38
3.19	Plasmidentfernung bei Hefe	38
3.20	Dihybridsystem	39
3.21	Das Dreikomponenten-System	40
3.22	DAPI-Färbung	41
3.23	Isolierung von Rohmitochondrien	42
3.24	Kreuzung von Hefe	43
3.25	Tetradenzerlegung	43
4.	ERGEBNISSE	45
4.1	Zusatzfaktoren der Organellen-RNA-Polymerasen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
4.1.1	Aufbau eines Dihybridsystems	45
4.1.2	Austesten von Wechselwirkungen zwischen Sigmafaktoren und den Organellen-RNA-Polymerasen von <i>Arabidopsis thaliana</i> mithilfe des Dihybridsystems	46
4.1.3	Verwendung eines Drei-Komponentensystems	47
4.1.4	Beschreibung der beiden potenziellen Spezifitätsfaktoren	49
4.2	Charakterisierung der RNA-Polymerasen des T7/SP6-Typs durch heterologe Komplementation	51
4.2.1	Heterologe Komplementation	51
4.2.2	Fusionsgene aus Hefe- und Arabidopsis-RNA-Polymerase	52
4.2.3	Herstellung eines C-terminal deletierten Rpo41p	53
4.2.4	In-vivo-Funktionsanalyse der hergestellten Konstrukte	53
4.2.5	Analyse der mitochondrialen Genome	55
4.2.6	Entfernung von Konstrukt K3 aus der Hefezelle	57
4.2.7	Test auf Hypersuppressivität	58

4.3	Komplementation des C-terminal deletierten Rpo41p <i>in trans</i>	58
4.3.1	Herstellung eines Hefestamms mit geeigneten molekularen Markern	59
4.3.2	Koexpression von Konstrukt K7 mit K2 und K3	60
4.3.3	Entfernung der Konstrukte aus den Hefezellen	62
4.4	Nachweis der Expression und korrekte Lokalisation der Fusionsproteine	62
4.5	Charakterisierung der mitochondrialen DNA in Mutanten mit C-terminal deletiertem Core-Enzym	62
4.5.1	Genomgröße und Expression des Petite-Genoms	62
4.5.2	Isolierung des Petite-Genoms	64
4.5.3	Identifizierung der mitochondrialen CsCl-Banden im Agarosegel	64
4.5.4	Klonierung von Petite-Genom-Fragmenten	65
4.5.5	Sequenzierung	65
5.	DISKUSSION	66
5.1	Identifizierung von Zusatzfaktoren der Phagentyp-RNA-Polymerasen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	66
5.2	In-vivo-Funktionsanalyse der chimären Konstrukte	69
5.3	In-vivo-Funktionsanalyse der verkürzten RNA-Polymerase	70
5.4	Das Petite-Genom	73
5.5	In-trans-Komplementation des C-terminal deletierten Rpo41p	74
5.6	Modell für die Funktionsbereiche der mitochondrialen RNA-Polymerase von Hefe	74
5.7	Die phylogenetische Entwicklung der Phagentyp-RNA-Polymerasen	75
5.8	Modell zur Replikation des mitochondrialen Hefegenoms	76
5.8.1	Die Notwendigkeit von Primern	76
5.8.2	Modell für die Primerbildung auf dem kodierenden Strang	77
5.8.3	Hat der Gegenstrang einen Promotor?	77
5.8.4	Modell der Zusammenwirkung von Rpo41p und der Primase des Gegenstrangs	78
5.9	Ausblick	79
6.	ZUSAMMENFASSUNG	81
7.	LITERATUR	82
8.	ANHANG	90

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten des SI-Systems und deren Vorsätze sowie allgemein gültige Abkürzungen sind nicht aufgeführt

A	Adenin
abs.	absolut
–ade	ohne Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
DAPI	4',6-Diamino-2-phenyllindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
G	Guanin
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
–his	ohne Histidin
HMG	High Mobility Group
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton ($\text{kg} \cdot \text{mol}^{-1}$)
–leu	ohne Leucin
log	logarithmisch(er)

Lsg.	Lösung
M	molar ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
mM	Millimolar ($10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$)
mRNA	Messenger-RNA (Boten-RNA)
mtDNA	mitochondriale DNA
Nt.	Nukleotid
PEG	Polyäthylenglykol
pH	Wasserstoffionen-Konzentration (negativer dekadischer Logarithmus)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
R	ein beliebiges Nukleotid (A, C, G, T oder U)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNAs	ribosomale Ribonukleinsäuren
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Tyrosin
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylenäthylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
tRNAs	Transfer-Ribonukleinsäuren
-trp	ohne Tryptophan
U	Einheit für Enzymaktivität
U	Uracil
-ura	ohne Uracil
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
WA	Minimalmedium
X	-fach konzentriert (z. B. 10X Puffer = 10-fach konzentrierter Puffer)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galaktopyranosid

1. Einleitung

1.1 Die Hefe als Modellorganismus

Die Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*, kurz Hefe genannt), ein einzelliger Pilz aus der Ordnung der Ascomyceten, ist aus verschiedenen Gründen ein geeignetes Modell zur Erforschung genetischer, biochemischer und zellbiologischer Probleme. Abgesehen von den Differenzierungsvorgängen mehrzelliger Organismen können an ihr die meisten grundlegenden Eukaryonten-Funktionen untersucht werden; viele Hefegene besitzen auch ein homologes Pendant bei den höheren Eukaryonten. Schon häufig haben Studien an der Hefe erste Einblicke in zelluläre Prozesse und molekulare Funktionen von neuen Proteinen gebracht (Foury und Cazzalini 1997).

Die Hefe ist relativ leicht und kostengünstig zu kultivieren, da sie sich durch Zellsprossung (Knospenbildung) in einfachen Zuchtmedien vegetativ vermehrt. Bedingt durch die Generationszeit von 90 Minuten ist es möglich, in relativ kurzer Zeit biologisches Material in ausreichenden Mengen für biochemische und biophysikalische Untersuchungen zu gewinnen. Des Weiteren ist jetzt das Genom vollständig bestimmt (Goffeau *et al.* 1996, 1997) und genetische und molekularbiologische Arbeitsmethoden sind verhältnismäßig leicht anwendbar.

Ein weiteres, hervorstechendes Merkmal der Hefe ist das Vorkommen von Zellen mit einfachem (haploiden) und doppeltem (diploiden) Chromosomensatz. Unter natürlichen Lebensbedingungen kommt die Hefe im diploiden Zustand vor. Unter Mangelbedingungen bilden sie jedoch vier haploide Dauersporen (Tetraden), die unter günstigerem Nährstoffangebot wieder auskeimen. Dabei kommt es zur Verschmelzung zweier haploider Zellen verschiedenen Paarungstyps zu einer diploiden Zygote. Im Labor ist es möglich, die haploiden Sporen vor der Auskeimung zu vereinzeln, so dass die Zellen im haploiden Zustand verbleiben. Auch diese vermehren sich vegetativ durch Knospenbildung. Einerseits ist es deshalb möglich, haploide Hefezellen mit definierter genetischer Ausstattung zu paaren, andererseits können diploide Zellen gezielt durch das Aufbringen auf Mangelmedium zur Sporulation veranlasst werden.

Zudem ist die Hefe durch ihre homologe Rekombination leicht gezielten genetischen Veränderungen, wie das Ausschalten oder Einbringen von Genen, zugänglich. All dies erlaubt insbesondere die Durchführung sowohl klassischer als auch molekularer genetischer Experimente (Broach *et al.* 1991).

Ein besonderer Schwerpunkt in der Hefeforschung bilden Untersuchungen über die Biogenese der Mitochondrien. Die Bäckerhefe ist in der Lage, fakultativ anaerob zu leben, d. h. sie kann durch Vergären bestimmter Nährstoffe genügend Energie zum Überleben herstellen. Damit ist sie nicht zwangsläufig auf die Atmung angewiesen. So ist es möglich, für die Atmung relevante Funktionen an der lebenden Hefe zu erforschen (Grivell *et al.* 1999, Poyton und McEwen 1996) und geeignete mitochondriale oder nukleare Mutanten herzustellen.

1.2 Die Mitochondrien – semiautonome Zellorganellen

Die Mitochondrien werden auch – in Anlehnung an das Wort Organ – als Organellen bezeichnet. Dies soll darauf hinweisen, dass es sich um ein Kompartiment mit genau definierten Aufgaben handelt. Da sie ein eigenes Genom besitzen, auf dem aber nur ein Teil der für ihre Funktionen notwendigen Proteine kodiert sind, spricht man von semiautonomen Organellen. Andere semiautonome Organellen sind die Plastiden in den Pflanzen.

Mitochondrien sind stäbchen- bis schlauchförmige und – besonders bei der Hefe – sehr forminstabile Gebilde. Sie besitzen zwei Membranen; die äußere Membran grenzt das Organell vom Zytoplasma ab, die innere Membran umschließt die Matrix. Der Raum zwischen den beiden Membranen wird als Intermembranraum bezeichnet.

Mitochondrien kommen in allen eukaryotischen Zellen vor und dienen vornehmlich der Energiegewinnung durch die Veratmung von Nährstoffen. Des Weiteren laufen in ihnen auch noch andere essentielle metabolische und anabolische Reaktionen ab wie die Aminosäuresynthese und die Biogenese von Eisen-Schwefel-Proteinen (Lange *et al.* 2001).

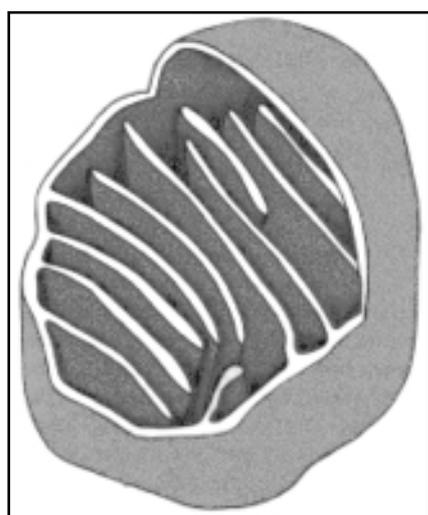


Abb. 1.1: Darstellung eines angeschnittenen Mitochondriums.

Man erkennt die stark aufgefaltete innere Membran, die die Struktur der *Cristae* bildet.

Allgemein anerkannt ist heute die Hypothese, dass die Mitochondrien sich von einem aeroben Prokaryonten ableiten, welcher durch einen endosymbiotischen Vorgang in eine Ur-Eukaryontenzelle gelangt ist. Indizien hierfür sind vor allem der unterschiedliche Aufbau der zwei Membranen und die Struktur des eigenen Genoms der Mitochondrien. Phylogenetisch am nächsten stehen die Mitochondrien den rezenten α -Proteobakterien (Gray 1992).

Ein Charakteristikum der Mitochondrien ist die stark aufgefaltete innere Membran (Abb. 1.1). Durch diese Auffaltung erweitern sie ihre Oberfläche – und damit auch die Reaktionsfläche – drastisch. Diese typisch auf-

gefaltete Membran wird auch als *Cristae* bezeichnet. An ihr laufen viele enzymatischen Reaktionen ab und vor allem finden sich dort die Komplexe der Atmungskette. Hier geschieht die Synthese der sehr energiereichen Verbindung ATP aus Phosphat und ADP. ATP ist für alle Zellen der universelle Energieträger, welcher einen Teil seiner Energie bei der Neuknüpfung von chemischen Bindungen auf andere Moleküle zu übertragen vermag. Bei diesem Vorgang wird das ATP wieder zu ADP und Phosphat umgesetzt, welches in den Mitochondrien dann wieder der Synthese von ATP zur Verfügung steht. Die Matrix beherbergt eine große Anzahl von Enzymen und die meisten nicht membrangebundenen Reaktionen laufen in diesem Kompartiment ab, wie z. B. der Fettsäure- (nicht bei der Hefe!) oder der Zitronensäurezyklus.

Bei den höheren Eukaryonten kommt den Mitochondrien durch die Freisetzung des Atmungsketten-Enzyms Cytochrom c eine Schlüsselrolle bei der Apoptose, also der gezielten Selbsttötung der Zelle, zu (Mignotte und Vayssiere 1998).

1.3 Mitochondrien besitzen ein eigenes Genom

Auf Grund ihrer eigenständigen, prokaryotischen Vergangenheit besitzen die Mitochondrien ein eigenes Genom. Durch eine Vielzahl komplett sequenzierter Mitochondriengenome weiß man, dass hier nur Gene vorhanden sind, die direkt oder indirekt für den Aufbau der Atmungskettenkomplexe benötigt werden (Boumanns *et al.* 1998, Unseld *et al.* 1997). Die meisten mitochondrialen Proteine werden jedoch durch Kerngene kodiert, so dass man annehmen muss, dass im Laufe der Entwicklungsgeschichte einerseits eine Verlagerung mitochondrialer Gene in den Kern stattgefunden hat, andererseits Kerngene an die Funktion der Mitochondrien angepasst wurden und nicht mehr benötigte mitochondriale Gene verloren gingen. Bedingt durch diese Verlagerung ist eine genau abgestimmte Koordinierung der Genexpression in beiden genetischen Systemen unverzichtbar, zumal häufig einige Untereinheiten für einen Enzymkomplex im Kern, andere hingegen in den Mitochondrien kodiert werden.

Die Vererbung des mitochondrialen Genoms geschieht unabhängig vom Kerngenom. In der Mehrzahl der Fälle wird das mitochondriale Genom bei höheren Eukaryonten maternal vererbt. Auf Grund der dort fehlenden genetischen Rekombinationsmöglichkeit ergeben sich für die Evolutionsforschung bei der Mitochondriengenomanalyse genaue Aufschlüsse über die Verwandtschaftsverhältnisse, sowohl innerhalb einer Art als auch zwischen verschiedenen Arten.

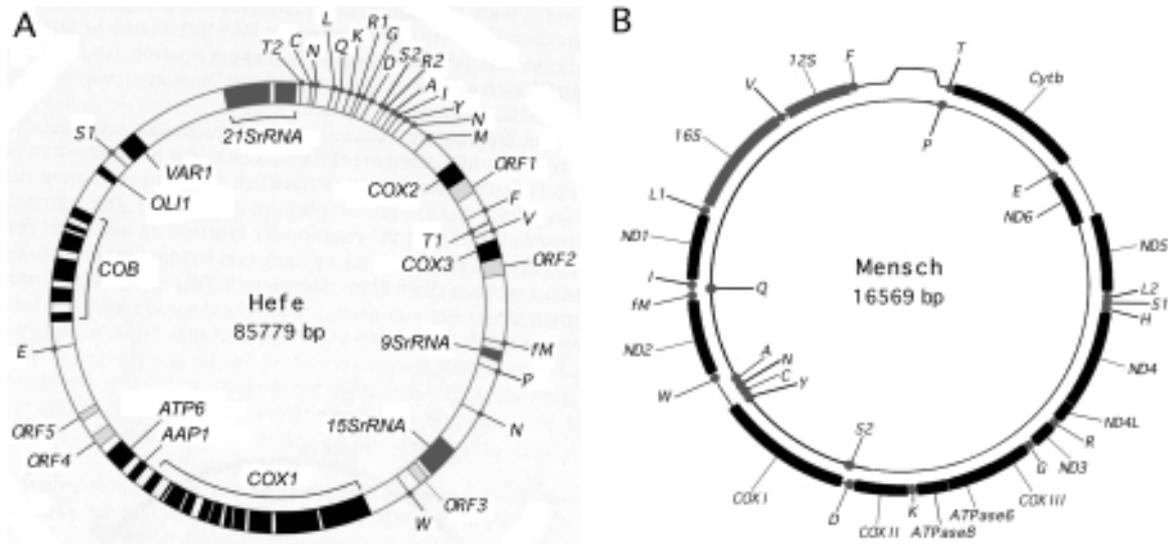


Abb. 1.2: Die Mitochondriengenome von Hefe (A) und Mensch (B).

Das Mitochondriengenom der Hefe ist längst nicht so kompakt strukturiert wie das des Menschen (bzw. der Säuger). Obwohl das mitochondriale Hefegenom mehr als fünfmal größer ist, enthält es weniger Gene und es gibt unterbrochene Gene (Intron-/Exonstruktur). Im Einzelnen bezeichnen die schwarzen Bereiche Protein kodierende Sequenzen, die grauen Bereiche stellen Gene für tRNAs (Punkte) oder rRNAs dar. Die Aminosäuren der tRNAs sind im Einbuchstabencode angegeben (S. Anhang III). Im Hefegenom gibt es noch offene Leseraster ohne bekannte Funktion (*ORF 1–5*, hellgrau dargestellt).

Das mitochondriale Genom kann in einer Zelle in einer Kopienzahl von 100 bis 100.000 (reife Maus-Oozyte, Piko und Matsumoto 1976) vorkommen und dann bis zu ein Drittel der gesamten DNA ausmachen.

Ein besonderes Kennzeichen der mitochondrialen DNA der Hefe ist der hohe Gehalt an Adenin-Thymin-Basenpaaren. Hierdurch ergibt sich gegenüber der Kern-DNA eine geringere Dichte, so dass man durch eine Cäsiumchloridgradienten-Zentrifugation die mitochondriale von der Kern-DNA abtrennen kann.

Vermutlich bedingt durch die relativ geringe Anzahl der Gene konnte es in den Mitochondrien von Säugetieren und Hefe zu einer Veränderung des universellen genetischen Codes kommen. So kodiert bei der Hefe das Kodon UGA anstatt für Stopp für Tryptophan, das Kodon AUA für Methionin anstelle Isoleucin und das Kodon CUA kodiert für Threonin und nicht für Leucin (s. Anhang III). In den Mitochondrien anderer Organismen ist der Code anderweitig verändert, bei Pflanzen wurden bislang aber keine Veränderungen festgestellt! Die unterschiedliche Abänderung bzw. Beibehaltung des genetischen Codes ist ein Hinweis darauf, dass sich diese Veränderungen im Laufe der Evolution der einzelnen Spezies herausgebildet haben, also nicht schon im endosymbiotisch aufgenommenen aeroben Prokaryont vorhanden waren.

Die Lage der Promotoren vor einzelnen Genen oder polycistronischen Transkriptionseinheiten ist in den Mitochondrien der verschiedenen Ordnungen unterschiedlich organisiert. So besitzt die Hefe – je nach Stamm – elf bis 17 bekannte Transkriptionsstartpunkte,

charakterisiert durch das Nonanukleotid ATATAAGTA (Baldacci und Bernardi 1982, Osinga *et al.* 1982). Beim Menschen gibt es für jeden der beiden DNA-Stränge nur einen Promotor, durch welchen die Transkripte der beiden DNA-Stränge initiiert werden. Bei der Pflanze wiederum gibt es – wie bei der Hefe – viele Transkriptionsstartpunkte, aber die Konsensussequenz des Promotors beschränkt sich auf CRTA, bei den Dikotyledonen erweitert sie sich auf CRTAAGAGA.

Die Größe des mitochondrialen Genoms schwankt stark zwischen den einzelnen Ordnungen der Eukaryonten (s. Abb. 1.2); sie reicht von 16,6 kb bei Säugetieren über 76–85,8 kb (je nach Stamm) bei der Bäckerhefe und bis zu weit über 200 kb bei Pflanzen. Die Anzahl der Gene hingegen ist relativ konstant (s. Anhang I). Diese Tatsache deutet auf eine unterschiedliche Organisation der mitochondrialen Genome hin. In der Tat ist bei Säugetieren eine kompakte, ringförmige Struktur wie bei den prokaryotischen Genomen zu beobachten. Es gibt fast nur kodierende Bereiche, manchmal überlappen sich einige Gene sogar und einige Stopp-Kodons (UAA, UGA, AGA) werden häufig erst durch das Anhängen einer kurzen Poly-A-Sequenz generiert. Fast alle Gene werden auf einem Strang (schwerer Strang) kodiert.

Das mitochondriale Genom der Pflanzen unterscheidet sich deutlich von dem der Säuger: Weite Bereiche enthalten keine kodierenden Sequenzen, und es gibt erhebliche Größenunterschiede (ca. 200 kb–2000 kb, Knippers 1995) nicht nur bei verschiedenen Pflanzen, sondern auch innerhalb einer Art und sogar innerhalb einer Pflanze! Die Struktur des pflanzlichen mitochondrialen Genoms ist starken Schwankungen unterworfen. Die Gene verteilen sich auf mannigfaltig rekombinierte kleine und große DNA-Ringe, die ständig Änderungen unterworfen sind. Dies erschwert sehr die Charakterisierung der pflanzlichen Mitochondriengenome, weil es **das** pflanzliche Mitochondriengenom nicht gibt. Man kann aber nach Restriktion und Sequenzierung der mitochondrialen DNA die Fragmente zu einem Idealgenom zusammensetzen, sodass man einen Standardring (*Master Circle*) erhält. Dieser Standardring wird aber selten oder vielleicht gar nicht im Mitochondrium vorkommen.

Im Mitochondriengenom der Hefe gibt es, ähnlich wie bei den Pflanzen, nichtkodierende Bereiche und es gibt – je nach Stamm – zwei oder drei Gene (*COX1*, *COB* und *21S rRNA*), die durch nichtkodierende Bereiche (Introns) unterbrochen werden. Allerdings haben die nichtkodierenden Bereiche einen wesentlich kleineren Anteil an der gesamten mitochondrialen DNA als bei Pflanzen. Außer einem tRNA-Gen liegen alle Gene auf demselben Strang. Im Gegensatz zu den Säugetieren und den Pflanzen findet man in der Hefe sehr häufig lineare und nur vereinzelt ringförmige Moleküle. Die Größe dieser linearen DNA-Moleküle reicht von annähernd 60 kb bis einige hundert Kilobasen, es wurden ver-

einzelnt sogar Moleküle mit mehr als einer Megabase gefunden (Bendich 1996). In diesen linearen Molekülen liegen ein bis mehrere Genome hintereinander angeordnet vor. Bislang konnte nicht geklärt werden, ob es sich bei den linearen Molekülen um Replikationsintermediate und bei den Zirkeln um die funktionellen Einheiten handelt oder ob die zirkuläre Form für die mitochondriale Funktion unerheblich ist.

Da im mitochondrialen Genom der Hefe nur Proteine für die Atmungskettenkomplexe kodiert werden, fällt bei fast jedem Defekt in der mitochondrialen DNA die Atmung aus. Dadurch wachsen die Hefen nur noch auf fermentierbaren Substraten und zwar deutlich langsamer als solche mit intakter Atmung. Wegen dieser phänotypischen Ausprägung spricht man auch von Petite-Mutanten. Im engeren Sinne sind darunter Zellen mit Defekten in der mitochondrialen DNA zu verstehen. Aber auch Veränderungen oder Ausfall kernkodierter mitochondrialer Proteine können diesen Phänotyp verursachen; zur Unterscheidung spricht man dann aber häufig von *pet*-Mutanten. Petite-Mutanten haben entweder ein reduziertes Mitochondriengenom (ρ^-) oder überhaupt kein Mitochondriengenom (ρ^0). Zellen mit mitochondrialem Wildtypgenom werden auch als ρ^+ -Zellen bezeichnet.

1.4 Der mitochondriale Transkriptionsapparat

Die Analyse des mitochondrialen Transkriptionsapparates ergab einige Besonderheiten. Er unterscheidet sich deutlich von dem des Kerngenoms und dem Genom von Bakterien. Während bei diesen Transkriptionsapparaten die Polymerasen aus mehreren Untereinheiten aufgebaut sind, bestehen die mitochondrialen RNA-Polymerasen nur aus einem Protein (Single-subunit-Polymerasen). Vergleicht man den Aufbau der mitochondrialen RNA-Polymerasen verschiedener Spezies, so bietet sich einem – im Gegensatz zu den mitochondrialen Promotor-Strukturen – ein überraschend einheitliches Bild. Alle Core-Enzyme ähneln denen der Phagen T7, SP6 und T3. Man spricht deshalb auch von RNA-Polymerasen des Phagentyps T7/SP6. Sie besitzen stark konservierte zentrale Domänen, aber auch variable aminoterminalen Bereiche.

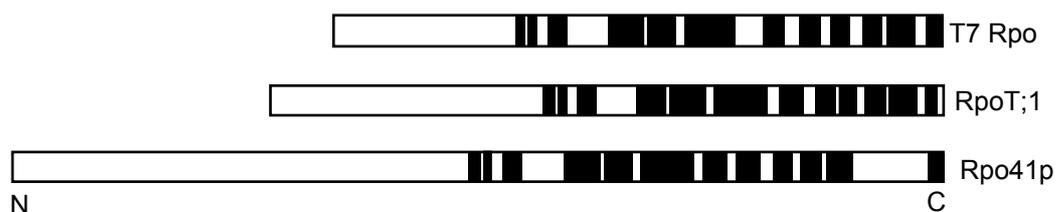


Abb. 1.3: Schema der mitochondrialen RNA-Polymerasen von Hefe und *Arabidopsis* im Vergleich zur RNA-Polymerase des Phagen T7.

Die zwölf schwarz eingezeichneten Flächen stellen konservierte Domänen dar. Auffallend ist die sehr lange N-terminale Erweiterung und der nicht konservierte Bereich zwischen den beiden letzten konservierten Domänen der Hefe-Polymerase (Rpo41p). Die pflanzliche Polymerase (RpoT;1) ist gegenüber der T7-Polymerase in Länge und Aufteilung der Domänen weniger verändert.

Bei den Phagentyp-RNA-Polymerasen kann man im zentralen Bereich bis zu zwölf konservierte Domänen definieren (Hedtke 1999, s. Abb. 1.3). Vier Strukturmodule wurden ebenfalls in allen bisher untersuchten Phagentyp-RNA-Polymerasen festgestellt (Delarue *et al.*). Diese konservierten Bereiche tragen alle katalytischen Domänen der Polymerase und dienen zum größten Teil der Bindung an den DNA-Strang. Im Gegensatz dazu zeigen die Aminotermini und zum Teil auch die Carboxytermini sehr hohe Variationen sowohl in der Länge als auch in der Proteinsequenz. Eine Besonderheit ist die ungewöhnlich große N-terminale Extension bei der Hefe (400 AS). Die Variationen der Amino- und Carboxytermini werden für die hohe Spezifität dieser Enzyme verantwortlich gemacht (Jan *et al.* 1999). Da das Enzym alleine nicht in der Lage ist, eine spezifische Transkription von den mitochondrialen Promotoren zu starten, wird für alle Organismen mindestens ein weiterer Zusatzfaktor postuliert (Bogehagen 1996).

Am besten untersucht ist der mitochondriale Transkriptionsapparat bei der Hefe; hier sind an der Transkription mindestens drei Proteine beteiligt (s. Abb. 1.4). Die eigentliche Transkription geschieht durch das Core-Enzym Rpo41p (145 kDa). Hinzu kommt ein Spezifitätsfaktor zur Initiation der Transkription mit einer Größe von 40 kDa (Mtf1p oder sc-mtTFB, Schinkel *et al.* 1987, Lisowsky und Michaelis 1988) sowie ein 19 kDa großer Faktor zur Verstärkung der Transkription (Abf2p oder sc-mtTFA). Weiter wird das Protein Mtf2p (auch Nam1p) als mit Rpo41p assoziiertes Protein diskutiert (Lisowsky und Michaelis 1989, Rodeheffer *et al.* 2001). Rpo41p und Mtf1p bilden in Lösung ein Holoenzym (Mangus *et al.* 1994, Cliften *et al.* 1997), die Funktion von Abf2p ist noch nicht hinreichend erforscht. Ihm werden jedoch auf Grund von Sequenzhomologien zu HMG-Proteinen DNA-beugende und Entwindungseigenschaften zugeschrieben (Fisher *et al.* 1991, 1992). Alle Proteine werden im Kern kodiert, müssen folglich in die Mitochondrien

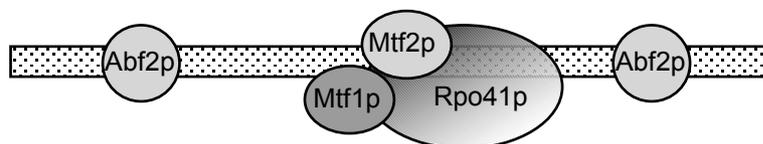


Abb. 1.4: Schema des mitochondrialen Transkriptionsapparates der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Die aktive RNA-Polymerase wird durch die beiden Proteine Mtf1p und Rpo41p gebildet. Dieses sogenannte Holoenzym erkennt spezifisch die mitochondrialen Promotoren. Nachdem die Transkription initiiert wurde, dissoziiert der Spezifitätsfaktor Mtf1p vom Core-Enzym Rpo41p. Die Funktion des Faktors Abf2p ist nicht hinreichend geklärt; ihm werden DNA-beugende und entwindende Eigenschaften zugeschrieben. Als zusätzlicher, an Rpo41p bindender Faktor wird Mtf2p (Nam1p) diskutiert.

importiert werden. Disruptionen dieser Gene führen jeweils nicht nur zum Verlust der mitochondrialen Transkription, sondern auch zum Verlust der gesamten mitochondrialen DNA (Greenleaf *et al.* 1986, Lisowsky und Michaelis 1988, Diffley und Stillman 1991).

Das Core-Enzym vom Phagentyp SP6/T7 findet man in fast allen untersuchten Eukaryonten. Homologe Spezifitätsfaktoren hingegen wurden in anderen Spezies bis jetzt kaum gefunden. Zwar findet man Abf2p-Homologe bei Mensch (Parisi und Clayton 1991) und Maus (Larsson *et al.* 1996), jedoch haben sie hier einen stärkeren Einfluss auf die Spezifität der Transkription (Parisi *et al.* 1993, Dairaghi *et al.* 1995). Zu Mtf1p konnten erst drei homologe Proteine gefunden werden und zwar bei den nahe verwandten Hefen *Saccharomyces douglasii* (94 % Identität der DNA-Sequenz, Stein 1998), *Saccharomyces kluyveri* (56 %) und *Kluyveromyces lactis* (40 %, Carrodegua *et al.* 1996). *S. cerevisiae* und *S. douglasii* lassen sich noch miteinander kreuzen, nach einer Sporulation entstehen aber sterile Nachkommen ohne Atmungsfähigkeit (Herbert *et al.* 1988).

1.5 Die Replikation des Mitochondriengenoms

Die DNA-Replikation kann grundsätzlich nicht *de novo* durch eine DNA-Polymerase alleine begonnen werden. Zunächst muss am Replikationsstartpunkt ein Stück RNA (Primer) synthetisiert werden. Es entsteht ein kurzer DNA-RNA-Doppelstrang mit einem freien 3'-OH-Ende. Von diesem hybriden Doppelstrang sind die DNA-Polymerasen in der Lage, die Replikation zu starten, indem zwischen freiem 3'-OH-Ende und erster Phosphatgruppe des Nukleotids unter Abspaltung von Diphosphat eine Bindung geknüpft wird.

Die Replikation des Mitochondriengenoms ist bei Säugetieren schon recht gut untersucht (für einen Überblick siehe Lecrenier und Foury, 2000). Für jeden der beiden DNA-Stränge gibt es jeweils einen Replikationsstartpunkt. Der benötigte RNA-Primer wird vermutlich durch die RNA-Polymerase h-mtRPOL (schwerer Strang, Xu und Clayton 1995, 1996) bzw. einer Primase (leichter Strang, Wong und Clayton 1985) synthetisiert. Die Replikation erfolgt dann durch die DNA-Polymerase γ (Wernette und Kaguni 1986, Foury und Vanderstraeten 1992, Gray und Wong 1992, Graves *et al.* 1998).

Im Gegensatz zu den Säugetieren gibt es in der Hefe je nach Stamm sieben oder acht potenzielle Replikationsstartpunkte, von denen aber wohl nur drei oder vier von der mitochondrialen DNA-Polymerase Mip1p benutzt werden. Hier beginnt sowohl die Synthese des kodierenden als auch die des Gegenstranges; die Replikation verläuft also bidirektional (Baldacci *et al.* 1984). Auch bei der Hefe ist normalerweise ein RNA-Primer für die Replikation notwendig. Auf dem kodierenden Strang gibt es vor jedem Replikationsstartpunkt (ori) einen Promotor für die mitochondriale RNA-Polymerase Rpo41p, sodass

diese sehr wahrscheinlich die Primersynthese bewerkstelligt (Xu und Clayton 1995, 1996). Auf dem Gegenstrang gibt es keine Promotoren für Rpo41p, deshalb wird hier für die Synthese der RNA-Primer eine Primase postuliert (Baldacci *et al.* 1984).

Die Replikation der mitochondrialen DNA in der Hefe ist weit weniger verstanden als bei den Säugetieren, denn die Hefe hat alternative Replikationsverfahren entwickelt, die anscheinend ohne RNA-Primer auskommen und zu den so genannten rho⁻-Genomen führen. Diese Genome setzen sich aus repetitiven Sequenzen – manchmal in Tandemanordnung – von ca. 35 bis einige hundert Basenpaare pro Einheit zusammen. Die rho⁻-Genome sind meistens etwa genauso groß wie das intakte Mitochondriengenom.

1.6 *Arabidopsis thaliana* als Modellpflanze

Der im Deutschen „Ackerschmalband“ genannte Kreuzblütler *Arabidopsis thaliana* ist auf Grund seiner einfachen Anzucht, der schnellen Generationenfolge und des relativ kleinen Kerngenoms das Modellsystem der Pflanzengenetik geworden. Da hier zuerst das 367 kb große mitochondriale Genom einer höheren Pflanze vollständig sequenziert vorlag (Unsold *et al.* 1997), spielt *Arabidopsis* auch für die Erforschung der Mitochondrien-Biogenese eine entscheidende Rolle. Die ersten pflanzlichen Phagentyp-RNA-Polymerasen konnten ebenfalls bei *Arabidopsis* identifiziert werden und zwar eine in den Mitochondrien (RpoT;1) und eine in den Plastiden lokalisiert (RpoT;3, Hedtke *et al.* 1997). Eine dritte Phagentyp-RNA-Polymerase kommt sowohl in den Mitochondrien als auch in den Plastiden vor (RpoT;2, Hedtke *et al.* 2001). Es ist also anzunehmen, dass das mitochondriale Genom zumindest bei *Arabidopsis* von zwei unterschiedlichen RNA-Polymerasen transkribiert wird bzw. dass es eine universelle Organellen-RNA-Polymerase des Phagentyps bei Pflanzen gibt.

1.7 Die Transkription in den Plastiden

Die Plastiden sind wie die Mitochondrien semiautonome Zellorganellen mit einem eigenen Genom. Man unterscheidet zwischen Chloroplasten, Etioplasten als eine Sonderform der Chloroplasten, Amyloplasten, Leukoplasten und Chromoplasten. Alle Plastiden differenzieren sich aus den so genannten Proplastiden in Abhängigkeit von Umwelteinflüssen wie z. B. Licht und entwicklungspezifischen Signalen der Pflanze (Kirk und Tilney-Bassett 1978).

Der Transkriptionsapparat der Plastiden stellt eine Besonderheit dar: Es existieren zwei unterschiedliche Systeme, kodiert in verschiedenen genetischen Kompartimenten. Die bereits erwähnten Phagentyp-RNA-Polymerasen werden allesamt im Kern kodiert (*nuclear encoded polymerases, NEP*). Das zweite System wird in den Plastiden selbst kodiert

(*plastom encoded polymerases, PEP*) und zeigt starke Homologien zum eubakteriellen Core-Enzym mit seinen Untereinheiten α_2 , β und β' (Cozens und Walker 1986, Sijben-Müller *et al.* 1986, Hu und Bogorad 1990, Igloi und Kössel 1992). Nach der Sequenzierung einiger Plastidengenome konnten die entsprechenden Gene *rpoA*, *rpoB*, *rpoC1* und *rpoC2* identifiziert werden (Shinozaki *et al.* 1986, Whittier und Sugiura 1992). Weiterhin zeigte sich, dass viele Gene bzw. polycistronische Transkriptionseinheiten in ihrem 5'-Bereich konservierte Promotor-Sequenzen besitzen, welche ebenfalls sehr an eubakterielle Promotor-Sequenzen erinnern. Diese Sequenzen werden bei den Bakterien durch die so genannten Sigma-Faktoren (σ^{70}) erkannt, welche zusammen mit den Untereinheiten des Core-Enzyms das Holoenzym bilden. Auch bei *Arabidopsis* und anderen Pflanzen konnten Gene für Sigma-Faktoren identifiziert werden. Sie sind im Kern kodiert und müssen folglich in die Plastiden importiert werden. Bei zweien (SIG2 und SIG3) konnte *in vivo* als Zielorte die Plastiden nachgewiesen werden (Isono *et al.* 1997, Tanaka *et al.* 1997). Interessanterweise kann man zwischen lichtunabhängigen und lichtinduzierten Sigma-Faktoren unterscheiden. In Transkriptionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die Bakterientyp-RNA-Polymerase besonders bei der Transkription der Photosynthesegene mitwirkt (Hajdukiewicz *et al.* 1997). Des Weiteren wurde noch eine andere Klasse von Promotoren entdeckt, die vermutlich durch die Phagentyp-RNA-Polymerasen erkannt wird. Ihnen wird eine Aktivität während der frühen Plastidenentwicklung zugeschrieben, insbesondere für die Transkription der plastidären Transkriptions- und Translationsmaschinerie (Mullet 1993, Stern *et al.* 1997).

1.8 Problemstellung

Die Funktion der mitochondrialen RNA-Polymerase beruht zum einen auf intramolekulare Wechselwirkungen, zum anderen auf Wechselwirkungen zwischen Core-Enzym, Spezifitätsfaktoren und DNA. Die Spezifitätsfaktoren erkennen gemeinsam mit dem Core-Enzym spezifisch die DNA-Sequenz des Promotors und initiieren dort die Transkription. Um mehr über die Transkriptionsmaschinerie und die Regulation der Transkription zu erfahren, ist es deshalb wichtig, diese Spezifitätsfaktoren zu identifizieren. Versuche, mittels vergleichender Computeranalysen weitere Faktoren in Gen-Datenbanken aufzuspüren, sind aber fehlgeschlagen. Die Evolution der mitochondrialen Transkriptionsmaschinerie in den einzelnen Spezies ist anscheinend sehr isoliert verlaufen.

Auch bei Pflanzen konnten die ersten mitochondrialen und plastidären RNA-Polymerasen vom Bakteriophageotyp identifiziert werden (Hedtke *et al.* 1997, Weihe *et al.* 1997, Hedtke *et al.* 2001), sodass man von einem universellen Core-Enzym-System für die

mitochondriale und plastidäre Transkription bei allen Eukaryonten ausgehen kann. Da die Initiation der Transkription auf Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Core-Enzym und Spezifitätsfaktor beruht, bietet sich zur Suche der unbekannt Arabidopsis-Faktoren das gut etablierte Dihybridsystem in der Hefe an.

Für Experimente zur Charakterisierung der mitochondrialen Core-Enzyme bietet sich die Hefe wegen ihrer fakultativ anaeroben Lebensweise ebenfalls als Modellorganismus an. So konnte in vorangegangenen Arbeiten (Stein 1998) mit Hefe gezeigt werden, dass die Core-Enzyme spezifisch an die jeweilige Spezies angepasst sind: Die Funktion der Hefe-RNA-Polymerase kann nicht durch die mitochondriale RNA-Polymerase von *Arabidopsis* ersetzt werden. Weite Teile des C-Terminus der Phagentyp-RNA-Polymerasen sind hoch konserviert. Trotzdem konnten auch erste chimäre Enzyme mit N-terminalen Sequenzen aus Hefe und C-terminalen Sequenzen aus *Arabidopsis* das Hefe-Enzym nicht ersetzen. Da es zwischen den letzten beiden konservierten Domänen im Hefe-Enzym einen größeren nicht konservierten Bereich gibt, soll in dieser Arbeit durch stufenweises Austauschen homologer Sequenzen aus dem hoch konservierten Mittelbereich der Frage nachgegangen werden, ob es einen speziesunspezifischen Bereich in den Phagentyp-RNA-Polymerasen gibt.

Die konkreten Aufgaben dieser Doktorarbeit zur Funktionsanalyse des mitochondrialen Transkriptionsapparates *in vivo* bestand deshalb in den folgenden Punkten:

- a) Aufbau eines neuen Dihybridsystems in der Hefe für die Suche nach möglichen Zusatzfaktoren in *Arabidopsis*
- b) Herstellung chimärer RNA-Polymerase-Konstrukte aus Hefe und *Arabidopsis* zu funktionellen Komplementationsstudien

2. Material

2.1 Chemikalien, Nährstoffe

Acrylamid/Bisacrylamidlösung.	Roth, Karlsruhe
Adenin	Merck, Darmstadt
Agarose	Gibco BRL, Bethesda (USA)
3-Amino-1,2,4-triazol	Sigma, St. Louis (USA)
Äthanol	Riedel-deHaën, Seelze
Äthylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Bacto [®] Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto [®] Peptone	Difco, Detroit (USA)
Bacto [®] Tryptone	Difco, Detroit (USA)
Bind-Silan [®]	Pharmacia Biotech, Upsala (S)
Bis-Benzimid	Riedel-deHaën, Seelze
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Janssen, Beerse (B)
2-Butanol	Acros, Geel (B)
Cäsiumchlorid	BRL, Bethesda (USA)
Coomassie Brillant Blue G259	Serva, Heidelberg
CSPD [®]	Serva, Heidelberg
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Merck, Heidelberg
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Riedel-deHaën, Seelze
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Baker, Deventer (NL)
Ethidiumbromid	Biorad, Hercules (USA)
Ficoll	Pharmacia Biotech, Upsala (S)
Gel Slick [®]	Serva, Heidelberg
Glukose	Caesar & Lorenz, Hilden
Glycerin	Baker, Deventer (NL)
Guanidiniumhydrochlorid (GuHCl)	Boehringer, Ingelheim
Heringsspermien-DNA	Roche, Mannheim
Histidin	Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Gibco BRL, Paisley (GB)
I-Block [®]	Serva, Heidelberg

iso-Amylalkohol	Riedel-deHaën, Seelze
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	Acros, Geel (B)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Baker, Deventer (NL)
Leucin	Merck, Darmstadt
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck, Darmstadt
Lysin	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver "Glücksklee"	Nestlé S. A., Vevey (CH)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, Darmstadt
Maltose	Merck, Darmstadt
Mannit	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoäthanol	Roth, Karlsruhe
Methionin	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Grüssing, Filsum
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel-deHaën, Seelze
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Baker, Deventer (NL)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, St. Louis (USA)
Natriumthiosulfat	Fluka, Buchs (CH)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Phenol	Roth, Karlsruhe
Polyäthylenglykol 4000 (PEG)	Serva, Heidelberg
Poly-L-Lysin	Serva, Heidelberg
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Sigma, St. Louis (USA)
Ponceau S	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Riedel-deHaën, Seelze
Sarkosyl	Sigma, St. Louis (USA)
Sorbitol	Roth, Karlsruhe
<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylenäthylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Sigma, St. Louis (USA)
Tween 20	Fluka, Buchs (CH)
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trichlormethan	Baker, Deventer (NL)
Threonin	Riedel-deHaën, Seelze

Tryptophan	Roth, Karlsruhe
Tyrosin	Merck, Darmstadt
Uracil	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Janssen, Berse (B)
Yeast Nitrogen Base [®]	Difco, Detroit (USA)

2.2 Enzyme

DNase I	Roche, Mannheim
Proteinase K	Merck, Darmstadt
RNase	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, Wilna (LIT) und Boehringer, Mannheim
Taq [®] -Polymerase	MBI Fermentas, Wilna (LIT)
Zymolyase 20T	ICN Biomedicals, Aurora (USA)

2.3 Antikörper

Anti-Rpo41p aus Kaninchen, Verdünnung 1:5000
 Anti-Kaninchen, Peroxidase-Aktivität, Verdünnung 1:10000, Boehringer, Mannheim

2.4 Sonstige Materialien und Geräte

Blotmembran	Schleicher und Schuell, Dassel
Filterpapier	Whatman, Maidstone (GB)
Fluoreszenzmikroskop	Leica DM LB
Glasperlen	Grüssing, Filsum
Homogenisator	Braun Melsungen AG
Kühlzentrifuge	Sigma 202 MK
Mikromanipulator	Ch. Beaudouin, Paris (F)
Mikroskop	Leitz
Photometer	Zeiss PM2A
Refraktometer	Carl Zeiss
Röntgenfilm X-Omat AR	Kodak, Rochester (USA)
Tischzentrifuge 1	Beckman Microfuge [®] Lite
Tischzentrifuge 2	Heraeus Biofuge 13
Ultrazentrifuge	Beckman L7-55
Zentrifuge	Sorvall RC-5B

2.5 Puffer

Sörensenpuffer:

400 mM KH_2PO_4 und 100 mM Na_2HPO_4 , pH 6,2

TE-Puffer:

10 mM Tris und 1 mM EDTA, pH 8,0

Ringer-Lösung:

2 g NaCl und 2 g KCl pro Liter

2.6 Medien

Alle Medien wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt und vor Gebrauch autoklaviert. Platten wurden unter Zufügung von 2,3 % (Hefe) bzw. 1,5 % (*E. coli*) Agar hergestellt.

2.6.1 Hefemedien

YPGc-Medium: 2 % Glukose, 1 % Hefeextrakt, 1 % Bacto-Pepton[®], 0,02 % Adenin, je 0,005 % Threonin, Tryptophan und Uracil.

Minimalmedium: 2 % Glukose, 0,67 % Yeast Nitrogen Base[®], 5 % Sörensen-Puffer, gegebenenfalls der Verwendung entsprechend angereichert mit 0,005% der benötigten Aminosäuren und Uracil und 0,02 % Adenin.

Glycerin-Medium: 2 % Glycerin, 1 % Hefeextrakt, 1 % Bacto-Pepton[®], 10 % Sörensenpuffer.

Sporulationsmedium: 1 % Kaliumacetat, 0,1 % Hefeextrakt, 0,05 % Glukose, gegebenenfalls der Verwendung entsprechend angereichert mit 0,005 % der benötigten Aminosäuren und Uracil und 0,02 % Adenin.

2.6.2 E.-coli-Medien

LB-Medium: 1 % Bacto-Trypton[®], 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Natriumchlorid, 100 mg/l Ampicillin (nach dem Autoklavieren).

M9-Medium: 1,2 % $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,3 % KH_2PO_4 , 0,05 % NaCl, 0,1 % NH_4Cl , 0,4 % Glukose, 0,004 % Prolin und Tryptophan, 0,034 % Thiamin · HCl, 0,005 % Ampicillin.

X-Gal-Indikatorplatten: Zusammensetzung wie LB/Amp-Platten mit Zugabe von 40 mg X-Gal in 2 ml Dimethylformamid und 48 mg IPTG in 2 ml Wasser pro Liter Lösung.

2.7 Hefestämme

JRY: 1n, Mat α , *his4*, *leu2*, *ura3* (Jasper Rine, unveröffentlicht)

Hsrp1: 1n, Mat a, *his1*, *leu2*, *trp2*, *ura3*, *rpo41::Tn10::URA3*, r0m (Fangman, unveröffentlicht)

FY1679-18B: 1n, Mat α , *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3* (Winston *et al.* 1995)

DW318-7A: 1n, Mat α , *his1*, *leu2*, *trp1*, *ura3*, *rpo41::Tn10::URA3*, r0m (diese Arbeit)

DW318-7D: 1n, Mat a, *his3*, *leu2*, *trp1*, *ura3* (diese Arbeit)

DW318: 2n, Mat a/Mat α , *his1/HIS1*, *his3/HIS3*, *leu2/leu2*, *trp1/trp1*, *ura3/ura3*, *rpo41::Tn10::URA3/RPO41* (diese Arbeit)

PJ69-4A: 1n, Mat a, *trp1*, *leu2*, *ura3*, *his3*, *gal4D*, *gal80D*, *GAL2-ADE2 (::ade2)*, *LYS2::GAL1-HIS3*, *met2::GAL7-lacZ*

Y 187: 1n, Mat α , *his3*, *leu2*, *met*, *trp1*, *ura3/URA3::GAL1UAS – GAL1 lacZ*, *ade2*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ*

YM4271: Mat a, *ura3*, *his3*, *ade2*, *lys2*, *leu2*, *trp1*, *tyr1*, *gal4- Δ 512*, *gal80- Δ 538*, *ade5::hisG* (Liu *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1991).

2.8 E.-coli-Stämme

RR1 Δ M15: *fhsd 320(r_B⁻, m_B⁻)*, *recA⁺*, *ara-14*, *pro A2*, *lac I^qZ*, Δ M15, *gal K2*, *rspL20*, *str^R*, *xy1-5*, *mtl-1*, *supE44*, Λ mbd⁻ (Bolivar *et al.* 1977)

DH5 α : F⁻ *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17(r_k⁻, m_k⁻)*, *supE44*, *lac I^qZ*, Δ M15, *galK2* (Hanahan 1983)

SCS 110: *rpsL (StrR)*, *thr*, *leu*, *endA*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supE44*, *_(lac-proAB)*, [F⁻, *tra D36*, *proAB*, *lacIyZ*, *_m15*] (Stratagene, 1997)

JA 221: *hsdM⁺*, *hsdR⁻*, *lacY*, *leuB6*, Δ *trpE5*, *recA1*

2.9 Plasmide

pA112: P_{ADH1}, MCS (*EcoRI*, *NotI*, *BamHI*), T_{ADH1}, 2 μ ori, TRP1, Amp^r

pACT: P_{CMV (I-E)}, P_{T7}, nukl. Lok.-Seq., VP16 Fus.-Prot., MCS (*BamHI*, *SalI*, *AccI*, *MluI*, *EcoRV*, *XbaI*, *BstZI*, *NotI*, *Acc65I*, *KpnI*) f1 ori, P_{SV40 (E)}, neo, syn. Poly-A-Sign., Amp^r

pGAD 10: P_{ADH1}, GAL4 AD, MCS (*BglII*, *XhoI*, *BamHI*, *EcoRI*, *BglII*), T_{ADH1}, LEU2, Col E1 ori, Amp^r, 2 μ ori (6,65 kb)

pGBT 9: P_{ADH1}, GAL4 BD, MCS (*EcoRI*, *SmaI*, *BamHI*, *SalI*, *PstI*), T_{ADH1}, TRP1, Col E1 ori, Amp^r, 2 μ ori (5,5 kb)

pGEM-T: f1 ori, *lacZ* (P_{T7}, 3' T->3' T, P_{SP6}), ori, Amp^r

pHISi-1: MCS (*EcoRI*, *SmaI*, *SacI*, *MluI*, *SacII*, *XbaI*), P_{minHIS3}, HIS3, T_{minHIS3}, Col E1 ori, Amp^r

pUC19: Amp^r, lacZ, MCS (*EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*), Col E1 ori (2,7 kb)

YEp351: Amp^r, 2 μ ori, LEU2, lacZ, MCS (*EcoRI*, *SacI*, *KpnI*, *SmaI*, *BamHI*, *XbaI*, *Sall*, *PstI*, *SphI*, *HindIII*), Col E1 ori

2.10 Primer

<u>Sequenz:</u>	<u>Name:</u>
GACACATATGCCAAAATTTTGAAGGATAAGAT	NdeI-RPO41
AAACCCGGGAAAGGAAATGGCTCCGCTGCTACC.....	RPO41-ENDE (<i>SmaI</i>)
TTGTGATCAAGGTGGATATCATTATACAC	BclI-RPO41
AAACTCGAGATTGCAAGAGCATTTTTGGG.....	XhoI-RPO41
TAAGCCGGCAGATGTTTATGCTCATGTTG.....	NgoMI-RPO41
CCCGAATTCATGCTGAGACCGGCCTATAAATCGCTC-	
-GTGAAAACATCCCTGTTACAAAGACGGTTAAATCTT-	
-CAAAGGGATCTAAGTTAACGGGAGATCGTTGGTGG.....	p-D6-RPO41- <i>EcoRI</i>
CCCGGATCCAAAGGAAATGGCTCCGCTGCTACC.....	r-RPO41- <i>BamHI</i>
CCCCGAATTCGTTGATAGGTATTCCCCCGCT	cox1
CCCCTCTAGACATAAATTTGAGATTCTTTTCG	cox1rev
CCCCTCTAGATTCGTGCCTCAAGACTCTGCC	cox2
CCCCTCTAGACATTTTCAAAGCAAAGGTTCC	cox2rev
CCCCGAATTCGACGATTAACAAAGTGTTTAG	cox3
CCCCTCTAGACATAAACCACTTTGTCTCGGT	cox3rev

3. Methoden

3.1 Gelelektrophorese

3.1.1 Agarosegele

Es wurden 0,8–1%ige Mini-Gele (in 20 ml TBE-Puffer) zur DNA-Analyse benutzt. Den Gelen wurde entweder 9 μg Ethidiumbromid zugegeben oder die Gele wurden nach dem Lauf in 50 ml Ethidiumbromidlösung (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gefärbt. Der Lauf erfolgte bei einer Spannung von 80–100 V (ca. 40–60 mA) für ca. 1 h in TBE-Puffer. Aufgetragen wurden i. d. R. 10 μl DNA-Lösung mit 2 μl Probenauftragspuffer.

Probenauftragspuffer:

5 mM EDTA, 0,1 % SDS, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol, 50 % Glycerin

TBE-Puffer:

100 mM Tris, 83 mM Borsäure und 1 mM EDTA, pH 8,3

3.1.2 Polyacrylamidgel für die Sequenzierung

Glasplattenbehandlung:

Die Glasplatten wurden zunächst mit Alkohol gesäubert, dann wurde die Hälfte einer Lösung aus

12 ml Äthanol p. a.

370 μl Essigsäure 10%ig und

37,5 μl Bind-Silan[®] auf die Platte, an der das Gel haften soll, gegeben und gut verrieben. Nach dem Antrocknen wurde der Rest der Lösung aufgetragen und erneut verrieben. Nach dem erneuten Antrocknen wurde die Glasplatte so lange poliert, bis alle Schlieren verschwunden waren. Die Gegenplatte wurde mit Gel Slick[®] behandelt, um ein Anhaften des Gels zu vermeiden.

Zusammensetzung des Gels:

30 g Harnstoff

20 ml Wasser

15 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 30%ig

3 ml TBE-Puffer 10X (1 M Tris, 830 mM H_3BO_3 und 10 mM EDTA, pH 7,3)

=> man erhält 60 ml Lösung, welche filtriert und entgast wird

1 Spatelspitze Ammoniumpersulfat

15 μl TEMED

Gelgießen:

Nach Zugabe von Ammoniumpersulfat und TEMED wird die Lösung zur Durchmischung geschwenkt und dann auf die genau waagerechte, vorbehandelte Glasplatte gegossen. Die Gegenplatte wird vorsichtig aufgelegt, so dass sich die Gel-Lösung langsam und luftblasenfrei über die ganze Platte verteilt. Die Glasplatten werden verklammert und der Kamm wird eingesetzt. Im Bereich des Kammes wird die Glasplatte mit mindestens 1 kg beschwert, um Luftblasen zu vermeiden.

3.1.3 Verwendung von Polyacrylamid-Fertiggelen

Zur Auftrennung von Proteinen wurden Fertiggele und Apparaturen der Firma Invitrogen verwendet. Es handelte sich dabei um Bis-Tris-HCl gepufferte Polyacrylamidgel mit einer Konzentration von 4–12 %. Die Gele wurden nach Vorschrift des Herstellers verwendet. Die Laufzeit betrug zwischen 40 und 60 min.

3.2 Coomassie-Blue-Färbung

Diese Färbemethode (Neuhoff *et al.*, 1985) hat den Vorteil, quantitativ zu sein und eignet sich daher auch zur Konzentrationsabschätzung von Proteinlösungen. Die Färbung wird unter ständigem Schwenken des Gels durchgeführt:

- Fixierung mit einer Lösung aus 25 % 2-Propanol und 10 % Essigsäure für 1 h
- Färbung mit einer Lösung aus 10 % Essigsäure und 0,006 % Coomassie Brilliant Blue G-250 für 2 h oder über Nacht
- Entfärben mit 10%iger Essigsäure für mindestens 2 h, unter Umständen die Lösung erneuern

3.3 Elektrotransfer von Proteinen (*Westernblotting*) und Antikörpernachweis

Durch Antikörper-Reaktionen können sehr spezifisch und empfindlich einzelne Proteine nachgewiesen werden. Hierzu werden die Proteine durch ein erneutes Anlegen eines elektrischen Feldes in einer Blotapparatur vom Gel auf eine Membran transferiert (“blotten”). Durch Inkubation der Membran mit spezifischen Antikörpern wird das gewünschte Protein markiert. Es folgt eine Inkubation mit einem Nachweisantikörper, der die vorhergehenden Antikörper spezifisch erkennt und mit einer enzymatischen Aktivität gekoppelt ist. Durch nachfolgende Inkubation mit speziellen Chemikalien wird eine Chemolumineszenz-Reaktion ausgelöst, so dass durch anschließende Belichtung eines Röntgenfilms die Proteinbanden sichtbar werden. Für das Western-Blotting werden folgende Schritte ausgeführt:

- Das zu blottende Gel wird vorschriftsmäßig in die Blotkammer der Firma Invitrogen eingebaut und nach Vorschrift des Herstellers geblottet. Mit einer Spannung von 20 V bei einer Stromstärke von ca. 150 mA werden die Proteine in ca. 2 h auf die Membran transferiert

- Die Membran wird zur Kontrolle der Proteinkonzentration mit Ponceau S gefärbt: ca. 10 min schüttelnd in 100 ml einer wässrigen Lösung aus 2 g Ponceau S, 30 g Trichloressigsäure und 30 g Sulfosalicylsäure inkubieren, ggf. fotografieren, danach mit PBST-Puffer entfärben
- Inkubation der Membran in Blockierungspuffer für 2 h oder über Nacht, um die unspezifischen Protein-Bindestellen der Membran abzusättigen
- Waschen mit PBST-Puffer, einmal 5 min

Chemolumineszenz-Entwicklung (Western Light von Serva):

- Inkubation mit dem primären Antikörper für 2 h
- Waschen mit PBST-Puffer, dreimal 5 min
- Inkubation mit dem sekundären Antikörper gegen Kaninchen mit Alkalische-Phosphatase-Aktivität für 2 h
- Waschen mit PBST-Puffer, dreimal 5 min
- Inkubation in Assay-Puffer für zweimal 2 min
- 3 ml CSPD®-Lösung und 150 μ l Nitro Block® mischen und auf die Membran geben. 5 min im Dunkeln inkubieren
- Entfernen der Reaktionsflüssigkeiten von der Membran, Belichten, Entwickeln und Fixieren des Röntgenfilms

Lösungen:

PBST-Puffer: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, 0,1 Vol.% Tween 20, pH 7,3

Blockierungspuffer: 2 g/l I-Block (Serva), 40 g/l Magermilchpulver in PBST-Puffer

Assay-Puffer: 20 mM Tris und 1 mM MgCl₂, pH 9,6

3.4 Kapillartransfer von DNA und RNA auf eine Membran

3.4.1 *Southern Blot* – Transfer von DNA

Für Hybridisierungsreaktionen wird in Agarosegelen aufgetrennte DNA auf Zellulosemembranen transferiert. Hierbei wird die DNA mittels Kapillarkraft aus dem Gel gelöst und transferiert.

Folgende Schritte sind hierzu notwendig:

- Inkubation des Gels in 0,2 M Salzsäure für 10 min zur Fragmentierung der DNA.
- Inkubation in einer Lösung aus 1,5 M NaCl und 0,5 M Natronlauge für 10 min zur Denaturierung der DNA.
- Inkubation in einem Puffer aus 1 M Tris/HCl und 1,5 M NaCl, pH 8,0, für 20 min zum Neutralisieren.

- Transfer mit 20X SSC-Puffer (3 M NaCl und 0,3 M Natriumcitrat).

Blotaufbau:

Stapel aus ca. 10 cm saugfähigem Papier (z. B. Papierhandtücher)

2 Lagen Filterpapier (mit 20X SSC-Puffer vorinkubieren)

Zellulosemembran (in dest. Wasser und 20X SSC-Puffer vorinkubieren)

Agarosegel

2 Lagen Filterpapier (mit 20X SSC-Puffer befeuchtet)

4–6 zugeschnittene Schwammtücher (mit 20X SSC-Puffer befeuchtet)

Der ganze Aufbau wird mit ca. 200 g beschwert.

Durch die Papiertücher wird der Puffer per Kapillarkraft durch das Gel gesogen. Dabei wird die DNA auf die Membran transferiert. Der Transfer dauert mindestens 12 h. Anschließend wird die Membran zur kovalenten Bindung der DNA für 2 h bei 80 °C inkubiert.

3.4.2 Northern Blot – Transfer von RNA

Der Transfer von RNA auf eine Zellulosemembran erfolgt im Prinzip wie der Transfer von DNA. Das RNA-Gel wird aber ohne weitere Vorbehandlung nur für 2–3 min in 20X SSC-Puffer inkubiert und dann wie oben beschrieben geblottet. Nach dem Transfer erfolgt die kovalente Bindung an die Membran durch Inkubation bei 37 °C für 2 h.

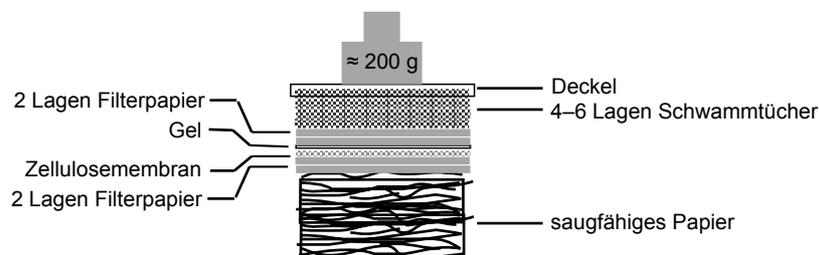


Abb. 3.1: Aufbau des Southernblots.

3.5 Hybridisierung von DNA und RNA mit radioaktiv markierten Sonden

3.5.1 Herstellung der Sonden

Radioaktiv markierte DNA-Sonden wurden nach der Random-Priming-Methode von Feinberg und Vogelstein (1983) hergestellt. Verwendung fand der Detektions-Kit der Firma Roche, Mannheim; die Herstellung der Sonden erfolgte nach deren Vorschrift.

3.5.2 Hybridisierungsreaktion

Für die Hybridisierungsreaktion werden die nachfolgenden Schritte ausgeführt:

- Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen werden die DNA- bzw. RNA-Filter für 2 h bei 42 °C in Hybridisierungslösung ohne Sonde inkubiert.
- Die denaturierte Sonden wird hinzugegeben und der Ansatz wird für ca. 16 h unter gleichbleibenden Bedingungen inkubiert.
- Die Filter werden mehrfach mit der Waschlösung 1 bei RT gewaschen.
- Die Filter werden bei 68 °C mehrfach mit Waschpuffer 2 gewaschen.
- Nach dem Trocknen werden die Filter mit einem Röntgenfilm belegt und bei –70 °C inkubiert

20X SSC-Lösung:

3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0

Hybridisierungslösung:

30 ml Formamid, entionisiert

15 ml 20X SSC

6 ml 1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄-Puffer, pH 7,0

0,6 ml Natriumpyrophosphat-Lsg. 10%ig

0,6 ml 100X Denhardt-Lsg.

6,6 ml Wasser

0,6 ml denaturierte Heringsspermien-DNA (20 mg/ml)

Denhardt-Lsg.:

2 % PVP

2 % BSA

2 % Ficoll

Waschpuffer 1:

1X SSC mit 0,1 % SDS

Waschpuffer 2

0,2X SSC mit 0,1 % SDS

3.6 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit dem T7-DNA-Polymerase-Sequenzierungskit der Firma Pharmacia und [³⁵S] dATP. Die Reaktion wurde nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Ein 5%iges Polyacrylamidgel mit 8 M Harnstoff wurde zur Auftrennung der synthetisierten DNA verwendet (s. 3.1.2). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer LKB-Apparatur mit 0,5X TBE-Puffer bei 2200 V, ca. 25 mA und einer Temperatur von 58 °C.

Das Gel wurde dann in 10 vol%iger Essigsäure für 10 min fixiert. Zur Entfernung des Harnstoffs wurde das Gel mit deionisiertem Wasser mindestens 10 min gespült. Nach dem Trocknen des Gels bei 75 °C wurde es mit einem Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR) für mindestens 2 Tage exponiert.

10X TBE-Puffer: 1 M Tris; 0,83 M Natriumborat; 10 mM EDTA, pH 8,3

3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur genauen Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurden Verdünnungen photometrisch bei einer Wellenlänge von 257 nm vermessen. Die DNA-Konzentration berechnet sich dann wie folgt:

$$c = E \cdot f \cdot \varepsilon^{-1} \cdot d^{-1}$$

c: Stoffmengenkonzentration der Desoxyribonukleotide [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]

f: Verdünnungsfaktor (dimensionslos)

E: Extinktion (Messgröße, dimensionslos)

ε : Extinktionskoeffizient für dsDNA bei 257 nm [$1,31 \cdot 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ l}$]

d: Schichtdicke der Küvette [1 cm]

Umrechnung in Massenkonzentration:

$$\beta = c \cdot M$$

β : Massenkonzentration der Desoxyribonukleotide [$\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$]

M: Molare Masse eines DNA-Basenpaares [$\approx 660 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$]

3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die DNA-Amplifikation durch PCR erfolgte mit der Taq[®]-Polymerase der Firma Boehringer. Die Zusammensetzung der Ansätze entsprach den Empfehlungen des Herstellers. Typischer Weise wurden 35 Hauptzyklen gefahren:

Denaturierung: 30 s bei 95 °C,

Annealing: 30 s bei 50–60 °C (je nach verwendetem Primer),

Synthese: 60–120 s bei 72 °C (je nach Länge der zu synthetisierenden Stränge).

Wenn die Primer sequenzfremde Nukleotide enthielten (z. B. um Schnittstellensequenzen einzubauen) wurden zunächst 2–3 zusätzliche Zyklen mit verminderter Annealing-Temperatur gefahren (40–50 °C). Im letzten Zyklus wurde i. d. R. die Synthesezeit auf 10 min verlängert, damit die Polymerase möglichst vollständig alle Stränge synthetisieren kann. Literatur: Innis *et al.* (1990): PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications.

PCR von Plasmiden aus ganzen Hefezellen:

Diese Methode dient der schnellen Amplifikation von cDNA aus Genbankplasmiden in Hefezellen. Etwas Zellmaterial wird mit einer Pipettenspitze abgenommen und in einem PCR-Reaktionsgefäß an der Wandung verteilt. Die Zellen werden nun für 90 s bei 600 W mit Mikrowellen aufgeschlossen. Danach werden 50 µl Wasser dazu gegeben, gut geschüttelt und kurz zentrifugiert. Vom Überstand werden 25 µl für eine PCR-Reaktion von 50 µl abgenommen.

3.9 DNA-Isolierung aus Agarosegelen durch das Dialyseverfahren

Die benötigte Anzahl autoklavierter und in Alkohol eingelegter Stücke Dialyseschlauch werden zunächst in Lauffpuffer für Agarosegele (TBE-Puffer) für wenigstens 10 min inkubiert. Nach der Auftrennung der DNA im Agarosegel werden die gewünschten Banden unter UV-Strahlung mit einem Skalpell ausgeschnitten. Jedes Agarosestückchen wird dann in ein Stück mit Puffer gefüllten Dialyseschlauch von geeigneter Größe gegeben. Mit Klammern werden die gefüllten Dialyseschläuche nun verschlossen, wobei darauf zu achten ist, dass sich möglichst wenig Puffer und keine Luftblasen im Schlauch befinden. Der Dialyseschlauch wird so in die Elektrophoresekammer gelegt, dass das an der Wandung anliegende Gelstück zum Minuspol zeigt. Nun wird für ca. eine halbe Stunde (je nach Breite des Gelstücks) eine Spannung von 80 V angelegt, so dass die DNA aus dem Gelstück in den Puffer des Dialyseschlauches läuft. Unter UV-Strahlung kann das Herauswandern der DNA verfolgt werden. Der DNA enthaltene Puffer des Dialyseschlauches wird entnommen und mit einer Mischung aus Phenol, Trichlormethan und iso-Amylalkohol im Verhältnis 25:24:1 extrahiert, die DNA wird wie unter 3.10 beschrieben gefällt.

3.10 DNA-Fällungen

DNA wurde entweder mit 0,7 Volumen 2-Propanol oder mit 2–3 Volumen Äthanol gefällt. Als Fällhilfe wurde vorher in der Regel 6 % (bez. Endvol.) 5 M Natriumacetat hinzugesetzt. Bei geringen Mengen DNA wurden zusätzlich 1–2 µl Glykogenlösung (20 mg/ml) zugesetzt; erfolgte die Fällung zudem mit Äthanol, so folgte eine 10- bis 20-minütige Inkubation bei –20 °C. Nach anschließender Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 13.000/min und 4 °C

für mind. 20 min wurde das DNA-Pellet mit 70vol.%igem Äthanol gewaschen und dann getrocknet. Je nach weiterem Verwendungszweck wurde die DNA in Wasser oder TE-Puffer gelöst.

3.11 Restriktionen

DNA-Restriktionen erfolgten unter den von den Herstellern der Restriktionsenzymen angegebenen Standardbedingungen. In der Regel wurden 1 μg DNA mit 2 U Enzym für 1–2 h behandelt.

3.12 Ligierungen

Die mit Restriktionsenzymen geschnittenen DNA-Fragmente wurden etwa im Stoffmengen-Verhältnis 1:3 (1 Teil Vektor, 3 Teile DNA-Fragmente) mit entsprechend geschnittenem Vektor in einem Restriktionsansatz inkubiert. In der Regel wurde ein Ansatz von 20 μl verwendet. Die Inkubationszeit betrug meistens 2 h bei RT oder über Nacht bei ca. 16 °C. Bei DNA ohne überhängende Enden wurde Ligationspuffer mit 50 Vol.% PEG verwendet (Endkonzentration 10 %), es wurde dann bei RT für 3–6 h inkubiert.

3.13 Isolierung von Mitochondrien-DNA aus Hefe

- Animpfen

Etwas Zellmaterial in 20 ml Minimalmedium animpfen. Zwei Tage bei 28 °C wachsen lassen.

- Umimpfen

Die gewachsene Kultur wird in 1 l Minimalmedium überimpft und weitere 2 Tage bei 28 °C inkubiert.

- Zellernte

Die Kultur wird im GSA-Rotor bei 8000/min für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Pellets in insgesamt 200 ml NaCl/KCl-Lösung (Ringer-Lösung) resuspendiert und in einem GSA-Becher vereinigt. Es folgt eine erneute Zentrifugation bei 8000/min für 5 min. Der Überstand wird verworfen, das Pellet ausgewogen.

- Zellwand-Lyse

Das eben gewonnene Pellet wird in 100 ml Isolationspuffer resuspendiert. Hinzugegeben werden 1 mg Zymolyase pro 1 g Rohmasse Hefezellen. Die Zellsuspension wird für 1 h bei 37 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

- Zell-Lyse

Zum Ansatz wird 100 ml Lysispuffer hinzugefügt und für 1 h bei 65 °C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert.

- Fällung

Der Ansatz wird für 15 min in Eiswasser gegeben. Anschließend wird 50 ml Natriumacetat-Lösung (5 M) hinzugegeben, gut geschüttelt und für 45 min in Eiswasser inkubiert. Hierbei fallen viele Zellbestandteile (hauptsächlich Proteine) und SDS aus.

- Zentrifugation 1

Der Ansatz wird geteilt und für 10 min bei 8000/min und 10 °C zentrifugiert. Die klaren Überstände werden in neue GSA-Becher überführt, die Pellets werden verworfen.

- DNA-Fällung

Zu den Ansätzen werden je 50 ml 2-Propanol gegeben. Hierbei fällt die DNA und auch ein großer Teil des Salzes aus.

- Zentrifugation 2

Die Ansätze werden im GSA-Rotor für 20 min bei 10.000/min und 10 °C zentrifugiert. Die Überstände werden verworfen, die Pellets zweimal mit je 50 ml Äthanol 70%ig gewaschen (Zentrifugation wie oben).

- Lösen der DNA

Die Pellets werden im Vakuum getrocknet und dann in insgesamt 15 ml TE-Puffer resuspendiert (Pellets vereinigen und über Nacht lösen, mindestens jedoch vier Stunden). Die DNA löst sich im Puffer, der größte Teil der Salze bleibt ungelöst.

- Zentrifugation 3

Der Ansatz wird in ein SS 34-Röhrchen überführt und im SS 34-Rotor bei 18.000/min und 10 °C für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen.

- Cäsiumchloridgradienten-Zentrifugation

Der Überstand wird mit TE-Puffer auf 30 ml aufgefüllt und dann mit 33 g CsCl versetzt. Nach dem Lösen des CsCl werden 500 μ l Bisbenzimidlösung (10 mg/ml) hinzugefügt. Die Lösung wird mit TE-Puffer bzw. CsCl auf einen Brechungsindex von 1,3938 eingestellt (Refraktometer). Anschließend wird die Lösung in ein Ultrazentrifugenröhrchen (50 ml) gegeben, dieses wird fest verschweißt und im VTI-50-Rotor für mindestens 18 h bei 44.000/min und 18 °C zentrifugiert.

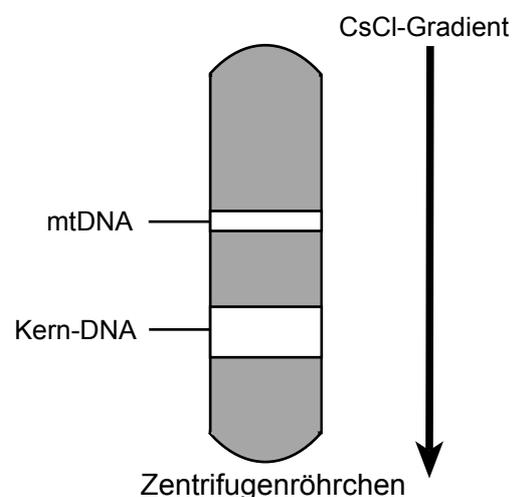


Abb. 3.2: DNA-Banden nach CsCl-Gradientenzentrifugation unter UV-Strahlung.

- Isolierung der Mitochondrien-DNA

Unter UV-Strahlung werden die DNA-Banden nach der Zentrifugation sichtbar (Abb. 3.2). Mit einer Spritze werden zunächst Löcher (2–3) im oberen Bereich des Zentrifugenröhrchens gestochen, dann wird mittels der Spritze unterhalb der Mitochondrien-DNA-Bande eingestochen und diese abgezogen.

- Aufarbeitung der Mitochondrien-DNA

Die DNA-Lösung wird zweimal mit 1 Volumen 2-Butanol (mit TE-Puffer gesättigt) ausgeschüttelt (Extraktion des Benzimidis). Nach der Entfernung des 2-Butanols wird die DNA-Lösung mit einem Volumen TE-Puffer versetzt und dann mit zwei Volumen Äthanol abs. (z. B. 2 ml DNA-Lösung + 2 ml TE-Puffer + 8 ml Äthanol). Über Nacht, mindestens jedoch 4 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren.

- Zentrifugation 4

Es folgt eine Zentrifugation im SS 34-Rotor für 20 min bei 18.000/min und $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit Äthanol 70%ig gewaschen, im Vakuum getrocknet und in $100\text{ }\mu\text{l}$ TE-Puffer gelöst.

Lösungen:

Isolationspuffer: 50 mM Na_2HPO_4 , 50 mM KH_2PO_4 , 25 mM EDTA und 1 Vol.%

2-Mercaptoäthanol, pH 7,5

Lysispuffer: 200 mM Tris, 80 mM EDTA und 10 g/l SDS, pH 9,5

3.14 Isolierung von Gesamt-DNA aus Hefe (nach Holm *et al.* 1986)

- Kultur (ca. $5 \cdot 10^8$ Zellen in log Phase) abzentrifugieren (5–20 ml) und mit dest. Wasser waschen
- in $150\text{ }\mu\text{l}$ SCE-Puffer resuspendieren und $10\text{ }\mu\text{l}$ Zymolyase-Lsg. zugeben
- 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren
- sehr kurz zentrifugieren (ca. 30 s, nur um die Zellen zu sedimentieren)
- die Flüssigkeit gut abnehmen
- Pellet in $150\text{ }\mu\text{l}$ GuHCl-Lsg. langsam suspendieren
- 10 min $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren, ab und zu mischen
- auf RT abkühlen, dann $150\text{ }\mu\text{l}$ kaltes Äthanol zugeben
- 5 min zentrifugieren, Pellet gut ablaufen lassen
- langsam $0,3\text{ ml}$ 10X TE zugeben, mit Pipettenspitze vorsichtig rühren
- optional: $3\text{ }\mu\text{l}$ RNase-A-Lsg. (5 mg/ml) zugeben, 1 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren
- $30\text{ }\mu\text{l}$ Proteinase-K-Lsg. (2 mg/ml) zugeben, 30 min bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubieren
- 2-mal mit je $0,5\text{ ml}$ Phenol/Chloroform/iso-Amylalkohol (25:24:1) extrahieren

- wässrige Phase mit 30 μl 3 M Natriumacetat und 600 μl Äthanol versetzen
- 15 min bei -70°C inkubieren
- 10 min zentrifugieren, Pellet mit 70%igem Äthanol waschen, trocknen
- Lösen in z.B. 50 μl TE-Puffer

Lösungen:

SCE-Puffer: 1 M Sorbitol, 0,1 M Natriumcitrat und 0,06 M EDTA, pH 7,0

Zymolyase-Lsg.: 10 mg/ml Zymolyase 20T, 10 Vol.% 2-Mercaptoäthanol in SCE

GuHCl-Lsg.: 4,5 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M EDTA, 0,15 M NaCl und 0,05 Vol.% Sarkosyl, pH 8,0

3.15 Isolierung von Plasmid-DNA oder Gesamt-DNA bei Hefe

- 3 ml Übernachtskultur (ca. $5 \cdot 10^8$ Zellen, log Phase) abzentrifugieren, mit sterilem Wasser waschen
- in 200 μl Isolationspuffer mit 10 μl 1M DTT und 10 μl Zymolyase (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) resuspendieren
- 30 min bei 37°C inkubieren
- Zugabe von 600 μl Lysispuffer
- 20 min bei 70°C inkubieren
- Zugabe von 150 μl 5 M Kaliumacetatlösung
- 15 min bei 4°C inkubieren
- Zentrifugation bei 4°C für 10 min
- Abnahme des Überstandes und Fällung der DNA durch Zugabe von 600 μl 2-Propanol
- Inkubation für 5 min bei 4°C
- Zentrifugation für 20 min bei 13.000/min und 4°C
- Waschen des Pellets mit 70vol%igem Äthanol
- Trocknen und Aufnahme des DNA-Pellets im gewünschten Puffer
- Bei Plasmidisolierung: Transformation der DNA-Lösung nach *E. coli*

Isolationspuffer: 50 mM Na_2HPO_4 ; 50 mM KH_2PO_4 ; 25 mM EDTA; 1 Vol.% 2-Mercaptoäthanol

Lysispuffer: 200 mM Tris, 80 mM EDTA und 10 g/l SDS, pH 9,5

3.16 Plasmidisolierung von *E. coli*

Je nach *E.-coli*-Stamm wurden 3–5 ml Kultur über Nacht oder 5 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden in 1,5-ml-Eppendorf-Gefäße abzentrifugiert. Die Plasmid-Isolierung erfolgte dann mit dem Plasmid-Isolierungskit QIAprep[®] der Firma Qiagen nach deren Vorschrift. Bei diesem Kit erfolgt der Aufschluss der Zellen durch alkalische Lyse, gefolgt von

einer Acetat-Fällung mit anschließender Zentrifugation zur Gewinnung der DNA-haltigen Lösung. Diese Lösung wird über eine Säule gegeben, an der die DNA absorbiert wird. Nach einigen Waschsritten wird die DNA mit dem gewünschten Puffer (pH 7–7,5) oder Wasser eluiert.

3.17 Genbankherstellung aus Phagen

Für das Dihybridsystem, Monohybridsystem und das Drei-Komponenten-System wurde eine Arabidopsis-thaliana-Genbank vom *DNA Stock Center* des *Arabidopsis Biological Resource Center* benutzt, außerdem eine ebensolche Genbank der Firma Clontech. Die cDNA-Banken lagen als Phagen vor und mussten zunächst nach *E. coli* infiziert werden. Hierzu geht man wie folgt vor:

- Über Nacht wird in LB-Medium mit 0,2 % Maltose eine *E.-coli*-Kultur bei 37 °C angezogen (20 ml).
- Die Zellen werden abzentrifugiert (8000/min für 5 min) und in 10 ml 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert
- Diese Zellsuspension kann für zwei Wochen bei 4 °C gelagert werden.
- 10⁸ Phagen werden mit 2 ml logarithmisch gewachsenen *E. COB* in MgSO₄-Lösung bei 30 °C ohne zu schütteln für 30 min inkubiert.
- 2 ml LB-Medium werden zum Ansatz gegeben. Das Ganze wird schüttelnd bei 30 °C für 1 h inkubiert.
- Je 200 µl der Zellsuspension werden auf eine 150 mm LB/Amp-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.
- Die Platten werden mit je 10 ml LB-Medium überschichtet und die Kolonien werden darin suspendiert. Die Suspensionen werden vereinigt, in 1 l LB/Amp-Medium gegeben und bis zur stationären Phase bei 37 °C schüttelnd inkubiert.
- Die Plasmid-DNA wird nach Protokoll isoliert.

3.18 Transformationen

3.18.1 Hefetransformation

Anwendung fand die Methode nach Gietz *et al.* (1995) in leicht abgewandelter Form.

- Zellernte

Die frisch angezogenen Zellen, welche sich noch nicht in der stationären Phase befinden, werden abzentrifugiert (5000/min für 5 min) und anschließend mit sterilem Wasser und mit 0,1 M LiCl/TE gewaschen.

- Herstellung kompetenter Zellen

Die Zellen werden in

1 Volumen 0,1 M LiCl in TE-Puffer pH 7,6 resuspendiert und

30 min bei 28 °C inkubiert.

- Transformation

Zu den kompetenten Hefezellen werden

1/10 Vol. einzelsträngige Heringsspermien-DNA (10 mg/ml) und

1/10 Vol. Plasmid-DNA (ca. 150 µg/ml) hinzugegeben, sowie

10 % vom Gesamtvolumen Äthanol 96%ig (z. B. 100 µl Hefesuspension, 10 µl

Heringsspermien-DNA, 10 µl Plasmid-DNA und 12 µl Äthanol).

10 min Inkubation bei RT, dann das

sechsfache Volumen Transformationspuffer (50 Vol.% PEG 4000, 0,1 M LiCl in TE-Puffer, pH 7,6) dazugeben. Nach

30 min Inkubation bei

28 °C erfolgt ein Hitzeschock von

45 °C für

15 min

- Ausplattierung

Der Transformationsansatz wird abzentrifugiert (3000/min für 5 min) und in 0,1 M

Glukose in TE-Puffer resuspendiert (1 Volumen, bezogen auf die eingesetzte

Hefesuspension) und auf Selektiv-Medium ausplattiert (100 µl/Platte).

3.18.2 E.-coli-Transformationen

Der Ligationsansatz (oder Plasmid-DNA-Lsg.) wird mit 70 µl kompetente *E. coli* versetzt und für ca. 1 h auf Eis inkubiert, gefolgt von einem Hitzeschock von 90 s bei 42 °C. Anschließend wird der Ansatz mit 500 µl LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Es erfolgt die Ausplattierung auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum. Die Platten werden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.19 Plasmidentfernung bei Hefe

Um Plasmide aus Hefezellen wieder zu entfernen, wurden diese in Glukose-Vollmedium angezogen und mehrmals in frisches Medium überimpft (3–4 mal). Durch den fehlenden Selektionsdruck auf den Auxotrophie-Marker verlieren einige Zellen das Plasmid. Etwas Zellsuspension wird 1:1000 mit sterilem Wasser verdünnt und auf eine YPGc-Platte ausplattiert. Auf der Platte sollten einzelne Kolonien sichtbar wachsen, unter Umständen muss die Zellsuspension weiter verdünnt werden. Die Kolonien werden nun auf Platten mit Selektions-

medium gestempelt und durch Vergleich mit der YPGc-Platte werden die nicht gewachsenen Kolonien von der YPGc-Platte selektiert und nochmals auf Selektiv-Medium geprüft. Ergibt die zweite Prüfung auch kein Wachstum, so hat diese Kolonie das Plasmid verloren.

3.20 Dihybridsystem

Das Dihybridsystem dient zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Das System beruht auf der Wechselwirkung zwischen DNA-Bindedomäne und DNA-Aktivierungsdomäne des Hefe-GAL4-Proteins. Normalerweise befinden sich beide Domänen im selben Protein. Die Bindedomäne hat dabei die Aufgabe, spezifisch an die Promotorsequenz des entsprechenden Gens zu binden; die Aktivierungsdomäne wechselwirkt hingegen mit der RNA-Polymerase II und ermöglicht so die Transkription des Gens. Das Hefe-GAL4-Protein ist auch in der Lage, diese Aktivierung der Transkription durchzuführen, wenn die beiden Domänen getrennt vorliegen. Voraussetzung ist nur die passende räumliche Nähe der beiden Domänen. Fusioniert man nun an Aktivierungs- und Bindedomäne jeweils Proteine, welche miteinander in Wechselwirkung treten, so ist das gesamte System in der Regel in der Lage, ein Reportergen hinter dem GAL4-Promotor zu aktivieren.

In dieser Arbeit wurde das Dihybridsystem dazu verwendet, Transkriptionsfaktoren der Phagentyp-RNA-Polymerasen RpoT;1 und RpoT;3 von *Arabidopsis thaliana* aus einer Genbank zu finden. Hierzu wurde eine Genbank von *Arabidopsis thaliana* im Vektor pACT (*LEU2*-Marker) hinter (C-terminal) der GAL4-Aktivierungsdomäne angelegt. Die beiden Polymerasen wurden in den Vektor pGBT9 (*TRP1*-Marker) hinter (C-terminal) die GAL4-Bindedomäne kloniert. Beide Vektoren wurden dann in den Reporterstamm PJ69-4A transformiert. Dieser enthält die Reportergene *HIS3* und *ADE2* jeweils hinter dem GAL4-Promotor, aber mit unterschiedlichen Minimalpromotoren. Da jetzt zwei verschiedene Gene aktiviert werden müssen, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass diese Aktivierung auch tatsächlich auf native Protein-Protein-Wechselwirkungen beruht. Zunächst wurden die erfolgreichen Kotransformanten auf WA^{-trp, -leu}-Platten selektioniert. Positive Klone nach Überstempeln auf Platten mit Glukosemedium ohne Adenin und ohne Histidin zeigen eine Wechselwirkung zwischen den beiden Fusionsproteinen in den Hefezellen und wurden weiter analysiert. Die Erfahrungen mit diesem System hatten gezeigt, dass es für die Hefe allerdings schwierig ist, wenn sie beide Reportergene gleichzeitig aktivieren muss (T. Lisowsky, pers. Mitteilung).

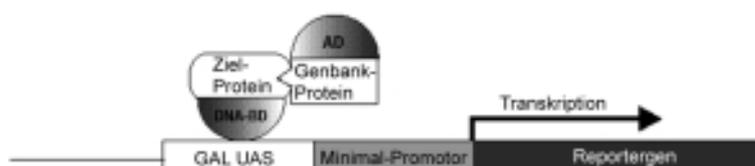


Abb. 3.3: Schema über die Funktionsweise des Dihybridsystems der Hefe. Bei Wechselwirkung zwischen Genbank- und Zielprotein kommt es zur Aktivierung des Reportergens.

Deshalb wurden die Hefen immer zunächst auf Mangelmediumplatten ausplattiert, auf denen entweder nur Adenin oder nur Histidin fehlten. Wachsende Klone wurden dann auf die komplementären Medien umplattiert.

Als Alternative wurden die beiden Plasmidkonstrukte getrennt transformiert, und zwar die pACT-Plasmide in den Stamm PJ69-4A und die pGBT9-Plasmide in den Stamm Y187. Die Kreuzung beider Transformanten erfolgte auf WA^{-trp, -leu}-Platten, die Selektion der Protein-Protein-Interaktion erfolgte auf WA^{-leu, -trp, -ade} - und WA^{-leu, -trp, -his}-Platten.

Es wurde wie folgt vorgegangen:

- Transformation des Hefestamms für das Dihybridsystem (PJ69-4A) mit dem Plasmid pGBT9::TH-Y2 (enthält die mitochondriale RNA-Polymerase von *Arabidopsis*) bzw. pGBT9::TH-Z2 (enthält die plastidäre RNA-Polymerase von *Arabidopsis*).
- Transformation dieser Stämme mit Genbank-Vektoren (cDNA-Genbank aus *Arabidopsis thaliana* im pACT-Vektor)
- Ausplattierung auf WA^{-leu}-Platten zur Selektion der Transformanten
- Umplattierung auf WA^{-ade} und WA^{-his}-Platten (es wachsen nur solche Klone, bei denen mindestens ein Reporter gen aktiviert wurde)
- Umplattierung der wachsenden Kolonien auf die jeweils andere Mangelmediumplatte (es wachsen nur solche Klone, bei denen beide Reportergene aktiviert wurden)
- Isolierung der cDNA-Plasmide aus Klonen, welche beide Reportergene aktivieren konnten.
- Sequenzierung der cDNA
- Datenbankvergleich

3.21 Das Drei-Komponentensystem

Das Drei-Komponentensystem ist eine Erweiterung des Monohybridsystem für Hefe um ein weiteres Hybridprotein. Beim Monohybridsystem werden Wechselwirkungen zwischen Proteinen und DNA untersucht. Hierzu wird über ein lineares Plasmid die zu untersuchende DNA-Sequenz in das Hefegenom integriert. Durch Transformation des so erhaltenen Hefestammes mit einem Plasmid, auf welchem ein hybrides Protein mit einer Aktivierungsdomäne kodiert wird, können nun Wechselwirkungen zwischen diesem Protein und der DNA getestet werden, da hinter dieser DNA-Sequenz ein Reporter gen liegt. Dieses wird nur bei Interaktion des Proteins mit der DNA aktiviert. Beim Drei-Komponentensystem wird nun ein zweites Hybridprotein in die Hefe transformiert. In unserem Fall handelt es sich zum einen um die RNA-Polymerase RpoT;1 aus *Arabidopsis* (in pGBT9) und zum anderen um Vektor mit Genbank-DNA (in pACT mit Aktivierungsdomäne). Bei den gewählten DNA-Sequenzen handelt es sich jeweils um die -1000-Region der Gene *COX2* und *COX3*, welche

von RpoT;1 abgelesen werden. In dieser Sequenz liegen die Promotoren der Gene, welche sowohl mit dem hypothetischen Transkriptionsfaktor als auch mit der Polymerase in Wechselwirkung treten. Mit dieser Anordnung sollte gewährleistet werden, dass alle Reaktionskomponenten im In-vivo-Testsystem vorhanden sind.

- Restriktion der Ziel-DNA mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI* und Ligation mit dem Plasmid pHisi-1
- Amplifikation der ligierten Plasmiden in *E. coli* und Plasmidisolierung
- Restriktion der Plasmide mit *XhoI*
- Transformation und Integration der linearen Plasmide in das Genom des Hefestamms YM 4271 durch homologe Rekombination
- Selektion der transformierten Klone durch Ausplattierung auf Histidin-Mangelmedium
- Transformation der oben erhaltenen Hefestämme mit dem Plasmid pGBT9::TH-Y2
- Transformation des Hefestamms Y 187 mit dem Genbankplasmid pACT-AraII, welches ein Hybridgen aus Arabidopsis-Genbank und der Bindedomäne des GAL 4-Systems enthält (Monohybridsystem)
- Kreuzung der beiden vorgenannten Hefestämme, Selektion auf Histidin-/Tryptophan-Mangelmedium
- Isolierung der cDNA-Plasmide aus Klonen, welche das Reportergeren aktivieren konnten.
- Sequenzierung der cDNA
- Datenbankvergleich

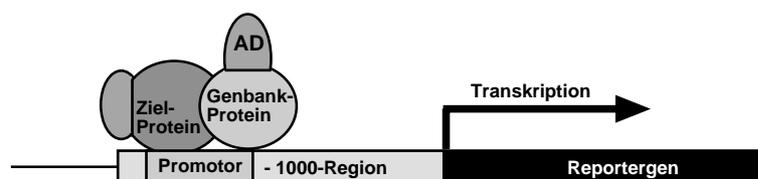


Abb. 3.4: Schema des Drei-Komponentensystems.

Durch die Wechselwirkungen zwischen Zielprotein (RpoT;1) und Genbankprotein (pot. Spezifitätsfaktor), fusioniert mit der Aktivierungsdomäne AD, mit der Ziel-DNA wird das Reportergeren aktiviert und durch die Hefe-RNA-Polymerase II abgelesen.

3.22 DAPI-Färbung

Zum Sichtbarmachen von DNA in Hefezellen werden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI inkubiert. Dieser interkaliert zwischen Basenpaare der DNA und verursacht bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm Fluoreszenz. Mit einem Fluoreszenzmikroskop kann so die DNA sichtbar gemacht werden. Für die DAPI-Behandlung der Hefezellen hat sich die folgende Vorgehensweise bewährt:

- Aus einer Flüssigkultur wird etwas Zellsuspension abgenommen und in der Tischzentrifuge bei 8000/min für ca. 1 min zentrifugiert.
- Die Zellen werden einmal mit 500 μl Ringerlösung gewaschen und dann in Ringerlösung aufgenommen.
- Die Zelldichte wird unter dem Mikroskop kontrolliert und ggf. mit Ringerlösung verändert.
- Zur Fixierung der Zellen wird auf einem Objektträger (schwarz lackiert mit runden Fenstern) 10 μl Poly-L-Lysinlösung/Fenster aufgetragen.
- Zur Zellsuspension werden 1 μl DAPI-Lösung (10 mg/ml) pro 50 μl Zellsuspension gegeben und 3–5 Minuten inkubiert.
- Die Zellen werden kurz abzentrifugiert und in Ringerlösung resuspendiert.
- Je 10 μl Zellsuspension werden auf die mit Poly-L-Lysin benetzten Fenster des Objektträgers gegeben und für mind. 5 min inkubiert; hierbei sinken die Zellen in das Poly-L-Lysin.
- Der Objektträger wird vorsichtig (!) mit Wasser aus einer Spritzflasche abgespült und nach Auflage eines Deckglases können die Zellen im Mikroskop betrachtet werden.

3.23 Isolierung von Rohmitochondrien

- Animpfen

Etwas Zellmaterial wird in 5 ml Glycerin-Medium, bei nichtatmenden Stämmen in Glukose-Medium, angeimpft. Inkubation über Nacht oder länger bei 28 °C.

- Zellernte

Die Zellen werden in 2-ml-Reaktionsgefäße in der Tischzentrifuge bei 13.000/min abzentrifugiert und einmal mit 200 ml MTE-Puffer (0,6 M Mannit, 25 mM Tris und 1 mM EDTA) gewaschen.

- Zellaufschluss

Das Zellpellet wird in 500 μl MTE-Puffer resuspendiert. Dazu werden ca. 400 μl Glasperlen (\varnothing 4,5 μm) gegeben. Das Ganze wird im Braun-Homogenisator für 6 min bei 4 °C aufgeschlossen. Alternativ kann man die Reaktionsgefäße auch für 5-mal eine Minute vortexen; zwischen den einzelnen Vortex-Schritten müssen die Ansätze auf Eis gelagert werden.

- Isolierung des Zellaufschlusses

Die Ansätze werden auf Eis gegeben, der Zellaufschluss wird mit einer (feinen) Pipette abgenommen und in ein anderes 2-ml-Reaktionsgefäß überführt (auf Eis). Die Glasperlen werden noch 3-mal mit je 500 μl eiskaltem MTE-Puffer gewaschen, die Waschsuspensionen werden zum Zellaufschluss gegeben.

- Zentrifugation 1

Die Ansätze werden im SS-34-Rotor bei 2000/min für 15 min zentrifugiert. Hierbei sedimentieren die Zellreste und die Rohmitochondrien verbleiben im Überstand. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und ein zweites Mal wie oben zentrifugiert, um auch die letzten Zellreste zu entfernen.

- Zentrifugation 2

Der letzte Überstand wird nun im SS 34-Rotor bei 18.000/min für 30 min zentrifugiert. Hierbei sedimentieren die Rohmitochondrien. Der Überstand wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Das Pellet wird einmal mit 100 μ l MTE-Puffer gewaschen, 10 min bei 18.000/min zentrifugiert und dann in 100 μ l MTE-Puffer resuspendiert. Hierzu lässt man die Ansätze zunächst ein bis mehrere Stunden auf Eis stehen, damit sich das Pellet langsam löst. Nun wird sehr vorsichtig mit einer Pipette das Pellet weiter resuspendieren und zwar so, dass möglichst kein Schaum entsteht. Die Rohmitochondrien werden bei -70°C gelagert.

3.24 Kreuzung von Hefe

Die zu kreuzenden Hefestämme werden mit einer sterilen Impföse auf einer Agarplatte miteinander vermischt. Das Medium der Platte wird so gewählt, dass nur gekreuzte Hefezellen wachsen können. Zur Kontrolle werden die beiden Hefestämme auch einzeln auf dieser Platte ausgestrichen. Alternativ fand auch flüssiges Medium Verwendung.

3.25 Tetradenzerlegung

Diploide Hefestämme werden zunächst auf Platten mit Sporulationsmedium mindestens eine Woche kultiviert. Ggf. erfolgt vorher eine Inkubation in Präsporulationsmedium, falls nicht ausreichend Tetraden entstehen. Die entstandenen Tetraden werden dann in Zymolyase-Lösung (0,5 mg/ml) gegeben und für ca. 5 min bei RT inkubiert, um die Sporenwand anzudauen. Ein Aliquot hiervon wird auf eine Agarplatte mit der gewünschten Zusammensetzung gegeben. Mit einem Mikromanipulator können nun unter dem Mikroskop die Sporen einer Tetrade vereinzelt werden (s. Abb. 3.5).

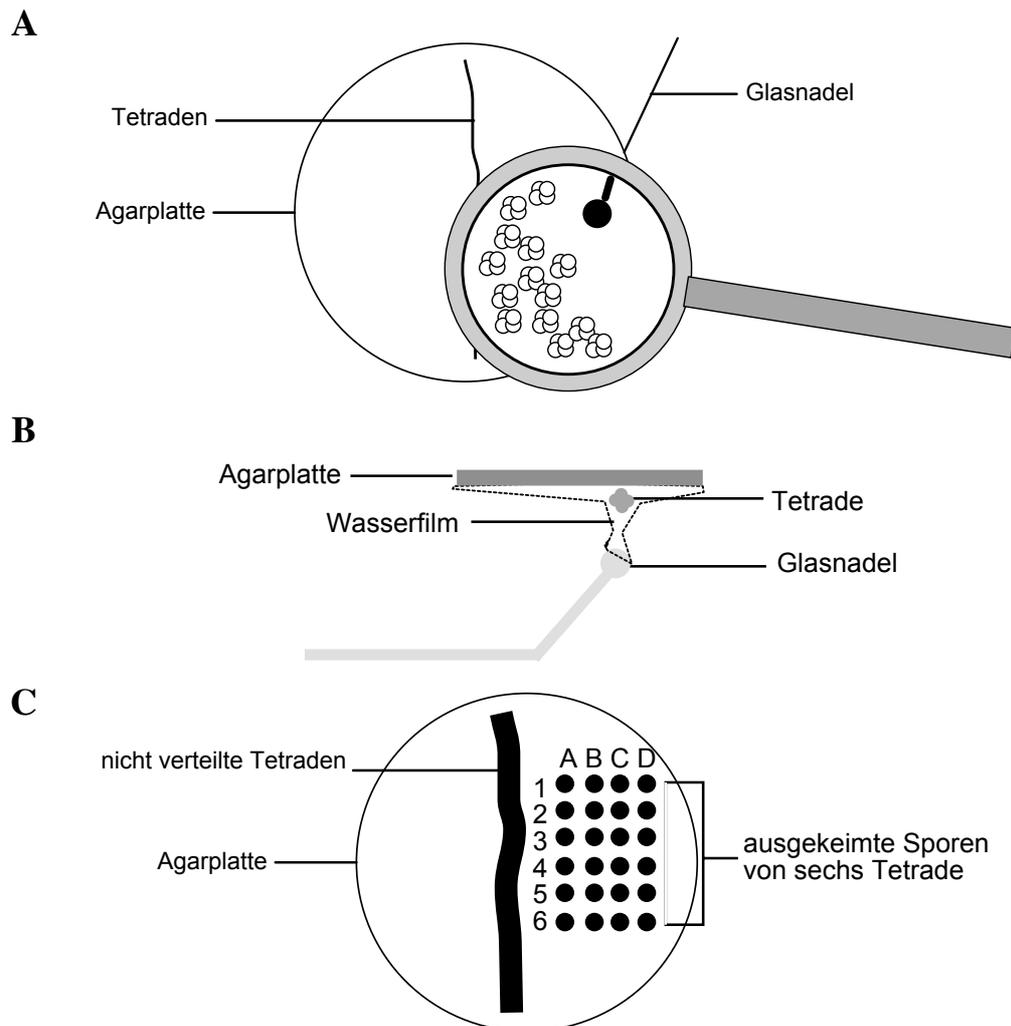


Abb. 3.5: Zerlegung von Tetraden mit dem Mikromanipulator.

A: Ansicht von oben. Eine mit Tetraden (mit aufgelösten Sporenwänden) belegte Agarplatte wird unter ein Mikroskop gelegt. Mit der Glasnadel des Mikromanipulators werden die Tetraden zunächst aufgenommen und am Platz der ersten Spore (s. C, A1–A6) abgelegt. Hier werden die Sporen voneinander gelöst, um dann einzeln mit der Nadel an ihre Plätze gebracht zu werden (s. C, B1–D6).

B: Ansicht von der Seite: Durch den Wasserfilm auf der Agarplatte lassen sich die Tetraden mit der Glasnadel bewegen. Um eine Tetrade aufzunehmen, wird die Nadel unter der gewünschten Tetrade platziert. Durch kurze, leichte Erschütterungen der Nadel lösen sich die Tetraden von der Platte und gelangen auf die Nadelspitze.

C: Ansicht einer Agarplatte nach dem Vereinzeln von sechs Tetraden.

4. Ergebnisse

4.1 Zusatzfaktoren der Organellen-RNA-Polymerasen von *Arabidopsis thaliana*

Die Phagentyp-RNA-Polymerasen haben im Laufe ihrer Evolution zusätzliche Proteine rekrutiert, mit denen sie in der Lage sind, die Genome der Organellen zu transkribieren. Bis jetzt sind aber nur bei sehr wenigen Spezies überhaupt diese Zusatz- oder Spezifitätsfaktoren identifiziert worden. Bei Pflanzen wurde bislang keiner dieser Zusatzfaktoren kloniert und sequenziert.

4.1.1 Aufbau eines Dihybridsystems

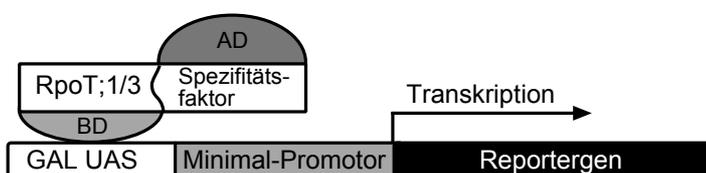
Bei der Transkriptionsinitiation treten das Core-Enzym und der oder die Faktoren in Wechselwirkung zueinander. Diese Wechselwirkungen können dazu dienen, unbekannte Zusatzfaktoren über das Dihybridsystem der Hefe zu isolieren (Abb. 4.1). Als Zielprotein wurde in dieser Arbeit die Organellen-RNA-Polymerase RpoT;1 (mitochondrial) bzw. RpoT;3 (plastidär) in das Plasmid pGBT9 kloniert. Im Plasmid mit der Aktivierungsdomäne (pACT) befand sich die Arabidopsis-cDNA-Genbank AraII.

Da es beim Dihybridsystem sehr häufig zu falsch positiven Ergebnissen kommt, wurde das auf zwei Reportergene erweiterte System benutzt. Diese Reportergene besitzen dieselben GAL4-Bindedomänen, aber unterschiedliche Minimalpromotoren. Damit steigt die Wahrscheinlichkeit, dass das Wachstum von Klonen tatsächlich auf spezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen beruht.

Insgesamt wurden elf Klone aus dem Test mit der RNA-Polymerase RpoT;1 und zehn Klone aus Versuchen mit der RNA-Polymerase RpoT;3 als Zielprotein isoliert. Sie konnten sowohl das Adenin- als auch das Histidin-Reporter gene aktivieren. Bei diesen Klonen wurde zunächst über PCR die cDNA-Insertion des Genbankplasmids amplifiziert (Schnellmethode aus ganzen Hefezellen). Wo dies nicht gelang, wurde das Plasmid aus der Hefe isoliert und anschließend in *E. coli* amplifiziert. Es zeigte sich, dass zehn Klone kein bzw. nur ein leeres Genbank-Plasmid enthielten. Die Sequenzierung der restlichen Plasmide ergab, dass die im pACT-Vektor inklonierte cDNA nicht im Leseraster der Aktivierungsdomäne war. Somit beruhte die Aktivierung der Reportergene nicht auf der Wechselwirkung zwischen Zielprotein (RpoT;1 bzw. RpoT;3) und Genbankprotein.

Abb. 4.1: Das Dihybridsystem der Hefe.

Durch Bindung potenzieller Zusatzfaktoren an die Organellen-RNA-Polymerasen von *Arabidopsis thaliana* entsteht in der Hefe ein Transkriptionsinitiationskomplex, infolge dessen das Reporter gen abgelesen wird.



4.1.2 Austesten von Wechselwirkungen zwischen Sigmafaktoren und den Organellen-RNA-Polymerasen von *Arabidopsis thaliana* mithilfe des Dihybridsystems

In den Plastiden gibt es neben den Phagentyp-RNA-Polymerasen auch RNA-Polymerasen des eubakteriellen Typs. Die Transkription der eubakteriellen RNA-Polymerasen wird durch so genannte Sigmafaktoren als Spezifitätsfaktoren geregelt. Auch in Pflanzen sind homologe Gene zu diesen Sigmafaktoren bekannt. Sie werden alle im Kern kodiert und bei zwei dieser Faktoren (SIG2 und SIG3) konnte ein Export in die Plastiden nachgewiesen werden (Tanaka *et al.* 1997, Isono *et al.* 1997). Weil die anderen Sigmafaktoren möglicherweise nicht plastidär lokalisiert sind, kommt auch eine mitochondriale Lokalisierung in Frage. Da es in den Mitochondrien aber keinen eubakteriellen Transkriptionsapparat gibt, liegt die Vermutung nahe, dass Sigmafaktoren oder Sigmafaktor ähnliche Proteine auch eine Rolle für die Transkriptionsmaschinerie der Phagentyp-Polymerasen spielen. Durch das gezielte Einbringen dieser vermuteten Faktoren in das Dihybridsystem sollte sich zeigen, ob eine Interaktion mit den pflanzlichen RNA-Polymerasen des Phagentyps zustande kommt. Hierzu wurden in Kooperation mit dem Labor von Dr. Weihe und Prof. Börner von der Humboldt-Universität Berlin die jeweiligen Gene über PCR amplifiziert und in das Genbankplasmid inkloniert. Zur Überprüfung der Sequenzen wurden die Plasmidinsertionen sequenziert. Es folgte die Transformation dieser Plasmide in Hefezellen des Dihybridsystems. Als Zielprotein wurden wie schon zuvor die mitochondriale und die plastidäre RNA-Polymerase verwendet. Nach dem Ausplattieren auf Selektionsmedium zeigte sich, dass keiner der zehn Hefeklonen in der Lage war, auch nur eines der beiden Reportergene zu aktivieren.

Die nachfolgenden Proteine wurden im Dihybridsystem getestet:

sig1, sig2 (plastidärer Import nachgewiesen), sig3 (plastidärer Import nachgewiesen), sig4, sig5.

Zur Überprüfung wurden die pflanzlichen Sigmafaktoren auch mit den vier Untereinheiten der eubakteriellen plastidären RNA-Polymerase im Dihybridsystem ausgetestet (jeder Sigmafaktor mit allen Untereinheiten). Auch dieser Test verlief negativ, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein störender Faktor bei den Sigmafaktoren die Aktivierung des Dihybridsystems grundsätzlich verhindert.

4.1.3 Verwendung eines Drei-Komponentensystems

Bei der Initiation der Transkription binden Core-Enzym und Zusatzfaktoren an die entsprechenden DNA-Sequenzen der Promotorregion. Wie dieser Vorgang bei der Organellen-Transkription genau vonstatten geht, ist noch nicht bekannt. Eine Möglichkeit ist, dass Core-Enzym und Faktoren aneinander binden und dann erst gemeinsam die Promotorregion erkennen können und an diese andocken. Dieses Modell vorausgesetzt müssten potenzielle Faktoren über das Dihybridsystem zu finden sein. Eine andere Möglichkeit ist,

dass die oder der Zusatzfaktor zunächst die Promotorregion erkennt und dort bindet. Erst dann ist es dem Core-Enzym möglich, an derselben Stelle den Transkriptionsinitiationskomplex zu bilden. Zusatzfaktoren können unter dieser Voraussetzung nur gefunden werden, wenn das Suchsystem auch die entsprechende DNA-Sequenz enthält. Deshalb wurde ein neues Verfahren entwickelt, welches diesen Sachverhalt berücksichtigt und auf dem Monohybridensystem der Hefe basiert. Das Monohybridensystem zeigt Wechselwirkungen zwischen DNA-Sequenzen und einem Hybridprotein mit Aktivierungsdomäne an. Das neu entwickelte Drei-Komponentensystem (Abb. 4.2) enthält ein zweites Protein (RpoT;1), welches mit der DNA-Zielsequenz in Wechselwirkung tritt und durch ein zusätzliches Plasmid (YEp351) in das System gebracht wird.

Für diese Arbeit wurden als DNA-Zielsequenzen die –1000-Regionen der mitochondrialen Gene *COX1*, *COX2* und *COX3* von *Arabidopsis thaliana* ausgewählt (Abb. 4.3). Diese Regionen enthalten die Promotor- und Erkennungssequenzen der jeweiligen Gene für die mitochondriale RNA-Polymerase RpoT;1 und deren gesuchten Faktoren. Die Herstellung der –1000-Regionen erfolgte durch PCR. Als Kopiervorlage für die PCR wurde aufgereinigte Gesamt-DNA von *Arabidopsis* verwendet. Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass an den Enden geeignete Schnittstellen für die Ligierung in das Plasmid pHisi-1 entstanden (*EcoRI* und *XbaI*)

Da in der –1000-Region von *COX2* eine *EcoRI*-Schnittstelle vorhanden ist, wurden hier die Primersequenzen so gewählt, dass diese an den Enden jeweils eine *XbaI*-Schnittstelle enthielten. Nach der Restriktion der –1000-Region von *COX2* entstanden deshalb zwei Fragmente, die beide in das Plasmid inkloniert wurden. Die –1000-Region von *COX1* konnte nicht in das Plasmid inkloniert werden bzw. nicht in *E. coli* amplifiziert werden. Die –1000-Region von *COX3* hingegen konnte problemlos kloniert und amplifiziert werden.

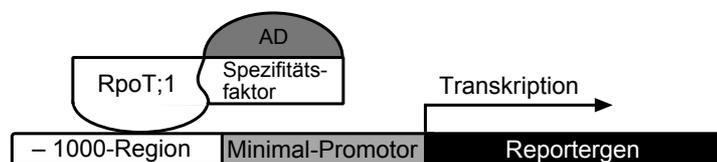


Abb. 4.2: Das 3-Komponentensystem der Hefe.

Durch ein linearisiertes Plasmid (pHisi-1) wird eine DNA-Zielsequenz mit Reporter-gen und GAL4-Minimalpromotor in das Genom der Hefe integriert. Durch Plasmide werden zwei DNA-Bindeproteine (RpoT;1, mitochondriale RNA-Polymerase von *Arabidopsis thaliana* und Genbankprotein, welches an die Aktivierungsdomäne des GAL4-Proteins fusioniert ist), in die Hefe eingebracht. Können diese beiden Proteine an die DNA-Zielsequenz (–1000-Region der mitochondrialen Gene *COX1*, *COX2* oder *COX3* von *Arabidopsis thaliana*) binden, so entsteht ein Transkriptionsinitiationskomplex und das Reporter-gen (*HIS3*) wird durch die Hefe eigene RNA-Polymerase II abgelesen. Hefezellen, die diese Voraussetzung erfüllen, wachsen deshalb auf Medien ohne Histidin.

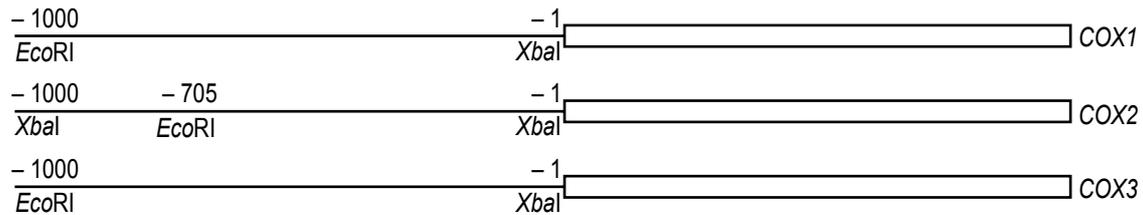


Abb. 4.3: Ziel-Sequenzen für das 3-Komponentensystem.

Es wurden jeweils die -1000-Regionen von *COX1*, *COX2* und *COX3* ausgewählt und über PCR amplifiziert. An den Enden der Sequenzen wurden über die Primer die eingezeichneten Schnittstellen für die Ligierung in das Plasmid pHisi-1 integriert. Da in der -1000-Region von *COX2* bereits eine *EcoRI*-Schnittstelle vorhanden ist, wurden an den Enden nur *XbaI*-Schnittstellen integriert.

Ansätze für die DNA-Amplifikation:

Primerpaare: *cox1|cox1rev*; *cox2|cox2rev*; *cox3|cox3rev*

PCR-Zyklen:

- 2 min/98 °C zur Denaturierung (ohne Taq[®]-Polymerase!)
- 30 s/95 °C, 30 s/40 °C, 60 s/72 °C: 3 Zyklen
- 30 s/95 °C, 30 s/55 °C, 60 s/72 °C: 35 Zyklen
- 30 s/95 °C, 30 s/55 °C, 10 min/72 °C: 1 Zyklus

Da der Minimalpromotor des Reportergens (*HIS3*) eine basale Aktivität besitzt, wurde diese durch Zugabe von 3-Amino-1,2,4-triazol (Triazol) unterdrückt. Hierzu wurden die mit den Ziel-DNAs transformierten Stämme auf Glukosemedien ohne Histidin und mit verschiedenen Konzentrationen Triazol ausplattiert. Ab einer Konzentration von 5 mM Triazol konnten die mit den Ziel-DNAs transformierten Hefestämme nicht mehr wachsen. Diese wurden nun mit dem Plasmid, welches die mitochondriale RNA-Polymerase von *Arabidopsis* kodiert, transformiert. Danach musste die Triazolkonzentration auf 50 mM erhöht werden, um ein Wachstum auf Platten mit Histidin-Mangelmedium zu verhindern. Anschließend erfolgte die Kreuzung mit dem Hefestamm, in welchem die Genbank transformiert war und der eigentliche Wachstumstest auf Histidin-Mangelmedium.

Wie beim Dihybridsystem wurde auch hier die cDNA aus dem Genbankplasmid der wachsenden Klone über die PCR-Schnellmethode oder über Plasmidisolierung und Amplifizierung in *E. coli* gewonnen. Insgesamt wurden 21 cDNA-Insertionen sequenziert und in die Proteinsequenzen des Leserasters der Aktivierungsdomäne übersetzt (s. Tafel 4.5). Die cDNA-Insertion des Klons 3 kodiert den Transkriptionsfaktor ERF4, allerdings nicht im Leseraster der Aktivierungsdomäne. Die Sequenz dieses Gens ist am 5'-Ende komplett, am 3'-Ende fehlen die letzten 69 Nukleotide. Die cDNA des Klons 23 enthielt ein im Leseraster der Aktivierungsdomäne vollständig kodiertes Protein, das in den Gen-Datenbanken zunächst als PSII-X-Protein beschrieben war. Wegen der Beschreibung als Protein des Photosystems II wurde der Identifizierung keine große Bedeutung beigemessen.

Mittlerweile wird das Protein in den Gen-Datenbanken aber als hypothetisches Protein beschrieben, offensichtlich war der frühere Eintrag der Datenbanken fehlerhaft. Das Gen wird nun als At2g06520 bezeichnet.

4.1.4 Beschreibung der beiden potenziellen Spezifitätsfaktoren

Die cDNA-Insertion des Klons 3 kodiert im Leseraster 3 199 von 222 Aminosäuren des Proteins ERF4 (*Ethylene Responsive Element Binding Factor 4*), welches auch unter dem Namen RAP2.5 beschrieben wird. Hierbei handelt es sich um einen mutmaßlichen Transkriptionsfaktor aus der ERF- bzw. RAP2-Familie. Die Lokalisation wird mit „wahrscheinlich nuklear“ angegeben. Das Protein besitzt eine AP-DNA-Bindedomäne und ist vermutlich an der Regulierung der Blüten- und Samenentwicklung beteiligt (Okamoto *et al.* 1997). Die cDNA-Insertion des Klons 3 beinhaltet noch die Nukleotide –1 bis –20 von RAP2.5. Das Gen befindet sich auf Chromosom 3, und trägt den Namen At3q15210. Die molare Masse des Proteins beträgt 23741 Da.

Über die Funktion des Gens At2g06520 ist noch nichts bekannt. Die cDNA-Insertion des Klons 23 enthält dieses Gen vollständig. Da das Gen keine Ähnlichkeit mit bekannten Genen hat, wird es als hypothetisches Gen bezeichnet. Das im Internet aufrufbare Programm PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp>) gibt eine Wahrscheinlichkeit der Lokalisation des Proteins an, die für die innere Mitochondrienmembran bei 0,857 und für die Chloroplastenthylakoidmembran bei 0,627 liegt, eine Proteinstrukturanalyse wurde im Internet unter <http://bmerc-www.bu.edu/psa> vorgenommen. Alle Ergebnisse sind in Tafel 4.4 zusammengefasst.

Tafel 4.4: Ergebniszusammenfassung der computergestützten Proteinanalyse von Klon 23.

Proteinsequenz des Gens At2g06520

```

1  MASTSAMSLVTPLNQTRSSPFLKPLPLKPSKALVATGGRAQRLQVKALKMDKALTGIS
..  .....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+.....+
59 AAALTASMVIPeIAEAAGSGISPSLKNFLLSIASGGLVLTVIIGVVVGVSNFDPVKRT
..  .....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....+

```

Geladene Aminosäurereste sind entsprechend markiert

Sekundärstruktur-Vorhersage:

Helixwahrscheinlichkeit: AS1–10: $\approx 0,5$; AS 40–75: 0,56–0,85
 Faltblattwahrscheinlichkeit: AS 95–106: 0,51–0,78
 Wahrscheinlichkeit eines Knicks: AS 1–116: $<0,193$

PSORT-Analyse:

N-terminale Signalsequenz: Keine
 Transmembranregion: AS 90–106, Typ-II-Membranprotein
 Mitochondriale Zielsequenz: AS 41–46
 Apolares Signal für Intramitochondriale Sortierung: AS 53–68
 Apolares Signal für Intraplastidäre Sortierung: AS 86–107
 Status als Chloroplastenprotein: 0,16 (nicht klar)
 Status für innere Mitochondrienmembran: 0,80 (wahrscheinlich)
 Status für nukleäres Signal und Peroxysomenprotein: 0,0 (negativ)

Tafel 4.5: Proteinsequenzen der potenziell positiven Klone im Leseraster der Aktivierungsdomäne.

Die Aminosäuren bis zum ersten Stoppkodon sind fett gekennzeichnet, Proteinleseraster mit Startkodon sind unterstrichen.

>1
KRTVAGKWFVSVASSYRVSRSTASTVSCSTSDRTSSGGETTA•WSQVERRSAPKKNKVASRGIFQCPTTW•SSAVCRGAWFAVISPRVCEGSNIPVS•EKPACR•A
 NCYTLGVFVIKEGSRTOGS•NWVLALRCYVGRHWN•SS•GTKQFW•DCGKADSGWWCQFQIG•RNYREDGRR•VPEDGGRCSCTHCGV

>3
SNLSIREWPRWA•NPTRLLLTRPTIMPRRFVTEALGSVLGAVMPRSEIRARKPASGLALSIRLKRRLVLTIRRRVIFVVLRLRPLISQLFSS•VTRRSLPVS
 RVALARAARSTVLLLR•LCLQRRLGMFPRSSLSVSAEAAAARVIRSRVSLTFWT•WGSVT•VVVSLLL•HRLDRRWCMRLRRRWLVVPKATLIRHRS
 LSK

>3 (Leseraster 3)
MAKMGLKPPDATTNQHNNNAKEIRYRGVRRKRPWGRYAAEIRDPGKTRVWLGTFTAEAAARAYDTAARDFRGAKAKTNFPFLELSDOKVPTGFARSPSOS
STLDCASPTLVVPSATAGNVPPQLELSLGGGGGGSCYQIPMSRPVYFLDLMGIGNVGRGQPPPVTSAFRSPVHVATKMACGAQSDSDSSSVVDFE

>6
ALEKENIQTESDQTGQLFPVIGKQPVQTKPFTAVQVT•VSRKL•SSTKVDLLKESKLTGSCMSIVSMIHVKHQKRVNVTVP•G•MNGYCVGYTRREEQVSF•MSK
 RVSWTKY•WRMRQKL•LTKQREELKRR••••RR•NFQGRVRLWLCWKWITWDPSTLTIILVSSIIFINLIRSLVSGSFTSLTKTRS•TIIVKRCLSFSDG

>12
FFFSV•KINPCFYFDNQFIIQFVRRNKNAEYIISHFERLQQLK•GQT•R•DQENTYF•YLVVHSNFPSSQQAQLTQPI•AKALHFLANKCSYRL
 SPLFLS•SKEPPIQSPQDQTLR•LFARLVSQVEQYQSHTHLLYHYCLNPFHSSLP•IRNPQFLRTFHP•SNKMLDVFTSL•IIGGSTSLCK•SSPLAACT•S
 SVSCSSP

>14
FFFFFFFGEIKHLQKEGQVLDNINNRRRRNDREQIR•LATQVKHIHIREIDIEFNHPKLGSYPLLEVAKM••ATMCPIEPQARTSTMLNPIGSFDFKR
 LTYSLARS•PASKWVFPFCGSKGPCFATFSLWKLKTKRPRKRERPVLRMTMEGLSSALITAEEDFLPVVDSLGRAEEPPRRRGRPNWEMEL

>23
KDQSRKTKRSEEMASTSAMSIVTLPINOTRSSPFLKPLKPKSKALVATGGAORLOVKALKMDKALTGISAAALTASMVIPETIAEAGSGISPLKNFLLS
IASGGLVLTIVLIGVVGVSNFDPVKRT•DLYIFLTSLL•SVLLLCIRFNVAAMNFWIKVFFVS•IRKTIET

>27
QNVIIYLHGTIQ•NIT•EKYLSPTICMEDNKAKQSKIRINKQV•YDELEEDYNSIDS•LAIKSRHTWSAEKQTRWLN•R•EEP•DRT•SWA•TSTT•STQT•
 T•S•VSAWHRYSYSENHSPRNPSSLRQAAPIAVPRV•FQPPSCSYVPGKTSRCCYSYRIADHRSIL•LRFHSHKRSRG•GYGL•N•DRDCE

>31
 •KVILDL•MLWHSILMGRVSLVEKVTVT•GCIILTPTTSTSRFRLLERQPFRIFEKVSHSGFCFLSLLTFSCFYLLPIQIP•••SF•I

>35
SFLSS•DFVFWVPGC•LMSQRLW•GESWFYFLWIDL•FQICFNKLDLDFAFQF•VFLVMNLESGLVSLFFNLGFFPIRSVLVPGRCVLVLAGLVLGR
 VFLANICITYPLYFNCKVLI•SGIKNNRYAT

>37
FDDVSVFS•PRNVTDWS•T•LFKTRSRNENLTEIFTCHKLTSG•AAKLIQFSP•GFYSL•CSR•FACGRSYRRSSENSVSE•RFLFFPVILNELSQRRETR
 SLCSLDCRFREDIFYAIFCWYNNRGI•FVLFRTATTT•LS•SKNLWYSTATLFLCRFFVSLCINTVCFKFTFHLQNYLSLSRFFFKISGI

>45
SKCITFFSRVNLQSHITILHR•VLN•QEKKNREKPLTLFINSVTY•SRIA•THRQIQSQP•SPAIKPPPNQQRFLPSPETPKSSHQTYSTVHF•PPPAPF
 TRNHYHTSETSESP••PKLRRHFQEENTWDSLNPQRYESSRLDEPHQS•ADQRTI•DHVTKPLPQSQP•ERFESRFRNTPDSV•DSNGDDNSR•ISRD
 L

>56
FFVVSFNDVNFGTWVWLPSGGWKEEGGGTRPPSARVA•YLASARAEQCPLAAGIMALRFTFVNLNKTGKLVAI•CMILSG•NVEGSSGWLAMDESLISSVS
 NVNVASLDSTPGGIPMYSSPSIFRGLTMDSSRISWSFFPEAYSRI•PPHSHPNVR•••DC•LPGSVSGDELAIRFKHSQSQISRGFSPTGSKEFCI

>60
FFFF•M•L•ILFIIISLSHTISCTDIYL•VNTKKQNKILF•NLHSFNRTDSDFRHNHVVF•DQSLVNAILCF•ASDGLTSVAKPMA•RNLITYQVISSCHH
 SKPCRAENSKAW•LLCHPSNARAATHQLFLDKSPVFHACFPHT•QAEFTSQVI•YTLFLHPFPKR•MESHPLRIKQPLEPADAKCRWFEGIDRMAASP
 SP

>69
FFKTPQLEKKRFDYTKIPQRKVHKFT•NRPQTNSLSLSFT••AAHFPGTKLVAKAQALLTGSAKWSARF•SKGPFVPTMA•TKNPNIEIANLPFLSS
 FTFNSAKASGSVARENGSKLPPG•SKSSASPNGSPATL•PSTAPMRIT•VAQMAKML•AWTKLGLPK•SNPPSLKICEPALNQTASPNTTPFLANS

>86
DGWITRCSIGGS•RKLKDQWLQPSSEWLKSGGSKV•TCRQSSAE•GDFSPVRDWACCCWFSWWLVCSGCPRRCYFDQSWPSSSSFRWPSWDR•LRPSKRLC
 IGIERQVLLTAIATNRSCS•SQRICKGYHKCEAIDRQESLAICSKRSSFQGLSSL•S•HNHFPPNPRMRRSHSRISPPSSITIDNLDYAAKKKSPSAG•EV
 YAEA

>89
RRLVPGEEEEER•ENGD•WIC•LSAALSEGS•CQDDVCR•GSSWNQELQLPDGALRLQETQRWYLHLQPWQNMKGAPDGC•SYCCH•EPTGHRPVS•ALWT
 ESCVEVCSVHWSQCHWKTHSWYHLQSDADILQ•TKAVDSY•PKN•PPAYQGRFCFKGKSHNCF•HRLFNEIC•HWYPSQQQGAQHWPFLASGSHGSPD
 AWNHCC

>93
EFTVIFV•K•SNAIRFESLLIITVQLEKSYQYKTNPKKVCQSHQWIRVFFFSFFLKVSRWKKKRLVKFTSLLQKTSFLKELIHR•SNLSRRFNNLHSS
 IIQTLNFWLSRTFTTGNNGSGMTHSTTRWCSSNKSNRLLSTTCLYQCCSIFFCASADFSNENDTFCLRINKEFLOAVDKVCPVKRIPDTSYTSRLA•THC
 SCLENS

>99
WYSEQLEMMETRL•Q•PT•VSFLARKAPC•RLWRRLFQN•G•LKRIVLK•AGLKPPFSMDFQVLLLLKFCSSSRL•EKITSKQRRISLKNLFL••GSKEYS
 K•D•LKETQHF•TGLLTIVV•CRKSLNLRSHFR•IETEPSSRF•SITRTG•RMTRHRVEKSTGSKRYTITWRLMSQAIQDKHM•TTEI•TSDRTRIT

>108
F•FITKTAIH•IIFIQIG•KLQRNRTKLQTKQERSRQSNQTKQKHESIITCFLRNQKQEEHVKNP•RHFR•VRQVHR•VVQPSRPSDQSLRQQQLVQ
 RNVLGSWIHRRMDRRRCWQHQR•DQWREERWFRENPSWDQRRWRRCRKR•••SPSLLLLSILVQPQRCGLEPPHHR•RI•GGNKRWSREAEERSSR

>113
DGWITRCSIGGS•RKLKDQWLQPSSEWLKSGGSKV•TCRQSSAE•GDFSPVRDWACCCWFSWWLVCSGCPRRCYFDQSWPSSSSFRWPSWDR•LRPSKRLC
 IGIERQVLLTAIATNRSCS•SQRICKGYHKCEAIDRQESLAICSKRSSFQGLSSL•S•HNHFQQTQ•EVTQGSQHQRVYRQSGLCGEEESFAG•EVL
 C•DA

>115
INQTFDNPPIEIVS•REKEHRQ•EMK•AEI•IHKNVLEKLSFGAEAWLVGNETDALDLTGVESEDDPNEGARVLLLAFFNFLQHLSSGSGVASEQWKLPHCPVPS
 IIVVSGSVSLTVHKSVL•LEFNTRNPLVAEKVNFSLQFDVLRSGR•DRVSNFFFP•IGGHTFMQLTLPVACDGSVDLVGLAG

Durch die komplexen und empfindlichen Wechselwirkungen zwischen Core-Enzym, Zusatzfaktoren und Nukleinsäure konnten über die Hybridsysteme keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich deshalb auf funktionelle In-vivo-Untersuchungen des Core-Enzyms. Im Vordergrund stand die Erforschung von Wechselwirkungen einzelner Proteindomänen innerhalb des Enzyms.

4.2 Charakterisierung der RNA-Polymerasen des T7/SP6-Typs durch heterologe Komplementation

Bei *Arabidopsis thaliana* und anderen Pflanzen wurden keine Gene gefunden, die eine Ähnlichkeit zum Gen des Spezifitätsfaktors Mtf1p der Hefe besitzen. Die Suche nach ähnlichen Proteinen kann sich dabei ausschließlich auf die Aminosäuresequenz beziehen, nicht auf die Proteinstruktur. Die mit diesen Faktoren interagierenden Organellen-RNA-Polymerasen besitzen hingegen große homologe Bereiche, was auf eine große Ähnlichkeit hinsichtlich der Sekundär- und Tertiärstruktur hindeutet. Es ist deshalb anzunehmen, dass die gesuchten Faktoren ebenfalls eine ähnliche Sekundär- und Tertiärstruktur besitzen. So sollte es möglich sein, dass RpoT;1 oder chimäre Konstrukte aus RpoT;1 und Rpo41p in der Lage sind, mit dem Spezifitätsfaktor der Hefe (Mtf1p) in Wechselwirkung zu treten und die Aufgabe von Rpo41p zu übernehmen. Dies kann durch heterologe Komplementationsexperimente überprüft werden.

4.2.1 Heterologe Komplementation

Bei der Hefe ist es möglich, gezielt Gene auszuschalten oder zu verändern, indem linearisierte Plasmide mit homologen Sequenzen des entsprechenden Gens in die Zellen transformiert werden. Durch Rekombination bei der Replikation des Genoms gelangen diese DNA-Abschnitte in das Genom und schalten so das gewünschte Gen aus. Durch miteingebrachte Reportergene kann die Integration in das Genom verfolgt werden. Das gezielte Ausschalten von Hefegenen lässt sich ausnutzen, um die Funktion homologer Gene anderer Spezies oder aber chimärer Gene in der Hefe zu testen. Dazu werden Plasmide mit den entsprechenden Genkonstrukten in die Hefezellen transformiert. Wird dadurch der Defekt ausgeglichen, so spricht man von artfremder oder heterologer Komplementation.

4.2.2 Fusionsgene aus Hefe- und Arabidopsis-RNA-Polymerase

Die mitochondrialen RNA-Polymerasen des T7/SP6-Typs besitzen zwar lange Bereiche mit großer Übereinstimmung (s. auch 1.4), aber vor allem am N-Terminus und bei der Hefe auch am C-Terminus, gibt es Regionen, die speziesspezifisch sind. In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte durch heterologe Komplementationsstudien gezeigt werden, dass weder die komplette RNA-Polymerase von *Arabidopsis*, noch chimäre

Enzyme aus C-terminalen Arabidopsis- und N-terminalen Hefeteilen in der Lage sind, die Funktion der mitochondrialen RNA-Polymerase von Hefe zu übernehmen. Als Folge hiervon besaßen alle Mutanten mit den chimären Enzymen keine mitochondriale DNA mehr (ρ^0), da die RNA-Polymerase auch bei der Replikation des mitochondrialen Genoms eine Funktion besitzt (s. 1.5). Eine besondere Ausnahme bildet das Konstrukt K2, siehe hierzu Punkt 4.2.3.

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob es überhaupt möglich ist, dass chimäre Polymerasen die Funktion der natürlichen Polymerase übernehmen können. Da bei der Hefe auch der C-Terminus (zwischen den letzten beiden konservierten Domänen) spezie-spezifisch ist, wurden nur Sequenzen des in allen Spezies konservierten Mittelteils durch homologe Sequenzen von *Arabidopsis* ersetzt. Die Konstrukte wurden aus dem Konstrukt K1 (T.Stein 1998) hergestellt. Dieses besitzt N-terminal DNA-Sequenzen von Hefe und C-terminal DNA-Sequenzen von *Arabidopsis*. Es wurden verschieden große Regionen vom Arabidopsis-C-Terminus durch homologe Sequenzen von Hefe ersetzt, sodass sich nur noch im Mittelteil Arabidopsis-Sequenzen befanden (Abb. 4.6).

Strategie zur Herstellung der Konstrukte K4, K5 und K6:

Durch Sequenzvergleiche mit dem Computerprogramm Clustal X wurden die homologen Sequenzen zwischen *Arabidopsis* und Hefe bestimmt (s. Anhang II). Nach einer Schnittstellenanalyse wurden drei geeignete Sequenzen für den Austausch bestimmt. Die entsprechenden homologen Sequenzen der Hefe wurden mit Hilfe der PCR (3.7) amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden so synthetisiert, dass an den Enden der amplifizierten DNA die gewünschten Schnittstellen entstanden. Die folgenden Primer wurden

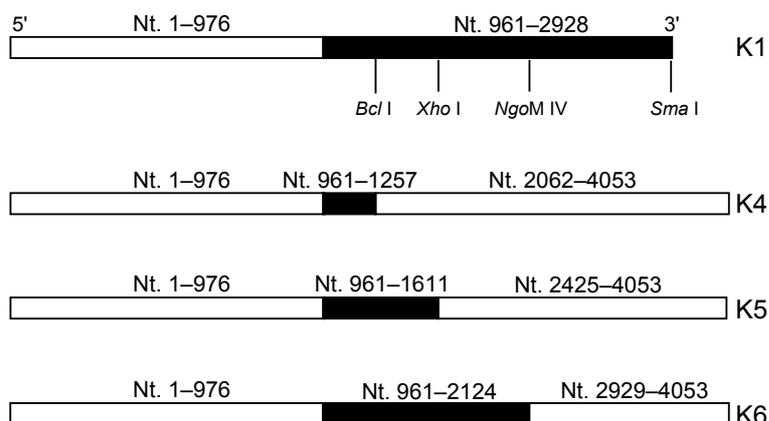


Abb. 4.6: Chimäre Gene der mitochondrialen Hefe (*RPO41*) und Arabidopsis-RNA-Polymerase (*RPOT1*)
Die Sequenzen der Hefe sind weiß, die von *Arabidopsis* schwarz dargestellt. Die Ziffern bezeichnen die Nukleotide des jeweiligen Bereichs. Die Konstrukte K4 bis K6 wurden aus dem Konstrukt K1 hergestellt, indem mit den eingezeichneten Restriktionsenzymen die entsprechenden Arabidopsis-Anteile herausgeschnitten und durch homologe Sequenzen der Hefe ersetzt wurden. Die DNA-Sequenzen im Bereich der Schnittstellen können dem Anhang II entnommen werden. Alle Gene befinden sich im Plasmid YEp351.

verwendet: RPO41-ENDE (SmaI): alle Konstrukte; BclI-RPO41: K4; XhoI-RPO41: K5; NgoMI-RPO41: K6. Die PCR-Produkte wurden in den pGEM-T-Vektor inkloniert und zur Überprüfung komplett sequenziert (in Kooperation mit der Gruppe von Dr. Weihe und Prof. Börner, Humboldt-Universität Berlin). Die Arabidopsis-Sequenzen in K1 wurden dann mit den entsprechenden Restriktionsenzymen herausgeschnitten, ebenso wurden die neu amplifizierten Sequenzen aus dem pGEM-T-Vektor herausgeschnitten. Die gewünschten DNA-Banden wurden über Agarosegele isoliert (Dialyse-Verfahren). Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht. Die Ligationsansätze wurden in den E.-coli-Stamm RR1ΔM15 transformiert. Nach Plasmidisolierung aus einigen E.-coli-Klonen wurden durch Proberestriktionen korrekt ligierte Plasmide identifiziert (Abb. 4.7 B–D).

4.2.3 Herstellung eines C-terminal deletierten Rpo41p

Das chimäre Gen K2 aus Vorarbeiten konnte zwar nicht die Funktion der mitochondrialen RNA-Polymerase wieder herstellen, aber die entsprechend transformierten Hefezellen besaßen ein stabil replizierendes Mitochondriengenom (Petite-Genom, rho⁻, s. 1.3 und 1.5). Dieses chimäre Gen besitzt nur einen relativ kleinen Arabidopsis-Anteil am C-Terminus (810 bp, Abb. 4.8). Durch die Entfernung dieses Anteils aus dem Gen sollte überprüft werden, ob dieser eine Relevanz für die Bildung und den Erhalt des Petite-Genoms hat. Hierzu wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen der Arabidopsis-Teil entfernt, die dabei entstandenen glatten Enden wurden wie vorher beschrieben ligiert und das entstandene zirkuläre Plasmid transformiert. Durch eine Kontrollrestriktion mit dem Enzym *Sall* konnte ein richtig ligiertes Plasmid identifiziert werden (Abb. 4.7 A).

4.2.4 In-vivo-Funktionsanalyse der hergestellten Konstrukte

Die hergestellten Konstrukte K3 bis K6 (Markierung durch *LEU2*-Gen) wurden in den haploiden Hefestamm Hsrp1 (ΔRpo41, *leu2*-Auxotrophie) transformiert (Abb. 4.9). Bei diesem Stamm ist das Gen *RPO41* disruptiert (Markierung durch *URA3*-Gen), infolgedessen unterbleiben die mitochondriale Transkription und Replikation und es entstehen Zellen ohne mitochondriale DNA (rho⁰). Es folgten die Kreuzung mit dem haploiden Wildtypstamm JRY (rho⁺, *RPO41*, *leu2*- und *ura3*-Auxotrophie) und die Induktion der Sporulation. Die entstandenen Sporen der Tetraden (Abb. 4.9-3) wurden auf Selektionsmedium (WA^{-leu}) vereinzelt und dann auf verschiedene Medien getestet. Sind die Produkte der chimären Gene nun in der Lage, die Funktion des defekten *RPO41*-Gens zu übernehmen, so wachsen alle vier Sporen einer Tetrade auch auf nicht fermentierbaren Medien (z.B. Glycerin), andernfalls wachsen nur die beiden Zellen mit Wildtypgen *RPO41*.

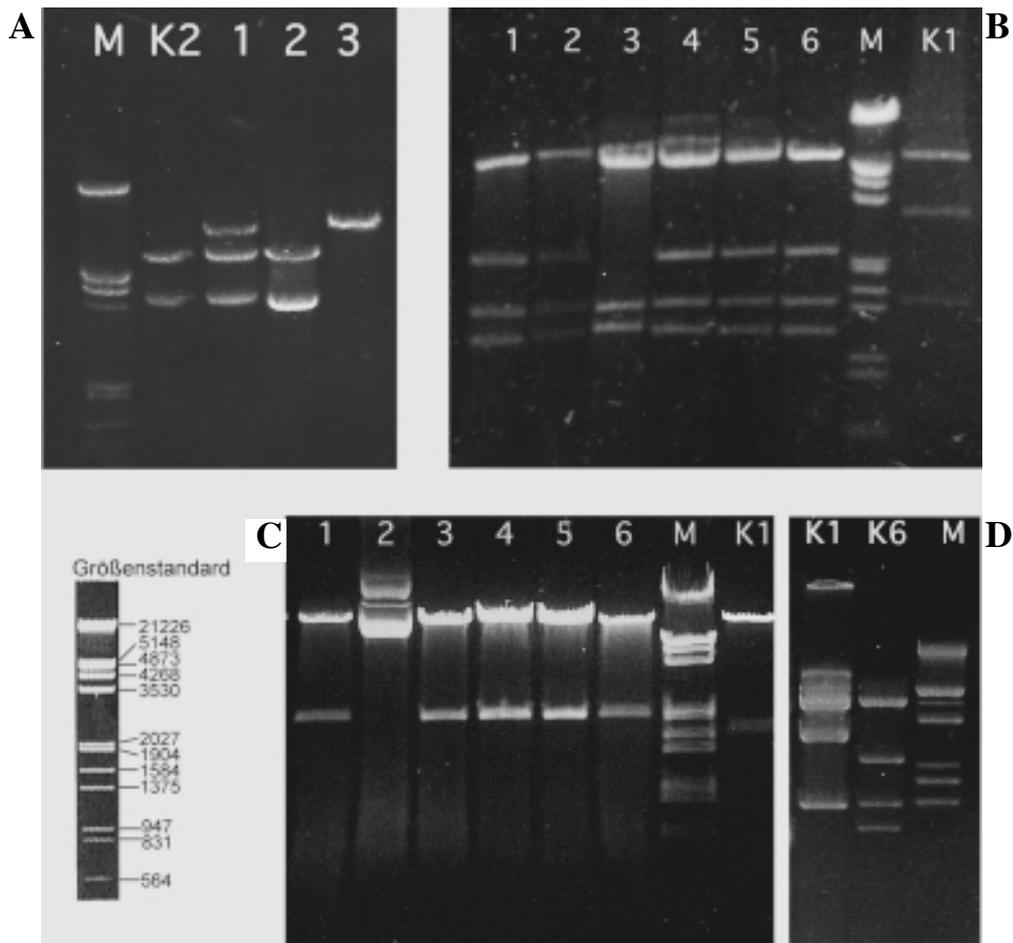


Abb. 4.7: Kontrollrestriktionen für die Konstrukte K3 bis K6.

Die im Plasmid YEp351 einklonierten Konstrukte wurden in *E. coli* amplifiziert. Nach Plasmidisolierung wurden zur Identifizierung richtig ligierter Konstrukte Proberestriktionen durchgeführt. M: Marker-DNA als Größenstandard; K1 bzw. K2: Ausgangskonstrukte.

A (K3): Restriktion mit *SalI*. Das Ausgangskonstrukt YEp351::K2 hat 2 Schnittstellen für dieses Enzym, YEp351::K3 hat nur noch 1 Schnittstelle. Auf Bahn 3 befindet sich ein korrektes Konstrukt.

B (K4): Restriktion mit *HindIII*. Das Ausgangskonstrukt YEp351::K1 hat für dieses Enzym 3 Schnittstellen, YEp351::K4 besitzt 4 Schnittstellen. Es entstehen Fragmente mit 5,6, 2,1, 1,6 und 1,1 kb. Alle Klone außer Klon 3 enthalten das richtige Konstrukt.

C (K5): Restriktion mit *XhoI* und *SmaI*. Hierdurch wird das Konstrukt aus dem Plasmid herausgeschnitten. Im Vergleich mit der Marker-Bahn sieht man, dass das Konstrukt die richtige Größe hat. Zum Vergleich wurde das Ursprungskonstrukt YEp351::K1 ebenfalls restringiert und aufgetragen. Alle außer Klon 2 enthielten das richtige Konstrukt.

D (K6): Restriktion mit *HindIII*. Wie K4 hat dieses Konstrukt 4 Schnittstellen für dieses Restriktionsenzym und es entstehen Fragmente derselben Größe.

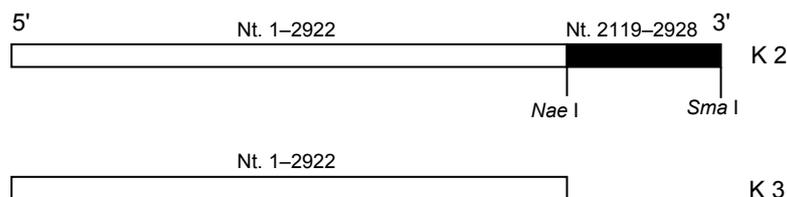


Abb. 4.8: Herstellung eines Plasmids mit C-terminal deletiertem *RPO41*-Leseraster aus einem chimären Genkonstrukt.

Die DNA-Sequenzen der Hefe sind weiß, die von *Arabidopsis* schwarz dargestellt. Die Ziffern bezeichnen die Nukleotide des jeweiligen Bereichs. Zur Herstellung des deletierten *RPO41*-Genfragments wurde aus dem Konstrukt K2 mit Hilfe der eingezeichneten Restriktionsenzyme *NaeI* und *SmaI* der RPOY-Anteil entfernt. Die dabei entstandenen glatten DNA-Enden wurden ligiert, sodass wieder ein zirkuläres Plasmid vorlag.

Abbildung 4.10 zeigt exemplarisch jeweils vier Sporen einer Tetrade mit den transformierten Konstrukten auf verschiedenen Medien. Es zeigte sich, dass keine der Sporen mit disruptiertem *RPO41* in der Lage war, auf nicht fermentierbarem Medium zu wachsen.

4.2.5 Analyse der mitochondrialen Genome

Von besonderem Interesse ist, dass eine nicht funktionsfähige chimäre mitochondriale RNA-Polymerase durchaus noch eine Rolle bei der Replikation des mitochondrialen Genoms erfüllen kann. Dabei entstehen die so genannten rho⁻-Genome (s. 1.5). Ob die Hefezellen mitochondriale DNA enthalten, kann durch den Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) überprüft werden. Er dringt in die Hefezellen ein und lagert sich in die DNA ein. Bestrahlt man die Zellen unter dem Mikroskop nun mit UV-Strahlen, so wird die DNA in den Zellen sichtbar.

Mit Ausnahme von Zellen mit Konstrukt K3 zeigten keine der transformierten Zellen mitochondriale DNA. Wie schon bei Konstrukt K2 ist die mitochondriale DNA aber nicht wie beim Wildtyp hauptsächlich entlang der Zellwänden zu finden, sondern es kommt in einigen Bereichen zu einer verstärkten Ansammlung von Nukleoiden (Abb. 4.11 C), wie es typisch für rho⁻-Genome ist.

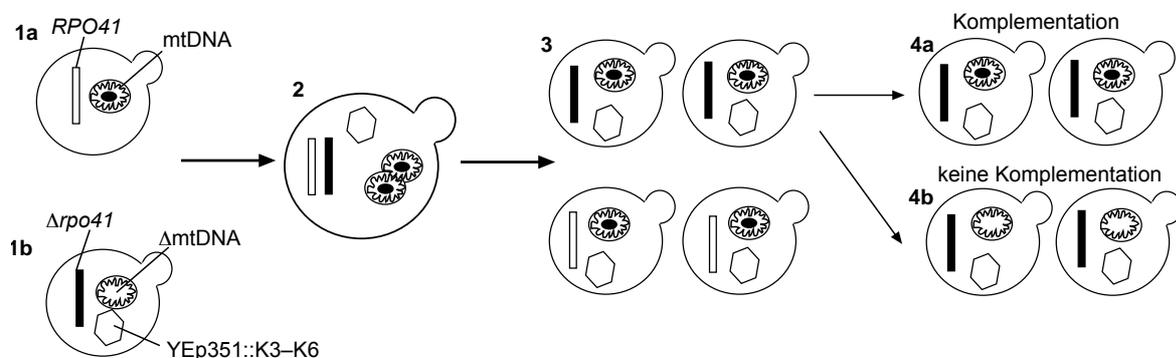


Abb. 4.9: In-vivo-Funktionsanalyse durch heterologe Komplementation.

Die Abbildung zeigt schematisch die Vorgehensweise der heterologen Komplementation beim Gen *RPO41*.

1a: Wildtypstamm JRY mit *RPO41* und mitochondrialer DNA.

1b: Hsrp1 ($\Delta rpo41$), atmungsdefekt und ohne mitochondriale DNA, transformiert mit YEp351::K3-K6

2: Kreuzung der Stämme JRY und Hsrp1 ($\Delta rpo41$).

3: Tetrade, durch Sporulation entstanden. Je zwei Sporen einer Tetrade enthalten das Wildtyp- bzw. das disruptierte *RPO41*. Alle Sporen besitzen das Plasmid YEp351::K3-K6 und (zunächst) mitochondriale DNA.

4a: Wachsen die Sporen mit dem disruptierten *RPO41* auf nicht fermentierbaren Medien (z. B. Glycerin) und behalten sie ihre mitochondriale DNA, so komplementiert das entsprechende eintransformierte Konstrukt den Defekt.

4b: Findet keine Komplementation des defekten Gens statt, so unterbleibt das Wachstum auf nicht fermentierbaren Medien und die Mitochondrien verlieren ihre DNA oder besitzen unter Umständen nur ein reduziertes Genom.

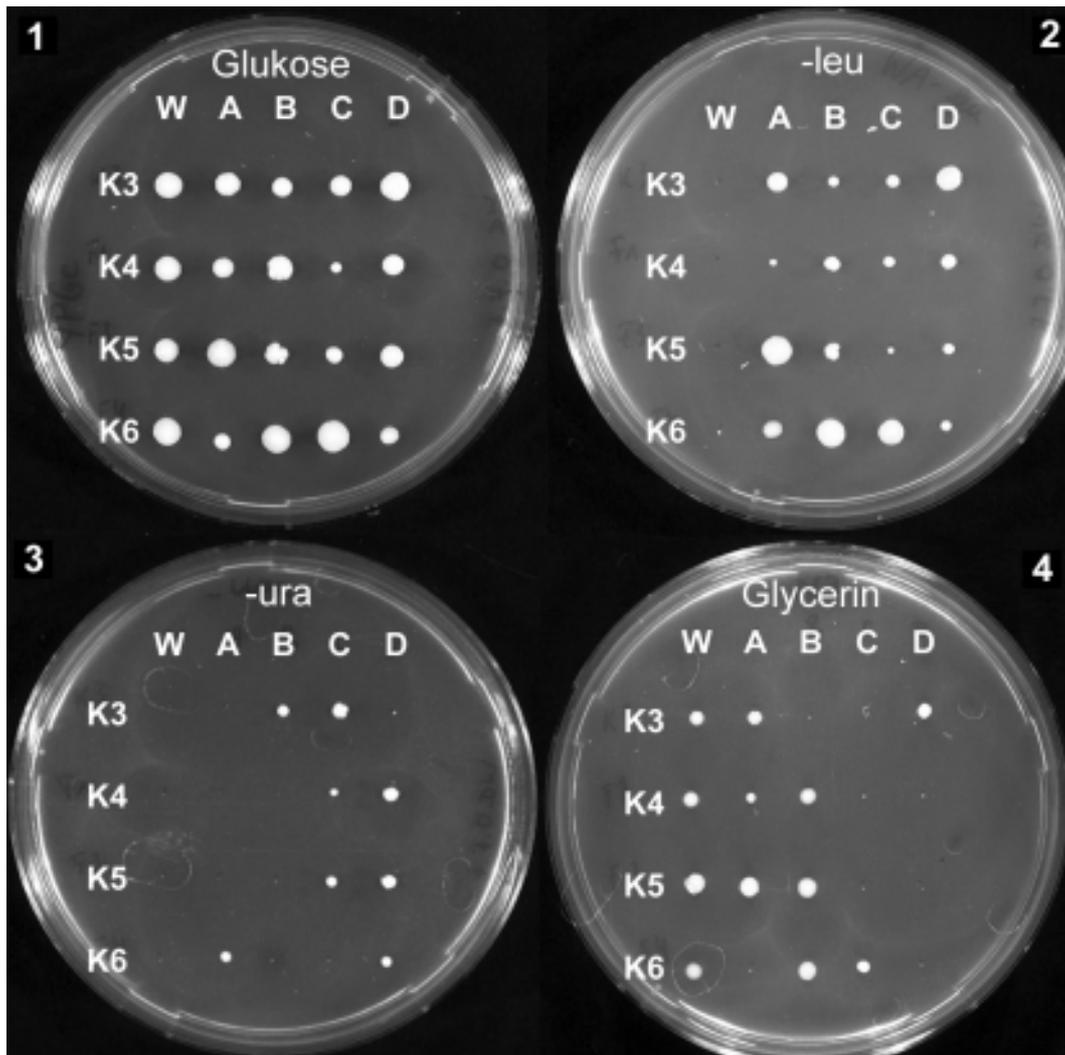


Abb. 4.10: In-vivo-Funktionstest chimärer Gene durch Tetradenanalyse

Für jedes Konstrukt wurden exemplarisch die vier Sporen einer Tetrade (A–D) auf verschiedene Medien aufgebracht.

W: Wildtyp-Hefestamm JRY; A–D: Sporen der jeweiligen Konstrukte; K3–K6: Tetradenreihen, transformiert mit den Konstrukten K3–K6.

1: Glukose-Vollmedium zur Kontrolle, es müssen alle Zellen wachsen.

2: Glukose-Mangelmedium ohne Leucin, es wachsen nur transformierte Zellen.

3: Glukose-Mangelmedium ohne Uracil, es wachsen nur Zellen mit disruptiertem *RPO41*.

4: Glycerinmedium, es wachsen nur atmungsfähige Zellen.

In den Wildtypstamm sind Auxotrophien für die Aminosäuren Leucin und Uracil eingeführt worden. Das Plasmid mit den Gen-Konstrukten besitzt das Leucin-2-Gen, durch die *RPO41*-Disruption wurde das Uracil-3-Gen in das Genom eingeführt.

4.2.6 Entfernung von Konstrukt K3 aus der Hefezelle

Die deletierten Mitochondriengenome der Hefe können auf vielfältige Art und Weise entstehen. Jeder Hefestamm ist für spontan entstehende Deletionen in seinem mitochondrialen Genom mehr oder weniger empfänglich (Ephrussi *et al.* 1949). Mutationen in einigen Kerngenen führen zum Ausfall der Atmung und meist zum kompletten Verlust der mitochondrialen DNA, so auch beim Gen der mitochondrialen RNA-Polymerase *RPO41* (Greenleaf *et al.* 1986). Je nach Gestaltung der experimentellen Bedingungen geht die

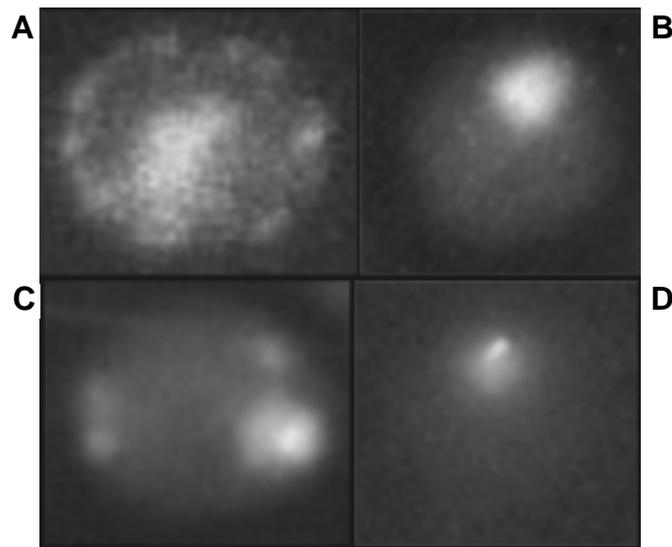


Abb. 4.11: Anfärbung von Hefe-DNA mit DAPI

A: Wildtypzelle, man erkennt die Kern-DNA als einen größeren, sehr hellen Bereich und die mitochondriale DNA als Punkte gleichmäßig in der Zelle verteilt.

B: Hefezelle ohne mitochondrialer DNA, hier ist nur die Zellkern-DNA eingefärbt.

C: Hefezelle mit Konstrukt K3 transformiert. Die mitochondriale DNA aggregiert an einigen Stellen in der Zelle zu Nukleoiden.

D: Zelle, die mit dem Konstrukt K3 transformiert war, aus der aber das Konstrukt entfernt wurde. Auch hier ist nur noch der Zellkern zu sehen.

mitochondriale DNA nicht komplett verloren, sondern es entstehen rho^- (Petite-) Genome. Dies ist der Fall, wenn die genetischen Veränderungen im Gen *RPO41* direkt an der haploiden Zelle vorgenommen werden (Fangman *et al.* 1990) und nicht über den „Umweg“ der Sporulation der diploiden Zelle in die haploide Zelle gelangen.

Alle früheren Experimente hatten gezeigt, dass der Erhalt bestimmter Petite-Genome unabhängig sein kann vom Enzym Rpo41p (Fangman *et al.* 1990). Um zu erfahren, ob die am C-Terminus verkürzte RNA-Polymerase (K3) für die stabile Replikation des mitochondrialen Restgenoms verantwortlich ist oder ob sie diese nur – vielleicht während der Sporulation – induziert, wurde das Plasmid mit dem Konstrukt K3 durch Anzucht in nicht-selektivem Medium (Glukose-Vollmedium) entfernt. Nach Anfärbung von Zellen ohne Plasmid mit DAPI (Abb. 4.11 D) zeigten die meisten Zellen keine mitochondriale DNA mehr. Nach längerem Wachstum in Glukose-Vollmedium waren alle Zellen rho^0 .

4.2.7 Test auf Hypersuppressivität

Spezifische, deletierte Mitochondriengenome der Hefe zeigen ein Phänomen, dass als Hypersuppressivität bezeichnet wird. Nach Kreuzung eines Hefestamms, welcher ein solches mitochondriales Genom enthält, mit einem Wildtypstamm, verdrängen diese Genome zu mehr als 98 % das mitochondriale Wildtypgenom (Abb. 4.12). Phänotypisch sind diese diploiden Hefezellen durch den Verlust der Atmungsaktivität zu erkennen. Untersuchungen dieser hypersuppressiven Genome haben gezeigt, dass sie in Tandemanordnung sich wie-

derholende ori-Sequenzen (Replikationsstartpunkte) besitzen (Faugeron-Fonty *et al.* 1984). Ob es sich bei dem hier beschriebenen deletierten Mitochondriengenom um ein hypersuppressives Petite-Genom handelt oder nicht, wurde durch Kreuzung mit dem Wildtypstamm JRY bestimmt. Die dabei entstandenen diploiden Zellen wurden zunächst auf Platten mit Glukose-Vollmedium ausplattiert und zwar in einer Dichte, in der die einzelnen Kolonien sichtbar waren. Von dort wurden sie auf Platten mit Glycerin-Medium überstempelt. Durch Vergleich der beiden Platten wurden die auf Glycerin-Medium nicht wachsenden Kolonien ermittelt. Es ergab sich ein Anteil von über 99 % der Kolonien, die auch auf Glycerin-Medium wachsen, folglich handelt es sich nicht um ein hypersuppressives Petite-Genom.

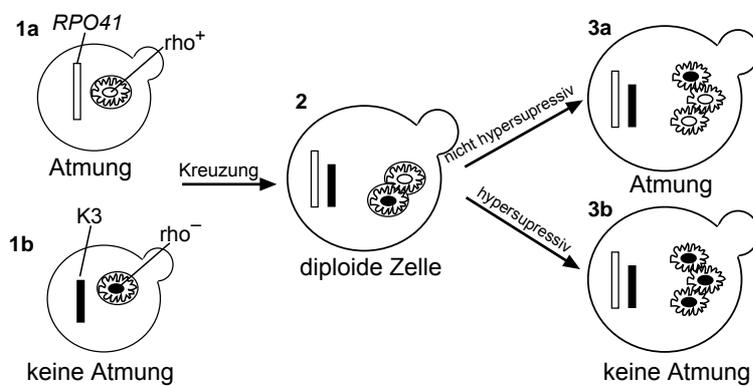


Abb. 4.12: Test auf Hypersuppressivität von rho⁻-Genomen.

Ein hypersuppressiver Hefestamm verdrängt nach der Kreuzung mit einem Wildtypstamm dessen intaktes mitochondriales Genom (3b). Bei einem nicht hypersuppressiven Hefestamm gibt es zunächst ein Gemisch aus rho⁻- und rho⁺-Genom (3a). Durch Wachstumstests auf Glycerinmedium kann die Hypersuppressivität bestimmt werden, da Zellen mit rho⁻-Genom nicht atmen können und deshalb dort nicht wachsen.

4.3 Komplementation des C-terminal deletierten Rpo41p *in trans*

Untersuchungen von Wang und Shadel (1999) hatten gezeigt, dass der Defekt einer $\Delta rpo41$ -Mutante komplementiert wird, wenn ein am N-Terminus deletiertes *RPO41*-Konstrukt auf einem Plasmid und die fehlende Proteinsequenz auf einem anderen Plasmid in dieser Mutante exprimiert wird (Abb. 4.13 B). Diese *in trans* komplementierenden Proteine deuten auf einen modularen Aufbau der mitochondrialen RNA-Polymerase hin. Um weitere Aufschlüsse hierüber zu erlangen, sollten andere Proteinfragmente von Rpo41p auf ihre Fähigkeit der In-trans-Komplementation getestet werden. Hierfür boten sich die beiden rho⁻-Genom produzierenden Konstrukte K3 K2 an. Die Sequenz des deletierten C-Terminus wurde über PCR amplifiziert (Primer: p-D6-RPO41-EcoRI und r-RPO41-BamHI) und dann in das Plasmid pA112 ligiert. Die Plasmide wurden dann in einen geeigneten Hefestamm transformiert und durch Sporulation und Tetradenanalyse auf ihre In-trans-Komplementationsfähigkeit untersucht.

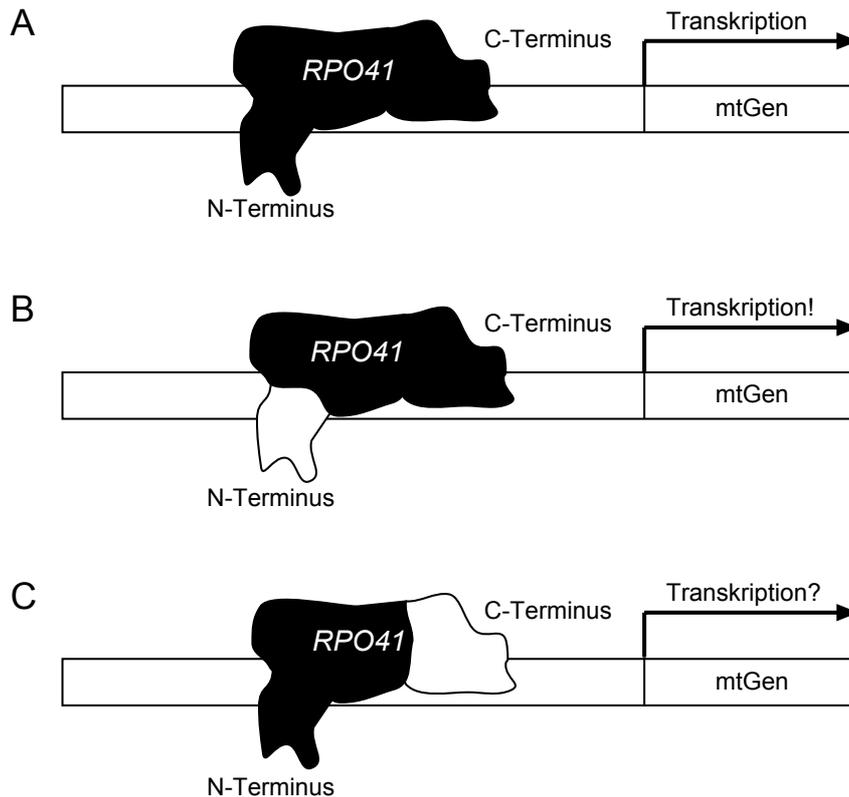


Abb. 4.13: In-trans-Komplementation von Rpo41p.

A: Wildtypsituation der Transkription des mitochondrialen Hefegenoms.

B: Am N-Terminus deletiertes Rpo41p wird *in trans* komplementiert. Wang und Shadel (1999) konnten zeigen, dass der Defekt eines $\Delta rpo41$ -Hefestamms durch zwei Proteinfragmente – ein am N-Terminus deletiertes Rpo41p (schwarz) und die fehlende N-terminale Proteinsequenz (weiß) – komplementiert wird.

C: In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob die unter B beschriebene In-trans-Komplementation auch mit einem am C-Terminus deletiertem Rpo41p (kodiert durch K3, schwarz) und der fehlenden C-terminalen Sequenz (weiß) funktioniert.

4.3.1 Herstellung eines Hefestamms mit geeigneten molekularen Markern

Da kein geeigneter Hefestamm für diese Untersuchungen zur Verfügung stand, wurde ein neuer diploider Hefestamm hergestellt. Die zu transformierenden Plasmide besitzen den *LEU2*-Marker (YEp351) bzw. den *TRP1*-Marker (pA112), sodass der neue Hefestamm entsprechende Auxotrophien besitzen musste. Weiterhin musste der Hefestamm heterozygot die *RPO41*-Deletion tragen. Die Herstellung des neuen Hefestamms sollte durch Kreuzung zweier haploider Stämme erfolgen, die Träger der gewünschten genetischen Eigenschaften sind. Durch anschließende Sporulation und Tetradenanalyse wurden die unerwünschten genetischen Marker herausselektiert.

Für die Kreuzung wurden die haploiden Stämme Hsrp1($\Delta rpo41$) und FY1679-18B (*RPO41*) ausgewählt (s. Tafel 4.14). Nach Sporulation, Tetradenanalyse, Selektion auf verschiedenen Minimalmedien und Testkreuzungen enthielten die haploiden Stämme DW318-

Tafel 4.14: Strategie bei der Herstellung eines neuen Hefestamms mit definierter genetischer Ausstattung.

1. Kreuzung von Hsrp1 ($\Delta rpo41$) (*a, his1, leu2, trp2, ura3, rpo41::Tn10/URA3*) mit FY1679-18B (*$\alpha, his3, leu2, trp1, ura3$*) auf Histidin-Mangelmedium. Gewünschte genetische Ausstattung:
 1. Spore: *leu2, trp1, (ura3), his1 (o. his3), rpo41::Tn10/URA3*
 2. Spore: *leu2, trp1, ura3, his3 (o. his1)*
2. Sporulation und Tetradenzerlegung
3. Selektion der Sporen auf Tryptophan-Mangelmedium: Wenn mindestens drei Sporen nicht wachsen, hat eine der Sporen die gewünschte genetische Ausstattung.
4. Testkreuzungen mit JRY α und JRY *a* zur Feststellung des Paarungstyps und mit KN79 (*$\alpha, trp1$*) und Hsrp1 (*a, trp2*) zur Identifizierung des *trp1*-Markers.
5. Kreuzung zweier geeigneter Sporen in Histidin-Mangelmedium zur Herstellung des diploiden Hefestamms mit der genetischen Ausstattung *a/ $\alpha, leu2/leu2, trp1/trp1, ura3/(ura3), his1/HIS1, his3/HIS3, rpo41::Tn10::URA3/RPO41$* .

7A und DW318-7D die geeignete genetische Ausstattung. Durch Kreuzung der beiden Stämme entstand der diploide Hefestamm DW318, welcher für die Transformation benutzt wurde.

4.3.2 Koexpression von Konstrukt K7 mit K2 und K3

Der deletierte, C-Terminus kodierende Teil von Konstrukt K3, wurde über PCR mit einer Überlappung von 219 Nukleotiden im 5'-Bereich amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass das Konstrukt am 5'-Ende die mitochondriale Importsequenz von 78 Nukleotiden kodiert (Abb. 4.15). Das so hergestellte Konstrukt K7 wurde in das Plasmid pA112 mit *TRP1*-Gen kloniert. Die Konstrukte K2 und K3 wurden nun jeweils mit K7 in den neuen diploiden Hefestamm DW318 transformiert. Es folgten die Induktion der Sporulation sowie die Zerlegung der entstandenen Tetraden. Es zeigte sich, dass jeweils alle vier Sporen in der Lage waren, auf nicht fermentierbarem Medium zu wachsen. Das disruptede *RPO41* wird somit sowohl von K2 (Daten nicht gezeigt) als auch von K3 jeweils *in trans* mit K7 komplementiert. Bei erhöhter Temperatur (37 °C) wurde der Defekt jedoch im Gegensatz zum Wildtyp wieder sichtbar (Abb. 4.16).

4.3.3 Entfernung der Konstrukte aus den Hefezellen

Um eindeutig zu zeigen, dass die Komplementation nicht auf ein Rekombinationsereignis zurückzuführen ist, wurde eine Spore mit *RPO41*-Disruption längere Zeit in nicht selektivem Medium (Glukose-Vollmedium) inkubiert. Hierbei verlieren einige Zellen spontan ihr Plasmid bzw. ihre Plasmide. Durch anschließendes Aufbringen auf die entsprechenden Minimalmedien werden die Zellen mit Plasmidverlust identifiziert. In Abbildung 4.17 ist exemplarisch an Zellen mit den Konstrukten K3 und K7 gezeigt, dass die Hefezellen nach Plasmidverlust nicht mehr in der Lage sind, auf Glycerin-Medium zu wachsen, der ursprüngliche Atmungsdefekt tritt also wieder auf.

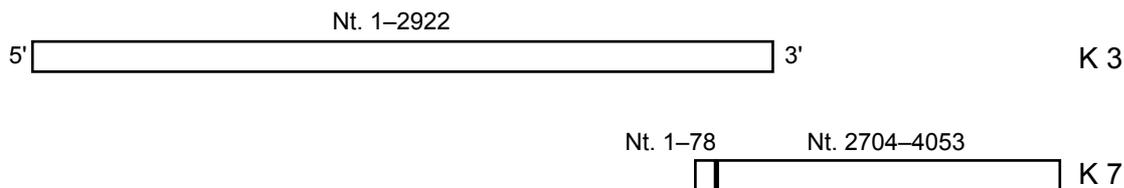


Abb. 4.15: DNA-Konstrukte K3 und K7 für die In-trans-Komplementation von RPO41.

Um zu untersuchen, ob das deletierte 3'-Ende von Konstrukt K3 *in trans* ersetzt werden kann, wurde über PCR das 1428 Nukleotide große Konstrukt K7 hergestellt. Dieses beinhaltet am 5'-Ende die 78 Nukleotide umfassende Sequenz für die Kodierung des Importsignals in die Mitochondrien und einen 219 Nukleotide umfassenden überlappenden Bereich mit K3 (Nt. 2704–2922). Das Konstrukt K7 wurde in das Plasmid pA112 kloniert.

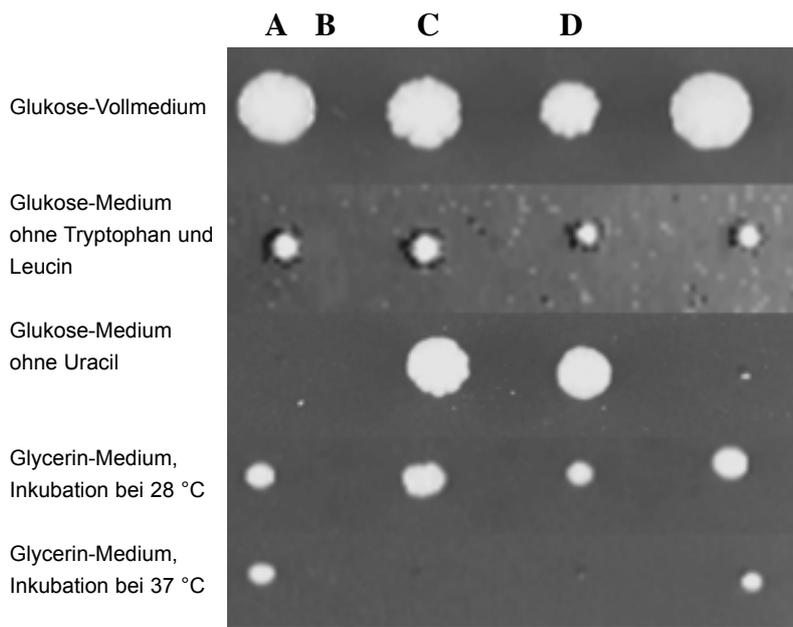


Abb. 4.16: In-trans-Komplementation durch die Konstrukte K3 und K7.

Exemplarisch ist hier eine Tetrade (A–D) abgebildet, deren vier Sporen auf verschiedene Medien getestet wurden.

Glukose-Vollmedium: Kontrolle, es müssen alle Sporen wachsen.

Medium ohne Tryptophan und Leucin: Es wachsen alle mit den beiden Konstrukten transformierten Sporen.

Medium ohne Uracil: Es wachsen nur die Sporen mit der RPO41-Disruption.

Glycerin-Medium: Es wachsen nur Sporen mit intakter Atmung. Da alle Sporen wachsen, komplementieren die Konstrukte den Defekt.

Bei erhöhter Temperatur (37 °C) tritt der Defekt wieder auf.

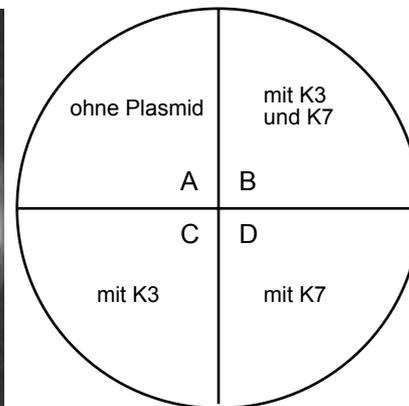
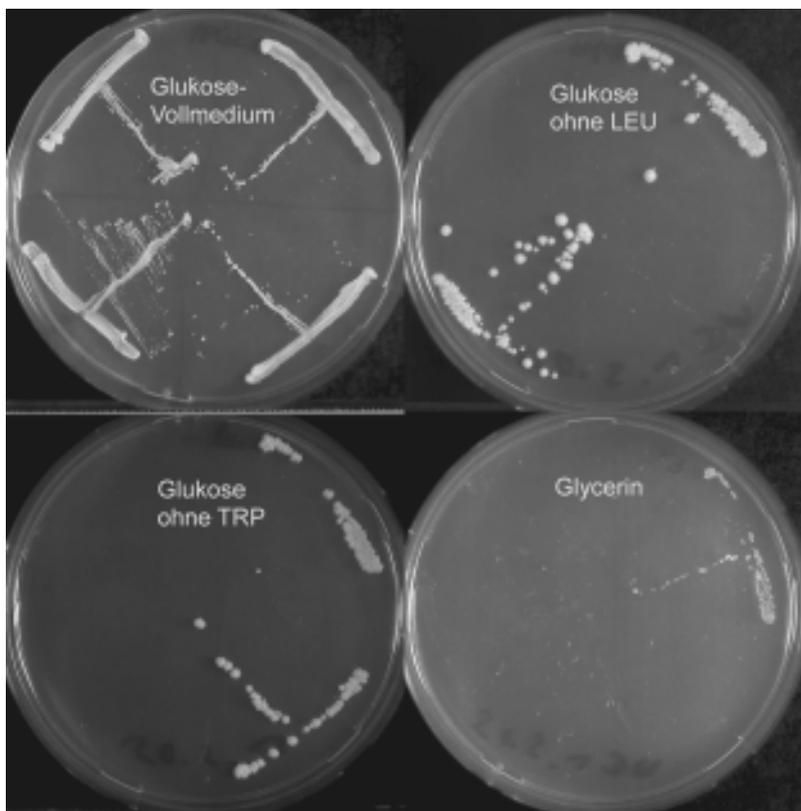


Abb. 4.17: Entfernung der *in trans* komplementierenden Konstrukte aus einer Spore mit disruptiertem RPO41.

Es wurden Zellen isoliert, die jeweils nur ein Plasmid verloren hatten und Zellen, die kein Plasmid mehr besaßen. Die Zeichnung gibt an, welche Zellen in den jeweiligen Quadranten aufgetragen wurden. Auf Glycerin-Medium wachsen ausschließlich Zellen mit beiden Plasmiden (Quadrant B der Glycerin-Platte).

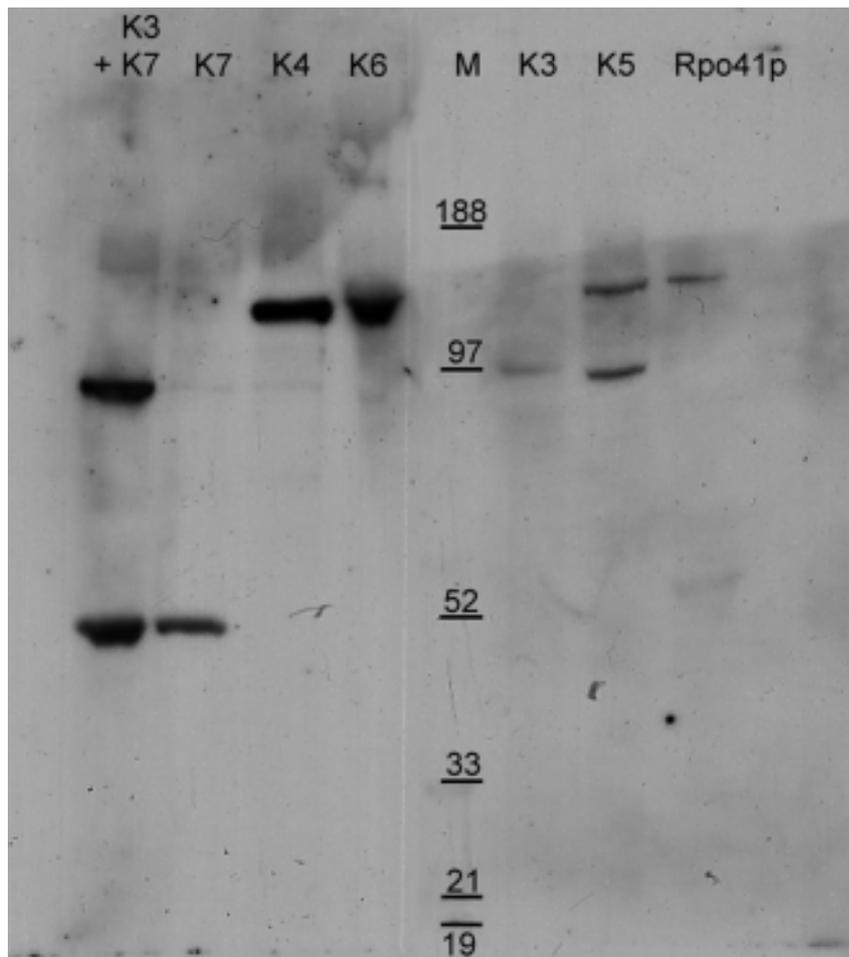


Abb. 4.18: Westernblot zur Analyse der Expression und mitochondrialen Lokalisation der Fusionsproteine.

Aufgetragen wurden Proteinextrakte aus isolierten Mitochondrien von Hefezellen, welche mit den entsprechenden Konstrukten (K3–K7) transformiert waren. Als Kontrolle wurden Mitochondrien aus Hefezellen isoliert, welche mit dem kompletten *RPO41* transformiert waren und Rpo41p expremierten. Der Westernblot wurde mit einem polyclonalen Antikörper gegen Rpo41p inkubiert. Durch einen sekundären Antikörper – konjugiert mit Alkalischer Phosphatase – wurden die chimären und deletierten Proteine im Autoradiogramm sichtbar gemacht. Rpo41p erscheint hierbei als Bande von 145 kDa, ebenso wie die Fusionsproteine der Konstrukte K4–K6. Die beiden getrennt expremierten Proteine der In-trans-Komplementation erscheinen bei ca. 100 und 45 kDa. Die zweite Bande bei K5 (ca. 100 kDa) trat auch bei anderen Westernblots auf und deutet auf einen spezifischen Abbau hin.

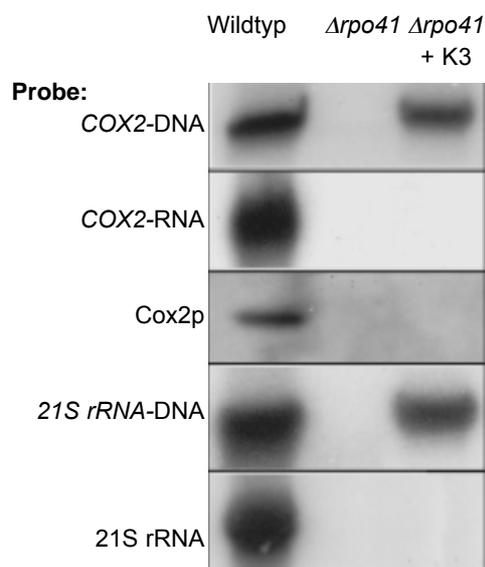


Abb. 4.19: Hybridisierung mitochondrialer Nukleinsäuren mit radioaktiv markierten Sonden und Detektion von Cox2p durch spezifische Antikörper.

Die Nukleinsäuren wurden im Agarosegel aufgetrennt und auf Zellulosemembranen gebロットet. Nach der Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden erfolgte die Belichtung eines Röntgenfilms.

Die Proteinproben wurden in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt, gebロットet und mit spezifischen Antikörpern markiert. Die Detektion erfolgte über sekundäre Antikörper, gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase, im Chemolumineszenz-Verfahren. Die Autoradiogramme zeigen, dass zwar die jeweilige Gene im Petite-Genom vorhanden sind, RNA und Protein aber nicht synthetisiert werden, d. h. es findet keine Transkription mehr statt.

$\Delta rpo41$ enthält keine Mitochondrien-DNA und dient als Negativ-Kontrolle, da es weder Signale für mitochondriale Gene, noch für deren mRNA oder Proteine liefern kann.

4.4 Nachweis der Expression und korrekte Lokalisation der Fusionsproteine

Um sicher zu stellen, dass die fehlende Komplementationsfähigkeit der beschriebenen Konstrukte K3 bis K6 nicht auf eine Fehllokalisierung der exprimierten Proteine zurückzuführen ist, wurden diese im Westernblot mittels Antikörper nachgewiesen. Hierzu wurden zunächst Mitochondrien aus den jeweiligen Hefezellen isoliert. Auf einem Polyacrylamidgel wurden die mitochondrialen Proteinextrakte aufgetrennt und dann auf eine Zellulosemembran geblottet. Die Membran wurde mit Anti-Rpo41p-Antikörpern (dankenswerterweise vom Labor Prof. Shadel zur Verfügung gestellt) inkubiert, um dann über das Chemolumineszenz-Verfahren die chimären Proteine bzw. die verkürzten Proteine sichtbar zu machen. In Abbildung 4.18 ist das Autoradiogramm des Westernblots dargestellt. Alle Konstrukte werden auf dem Blot detektiert und sind somit in den Mitochondrien lokalisiert.

4.5 Charakterisierung der mitochondrialen DNA in Mutanten mit C-terminal deletiertem Core-Enzym

4.5.1 Genomgröße und Expression des Petite-Genoms

Das durch die am C-Terminus deletierte Polymerase Rpo41p (kodiert durch Konstrukt K3) entstandene mitochondriale Petite-Genom wurde weiter untersucht. Um Aufschlüsse über die enthaltenen Gene und deren mögliche Transkription zu bekommen, wurden radioaktiv markierte DNA-Sonden hergestellt. Diese wurden zum einen mit dem Petite-Genom und zum anderen mit der gesamten aus diesem Klon isolierten RNA hybridisiert. Für die DNA-Sonden ausgewählt wurden die Gene *COX2* und *21S rRNA*. Die *COX2*-DNA-Sonde wurde über PCR amplifiziert, für die *21S-rRNA*-Sonde wurde einer Probe des Petite-Genoms *E41* verwendet, welches speziell dieses Gen enthält (Sor und Fukuhara, 1982). Die Nukleinsäuren des Klons mit dem Petite-Genom wurden im Agarosegel aufgetrennt, auf

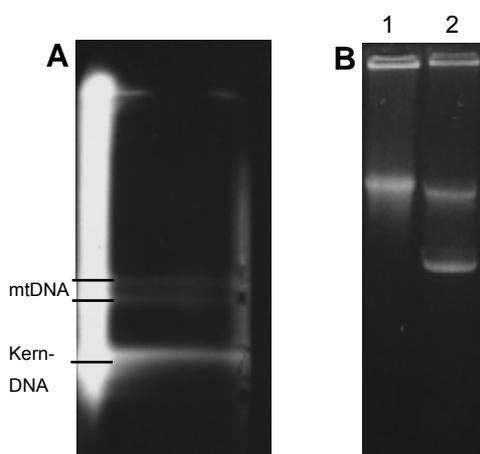


Abb. 4.20: Hefe-Gesamt-DNA aus einer Mutante mit Petite-Genom im Cäsiumchloridgradienten aufgetrennt.

A: Nach der Zentrifugation im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten zeigten sich unter UV-Strahlung zwei distinkte Banden mit mitochondrialer DNA (s. Abbildung). Diese wurden abgenommen, aufgereinigt und im Agarosegel analysiert.

B: Auftrennung der beiden Proben mitochondrialer DNA im Agarosegel. In Spur 1 wurde DNA der oberen Bande des CsCl-Gradienten aufgetragen, in Spur 2 die untere Bande mit Resten der oberen Bande. Wie man sieht, entspricht die obere Bande im CsCl-Gradienten (geringere spezifische Dichte) der oberen Bande im Agarosegel (größere Masse).

Zellulosemembranen geblottet und dann mit den Sonden inkubiert. Zur Kontrolle wurden Proben aus Wildtyp-Zellen und aus Zellen mit disruptiertem Gen *RPO41* aufgetragen. Im Autoradiogramm zeigte sich, dass sowohl die DNA des Gens *COX2* als auch des Gens *21S rRNA* im Petite-Genom vorhanden ist. RNA-Transkripte hingegen können nur bei Wildtyp-Zellen detektiert werden und auch das mitochondriale Protein Cox2p ist nur in Wildtyp-Zellen nachweisbar (s. Abb. 4.19)

4.5.2 Isolierung des Petite-Genoms

Um genauere Erkenntnisse über das Petite-Genom zu erhalten, sollte dieses sequenziert werden. Hierzu musste zunächst die mitochondriale DNA isoliert werden. Auf Grund des AT-Reichtums und der damit einhergehenden geringeren spezifischen Dichte lässt sich die mitochondriale DNA der Hefe in einer Cäsiumchloridgradienten-Zentrifugation von der Kern-DNA abtrennen. Die spezifisch leichtere Mitochondrien-DNA ist nach der Zentrifugation als schmalere Bande oberhalb der Kern-DNA zu sehen. Zum Sichtbarmachen der DNA wird dem Gradienten das fluoreszierende Agens Bis-Benzimid zugesetzt. Nach der Zentrifugation wird unter UV-Strahlung die Mitochondrien-DNA-Bande mit einer Spritze abgenommen. Es zeigte sich, dass die mitochondriale DNA zwei distinkte Banden aufspaltete (Abb. 4.20 A).

4.5.3 Identifizierung der mitochondrialen CsCl-Banden im Agarosegel

Die beiden beschriebenen Banden sollten getrennt analysiert werden. Deshalb wurde zunächst vorsichtig der größte Teil der oberen Mitochondrien-DNA-Bande abgenommen, im zweiten Schritt wurde die restliche Mitochondrien-DNA entnommen. Nach getrennter Aufreinigung wurden beide Proben im Agarosegel analysiert (Abb. 4.20 B). Hier erkennt man, dass die untere, spezifisch schwerere Bande des CsCl-Gradienten eine Größe von ca. 5 kb besitzt, die obere Bande hat eine Größe von über 10 kb.

4.5.4 Klonierung von Petite-Genom-Fragmenten

Die mitochondrialen DNA-Banden des Cäsiumchlorid-Gradienten wurden im Agarosegel aufgetrennt und dann über das Dialyse-Verfahren aus dem Gel isoliert. Um Erkenntnisse über die Sequenz des Petite-Genoms zu erlangen, sollten Teile davon sequenziert werden. Hierzu wurde die DNA zunächst mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt, um die erhaltenen Fragmente dann in ein Plasmid einzuklonieren. Es zeigte sich aber, dass keines der verwendeten Enzyme in der Lage war, die obere oder die untere mitochondriale DNA-Bande zu schneiden. Deshalb wurde die DNA mechanisch geschert. Die erhaltenen Fragmente wurden in das Plasmid pUC19, welches mit dem Restriktionsenzym *Sma*I (glatte Enden) geschnitten war, ligiert. Nach Transformation der Plasmide nach *E. coli* wurde aus den erhaltenen Klonen die Plasmide isoliert.

4.5.5 Sequenzierung

Die einligierten Fragmente der unter 4.5.4 erhaltenen Plasmide wurden in Kooperation mit der Gruppe von Dr. Weihe und Prof. Börner (Humboldt-Universität Berlin) sequenziert. Eines der Plasmide enthielt ein mitochondriales Fragment (Abb. 4.21). Dieses 104 Nukleotide umfassende Fragment entspricht im Mitochondriengenom den Nukleotiden 77619–77722 und liegt zwischen den tRNA-Genen für Phenylalanin [Genname: TF (GAA) Q] und Threonin [Genname: TT (XXX) Q2]. Es besteht hauptsächlich aus AT-Basenpaaren, unterbrochen von einem GC-Block.

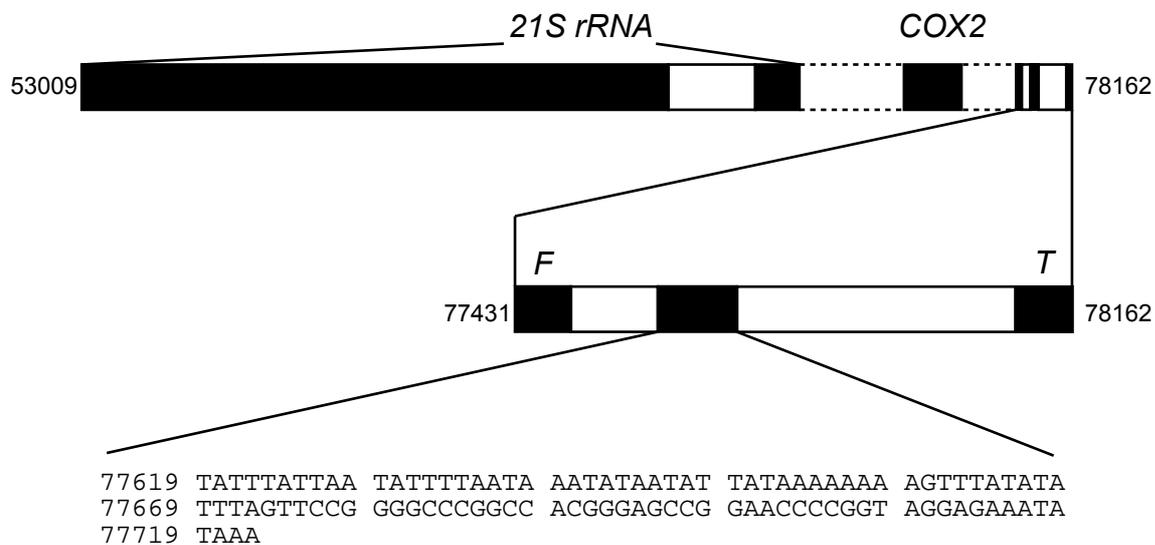


Abb 4.21: Fragment des mitochondrialen rho⁻-Genoms von Hefe:

Vom entstandenen rho⁻-Genom konnte ein Fragment sequenziert werden, das den Nukleotiden 77619–77722 des mitochondrialen Genoms entspricht. Die Sequenz liegt zwischen den tRNA-Genen für Phenylalanin und Threonin und 24610 Nukleotide vom Beginn des detektierten Gens *21S rRNA* entfernt. Dazwischen liegt das ebenfalls detektierte Gen *COX2*.

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde über verschiedene methodische Ansätze die Evolution der Phagentyp-RNA-Polymerasen untersucht. Über das Dihybrid- und Drei-Komponentensystem der Hefe wurde nach möglichen Zusatzfaktoren des mitochondrialen und plastidären Transkriptionsapparates von *Arabidopsis* gesucht.

In heterologen Komplementationsstudien mit chimären RNA-Polymerase-Genen wurde das Core-Enzym der Hefe (Rpo41p) weiter charakterisiert. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob die hoch konservierten Domänen zwischen verschiedenen Spezies austauschbar sind. Dazu wurden chimäre RNA-Polymerase-Gene hergestellt, die am N- und C-Terminus aus Sequenzen von *Saccharomyces cerevisiae* bestanden und im konservierten Mittelteil aus verschieden langen homologen Sequenzen von *Arabidopsis thaliana*.

Durch Komplementationsstudien mit einem verkürztem *RPO41* sollte die Funktion bei der Entstehung eines Petite-Genoms in der Hefe erforscht werden.

Ergänzend wurde der modulare Aufbau von Rpo41p untersucht, indem die RNA-Polymerase in zwei Teile getrennt in einem Hefestamm exprimiert und die Funktion durch Komplementationsstudien untersucht wurde.

5.1 Identifizierung von Zusatzfaktoren der Phagentyp-RNA-Polymerasen von *Arabidopsis thaliana*

Über das zunächst benutzte Dihybridensystem der Hefe konnten keine Zusatzfaktoren für *Arabidopsis* gefunden werden. Die Ursache hierfür könnte das Fehlen des Vollängenklons für das Gen in der Genbank sein. Bei der Hefe ist es so, dass eine Aktivierung des Dihybridensystems nur geschieht, wenn sowohl Rpo41p als auch der Zusatzfaktor Mtf1p mit der vollständigen Sequenz inkloniert vorliegen (Clifton *et al.* 1997).

Die fusionierte Aktivierungs- bzw. Bindedomäne des GAL4-Systems könnte auch für eine fehlende Interaktion verantwortlich sein, denn diese Domänen müssen in einem gewissen Rahmen räumliche Abstände zueinander und zum Promotor des Reportergens einhalten. Auch könnte eine Interaktion zwischen RpoT;1 und dem potenziellen Faktor durch die fusionierten Binde- bzw. Aktivierungsdomänen gestört sein.

Eine weitere Möglichkeit ist, dass eine stabile Interaktion der Proteine erst beim Binden an eine Promotorregion eines mitochondrialen bzw. plastidären Gens stattfindet. So konnte bei der Hefe gezeigt werden, dass der Spezifitätsfaktor Mtf1p zusammen mit Rpo41p an den Promotorregionen bindet, wodurch die Transkription initiiert wird (Mangus *et al.* 1994, Clifton *et al.* 1997).

Um dieses Problem auszuschließen, wurde das Drei-Komponentensystem entwickelt. Im Prinzip handelt es sich dabei um eine Erweiterung des Monohybridensystems, wo Interaktionen zwischen Protein und DNA-Sequenzen angezeigt werden. Aber anstatt einem können beim Drei-Komponentensystem zwei Proteine mit der gewünschten DNA-Sequenz in Wechselwirkung treten und die Transkription des Reportergens auslösen. Bei den verwendeten DNA-Sequenzen handelte es sich ausschließlich um mitochondriale Promotorregionen der pflanzlichen Gene *COX2* und *COX3*, da nicht sicher ist, welche plastidären Gene durch die Phagentyp-RNA-Polymerase transkribiert werden. Deshalb wurde auch nur die mitochondriale RNA-Polymerase RpoT;1 als Zielprotein ausgewählt.

Bei der Anwendung des Drei-Komponentensystems traten grundsätzliche Probleme auf. So bewirkte schon das Einbringen von RpoT;1 alleine in das System eine stark erhöhte Transkriptionsrate des Reportergens *HIS3*, die mit 50 mM Triazol unterdrückt werden musste. Das Triazol hemmt die Aktivität des *HIS3*-Genproduktes (ein Enzym im Stoffwechselweg der Histidinsynthese). Die hohe Transkriptionsrate könnte verursacht werden, weil RpoT;1 ein DNA-bindendes Protein ist, welches zudem noch mit der DNA-Bindedomäne des GAL4-Proteins fusioniert ist. Zwar fehlt die Aktivierungsdomäne, aber es können z. B. Transkriptionsfaktoren auch ohne diese das Reportersystem aktivieren (Lisowsky *et al.* 1999). Die Möglichkeit, dass das Zielprotein RpoT;1 selbst die Transkription des Reportergens bewerkstelligt, kann nicht sicher ausgeschlossen werden. Zwar kann RpoT;1 nach heutiger Erkenntnis nicht ohne einen Transkriptionsfaktor arbeiten, auch kann eine Interaktion mit dem Hefefaktor Mtf1p durch die heterologen Komplementationsexperimente sicher ausgeschlossen werden (Stein 1998), zumal Mtf1p mitochondrial lokalisiert ist, die Aktivierung des Reportergens hingegen im Kern stattfindet. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass Transkriptionsfaktoren des Kerns die Transkription mit RpoT;1 initiieren können. Sollte dies der Fall sein, so könnten die Wechselwirkungen zwischen RpoT;1 und seinem Spezifitätsfaktor verdeckt werden.

Ein anderes Problem sind die vielen falsch positiven Befunde. Diese werden durch Gene verursacht, die im falschen Leseraster im Genbankplasmid inkloniert sind, sodass nur wenige Aminosäurereste mit der Aktivierungsdomäne fusioniert exprimiert werden. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierungsdomäne allein oder mit nur wenigen zusätzlich fusionierten Aminosäuren an RpoT;1 bindet und damit das System aktiviert.

Durch die Anwendung dieses Systems konnten zwei Gene identifiziert werden, die eine Rolle bei der Transkription von mitochondrialen Genen bei *Arabidopsis* spielen könnten. Zum einen handelt es sich um das Gen *RAP2.5*, auch *ERF4* genannt. Das Produkt dieses Gens wird als mutmaßlicher Transkriptionsfaktor der ERF- bzw. RAP-Familie beschrieben, welche nuklear kodiert sind und bei der Transkriptionsregulation von Kerngenen involviert sind. Das Gen dieses mutmaßlichen Transkriptionsfaktors war allerdings nicht im selben

Leseraster wie die Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors im Plasmid einkloniert, sodass auf keinen Fall ein entsprechendes Hybridprotein entstanden sein kann. Da aber das Startkodon von *ERF4* vorhanden ist, könnte das Protein trotzdem exprimiert worden sein. Da es sich um einen Transkriptionsfaktor handelt, könnte dieses Protein auch allein für die Aktivierung des Reportergens verantwortlich sein. Wie bereits erwähnt, gibt es Transkriptionsfaktoren, die auch ohne fusionierte Aktivierungsdomäne das Monohybridensystem aktivieren. Weil der beschriebene mutmaßliche Transkriptionsfaktor zu einer Familie von Kern-Regulationsfaktoren gehört, ist es eher unwahrscheinlich, dass dieser auch bei der Transkription des mitochondrialen Genoms eine Rolle spielt. Grund für die Aktivierung könnte vielmehr das bereits beschriebene Phänomen sein, dass das System durch die Aktivierungsdomäne mit nur wenigen fusionierten Aminosäuren im Zusammenspiel mit RpoT;1 aktiviert wird.

Ein zweites durch das Drei-Komponentensystem identifiziertes Gen ist in seiner Funktion bislang unbekannt. Es war im Leseraster der Aktivierungsdomäne einkloniert und enthielt die komplette Sequenz von 348 Nukleotiden. Weil es keine Homologien zu bekannten Genen hat, wird es in den Gendatenbanken als potenzielles Gen beschrieben. Untersucht man die Aminosäuresequenz des potenziellen Proteins, so stellt man eine Häufung von basischen – also positiv geladenen – Aminosäureresten im N-terminalen Bereich fest. Weil die DNA negativ geladen ist, haben DNA-bindende Proteine Domänen mit positiv geladenen Resten. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass es sich bei dem gefundenen DNA-Abschnitt tatsächlich um ein Gen handelt, das eine Funktion bei der Organellen-Transkription hat. Weitere Untersuchungen mit diesem Gen waren im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht möglich.

Die zu Sigma-Faktoren in Eubakterien homologen Sigma-Faktoren bei *Arabidopsis thaliana* stellen vermutlich Spezifitätsfaktoren der plastidär kodierten RNA-Polymerase dar, welche zu den RNA-Polymerasen der Eubakterien homolog ist. Bislang konnte aber erst bei zwei dieser Faktoren (SIG2/SIGA und SIG3) eine plastidäre Lokalisation nachgewiesen werden (Tanaka *et al.* 1997 und Isono *et al.* 1997). Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass ein oder mehrere Sigma-Faktoren mitochondrial lokalisiert sind und deshalb auch für die nuklear kodierten RNA-Polymerasen Spezifitätsfaktoren darstellen. Das Austesten der Sigma-Faktoren mit RpoT;1 und RpoT;3 im Dihybridensystem ergab aber keine spezifische Aktivierung in diesem System.

Um Aufschlüsse über das Zusammenwirken der vier Untereinheiten der plastidär kodierten RNA-Polymerase mit den Sigma-Faktoren zu erhalten, wurden diese jeweils im Dihybridensystem getestet. Auch hier gab es keine Aktivierung des Systems. Ursache könnte sein, dass die Wechselwirkungen nicht mit einer einzelnen Untereinheit stattfinden können oder dass die fusionierten Proteine die Wechselwirkungen beeinträchtigen. Auch die vorhandenen Transitsequenzen der Sigma-Faktoren könnten sich störend auswirken.

5.2 In-vivo-Funktionsanalyse der chimären Konstrukte

Der Austausch von Bereichen der mitochondrialen Hefe-RNA-Polymerase durch homologe Bereiche der mitochondrialen Arabidopsis-RNA-Polymerase diente zur Identifizierung funktionell hochkonservierter Bereiche, was durch die sukzessive Verkleinerung des Austauschbereiches erreicht werden sollte. Überraschenderweise waren alle hergestellten und über Plasmide in die Hefe eingebrachten chimären Konstrukte nicht in der Lage, das disruptierte Gen der mitochondrialen RNA-Polymerase Rpo41p zu ersetzen. Im Gegensatz hierzu stehen viele erfolgreich verlaufende heterologe Komplementationsstudien in der Hefe mit diversen pflanzlichen und humanen Enzymen (Minet und Lacroute 1990, Riesmeier *et al.* 1992, Parisi *et al.* 1993, Lisowski *et al.* 1995, Lange *et al.* 2001). Auch der funktionelle Austausch von Komponenten der Multi-Enzym-RNA-Polymerasen des Kerns zwischen Hefe und Mensch konnte gezeigt werden (Shpakovski *et al.* 1995).

Infolge der unterbleibenden Transkription wurden die mitochondrialen Gene nicht mehr abgelesen, was in der Folge zur Atmungsdefizienz führte. Diese Hefezellen waren nicht mehr in der Lage, auf nicht fermentierbaren Medien wie Glycerin zu wachsen. Wegen der – noch nicht ganz verstandenen – Funktion von Rpo41p bei der Replikation des mitochondrialen Genoms unterblieb auch diese bei den disruptierten Hefezellen und als Folge hiervon verloren sie ihre mitochondriale DNA – die Zellen wurden rho⁰.

Beim Konstrukt mit den wenigsten Anteilen an der mitochondrialen Arabidopsis-RNA-Polymerase RpoT;1 (Konstrukt K4, 297 Nt oder 99 AS RpoT;1) waren die Aminosäuren 591 bis 689 ausgetauscht. Die erste konservierte Domäne erstreckt sich bei der Hefe von der Aminosäure 668 bis zur Aminosäure 683, war also bei allen Konstrukten komplett durch Arabidopsis-Sequenzen ersetzt (Abb. 5.1). Man kann deshalb sagen, dass mindestens die erste konservierte Domäne in der Hefe (zumindest teilweise) spezieabhängig ist. Durch Arbeiten mit der temperatursensitiven Punktmutante *pet798* (P679L) wird die Annahme gestärkt, dass dieser Bereich in Wechselwirkungen mit dem Spezifitätsfaktor Mtf1p steht, denn sie befindet sich in der ersten konservierten Domäne und durch die Überexpression von Mtf1p wird die Mutation supprimiert (Riemen und Michaelis 1994). Die Wechselwirkungen zwischen Mtf1p und Rpo41p sind essentiell für die normale mitochondriale Transkription und Replikation (Greenleaf *et al.* 1986, Lisowsky und Michaelis 1988, Fangman *et al.* 1990). Da es für Mtf1p kein homologes Protein in *Arabidopsis* gibt, ist es höchst unwahrscheinlich, dass es einen Bereich in RpoT;1 gibt, der mit Mtf1p funktionell wechselwirken könnte. Ein Austausch von Hefesequenzen durch Arabidopsis-Sequenzen in einem Bereich, der involviert ist mit der Wechselwirkung zu Mtf1p, muss deshalb zur Funktionslosigkeit führen. Bestärkt wird diese Annahme durch die Tatsache,



Abb. 5.1: Funktionelle Bereiche der mitochondrialen Hefe-RNA-Polymerase Rpo41p.

Zum Vergleich ist oben die T7-RNA-Polymerase mit den 12 konservierten Domänen abgebildet, darunter Rpo41p mit den entsprechenden Domänen. Die Ziffern bezeichnen die Positionen einzelner Aminosäuren.

1–26: Mitochondriale Importsequenz.

27–117: Bereich, der nach Deletion durch Überexpression von Mtf2p supprimiert werden kann (Rodeheffer *et al.* 2001).

591–687: Austauschbereich des Konstruktes mit den geringsten Arabidopsis-Sequenzen K4.

679: Punktmutante pet798, Austausch von Prolin zu Leucin, temperatursensitiv, nur geringer Einfluss auf den Erhalt der mitochondrialen DNA, Supprimierung durch Überexpression von Mtf1p.

902–1351: Bereich von Konstrukt K7, welches *in trans* mit K2 und K3 das deletierte *RPO41* komplementiert.

938: Punktmutante G8, Austausch von Serin zu Phenylalanin, temperatursensitiv, beeinflusst auch die Replikation und den Erhalt der mitochondrialen DNA, kein Suppressor bekannt (Lisowsky *et al.* 1996)

974: Ende von Konstrukt K3 und Beginn der Arabidopsis-Sequenzen bei Konstrukt K2.

Essentielle Aminosäuren des katalytischen Zentrums von Rpo41p: D945, K1014, Y1022, G1023 und D1189.

dass auch die komplette Arabidopsis-RNA-Polymerase nicht in der Hefe funktioniert (Stein 1998), was sehr wahrscheinlich auf die fehlenden Wechselwirkungen mit dem Spezifitätsfaktor Mtf1p zurückzuführen ist.

Ein anderer möglicher Grund für die Inkompatibilität könnte sein, dass die Arabidopsis-Sequenzen Interaktionen zwischen Rpo41p-Domänen stören. Dies kann auf alle Funktionen des Proteins Einflüsse haben.

5.3 In-vivo-Funktionsanalyse der verkürzten RNA-Polymerase

Das von T. Stein (1998) hergestellte Konstrukt K2 bewirkt das Auftreten eines Petite-Genoms bei der Hefe; ansonsten sind auch die Hefezellen mit diesem Konstrukt atmungsdefizient. Durch die Entfernung des Arabidopsis-Anteils sollte geklärt werden, ob die Entstehung des Petite-Genoms mit dem Arabidopsis-Anteil aus K2 zusammenhängt. Es zeigte sich, dass auch das Konstrukt ohne Arabidopsis-Sequenzen (K3) für die Entstehung eines Petite-Genoms sorgt. Da nach der Entfernung der Konstrukte K2 bzw. K3 dieses Petite-Genom verschwindet, sind die Produkte dieser Konstrukte für die Entstehung und stabile Replikation des Petite-Genoms verantwortlich. Überprüft wurde dies anhand der DAPI-Färbung. Nur bei Zellen mit K2 oder K3 erkennt man in der DAPI-Färbung an einigen Stellen der Zelle Ansammlungen von DNA in Form von mitochondrialen Nukleoiden, ein typisches Bild für rho⁻-Zellen.

Es ist bekannt, dass bei der Phagen-RNA-Polymerase des Phagen T7 die Aminosäuren D537, K631, Y639, G640 und D812 das katalytische Zentrum bilden (DeLarue *et al.* 1990). Diese Aminosäuren sind stark konserviert und in allen bislang untersuchten mitochondrialen RNA-Polymerasen vorhanden (Hedtke 1999). Bei Rpo41p sind dies die Aminosäuren D945 (Domäne 6), K1014, Y1022, G1023 (alle Domäne 7) und D1189 (Domäne 11). Das chimäre Konstrukt K2 enthält nur die erste essentielle Aminosäure von der Hefe, die restlichen vier stammen von *Arabidopsis*. Da dass in dieser Arbeit hergestellte Konstrukt K3, welches demnach nur noch die erste essentielle Aminosäure kodiert, dieselben Eigenschaften besitzt wie K2, kann davon ausgegangen werden, dass beim Produkt des Konstrukts K2 das katalytische Zentrum funktionslos ist und nicht zum Erhalt des Petite-Genoms beiträgt.

Die genaue Funktion der mitochondrialen RNA-Polymerase bei der Replikation des Mitochondriengenoms der Hefe ist noch nicht eindeutig. Es wird angenommen, dass sie RNA-Primer für die mitochondriale DNA-Polymerase synthetisiert (s. 1.5), wie dies bei Säugern der Fall ist (Chang und Clayton, 1985a; Chang *et al.* 1985b). Die Befunde der bisherigen Experimente sind nicht ganz zufrieden stellend. Einerseits konnte durch In-vitro-Versuche mit Rpo41p, Mtf1p und einem hypersuppressiven Hefe-Mitochondriengenom (HS40) gezeigt werden, dass am Replikationsstartpunkt stabile DNA-RNA-Doppelstränge – also RNA-Primer – entstehen. Von den gebildeten hybriden Doppelsträngen ist die mitochondriale DNA-Polymerase Mip1p in der Lage, *in vitro* effizient die DNA-Replikation auszuführen (Xu und Clayton 1995). Andererseits aber ist genau dieses hypersuppressive Petite-Genom für seine Replikation *in vivo* nicht auf die mitochondriale RNA-Polymerase Rpo41p angewiesen. Die Deletion von *RPO41* hat keinen Effekt auf den Erhalt des Petite-Genoms (Lorimer *et al.* 1995). Demnach geschieht die Replikation des Petite-Genoms *in vivo* nach einem anderen Mechanismus als *in vitro*. Die In-vitro-Experimente geben aber Anhaltspunkte, wie die Replikation des normalen Hefe-Mitochondriengenoms *in vivo* verläuft. Welche Aufgabe die verkürzte bzw. die chimäre RNA-Polymerase beim Erhalt des in dieser Arbeit aufgetretenen Petite-Genoms erfüllt, kann aus diesen Experimenten nicht gefolgert werden. Dass sie für den Erhalt des Petite-Genoms unabdingbar ist, konnte eindeutig gezeigt werden.

Durch die Ergebnisse der In-trans-Komplementation (s. 5.4) kann davon ausgegangen werden, dass die verkürzte RNA-Polymerase nur die Katalyse – also die Herstellung der Phosphordiesterbindung – nicht mehr ausführen kann. Promotorerkennung und Transkriptionsinitiation scheinen nicht wesentlich gestört zu sein. So könnte man folgern, dass diese verkürzte RNA-Polymerase an den Replikationsstartpunkten für kurze Zeit unverbundene, sich mit der DNA paarende Ribonukleotide zurücklässt. Für die DNA-

Polymerase könnte ein einziges Ribonukleotid ausreichen, die DNA-Replikation zu starten. Wegen der instabilen DNA-RNA-Basenpaarung für einzelne Ribonukleotide würde es der DNA-Polymerase Mip1p sehr viel seltener gelingen, die DNA-Replikation zu starten. Die Entstehung des Petite-Genoms wäre die Folge. Schaut man sich das Molekülmodell der T7-RNA-Polymerase an (Abb. 5.2) und geht man davon aus, dass die Struktur des Enzyms sich nicht wesentlich von der des Hefe-Enzyms unterscheidet, so muss man allerdings annehmen, dass durch die Entfernung des C-Terminus auch die Nukleotidbindung des Enzyms verloren gegangen ist. Damit erscheint die Möglichkeit der Ein-Nukleotid-Primer eher unwahrscheinlich. Die Rumpf-Polymerase könnte aber noch eine Funktion bei der Initiation der postulierten Primase haben. Diese soll auf dem Gegenstrang den RNA-Primer herstellen, weil es für Rpo41p auf dem Gegenstrang keinen Promotor – und damit auch nicht die Möglichkeit der Transkriptionsinitiation – gibt. Dies würde bedeuten, dass nur der Gegenstrang repliziert wird, infolgedessen würde einzelsträngige DNA entstehen. Die zumindest teilweise vorhandene Resistenz der mitochondrialen DNA des Petite-Genoms gegenüber DNase verstärkt diese Hypothese. Unlängst wurde auch im hypersuppressiven Petite-Genom HS40 mitochondriale Einzelstrang-DNA gefunden, allerdings nicht in dem nicht hypersuppressiven Petite-Genom VAR1 (MacAlpine *et al.* 2001).

Durch die Hybridisierungsversuche mit radioaktiver DNA konnte gezeigt werden, dass die verkürzte RNA-Polymerase keine detektierbaren Transkripte herstellen kann: Die benutzten Sonden konnten zwar die entsprechenden Gene, aber keine RNA detektieren, infolge dessen auch nicht das Protein Cox2p. In dieser Arbeit konnte nicht gezeigt werden, welche und ob überhaupt Sequenzen des Mitochondriengenoms fehlen, es konnte nur gezeigt werden, welche Sequenzen das Genom enthält. Möglicherweise sind große Sequenzbereiche des mitochondrialen Genoms enthalten. Die Analyse der mitochondrialen DNA im Agarosegel zeigte aber, dass auch ein großer Teil kleine DNA-Fragmente entsteht. Bislang ist nicht bekannt, welche Faktoren für die Stabilität der DNA-Moleküle in den

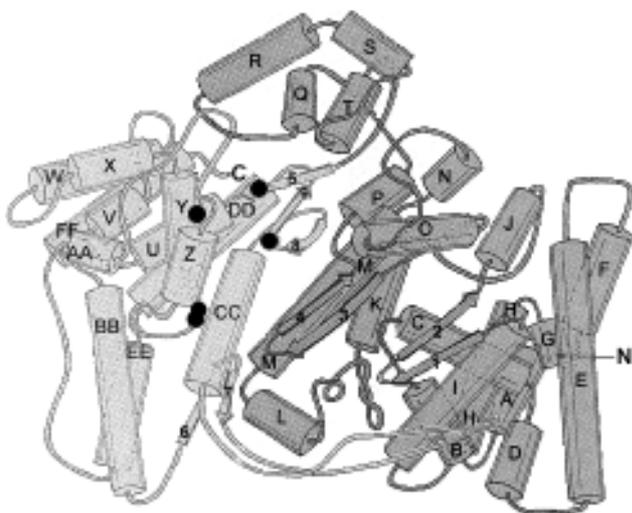


Abb. 5.2: Dreidimensionales Modell der T7-RNA-Polymerase nach Koordinaten einer Röntgenstrukturanalyse.

Die α -Helices sind von A bis FF gekennzeichnet, β -Faltblatt-Strukturen von 1 bis 9. Die essentiellen Aminosäuren des katalytischen Zentrums (D537, K631, Y639, G640, D812) sind als schwarze Punkte markiert.

Die Zeichnung zeigt die lange Achse des DNA-Bindespalts parallel zur Ebene des Bildes. Der Bereich, der homolog zum C-Terminus (K7) von Rpo41p ist, ist heller dargestellt.

Nach Sousa *et al.* 1993, verändert.

Mitochondrien eine Rolle spielen. So kann nicht ausgeschlossen werden, dass Proteine, die im Mitochondriengenom kodiert sind, an der Stabilität der DNA-Moleküle beteiligt sind. Dies würde auch die Instabilität der Mitochondrien-DNA und den schnellen Verlust erklären, sobald Rpo41p nicht mehr funktioniert.

Der Test auf Hypersuppressivität zeigte, dass es sich bei dem neu gebildeten rho⁻-Genom nicht um ein hypersuppressives handelt. Nach Analyse der Sequenzen des rho⁻-Genoms war dies auch nicht zu erwarten, weil hypersuppressive Petite-Genome in Tandemanordnung sich wiederholende Sequenzen mit bekannten Replikationsstartpunkten enthalten (Blanc 1984) und sich unabhängig von Rpo41p replizieren (Lorimer *et al.* 1995).

5.4 Das Petite-Genom

Die Charakterisierung des Petite-Genoms stellte sich als sehr schwierig heraus. Insbesondere gestaltete sich das Einklonieren in einen Sequenzierungsvektor als problematisch, keines der ausprobierten Restriktionsenzyme konnte die isolierte DNA schneiden. Selbst die Fragmentierung mit DNase schlug fehl. Dies könnte auf die Anwesenheit von Einzelstrang-DNA hinweisen, eine andere Möglichkeit ist die Verunreinigung mit Cäsiumchlorid, wodurch die Restriktionsenzyme gehemmt würden. Durch mechanisches Scheren der DNA und Einklonierung in einen geschnittenen Vektor mit glatten Enden konnte ein Teilbereich sequenziert werden. Durch Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA konnten zwei in diesem Genom enthaltene Gene detektiert werden. Der durch die Sequenzierung und Hybridisierung erfasste Bereich enthält 24714 Nukleotide, die wahrscheinlich – zumindest Anfangs – in dem Genom enthalten sind. Dieser Bereich enthält die Gene der 21S-RNA und der Untereinheit 2 der Cytochrom-c-Oxidase sowie einige tRNA-Gene.

Die ca. 5 kb große DNA-Bande im Agarosegel (die untere Bande im CsCl-Gradient mit der größeren spezifischen Masse) ist nicht reproduzierbar. Das deutet darauf hin, dass das rho⁻-Genom mit der Zeit deletiert, also Änderungen unterworfen ist. Auch kann man in den Agarosegelen in den Taschen immer hochmolekulare DNA sehen, die praktisch nicht in das Gel einläuft.

5.5 In-trans-Komplementation des C-terminal deletierten Rpo41p

Die Experimente von Wang und Shadel (2000) hatten erste Hinweise darauf gegeben, dass die RNA-Polymerase Rpo41p in zwei Proteine zerlegt werden kann, die dann gemeinsam *in trans* die Polymerasefunktion rekonstituieren können. Sie zeigten dies mit einem kleinen N-terminalen und einem großen C-terminalen Bereich, der alle katalytischen

Domänen enthielt. In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass Rpo41p in katalytische Domäne (Domäne 6–12) und Restprotein zerteilt werden kann, die gemeinsam exprimiert eine funktionierende RNA-Polymerase bilden. Die katalytischen Domänen konnten auch das chimäre Protein des Konstrukts K2 *in trans* komplementieren, welches zum größten Teil die – funktionsunfähigen – katalytischen Domänen von *Arabidopsis* besitzt. Dies ist sehr erstaunlich und deutet darauf hin, dass das katalytische Fragment entweder relativ autonom, ohne größere Bedeutung der räumlichen Zusammenwirkung mit dem Restprotein, seine Funktion ausführen kann oder dass die *Arabidopsis*-Sequenzen durch den Rpo41p-C-Terminus beiseite gedrängt werden können. Letzteres scheint nach einem Blick auf das Modell der T7-RNA-Polymerase wahrscheinlicher (Abb. 5.2).

Bei höherer Temperatur (37 °C) verlieren die Hefen mit den *in trans* komplementierten RNA-Polymerasen die Atmungsfähigkeit, das bedeutet, die Funktion der in zwei Teilen vorliegenden RNA-Polymerase geht bei erhöhter Temperatur verloren. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf die höhere kinetische Energie, welche nun auf die beiden Polymerasefragmente wirkt. Dies verhindert augenscheinlich notwendige Wechselwirkungen der beiden Fragmente.

5.6 Modell für die Funktionsbereiche der mitochondrialen RNA-Polymerase von Hefe

Stellt man die in dieser und anderen Arbeiten erhaltenen Ergebnisse zusammen, so ergibt sich für die Struktur der mitochondrialen RNA-Polymerase von *Saccharomyces cerevisiae* das folgende Bild (Abb. 5.1).

Die ersten 26 Aminosäuren des Enzyms dienen als Transitsequenz bzw. Erkennungssignal für den Transport in die Mitochondrien (Wang und Shadel 1999).

Die nachfolgenden 91 Aminosäuren (27–117) sind involviert im Aufbau von Wechselwirkungen mit Mtf2p (Nam1p). Werden diese nämlich deletiert, so entsteht eine temperatursensitive Mutante, die durch die Überexpression von Mtf2p supprimiert wird (Rodeheffer *et al.* 2001).

Die Punktmutante pet798 (Prolin 679 zu Leucin) ist ebenfalls temperatursensitiv und wird durch Überexpression von Mtf1p supprimiert (Riemen und Michaelis 1994). Betroffen ist hier hauptsächlich die Transkription, die Replikation ist nicht sehr beeinflusst: Auch bei erhöhter Temperatur verlieren die Mutanten nur sehr langsam ihre mitochondriale DNA (Riemen und Michaelis 1994). Es kann deshalb angenommen werden, dass Rpo41p in diesem Bereich (Domäne 1) mit Mtf1p wechselwirkt. Gestärkt wird diese

Annahme durch die in dieser Arbeit hergestellten chimären Konstrukte, denn die ausgetauschte Aminosäure der Punktmutante liegt im Austauschbereich der chimären Konstrukte.

Durch die Identifizierung und Charakterisierung einer weiteren temperatursensitiven Punktmutante in der Domäne 6 (G8, Serin 938 zu Phenylalanin) stellte sich heraus, dass hier sowohl die Transkription als auch die Replikation betroffen ist. Eine Überexpression von Mtf1p kann diesen Defekt nicht supprimieren. Die Mutante verliert selbst bei 23 °C teilweise ihre mitochondriale DNA (Lisowsky *et al.* 1996). Die betroffene Aminosäure an Position 938 liegt unweit der für die Katalyse essentiellen ersten Aminosäure Asparaginsäure 945. Damit kann auch bei Rpo41p die Domäne 6 eindeutig dem katalytischen Zentrum zugeordnet werden.

Aufgrund der Röntgenstrukturanalyse der T7-RNA-Polymerase und anderer DNA- und RNA-Polymerasen weiß man, dass alle diese Enzyme ähnlich einer greifenden Hand geformt sind. Dabei befindet sich der zu transkribierende bzw. replizierende Nukleinsäurestrang in einer Spalte, gebildet durch „Finger“ und „Daumen“ (Sousa *et al.* 1993). Den Aufbau zeigt das Strukturmodell in Abbildung 5.2. Das katalytische Zentrum befindet sich in den Domänen 6–11 (Abb. 5.1).

5.7 Die phylogenetische Entwicklung der Phagentyp-RNA-Polymerasen

Zwar sind weite Bereiche der mitochondrialen RNA-Polymerasen der einzelnen Spezies homolog, die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente zeigen jedoch, dass die Entwicklung von Spezifitätsfaktoren getrennt verlaufen ist. Dies führt dazu, dass nicht beliebig homologe Bereiche zwischen den RNA-Polymerasen ohne Funktionsverlust ausgetauscht werden können.

Die Ergebnisse der In-trans-Komplementation in dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass die Phagentyp-RNA-Polymerasen das Produkt von Genfusionen sind. Anscheinend bestand die Ur-RNA-Polymerase dieses Typs aus mehreren Funktionseinheiten, die während der evolutionären Entwicklung zu einem einzigen großen Enzym vereinigt wurden. Dies deutet entwicklungsgeschichtlich gesehen auf sehr alte Enzyme hin. Derselbe Mechanismus wurde schon für das eukaryotische Fettsäuresynthese-Enzym FAS2 dokumentiert, welches aus den Einheiten des Multienzymkomplexes der Prokaryonten (FAS1) hervor gegangen ist (McCarthy und Hardy 1984, Schweizer *et al.* 1984, Mohamed *et al.* 1988, Schneider *et al.* 1997).

Vieles deutet darauf hin, dass die Phagentyp-Polymerase nicht die ursprüngliche RNA-Polymerase der Mitochondrien und Plastiden ist. So hat der primitive Eukaryont *Reclinomonas americana* in seinem mitochondrialen Genom Gene, die homolog zu den vier Untereinheiten der eubakteriellen RNA-Polymerase sind. Die anderen Eukaryonten haben diese Gene offensichtlich verloren und stattdessen die Phagentyp-RNA-Polymerase für die Transkription des Mitochondriengenoms rekrutiert. Da die RNA-Polymerasen der Phagen ohne Spezifitätsfaktor arbeitet, weil die Phagengene keine spezifische Transkription benötigen, wurden für Mitochondrien und Plastiden ein oder mehrere Faktoren rekrutiert. Diese Entwicklung ist nicht nur bei Pflanzen, Pilzen und Tieren, sondern auch innerhalb dieser Gruppen getrennt verlaufen.

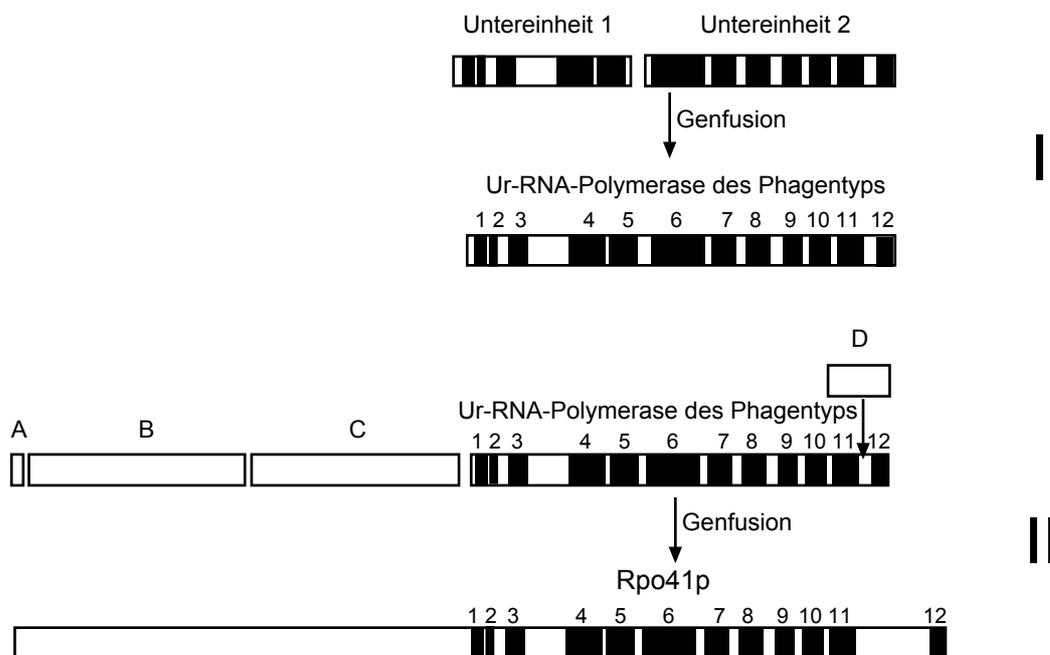


Abb. 5.3: Modell zur Entstehung der mitochondrialen RNA-Polymerase von Hefe in zwei Phasen.

Die konservierten Domänen sind von 1 bis 12 nummeriert und schwarz dargestellt.

I: In der ersten Phase der Evolution ist eine Ur-RNA-Polymerase des Phagentyps durch die Fusion von mindestens zwei Untereinheiten entstanden. Untereinheit 2 beinhaltet u. a. die katalytische Funktion und die Bindung der Nukleotide, Untereinheit 1 bewirkt u. a. die Öffnung des DNA-Strangs.

II: In der zweiten Phase haben sich die RNA-Polymerasen in den unterschiedlichen Spezies durch die Fusionierung weiterer Gensequenzen weiterentwickelt. Rpo41p ist durch die Insertion des Bereichs D (bisher unbekanntes Funktion), die Fusion der Bereiche C (Interaktion mit Mtf1p), B (Interaktion mit Mtf2p) und A (mitochondriale Importsequenz) entstanden. Der genaue Umfang der Bereiche B und C ist unbestimmt. Teile der konservierten Domäne 1 interagieren ebenfalls mit Mtf1p.

5.8 Modell zur Replikation des mitochondrialen Hefegenoms

5.8.1 Die Notwendigkeit von Primern

Alle DNA-Polymerasen prüfen vor der Knüpfung einer neuen Phosphordiesterbindung, ob das vorangehende Nukleotid mit dem entsprechenden Nukleotid auf dem Matrizenstrang gepaart ist (Alberts *et al.* 1990). Ist dies nicht der Fall, wird das Nukleotid wieder entfernt. So wird eine sehr hohe DNA-Replikationsgenauigkeit erreicht. RNA-Polymerasen besitzen keinen Korrekturlesemechanismus, weil gelegentliche Fehler im RNA-Strang keine großen Folgen haben. Fehler bei der DNA-Replikation werden jedoch auf alle Tochterzellen weiter vererbt. Auf Grund des Korrekturlesevorgangs sind DNA-Polymerasen für den Beginn der DNA-Replikation auf einen Primer, also einem Nukleotid, welches schon mit dem abzulesenden DNA-Strang gepaart ist, angewiesen. Da RNA-Polymerasen ja ohne Primer neue Nukleotidstränge synthetisieren können, werden diese Primer von RNA-Polymerasen oder speziellen Primasen hergestellt. Auch der Replikationsmechanismus im Phagen T7 verläuft vermutlich über Primer. Die Replikationsinitiation geschieht hier durch die Verdrängung der T7-RNA-Polymerase durch die T7-DNA-Polymerase (Fuller und Richardson 1985). Die T7-RNA-Polymerase bindet an DNA-Stränge zunächst im so genannten abortiven oder nichtprozessiven Zustand, durch die Promotorsequenz ändert sich die Konfiguration in den prozessiven Zustand. Im nichtprozessiven Zustand synthetisiert sie mit einer hohen Rate überwiegend Dinukleotide (Sousa *et al.* 1992). Diese können der T7-DNA-Polymerase als Primer dienen.

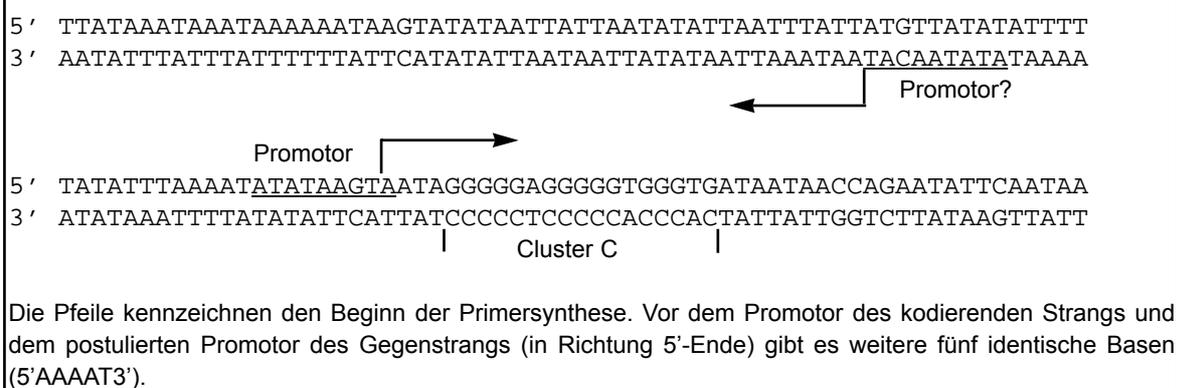
5.8.2 Modell für die Primerbildung auf dem kodierenden Strang

Alle bisherigen Experimente deuten auf Rpo41p als Enzym für die Primersynthese für den kodierenden Strang hin. Während der normalen Transkription bilden aber nur zwei bis drei Nukleotide des Transkripts mit der DNA einen Doppelstrang (Sousa *et al.* 1992). Es muss deshalb einen Mechanismus in der RNA-Polymerase geben, durch den die Nukleotide für den Primer mit der DNA gepaart bleiben. Ausgelöst wird dieser Mechanismus wahrscheinlich durch die DNA-Sequenz des Replikationsstartpunkts (Cluster C, GC-reiche Sequenz), denn andere Proteine scheinen bei der Primersynthese nicht notwendig zu sein: Durch In-vitro-Experimente konnte gezeigt werden, dass Rpo41p und Mtf1p allein in der Lage sind, an ori2- und ori5-Sequenzen Primer zu synthetisieren (Xu und Clayton 1995). Die RNA-Polymerase dürfte dabei eine andere Konformation einnehmen (Primersynthese-Konformation). Die Synthese beginnt bei hypersuppressiven Mitochondriengenomen jeweils an einem destinkten Nukleotid (Tafel 5.4), die Primerlänge hingegen ist unterschiedlich (Graves *et al.* 1998).

5.8.3 Hat der Gegenstrang einen Promotor?

Im mitochondrialen Genom der Hefe (Foury *et al.* 1998) befindet sich vor zwei Replikationsstartpunkten der Promotor der RNA-Polymerase (5'ATATAAGTA3'), von welchem sehr wahrscheinlich Rpo41p in Zusammenarbeit mit Mtf1p die Herstellung des Primers beginnt. Vor zwei Replikationsstartpunkten befindet sich ein degenerierter Promotor (5'ATATAAGTC3'). Der Primer des Gegenstrangs beginnt beim ori5 34 Basenpaare vor (in 5'-3'-Leserichtung des kodierenden Strangs) dem Primer des kodierenden Strangs (Graves *et al.* 1998). Interessanterweise befindet sich direkt vor (in 5'-3'-Leserichtung des Gegenstrangs) Beginn des Gegenstrangprimers das Nonanukleotid 5'ATATAACAT3'; die ersten sechs Basen entsprechen der normalen Promotorsequenz, die letzten drei Basen entsprechen der inversen Promotorsequenz an dieser Stelle (Tafel 5.4). Diese Sequenz ist im Gegenstrang des Mitochondriengenoms insgesamt elf Mal vorhanden, davon zwei Mal in der Nähe von Replikationsstartpunkten mit normalem Promotor und ein Mal in der Nähe eines Replikationsstartpunkts mit degeneriertem Promotor. Zum Vergleich: Die Promotorsequenz kommt auf dem kodierenden Strang ebenfalls elf Mal vor, auf dem Gegenstrang nur drei Mal. Es ist also möglich, dass zwei oder drei dieser Sequenzen zur Markierung des Primerbeginns auf dem Gegenstrang dienen.

Tafel 5.4: DNA-Sequenz um den Replikationsstartpunkt ori5.



5.8.4 Modell der Zusammenwirkung von Rpo41p und der Primase des Gegenstrangs

Beim Gegenstrang des Mitochondriengenoms wird der benötigte Primer sehr wahrscheinlich von einer Primase hergestellt (Baldacci *et al.* 1984). Da die in dieser Arbeit hergestellte verkürzte RNA-Polymerase nicht mehr in der Lage ist, RNA-Stränge zu synthetisieren, aber für die stabile Replikation eines Petite-Genoms notwendig ist, liegt die Vermutung nahe, dass die RNA-Polymerase mit der postulierten Primase in Wechselwirkung tritt, sodass diese veranlasst wird, auf dem Gegenstrang den Primer herzustellen. Möglicherweise handelt es sich bei der Primase um ein Protein mit einem aktiven katalytischen Zentrum wie z. B. eine RNase, dass gemeinschaftlich mit der

RNA-Polymerase die Primersynthese bewerkstelligt (Abb. 5.5). Hierfür spricht die promoterartige Sequenz vor dem Beginn des detektierten Primers, der gemeinsam von Rpo41p und der Primase erkannt werden könnte. Die Ergebnisse der Komplementation *in trans* in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass das katalytische Zentrum am C-Terminus von Rpo41p beweglich ist. Bei einer starren Wechselwirkung dieser Region mit den anderen Regionen ist es nicht vorstellbar, dass das chimäre Protein des Konstrukts K2 ebenfalls *in trans* komplementiert wird. Der eigenständig exprimierte C-Terminus von Rpo41p mit dem katalytischen Zentrum kann anscheinend die Arabidopsis-Sequenzen wegdrängen. Ebenso ist es vorstellbar, dass die postulierte Primase das katalytische Zentrum verdrängt und an seine Stelle tritt. Hierdurch könnte von Rpo41p die Primerkonformation eingenommen werden, sodass ein Primer und nicht ein ungepaarter RNA-Strang entsteht.

A

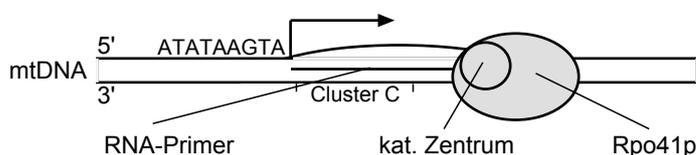
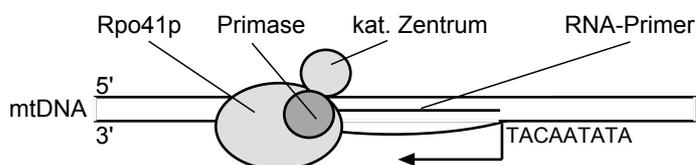


Abb. 5.5: Modell der Primersynthese für die Replikation der Mitochondrien-DNA der Hefe.

A: Primersynthese des kodierenden Strangs durch Rpo41p. Im Zusammenwirken mit Mtf1p initiiert Rpo41p die RNA-Synthese. Vermutlich durch den Cluster C wird Rpo41p zur Synthese eines Primers veranlasst.

B



B: Primersynthese des Gegenstrangs durch Rpo41p in Zusammenarbeit mit einer Primase. Die Primase setzt sich an die Stelle des katalytischen Zentrums von Rpo41p und synthetisiert den Primer des Gegenstrangs.

5.9 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die mitochondriale RNA-Polymerase von *Saccharomyces cerevisiae* nicht nur für die Transkription des Mitochondriengenoms verantwortlich ist, sondern dass sie auch bei der Replikation des normalen Mitochondriengenoms und auch von Petite-Genomen eine wichtige Rolle spielt. Welche Funktion das Enzym bei der Replikation des Gegenstranges hat, konnte nicht abschließend geklärt werden. Um diese Frage zu beantworten, wäre es wichtig, die postulierte Primase zu identifizieren. Durch In-vitro-Replikationsversuche mit diesen und veränderten Enzymen ließe sich auf das Zusammenwirken schließen.

Um zu klären, ob es in der mitochondrialen Hefe-RNA-Polymerase speziesunspezifische Bereiche gibt, müssten weitere Sequenzaustausche und Komplementationsexperimente erfolgen. Hier ergibt sich die Schwierigkeit, dass geeignete Schnittstellen für den Austausch vorhanden sein müssten, da Sequenz-Amplifizierungen von Phagentyp-RNA-Polymerasen über PCR sehr fehlerbehaftet sind (Stein 1998).

Die weitere Charakterisierung des Petite-Genoms könnte durch Hybridisierung mit verschieden großen DNA-Fragmenten des Mitochondriengenoms erfolgen. Die Identifizierung von fehlenden Sequenzen lässt eventuell Rückschlüsse auf den Mechanismus der Replikation zu.

Für die Analyse der Evolution von Rpo41p wären weitere In-trans-Komplementationen hilfreich. Hierdurch könnten zusammengehörige Funktionseinheiten der verschiedenen Domänen identifiziert werden und die Abfolge der Schritte der hypothetischen Genfusion aufgeklärt werden.

6. Zusammenfassung

Ein Schlüsselprozess für die Regulation der Kern-Zytoplasma-Interaktionen ist die Transkription in den Mitochondrien. Die mitochondrialen RNA-Polymerasen sind in fast allen Eukaryonten vom Bakteriophagentyp. Für die Untersuchung dieser RNA-Polymerasen hat sich die Hefe als genetisches System etabliert. Sie wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit benutzt, um funktionelle Studien zum mitochondrialen Core-Enzym von *Arabidopsis* (RpoT;1) und Hefe (Rpo41p) durchzuführen. Über das Dihybridsystem und heterologe Komplementationsstudien wurden mögliche Zusatzfaktoren und Protein-Protein-Interaktionen analysiert. Für detaillierte Experimente zu den möglichen Zusatzfaktoren wurden *Arabidopsis*-Genbanken des Dihybridsystems und Klone mit potenziellen pflanzlichen Sigma-Faktoren genutzt. Über diesen Ansatz konnten trotz intensiver Suche nicht eindeutig neue pflanzliche Zusatzfaktoren bestimmt werden. Die Arbeit wurde deshalb auf die Analyse des Core-Enzyms fokussiert. Das Core-Enzym von *Arabidopsis* wurde in einem Hefestamm mit deletiertem mitochondrialen RNA-Polymerase-Gen ($\Delta rpo41$) exprimiert und auf die funktionelle Komplementation getestet. Obwohl viele solcher heterologen Komplementationen mit anderen Genen schon erfolgreich waren, ergab die pflanzliche Polymerase in Hefe-Mitochondrien keine Aktivität. Durch den Austausch einzelner Hefedomänen durch homologe *Arabidopsis*-Domänen wurde deshalb nach chimären Genen gesucht, die die $\Delta rpo41$ -Mutante komplementieren. Zwar konnte keines dieser chimären Gene das deletierte Gen funktionell voll ersetzen, aber eines der Konstrukte unterstützte die Replikation deletierter Mitochondriengenome (Petite-Genom). Das chimäre Enzym enthielt die ersten 974 N-terminalen Aminosäuren von Rpo41p und die letzten 270 C-terminalen Aminosäuren von RpoT;1. Die Deletion der C-terminalen pflanzlichen Domäne zeigte, dass auch das verkürzte Rpo41p alleine noch die Replikation von Petite-Genomen erlaubt, obwohl es keine RNA synthetisieren kann. Dieser Befund führte zu neuen Komplementationsstudien. Die fehlende C-terminale Sequenz von Rpo41p wurde mit einer mitochondrialen Importsequenz versehen und dann zusammen mit dem N-terminalen Fragment *in trans* exprimiert. Diese beiden Rpo41p-Fragmente waren nun in der Lage, eine funktionelle RNA-Polymerase zu bilden. Damit ergibt sich das überraschende Fazit, dass schon der kleinste Sequenz-Austausch bei Rpo41p durch homologe *Arabidopsis*-Sequenzen zur Funktionslosigkeit führt, nicht jedoch die Expression von Rpo41p in zwei Teilen. Dies kann nur durch starke spezifische Interaktionen einzelner Domänen des Core-Enzyms untereinander erklärt werden. Die Feinabstimmung dieser Interaktionen während der evolutionären Entwicklung der verschiedenen Spezies führte somit zur beobachteten funktionellen Isolierung der homologen Enzyme. Mit diesen Daten wurde ein neues Modell für die Funktion und Evolution der mitochondrialen RNA-Polymerasen des Bakteriophagentyps entwickelt.

7. Literaturverzeichnis

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K und Watson JD (1990):
Molekularbiologie der Zelle. 2. Aufl., VCH, Weinheim: 268
- Baldacci G und Bernardi G (1982): Replication origins are associated with transcription initiation sequences in the mitochondrial genome of yeast. *EMBO J.* 1: 987–994.
- Baldacci G, Chérif-Zahar B und Bernardi G (1984): The initiation of DNA replication in the mitochondrial genome of yeast. *EMBO J.* 3: 2115–2120.
- Bendich AJ (1996): Structural analysis of mitochondrial DNA molecules from fungi and plants using moving pictures and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 255: 564–588.
- Bogenhagen DF (1996): Interaction of mtTFB and mtRNA polymerase at core promoters for transcription of *Xenopus laevis* mtDNA. *J. Biol. Chem.* 271: 12036–12041.
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH und Falkow S (1977): Construction and characterization of new cloning vehicles. A multipurpose cloning system. *Gene* 2: 95–113.
- Boumanns H *et al.* (1998): The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *J. Biol. Chem.* 273: 4872–4877.
- Broach JR, Jones EW und Pringle EW (1991): The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Carrodeguas JA, Yun S, Shadel GS, Clayton DA und Bogenhagen DF (1996): Functional conservation of yeast mtTFB despite extensive sequence divergence. *Gene Exp.* 6: 219–230.
- Chang DD und Clayton DA (1985a): Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 351–355.
- Chang DD, Hauswirth WW und Clayton DA (1985b): Replication priming and transcription initiate from precisely the same site in mouse mitochondrial DNA. *EMBO J.* 4: 1559–1567.
- Chien C, Bartel PL, Sternglanz R und Fields S (1991): The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9578–9582.

- Cliften PF, Park J, Davis BP, Jang S, Jaehning JA (1997): Identification of three regions essential for interaction between a σ -like factor and core RNA polymerase. *Genes Dev.* 11: 2897–2909.
- Cozens AL und Walker JE (1986): Pea chloroplast DNA encodes homologues of *Escherichia coli* ribosomal subunit S2 and the β' -subunit of RNA polymerase
- Dairaghi DJ, Shadel GS und Clayton DA (1995): Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG-box containing protein into a transcriptional activator. *J. Mol. Biol.* 249: 11–28.
- DeLarue M, Poch O, Tordo N, Moras D und Argos P (1990): An attempt to unify the structure of polymerases. *Protein Eng.* 3: 461–467.
- Diffley JFX und Stillman B (1991): A close relative of the nuclear, chromosomal high-mobility group protein HMG1 in yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7864–7868.
- Ephrussi B, Hottinguer H und Chimenes AM (1949): Action de l'acriflavine sur les levures. I. La mutation 'petites-colonies'. *Ann. Inst. Pasteur* 76: 351–367.
- Fangman WL, Henly JW und Brewer BJ (1990): RPO41-independent maintenance of [*rho*] mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10: 10–15.
- Faugeron-Fonty G, le van Kim C, de Zamaroczy M, Goursot R und Bernardi G (1984): A comparative study of the ori sequences from the mitochondrial genomes of twenty wild-type yeast strains. *Gene* 32: 459–473.
- Fisher RP, Lisowsky T, Breen GAM, Clayton DA (1991): A rapid efficient method for purifying DNA-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 9153–9160.
- Fisher RP, Lisowsky T, Parisi MA, Clayton DA (1992): DNA wrapping and bending by a mitochondrial high mobility group-like transcriptional activator protein. *J. Biol. Chem.* 267: 3358–3367.
- Foury F und Cazzalini (1997): Deletion of the yeast homologue of the human gene associated with Friedreich's ataxia elicits iron accumulation in mitochondria. *FEBS Lett.* 411: 373–377.
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N und Purnelle B (1998): The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS L.* 440: 325–331.

- Fuller CW und Richardson CC (1985): Initiation of DNA replication at the primary origin of bacteriophage T7 by purified proteins. *J. Biol. Chem.* 260: 3185–3196.
- Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR und Wods RA (1995): Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11: 355–360.
- Goffeau A *et al.* (1996): Life with 6000 genes. *Science* 274: 546–567
- Goffeau A *et al.* (1997): The yeast genome directory. *Nature* 387: 1–105
- Graves T, Dante M, Eisenhour L und Christianson TW (1998): Precise mapping and characterization of the RNA primers of DNA replication for a yeast hypersuppressive petite by *in vitro* capping with guanylttransferase. *Nucl. Ac. Res.* 26: 1309–1316.
- Gray MW (1992): The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* 141: 233–357.
- Greenleaf AL, Kelly JL, Lehman IR (1986): Yeast *RPO41* gene product is required for transcription and maintenance of the mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 3391–3394.
- Grivell LA *et al.* (1999): Mitochondrial assembly in yeast. *FEBS Letters* 452: 57–60.
- Hajdukiewicz PTJ, Allison LA, und Maliga P (1997): The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids. *EMBO J.* 16: 4041–4048.
- Hanahan D (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557–580.
- Hedtke B, Börner T und Weihe A (1997): Mitochondrial and chloroplast phage-typ RNA polymerases in *Arabidopsis*. *Science* 277: 809–811.
- Hedtke B (1999): Isolation und Charakterisierung bakteriophagenähnlicher organellärer RNA-Polymerasen aus höheren Pflanzen. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin.
- Hedtke B, Börner T und Weihe A (2001): One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Reports* 1: 435–440.
- Herbert CJ, Dujardin G, Labouesse M und Slonimski PP (1988): Divergence of the mitochondrial leucyl tRNA synthetase genes in two closely related yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces douglasii*: a paradigm of incipient evolution. *Mol. Gen. Genet.* 213: 297–309

- Holm C, Meeks-Wagner DW, Fangman WL und Botstein D (1986): A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene* 42: 169–173.
- Hu J und Bogorad L (1990): Maize chloroplast RNA polymerase: the 180-, 120-, and 38-kilodalton polypeptides are encoded in chloroplast genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1531–1535.
- Igloi GL und Kössel H (1992): The transcriptional apparatus of chloroplasts. *Crit. Rev. Plant Sci.* 10: 525–558.
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ und White TJ (1990): PCR Protocols – a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego.
- Isono K, Shimizu M, Yoshimoto K, Niwa Y, Satoh K, Yokota A, und Kobayashi H (1997): Leaf-specifically expressed genes for polypeptides destined for chloroplasts with domains of σ 70 factors of bacterial RNA polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14948–14953.
- Jan P, Stein T, Hehl S und Lisowsky T (1999): Expression studies and promoter analysis of the gene for mitochondrial transcription factor 1 (*MTF1*) from yeast: *curr. Genet.* 36: 37–48.
- Kirk JTO und Tilney-Basset RAE (1978): The plastids; their chemistry, structure, growth and inheritance. 2nd Ed., Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Knippers R (1995): Molekulare Genetik, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Lange H, Lisowsky T, Gerber J, Mühlenhoff U, Kispal G und Lill R (2001): Essential function of the mitochondrial sulfhydryl oxidase *Erv1p/Alrp* in the maturation of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO reports* (in press/Ref. No. ER0176)
- Larsson NG, Garman JD, Oldfors A, Barsh GS und Clayton DA (1996): A single mouse gene encodes the mitochondrial transcription factor A and a testis specific nuclear HMG-box protein. *Nature Gen.* 13: 296–302.
- Lecrenier N und Foury F (2000): New features of mitochondrial DNA replication system in yeast and man. *Gene* 246: 37–48.
- Lisowsky T und Michaelis G (1988): A nuclear gene essential for mitochondrial replication suppresses a defect of mitochondrial transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 214: 218–223.

- Lisowsky T und Michaelis G (1989): Mutations in the genes for mitochondrial RNA Polymerase and a second mitochondrial transcription factor of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 219: 125–128.
- Lisowski T, Weinstat-Saslow DL, Barton N, Reeders ST und Schneider MC (1995): A new human gene located in the PKD1 region of chromosome 16 is a functional homologue to *ERV1* of yeast. *Genomics* 29: 690–697.
- Lisowsky T, Stein T, Michaelis G, Guan M, Chen XJ und Clark-Walker GD (1996): A point mutation in the nuclear gene of yeast mitochondrial RNA polymerase, *RPO41*, identifies a functionally important amino-acid residue in a protein region conserved among mitochondrial core enzymes. *Curr. Genet.* 30: 389–395.
- Lisowsky T, Polosa PL, Sagliano A, Roberti M, Gadaleta MN und Cantatore P (1999): Identification of human GC-box-binding zinc finger protein, a new Krüppel-like zinc finger protein, by the yeast one-hybrid screening with a GC-rich target sequence. *FEBS Letters* 453: 369–374.
- Lorimer HE, Brewer BJ und Fangman WL (1995): A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. *Mol. Cell. Biol.* 15: 4803–4809.
- MacAlpine DM, Kolesar J, Okamoto K, Butow RA und Perlman PS (2001): Replication and preferential inheritance of hypersuppressive petite mitochondrial DNA. *EMBO J.* 20: 1807–1817.
- Mangus DA, Jang SH, Jaehning JA (1994): Release of the yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor from transcription complexes. *J. Biol. Chem.* 269: 26568–26574.
- McCarthy AD und Hardie DG (1984): Fatty acid synthase – an example of protein evolution by gene fusion. *Trends Biochem. Sci.* 9: 60–62.
- Mignotte B und Vayssiere J (1998): Mitochondria and apoptosis. *Eur. J. Biochem.* 252: 1–15.
- Minet M und Lacroute F (1990): Cloning and sequencing of a human cDNA coding for a multifunctional polypeptide of the purine pathway by complementation of the *ade2-101* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 18: 287–291.
- Mohamed AH, Chirala SS, Mody NH, Huang W und Wakil SJ (1988): Primary structure of the multifunctional α subunit protein of yeast fatty acid synthase derived from *FAS2* gene sequences. *J. Biol. Chem.* 263: 12315–12325.

- Mullet JE (1993): Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiol.* 103: 309–313.
- Neuhoff N, Stamm R und Eibl H (1985): Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamid gels: A systemis analysis. *Electrophoresis* 6: 427–448.
- Okamuro JK, Caster B, Villarroel R, van Montagu M und Jofuku KD (1997): The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7076–7081.
- Osinga KA, De Haan M, Christianson T und Tabak HF (1982): A nonanucleotide sequence involved in promotion of ribosomal RNA synthesis and RNA priming of DNA replication in yeast mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 10: 7993–8006.
- Parisi MA und Clayton DA (1991): Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* 252: 965–969.
- Parisi MA, Xu B und Clayton DA (1993): A human mitochondrial transcriptional activator can functionally replace a yeast mitochondrial HMG-box protein both *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Cell Biol.* 13: 1951–1961.
- Piko L und Matsumoto L (1976): Number of mitochondria and some properties of mitochondrial DNA in the mouse egg. *Dev. Biol.* 49: 1–10
- Poyton RO and McEwen JE (1996): Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Ann. Rev. Biochem.* 65: 563–607.
- Pratje E und Michaelis G (1977): Allelism studies of mitochondrial mutants resistant to antimycin A or funiculosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 152: 167–174.
- Riemen G und Michaelis G (1994): A point mutation in the core subunit gene of yeast mitochondrial RNA polymerase is suppressed by a high level of specificity factor *MTF1*. *Mol. Gen. Genet.* 237: 49–57.
- Riesmeier JW, Willmitzer L und Frommer WB (1992): Isolation an characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J.* 11: 4705–4713.
- Rodeheffer MS, Boone BE, Bryan AC und Shadel GS (2001): Nam1p, a protein involved in RNA processing anf translation, is coupled to transcription through an interaction with yeast mitochondrial RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 276: 8616–8622.

- Sanger F, Nickeln S und Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463–5467.
- Schinkel AH, Groot Koerkamp MJA, Touw EPS und Tabak HF (1987): Specificity factor of yeast mitochondrial RNA polymerase: Purification and interaction with core RNA polymerase. J. Biol. Chem. 262: 12785–12791.
- Schneider R, Brors B, Massow M und Weiss H (1997): Mitochondrial fatty acid synthesis: a relict of endosymbiotic origin and a specialized means for respiration. FEBS Lett. 407: 249–252.
- Schweizer M, Lebert C, Höltke J, Roberts LM und Schweizer E (1984): Molecular cloning of the yeast fatty acid synthase genes, *FAS1* and *FAS2*: Illustrating the structure of the *FAS1* cluster gene by transcript mapping and transformation studies. Mol. Gen. Genet. 194: 457–465.
- Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, Wakasugi T, Hayashida N, Matsubayashi T, Zaita N *et al.* (1986): The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organisation and expression. EMBO J. 5: 2043–2049.
- Shpakovski GV, Acker J, Wintzerith M, Lacroix J, Thuriaux P und Vigneron M (1995): Four subunits that are shared by the three classes of RNA polymerase are functionally interchangeable between *Homo sapiens* and *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 15: 4702–4710.
- Sijben-Müller G, Hallick RB, Alt J, Westhoff P und Herrmann RG (1986): Spinach plastid genes coding for initiation factor IF-1, ribosomal protein S11 and RNA polymerase α -subunit. Nucl. Acids Res. 14: 1029–1044.
- Sor F und Fukuhara H (1982): Identification of two erythromycin resistance mutations in the gene coding for the large ribosomal RNA in yeast. Nuc. Acids Res. 10: 6571–6577.
- Sousa R, Patra D und Lafer EM (1992): Model for the mechanism of bacteriophage T7 RNAP transcription initiation and termination. J. Mol. Biol. 224: 319–334.
- Sousa R, Chung YJ, Rose JP und Wang B (1993): Crystal structure of bacteriophage T7 RNA polymerase at 3.3 Å resolution. Nature 364: 593–599.
- Stein T (1998): Genetische und molekularbiologische Charakterisierung von Komponenten der mitochondrialen Transkription in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Inaugural-Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Stern DB, Higgs DC und Yang J (1997): Transcription and translation in chloroplasts. *Trends Plant Sci.* 2: 308–315
- Stohl LL und Clayton DA (1992): *Saccharomyces cerevisiae* contains an RNase MRP that cleaves at a conserved mitochondrial RNA sequence implicated in replication priming. *Mol Cell. Biol.* 12: 2561–2569.
- Tanaka K, Tozawa Y, Mochizuki N, Shinozaki K, Nagatani A, Wakasa K, und Takahashi H (1997): Characterization of three cDNA species encoding plastid RNA polymerase σ factors in *Arabidopsis thaliana*: Evidence for the σ factor heterogeneity in higher plant plastids. *FEBS Lett.* 413: 309–313.
- Unsel M, Marienfeld JR, Brand P und Brennicke A (1997): The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat. Genet.* 15: 57–61.
- Wang Y und Shadel G (1999): Stability of the mitochondrial genome requires an amino-terminal domain of yeast mitochondrial RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 8046–8051.
- Weihe A, Hedtke B und Börner T (1997): Cloning and characterization of a cDNA encoding a bacteriophage-type RNA polymerase from the higher plant *Chenopodium album*. *Nuc. Acids Res.* 25: 2319–2325.
- Whittier RF und Sugiura M (1992): Plastid chromosomes from vascular plants-genes. In: *Cell organelles* (Herrmann RG, ed.), Springer, Wien: 164–182.
- Winston F, Dollard C und Ricupero-Hovasse SL (1995): Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* 11: 53–55.
- Xu B und Clayton DA (1995): A persistent RNA-DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence. *Mol. Cell Biol.* 15: 580–589.
- Xu B und Clayton DA (1996): RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA-DNA hybrids serving as primers. *EMBO J.* 15: 3135–3143.
- de Zamaroczy M, Faugeron-Fonty G, Baldacci G, Goursot R und Bernardi G (1984): The ori sequences of the mitochondrial genome of a wildtype yeast strain: number, location, orientation and structure. *Gene* 32: 439–457.

Die mitochondrialen Gene* bei Hefe, Mensch und *Arabidopsis thaliana*

	Hefe	Mensch	<i>A. thaliana</i>
Komplex I			
NAD1	-	+	+
NAD2	-	+	+
NAD3	-	+	+
NAD4	-	+	+
NAD4L	-	+	+
NAD5	-	+	+
NAD6	-	+	+
NAD7	-	-	+
NAD9	-	-	+
Komplex III			
COB	+	+	+
Komplex IV			
COX1	+	+	+
COX2	+	+	+
COX3	+	+	+
Komplex V			
ATP1	-	-	+
ATP6	+	+	+
ATP8/AAP1	+	+	-
ATP9/OLI1	+	-	+
Cytochrom-c-Biogenese			
CCB206	-	-	+
CCB256	-	-	+
CCB452	-	-	+
CCB382	-	-	+
CCB203	-	-	+
Ribosomale Proteine			
VAR1	+	-	-
RPL2	-	-	+
RPL5	-	-	+
RPL16	-	-	+
RPS3	-	-	+
RPS4	-	-	+
RPS7	-	-	+
RPS12	-	-	+
RPS13	-	-	+
RPS14	-	-	Ψ
RPS19	-	-	Ψ
Ribosomale RNAs			
RRN5/9SrRNA	+	-	+
RRN18G/15SrRNA/12S	+	+	+
RRN26G/21SrRNA/16S	+	+	+
Transfer-RNAs	25	22	22

Ψ = Pseudogen

*Die Nomenklatur der Gene der verschiedenen Spezies ist uneinheitlich
Nach Knippers (1995) und Unseld *et al.* (1997), verändert.

Sequenz-Alignment von *RPO41* und *RPOT;1* im Bereich der Sequenzaustausche

```

RPOT;1.....1233.CCAGAACTGGACAGGGTATGATCAAGGGGCTCATTTTTTCTTGCCCTTCGTACGTCATGAG
RP041.....2037.CAAACCCTGGGTAAATTGGAGATCAGGTGGATATCATTATACACAATCTACCCTTTTAAG
.....*.....****.....*.....***.*.....**.....*.....**.....*.....**
RPOT;1.....1293.AACACATGGAGCTAAACAACAACGCACTGTTATGAAACGAACTCC--AAAGGAGCAACT
RP041.....2097.AACAAAAGACTCACCCGAACAAGTAGCATATTTGAAAGCTGCTTCCGATAATGGTGATAT
.....****.*.....*.....*****.....*.....*****.....**.....*.....**.....*.....*
RPOT;1.....1350.GGAGCCAGTATATGAGGCTTTAGATACTCTAGGAAACACTAAATGGAAGATAAACAAAA
RP041.....2157.AGACCGCGTTTATGATGGTTTGAATGTTCTGGGTAGAACACCGTGGACTGTCAACAGAAA
.....*.....**.....*****.*.....**.....**.....***.*.....**.....*****.....*.....*****.***
RPOT;1.....1410.GGTGTTAAGTTTGGTGGACAGAATCTGGGCTAATGG---AGGTCGCATTGGTGGTCTGGT
RP041.....2217.AGTTTTTGGATGTGGTTTCAAGTTTGGAAATAAAGGTGAAGTTTCCCTAGATATTCAGG
.....**.....**.....*.....****.....*.....*.....***.....***.*.....*****.....*.....*.....*.....*
RPOT;1.....1467.TGACCGTGAAGATGTACCCATTCCAGTAGAGCCGAAAGGGAA--GACCAAGAAAAATT
RP041.....2277.TGCACAAGACGAAATGGTTTTACCACCAGCTCCTCCGAAGAACTCCGACCCTTCCATTTT
.....**.....*.....**.....**.....*.....*.....***.....*.....**.....*.....*.....*****.....**
RPOT;1.....1524.TAAAAATTGGAGATGGGAATCCAAAAA---GCAATTAAGCAAAATAATGAGAGACATTC
RP041.....2337.GAGAGCCTGGAAACTTCAAGTCAAAACAATTGCTAATAAATTCTCTTCAGATAGA--T-C
.....*.....****.*.....**.....*****.*.....**.....*.....***.....*.....**.....**.....*
RPOT;1.....1581.ACAAAGGTGTGATATAGAGCTCAAACTCGAGGTGGCACGTAAAATGAAGGATGAGGAAGG
RP041.....2394.AAATAGATGTGATACGAACTACAAATTGGAAATTGCAAGAGCATTTTTTGGGTGAA-AAG-
.....*.....**.....*****.....*.....*****.*.....**.....*.....***.*.....*.....**.....***.
RPOT;1.....1641.TTTCTACTACCCTCACAACTGATTTCGTGGGCGAGCATATCCCATACATCCATATCT
RP041.....2452.-CTGACTTTCCACATAATTTGGACTTTAGGGGACGTGCTTATCCTTTGTCTCCACATTT
.....*.....****.*.....**.....**.....*.....**.....***.*.....**.....**.....*****.....*.....*****.***
RPOT;1.....1701.CAACCATCTCGGGTCTGATCTCTGCCGAGGCATCCTTGAGTTTTGTGAGGGAAAGCCTCT
RP041.....2511.CAATCATCTTGGTAATGATATGAGTCGTGGCCTTTTGATTTTTTGGCACGGTAAAAAATT
.....***.....*****.*.....*****.*.....**.....**.....*.....*.....*****.....*.....**.....**.....*
RPOT;1.....1761.TGGGAAATCAGGGTTGCGTTGGCTGAAGATACATATAGCAAACCTTATATGCTGGTGGAGT
RP041.....2571.AGGACCTTCTGGTCTCAAGTGGTTAAAGATTCATTTGTCAA--TCTGTTTC---GGATT
.....**.....**.....**.....*.....***.*.....*****.....***.*.....*****.....*.....*.....*.....**.....*

```


Aminosäurekodierung in den Hefe-Mitochondrien

Aminosäure	Abkürzung	Ein-Buchstabencode	DNA-Kodons
Alanin	Ala	A	GCT, GCC, GCA, GCG
Cystein	Cys	C	TGT, TGC
Asparaginsäure	Asp	D	GAT, GAC
Gluthaminsäure	Glu	E	GAA, GAG
Phenylalanin	Phe	F	TTT, TTC
Glycin	Gly	G	GGT, GGC, GGA, GGG
Histidin	His	H	CAT, CAC
Isoleucin	Ile	I	ATT, ATC
Lysin	Lys	K	AAA, AAG
Leucin	Leu	L	CTT, CTC, CTG
Methionin	Met	M	<i>ATA</i> , ATG
Asparagin	Asn	N	AAT, AAC
Prolin	Pro	P	CCT, CCC, CCA, CCG
Glutamin	Gln	Q	CAA, CAG
Arginin	Arg	R	CGT, CGC, CGA, CGG
Serin	Ser	S	TCT, TCC, TCA, TCG
Threonin	Thr	T	ACT, ACC, ACA, ACG, <i>CTA</i>
Valin	Val	V	GTT, GTC, GTA, GTG
Tryptophan	Trp	W	<i>TGA</i> , TGG
Tyrosin	Tyr	Y	TAT, TAC

Die kursiven DNA-Kodons weichen vom universellen genetischen Code ab. Im universellen Code stehen sie für:

ATA: Isoleucin

CTA: Leucin

TGA: Stopp