

**Biochemische und funktionelle Untersuchungen der Transposase
des *Activator*-Elements aus *Zea mays***

Dissertation

der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Ruth Hedwig Adolphs
(eingereicht zur Begutachtung am 18.12.2000)

Erstgutachter: PD Dr. Reinhard Kunze
Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Ulrich Koop
Tag der mündlichen Prüfung: 8.März 2001

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Essers, L., **Adolphs R.H.**, und Kunze R. (2000): A highly conserved domain of the maize activator transposase is involved in dimerization. *Plant Cell* **12**, 211-222.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entdeckung der Transposition	1
1.2	<i>Ac/Ds</i> -Elemente gehören zur Familie der hAT-Transposons	2
1.3	Das <i>Ac</i> -Element codiert für ein einzelnes Protein, die Transposase	4
1.4	Die <i>Ac</i> -Transposase ist als Oligomer aktiv	5
1.5	Negative Autoregulation der <i>Ac</i> -Transposition	6
1.6	Das <i>Ac</i> -Element ist auch in heterologen Systemen aktiv	7
1.7	Modelle zum Reaktionsablauf der Transposition	8
1.8	Die Reaktionsabläufe bei der Transposition pro- und eukaryotischer DNA-Elemente sind ähnlich	11
1.9	Das DDE-Motiv bildet das katalytische Zentrum von bakteriellen Transposasen und retroviralen Integrasen	12
1.10	Spielt Transposition eine Rolle in der Evolution?	13
1.11	Zielsetzungen der Arbeit	13
2	Ergebnisse	15
2.1	Expression rekombinanter <i>Ac</i> -TPase in <i>E. coli</i>	15
2.1.1	Die Löslichkeit von in <i>E. coli</i> exprimierter TPase ist abhängig von der Wachstumstemperatur	15
2.1.2	Löslich exprimierte <i>Ac</i> -TPase aus <i>E. coli</i> bindet spezifisch DNA	17
2.1.3	Löslich exprimierte TPase aus <i>E. coli</i> bildet hochmolekulare Aggregate	18
2.1.4	Fraktionierte TPase-Aggregate binden spezifisch DNA	19
2.1.5	Die Reinigung der TPase mittels Affinitätschromatographie ist ineffizient	21
2.2	<i>Ac</i> -TPase aus transgenem Tabak	21
2.2.1	Isolierung von <i>Ac</i> -TPase als Kernproteinextrakt aus transgenem Tabak	22
2.2.2	TPase aus transgenem Tabak bindet spezifisch DNA	24
2.2.3	Kernproteine aus <i>Petunia hybrida</i> binden subterminale TPase-Bindestellen	26
2.3	Versuche zur Etablierung eines <i>in vitro</i> -Transpositionsassays und des Nachweises endonukleolytischer Aktivität der <i>Ac</i> -TPase	27
2.3.1	<i>In vitro</i> -Transpositionssystem zur Exzision und Integration	27
2.3.2	<i>In vitro</i> -Transpositionssystem zum Nachweis von Exzisionsereignissen	29

2.3.3	Endonukleaseaktivität der <i>Ac</i> -TPase	30
2.3.4	Unspezifische Endonukleaseaktivität der <i>Ac</i> -TPase	31
2.3.5	Integration eines vorgeschrittenen <i>Ds</i> -Elements in eine Ziel-DNA	32
2.4	Die C-terminale Dimerisierungsdomäne der <i>Ac</i>-TPase	33
2.4.1	Die Dimerisierung des TPase ^{His674-777} -Fragments ist <i>in vitro</i> sehr stabil	34
2.4.2	Mutationen innerhalb der Dimerisierungsdomäne verringern die Dimerstabilität <i>in vitro</i>	35
2.4.3	Mutationen innerhalb der Dimerisierungsdomäne führen zum Funktionsverlust der <i>Ac</i> -TPase <i>in vivo</i>	38
2.4.4	Rezessive und dominante Mutationen in der Dimerisierungsdomäne	41
2.4.5	Die Dimerisierungsdomäne ist <i>in vivo</i> an der Aggregatbildung beteiligt	43
2.5	Die N-terminale Oligomerisierungsdomäne der <i>Ac</i>-TPase	45
2.5.1	Teile der mutmaßlichen Oligomerisierungsdomäne sind hochkonserviert	45
2.5.2	Expression verschiedener Deletionsderivate der Oligomerisierungsdomäne	47
2.5.3	Deletionsderivate der TPase zeigen <i>in vitro</i> verschiedene Oligomerisierungsverhalten	48
2.5.4	Die inaktive TPase ¹³⁶⁻⁸⁰⁷ bildet <i>in vivo</i> kleinere Aggregate als die WT-TPase	53
2.5.5	Spezifische DNA-Bindung der TPase-Deletionsderivate	53
2.6	Die <i>Ac</i>-TPase bringt <i>in vitro</i> freie Transposon-Enden über Proteininteraktionen in räumliche Nähe zueinander	55
2.6.1	Die Oligomerisierungsdomäne ist am Aufbau eines synaptischen Komplexes <i>in vitro</i> beteiligt	56
2.7	Untersuchungen zum mutmaßlichen aktiven Zentrum der <i>Ac</i>-TPase	62
2.7.1	Die <i>Ac</i> -TPase besitzt innerhalb der Interaktionsdomänen mehrere mutmaßliche DDE-Motive	62
2.7.2	Effekte von Aminosäureaustauschen innerhalb der mutmaßlichen DDE-Motive auf die <i>in vivo</i> -Aktivität der TPase	63
2.8	Hyperaktive TPase-Mutanten	67
2.8.1	Doppel- und Vierfachmutanten zeigen eine erhöhte TPase-Aktivität in Hefe	67
2.8.2	Die Hyperaktivität der TPase-Mutanten kann auch in Petunienprotoplasten gezeigt werden	68
2.8.3	Hyperaktive Mutanten sind nur begrenzt in der Aggregatbildung gestört	70

3	Diskussion	72
3.1	<i>In vitro</i> - <i>Ac</i> -Transpositionsassays	72
3.2	Sind Wirtsfaktoren an der <i>Ac</i> -Transposition beteiligt?	74
3.3	TPase bindet DNA als Oligomer	75
3.4	Hochkonservierte Domänen der <i>Ac</i>-TPase enthalten Proteininteraktionsdomänen	76
3.4.1	Die C-terminale Dimerisierungsdomäne enthält ein Sequenzmotiv, das unter Transposasen der <i>hAT</i> -Familie hochkonserviert ist	76
3.4.2	Die Oligomerisierungsdomäne enthält mehrere Motive, die basischen Leucinzippern ähneln	77
3.5	Die PQ-Domäne als Proteininteraktionsdomäne	78
3.6	Die Rolle der Interaktionsdomänen	80
3.6.1	Die <i>Ac</i> -Transposition erfolgt wahrscheinlich über einen synaptischen Komplex als Zwischenprodukt	80
3.6.2	Regulation der <i>Ac</i> -Transposition durch die Ausbildung inaktiver TPase-Oligomere	83
3.7	Das mutmaßliche aktive Zentrum der <i>Ac</i>-TPase gleicht einem DDE-Motiv	84
3.8	Suppressorphänotyp der inaktiven TPase_{E719A}	87
3.9	Hyperaktive TPase-Mutanten	88
3.10	Ergebnisse aus dem neuartigen Hefesystem zur Transposition von <i>Ac/Ds</i> sind auf pflanzliche Systeme übertragbar	90
3.11	Ausblick	91
4	Zusammenfassung	93
5	Material und Methoden	95
5.1	Material	95
5.1.1	Bezugsquellen von Chemikalien, Enzymen, Radioisotopen, Materialien	95
5.1.2	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	96
5.1.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	97
5.1.4	Puffer und Lösungen	97
5.1.5	Medien	103

5.1.6	Oligonukleotide	104
5.1.7	Plasmide	108
5.1.8	Plasmidkonstruktionen	110
5.2	Mikrobiologische und genetische Methoden	118
5.2.1	Bestimmung der Zelldichte von <i>E. coli</i>	118
5.2.2	Kultivierung und Transformation von <i>E. coli</i>	118
5.2.3	Bestimmung der Zelldichte von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	118
5.2.4	Kultivierung und Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	119
5.3	Molekularbiologische Standardmethoden	119
5.3.1	Handhabung von Nukleinsäuren	119
5.3.2	Konzentrationsbestimmung von DNA	119
5.3.3	Isolierung von Nukleinsäuren	120
5.3.4	Mutagenese von Plasmid-DNA	120
5.3.5	Reinigung von DNA mit Hilfe des Cäsiumchloridgradienten	120
5.3.6	Sequenzierung von DNA	121
5.3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	121
5.3.8	Southernblot	122
5.4	<i>In vivo</i> Systeme zum Nachweis von Transposition	123
5.4.1	Petuniensystem	123
5.4.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -System	125
5.5	Zellbiologische Methoden	126
5.5.1	<i>In situ</i> -Immunfluoreszenz	126
5.5.2	Fluoreszenzmikroskopie	127
5.6	Biochemische Methoden	128
5.6.1	Expression pflanzlicher Proteine in <i>E. coli</i>	128
5.6.2	Isolierung von unlöslichen Proteinen aus <i>E. coli</i>	128
5.6.3	Isolierung und native Reinigung löslicher Proteine aus <i>E. coli</i>	129
5.6.4	Isolierung von Kernproteinen aus transgenem Tabak	130
5.6.5	Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösung	130
5.6.6	Dialyse von Proteinen	131
5.6.7	Ultrafiltration von Proteinen	131
5.6.8	Native Gelfiltration von Proteinen	131
5.6.9	Proteinextrakt aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	131
5.6.10	Proteinextrakt aus Petunienprotoplasten	132

5.6.11	SDS-PAGE von Proteinen und Coomassie-Färbung	132
5.6.12	Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western Blot	133
5.6.13	Gelretardation zum Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen	133
5.6.14	Transposase-vermittelte <i>in vitro</i> -Ligation	134
5.7	<i>In vitro</i>-Studien zur endonukleolytischen Aktivität der TPase	134
5.7.1	<i>In vitro</i> -Transpositionssystem zur Exzision und Integration	134
5.7.2	<i>In vitro</i> -Transpositionssystem zur Exzision	135
5.7.3	Spezifische Endonukleaseaktivität der <i>Ac</i> -Transposase	137
5.7.4	Unspezifische Endonukleaseaktivität der <i>Ac</i> -Transposase	138
5.7.5	Integration eines vorgeschneideten <i>Ds</i> -Elements in eine Ziel-DNA	139
6	Literaturverzeichnis	140
7	Danksagung	151

Abkürzungen und Fachbegriffe

μF	Mikrofarad	Km	Kanamycin
μg	Mikrogramm	kb	Kilobase
μl	Mikroliter	kDa	Kilodalton
μM	Mikromolar	L	Leucin
A	Adenin	Leu	Leucin
A	Alanin	Lys	Lysin
<i>Ac</i>	<i>Activator</i> -Element	M	Methionin
Ade	Adenin	M	Molar
Amp	Ampicillin	mg	Milligramm
AS	Aminosäure	min	Minute
ATP	Adenosintriphosphat	mM	Millimolar
bp	Basenpaar	MOPS	3-(N-Morpholino)propansulphonat
bzw.	beziehungsweise	mRNA	messenger RNA
°C	Grad Celsius	MW	Molekulargewicht
C	Cytosin	N	Asparagin
ca.	circa	ng	Nanogramm
C-Terminus	carboxyterminales Ende	NLS	„nuclear localisation signal“ Kernlokalisierungssignal
d.h.	das heißt	nm	Nanometer
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol	OD	Optische Dichte
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	OD ₅₉₅	Optische Dichte bei 595 nm
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	ORFa	„open reading frame“, offenes Lese - raster für TPase
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	P	Prolin
D	Asparaginsäure	PAA	Polyacrylamid
DMSO	Dimethylsulfoxid	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	PEG	Polyethylenglycol
<i>Ds</i>	<i>Dissociation</i> -Element	Pellet	Zentrifugationssediment
DTT	Dithiothreitol	Primer	Startoligonukleotid für die DNA- Polymerase
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	Q	Glutamin
E	Glutaminsäure	R	Arginin
G	Guanosin	RNA	Ribonukleinsäure
g	Gramm	RNase	Ribonuklease
GTP	Guanosintriphosphat	RT	Raumtemperatur
GUS	β-Glucuronidase	S	Serin
H	Histidin	SDS	Natriumdodecylsulfat
h	Stunde	sec	Sekunde
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser	ST-DNA	Hering-Sperma-DNA
His	Histidin	T	Thymidin
I	Isoleucin	T	Threonin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	TIR	„terminal inverted repeats“
K	Lysin	TPase	<i>Ac</i> -codierte Transposase
Tris	Trishydroxymethylaminomethan	W	Watt

U	Unit (Enzymeinheit)	WT	Wildtyp
Upm	Umdrehungen pro Minute	W	Tryptophan
UV	Ultraviolettes Licht	X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
V	Valin	z.B.	zum Beispiel
V	Volt		

1 Einleitung

1.1 Entdeckung der Transposition

In der klassischen Genetik wurde gelehrt, daß Gene wie Perlen auf einer Schnur in unveränderlicher Anordnung hintereinander aufgereiht auf einem Chromosom sitzen. Durch die Entdeckung der Transposition wurde dieses Bild des Genoms grundlegend verändert. Transposons können als bewegliche Einheiten ihren Platz im Genom wechseln und dabei in ein anderes Gen hineinspringen und dessen Funktion stören. Durch diese Mutation ergibt sich oft ein neuer Phänotyp. Das Transposon kann auch wieder aus dem Gen hinausspringen, so daß der ursprüngliche Phänotyp wieder hergestellt wird. In einem vielzelligen Organismus kann diese Mobilität des transponierbaren Elements während der Entwicklung zu einem variierten Phänotyp führen.

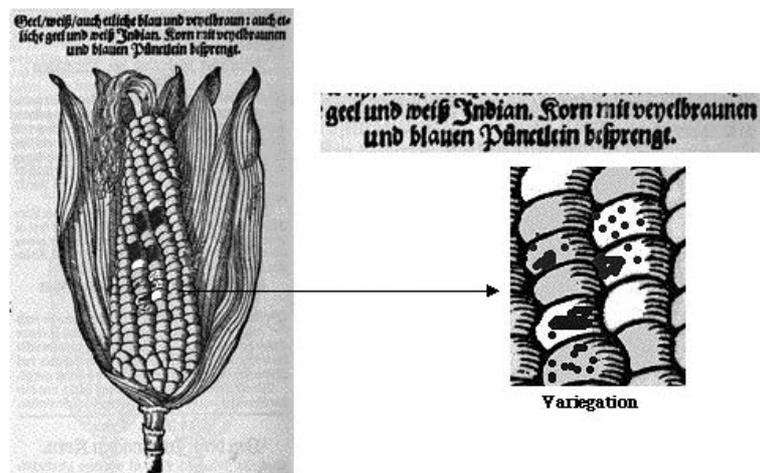


Bild 1: Nachbearbeitete Originalabbildung eines Maiskolbens mit variiertem Phänotyp von D. Jacobi Theodori Tabernamontani (1588). Tabernamontani beschreibt in seinem Herbarium einen mosaiken Phänotyp, der auf eine Transposon-Insertion in Genen der Pigmentsynthese zurückzuführen sein muß (aus „Short History of Discovery“ von Heinz Saedler, www.mpiz-koeln.mpg.de).

Der Franzose D. Jacobi Theodori Tabernamontani hat bereits 1588 als erster Europäer in einem Herbarium variierte Maiskolben beschrieben. Der mosaiken Phänotyp (Bild 1) ist, wie man heute weiß, auf eine Transposon-Insertion in Genen der Pigmentsynthese zurückzuführen.

Genetische Experimente führten in den vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts zur Entdeckung der Transposition. 1944 und 1945 veröffentlichte Barbara McClintock Beobachtungen zu Chromosomenbrüchen bei *Zea mays* (McClintock, 1944; McClintock, 1945). Dabei beobachtete sie unter anderem, daß Chromosom 9 wiederholt an einer ganz bestimmten Stelle

brach. Sie nannte diese Stelle *Dissociation (Ds)*, da der abgetrennte Teil des Chromosoms im Laufe weiterer Zellteilungen verloren ging. Sie erkannte bald, daß der *Ds*-Locus nur dann zu Chromosomenbrüchen führte, wenn ein weiterer Faktor anwesend war, den sie *Activator (Ac)* nannte. 1948 stellte sie fest, daß der *Ds*-Locus ebenso wie der *Ac*-Locus seine Position im Chromosom ändern konnte. Für die Transposition von *Ds* war die Anwesenheit von *Ac* notwendig (McClintock, 1948).

1951 stellte sie ihre Ergebnisse auf dem Cold Spring Harbor Symposium vor und erklärte dabei, daß durch die Transposition von *Ac/Ds* instabile Mutationen entstehen können (McClintock, 1951). Die Reaktionen auf diese Ergebnisse waren abweisend, die Transposition und ihre Bedeutung wurden lange Jahre nicht anerkannt. In den sechziger Jahren wurden transponierbare Elemente in Bakterien entdeckt und man erkannte, daß Transposons ubiquitär vorkommen. Die Arbeiten von Barbara McClintock erhielten 1983 eine späte Anerkennung durch die Verleihung des Nobelpreises.

1.2 *Ac/Ds*-Elemente gehören zur Familie der hAT-Transposons

Die molekularen Untersuchungen zum Mechanismus der Transposition von *Ac/Ds* begannen in den achtziger Jahren. Zwei *Ac*-Elemente, inseriert an verschiedenen Positionen im *waxy*-Gen von *Zea mays*, wurden sequenziert. Beide sind bis auf einige stille Mutationen identisch (Müller-Neumann *et al.* 1984; Yoder *et al.*, 1984; Pohlman *et al.*, 1984; Dooner *et al.*, 1988).

Das autonome *Ac*-Element ist 4565 bp lang und besitzt an beiden Enden 11 bp lange Sequenzwiederholungen („terminal inverted repeats“, TIRs), die bis auf die äußerste Base identisch sind (Bild 2). Die TIRs sind für die Transposition essentiell. Werden am 5'-Ende die äußersten fünf oder am 3'-Ende die äußersten vier Basen mutagenisiert, so führt dies zu einem immobilen *Ac*-Element (Chatterjee und Starlinger, 1995; Weil und Kunze, 2000). *In vitro* wurde nachgewiesen, daß die *Ac*-codierte Transposase schwach an die TIR bindet (Becker und Kunze, 1996).

In den ungefähr 240 bp langen subterminalen Regionen findet sich in mehrfacher Wiederholung und in unterschiedlicher Orientierung das Sequenzmotiv A/TCGG (Bild 2). Hierbei handelt es sich um DNA-Bindestellen für die *Ac*-codierte Transposase (Kunze und Starlinger, 1989), die aber nicht der Sequenz der TIRs entsprechen. Die DNA-Bindung der *Ac*-Transposase an diese Bindemotive ist sehr spezifisch, die Sequenz A/TGGG wird nicht gebunden (Kunze und Starlinger, 1989).

In transgenem Tabak konnte gezeigt werden, daß mindestens 238 bp des 5`-Endes und 209 bp des 3`-Endes zur Transposition notwendig sind (Coupland *et al.*, 1988; Coupland *et al.*, 1989). Die subterminalen Regionen haben zwar gemeinsame Sequenzeigenschaften, die Anordnung der DNA-Bindestellen ist aber unterschiedlich. 5`- und 3`-Ende können nicht gegeneinander ausgetauscht werden. Ein Element mit zwei 5`- oder zwei 3`-Enden kann nicht transponieren (Coupland *et al.*, 1989).

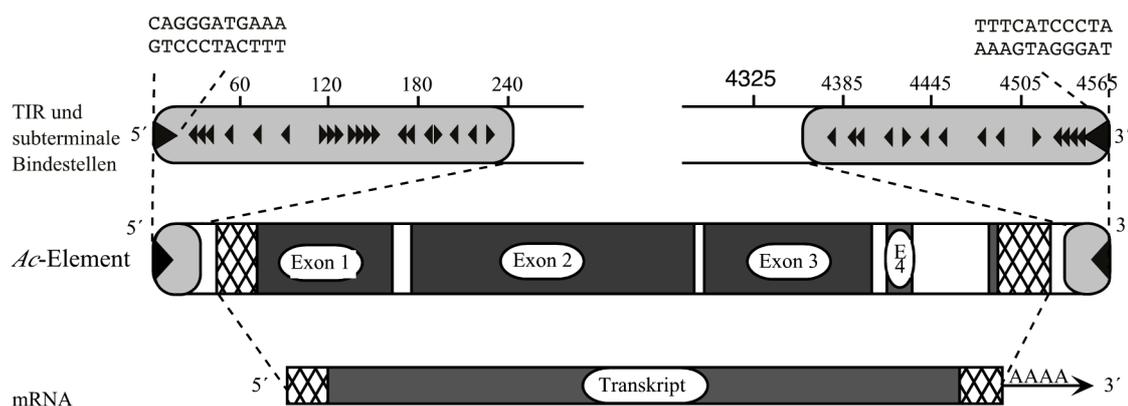


Bild 2: Schematische Darstellung des *Ac*-Elements und des *Ac*-codierten Transkripts aus *Zea mays*. Das *Ac*-Element trägt an beiden Enden elf Basenpaare große Sequenzwiederholungen („terminal inverted repeats“, TIRs, große Dreiecke), die bis auf das äußerste Basenpaar identisch sind. In den subterminalen Regionen finden sich mehrere Bindestellen für die *Ac*-Transposase in verschiedener Anordnung (kleine Dreiecke). Das Transkript besteht aus 5 Exons (dunkelgrau), flankiert von zwei untranslatierten Regionen (schraffiert).

Ds-Elemente sind nicht-autonome Abkömmlinge des *Ac*-Transposons, die in *trans* durch ein *Ac*-Element aktiviert werden können oder durch den Verlust essentieller *cis*-Sequenzen immobil geworden sind. Die einfachsten *Ds*-Elemente haben interne Deletionen der codierenden Sequenz für die Transposase. Andere besitzen die Enden eines *Ac*-Elements, die interne Sequenz weist jedoch Rearrangements oder Nicht-*Ac*-Sequenzen auf. Die *Ds1*-Elemente sind nur 0,4 kb lang und besitzen am 5`-Ende 13 bp und am 3`-Ende 26 bp der Sequenz des *Ac*-Elements. Sonst zeigen sich keine Homologien zu *Ac*. Trotzdem können *Ds1*-Elemente durch *Ac trans*-aktiviert werden (zusammengefaßt in: Kunze, 1996; Kunze *et al.*, 1997).

Das *Ac*-Element ist der Prototyp der Superfamilie der sogenannten *hAT*-Elemente (*h* für *hobo*, *A* für *Ac* und *T* für *Tam3* (Calvi *et al.*, 1991; Hehl *et al.*, 1991)). Diese Transposons integrieren in DNA unter Ausbildung einer acht Basenpaare großen Sequenzduplikation. Außerdem sind die Sequenzen der elf terminalen Basen (TIR) sehr ähnlich. Auf Proteinebene besitzen die von den *hAT*-Elementen codierten Transposasen hochkonservierte Domänen.

1.3 Das *Ac*-Element codiert für ein einzelnes Protein, die Transposase

Das autonome *Ac*-Element codiert für eine 3,5 kb große mRNA. Das Transkript besteht aus 5 Exons und 4 Introns und einer nicht-translatierten 5'- bzw. 3'-Region (Bild 2). Das offene Leseraster codiert für ein 807 Aminosäuren großes Protein, die Transposase (TPase, Bild 3) (Kunze *et al.*, 1987). Dieses Protein ist essentiell für die *Ac/Ds*-Transposition.

In heterologen Pflanzen können nicht-autonome *Ds*-Elemente ebenso durch die *Ac*-Transposase *trans*-aktiviert werden wie in *Saccharomyces cerevisiae* (zusammengefaßt in: Kunze, 1996; Weil und Kunze, 2000). Dadurch kann ausgeschlossen werden, daß zusätzliche pflanzliche Wirtsfaktoren eine für die Transposition essentielle Funktion ausüben (siehe auch 1.6).

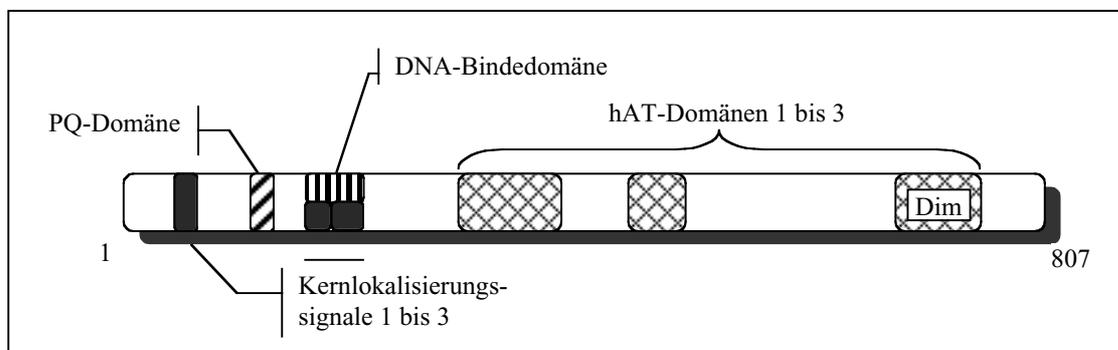


Bild 3: Schematische Darstellung der *Ac*-Transposase. Am N-Terminus des 807 Aminosäuren großen Proteins befinden sich 3 Kernlokalisierungssignale, von denen zwei mit der DNA-Bindedomäne überlappen. Zwischen dem ersten und zweiten Signal befindet sich die essentielle PQ-Domäne unbekannter Funktion. Der C-Terminus des Proteins zeigt starke Homologien zu Transposasen der *hAT*-Familie.

Die TPase enthält N-terminal eine zweigeteilte DNA-Bindedomäne (Kunze und Starlinger, 1989; Feldmar und Kunze, 1991; Becker und Kunze, 1997). Die DNA-Bindemotive in der subterminalen Region von *Ac* werden durch den C-terminalen Teil dieser Domäne erkannt und kooperativ gebunden. Die Bindung an die TIR ist schwächer und benötigt die gesamte DNA-Bindedomäne. Beide Protein-DNA-Interaktionen sind für die Transposition essentiell.

Die *Ac*-Transposase besitzt am N-Terminus außerdem 3 Kernlokalisierungssignale („nuclear localisation signal“, NLS), die gemeinsam den Transport der TPase in den Kern steuern. NLS 2 und 3 überlappen mit der DNA-Bindedomäne (Boehm *et al.*, 1995). Ein Deletionsderivat der Transposase (TPase₁₀₃₋₈₀₇), dem NLS 1 fehlt, zeigt einen verminderten Transport in den Kern. Die einzelnen Signale ergänzen sich somit gegenseitig (Heinlein *et al.*, 1994). Erstaunlicherweise ist die TPase₁₀₃₋₈₀₇ sowohl in transformierten Petunienprotoplasten als auch in transgenem Tabak aktiver als das vollständige Protein (Houba-Hérin *et al.*, 1990; Becker *et*

al., 1992; Kunze *et al.*, 1995). Möglicherweise ist dies auf eine herabgesetzte Autoregulation zurückzuführen, da bei einer hohen TPase-Konzentration im Kern die Transpositionsfrequenz vermindert ist (siehe 1.5).

Eine weitere essentielle Region der *Ac*-TPase befindet sich zwischen NLS1 und 2, die sogenannte PQ-Domäne, deren Funktion unbekannt ist (Kunze *et al.*, 1993). Sie besteht aus Wiederholungen des Dipeptids Prolin-Glutamin.

Während der N-Terminus der TPase keinerlei Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Transposasen aufweist, sind die C-terminalen 600 Aminosäuren unter den Transposasen der *hAT*-Familie zu 30% konserviert. Innerhalb des C-Terminus finden sich drei Regionen, die *hAT*-Regionen eins bis drei, in denen die Proteinsequenz zu 65% identisch ist. Im Hefe-„two-hybrid“-System konnte für die dritte *hAT*-Domäne der *Ac*-codierten Transposase gezeigt werden, daß sie eine Proteininteraktionsfunktion enthält (Essers, 1996).

Bisher ist es nicht gelungen, weitere TPase-spezifische Funktionen zu charakterisieren. Dazu würde beispielsweise eine spezifische Endonuklease-Aktivität gehören. Die Transposase kann aber durch verschiedene, über das ganze Protein verteilte Aminosäureinsertionen inaktiviert werden (Kunze *et al.*, 1993), was den Schluß nahelegt, daß das multifunktionale Protein C-terminal weitere funktionelle Domänen besitzt.

1.4 Die *Ac*-Transposase ist als Oligomer aktiv

Die DNA-Bindung der *Ac*-Transposase an die subterminalen Bindemotive im *Ac*-Element verläuft kooperativ (Becker und Kunze, 1997). Eine Erklärung dafür wäre, daß die DNA-Proteininteraktion über Protein-Protein-Wechselwirkungen stabilisiert wird.

Durch *in vivo*-Studien wurde gezeigt, daß die *Ac*-Transposase tatsächlich als Oligomer aktiv ist. Dazu wird die Transpositionsfrequenz in Petunienprotoplasten anhand eines *Ds*-Reporterplasmids ermittelt, in dem ein nicht-autonomes *Ds*-Element im offenen Leseraster des *GUS*-Gens sitzt. Wird das *Ds*-Element *trans*-aktiviert, ist die GUS-Expression wieder hergestellt (Houba-Hérin *et al.*, 1990; Heinlein *et al.*, 1994).

Die Co-Expression der Mutante TPase_{H191R/R193H}, die nicht mehr spezifisch DNA bindet, mit WT-TPase ergibt einen dominant-negativen Phänotyp. Es konnte keine Transpositionsfrequenz mehr gemessen werden. Dies bedeutet, daß die Mutante mit der WT-TPase einen inaktiven Heterokomplex gebildet haben muß (Kunze *et al.*, 1993).

Ein dominant-negativer Phänotyp konnte auch für TPase₁₈₉₋₈₀₇ beobachtet werden (Kunze *et al.*, 1993). TPase₁₈₉₋₈₀₇ kann nicht spezifisch DNA binden, da der größte Teil der DNA-Bindedomäne deletiert ist. Das Protein wird aber auch nicht mehr in den Kern transportiert, da die Kernlokalisierungssignale fehlen, es akkumuliert stattdessen in Form filamentöser Aggregate im Cytoplasma. Dies konnte in der Immunfluoreszenz von transfizierten Petunienprotoplasten nachgewiesen werden (Boehm *et al.*, 1995). Die WT-TPase hingegen bildet hauptsächlich in oder auf den Kernen der Protoplasten Aggregate. Werden beide Proteine co-exprimiert, sind keine cytoplasmatischen Aggregate mehr nachweisbar, demzufolge wird die Mutante von der WT-TPase in einem inaktiven Heterokomplex in den Kern co-transportiert (Boehm *et al.*, 1995).

1.5 Negative Autoregulation der Ac-Transposition

Filamentöse Aggregate können auch in Endospermzellen von *Zea mays* detektiert werden, die homozygot für ein aktives *Ac*-Element sind (Heinlein *et al.*, 1994), sowie in transgenen Tabakpflanzen (I. Kornacker und R. Kunze, unveröffentlicht). Es ist nicht bekannt, ob diese Aggregate aus aktiven Oligomeren entstehen oder ob es sich hierbei um eine gesonderte Form der Oligomerisierung handelt, die zur Inaktivierung der Transposase führen könnte.

Die Transposition unterliegt einer negativen Autoregulation, die von der TPase-Konzentration in der Zelle abhängig ist. Überschreitet diese einen Grenzwert, kann die Transpositionsfrequenz nicht weiter gesteigert werden (Scofield *et al.*, 1993). Interessanterweise stellte Barbara McClintock schon 1948 fest, daß die Transpositionsfrequenz mit steigender Anzahl an *Ac*-Elementen zurückgeht, was sie als „inversen Dosisseffekt“ bezeichnete (McClintock, 1948).

Es wird postuliert, daß die Ausbildung der filamentartigen Aggregate für diesen Effekt verantwortlich ist und daß diese aus inaktiver TPase bestehen (Heinlein *et al.*, 1994). Dafür spricht, daß eine erhöhte TPase-Expression in transfizierten Petunienprotoplasten zwar zu einer vermehrten Ausbildung von filamentösen Aggregaten führt, aber die Transpositionsfrequenz konstant bleibt (Heinlein *et al.*, 1994). Das heißt, daß die Menge aktiver Transposase in der Zelle trotz erhöhter Expression gleichzubleiben scheint und überschüssiges Protein ab einem bestimmten Grenzwert vermutlich in Aggregaten inaktiviert wird.

1.6 Das Ac-Element ist auch in heterologen Systemen aktiv

Das *Ac*-Element ist in allen 17 Pflanzenarten aktiv, in die es bisher eingebracht wurde, darunter auch in Kulturpflanzen wie Reis, Weizen, Soja und Kartoffel (Knapp *et al.*, 1988; Laufs *et al.*, 1990; Zhou und Atherly, 1990; Izawa *et al.*, 1991). Dabei springt das *Ac*-Element autonom und *trans*-aktiviert nicht-autonome *Ds*-Elemente (Baker *et al.*, 1986; Hehl und Baker, 1989).

Bei der *Ac*-Transposition in Mais und auch in heterologen Pflanzen bildet das Transposon während der Integration eine acht Basenpaare lange Sequenzduplikation, die nach der Exzision partiell erhalten bleibt („Footprint“). Die Transposition scheint während der gesamten Entwicklung der Pflanzen stattfinden zu können (Scofield *et al.*, 1992; Keller *et al.*, 1993). Im Unterschied zu Mais wurde aber in transgenen Pflanzen wie z.B. Tabak bisher keine negative Autoregulation beobachtet. Eine höhere Kopienzahl von *Ac*-Elementen im Genom führt zu einer höheren Transpositionsfrequenz (Jones *et al.*, 1989; Keller *et al.*, 1993). Da in Tabak die *Ac*-Transposase nur ineffizient translatiert wird, steht die Proteinkonzentration hier nicht in direkter Korrelation zur Promotorstärke oder der Kopienzahl von *Ac* im Genom (I. Kornacker und R. Kunze, unveröffentlicht).

In *Arabidopsis thaliana* ist das *Ac*-Element weniger aktiv als in Mais oder Tabak (Schmidt und Willmitzer, 1989; Dean *et al.*, 1992). Wie in Tabak führt auch hier eine erhöhte Kopienzahl der *Ac*-Elemente im Genom zu einer erhöhten Transpositionsfrequenz. In *Arabidopsis thaliana* ist dies vermutlich auf ineffiziente Transkription zurückzuführen. Nur ein geringer Teil der mRNA wird richtig prozessiert, damit bleibt die Transposase-Konzentration unterhalb der kritischen Grenze, die zu einer reduzierten Transposition führen würde (Grevelding *et al.*, 1992).

Vor kurzem wurde gezeigt, daß die *Ac*-Transposase auch in *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage ist, ein nicht-autonomes *Ds*-Element zu *trans*-aktivieren (Weil und Kunze, 2000). Damit kann ausgeschlossen werden, daß pflanzliche Wirtsfaktoren essentiell für die Transposition sind. Reparaturenzyme oder Proteine, die die Chromosomenarchitektur beeinflussen, könnten aber einen Einfluß auf die Regulation und den Ablauf der Transposition haben.

1.7 Modelle zum Reaktionsablauf der Transposition

Das *Ac/Ds*-Element transponiert nach einem „cut-and-paste“-Mechanismus. Das heißt, daß das Transposon an der Donorstelle ausgeschnitten und an der Rezipientenstelle wieder eingesetzt wird (Greenblatt und Brink, 1962). *Ac* transponiert häufig während oder nach der Replikation (Greenblatt, 1984). Die Insertion erfolgt dabei in replizierte oder nicht-replizierte Rezipientenstellen (Chen *et al.*, 1992). Wird dieser Locus erst nach der Insertion des Transposons repliziert, kommt es zu einer Erhöhung der Kopienzahl des *Ac*-Elements im Genom (Bild 4).

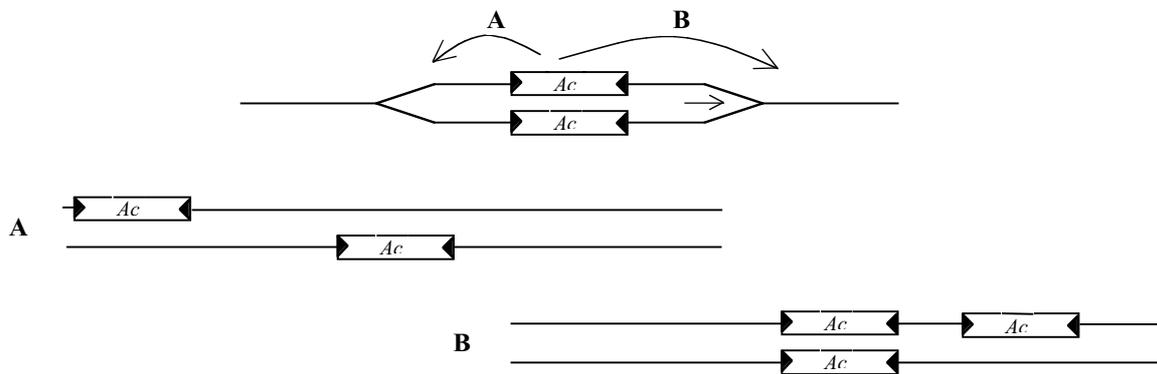


Bild 4: *Ac* transponiert häufig während oder kurz nach der Replikation. Nach der Replikation ist nur eines der beiden *Ac*-Elemente transpositions-kompetent. Die Insertion erfolgt sowohl in replizierte (A) wie auch in nicht-replizierte (B) Ziel-DNA.

Das *Ac*-Element integriert bevorzugt in Rezipientenstellen nahe der Donorstelle. In einer Studie zur Transposition von *Ac* aus dem *bz-m2::Ac*-Allel in Mais konnte in 60% der Reintegrationen eine Transpositions-distanz von maximal 5 cM gemessen werden (Dooner und Belachew, 1989). Diese kurzen Distanzen untermauern ein Modell zum Transpositions-mechanismus, in dem die Donorstelle und die Rezipientenstelle im sogenannten Transpososom oder synaptischen Komplex in unmittelbare Nähe zueinander gebracht werden (Bild 5). In diesem Modell bindet die Transposase kooperativ an die Enden des *Ac*-Elements und komplexiert diese über Protein-Protein-Interaktionen. Danach tritt über unspezifische DNA-Bindung vermutlich auch die Rezipientenstelle in den Komplex ein, so daß das ausgeschnittene Transposon ohne wegzudiffundieren direkt wieder reintegrieren kann.

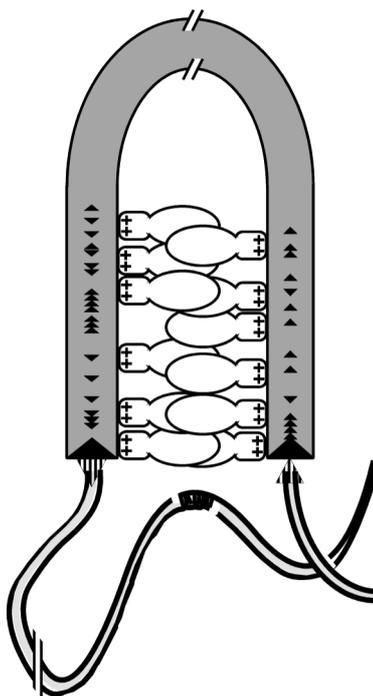


Bild 5: Schematische Darstellung des synaptischen Komplexes. Die *Ac*-TPase bindet kooperativ an beide Enden des *Ac*-Elements und bringt diese über Proteininteraktionen zusammen. Anschließend soll auch die Ziel-DNA in den Komplex eintreten. Die DNA-Bindestellen der TPase sind als kleine Dreiecke dargestellt, deren Orientierung auch die Orientierung der Bindemotive in den Transposonenden darstellt. Die „inverted repeats“ sind als schwarze Dreiecke an den äußersten Enden des Transposons dargestellt, die Sequenzduplikationen in der Rezipientenstelle schließen direkt daran an (gestreifte Dreiecke). Die TPase bindet mit der N-terminalen basischen Region (++) an die Enden des Transposons.

Wird ein *Ac/Ds*-Element in DNA integriert, entsteht eine acht Basenpaare große Sequenzduplikation. Diese bleibt nach der Exzision erhalten, wobei zusätzliche Basenpaarinsertionen oder -deletionen auftreten können („DNA-Footprints“). Zum molekularen Mechanismus der Transposition existieren zwei Modelle, die die Ausbildung dieser charakteristischen Sequenzveränderungen auf unterschiedliche Weise erklären (Bild 6).

In Modell A (Exonukleasemodell, Saedler und Nevers, 1985) wird das Transposon durch versetzte Schnitte an beiden Enden der Sequenzduplikation ausgeschnitten. Die freien überhängenden Enden werden dann einerseits exonukleolytisch abgespalten, was zur Deletion von Basenpaaren führt. Andererseits können die Enden durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt werden. Erreicht die Polymerase das Ende des freien Überhangs, kann sie den Matrizenstrang wechseln und die freien Enden des noch komplexierten, ausgeschnittenen Transposons benutzen, wodurch es zu Basenpaarinsertionen kommt. Letztendlich wird das Transposon aus dem Komplex entlassen, die freien Chromosomenenden werden repariert und religiert. Die hinterlassenen Sequenzveränderungen („Footprints“) können je nach Aktivität der Exonuklease und der DNA-Polymerase stark variieren.

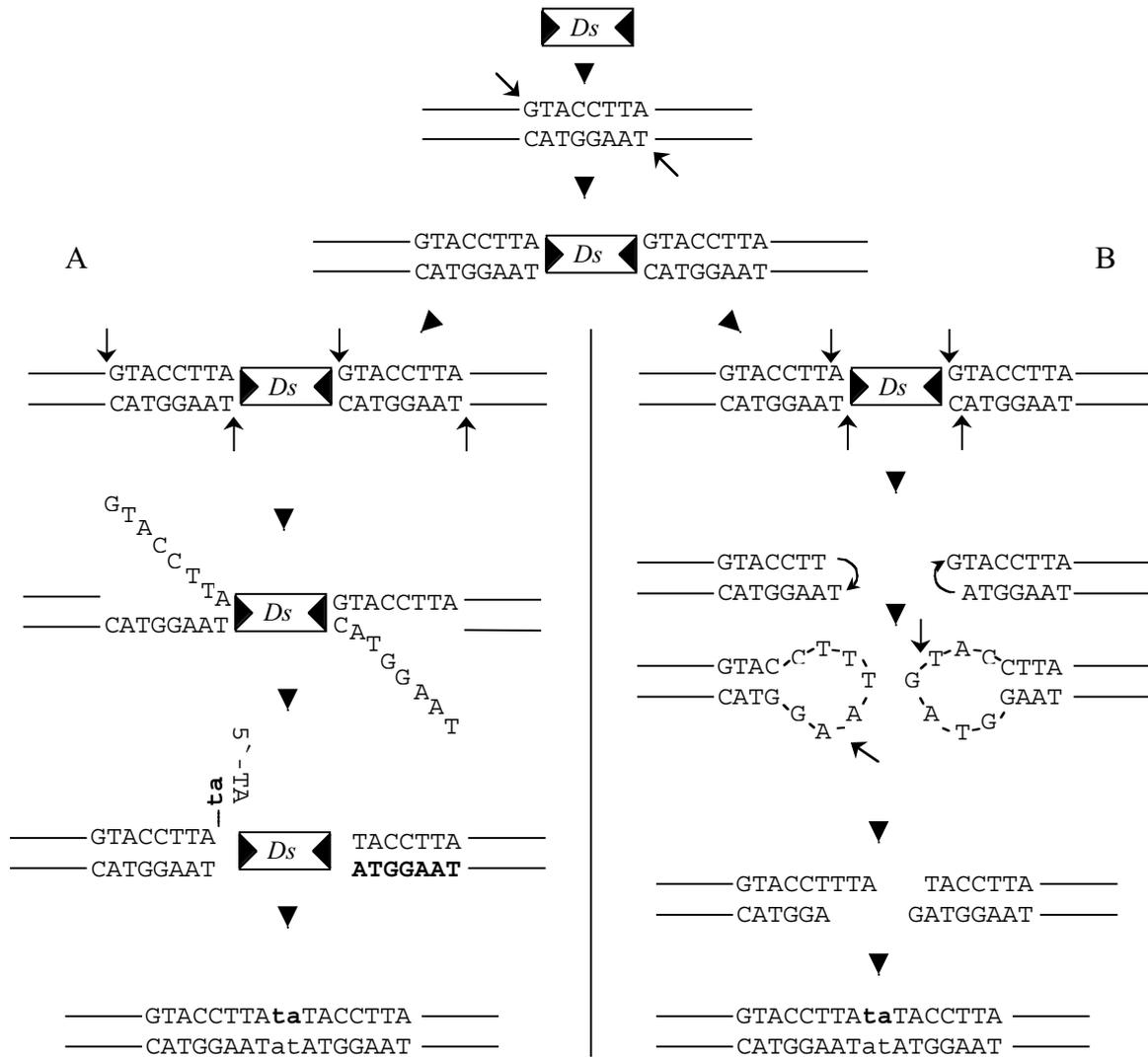


Bild 6: Modelle zur Entstehung von Sequenzveränderungen nach der Exzision eines *Ds*-Elements (nach Kunze *et al.*, 1997). A: Exonukleasemodell nach Saedler und Nevers, 1985; B: Endonukleasemodell nach Coen *et al.*, 1986. Weitere Erklärungen siehe Text.

Ein zweites Modell (Endonukleasemodell, Coen *et al.*, 1986) schlägt vor, daß das Transposon mit um ein Basenpaar versetzten Schnitten ausgeschnitten wird (Bild 6B). Anschließend werden die jeweils ein Basenpaar großen Sequenzüberhänge an beiden Enden unter Ausbildung einer „Haarnadelstruktur“ ligiert. Diese wird anschließend durch eine Endonuklease geschnitten und aufgelöst. Die verbleibenden Chromosomenenden werden ligiert und repariert. Abhängig davon, an welcher Position die Haarnadelstruktur geschnitten wurde, können unterschiedliche „Footprints“ entstehen.

Keines der beiden Modelle ist bis heute experimentell eindeutig bestätigt. In *Arabidopsis thaliana* entsteht wie auch in *Zea mays* bei der Exzision vorzugsweise ein bestimmter „Footprint“, der je nach Insertionsort variiert. Die veränderten Sequenzen an der Donorstelle

können in einigen Fällen durch Modell A, in anderen besser durch Modell B erklärt werden (Rinehart *et al.*, 1997). In Hefe entstehen nach der Exzision eines *Ds*-Elements Sequenzveränderungen, die eher durch Modell B zu erklären sind, das die Ausbildung einer Haarnadelstruktur postuliert (Weil und Kunze, 2000).

1.8 Die Reaktionsabläufe bei der Transposition pro- und eukaryotischer DNA-Elemente sind ähnlich

Für einige eukaryotische und prokaryotische Transposons, die nach dem „cut-and-paste“-Prinzip transponieren, wurde *in vitro* die Transposition rekonstruiert. Die Reaktionsabläufe ähneln sich in vielen Fällen: Zunächst wird ein synaptischer Komplex gebildet, in den auch die Ziel-DNA eintritt. Nach dem Ausschneiden des Transposons begeben die freien 3'-OH-Enden des DNA-Elements einen nukleophilen Angriff auf beide Stränge der Ziel-DNA, wodurch das Transposon stabil inseriert werden kann.

Für die vom P-Element codierte Transposase aus *Drosophila melanogaster*, die wahrscheinlich als Oligomer aktiv ist (Beall und Rio, 1998), wurde ein *in vitro*-Transpositionssystem etabliert (Kaufman und Rio, 1992). In einem Zwei-Plasmid-System wird das P-Element aus einem Donorplasmid ausgeschnitten und in ein Rezipientenplasmid unter Ausbildung einer acht Basenpaare großen Sequenzduplikation inseriert. Diese Reaktion ist ausschließlich von der Anwesenheit der P-Element-codierten Transposase abhängig. In Versuchen mit freien Transposonenden konnte gezeigt werden, daß wie bei *Ac* (Coupland *et al.*, 1989) ein 5'- und ein 3'-Ende notwendig sind, damit die Transposase an den DNA-Enden versetzte Schnitte einführt, was darauf hindeutet, daß die endonukleolytische Spaltung in einem synaptischen Komplex abläuft (Beall und Rio, 1997).

Die Transposase des Tc3-Elements aus *Caenorhabditis elegans* bindet ebenfalls *in vitro* spezifisch die Enden des Transposons und bringt diese über Proteininteraktionen in einem synaptischen Komplex zusammen. Dies konnte in der Kristallstruktur der DNA-Bindedomäne mit DNA gezeigt werden (van Pouderoyen *et al.*, 1997).

Nicht nur bei der Transposition eukaryotischer Transposons entsteht durch Proteininteraktionen ein Transpososom als Zwischenprodukt. Ein synaptischer Komplex konnte auch für das bakterielle Transposon Tn5 gezeigt werden (Mahnke Braam und Reznikoff, 1998; Bhasin *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2000). Der Transpositionsmechanismus konnte bis ins Detail aufgeklärt werden (Goryshin und Reznikoff, 1998; Bhasin *et al.*, 1999),

wobei sich herausstellte, daß Tn5 unter Ausbildung einer Haarnadelstruktur an den Transposonenden transponiert.

Für das *Ac*-Element aus Mais konnten bisher die einzelnen Schritte der Transposition *in vitro* nicht rekonstruiert werden. Es existieren aber indirekte Hinweise, daß sich auch die *Ac*-Transposase ähnlicher Mechanismen bedient (siehe 1.4 und 1.7).

1.9 Das DDE-Motiv bildet das katalytische Zentrum von bakteriellen Transposasen und retroviralen Integrasen

Das *Ac*-Element transponiert wie auch einige bakterielle Transposons nicht-replikativ. Für Tn5 oder Tn10 ist dies bereits *in vitro* gezeigt worden (Goryshin und Reznikoff, 1998, Chalmers und Kleckner, 1994). Auch die Integration von Retroviren in ihre Ziel-DNA, vermittelt durch die retroviral exprimierte Integrase (IN), verläuft nach einem ähnlichen Mechanismus (z. B. HIV, Übersicht in: van Gent *et al.*, 1993).

Die Aktivität sowohl der bakteriellen Transposasen als auch der retroviralen Integrasen ist dabei abhängig von der Anwesenheit von Mg^{2+} , das durch drei saure Aminosäuren im aktiven Zentrum koordiniert wird. Dieses sogenannte DDE-Motiv ist unter den genannten Proteinen konserviert. Der Abstand zwischen der zweiten Asparaginsäure (D) und der Glutaminsäure (E) beträgt oft 35 Aminosäuren (Kulkosky *et al.*, 1992). Dieser Abstand ist jedoch offenbar keine Grundvoraussetzung für die Koordination eines Mg^{2+} -Ions. Bei der Transposase von Tn10 beträgt der Abstand der beiden Reste sogar 131 Aminosäuren (Allingham *et al.*, 1999). Im aktiven Zentrum der IS903-codierten Transposase liegen zwischen den Resten D und E 66 Aminosäuren (Tavakoli *et al.*, 1997). Für die IS911-codierte Transposase wurde gezeigt, daß das DDE-Motiv innerhalb einer Protein-Interaktionsdomäne liegt (Haren *et al.*, 1998). IS911 ist wie die *Ac*-Transposase als Oligomer aktiv. Das gleiche gilt für die Integrase des HI-Virus, auch hier befindet sich das aktive Zentrum in einer Oligomerisierungsdomäne (van Gent *et al.*, 1993).

Das aktive Zentrum der *Ac*-codierten Transposase wurde bisher noch nicht identifiziert.

1.10 Spielt Transposition eine Rolle in der Evolution?

Die Donorstelle, aus der ein Transposon herausspringt, wird meist unpräzise repariert. Neben einer Sequenzduplikation, die bei der Transposon-Insertion erzeugt wird und die bei der Exzision zurückbleibt, entstehen weitere Basenpaarinsertionen, -deletionen oder auch -inversionen. Geschieht dies im offenen Leserahmen eines Gens, so kann dieser bei der Exzision entweder zerstört werden, oder es werden zusätzliche Codons eingebaut oder vorhandene deletiert. Letztendlich entsteht eine stabile Null-Mutante, ein Protein mit veränderter Aktivität, eine stille Mutation oder eine echte Revertante.

Eine unpräzise Exzision in der Nähe eines Promotors kann zu einer veränderten Genexpression führen. Dies wurde für die Exzision von Tam3 aus einem Gen für die Pigmentsynthese bei *Antirrhinum majus* gezeigt (Coen *et al.*, 1986). Die Genexpression kann auch beeinflusst werden, wenn durch Transposons induzierte größere Rearrangements im Genom entstehen. Dabei kann Wirts-DNA auch zwischen verschiedenen Chromosomen ausgetauscht werden. Transposons könnten somit bei der Entstehung von Mutationen im Laufe der Evolution eine große Rolle gespielt haben.

Auch die Immunglobulingene der Säuger scheinen ihre jetzige Struktur einer Transposon-Insertion zu verdanken. Die Proteine RAG1 und RAG2, die die Zusammensetzung der Gensegmente der Immunglobuline und T-Zell-Rezeptoren steuern, bilden *in vitro* eine Transposase, die die Transposition eines DNA-Fragments katalysiert, dessen Enden aus Sequenzsignalen der V(D)J-Gensegmente besteht (Agrawal *et al.*, 1998). Es wird spekuliert, daß im Laufe der Evolution ein Transposon mit den Genen *RAG1* und *RAG2* in ein Membranrezeptorgen der Lymphozyten gesprungen ist und dessen Exon in mehrere Teile gespalten hat. Nach der Transposition in die Nachbarregion und mehreren Genduplikationen sollen dann die Gensegmente der heutigen Immunglobulingene entstanden sein (Agrawal *et al.*, 1998; Plasterk, 1998).

1.11 Zielsetzungen der Arbeit

In bisherigen Arbeiten war es nicht möglich, die *Ac*-Transposase löslich und in aktivem Zustand zu reinigen. *In vitro* konnte bisher die spezifische DNA-Bindung mit renaturierter Transposase nachgewiesen werden. Weitere Funktionen wie Endonuklease-Aktivität konnten mit den bisher verwendeten Proteinpräparationen *in vitro* noch nicht gezeigt werden. In dieser

Arbeit sollte in zwei verschiedenen Ansätzen versucht werden, die Transposase in löslicher Form zu gewinnen. Zum einen sollte das Protein löslich in *E.coli* exprimiert und anschließend gereinigt werden. Zusätzlich sollte die Transposase in einem Kernproteinextrakt aus transgenen Tabakpflanzen isoliert werden. Im Anschluß daran sollte ein *in vitro*-Transpositionssystem aufgebaut werden. In einem solchen System sollte die spezifische Endonuklease-Aktivität der Transposase nachgewiesen werden und die einzelnen Reaktionsschritte der *Ac*-Transposition *in vitro* im Detail studiert werden. Diese Untersuchungen sollten zeigen, auf welchem Weg die Entstehung der „DNA-Footprints“ nach einer Transposonexzision entstehen. Außerdem sollte versucht werden, das aktive Zentrum der *Ac*-Transposase zu charakterisieren.

Indirekte Hinweise deuten daraufhin, daß die *Ac*-Transposase als Oligomer aktiv ist. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, daß eine hochkonservierte Region am C-Terminus der Transposase eine Dimerisierungsfunktion enthalten könnte (Essers, 1996), eine Bedeutung dieser Domäne für die Transposition *in vivo* wurde hingegen noch nicht nachgewiesen. Daher sollten in dieser Arbeit durch gezielte Aminosäureaustausche essentielle Reste für die *in vitro*-Dimerisierung ermittelt werden und der Effekt dieser Mutationen auf die Transposition *in vivo* untersucht werden.

Da die *Ac*-Transposase *in vivo* hochmolekulare Aggregate bildet, muß das Protein mindestens eine weitere Proteininteraktionsdomäne enthalten. Diese sollte in der vorliegenden Arbeit charakterisiert werden. Abschließend sollte untersucht werden, ob eine oder mehrere Interaktionsdomänen, beim Aufbau eines möglichen synaptischen Komplex eine Rolle spielen. Außerdem wurde die Frage gestellt, ob sich diese von solchen unterscheiden, die zur Bildung mutmaßlich inaktiver Oligomere im Rahmen der Autoregulation der *Ac*-Transposase führen.

Zunächst wurde die Löslichkeit von TPase_{His1-807} und TPase_{His103-807} in Abhängigkeit von der Wachstumstemperatur der Bakterien überprüft. Dazu wurde die IPTG-Induktion bei 16°C, 25°C bzw. 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer Frenchpress aufgebrochen und lösliche und unlösliche Fraktionen im Westernblot analysiert.

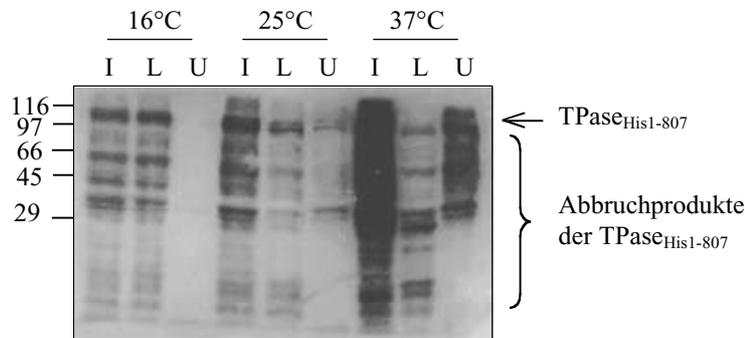


Bild 8: Temperaturabhängige Expression der TPase_{His1-807}. TPase_{His1-807} wurde in BL21DE3 exprimiert. Die Zellen wurden bei 16°C, 25°C bzw. 37°C bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 mit 0,6 mM IPTG für 4 h induziert. Anschließend wurde jeweils ein Aliquot von 800 µl entnommen, abzentrifugiert und in 80 µl 1x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert (I). Die restlichen Zellen wurden abzentrifugiert und in IB-1 resuspendiert. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Frenchpress aufgeschlossen. Durch Zentrifugation wurden unlösliche (U) von löslichen (L) Proteinen getrennt. Von beiden Fraktionen wurden 50 µl abgenommen und 1:1 mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 95°C gekocht, zentrifugiert (5 min, 15000 Upm, 4°C) und anschließend auf einem 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (1x Laemmli-Laufpuffer). Nach der Übertragung der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran wurde die TPase mit einem polyklonalen anti-TPase-Antikörper („anti 10.ATG“) spezifisch nachgewiesen. I: Gesamtprotein aus induzierten Zellen, L: lösliche Fraktion nach Frenchpress, U: unlösliche Fraktion nach Frenchpress. Der Molekulargewichtstandard ist in kDa angegeben.

Die Löslichkeit der TPase_{His1-807} in *E. coli* steigt mit abnehmender Wachstumstemperatur (Bild 8). Bei 37°C liegt der größte Teil des Proteins in unlöslicher Form vor (Spur U, 37°C), während die TPase_{His1-807} bei 16°C ausschließlich in der Fraktion der löslichen Proteine zu finden ist. Die Menge der unvollständig translatierten TPase ist bei den genannten Temperaturen vergleichbar, die Temperaturänderungen bewirken keine höhere Effizienz der Translation. Dasselbe Bild ergab sich für TPase_{His103-807} (Daten nicht gezeigt). Das löslich exprimierte Protein zeigt in der SDS-PAGE, wie es auch für renaturierte TPase bereits beschrieben wurde, ein scheinbares Molekulargewicht von ungefähr 112 kDa. Das theoretische Molekulargewicht beträgt nur 92 kDa. Diese Diskrepanz ist auf den sehr basischen N-Terminus der TPase zurückzuführen. Werden die ersten 188 Aminosäuren deletiert, so zeigt die resultierende TPase_{His189-807} in der SDS-PAGE das erwartete Laufverhalten (Feldmar und Kunze, 1991; Kunze *et al.*, 1991).

In diesem Versuch ist es zum ersten Mal gelungen, die *Ac*-codierte TPase in *E. coli* löslich zu exprimieren.

Um die TPase im Proteinextrakt zu konzentrieren und weiter zu reinigen, wurde eine Ammoniumsulfatfällung durchgeführt. Mit 20%iger $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Sättigung wird ein großer Teil der *E. coli*-Proteine ausgefällt, während die TPase überwiegend in Lösung bleibt. Bei einer 40%igen Sättigung präzipitiert der größte Teil der TPase. Das Protein wurde nach der Fällung wieder in Lösung gebracht und dialysiert (siehe Material und Methoden, 5.6.6).

2.1.2 Löslich exprimierte *Ac*-TPase aus *E. coli* bindet spezifisch DNA

Um die Funktionalität der löslich exprimierten *Ac*-TPase zu überprüfen, wurde getestet, ob das Protein wie die renaturierte TPase spezifisch DNA binden kann. Dazu wurden folgende DNA-Fragmente verwendet (Kunze und Starlinger, 1989):

14-9, positive DNA-Probe: (AAACGG)₃AAAC(AAACGG)₅AAAC
15-3, negative DNA-Probe: (AAAGGG)₇AAAG

Das Fragment „14-9“ enthält 8 Bindestellen für die TPase, die normalerweise in den subterminalen Regionen des *Ac*-Transposons zu finden sind. In Fragment „15-3“, der Negativkontrolle, sind diese mutiert, so daß die TPase nicht mehr spezifisch binden kann. Nach der Inkubation der radioaktiv markierten DNA mit Proteinextrakt wurden die Reaktionen in einem Agarosegel aufgetrennt (Material und Methoden, 5.6.13).

TPase_{His1-807} und TPase_{His103-807} zeigen einen typischen Shift der DNA-Probe, während die Negativkontrolle nicht gebunden wird (Bild 9). Die uneinheitliche Wanderung der TPase/DNA-Komplexe, die auch für die de- und renaturierte Form der TPase beschrieben worden ist (Feldmar und Kunze, 1991), ist darauf zurückzuführen, daß das Protein in Lösung heterogene Oligomere ausbildet. Die TPase behält somit auch in löslicher Form die Neigung zur Selbstaggregation bei.

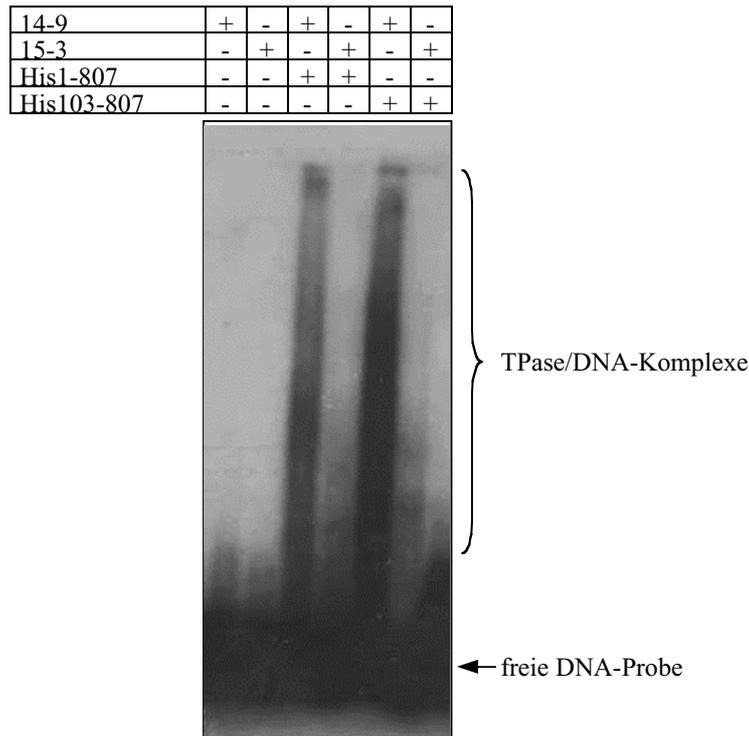


Bild 9: TPase_{His1-807} und TPase_{His103-807} löslich exprimiert in *E. coli* binden spezifisch DNA. 3 µl Ammoniumsulfat-gefällter und dialysierter Proteinextrakt wurden unter Zugabe von 3 µg poly(dI-dC) mit der jeweiligen radioaktiv-markierten DNA (20000 cpm) 30 min in 1x EMSA-Bindpuffer bei RT inkubiert. Die entstandenen DNA-Protein-Komplexe wurden anschließend in einem 1,2%igen Agarosegel (low ionic strength Puffer) elektrophoretisch bei 4°C aufgetrennt. Das Gel wurde dann auf DE81-Cellulose getrocknet und bei -80°C exponiert. 14-9: positive DNA-Probe; 15-3: negative DNA-Probe.

2.1.3 Löslich exprimierte TPase aus *E. coli* bildet hochmolekulare Aggregate

Mittels nativer Gelfiltration sollte die Größe der TPase_{His1-807}-Multimere bestimmt werden, die das Protein in Lösung bildet. Dazu wurde eine Superose-6 HR10/30-Säule verwendet, die es erlaubt, globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 5 und 5000 kDa zu fraktionieren. Für die Gelfiltration wurde ammoniumsulfatgefällter und dialysierter Proteinextrakt aus *E. coli* verwendet. Die gesammelten Fraktionen wurden im Westernblot analysiert und mit einem Gelfiltrationsstandard der Firma BioRad verglichen (siehe Material und Methoden, 5.6.8).

Die TPase_{His1-807} eluiert bereits im Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule (Fraktion 1-3, Bild 10) und ist in allen Fraktionen bis Nummer 19 nachweisbar. Fraktion 18 entspricht einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa, hier liegt die TPase_{His1-807} als Monomer vor. Der Anteil der monomeren Form im Gesamtextrakt ist klein. In Fraktionen, die einem Molekulargewicht größer als 300 kDa (Fraktion 1 bis 15) entsprechen, ist die TPase_{His1-807} jedoch leicht nachweisbar.

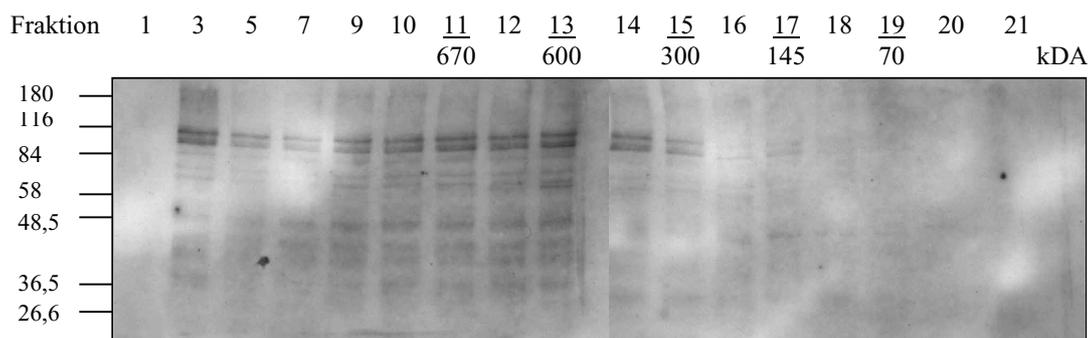


Bild 10: Die TPase_{His1-807} liegt auch in löslicher Form zum Teil aggregiert vor. 300 µg ammonium-sulfatgefällte und dialysierte TPase_{His1-807} wurde über eine Superose 6 10/30-Säule in Gelfiltration-Laufpuffer nativ bei 4°C fraktioniert. Von den Fraktionen 1 bis 21 wurde je ein Aliquot mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min, 15000 Upm, 20°C) wurden 30 µl Probe auf ein 7,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (1x Laemmli-Laufpuffer). Der spezifische Nachweis der TPase_{His1-807} erfolgte mit dem polyklonalen anti-TPase Antikörper „anti-10.ATG“. In der Abbildung ist unterhalb der Fraktionsnummern das Molekulargewicht in kDa angegeben, dem die einzelnen Fraktionen entsprechen (im Vergleich zum verwendeten Gelfiltrationsstandard). Der Pfeil kennzeichnet TPase_{His1-807}. Der Molekulargewichtstandard für die SDS-PAGE ist in kDa angegeben.

Wie schon nach dem Ergebnis aus dem Gelretardationsversuch vermutet, liegt auch die löslich exprimierte TPase in Oligomeren und hochmolekularen Aggregaten vor. In fast allen Fraktionen, auch in den hochmolekularen, tauchen mutmaßliche Abbruchprodukte der TPase auf. Dies bedeutet, daß diese verkürzten Proteine in der Lage sein müssen, miteinander oder mit der vollständigen TPase zu interagieren.

2.1.4 Fraktionierte TPase-Aggregate binden spezifisch DNA

Bisher ist nicht klar, ob die *Ac*-TPase bereits als Oligomer DNA bindet oder ob ausschließlich TPase-Monomere an die DNA binden und dann oligomerisieren. TPase_{His1-807} aus den verschiedenen Fraktionen der Gelfiltration wurde in einem Gelretardationsversuch eingesetzt, um diese Frage zu klären. Das Volumen der Fraktionen 15 bis 19 wurde zuvor durch Ultrafiltration eingengt, um mehr TPase_{His1-807} in der Gelretardation einsetzen zu können (Material und Methoden, 5.6.7). Die DNA-Probe entsprach der bereits in Abschnitt 2.1.2 verwendeten Probe.

Der unfraktionierte Gesamtproteinextrakt (K) wurde als Kontrolle eingesetzt und ergibt zusammen mit DNA „14-9“ einen heterogenen TPase/DNA-Komplex (Bild 11). Für die Fraktionen 3 bis 7 (MW größer als 1000 kDa) zeigt sich, daß die TPase_{His1-807}-Aggregate spezifisch DNA binden. Es bilden sich mit abnehmendem Molekulargewicht der TPase-Aggregate im Agarosegel schneller laufende DNA-Protein-Komplexe (von 3 nach 7). Die

DNA-Probe „15-3“ wird wie erwartet nicht gebunden. Die zusätzlichen Banden sind auf die DNA-Präparation zurückzuführen. Sie entstehen auch unter Verwendung der Fraktionen 1 und 2, in denen TPase nicht nachgewiesen werden konnte. Die gleiche DNA aus einer anderen Präparation ergibt in der Reaktion mit unfraktionierter TPase_{His1-807} in Bild 9 keinerlei unspezifische Banden.

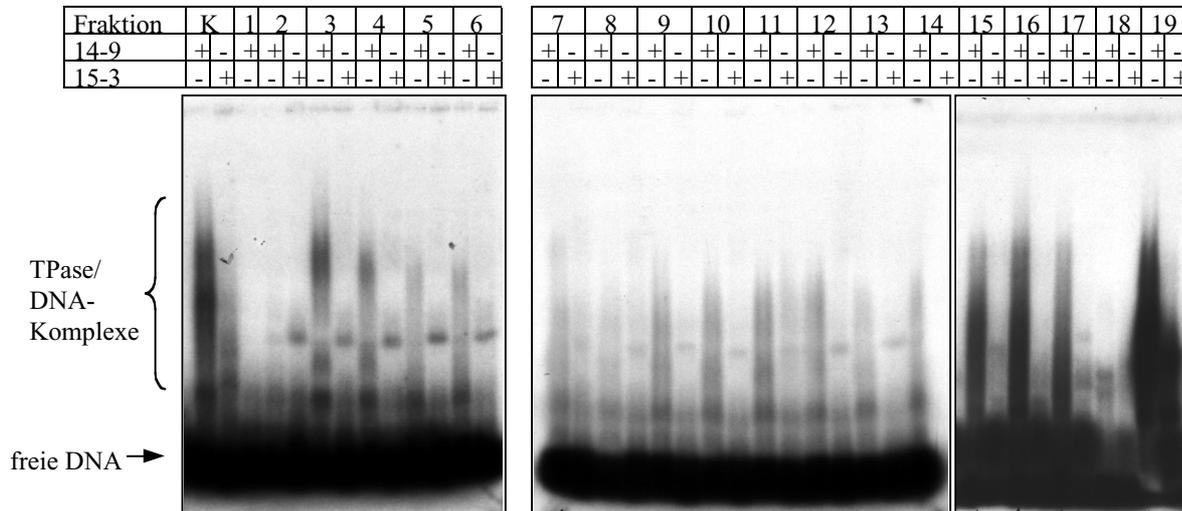


Bild 11: Fraktionierte TPase_{His1-807} aus *E.coli* bindet spezifisch DNA. 1 µl Gesamtproteinextrakt (K), 5 µl der Fraktionen 1 bis 14 und 2 µl der Fraktionen 15 bis 19 wurden unter Zugabe von 3 µg poly(dI-dC) mit der jeweiligen radioaktiv-markierten DNA (20000 cpm) 30 min in 1x EMSA-Bindepuffer bei RT inkubiert. Die entstandenen DNA-Protein-Komplexe wurden anschließend in einem 1,2%igen Agarosegel (low ionic strength Puffer) elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde auf DE81-Cellulose getrocknet und bei -80°C exponiert. 14-9: positive DNA-Probe, 15-3: negative DNA-Probe; K: unfraktionierter Gesamtproteinextrakt.

Die bereits gezeigten großen Protein-DNA-Komplexe (Bild 9) sind somit nicht ausschließlich eine Konsequenz der spezifischen DNA-Bindung durch mehrere monomerische TPase-Moleküle. Vielmehr kann die TPase auch als schon bestehendes Oligomer DNA spezifisch binden. Für die übrigen getesteten Proteinfractionen konnte ebenfalls eine spezifische DNA-Bindekapazität nachgewiesen werden, wobei mit TPase_{His1-807} aus Fraktion 18 nur ein schwacher DNA-Proteinkomplex nachzuweisen war. Dies ist wahrscheinlich auf Proteinverlust bei der Ultrafiltration zurückzuführen. Ein Größenunterschied der heterogenen Komplexe war nicht mehr auszumachen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß mono- bzw. oligomerische TPase aus Fraktionen geringeren Molekulargewichts weiterhin die Tendenz zur Aggregatbildung besitzt, so daß das Protein im Laufe der Präparation weiter oligomerisieren kann und sich wieder TPase-typische Shifts ergeben. Die Bindestellen auf der DNA könnten möglicherweise durch wenige Oligomere oder viele Monomere abgesättigt sein.

2.1.5 Die Reinigung der TPase mittels Affinitätschromatographie ist ineffizient

Um die in *E. coli* löslich exprimierte *Ac*-TPase in *in vitro*-Experimenten einsetzen zu können, sollte das Protein in möglichst reiner Form vorliegen. Dazu sollte die TPase_{His1-807} mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt werden. Die Elution des Proteins erfolgte mit Imidazol, das im Überschuß den Imidazolring des Histidins von der Ni-NTA-Matrix verdrängt. Die Reinigung der TPase_{His1-807} war mit sehr großen Verlusten verbunden, da nur ein geringer Anteil TPase aus dem Gesamtextrakt an der Ni-NTA-Matrix immobilisiert wurde. Die Anwendung anderer Puffersysteme oder eine Elution mit sinkendem pH-Wert erbrachte keine Verbesserung. Wahrscheinlich behindert die Aggregatbildung die Bindung des Proteins an die Matrix. Eine andere Möglichkeit ist, daß das N-terminale Histidinhexamer so in das Protein gefaltet wird, daß es nicht mehr exponiert an der Oberfläche liegt und die Ni-NTA-Matrix nicht mehr effizient binden kann.

Das mit Imidazol in geringer Konzentration eluierte Protein wurde dialysiert (siehe Material und Methoden, 5.6.6) und in Gelretardationsexperimenten eingesetzt. Die spezifische DNA-Bindung an die subterminalen Bindestellen der TPase im *Ac*-Element konnte nicht mehr nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß die TPase-Konzentration im Eluat zu gering ist, um *in vitro* einen Nachweis führen zu können. Da sich die *Ac*-TPase aus *E. coli* nicht effizient mittels Affinitätschromatographie reinigen läßt, wurden diese Versuche nicht weiterverfolgt.

2.2 *Ac*-TPase aus transgenem Tabak

Bisher wurde ausschließlich mit rekombinant in *E. coli* exprimierter TPase gearbeitet, die keine für Eukaryoten typischen Modifikationen wie Phosphorylierungen besitzt. Falls solche Modifikationen für die Aktivität der TPase erforderlich sein sollten, oder zusätzliche Proteinfaktoren der Pflanze an der Transpositionsreaktion essentiell beteiligt sein sollten, wären die Versuche mit in *E. coli* exprimierter TPase von vornherein zum Scheitern verurteilt. Aus diesem Grund wurde versucht, die *Ac*-TPase aus transgenen Tabakpflanzen zu reinigen, in denen sie nachweislich aktiv ist (Kunze *et al.*, 1995).

Zur Isolierung der vollständigen TPase und von TPase-Deletionsderivaten aus Tabakpflanzen wurden folgende transgene Linien verwendet: 6281-B1 für TPase₁₋₈₀₇, 6291 für TPase₁₀₃₋₈₀₇, 6301-E4 für TPase₁₈₉₋₈₀₇ (Kunze *et al.*, 1995). Das jeweilige Protein wird in allen Linien unter

der Kontrolle des 35S-Promotors (Odell *et al.*, 1985) stark überexprimiert. In den Linien 6281-B1 und 6291 akkumuliert die TPase in hohem Maße im Kern. In diesen Linien ist die TPase aktiv. Die TPase₁₈₉₋₈₀₇ ist inaktiv (Kunze *et al.*, 1993) und wird als Negativkontrolle verwendet. Als Wildtypkontrolle wird die Ausgangslinie PH (Petite Havana, Scofield *et al.*, 1992) verwendet.

2.2.1 Isolierung von *Ac*-TPase als Kernproteinextrakt aus transgenem Tabak

Die *Ac*-TPase sollte in einem Kernproteinextrakt aus transgenem Tabak isoliert werden. Dies geschah mit Modifikationen nach Maier *et al.* (Maier *et al.*, 1987). Zur Isolierung der Kernproteine wurde frisches Blattmaterial homogenisiert. Dieses Homogenat wurde filtriert und die Zellkerne mit den unlöslichen Bestandteilen abzentrifugiert. Das Pellet wurde gewaschen, resuspendiert und die Zellkerne mittels Ultraschall aufgebrochen. Durch Zentrifugation wurden lösliche von unlöslichen Proteinen getrennt (Details siehe Material und Methoden, 5.6.4). Bild 12 zeigt exemplarisch die Westernblot-Analyse der einzelnen Reinigungsschritte für die Präparation von TPase₁₀₃₋₈₀₇.

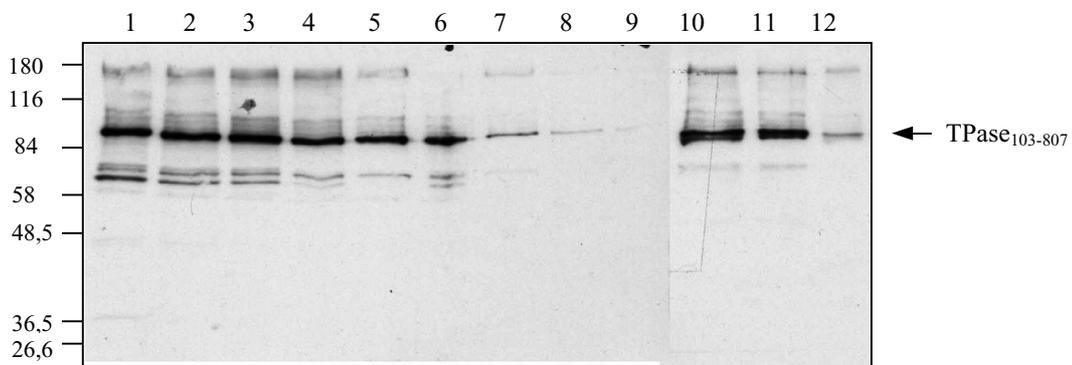


Bild 12: Kernproteinpräparation von transgenem Tabak zur Isolierung von TPase₁₀₃₋₈₀₇. Im Laufe der Präparation wurde nach jedem Schritt ein Aliquot abgenommen und 1:1 mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Nach 10minütigem Erhitzen bei 95°C und kurzer Zentrifugation (5 min, 15000 Upm, 20°C) wurden je 20 µl Probe auf ein 7,5%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese (1x Laemmli-Laufpuffer) wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert. Der Nachweis der TPase erfolgte mit polyklonalem anti-TPase Antikörper „anti-10.ATG“. Der Molekulargewichtstandard ist in kDa angegeben. **1:** Homogenat, **2:** Filtrat 1, **3:** Filtrat 2, **4:** lösliche Proteine im Überstand nach Zentrifugation, **5:** lösliche Proteine im Überstand nach dem ersten Waschschrift, **6:** unlösliche Proteine im Pellet nach dem ersten Waschschrift, **7:** Überstand nach dem zweiten Waschschrift, **8:** Überstand nach dem dritten Waschschrift, **9:** Überstand nach dem vierten Waschschrift, **10:** Kernproteine, Gesamtextrakt, **11:** lösliche Kernproteine, **12:** unlösliche Kernproteine.

Es zeigte sich, daß die *Ac*-TPase nicht nur in den Zellkernen (Bild 12, Spuren 10 bis 12) sondern auch in der cytoplasmatischen Fraktion der Präparation vorliegt (Spur 4). Dies ist nicht unerwartet, denn Immunfluoreszenz-Untersuchungen der entsprechenden Pflanzen ergaben, daß die TPase auch aggregiert im Cytoplasma vorliegt (I. Kornacker und R. Kunze, unveröffentlicht). Bei den Waschschrritten ging TPase verloren (Spuren 5 bis 9). Dies war aber zu vernachlässigen, da mit den löslichen Kernproteinen eine große Menge TPase gereinigt werden konnte (Spur 11). Die lösliche TPase wurde im weiteren durch Ultrafiltration konzentriert. Dieser Proteinextrakt wurde für *in vitro*-Studien der *Ac*-Transposition eingesetzt.

Eine Zusammenstellung der Kernproteinextrakte zeigt Bild 13. Die verschiedenen TPase-Derivate aus Tabak zeigen im Westernblot Aggregatbildung, wie sie auch für in *E. coli* exprimierte TPase typisch ist. Ebenso zeigen TPase₁₋₈₀₇ und TPase₁₀₃₋₈₀₇ isoliert aus Tabak das bereits beschriebene ungewöhnliche Laufverhalten in der SDS-PAGE. Es ergibt sich wieder ein scheinbares Molekulargewicht von ungefähr 112 kDa für TPase₁₋₈₀₇, obwohl das theoretische bei 92 kDa liegt. TPase₁₀₃₋₈₀₇, deren berechnetes Molekulargewicht 81 kDa beträgt, läuft in der SDS-PAGE bei ungefähr 95 kDa. TPase₁₈₉₋₈₀₇ fehlt die N-terminale basische Region und zeigt in der SDS-PAGE das erwartete Laufverhalten von 71 kDa.

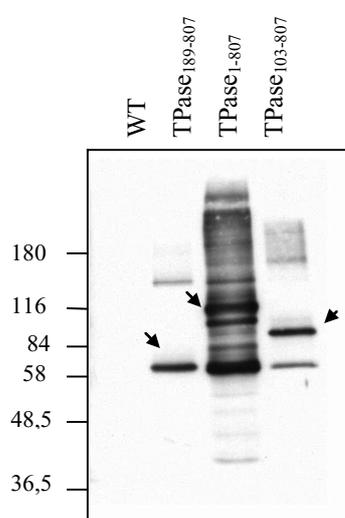


Bild 13: Zusammenstellung der Transposasepräparationen aus Tabak. Je 5 µl Kernproteinextrakt wurden mit 5 µl 2x Laemmli-Probenpuffer gemischt und 10 min bei 95°C erhitzt. Nach einer kurzen Zentrifugation (5 min, 15000 Upm, 20°C) wurden die Proben auf ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese (1x Laemmli-Laufpuffer) wurden die Proteine auf Nitrocellulose übertragen und die TPase im Western blot mit einem polyklonalen anti-TPase-Antikörper („anti-10.ATG“) nachgewiesen.

Es ist verwunderlich, daß die Isolierung von TPase₁₈₉₋₈₀₇ zusammen mit Kernproteinen gut funktioniert. Dem Protein fehlen N-terminal Kernlokalisierungssignale und es ist somit hauptsächlich im Cytoplasma vorzufinden. Möglicherweise gelangt dennoch ein kleiner Anteil

Protein in den Kern. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß cytoplasmatische TPase-Aggregate zusammen mit den Kernen der Tabakzellen abzentrifugiert wurden und so auch TPase₁₈₉₋₈₀₇ gereinigt werden konnte.

2.2.2 TPase aus transgenem Tabak bindet spezifisch DNA

Um die spezifische DNA-Bindung der aus transgenem Tabak isolierten TPasen zu zeigen, wurden wiederum Gelretardationsversuche durchgeführt. Als DNA Proben dienten ähnliche Fragmente wie in den vorangegangenen Experimenten. Sie unterscheiden sich von jenen nur in der Anzahl der DNA-Bindestellen (Kunze und Starlinger, 1989).

14-12, positive DNA-Probe: (AAACGG)₃AAAC(AAACGG)₁₂AAAC

15-6, negative DNA-Probe: (AAAGGG)₁₃AAAG

Es stellte sich heraus, daß sowohl in der WT-Kontrolle (nicht-transformierte Tabaklinie PH, Bild 14, Spur C) als auch in Kernproteinpräparationen von Linien, die TPase₁₈₉₋₈₀₇ bzw. TPase₁₀₃₋₈₀₇ exprimieren (Spur I bzw. Spur Q), ein unbekanntes Protein enthalten ist, das spezifisch die TPase-Bindestellen in DNA-Fragment „14-12“ erkennt, bindet und womöglich einen TPase-DNA-Komplex überlagert (Komplex 2). Die mutierten Bindestellen („15-6“) werden weder von der TPase noch von dem unbekanntem Protein gebunden.

Eine spezifische DNA-Bindung durch die TPase konnte durch einen „Supershift“ (Komplex 3) nachgewiesen werden. Dabei wurde nach der Inkubation von DNA mit Kernproteinextrakt zusätzlich polyklonaler anti-TPase-Antikörper in die Reaktion gegeben. Bild 14B zeigt dies für TPase₁₋₈₀₇. Nach Zugabe des Antikörpers entsteht ein Komplex bestehend aus DNA, TPase und anti-TPase-Antikörper („Supershift“), der anzeigt, daß auch die TPase die DNA spezifisch bindet (Spuren S und U). Der TPase-DNA Komplex wurde vor Zugabe des Antikörpers durch den DNA-Komplex mit unbekanntem Protein im Agarosegel überlagert (Spur Q). Der gleiche Antikörper führt in einer Reaktion mit dem WT-Extrakt oder der Präparation für TPase₁₈₉₋₈₀₇ nicht zu einem „Supershift“ (Bild 14A, Spuren E/G und K/M), der DNA-Protein-Komplex 2 enthält keine *Ac*-codierte TPase.

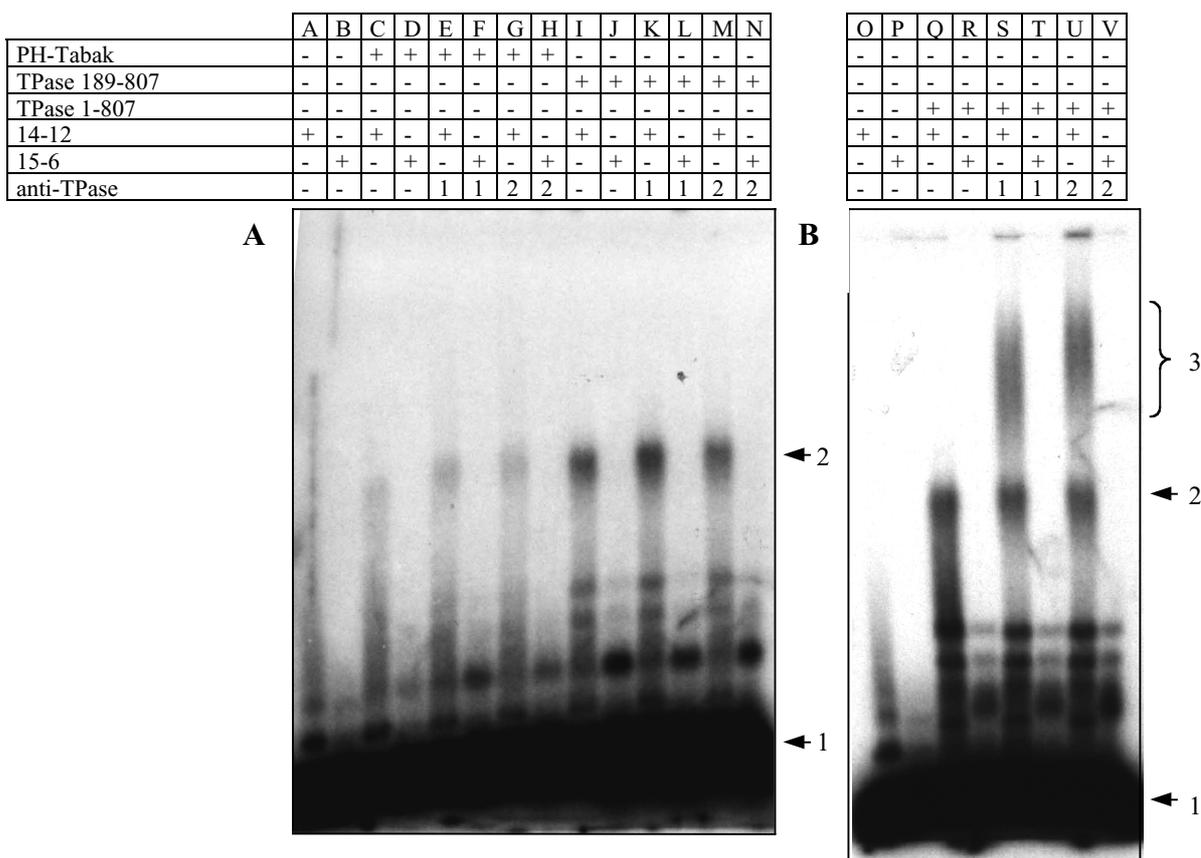


Bild 14: *Ac*-TPase isoliert aus transgenen Tabaklinien bindet neben einem unbekanntem Protein spezifisch die subterminalen DNA-Bindestellen. **A:** 2 μ l Kernproteine aus WT Tabak (Petite Havana, PH) bzw. 4 μ l Kernproteinextrakt mit TPase₁₈₉₋₈₀₇ aus Tabak wurden mit der jeweiligen radioaktiv markierten DNA (je 20000 cpm) unter Zugabe von 3 μ g Kompetitor-DNA (poly(dI-dC)) in 1x EMSA-Bindpuffer 15 min bei RT inkubiert. Gegebenenfalls wurden dann 1 μ l bzw. 2 μ l polyklonaler anti-TPase-Antikörper („C-terminal“) zugegeben und für weitere 15 min bei RT inkubiert. **B:** 1,5 μ l Kernproteinextrakt mit TPase₁₋₈₀₇ aus Tabak wurden wie die Proteine in A mit DNA und Antikörper inkubiert. Alle Reaktionen wurden auf einem 1,2%igen Agarosegel für 3 h bei 4°C elektrophoretisiert („low ionic strength“ Puffer), die Gele wurden auf DE81 Cellulose getrocknet und bei -80°C exponiert. **1:** freie DNA, **2:** DNA/Proteinkomplex mit unbekanntem Protein, **3:** „Supershift“ bestehend aus DNA, TPase₁₋₈₀₇ und anti-TPase-Antikörper.

Die eingesetzten DNA-Proben ergeben in der Kontrollreaktion ohne Proteinextrakt (Spuren A, B, O und P) ein Bandenmuster, das eindeutig von spezifisch gebundener DNA unterschieden werden kann und somit auf die jeweilige DNA-Präparation zurückzuführen ist. Dieses Bandenmuster taucht in Bild 15 nicht auf, obwohl die gleichen DNA-Proben mit WT-Kernproteinextrakt aus Tabak verwendet wurden. Der Antikörper allein vermag die eingesetzte DNA nicht spezifisch zu binden. Die Zugabe von einem Überschuss kalter DNA „14-12“ läßt sowohl den „Supershift“ als auch den zweiten prominenten Shift verschwinden. Ein Überschuss an kalter DNA „15-6“ bewirkt dies nicht (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Tabakpflanzen ein noch unbekanntes Protein exprimieren, das sehr spezifisch an die subterminalen TPase-Bindestellen im *Ac*-Element bindet und somit in Frage kommt, als Wirtsfaktor an der Transposition beteiligt zu sein oder diese zu regulieren.

2.2.3 Kernproteine aus *Petunia hybrida* binden subterminale TPase-Bindestellen

Da im folgenden *Petunia hybrida*-Protoplasten für einen *in vivo*-Transpositionsassay herangezogen werden, wird untersucht, ob auch in Kernproteinen dieser Pflanze ein Protein vorliegt, das spezifisch an die subterminalen DNA-Bindestellen für die *Ac*-TPase bindet.

Dazu wurden nach dem Protokoll für die Tabak-Kernproteinpräparation aus frischem Blattmaterial untransformierter Petunien Kernproteine isoliert und in Lösung gebracht. Anschließend wurde mit diesem Extrakt ein Gelretardationsexperiment durchgeführt (Bild 15). Dabei kamen die gleichen DNA-Proben zum Einsatz wie in Bild 14. Als Kontrolle wurden Kernproteine aus untransformiertem Tabak eingesetzt.

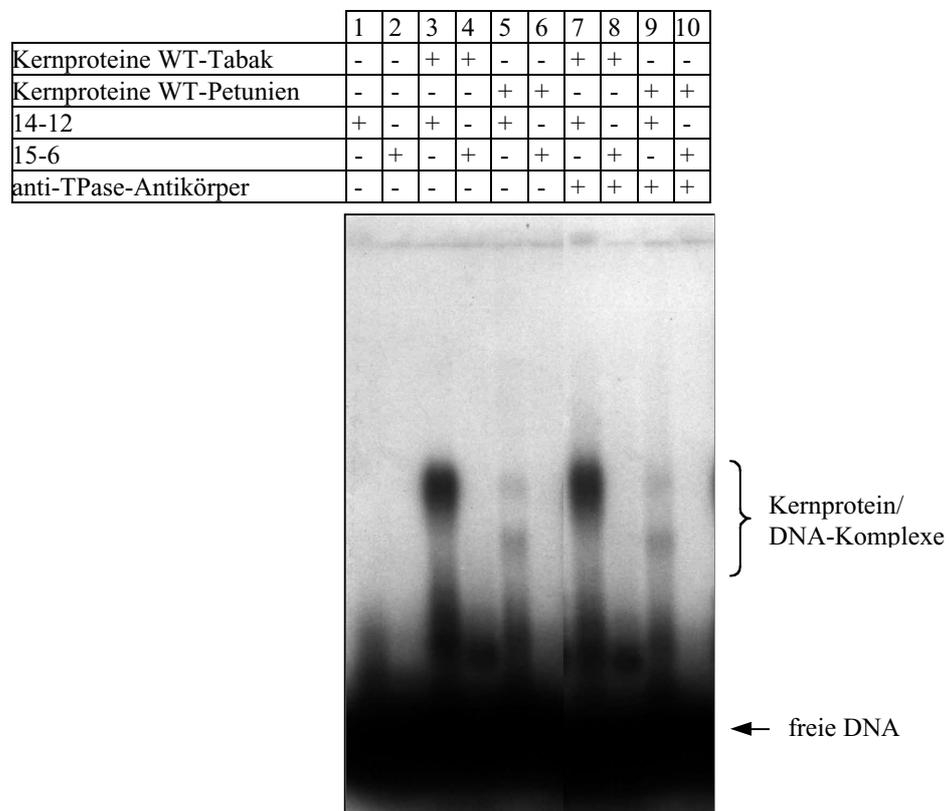


Bild 15: Kernproteine aus *Petunia hybrida* binden spezifisch an die subterminalen Bindestellen der *Ac*-TPase im *Ac*-Element. 2 μ l Kernproteine aus Tabak (Petite Havanna, untransformiert) bzw. 5 μ l Kernproteine aus *Petunia hybrida* (RL01 x Blue Titanic) wurden zusammen mit 3 μ g Kompetitor-DNA, poly(dI-dC), und den jeweiligen radioaktiv markierten DNA-Fragmenten (20000 cpm) 30 min in 1x EMSA-Bindepuffer bei RT inkubiert. Zu den anti-TPase-Kontrollen wurde nach 15 Minuten Inkubation bei RT jeweils 1 μ l anti-TPase Antikörper („C-terminal“) zugegeben und für weitere 15 min inkubiert. Dann wurden alle Proben auf ein 0,9%iges Agarosegel geladen (low ionic strength Puffer) und für 3 h bei 90 Volt bei 4°C elektrophoretisiert. Das Gel wurde auf DE81 Cellulose getrocknet und bei -80°C exponiert.

Auch mit Kernproteinextrakt aus *Petunia hybrida* ist eine spezifische DNA-Bindung an die TPase-Bindestellen im *Ac*-Element nachweisbar (Bild 15, Spur 5). Im Gegensatz zur Reaktion

mit Kernproteinen aus Tabak (Spur 3) konnten zwei schwache DNA-Komplexe aufgetrennt werden. Die negative DNA-Kontrolle („15-6“) wird nicht gebunden (Spur 6). Ein „Supershift“ mit anti-TPase-Antikörper entsteht nicht (Spur 9), wie auch in der Reaktion mit Kernproteinen aus Tabak (Spur 7). Demzufolge existieren auch in *Petunia hybrida* ein oder mehrere Protein(e), die *in vitro* an die subterminalen Bindestellen des *Ac*-Elements binden und somit als Wirtsfaktoren für die Transposition in Frage kommen.

2.3 Versuche zur Etablierung eines *in vitro*-Transpositionsassays und des Nachweises endonukleolytischer Aktivität der *Ac*-TPase

In früheren Versuchen war es nicht gelungen, die *Ac*-Transposition *in vitro* mit de- und renaturierter TPase zu etablieren. Mit den nun vorliegenden Proteinpräparationen aus *E. coli* und transgenem Tabak, die die TPase in löslicher Form enthalten, wurde ein neuer Versuch unternommen, enzymatische Aktivitäten der TPase in *in vitro*-Experimenten aufzuklären. Dazu wurden verschiedene Ansätze gewählt.

2.3.1 *In vitro*-Transpositionssystem zur Exzision und Integration

Zum Nachweis einer gekoppelten Exzision und Integration des *Ds*-Elements während der Transposition wurde ein Zwei-Vektorensystem verwendet (Bild 16). Das Donorplasmid trägt ein nicht-autonomes *Ds*-Element, in das das Gen für Kanamycinresistenz eingesetzt worden ist. Zusätzlich besitzt das Plasmid einen Prophagen-P1-Replikationsursprung, so daß es nur in einem *E. coli*-Stamm propagiert werden kann, der das P1 *RepA*-Protein exprimiert.

Das Rezipientenplasmid liegt als pBS-Tetramer vor und trägt neben einer Ampicillinresistenz den *colE1*-Replikationsursprung (Bild 16). Werden beide Plasmide aus einer *in vitro*-Reaktion gemeinsam in einen *repA*⁻-*E. coli*-Stamm transformiert, werden sich nur jene mit *colE1*-Replikationsursprung propagieren lassen. Bei Selektion auf Ampicillin und Kanamycin werden nur solche Zellen wachsen, die ein Rezipientenplasmid mit *Ds*-Kanamycin-Resistenzkassette tragen. So kann *in vitro* eine Transposition nachgewiesen werden. Der Vorteil eines tetramerischen Rezipientenplasmids ist, daß die Ampicillinresistenz die Insertion eines einzelnen *Ds*-Elements nicht zerstört werden kann.

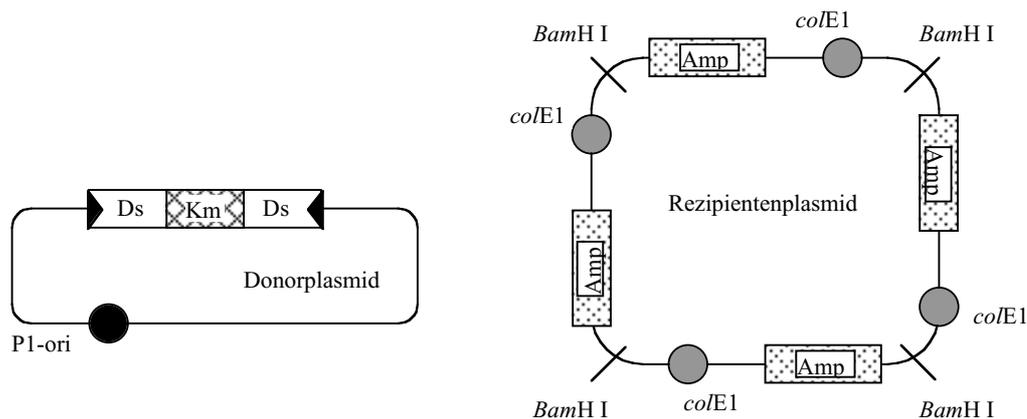


Bild 16: Schematische Darstellung des Donor- und Rezipientenplasmids. Das Donorplasmid besitzt einen P1-Replikationsursprung (P1-ori) und ein nicht-autonomes *Ds*-Element, mit eingesetzter Kanamycinresistenz (Km). Das Rezipientenplasmid ist ein natürlich entstandenes Tetramer des Plasmids pBluescript mit *colE1*-Replikationsursprung und Ampicillinresistenz (Amp).

Die Standardbedingungen (siehe Material und Methoden, 5.7.1) richteten sich nach dem *in vitro*-Transpositionssystem für das P-Element aus *D. melanogaster* (Kaufman und Rio, 1992). P1-Donorplasmid wurde mit TPase₁₋₈₀₇ aus Tabak inkubiert. Danach wurde die Rezipienten-DNA angeboten. Nach dem Stop der Reaktion wurde der Ansatz Phenol/Chloroform-extrahiert, die DNA gefällt und in *E. coli* JS4-elektrokompetente Zellen transformiert, in denen das P1-Plasmid nicht replizieren kann. Plasmid-DNA aus doppelresistenten Zellen wurde isoliert und in Restriktionverdaus weiter untersucht.

Im Vergleich zu Kontrollreaktionen, die keinen Proteinextrakt enthielten, war die Zahl der doppelresistenten Kolonien aus Reaktionen mit TPase nur unwesentlich größer oder sogar gleich groß. Doppelresistenz entstand in diesem System somit auch spontan, unabhängig von der Zugabe von TPase. Dennoch wurden aus verschiedenen Standardreaktionen 18 doppelresistente Plasmide isoliert und durch Restriktionsverdaus mit *BamH I* analysiert. Keines der Plasmide war durch Insertion des *Ds*-Elements entstanden.

Veränderungen der Grundbedingungen (mehr Proteinextrakt - bis zu 200fache Menge, verlängerte Inkubationszeiten - 2 h bis 16 h, unterschiedliche Inkubationstemperaturen - 20°C bis 37°C, andere Pufferbedingungen, Zugabe von MnCl₂ oder MgCl₂, gleichzeitige Inkubation von Donor und Rezipienten mit TPase; siehe Material und Methoden) ergaben nur sehr wenige doppelresistente Kolonien. Die Analyse der entstandenen Plasmide ergab, daß auch hier keine Transposition des *Ds*-Elements stattgefunden hat. Vielmehr müssen die doppelresistenten Plasmide durch Rekombinationsereignisse entstanden sein.

2.3.2 *In vitro*-Transpositionssystem zum Nachweis von Exzisionsereignissen

Um die einzelnen Schritte der Transposition getrennt untersuchen zu können und die *in vitro*-Reaktion so einfach wie möglich zu halten, wurde im folgenden mit einem Plasmid gearbeitet (Exzisionsvektor), in dessen Ampicillin-Resistenzgen ein nicht-autonomes Mini-*Ds* kloniert wurde, das eine Kanamycinresistenz trägt (Bild 17).

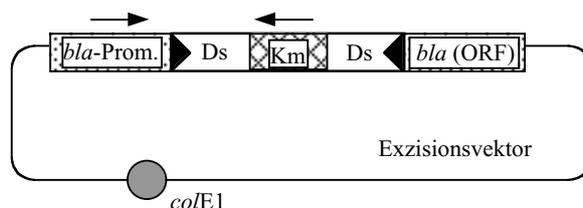


Bild 17: Schematische Darstellung des Exzisionsvektors. Im Gen für die Ampicillinresistenz (*bla*) liegt zwischen Promotor und offenem Leseraster (ORF) eine Insertion eines nicht-autonomen *Ds*-Elements. Das *Ds*-Element beinhaltet eine Kanamycinresistenzkassette (Km). Der Exzisionsvektor trägt einen *colE1*-Replikationsursprung.

Die Expression der Ampicillinresistenz ist in diesem Vektor stark herabgesetzt, aber nicht vollständig unterbunden, so daß eine sehr hohe Ampicillinkonzentration von 550 mg/l vonnöten ist, um das Wachsen von falsch-positiven Kolonien zu unterdrücken. Springt jedoch das *Ds*-Element aus diesem Locus im Plasmid während der Inkubation mit TPase heraus, wird das Ampicillin-Resistenzgen wieder voll exprimiert, transformierte Zellen wachsen auch bei hohen Ampicillin-Konzentrationen. Außerdem sollte die Kanamycinresistenz verloren gehen, wenn das *Ds*-Element nicht im gleichen Vektor reintegriert. Plasmid-DNA aus mutmaßlich positiven Kolonien wurde mit Restriktionsenzymen verdaut, mittels PCR untersucht und gegebenenfalls sequenziert.

Der Ablauf der Reaktion glich den *in vitro*-Reaktionen für Integration und Exzision (siehe 2.3.1). Im Laufe mehrerer Assays wurden verschiedene Bedingungen getestet. Grundsätzlich unterschieden diese sich in der Art der Reaktionspuffer und der Zugabe oder Nicht-Zugabe von Ligase (Material und Methoden, 5.7.2). Das Enzym sollte Plasmid-DNA aus der ein *Ds*-Element gesprungen ist, vor der Transformation in *E.coli* religieren. Auch für dieses System konnten keine Bedingungen gefunden werden, unter denen *in vitro* Exzision stattfindet. Um die Unwägbarkeit auszuschließen, daß das *Ds*-Element zwar ausgeschnitten, die Plasmid-DNA anschließend aber nicht religiert wurde und somit eine Transformation in *E. coli* erfolglos blieb, wurden komplette *in vitro*-Reaktionen im Southern blot untersucht. Dabei diente das *Ds*-Element als Sonde. Aber auch so wurden keine Exzisionsereignisse detektiert.

2.3.3 Endonukleaseaktivität der *Ac*-TPase

Es wird postuliert, daß die *Ac*-TPase während der Transposition die Enden des *Ac*-Transposons erkennt und spezifisch schneidet (siehe Bild 6). Da *Ac* in allen bisher getesteten Pflanzen autonom zu springen vermag, wird davon ausgegangen, daß die TPase dafür allein verantwortlich ist. Dazu benötigt das Protein eine spezifische Endonukleaseaktivität.

Um diese Aktivität *in vitro* nachzuweisen, wurden DNA-Fragmente eingesetzt, die dem 3`-Ende eines *Ac*-Elements mit drei subterminalen Bindestellen für die TPase entsprechen (Bild 18). Als 3`-flankierende DNA wurde die natürliche genomische Sequenz des *wx-m9*-Locus aus *Zea mays* mit der durch die Insertion des *Ac*-Elements entstandenen Sequenzduplikation gewählt. In diesem Locus wurde ein aktives *Ac*-Element nachgewiesen (Fedoroff *et al.*, 1983). Als Negativkontrolle wurde ein DNA-Fragment eingesetzt, das eine mutierte Sequenz im „terminal inverted repeat“ (TIR) enthält. Ein *Ac*-Element, dessen TIRs in dieser Weise verändert sind, ist *in vivo* inaktiv (Hehl und Baker, 1989).

Oligonukleotid 1	ACCGTTACCGACCGT <u>TTTTCATCCCTATCTCCATGAGCTGCGGGA</u> TGGCAATGGCTGGCA <u>AAAGTAGGGATAGAGGTACTCGACGCCCT</u>
Oligonukleotid 2 (Negativkontrolle)	ACCGTTACCGACCGT <u>TTTTCATCTGAGTCTCCATGAGCTGCGGGA</u> TGGCAATGGCTGGCA <u>AAAGTAGACTCAGAGGTACTCGACGCCCT</u>

Bild 18: DNA-Substrate zum Nachweis der spezifischen endonukleolytischen Aktivität der *Ac*-TPase. Dargestellt ist jeweils das 3`-Ende des *Ac*-Elements mit flankierender DNA aus dem *wx-m9*-Locus. Fett gedruckt: der „terminal inverted repeat“ von *Ac*. Fett und kursiv sind die mutierten Basen in der Negativkontrolle. Schattiert: bei der Insertion des *Ac*-Elements in das *Waxy*-Gen entstandene Sequenzduplikationen. Die Base im Substrat, die im „Suizid-Substrat“ fehlt, ist gewellt unterstrichen. Die subterminalen Bindestellen für die *Ac*-TPase sind schwarz unterstrichen.

Als weiteres Substrat wurden die gleichen doppelsträngigen DNA-Fragmente verwendet, die aber in der 3`-flankierenden Sequenz einen Einzelstrangbruch haben (Bild 18, gewellt unterstrichen). Solche sogenannten „Suizid-Substrate“ sind geeignet, sehr kurzlebige kovalente Protein-DNA-Intermediate einer Reaktion nachzuweisen (Pargellis *et al.*, 1988). Sollte die TPase am Ende des „inverted repeat“ das DNA-Fragment spezifisch schneiden und ein kovalentes Zwischenprodukt bilden, wird die Rückreaktion durch das Wegdiffundieren des abgeschnittenen Einzelstrangs verhindert.

Die eingesetzten Proteinpräparationen waren entweder TPase_{His1-807} exprimiert in *E.coli* mit entsprechender Kontrolle (Protein aus BL21DE3 transformiert mit leerem Expressionsvektor)

oder Kernproteine mit TPase₁₋₈₀₇ bzw. WT-Kernproteine aus Tabak. Radioaktiv markiertes DNA-Substrat wurde mit TPase unter verschiedenen Reaktionsbedingungen inkubiert. Nach mehreren Vorversuchen wurde für die Auftrennung der DNA-Fragmente ein natives Polyacrylamidgel-System gewählt (siehe Material und Methoden, 5.7.3).

Es stellte sich heraus, daß das wenig gereinigte Protein aus *E.coli* für diese Art der Experimente ungeeignet war, da in der Präparation eine Exo- und/oder Endonukleaseaktivität vorlag, die die eingesetzten DNA-Fragmente degradierte. TPase aus Tabak zeigte unter den gewählten Bedingungen keinerlei spezifische Aktivität. Die Zugabe von Mn²⁺ oder Mg²⁺ als mögliche Co-Faktoren der Endonukleasereaktion oder der Zusatz von ATP oder GTP konnten die spezifische endonukleolytische Spaltung nicht in Gang bringen. Auch der Einsatz der „Suizid-Substrate“ zeigte kein Reaktionsprodukt, das bei dem nicht-vorgeschnittenen Substrat eventuell rückreagiert haben könnte (Reaktionsbedingungen siehe Material und Methoden, 5.7.3).

2.3.4 Unspezifische Endonukleaseaktivität der *Ac*-TPase

Während der Transposition muß die TPase spezifisch die Enden des Transposons erkennen, binden und schneiden. Die Integration des *Ac*-Elements in eine Ziel-DNA setzt entweder eine unspezifische Endonukleaseaktivität der TPase voraus oder sollte, wie dies für andere mobile Elemente beschrieben ist, über einen nukleophilen Angriff der freien Transposonenden auf die Ziel-DNA ablaufen. In diesem Fall stabilisiert die TPase während der Integration das Transpososom. Im folgenden wird untersucht, ob *in vitro* eine unspezifische Endonukleaseaktivität der *Ac*-TPase gezeigt werden kann.

Dazu wurde der Vektor pBR322, der keinerlei Bindestellen für die *Ac*-TPase enthält, mit Proteinextrakt aus Tabak inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen auf einem Agarosegel aufgetrennt.

In dieser Versuchsreihe stellte sich heraus, daß in allen Kernproteinextrakten aus Tabak neben der TPase eine unspezifische endonukleolytische Aktivität unbekannter Natur vorlag. Nach der Inkubation mit Proteinextrakt tauchte jeweils ein neues DNA-Fragment auf, das in etwa der Größe linearisierter Plasmid-DNA entsprach (Bild 19, Pfeil). Daher konnte unter diesen Bedingungen keine unspezifische Endonuklease-Aktivität der TPase nachgewiesen werden.

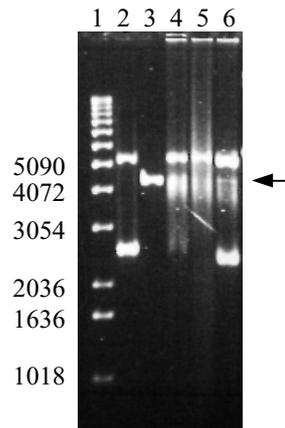


Bild 19: Endonukleaseaktivität in Kernproteinpräparationen aus Tabak. 300 ng Plasmid-DNA wurden mit 0,5 µg Proteinextrakt für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Elektrophorese der gereinigten Reaktionen erfolgte mit einem 0,9%igen Agarosegel (1x TTE). **1:** 1kb-Leiter; **2:** pBR322, ungeschnitten; **3:** pBR322, linearisiert mit *Bam*H I; **4:** pBR322 ungeschnitten, inkubiert mit WT-Tabakkernproteinen; **5:** pBR322 ungeschnitten, inkubiert mit Tabakkernproteinen mit TPase₁₈₉₋₈₀₇; **6:** pBR322 ungeschnitten, inkubiert mit Tabakkernproteinen mit TPase₁₋₈₀₇. Der Größenmarker ist in bp angegeben.

2.3.5 Integration eines vorgeschneideten *Ds*-Elements in eine Ziel-DNA

Für das prokaryotische *Tn10*-Element wurde beschrieben, daß die Ziel-DNA erst dann in den synaptischen Komplex eintritt, wenn die Transposase beide Enden des Transposons bereits geschnitten hat (Sakai und Kleckner, 1997). Dazu wurde *in vitro* ein vorgeschneidetes *Tn10*-Transposon mit Ziel-DNA inkubiert. Durch die Anwesenheit der *Tn10*-Transposase wurde das Transposon nicht-kovalent mit der Ziel-DNA verknüpft (Sakai und Kleckner, 1997).

Auch wenn bisher für die *Ac*-TPase keine spezifische oder unspezifische Endonukleaseaktivität gezeigt wurde, so wurde im folgenden dennoch untersucht, ob es der TPase isoliert aus Tabak möglich ist, ein Mini-*Ds*-Element *in vitro* in eine Ziel-DNA zu integrieren. Dazu wurde PCR-amplifiziertes Mini-*Ds* an beiden 5'-Enden radioaktiv markiert und anschließend mit Proteinextrakt unter Bedingungen, die eine DNA-Bindung ermöglichen, inkubiert. Danach wurde Ziel-DNA in Form von pBR322 angeboten (siehe Material und Methoden, 5.7.5). Sollte es der TPase gelingen, das *Ds*-Element in die Ziel-DNA zu integrieren, sollte diese radioaktiv markiert und detektierbar sein. Das eingesetzte Protein war TPase₁₋₈₀₇ aus Tabak und ein entsprechender Kernproteinextrakt aus untransformiertem Tabak.

In der Autoradiographie wurde nur das radioaktiv markierte *Ds*-Element detektiert. Die Plasmid-DNA war nicht markiert (Daten nicht gezeigt). Auch in diesem Experiment zeigt die *Ac*-codierte TPase keine enzymatische Aktivität, auf deren Grundlage man ein *in vitro*-Transpositionssystem aufbauen könnte.

Die isolierte Form der TPase, exprimiert in Tabak oder *E.coli*, könnte obligatorisch inaktiv sein, weil Eukaryoten-spezifische Modifikationen fehlen (*E.coli*) oder weil die Pufferbedingungen, in denen das Protein in Lösung vorliegt, das Protein inaktivieren (*E.coli* und Tabak). Im Falle der Kernproteinextrakte aus Tabak könnten die recht hohen Konzentrationen von Glycerin oder Ficoll eine Rolle spielen. Eine zweite Schwierigkeit, aktives Protein zu erhalten, besteht in der sehr hohen Selbstaggregationsbereitschaft der TPase. Dadurch erhält man auch bei der Präparation löslicher TPase nur einen geringen Anteil monomerischer TPase. *In vivo* werden in Mais-Endospermzellen, die homozygot für ein aktives *Ac*-Element sind, Aggregate im oder auf dem Kern beobachtet. Vergleichbare Aggregate werden auch in Petunienprotoplasten gebildet, die mit einem TPase-Expressionsvektor transformiert sind (Heinlein *et al.*, 1994). Es wird angenommen, daß diese Aggregate eine inaktive Form der *Ac*-TPase darstellen und Teil eines Autoregulationsmechanismus sind (Heinlein *et al.*, 1994). Daher ist es möglich, daß die hier verwendeten Proteinpräparationen mit aggregierter TPase fast ausschließlich inaktive TPase enthalten. Der Anteil aktiver TPase könnte zu gering sein, um *in vitro* enzymatische Aktivität nachweisen zu können. Im folgenden wurden daher bisher nicht charakterisierte, funktionelle Domänen der *Ac*-codierten TPase untersucht, um zunächst mehr über Eigenschaften wie Oligomerisierung und Aggregatbildung des Proteins zu erfahren.

2.4 Die C-terminale Dimerisierungsdomäne der *Ac*-TPase

Das *Ac*-Element gehört zu der Gruppe der *hAT*-Transposons (*hAT* für *hobo*, *Ac* und *Tam3*). Die *Ac*-codierte TPase trägt C-terminal drei sogenannte *hAT*-Domänen, die unter den zu dieser Gruppe gehörenden Transposasen konserviert sind. In Vorarbeiten wurde in einem Hefe-„two-hybrid“-Experiment in der dritten *hAT*-Domäne eine Interaktionsdomäne identifiziert (TPase_{His674-777}; Essers, 1996). Der Nachweis, daß dieses TPase-Fragment mit sich selbst dimerisiert, wurde über chemisches „Crosslinking“ erbracht. Dabei wurden die gereinigten Monomere mit Hilfe von Ethylenglycol-bis(succinimidylsuccinat) (EGS) über die Lysinreste der Domäne stabil vernetzt. Im Westernblot ließ sich dann mit einem TPase-spezifischen Antikörper neben dem monomeren Proteinfsegment ein dimeres Protein nachweisen (Essers, 1996). Die Rolle der C-terminalen Domäne in der Transposition wurde *in vivo* noch nicht geklärt.

2.4.1 Die Dimerisierung des TPase_{His674-777}-Fragments ist *in vitro* sehr stabil

Um die Spezifität und Stabilität dieser Dimerisierung genauer zu untersuchen, wurde zunächst das TPase_{His674-777}-Fragment in *E. coli* exprimiert und über ein N-terminal angefügtes Histidinhexamer mittels denaturierender Cobalt-Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurde das Protein zunächst mit Hilfe von Guanidiniumhydrochlorid in Lösung gebracht. Während der Affinitätschromatographie erfolgte dann ein Pufferwechsel, das Protein wurde mit harnstoffhaltigem Puffer von der Cobaltmatrix eluiert (Material und Methoden, 5.6.2). Gereinigte TPase_{His674-777} wurde anschließend nach dem Protokoll von Feldmar (Feldmar und Kunze, 1991) renaturiert. TPase_{His674-777} wurde in Renaturierungspuffer stark verdünnt und über mehrere Stunden bei 4°C inkubiert. Entnimmt man zu verschiedenen Zeitpunkten Protein, so läßt sich der Renaturierungszustand und im Fall von TPase_{His674-777} die fortschreitende Dimerisierung verfolgen. Bild 20 zeigt dies für die gereinigte TPase_{His674-777}.

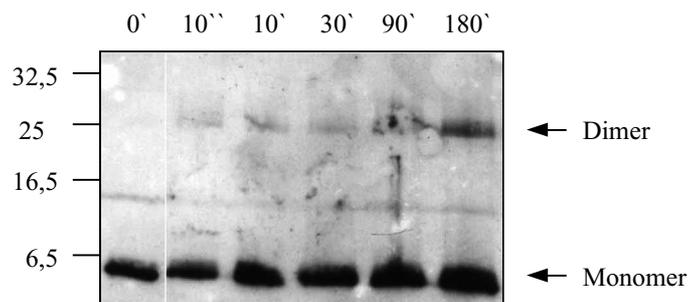


Bild 20: Dimerisierung von TPase_{His674-777} während der Renaturierung. TPase_{His674-777} wurde in BL21DE3 exprimiert. Die Zellen wurden bei 37°C bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 mit 0,6 mM IPTG für 4 h induziert. Anschließend wurden die Zellen in GuHCl-Puffer aufgeschlossen und das Protein mittels Co²⁺-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Zur Renaturierung wurden 20 µl Eluat 6 1:40 in Renaturierungspuffer verdünnt und bei 4°C inkubiert. Nach 10 sec, 10 min, 30 min, 90 min und 180 min wurde jeweils ein Aliquot entnommen und Aceton-gefällt. Das Pellet wurde in 1x Laemmli-Probenpuffer gelöst. Die Proben wurden für 10 min bei 95°C erhitzt, abzentrifugiert (5 min, 15000 Upm, 20°C) und anschließend auf ein 17,5%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Die Western-Analyse wurde mit einem TPase-spezifischen, polyklonalen Antikörper („C-terminal“) durchgeführt. Der Molekulargewichtsmarker ist in kDa angegeben.

Vor der Renaturierung liegt TPase_{His674-777} als Monomer vor. Wird das Protein renaturiert, so steigt mit der Zeit der Anteil dimeren Proteins wie erwartet an. Das dimerisierte Protein ist sehr stabil, da es auch durch zehninütiges Erhitzen in Probenpuffer und Elektrophorese im SDS-Gel nicht völlig zerstört werden kann.

Nachdem sich nun erstmals die hohe Stabilität des TPase_{His674-777}-Fragments angedeutet hat, wurde diese unter noch stringenteren Bedingungen mit nicht renaturiertem Protein weiter untersucht. Wird Eluat aus der Affinitätschromatographie direkt auf ein denaturierendes SDS-

Polyacrylamidgel geladen, so ist dimeres Protein nachweisbar (Bild 21, Spur1). Es ist stabil in der Anwesenheit von 8 M Harnstoff und SDS. Wird dieses Eluat für zehn Minuten bei 95°C erhitzt, bleibt immer noch ein Teil des Dimers erhalten (Spur 2). Dieser kann erst gänzlich zerstört werden, wenn die Proben vor der SDS-PAGE mit Laemmli-Probenpuffer versetzt werden und dann zehn Minuten bei 95°C erhitzt werden (Spur 3).

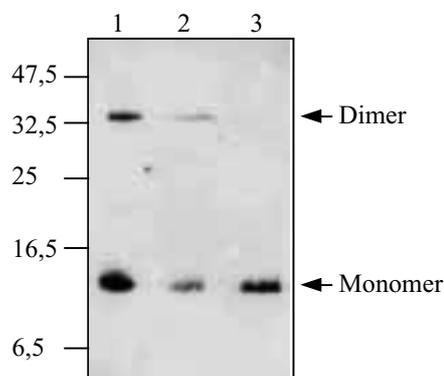


Bild 21: Stabilität des TPase^{His674-777}-Dimers unter denaturierenden *in vitro*-Bedingungen. TPase^{His674-777} wurde wie zuvor beschrieben in *E. coli* exprimiert und anschließend gereinigt (siehe Bild 20). Spur 1: 0,5 µl Eluat 6 in 8 M Harnstoff ohne weitere Behandlung, Spur 2: 0,5 µl Eluat 6 in 8 M Harnstoff 10 min bei 95°C erhitzt, Spur 3: 0,5 µl Eluat 6 in 8 M Harnstoff, 1:1 mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden auf einem 17,5%igen SDS-Polyacrylamidgel größenfraktioniert. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und mit einem TPase-spezifischem Antikörper („C-terminal“) im Westernblot nachgewiesen. Der Molekulargewichtsmarker ist in kDa angegeben.

Die Dimerisierungsdomäne am C-Terminus der *Ac*-TPase ermöglicht eine sehr effektive und ungewöhnlich stabile Protein-Protein-Interaktion *in vitro*. Diese Beobachtung läßt jedoch noch keine direkten Rückschlüsse auf die Stärke der Interaktionen der vollständigen TPase *in vivo* zu. Ebenso wenig kann eine Aussage darüber gemacht werden, ob die Dimerisierung *in vivo* überhaupt eine Rolle spielt und was deren Funktion *in vivo* sein könnte. Mit Hilfe von Mutanten der C-terminalen Region sollten dazu nähere Hinweise erbracht werden.

2.4.2 Mutationen innerhalb der Dimerisierungsdomäne verringern die Dimerstabilität *in vitro*

Der Vergleich der Aminosäuresequenz verschiedener Transposasen der *hAT*-Familie ergibt, daß die C-terminale Dimerisierungsdomäne der *Ac*-TPase mit der dritten *hAT*-Domäne überlappt. Verschiedene Programme zur Vorhersage der Sekundärstruktur von Proteinen geben an, daß einige besonders hochkonservierte Aminosäuren in Bereichen liegen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit α -helikalen Regionen entsprechen (Bild 22, Jpred², A consensus method

for protein secondary structure prediction. <http://jura.ebi.ac.uk:8888/> (Cuff *et al.*, 1998; Cuff und Barton, 1999); PSIPred V2.0 Protein Structure Prediction Server. <http://insulin.brunel.ac.uk./psipred/> (Jones, 1999)). Im folgenden wird daher untersucht, welche Auswirkungen Aminosäureaustausche in helikalen Bereichen auf die TPase^{His674-777}-Dimerisierung *in vitro* haben. In Bild 22 sind sämtliche Mutationen angegeben.

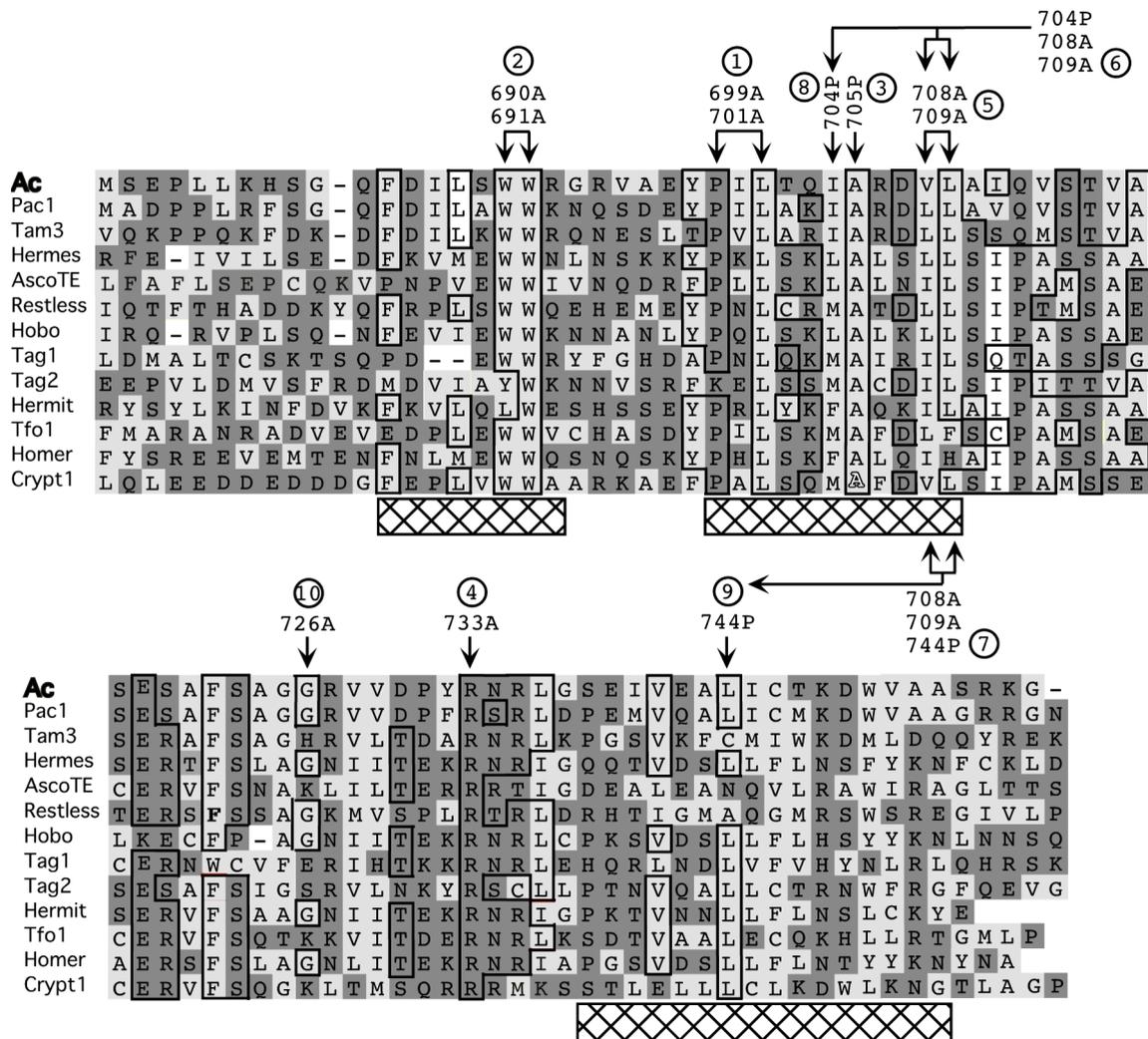


Bild 22: Die C-terminale Dimerisierungsdomäne überlappt mit der dritten hochkonservierten hAT-Domäne. Sequenzvergleich der C-terminalen hAT-Domäne verschiedener Transposasen der hAT-Familie. Hellgrau hinterlegte Reste sind eher hydrophob, dunkelgrau hinterlegte hydrophil. Reste die in über 50% der Sequenzen identisch sind, sind schwarz markiert. Helikale Bereiche sind als schraffierte Rechtecke unterhalb der Sequenzen gekennzeichnet. Die im folgenden eingeführten Mutationen sind angegeben und nummeriert. Ac: *Ac*-TPase aus *Zea mays* (Genbank accession number X05425, AS 674-757); Pac1: mutmaßliche *Pac1*-TPase aus *Pennisetum glaucum* (Genbank accession number U02300, AS 673-757); Tam3: *Tam3*-TPase aus *Antirrhinum* (Genbank accession number X55078, AS 635-716); Hermes: mutmaßliche Hermes-TPase aus *Musca domestica* (Genbank accession number L34807, AS 528-611); AscoTE: mutmaßliche TPase eines *Ascobulus immersus* Transposon (Genbank accession number Y07695, AS 516-601); Restless: mutmaßliche *Restless* TPase aus *Toypocladium inflatum* (Genbank accession number Z69893, AS 715-800); Hobo: mutmaßliche hobo TPase aus *Drosophila melanogaster* (Genbank accession number X04705, AS 596-639); Tag1: *Tag1* TPase aus *Arabidopsis thaliana* (Genbank accession number AF051562, AS 568-652); Tag2: *Tag2* TPase aus *Arabidopsis thaliana* (Genbank accession number AF120335.1, AS 462-547); Hermit: mutmaßliche *Hermit* TPase aus *Lucilia cupina* (Genbank accession

number U22467.1, AS 500-581); Tfo1: mutmaßliche TPase aus *Fusarium oxysporum* (Genbank accession number T00208, AS 693-777); Homer: mutmaßliche TPase aus *Bactrocera tryoni* (Genbank accession number AF110403, AS 537-620); Crypt1: mutmaßliche TPase aus *Cryphonectria parasitica* (Genbank accession number AF283502.1, AS 849-935).

Die Aminosäurereste wurden entweder gegen Alanin oder Prolin ausgetauscht. Ein Austausch gegen Alanin soll die Sekundärstruktur eines Proteins kaum beeinflussen, hingegen hydrophobe oder hydrophile Proteininteraktionen beeinträchtigen. Ein Aminosäureaustausch gegen Prolin soll die Struktur einer eventuell vorhandenen α -Helix zerstören. Die Mutationen wurden mit Hilfe von komplementären Mutageneseprimer-Paaren direkt in den Expressionsvektor für TPase_{His674-777} eingeführt (siehe Material und Methoden, 5.3.4). Nach der Reinigung der Plasmid-DNA wurden die eingeführten Mutationen durch Sequenzierung verifiziert. Erst dann erfolgte die Expression in *E. coli* (BL21DE3).

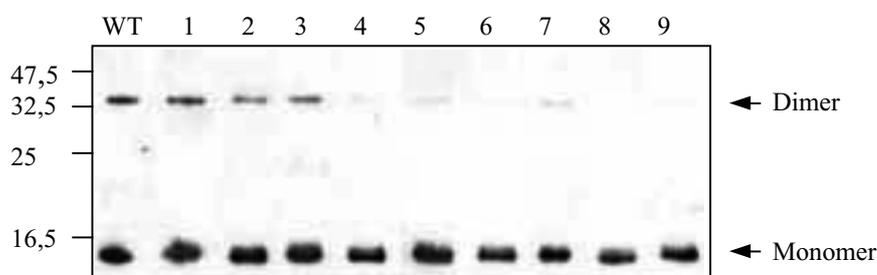


Bild 23: Stabilität der TPase_{His674-777}-Mutanten unter denaturierenden *in vitro*-Bedingungen. TPase_{His674-777} (WT) sowie die entsprechenden Mutanten wurden in BL21DE3 exprimiert. Die Zellen wurden bei 37°C bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 mit 0,6 mM IPTG für 4 h induziert. Anschließend wurden die Zellen in GuHCl-Puffer aufgeschlossen und das Protein mittels Co²⁺-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Die Eluate wurden sofort ohne weitere Behandlung auf ein 17,5%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert. TPase_{His674-777} und Derivate wurden mit einem TPase-spezifischen Antikörper („C-terminal“) in der Western-Analyse nachgewiesen. **WT:** TPase_{His674-777}; **1:** TPase_{His674-777/P699A/L701A}; **2:** TPase_{His674-777/W690A/W691A}; **3:** TPase_{His674-777/A705P}; **4:** TPase_{His674-777/R733A}; **5:** TPase_{His674-777/V708A/L709A}; **6:** TPase_{His674-777/I704P/N708A/L709A}; **7:** TPase_{His674-777/N708A/L709A/L744A}; **8:** TPase_{His674-777/I704P}; **9:** TPase_{His674-777/I704P}. Der Molekulargewichtsmarker ist in kDa angegeben.

Die gereinigten TPase-Derivate wurden direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen. Bild 23 zeigt die Auswirkungen der in TPase_{His674-777} eingefügten Mutationen auf die *in vitro*-Stabilität im Vergleich zur TPase_{His674-777} (WT). Tauscht man die hochkonservierten Reste W690/W691 (Spur 2) oder P699/L701 (Spur 1) gegen Alanin aus, so beeinträchtigt dies nicht die Bildung und Stabilität des TPase-TPase-Dimers. Das gleiche gilt, wenn A705 (Spur 3) gegen Prolin ausgetauscht wird. Alle genannten Aminosäuren sind innerhalb der Transposasen der *hAT*-Familie hochkonserviert und liegen in mutmaßlichen α -helikalen Bereichen der Dimerisierungsdomäne. Umso mehr ist es verwunderlich, daß Mutationen dieser Reste zu

keinerlei Beeinträchtigung der Dimerisierung *in vitro* führen. Möglicherweise haben diese Aminosäuren eine andere essentielle Funktion.

Werden die Reste V708/L709 (Spur 5) und R733 (Spur 4) gegen Alanin bzw. I704 (Spur8) und L744 (Spur 9) gegen Prolin ausgetauscht, wird die Stabilität der Dimere im SDS-Polyacrylamidgel stark herabgesetzt, teilweise ist ein dimeres Protein nur noch schwer nachweisbar. Ein vollkommener Verlust der Dimerisierung wird jedoch auch dann nicht erreicht, wenn die Mutationen V708A/L709A mit I704P (Spur 6) bzw. L744P (Spur 7) kombiniert werden. Da an der Proteininteraktion *in vitro* mehrere Aminosäurereste beteiligt sein müssen, ist es nicht verwunderlich, daß auch durch eine Dreifachmutation die Dimerisierung *in vitro* nicht vollkommen unterbunden werden kann. Es wurde gezeigt, daß nur einige der konservierten Aminosäuren an der Dimerisierung beteiligt sind, aber zusätzlich auch weniger gut konservierte Reste wie I704 und L744.

2.4.3 Mutationen innerhalb der Dimerisierungsdomäne führen zum Funktionsverlust der *Ac*-TPase *in vivo*

Bisher wurde die Dimerisierung der TPase *in vitro* untersucht. Aus diesen Experimenten können keine Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob die Dimerisierungsdomäne *in vivo* eine essentielle Rolle bei der Transposition spielt. Um die *in vitro*-Ergebnisse in einen Zusammenhang mit der *in vivo*-Situation bringen zu können, wurden die bisher erwähnten Mutationen mit Hilfe von Mutageneseprimern in den Pflanzenexpressionsvektor pcATG10 eingeführt, der die voll funktionsfähige TPase₁₀₃₋₈₀₇ exprimiert (Kunze *et al.*, 1993). Die Mutationen wurden durch Sequenzierung verifiziert. In einem *in vivo*-Transpositionssystem wurde die Aktivität der mutanten Transposasen bestimmt. In diesem System werden Petunienprotoplasten mit dem Expressionsvektor für die TPase und einem Reporterplasmid (pTY/DIR, F. Ros und R. Kunze, 2000) co-transformiert. Das Reporterplasmid trägt ein nicht-autonomes *Ds*-Element im offenen Leserahmen des Gens für die β -Glucuronidase (*GUS*-Gen), welches dadurch inaktiviert wird. Wird das *Ds*-Element *in trans* durch die TPase ausgeschnitten, kann das *GUS*-Gen wieder exprimiert werden. Nach einer Färbereaktion mit X-Gluc kann die Anzahl an *GUS*-positiven Protoplasten ausgezählt werden und die Transpositionsfrequenz in Abhängigkeit zur Aktivität der co-transformierten TPase bestimmt werden.

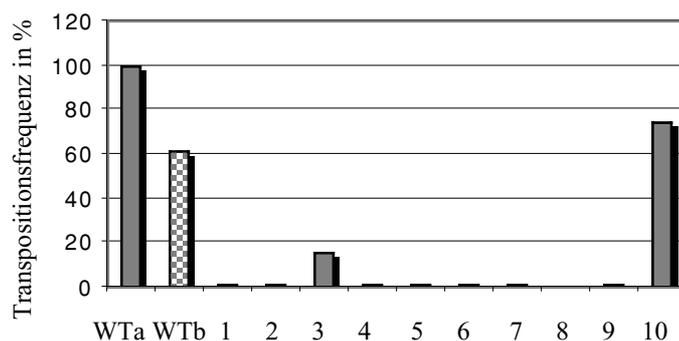


Bild 24: Aktivität der TPase-Mutanten *in vivo*. Die durchschnittliche Aktivität der TPase-Mutanten und des WTb (pcATG3-10) wurde jeweils relativ zur Aktivität der WT-TPase (pcATG10) *in vivo* ermittelt. **WTa:** TPase₁₀₃₋₈₀₇ exprimiert mit pcATG10; **WTb:** TPase₁₀₃₋₈₀₇ exprimiert mit pcATG3-10, **1:** pcATG10-P699A/L701A, **2:** pcATG10-W690A/W691A, **3:** pcATG10-A705P, **4:** pcATG10-R733A, **5:** pcATG10-V708A/L709A, **6:** pcATG10-I704P/V708A/L709A, **7:** pcATG10-V708A/L709A/L744P, **8:** pcATG10-I704P, **9:** pcATG10-L744P, **10:** pcATG10-G726A.

In Bild 24 sind die *in vivo*-Aktivitäten der verschiedenen Mutanten graphisch dargestellt. WTa entspricht dabei dem Vektor pcATG10, der für die TPase₁₀₃₋₈₀₇ codiert. Sämtliche Mutanten beruhen auf diesem Vektor. Die Aktivität der WT-TPase (WTa) wurde auf 100% gesetzt.

Die Mutante A705P (Nr. 3) zeigt *in vitro* keine Beeinträchtigung der Dimerstabilität. Passend dazu kann *in vivo* Transposition beobachtet werden. Die Frequenz ist aber verglichen mit dem WT um das ca. Fünffache herabgesetzt. Alle übrigen Mutanten zeigen *in vivo* keine Aktivität, auch jene, die *in vitro* die Dimerstabilität nicht beeinflussen (Nr. 1 und 2).

Um festzustellen, ob der Aktivitätsverlust spezifisch für die eingeführten Mutationen ist, wurde als Kontrolle eine neutrale Substitution einer nicht-konservierten Aminosäure gewählt. Dazu wurde Glycin 726 gegen Alanin ausgetauscht. *In vivo* zeigt sich, daß dieser Austausch keine Auswirkung auf die TPase-Aktivität hat (Nr.10).

Um auszuschließen, daß *in vivo* keine Aktivität gemessen werden konnte, weil die Proteine nicht exprimiert wurden oder instabil waren, wurde die TPase-Expression zum Zeitpunkt der GUS-Färbereaktion per Western-Analyse überprüft. Wie in Bild 25 zu sehen ist, kann für jede TPase-Mutante Expression nachgewiesen werden. Obwohl die Expressionsplasmide der verschiedenen Transposasen auf demselben Ausgangsvektor beruhen, ist die Expressionsstärke sehr unterschiedlich. Die neutrale Mutante TPase_{G726A} (Nr. 10) wird in gleichem Maße exprimiert wie die WT-TPase (WTa). TPase_{R733A} (Nr. 4) wird sogar stärker exprimiert. Alle übrigen Mutanten zeigen eine schwächere Expression als der WT (WTa).

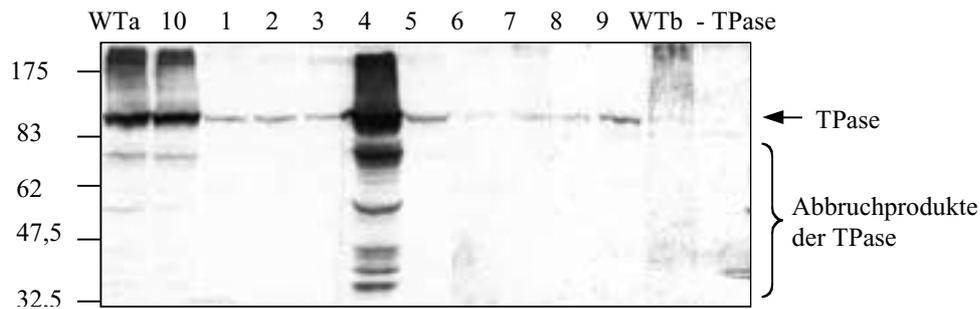


Bild 25: Expressionsrate der TPase-Mutanten im *in vivo*-System. Nach zweitägiger Inkubation der Protoplasten bei 26°C wurden parallel zur Bestimmung der Transpositionsfrequenz 3 ml Protoplasten bei 10000 Upm abzentrifugiert und in 100 µl 1x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert. Nachdem die Proben 10 min bei 95°C erhitzt worden waren, wurden sie zentrifugiert (5 min, 15000 Upm, 20°C) und direkt auf ein 7,5%iges SDS-Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulose übertragen. TPase wurde mit einem polyklonalen TPase-spezifischen Antikörper („anti-10.ATG“) nachgewiesen. **WTa:** pcATG10, WT-TPase; **10:** TPase_{103-807/G726A}; **1:** TPase_{103-807/P699A/L701A}; **2:** TPase_{103-807/W690A/W691A}; **3:** TPase_{103-807/A705P}; **4:** TPase_{103-807/R733A}; **5:** TPase_{103-807/V708A/L709A}; **6:** TPase_{103-807/I704P/V708A/L709A}; **7:** TPase_{103-807/V708A/L709A/L744P}; **8:** TPase_{103-807/I704P}; **9:** TPase_{103-807/L744P}; **WTb:** pcATG3-10, WT-TPase; **- TPase:** Petunienprotoplasten nur mit Reporterplasmid transformiert.

Die Inaktivität mancher Mutanten könnte aufgrund einer sehr schwachen Expression zu erklären sein. Um dies zu widerlegen, wurde als weitere Kontrolle der TPase₁₀₃₋₈₀₇-Expressionsvektor pcATG3-10 verwendet (Kunze *et al.*, 1993). Dieses Plasmid zeigt *in vivo* eine deutlich geringere Expression der WT-TPase als pcATG10, da vor dem eigentlichen Startcodon drei weitere ATG-Codons versetzt zum offenen Leserahmen liegen (WTb, Bild 25). Die Höhe der Expression ist vergleichbar mit der der meisten Mutanten (ausgenommen TPase_{R733A}, Bild 25, Nr. 4). Trotz der geringeren Expression ist die *in vivo*-Aktivität von WTb deutlich nachweisbar und liegt im Vergleich zu WTa bei über 60% (Bild 24). Somit kann ausgeschlossen werden, daß wegen einer geringen TPase-Expression keine *in vivo*-Transposition gemessen werden kann. Ein weiterer Beleg dafür ist zum einen, daß TPase_{A705P} trotz schwacher Expression eine geringe *in vivo*-Aktivität zeigt und zum anderen, daß die TPase_{R733A} *in vivo* vollkommen inaktiv ist, obwohl sie stark exprimiert wird.

Damit ergibt sich, daß alle Mutanten, die *in vitro* eine herabgesetzte Dimerstabilität zeigen, *in vivo* vollkommen inaktiv sind. Die Dimerisierungsdomäne nimmt demzufolge eine essentielle Funktion während der Transposition ein.

Einige Aminosäureaustausche an hochkonservierten Resten, die keine Veränderung der Dimerstabilität *in vitro* zeigen, führen *in vivo* zur Inaktivierung der TPase (Nr. 1 und 2). Diese Reste (W690, W691, P699 und V701) scheinen eine andere essentielle, bisher nicht bekannte Funktion in der Transposition zu haben.

2.4.4 Rezessive und dominante Mutationen in der Dimerisierungsdomäne

Um zu untersuchen, inwieweit die verschiedenen TPase-Mutanten an Proteinwechselwirkungen während der Transposition beteiligt sind, wurden die Proteine mit WT-TPase in Petunienprotoplasten co-exprimiert. Co-Expression inaktiver TPase-Mutanten mit WT-TPase können *in vivo* einen dominant-negativen oder einen rezessiven Phänotyp ergeben (Kunze *et al.*, 1993; Behrens-Jung, *et al.* 1994). Dominant-negativ heißt, daß durch die Mutante die Aktivität der WT-TPase vollkommen unterdrückt wird. Dies gilt zum Beispiel für eine DNA-bindungsdefiziente Mutante TPase_{103-807(H191R/R193A)} (Kunze *et al.*, 1993). Bei einem rezessiven Phänotyp wird die WT-Aktivität nicht beeinflusst. Dies gilt beispielsweise für die Insertionsmutante 709RV (Kunze *et al.*, 1993). Diese inaktivierende Insertion liegt in der hier charakterisierten Dimerisierungsdomäne und bestätigt, daß diese Region für die Transposition essentiell ist.

Die Mutanten TPase_{V708A/L709A}, TPase_{V708A/L709A/L744P} und TPase_{I704P}, die *in vitro* eine verringerte Dimerstabilität zeigen (Bild 23) und auch *in vivo* inaktiv sind (Bild 24), wurden mit WT-TPase co-transfiziert und zeigen einen rezessiven Phänotyp (Tabelle 1A). Dies könnte bedeuten, daß die Mutationen in der Dimerisierungsdomäne bewirken, daß die Proteine nicht mehr mit WT-TPase interagieren können und den Aufbau eines funktionierenden Oligomers nicht behindern können.

Diese Möglichkeit muß jedoch ausgeschlossen werden, da die Co-Transfektion der dimerisierungsdefizienten Proteine mit einer weiteren inaktiven, rezessiven Insertionsmutante, TPase_{585TR} (Kunze *et al.*, 1993) ergab, daß in dieser Kombination die Aktivität in geringem Maße wiederhergestellt werden kann (Tabelle 1B). Dies läßt sich nur damit erklären, daß die TPase als Oligomer aktiv ist und nicht alle TPase-spezifischen Funktionen in jeder Untereinheit benötigt werden. Im Falle der Co-Transfektion von TPase_{585TR} mit dimerisierungsdefizienten Mutanten entsteht ein kleiner Anteil aktiver Oligomere, so daß es zu einer geringen Transpositionsfrequenz kommen kann. Die Zusammensetzung der Oligomere läuft wahrscheinlich zufällig ab und der überwiegende Teil der Oligomere wird eine inaktive Konformation annehmen. Die Insertion 585TR liegt außerhalb der Interaktionsdomäne und zerstört wahrscheinlich eine andere essentielle Funktion der TPase. Daher scheint es wichtig zu sein, wo im Oligomer oder im entstehenden Transpososom die mutanten Proteine angeordnet sind.

Tabelle 1: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Komplementationsexperimenten. Angegeben sind die jeweils zur Transfektion verwendeten Plasmide, wobei der Vektor pcATG10 zu einer hohen Expression von TPase₁₀₃₋₈₀₇ führt und pcATG3-10 nur zu einer geringen Expression desselben Proteins. In den Kombinationen pcATG10-Mutante mit pcATG3-10 wurden jeweils 15 µg pcATG10-Mutante mit 3 µg pcATG3-10 co-transfiziert. Für TPase_{R733A} wurden 10 µg pcATG10-R733A mit 2 µg pcATG10 cotransfiziert. Für die Co-Transfektionen mit pcATG3-10-585TR wurden jeweils von beiden Plasmiden 10 µg DNA transfiziert. Wurde die Komplementation mit pcATG10-W690A/W691A durchgeführt, so wurden jeweils 5 µg der entsprechenden Plasmide co-transfiziert. Die Transpositionsfrequenz wurde anhand der Anzahl GUS-positiver Protoplasten bestimmt. ----: nicht getestet.

	A		B	C
	pcATG10	pcATG3-10	pcATG3-10-585TR	pcATG10-W690A/W691A
pcATG10-W690A/W691A	----	rezessiv	aktiv	----
pcATG10-P699A/L701A	----	----	----	inaktiv
pcATG10-I704P	----	rezessiv	aktiv	inaktiv
pcATG10-V708A/L709A	----	rezessiv	aktiv	inaktiv
pcATG10-V708A/L709A/L744P	----	rezessiv	aktiv	inaktiv
pcATG10-R733A	dominant	----	inaktiv	----

Die Mutante W690A/W691A, die zwar *in vitro* eine hohe Dimerstabilität zeigt (Bild 23), *in vivo* aber dennoch inaktiv ist (Bild 24), wurde ebenfalls mit WT-TPase co-transfiziert. Auch hier ergab sich ein rezessiver Phänotyp *in vivo* (Tabelle 1A). Ebenso konnte bei der Co-Transfektion mit der inaktiven Insertionsmutante 585TR eine geringe Anzahl an Transpositionsereignissen gezählt werden (Tabelle 1B). Auch hier ist wieder nur die Erklärung möglich, daß die TPase als Oligomer aktiv ist und die beiden unbekannt Funktionen in der Region um Aminosäure 585 bzw. 690/691 nicht in jeder einzelnen Untereinheit vorhanden sein müssen. Die sehr geringe Aktivität in der Co-Transfektion sollte darauf zurückzuführen sein, daß der größte Teil der sich ergebenden Oligomere in einer enzymatisch inaktiven Form zusammengesetzt vorliegt.

Ein anderes Bild ergab die Co-Transfektion der Mutante TPase_{R733A} mit WT-Protein bzw. der Insertionsmutante TPase_{585TR} (Tabelle 1A). Diese Mutante zeigte einen dominant-negativen Phänotyp, das heißt, daß trotz Anwesenheit von WT-TPase keine Transposition *in vivo* stattfinden konnte. In Kombination mit TPase_{585TR} war auch keinerlei Aktivität nachweisbar (Tabelle 1A).

Das Protein TPase_{R733A} sollte nach wie vor die Transposonenden spezifisch binden können, da sich die DNA-Bindedomäne am N-Terminus befindet. Aufgrund der sehr hohen TPase_{R733A}-Konzentrationen in den Protoplasten und der verringerten Dimerstabilität *in vitro*, könnte es

möglich sein, daß der überwiegende Teil der subterminalen Bindestellen von mutiertem Protein besetzt und die WT-TPase verdrängt wird. Andererseits könnte die eingefügte Mutation eine grundlegende Konformationsänderung der TPase zu Folge haben, so daß der Aufbau eines funktionellen Oligomers nicht mehr möglich ist, die WT-TPase aber trotzdem noch involviert ist und somit inaktiviert wird.

Da postuliert wurde, daß die Funktion um die Aminosäuren W690/W691 eine andere ist als Dimerisierung, sollte die Co-Transfektion von TPase_{W690A/W691A} mit Mutanten, die *in vitro* eine herabgesetzte Dimerstabilität zeigten, zu einer teilweisen Wiederherstellung der TPase-Aktivität führen. Um dies zu untersuchen, wurde die TPase_{W690A/W691A} mit TPase_{V708A/L709A}, TPase_{P699A/L701A}, TPase_{V708A/L709A/L744P} und TPase_{I704P} co-transfiziert und die Transpositionshäufigkeit gemessen. Wider Erwarten ergab sich, daß keine der genannten Kombinationen zu einer messbaren Transposition führten (Tabelle 1C). Möglicherweise handelt es sich bei der unbekanntem Funktion um eine Aktivität, die in engem Zusammenhang mit der Dimerisierung steht und Dimerisierung des gleichen TPase-Moleküls voraussetzt. Als weitere Erklärung muß in Betracht gezogen werden, daß die Dimerisierung *in vitro* nicht das Geschehen *in vivo* widerspiegelt. Es könnte zum Beispiel sein, daß die Dimerisierung *in vitro* mit einer etwas geänderten Konformation der TPase_{His674-777} noch möglich ist, aber *in vivo* nicht funktioniert, da hier die Dimerisierungsdomäne nicht isoliert vorliegt, sondern als Teil des insgesamt größeren TPase₁₀₃₋₈₀₇-Moleküls.

Zusammenfassend bestätigen die Co-Transfektionen die Annahme, daß die *Ac*-TPase als Oligomer aktiv ist. Außerdem scheinen sich im C-Terminus des Proteins drei unterschiedliche Funktionen voneinander abzugrenzen. Dies sind die unbekanntem Funktionen in den Regionen um die Aminosäure 585 und im N-Terminus der Dimerisierungsdomäne sowie die Dimerisierung selbst.

2.4.5 Die Dimerisierungsdomäne ist *in vivo* an der Aggregatbildung beteiligt

Mit den bisherigen Experimenten konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei der Dimerisierungsdomäne um eine für die Transposition essentielle Region handelt. Es konnte nicht geklärt werden, welches die eigentliche Funktion dieser Domäne *in vivo* ist.

Durch Immunfluoreszenz wurde in früheren Versuchen gezeigt, daß sich in Petunienprotoplasten, in denen die *Ac*-TPase exprimiert wird, große, zum Teil filamentartige TPase-Aggregate bilden. Diese Aggregate, die sich im Cytoplasma beziehungsweise im oder auf dem

Kern befinden, sollen inaktive Komplexe der TPase darstellen, die auf diesem Weg autoreguliert sein soll (Kunze *et al.*, 1993).

Um zu klären, ob die Dimerisierungsdomäne an der Ausbildung solcher Aggregate beteiligt ist, wurden Petunienprotoplasten aus den *in vivo*-Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dazu wurden transfizierte Protoplasten auf beschichtete Objektträger aufgebracht. Der Nachweis der TPase erfolgte in einem ersten Schritt mit einem polyklonalen anti-TPase Antikörper („anti-10.ATG“) aus Kaninchen. In einem zweiten Schritt wurde der anti-TPase-Antikörper mit einem sekundären Antikörper dekoriert, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist (Anti-Rabbit-IgG-FITC-Conjugate). Nach diversen Waschschrinen und dem Einbetten der Protoplasten wurden diese mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Kerne der Protoplasten wurden mit DAPI gefärbt, um die TPase in den Protoplasten lokalisieren zu können (Näheres siehe Material und Methoden, 5.5).

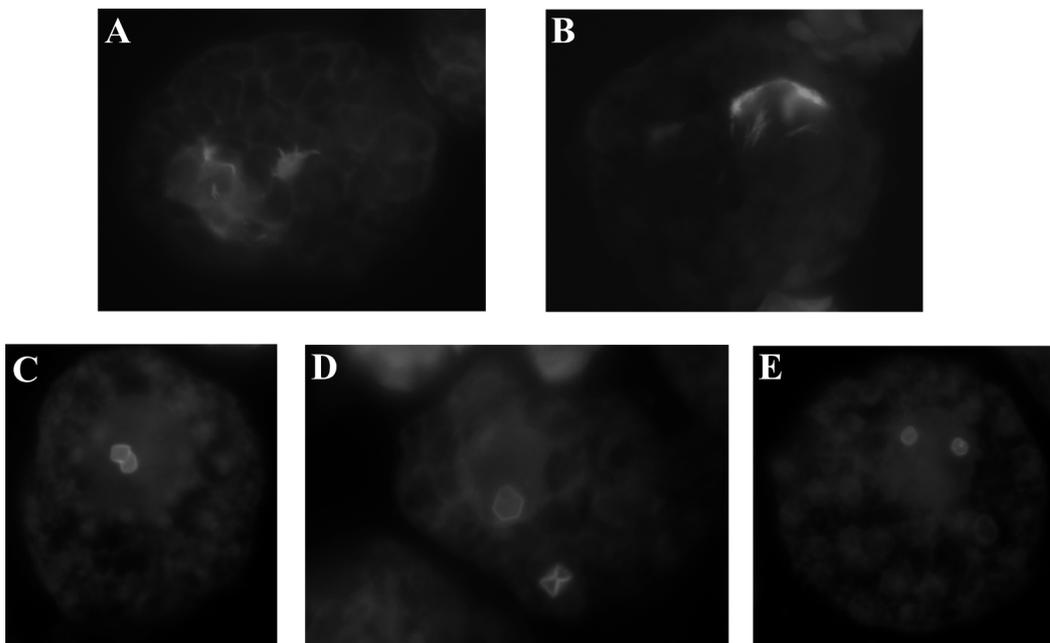


Bild 26: Immunfluoreszenz der WT-TPase und TPase_{R733A}. Die mutante TPase_{R733A} zeigt *in vivo* veränderte Aggregate. Der Nachweis der TPase erfolgte mit anti-TPase-Antikörper („anti-10.ATG“) Die Färbung der Kerne erfolgte mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Näheres siehe Material und Methoden. **A:** WT-TPase bildet große, filament- und netzartige Aggregate aus; **B:** TPase_{G726A} zeigt im Vergleich zu TPase₁₀₃₋₈₀₇ keinen veränderten Phänotyp; **C-D:** TPase_{R733A} bildet kristallähnliche Aggregate.

Es stellte sich heraus, daß nur für die Mutanten R733A und G726A TPase-Aggregate nachweisbar waren (Bild 26). Daraus kann nicht direkt geschlossen werden, daß durch die anderen Mutationen die Aggregatbildung verhindert wird, da auch für Protoplasten transfiziert mit pcATG3-10 (WT-TPase, schwach exprimiert) keine solchen Aggregate nachzuweisen

waren. In diesen Fällen scheint die Proteinexpression zu gering zu sein, um über Immunfluoreszenz die Aggregate sichtbar machen zu können.

Für die WT-TPase (pcATG10) ergaben sich die schon bekannten filamentartigen Aggregate, die im Cytoplasma oder im bzw. auf dem Kern lokalisiert waren (Bild 26, A). Hier war eine Unterscheidung nur schwer möglich. Die Aggregate der TPase_{G726A} unterschieden sich nicht von WT-Aggregaten (Bild 26, B). Die Immunfluoreszenzuntersuchung der Mutante R733A ergab jedoch ein völlig anderes Bild (Bild 26, C-E). Die Aggregate waren einheitlich zu kristallähnlichen Strukturen umgelagert, die vier- oder sechseckig waren. Das bedeutet, daß die Dimerisierungsdomäne an der Ausbildung von Aggregaten beteiligt sein muß.

2.5 Die N-terminale Oligomerisierungsdomäne der Ac-TPase

Mit der Dimerisierungsdomäne am C-Terminus der *Ac*-TPase ist eine erste essentielle Interaktionsdomäne des Proteins charakterisiert worden. Die Aggregation von Proteinen setzt jedoch die Anwesenheit weiterer Interaktionsdomänen voraus, da es sonst bei der Dimerbildung bleiben würde. Es wurde gezeigt, daß die Dimerisierungsdomäne an der Aggregatbildung der TPase beteiligt ist, die eine mutmaßliche negative Autoregulation der TPase darstellt. Erste Hinweise auf eine weitere Proteininteraktionsdomäne kamen von der Deletion TPase_{His103-465}. Wird dieses Protein in *E.coli* exprimiert, aus den „inclusion bodies“ gereinigt und renaturiert, so kann man beobachten, daß das TPase-Fragment im Laufe der Renaturierung Oligomere ausbildet (Rudenko und Kunze, nicht veröffentlicht).

2.5.1 Teile der mutmaßlichen Oligomerisierungsdomäne sind hochkonserviert

Der erste Teil der TPase-Region 103-465 ist unter den Transposasen der *hAT*-Familie nicht konserviert. Die mutmaßliche Oligomerisierungsdomäne umfaßt die erste hochkonservierte *hAT*-Domäne komplett (AS 293-376) und die zweite *hAT*-Domäne nur zum Teil (AS 442-490). Die Strukturvorhersage (Referenzen siehe 2.4.2) für die gesamte Region ergibt eine hohe Wahrscheinlichkeit für helikale Strukturen, sowohl in konservierten als auch in nicht-konservierten Teilbereichen (Bild 27). Konservierte Reste entsprechen zum Teil heptameren Sequenzwiederholungen hydrophober Aminosäurereste, die Leucinzippeln ähneln (Bild 27).

Bild 27 (vorherige Seite): Sequenzvergleich N-terminaler Regionen von Transposasen der *hAT*-Familie. Hydrophobe Reste sind hellgrau hinterlegt, hydrophile schwarz. Aminosäuren die zu über 50% identisch sind, sind schwarz umrahmt, Aminosäuren die zu 50% identisch sind, stehen in fetter Schrift. Helikale Bereiche sind schräg schraffiert, Bereiche mit hoher Wahrscheinlichkeit für β -Faltblatt-Strukturen sind gerade schraffiert. Hydrophobe Reste in heptamerer Wiederholung sind durch ein Sternchen gekennzeichnet. Ac: *Ac*-TPase aus *Zea mays* (Genbank accession number X05425, AS 103-465); Pac1: mutmaßliche *Pac1*-TPase aus *Pennisetum glaucum* (Genbank accession number U02300, AS 99-462); Tam3: *Tam3*-TPase aus *Antirrhinum* (Genbank accession number X55078, AS 76-432); Hobo: mutmaßliche hobo TPase aus *Drosophila melanogaster* (Genbank accession number X04705, AS 30-368); Hermes: mutmaßliche Hermes-TPase aus *Musca domestica* (Genbank accession number L34807, AS 1-320); Tag2: *Tag2* TPase aus *Arabidopsis thaliana* (Genbank accession number AF120335.1, AS 1-261).

2.5.2 Expression verschiedener Deletionsderivate der Oligomerisierungsdomäne

Das Protein TPase_{His103-465} umfaßt mehr als 40% der Aminosäurereste der vollständigen TPase. Um die Oligomerisierungsfunktion auf einen kleineren Bereich einzuschränken, wurden zunächst verschiedene Deletionen dieses TPase-Fragments in *E. coli* als Fusion mit einem N-terminalen Histidinhexamer exprimiert und deren Fähigkeit zur Oligomerisierung überprüft. Bild 28 zeigt eine schematische Darstellung der *Ac*-TPase, der Region 103-465, in der die Oligomerisierungsdomäne liegt sowie die exprimierten Deletionen dieser Region.

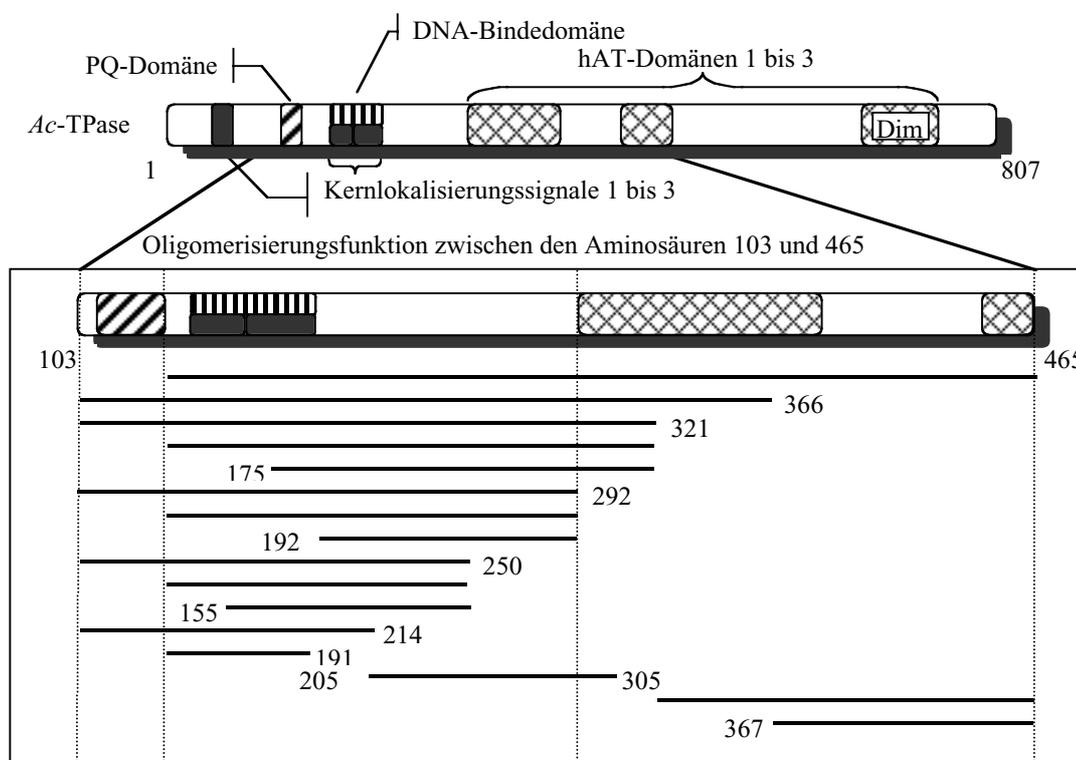


Bild 28: Schematische Darstellung der vollständigen *Ac*-TPase, der Region 103-465 sowie der exprimierten Subfragmente dieser Region. Sämtliche Deletionsderivate wurden in den Expressionsvektor pET15b kloniert und als N-terminale Histidinhexamer-Fusion exprimiert. Die verschiedenen schon charakterisierten Domänen der TPase sind gekennzeichnet.

Die N-terminale Deletion bis Aminosäure 136 sollte klären, ob die essentielle PQ-Domäne eine Funktion bei der Oligomerisierung der TPase hat. Das Ausweiten der Deletion bis Aminosäure 155 deletiert den gesamten Bereich vor Beginn der DNA-Bindedomäne. Durch die fortschreitenden Deletionen bis Aminosäure 192 sollte die Interaktionsdomäne N-terminal weiter eingeschränkt werden. Die schrittweisen C-terminalen Deletionen bis Aminosäure 292 sollten klären, ob die erste *hAT*-Domäne eine Rolle bei TPase-Interaktionen spielt.

Alle Deletionen der Region 103-465 bis auf zwei konnten in *E. coli* nur in unlöslicher Form exprimiert werden und wurden durch De- und Renaturierung in Lösung gebracht. TPase_{His103-214} und TPase_{His367-465} konnten in löslicher Form gewonnen werden und wurden über Affinitätschromatographie gereinigt.

2.5.3 Deletionsderivate der TPase zeigen *in vitro* verschiedene Oligomerisierungsverhalten

Das Oligomerisierungsverhalten der Deletionsderivate der Domäne 103-465 und die Stabilität der gebildeten Di- oder Oligomere wurden in Anlehnung an die Experimente zur Dimerisierungsdomäne durch Kochen in Laemmli-Probenpuffer und anschließende denaturierende SDS-PAGE bestimmt (2.4.1). Auch die Subfragmente der Region TPase_{His103-465} zeigen zum Teil eine Laufanomalie wie sie bereits in Abschnitt 2.1.1 beschrieben wurde.

Zunächst wurde die N-terminale Deletion TPase_{His136-465} in ihrem Oligomerisierungsverhalten mit der vollständigen Region TPase_{His103-465} verglichen. Dabei sollte eine mögliche Rolle der für die Transposition essentiellen PQ-Domäne in der Oligomerisierung aufgezeigt werden (Bild 29A). Das Protein TPase_{His103-465} liegt nach der Renaturierung vollständig aggregiert vor. Nach dem Kochen in Laemmli-Probenpuffer können die Aggregate soweit zerstört werden, daß wieder monomerisches Protein auftaucht, dennoch bleibt der überwiegende Teil der Multimere erhalten. Nach der Deletion der PQ-Domäne liegt bereits neben Multimeren monomerisches Protein in der ungekochten Probe vor. Die Multimere können durch Erhitzen fast vollständig zerstört werden, Mono- und Dimer bleiben erhalten. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Anwesenheit der PQ-Domäne die Stabilität der gebildeten Multimere *in vitro* positiv beeinflusst.

Die aggregierte Form der weiter C-terminal deletierten TPase-Fragmente TPase_{His103-366} und TPase_{His103-321} bleibt nach dem Kochen in Laemmli-Probenpuffer nur noch zum Teil stabil (Bild 29B). Wird zusätzlich die N-terminale PQ-Domäne deletiert (TPase_{His136-321}), so kann

bereits in der nicht-gekochten Probe kaum noch eine multimeren Form nachgewiesen werden. Das Protein liegt nur noch als Monomer bzw. Dimer vor. Somit spielen sowohl die PQ-Domäne wie auch die C-terminalen Reste 367 bis 465 eine Rolle bei der Stabilisierung der Oligomere in der SDS-PAGE. Wird die Deletion am N-Terminus bis auf den Rest 175 ausgedehnt (Bild 29C), ergibt sich keine weitere Destabilisierung im Vergleich zu TPase_{His136-321}. Das Protein TPase_{His175-321} kann weiterhin dimerisieren.

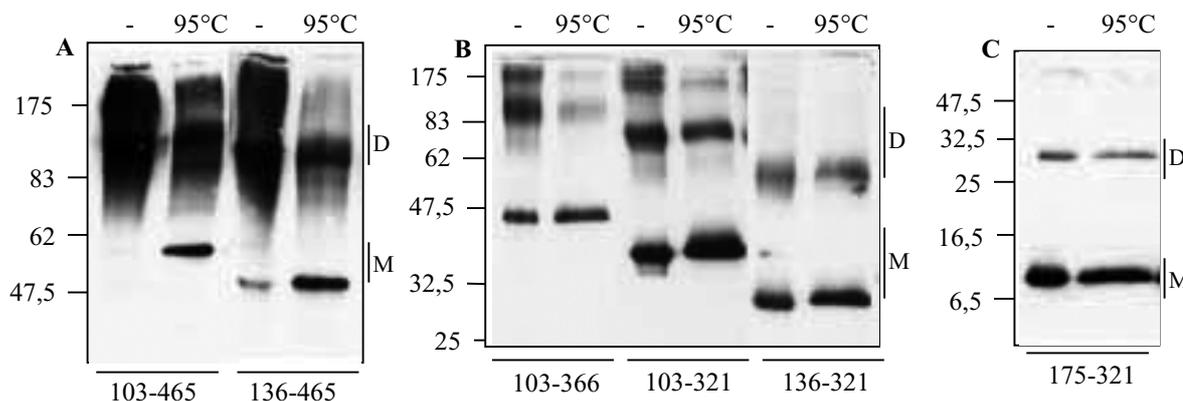


Bild 29: Deletionsderivate der Oligomerisierungsdomäne zeigen unterschiedliches Multi-merisierungsverhalten in der SDS-PAGE. Die Deletionsderivate der Oligomerisierungsdomäne der *Ac*-TPase wurden in BL21DE3 exprimiert. Die Zellen wurden bei 37°C bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 mit 0,6 mM IPTG für 4 h induziert. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe der Frenchpress lysiert. Die TPase-Derivate fanden sich jeweils in der unlöslichen Fraktion der „inclusion bodies“. Diese wurden denaturiert und durch 1:100 Verdünnung in Renaturierungspuffer bei 4°C für 72 h renaturiert. -: Das renaturierte Protein wurde direkt geladen. 95°C: Das renaturierte Protein wurde 1:1 mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt, 2 min zentrifugiert (15000 Upm, 20°C) und anschließend geladen. Nach der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert und im Westernblot mit einem polyklonalen TPase-spezifischen Antikörper („anti-10.ATG“) nachgewiesen. **A:** 7,5% Polyacrylamid, **B:** 10% Polyacrylamid, **C:** 15% Polyacrylamid. Die Molekulargewichtsmarker sind jeweils in kDa angegeben. M: monomeres Protein, D: dimeres Protein.

Weitere Deletionen des C-Terminus bis zu den Resten 292 bzw. 250 zeigen das gleiche Bild (Bild 30). Beginnt das TPase-Derivat bei Aminosäure 103, so können im SDS-Gel vor und nach dem Kochen in Laemmli-Probenpuffer Multimere nachgewiesen werden. Wird zusätzlich die PQ-Domäne deletiert, so liegt das jeweilige Protein (TPase_{His136-292} und TPase_{His136-250}) nur noch als Monomer und Dimer vor. Diese beiden Formen sind auch nach dem Erhitzen stabil. Das Fragment TPase_{His155-250}, in dem N-terminal weitere Aminosäuren deletiert sind, zeigt keine weitere Destabilisierung der dimeren Form.

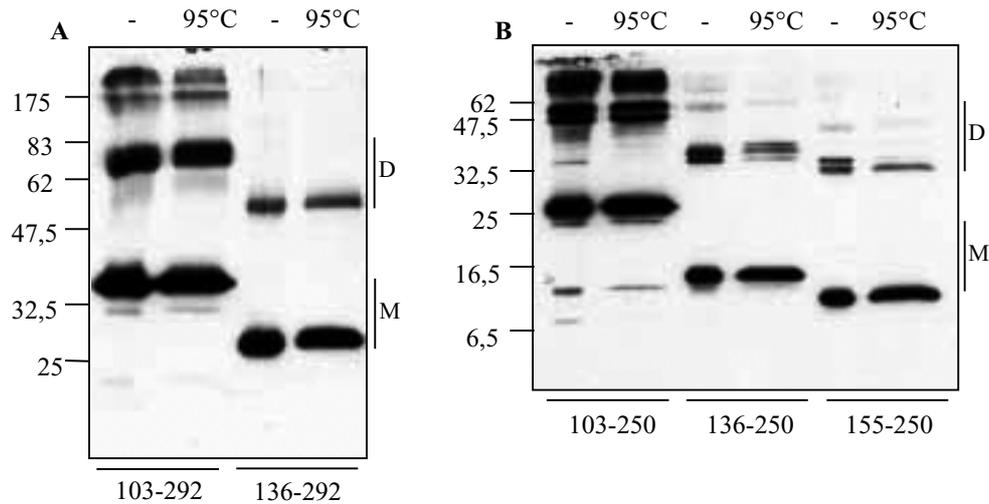


Bild 30: Die Multimerisierung von Deletionsderivaten der Oligomerisierungsdomäne wird durch die Deletion der PQ-Domäne in der SDS-PAGE destabilisiert. Die Deletionsderivate der Oligomerisierungsdomäne der *Ac*-TPase wurden wie in Bild 29 beschrieben exprimiert, gereinigt und renaturiert. -: Das renaturierte Protein wurde direkt geladen. 95°C: Das renaturierte Protein wurde 1:1 mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt, 2 min zentrifugiert (15000 Upm, 20°C) und anschließend auf ein Polyacrylamidgel geladen. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert und im Westernblot mit einem polyklonalen TPase-spezifischen Antikörper („anti-10.ATG“) nachgewiesen. **A:** 10% Polyacrylamid, **B:** 15% Polyacrylamid. Die Molekulargewichtsmarker sind jeweils in kDa angegeben. M: monomeres Protein, D: dimerisches Protein.

Die ausgeweitete C-terminale Deletion TPase_{His103-214} zeigt in der SDS-PAGE ebenfalls sehr stabile Dimerbildung (Bild 31A). TPase_{His103-214} wurde in *E.coli* löslich exprimiert und über Affinitätschromatographie gereinigt. Da auch hier Dimerbildung zu beobachten ist, kann davon ausgegangen werden, daß es sich dabei nicht um ein Renaturierungsartefakt handelt. Auffallend ist allerdings, daß dieses Protein, obwohl es die PQ-Domäne N-terminal enthält, im Gegensatz zu TPase_{His103-250} nicht zur Bildung von Multimeren neigt. Die Region zwischen den Resten 214 und 250 scheint ein weiteres Motiv der TPase-Interaktionsdomäne zu enthalten. TPase_{His136-191} zeigt nur schwache Dimerisierung (Bild 31B). Dieses Protein konnte nur in geringer Konzentration unlöslich exprimiert werden und mußte nach der Renaturierung durch Ultrafiltration konzentriert werden. Erst dann war die Dimerbildung nachweisbar.

Das TPase_{His205-305}-Fragment wurde untersucht, da in dieser Region keine Cysteine liegen (Bild 31C). Da auch dieses Protein *in vitro* Dimere bildet, kann ausgeschlossen werden, daß diese durch die Ausbildung von Disulfidbrücken während der Renaturierung zustande kommen. Ein weiterer Beleg dafür ist, daß eine hohe DTT-Konzentration im Renaturierungspuffer (10 mM DTT) die Proteininteraktionen keiner der untersuchten TPase-Fragmente stört. Außerdem ergab eine Behandlung der Proteine, renaturiert in Anwesenheit von 5 mM DTT, mit 0,1 M Iodacetamid keine Veränderung in der Interaktionsbereitschaft (Daten nicht gezeigt).

Iodacetamid geht mit reduzierten Thiolgruppen eine irreversible Verbindung ein und unterbindet so die Ausbildung von Disulfidbrücken.

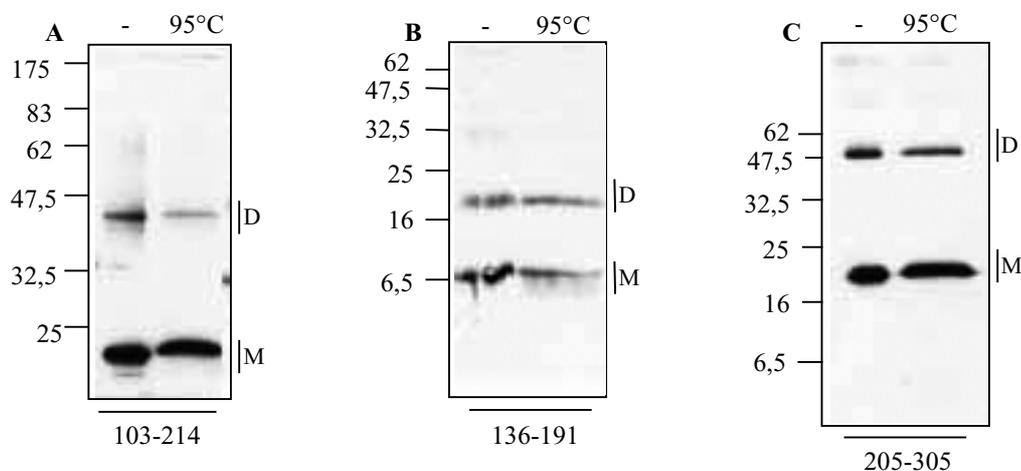


Bild 31: Einige Deletionsderivate der Oligomerisierungsdomäne zeigen in der SDS-PAGE überwiegend Dimerisierung. Die Deletionsderivate der Oligomerisierungsdomäne der *Ac*-TPase wurden wie in Bild 29 beschrieben exprimiert, gereinigt und renaturiert. Das Protein TPase_{His103-214} wurde löslich exprimiert und über Affinitätschromatographie gereinigt. -: Das renaturierte bzw. gereinigte Protein wurde direkt geladen. 95°C: Das renaturierte bzw. gereinigte Protein wurde 1:1 mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt, 2 min zentrifugiert (15000 Upm, 20°C) und anschließend geladen. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert und im Westernblot mit einem TPase-spezifischen Antikörper („anti-10.ATG“) nachgewiesen. **A:** 10% Polyacrylamid, **B:** 17,5% Polyacrylamid, **C:** 15% Polyacrylamid. Die Molekulargewichtsmarker sind jeweils in kDa angegeben. M: monomeres Protein, D: dimerisches Protein.

TPase_{His103-366} und TPase_{His103-321} zeigen *in vitro* eine geringere Aggregationsbereitschaft als TPase_{His103-465} (Bild 29). Um zu zeigen, daß im C-terminalen Teil der Oligomerisierungsdomäne ebenfalls ein Proteininteraktionsmotiv liegt, wurden die Fragmente TPase_{His322-465} und TPase_{His367-465} exprimiert. TPase_{His322-465} bildet *in vitro* stabile Dimere aus (Bild 32). Eine weitere Einschränkung war auch mit TPase_{His367-465} nicht möglich. Erstaunlicherweise bildet dieses nativ gereinigte Protein eine aggregierte Form des TPase-Fragments, die aber beim Erhitzen in Laemmli-Probenpuffer vollständig zerfällt und somit sehr instabil ist. Dieses Phänomen konnte bei TPase_{His103-214}, die auf die gleiche Weise gereinigt wurde, nicht beobachtet werden. Möglicherweise ist diese eher schwache Interaktion somit auf intermolekulare Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten der extrem kleinen TPase-Fragmente zurückzuführen. Dennoch konnte gezeigt werden, daß auch der äußerste C-terminale Bereich der Oligomerisierungsdomäne an TPase-Interaktionen *in vitro* beteiligt ist.

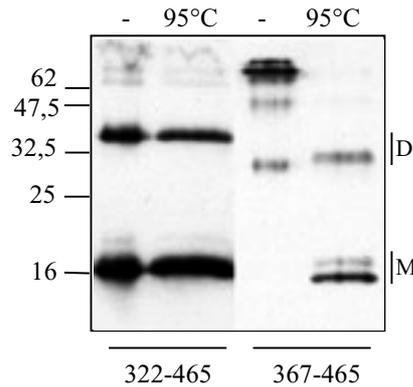


Bild 32: N-terminale Deletionen der Oligomerisierungsdomäne zeigen unterschiedliche Multi-merisierungsverhalten in der SDS-PAGE. TPase_{His322-465}-Fragment wurde wie in Bild 29 beschrieben exprimiert, gereinigt und renaturiert. Das Protein TPase_{His367-465} wurde löslich exprimiert und über Affinitätschromatographie gereinigt. -: Das renaturierte bzw. gereinigte Protein wurde direkt geladen. 95°C: Das renaturierte bzw. gereinigte Protein wurde 1:1 mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt, 2 min zentrifugiert und anschließend geladen. Nach der SDS-PAGE (15% Polyacrylamid) wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert und im Westernblot mit einem polyklonalen TPase-spezifischen Antikörper („anti-10.ATG“) nachgewiesen. Der Molekulargewichtsmarker ist in kDa angegeben.

Die Expression verschiedener Deletionsderivate der Oligomerisierungsdomäne ergab, daß die N-terminal gelegene PQ-Domäne Oligomere in der SDS-PAGE stabilisiert und somit an Protein-Proteininteraktionen beteiligt zu sein scheint. Das gleiche Phänomen konnte für die Regionen AS 214-250 und AS 322-465 gezeigt werden (Zusammenfassung siehe Tabelle 2). Es war nicht möglich, ein TPase-Subfragment zu exprimieren, das nicht mehr mit sich selbst dimerisiert. Eine weitere Einschränkung der Interaktionsdomäne war nicht möglich. Die Region 103-465 stellt somit eine sehr komplexe Interaktionsdomäne dar, die aus mehreren Motiven zusammengesetzt zu sein scheint.

Tabelle 2: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den *in vitro*-Untersuchungen zum *in vitro*-Oligomerisierungsverhalten von Deletionen der TPase-Domäne 103-465. Die renaturierten bzw. gereinigten TPase-Fragmente wurden entweder direkt auf ein SDS-Polyacrylamidgel geladen (-) oder vorher 1:1 mit 2x Laemmli-Probenpuffer vermischt, 10 min bei 95°C gekocht, kurz zentrifugiert und dann geladen (95°C). Die Proteine lagen als Monomer (M), Dimer (D) und/oder höher aggregierte Form (A) vor. *: Der Anteil aggregierten Proteins ist im Vergleich zu 103-465 gering. **: Die Expression des Proteins war schwierig, Dimer konnte erst nach Ultrafiltration nachgewiesen werden.

TPase-Fragment	103-465	136-465	103-366	103-321	136-321	175-321	103-292	136-292
-	D+A	M+D+A	M+D+A*	M+D+A*	M+D(+A)	M+D	M+D+A	M+D
95°C	M+D+A	M+D+A	M+D+A*	M+D+A*	M+D	M+D	M+D+A	M+D

TPase-Fragment	103-214	103-250	136-250	155-250	136-191	205-305	322-465	367-465
-	M+D	M+D+A	M+D	M+D	M+D**	M+D	M+D	D+A
95°C	M+D	M+D+A	M+D	M+D	M+D**	M+D	M+D	M+D

2.5.4 Die inaktive TPase₁₃₆₋₈₀₇ bildet *in vivo* kleinere Aggregate als die WT-TPase

In vitro destabilisiert die Deletion der PQ-Domäne die TPase-Oligomere. Dies wirft die Frage auf, ob diese Destabilisierung auch *in vivo* nachweisbar ist und ob die Architektur der inaktiven TPase-Aggregate beeinflusst wird. Um dies zu untersuchen, wurden TPase₁₃₆₋₈₀₇-exprimierende Petunienprotoplasten in der Immunfluoreszenz untersucht.

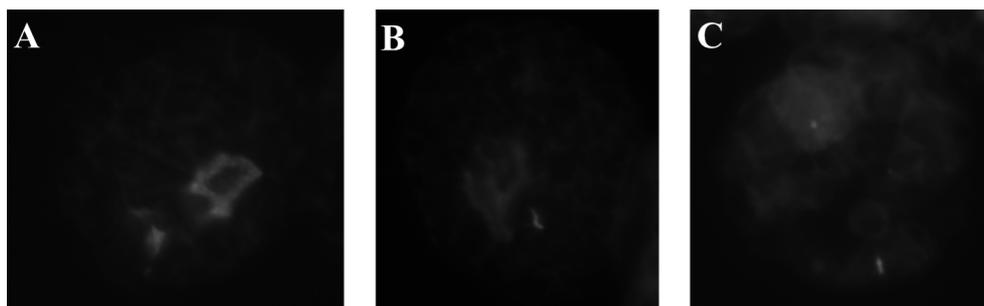


Bild 33: TPase₁₃₆₋₈₀₇ bildet *in vivo* keine netzartigen Aggregate. Immunfluoreszenzaufnahmen von TPase₁₀₃₋₈₀₇- und TPase₁₃₆₋₈₀₇-exprimierenden Petunienprotoplasten. Der Nachweis der TPase erfolgte mit anti-TPase-Antikörper („anti-10.ATG“). Die Färbung der Kerne erfolgte mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI). Näheres siehe Material und Methoden. **A:** TPase₁₀₃₋₈₀₇ bildet netzartige Aggregate aus, **B:** TPase₁₃₆₋₈₀₇ bildet filamentartige Aggregate und **C:** stark verkürzte Aggregate.

Es stellte sich heraus, daß im Vergleich zu Protoplasten, in denen die TPase₁₀₃₋₈₀₇ exprimiert wurde, nur wenige Protoplasten überhaupt TPase-Aggregate enthielten. Diese Aggregate waren filamentös und relativ kurz (Bild 33B und C), bildeten aber nie wie bei TPase₁₀₃₋₈₀₇ netzartige, große Strukturen aus (Bild 33A, auch Bild 26). Teilweise konnten sie nur noch als punktförmige Aggregate nachgewiesen werden. Die PQ-Domäne scheint auch *in vivo* TPase-Aggregate zu stabilisieren.

2.5.5 Spezifische DNA-Bindung der TPase-Deletionsderivate

Die DNA-Bindedomäne der *Ac*-TPase liegt zwischen den Aminosäuren 159 bis 206 (Feldmar und Kunze, 1991) und damit innerhalb der Oligomerisierungsdomäne. Bindet die TPase *in vitro* spezifisch an ihre subterminalen Bindestellen auf einem linearen DNA-Fragment, so kommt es zu einem ungewöhnlichen Shift der DNA-Probe, der anzeigt, daß die TPase als Oligomer an DNA bindet. Dabei variiert die Größe des Protein-Oligomers, so daß verschieden

große DNA-Protein-Komplexe entstehen (siehe dazu auch Bild 9). Diese Komplexe sind so groß, daß sie nur in Agarose-Gelen aufgelöst werden können. Ein Polyacrylamidgel kommt nicht in Frage, da hier die Protein-DNA-Komplexe nicht in die Gelmatrix einlaufen können.

Von den vorliegenden Deletionen der Oligomerisierungsdomäne enthalten einige die DNA-Bindedomäne. Um im weiteren Verlauf diese Proteine in einem *in vitro*-Funktionstest einsetzen zu können, muß zunächst gezeigt werden, daß die spezifische DNA-Bindung *in vitro* nicht zerstört wurde. Dazu wird wie bei der Überprüfung der aus Tabak isolierten TPase in der Gelretardation (Bild 34) ein DNA-Fragment eingesetzt, das mehrere Bindestellen für die TPase trägt („14-12“). Als Negativkontrolle dient ein DNA-Fragment mit mutierten Bindestellen, die die TPase nicht mehr erkennen kann („15-6“, Sequenz siehe 2.2.2).

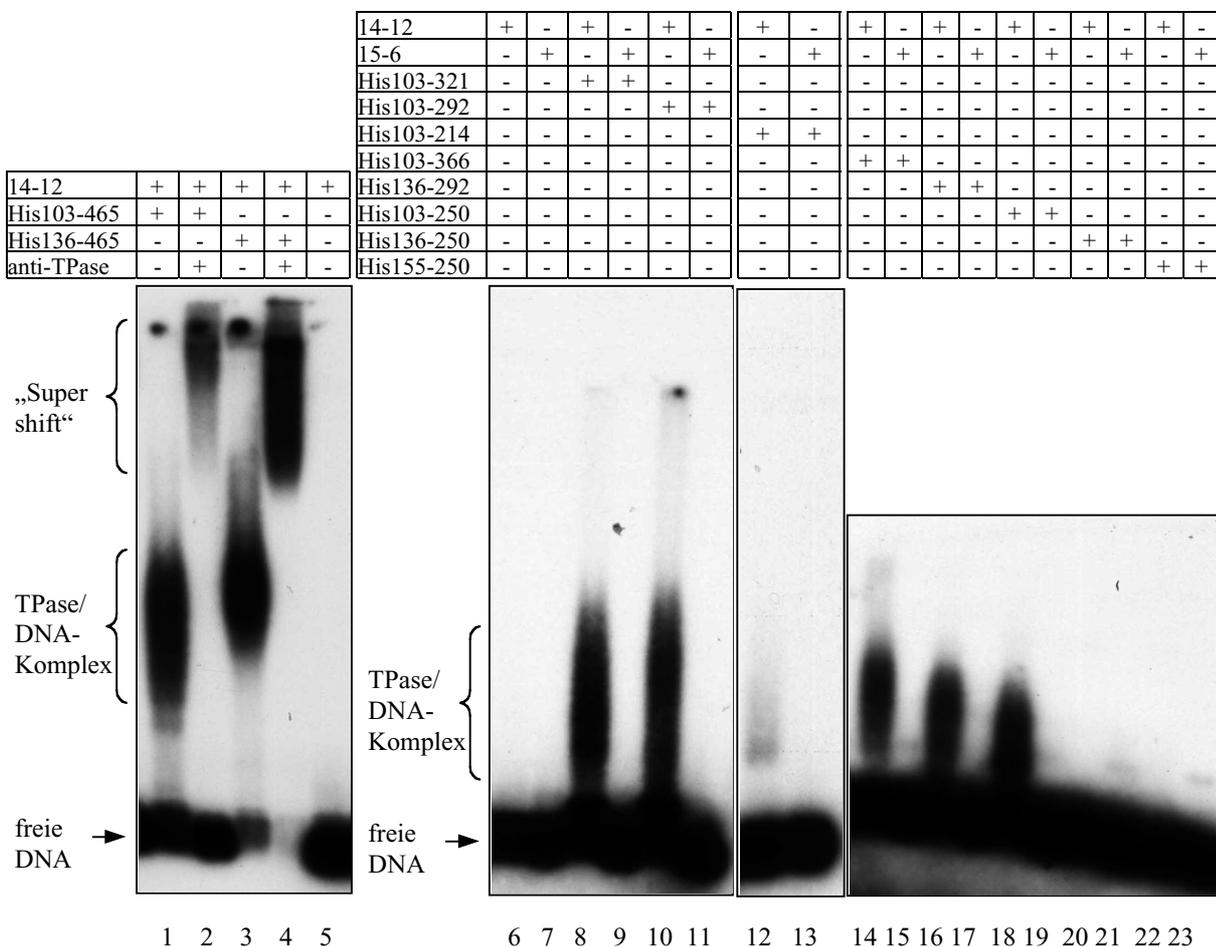


Bild 34: Deletionsderivate der Oligomerisierungsdomäne binden spezifisch DNA. 3 µl renaturierte TPase-Derivate bzw. gereinigtes Protein (im Falle von TPase_{His103-214}) wurden mit radioaktiv markierter DNA (20000 cpm) unter Zugabe von 3 µg Kompetitor-DNA (poly(dI-dC)) 30 min in 1x EMSA-Bindpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Auflösung der Protein-DNA-Komplexe erfolgte jeweils auf einem 1,2%igen Agarose-Gel (0,5x TBE). Nach dreistündiger Elektrophorese bei 4°C (90 V) wurden die Gele auf DE81 Cellulose getrocknet. „14-12“: DNA-Fragment mit TPase-Bindestellen; „15-6“: DNA-Fragment mit mutierten TPase-Bindestellen; anti-TPase: TPase-spezifischer polyklonaler Antikörper „anti-10.ATG“.

TPase_{His103-465} bindet spezifisch DNA (Bild 34, Spur 1). Dies konnte durch die Zugabe eines TPase-spezifischen, polyklonalen Antikörpers bestätigt werden (Spur 2). Wird N-terminal die PQ-Domäne deletiert, so beeinträchtigt dies nicht die DNA-Bindekapazität des Proteins (Spur 3), auch ein „Supershift“ mit anti-TPase-Antikörper ist möglich (Spur 4). In beiden Fällen entstehen auch weiterhin die TPase-typischen heterogenen Protein-DNA-Komplexe.

Für weiter C-terminal verkürzte Deletionsderivate wie TPase_{His103-366} (Spuren 14/15), TPase_{His103-321} (Spuren 8/9), TPase_{His103-292} (Spuren 10/11), TPase_{His136-292} (Spuren 16/17) und TPase_{His103-250} (Spuren 18/19) konnte ebenso gezeigt werden, daß spezifische DNA-Bindung in heterogenen Komplexen möglich ist.

Für TPase_{His103-214}, ein löslich exprimiertes Fragment, konnte *in vitro* eine schwache DNA-Bindekapazität nachgewiesen werden (Spuren 12/13). Dabei ist es wichtig herauszustellen, daß der schwache Shift der DNA-Probe auf eine geringe Proteinkonzentration in der Reaktion zurückzuführen sein kann und nicht unbedingt aussagt, daß dieses Fragment nur noch schwer die TPase-Bindestellen erkennt.

Für die Deletionsderivate TPase_{His136-250} (Spuren 20/21) und TPase_{His155-250} (Spuren 22/23) konnte keine spezifisch DNA-Bindekapazität gezeigt werden. Die Proteine wurden in mehreren getrennten Ansätzen de- und wieder renaturiert, doch mit keiner der Präparationen ließ sich eine spezifische DNA-Bindung nachweisen. Im Kontext dieser kurzen TPase-Fragmente führt die N-terminale Deletion der PQ-Domäne dazu, daß DNA nicht mehr spezifisch gebunden werden kann, möglicherweise durch eine Destabilisierung der die DNA-Protein-Komplexbildung unterstützenden Protein-Protein-Interaktionen.

2.6 Die Ac-TPase bringt *in vitro* freie Transposon-Enden über Proteininteraktionen in räumliche Nähe zueinander

Die TPase ist als Oligomer aktiv und bindet schon als solches an die subterminalen Bindestellen in den Transposonenden. Es wird postuliert, daß die TPase, nachdem sie an DNA gebunden hat, die beiden Transposonenden über TPase-TPase-Interaktionen in räumliche Nähe zueinander bringt, so daß ein synaptischer Komplex entstehen kann (Transpososom, Bild 5). In diesem Komplex soll dann die DNA geschnitten werden. Bisher konnten zwei Proteininteraktionsdomänen charakterisiert werden, die potentiell für den Aufbau und die Stabilisierung des Transpososoms verantwortlich sein könnten.

Für das Suppressor-Mutator (*Spm*)-Transposon aus Mais, das für zwei Proteine codiert (TnpA und die Transposase TnpD), wurde bereits gezeigt, daß TnpA *in vitro* die Enden des Transposons spezifisch bindet und über Proteininteraktion im Transpososom zusammenbringt. Um dies nachzuweisen, wurden freie Transposonenden mit TnpA inkubiert. Anschließend wurde Ligase zu der Reaktion gegeben. Die Anwesenheit von TnpA fördert die Ligation der DNA, indem DNA-gebundenes TnpA die Transposonfragmente über Protein-Protein-Interaktionen in räumliche Nähe zueinander bringt (Raina *et al.*, 1998).

Da für das *Ac*-Element ein ähnlicher Transpositionsmechanismus postuliert wird, wurde in einem ähnlichen experimentellen Ansatz geprüft, ob die TPase in der Lage ist, freie Transposonenden über Proteininteraktionen so nah zueinander zu bringen, daß eine Ligation gefördert wird. Involvierte Interaktionsdomänen können sowohl die Dimerisierungsdomäne als auch die Oligomerisierungsdomäne sein. Es ist auch vorstellbar, daß beide Domänen an der Stabilisierung des Transpososoms beteiligt sind.

2.6.1 Die Oligomerisierungsdomäne ist am Aufbau eines synaptischen Komplexes *in vitro* beteiligt

Die de- und wieder renaturierten Protein-Fragmente TPase_{His103-465} und TPase_{His136-465} entsprechen der vollständigen Oligomerisierungsdomäne bzw. der Oligomerisierungsdomäne ohne die essentielle PQ-Domäne. TPase-Aggregate werden durch die Deletion der PQ-Domäne *in vitro* und *in vivo* destabilisiert, *in vivo* ist die deletierte TPase₁₃₆₋₈₀₇ inaktiv (Kunze *et al.*, 1993).

Um die Rolle der PQ-Domäne in der Transposition weiter zu untersuchen, wurden das PCR-amplifizierte 5'- bzw. 3'-Ende des Mini-*Ds*-Elements radioaktiv markiert und gemeinsam mit TPase_{His103-465} bzw. TPase_{His136-465} inkubiert. Danach wurde Ligase in die Reaktion gegeben und der zeitliche Reaktionsablauf der Ligation verfolgt. Es stellte sich heraus, daß beide TPase-Derivate eine nachfolgende Ligation fördern (Bild 35).

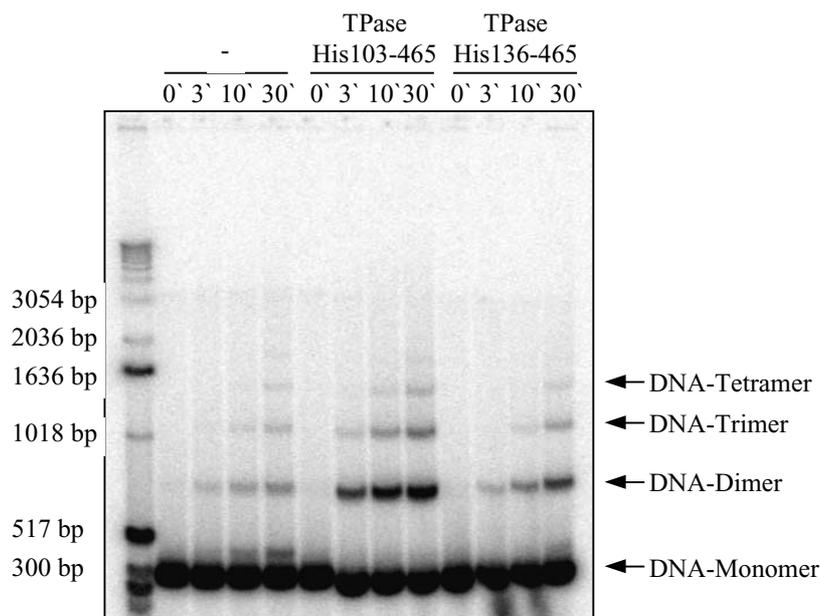


Bild 35: TPase_{His103-465} und TPase_{His136-465} fördern die Ligation freier Transposonenden. Gleiche Mengen Protein (0,15 µg) wurden mit PCR-amplifizierten und radioaktiv markierten 5'- und 3'-Enden des Mini-*Ds*-Elements (jeweils 12500 cpm) 15 min bei Raumtemperatur in Ligasepuffer inkubiert (Reaktionsvolumen 15 µl). Zum Zeitpunkt 0 min wurden 2,5 µl Reaktion abgenommen und die Reaktion in SDS- und EDTA-haltigem Auftragspuffer bei 65°C für 10 min abgestoppt. Zur restlichen Reaktion wurden 0,125 Einheiten T4-DNA-Ligase gegeben. Nach 3 min, 10 min und 30 min wurden wiederum 2,5 µl abgenommen und die Reaktion abgestoppt. Anschließend wurden die Ligationsprodukte auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt (1x TTE). Das Gel wurde auf DE81-Cellulosepapier getrocknet und exponiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Phosphorimager STORM840®. -: Reaktion ohne TPase, TPase_{His103-465}: vor Zugabe der Ligase wurde TPase_{His103-465} zur Reaktion gegeben, TPase_{His136-465}: vor Zugabe der Ligase wurde TPase_{His136-465} zur Reaktion gegeben.

Die eingesetzten DNA-Substrate waren an beiden Enden phosphoryliert. In der Kontrollreaktion ohne Zugabe von TPase waren die Fragmente daher 30 min nach Zugabe von T4-DNA-Ligase teilweise zu Di-, Tri- und weiteren Oligomeren ligiert. Wurde vor Ligasezugabe TPase_{His103-465} in die Reaktion gegeben, förderte dies die Ligation der *Ds*-Enden zu Dimeren. Als Konsequenz davon liegen auch mehr DNA-Trimere und Tetramere vor. Das gleiche gilt für TPase_{His136-465}, hier fällt die Förderung ein wenig schwächer aus.

Dieses Ergebnis zeigt, daß die TPase-Fragmente spezifisch an DNA binden und dann mit anderen TPase-Molekülen gebunden an DNA einen Komplex aufbauen, in dem die 5'- und 3'-Mini-*Ds*-Enden in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Die TPase-Fragmente können dabei als Oligomer binden, so daß der DNA-Protein-Protein-DNA-Komplex über viele TPase-TPase-Kontakte stabilisiert wird.

Um zu zeigen, daß die Förderung der Ligation freier Transposon-Enden über die spezifische DNA-Bindung der TPase abläuft, wurde ein DNA-bindungsdefizientes TPase-Derivat TPase_{His103-465/H191R/R193H} eingesetzt (Becker und Kunze, 1997). Dieses Protein konnte die

Ligationsreaktion nicht fördern, vielmehr wurde sogar die Grundaktivität der Ligase unterdrückt (Daten nicht gezeigt). Die Zugabe von BSA statt TPase förderte die Ligation nicht (Daten nicht gezeigt). Ein Überschuß EDTA hemmt die Ligation sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von TPase_{His136-465} (Daten nicht gezeigt). Die Reaktion ist somit von der Anwesenheit DNA-bindender TPase und aktiver Ligase abhängig.

Um zu testen, ob die gesamte, sehr komplexe Oligomerisierungsdomäne für die Ausbildung eines DNA-Protein-Protein-DNA-Komplexes *in vitro* notwendig ist, wurden weitere C-terminale Deletionen der Region 103-465 in der Ligationsreaktion eingesetzt. N-terminal weiter verkürzte TPase-Fragmente wurden nicht getestet, da bereits eine Deletion bis Rest 155 zur Folge hat, daß die TPase nicht mehr spezifisch DNA binden kann. Die eingesetzten TPase-Derivate sind in Bild 36 angegeben. Die TPase-Fragmente binden spezifisch an die subterminalen Bindestellen in den Enden des *Ac*-Transposons (Bild 34). Als Negativkontrolle wurde TPase_{His155-250} eingesetzt, die nicht mehr spezifisch DNA bindet (Bild 34).

Bild 36 zeigt, daß alle getesteten TPase-Derivate bis auf TPase_{His136-292} und die Kontrolle TPase_{His155-250} die Ligation der freien *Ds*-Enden fördern. Wird TPase_{His136-292} zu der Reaktion gegeben, werden die Enden des *Ds*-Elements zu DNA-Dimeren ligiert, es entsteht aber nur ein ganz geringer Teil DNA-Trimer (Bild 36). Dieses Protein bildet *in vitro* keine Multimere aus. TPase_{His136-321} fördert die Ligation freier *Ac*-Enden sehr gut. Dazu passt, daß das Protein *in vitro* in geringen Mengen Multimere ausbildet. Somit scheint zwischen den Resten 293 und 321 ein für die *in vitro*-Ligation essentieller Teil der TPase-Interaktionsfunktion zu liegen. Auffallend ist, daß gerade diese Region zwischen verschiedenen Transposasen der *hAT*-Elemente hochkonserviert ist (Bild 27). TPase_{His103-292} kann die Ligation wiederum durch die Anwesenheit der PQ-Domäne fördern, die an Proteininteraktionen beteiligt ist. Das gleiche gilt für TPase_{His103-250}. Die Negativkontrolle TPase_{His155-250}, die nicht mehr spezifisch DNA bindet, vermag die Ligation wie erwartet nicht zu fördern.

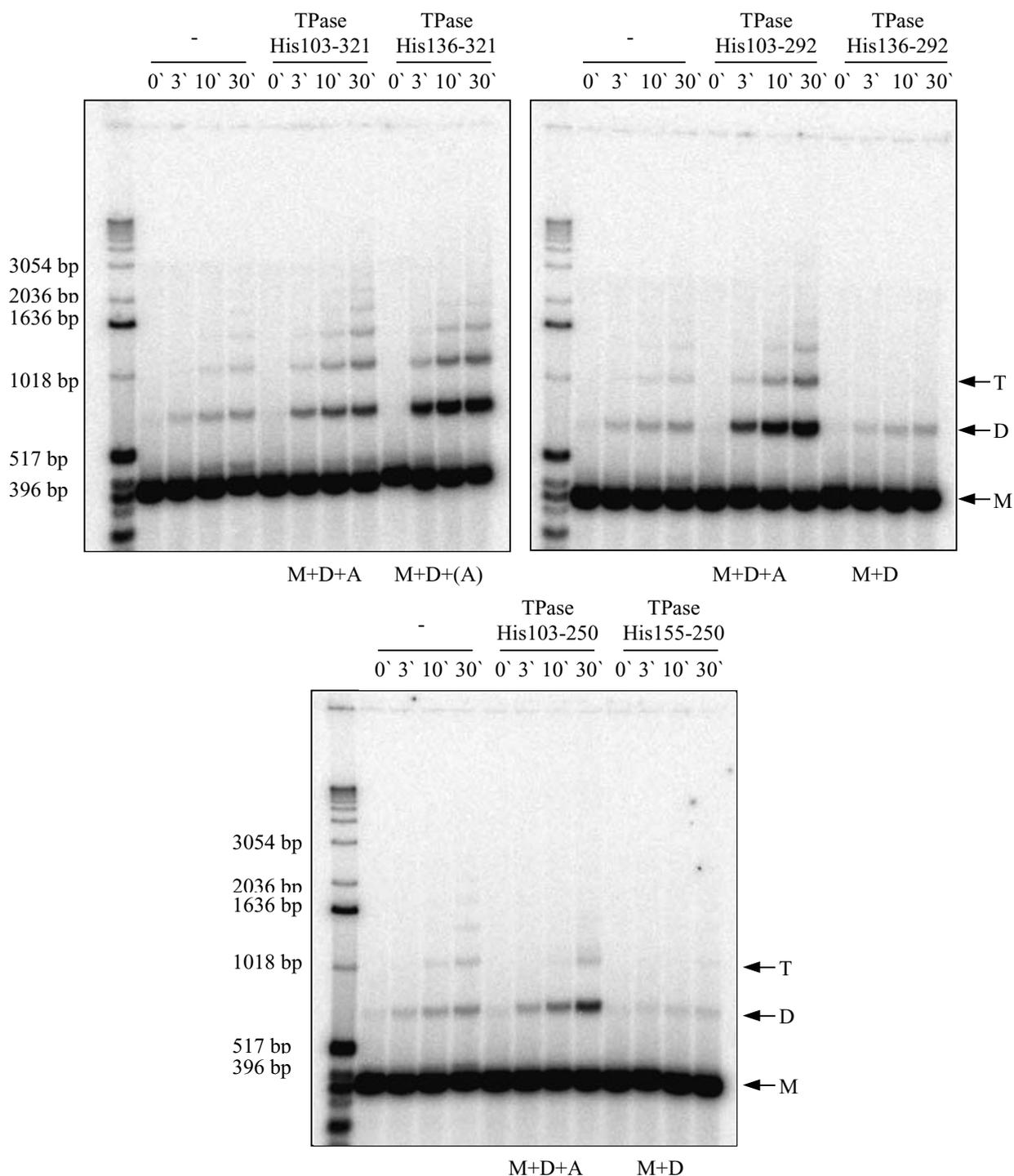


Bild 36: Verschiedene Deletionsderivate der Oligomerisierungsdomäne zeigen ein unterschiedliches Verhalten in der TPase-vermittelten Ligation freier Transposonenden. Die TPase vermittelte Ligation wurde wie in Bild 35 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die Ligationsprodukte auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt (1x TTE). Das Gel wurde auf DE81-Cellulosepapier getrocknet. Die Auswertung erfolgte mit einem Phosphorimager STORM840[®]. -: Reaktion ohne TPase. Bei den übrigen Reaktionen wurde die jeweils angegebene deletierte TPase vor der Ligase zur Reaktion gegeben. M+D+A: Das TPase-Fragment liegt in der SDS-PAGE als Monomer, Dimer und aggregiert vor. M+D: Das TPase-Fragment liegt in der SDS-PAGE als Monomer und Dimer vor (siehe auch Tabelle 2).

Die Transposition wird *in vivo* unterbunden, wenn das Transposon zwei gleiche Enden enthält. Es wird postuliert, daß der Aufbau und die Stabilität des Transpososoms *in vivo* von der Anordnung der subterminalen Bindestellen in den Transposonenden abhängig ist. Diese ist unterschiedlich für das 3`- bzw. 5`-Ende (Coupland *et al.*, 1989; Wang und Kunze, 1998). Im weiteren wurde deshalb getestet, ob dieser Effekt auch *in vitro* in der TPase-vermittelten Ligation auftritt. Statt wie bisher gleiche Mengen 5`- bzw. 3`-Ende in der *in vitro*-Reaktion einzusetzen, wurde nun jeweils nur ein Ende des Mini-*Ds*-Elements angeboten.

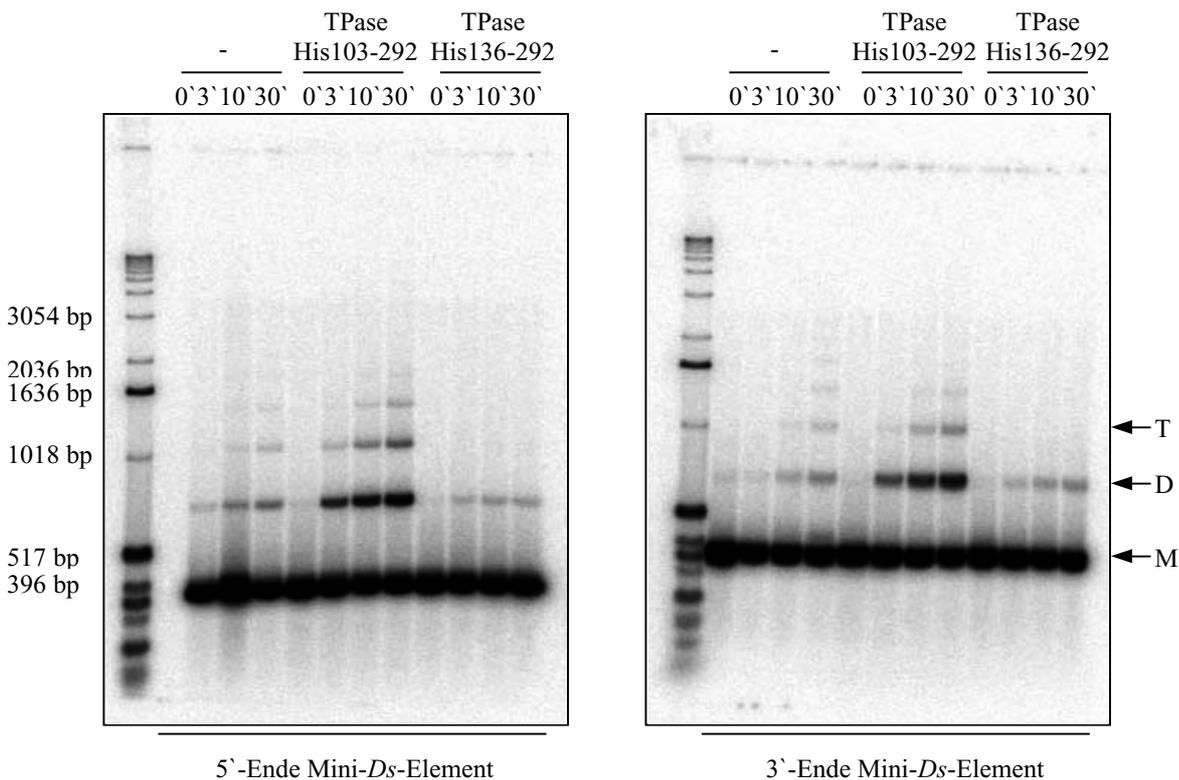


Bild 37: TPase_{His103-292} und TPase_{His136-292} unterscheiden *in vitro* nicht zwischen 5`- und 3`-Ende des Mini-*Ds*-Elements. Die TPase-vermittelte Ligation wurde wie in Bild 35 beschrieben durchgeführt. Die Ligationsprodukte wurden auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt. Das Gel wurde auf DE81-Cellulosepapier getrocknet und exponiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Phosphorimager STORM840®. -: Reaktion ohne TPase, TPase_{His103-292}: vor Zugabe der Ligase wurde TPase_{His103-292} zur Reaktion gegeben, TPase_{His136-292}: vor Zugabe der Ligase wurde TPase_{His136-292} zur Reaktion gegeben.

Bild 37 zeigt das Ergebnis aus der TPase-vermittelten Ligation des 5`- bzw. 3`-Endes des Mini-*Ds*-Elements. Die Ligation der einzelnen Enden wird im gleichen Maße von der TPase_{His103-292} gefördert, wie die Ligation beider Enden des Mini-*Ds*-Elements zusammen. *In vitro* kann die TPase nicht zwischen dem 5`- und dem 3`-Ende des Transposons unterscheiden. In der Ligrationsreaktion wurden freie DNA-Enden in Lösung eingesetzt, so daß die Protein-DNA-Wechselwirkungen flexibler gestaltet werden können als es *in vivo* im

Chromosomenkontext der Fall sein kann. TPase_{His136-292} fördert die Ligation der freien DNA-Fragmente *in vitro* nicht. Dies konnte schon für ein Mini-*Ds*-Enden-Gemisch beobachtet werden (Bild 36).

Bisher wurden in den TPase-vermittelten *in vitro*-Ligationsreaktionen 5'- und 3'-Enden des Mini-*Ds*-Elements verwendet, die an beiden Enden phosphoryliert waren. Die TPase bindet an diesen Enden im 5'-Bereich bzw. im 3'-Bereich, das heißt, daß die äußeren Enden des Transposons über TPase-TPase-Wechselwirkungen räumlich sehr nah zueinander gebracht werden können. Die anderen Enden, die den inneren Teil des Transposons ausmachen, bleiben unbesetzt von Protein und liegen somit im DNA-Protein-Protein-DNA-Komplex relativ frei vor. Wird nur ein Ende der eingesetzten DNA-Fragmente phosphoryliert, so kann angenommen werden, daß die TPase-vermittelte Ligation besser abläuft, wenn es sich dabei um die äußeren Enden des Transposons handelt.

Um dies zu überprüfen wurde das 5'-Ende des Mini-*Ds*-Elements PCR-amplifiziert. Dabei war entweder das 5'-Oligonukleotid oder das 3'-Oligonukleotid radioaktiv markiert. Die PCR-Produkte waren danach am 5'-Ende oder am 3'-Ende phosphoryliert. Wurden diese Substrate in der TPase-vermittelten Ligation eingesetzt, so ergab sich, daß die TPase_{His103-292} *in vitro* nicht unterscheidet, an welchem Ende das Transposon-Fragment phosphoryliert ist (Daten nicht gezeigt). Auch dieser Effekt ist auf die *in vitro*-Situation zurückzuführen, in der freie Transposon-Enden in Lösung verwendet werden und DNA-Protein-Komplexe flexibler aufgebaut werden können als dies *in vivo* der Fall sein kann.

Zusammenfassend haben die Ligationsversuche ergeben, daß die N-terminale Oligomerisierungsdomäne der *Ac*-codierten TPase beim Zusammenbringen der beiden Transposonenden *in vitro* beteiligt ist. Sowohl die PQ-Domäne als auch die Region zwischen den Aminosäuren 293 und 320 spielen beim Aufbau des mutmaßlichen Transpososoms eine Rolle. Die C-terminale Dimerisierungsdomäne spielt dabei *in vitro* keine Rolle. Dies bestätigen Versuche mit der Insertionsmutante TPase_{103-807/709RV}, die dimerisierungsdefizient ist (Essers *et al.*, 2000), aber die Ligation im gleichen Maße fördert wie TPase₁₀₃₋₈₀₇ (Daten nicht gezeigt).

2.7 Untersuchungen zum mutmaßlichen aktiven Zentrum der *Ac*-TPase

2.7.1 Die *Ac*-TPase besitzt innerhalb der Interaktionsdomänen mehrere mutmaßliche DDE-Motive

Einige pro- und eukaryotische Transposasen, die eine nicht-replikative Transposition katalysieren, besitzen als aktives Zentrum ein sogenanntes DDE-Motiv, das divalente Metallionen koordiniert. Das katalytische Zentrum der *Ac*-TPase, die ebenfalls die Transposition nach dem „cut-and-paste“ Mechanismus vermittelt, ist bisher nicht charakterisiert worden. Daher wurde untersucht, ob die Aminosäuresequenz der *Ac*-TPase ein entsprechendes Motiv enthält. Die Aminosäuresequenz der TPase wurde zunächst nach Glutaminsäureresten (E) durchsucht. Da bekannt ist, daß in vielen DDE-Motiven der Abstand zwischen der zweiten Asparaginsäure (D) und der Glutaminsäure ungefähr 35 Aminosäuren beträgt, wurden nur jene E's weiter beachtet, bei denen N-terminal in ungefähr diesem Abstand ein D vorlag. Das erste D wurde über einen Sequenzvergleich mit der HIV-1 Integrase und der RSV Integrase ermittelt (Bild 38). Hier ist der Abstand zwischen den beiden Asparaginsäuren 57 Aminosäuren (Kulkosky *et al.*, 1992). Somit ergaben sich für die *Ac*-TPase zwei mögliche DDE-Motive: D₁₅₇D₂₁₄E₂₄₉ und D₆₅₀D₇₀₇E₇₄₂. Durch einen Sequenzvergleich mit der Transposase von Tc3 (Bild 38), bei der zwischen den beiden Asparaginsäuren 87 Aminosäuren liegen (Doak *et al.*, 1994), ergab sich ein drittes mutmaßliches DDE-Motiv für die *Ac*-TPase: D₂₁₄D₃₀₁E₃₃₆.

Zwischen den verschiedenen Transposasen bzw. Integrasen und der *Ac*-TPase sind nicht nur die genannten Reste konserviert. Insbesondere für das C-terminale Motiv, das innerhalb der Dimerisierungsdomäne liegt, ergeben sich im Vergleich mit Integrasen weitere konservierte Reste in dieser Region (Bild 38). Lysin₇₄₈ (K₇₄₈) der *Ac*-TPase ist dabei sowohl unter den bakteriellen Transposase Tn3, Tn10 und Tn903 wie auch den Integrasen von HIV und RSV hochkonserviert. Unter den Integrasen der Retroviren und Transposasen der Retrotransposons ist an der *Ac*-TPase-Position 714 ein Serin hochkonserviert. Dies gilt auch bei einem Sequenzvergleich mit dem menschlichen Protein RAG1, für das ebenfalls ein DDE-Motiv als aktives Zentrum postuliert wird (Kim *et al.*, 1999). Dieses Protein ist an der V(D)J-Rekombination beteiligt, die nach dem Mechanismus der nicht-replikativen Transposition abläuft (Agrawal *et al.*, 1998).

```

RSV-IN  PLQIQWQDFTLPRMAFRSWLAVTV..I AVLGRPKAIKTDNGSCFTSKSTREW LARWGI AHTTGIPGNSOQOAMVERANRLK D
HIV-IN  SPGIWQLDCTHLEGGVILVAVHVAS..L AGRWPVKTVHTDNGSNFTSTTVKAACEWGGIKQEF GIPYNPQSQGVIESMNKELK K
Tn3     PNQKWAGDITYLRTDEGWLYLAVVI..R RKRPRNVIVHTDRGGQYCSADYQAQLKRHNL RGSMSAKGCCYDNACVESFFHSLK V
Copia   PLFVVHSDVCGPITPVTLDKKNYFV..A HFNLKVVYLYIDNGREYLSNEMRQFCVKKGISYHLTVPHTPQLNGVSERMIR TITE
Tf1     PWESLSMDFITALPESSGYNALLV..I AYFGNPKKIIADNDHIFTSQTWKDFAHKYNFVMKFSLPYRPQTDGQTERNOTVE K
RAG1    VVVKESCDMGMDVSEKHGSGPVVPE..R TFKFIFRGTGYDEKLVREVEG..K TLAHVPEI IERDGSIGAWASEGNE SGNKLFRR
Tn10    TMPIVLVDWSDIREQKRLMVLRA SV..I LPSNTPPLIVSDAGFKVPWYK..A TNLPVEIRTPKQLVNIY SKRMQIEETFRDLK S
Tn903   EIAHLVIDSTGLKVFGEWVKKKH..R QTHRKIRAASADGAYDTRLCH..A NQRMTGSNARWKT TDYNRRSIAETAMYRVK Q
Tc3     WSKVVFSDKKFNLDGPDGCYRYWR..R HYSRKDFRFQODNATHVSN S TRDYFKLKKINLLDWPARS PDLNPIENLWGI LVR
Ac640-750 TLMENEDDEFQNYLHELKDYDQVES..V AEYPILTQIARDVLAIQVSTVASES AFSAGGRVDPYR.N RLGSEIVE.A LICTKD
Ac147-260 KEIEVEVDGKKYVQVWGHCFNCK..Q LCLKSERDHGKDINLIEPYKYD.E VVSLKKLHLAIIMHEYPFNIVEHE YFVEFVKS
Ac200-350 LCLKSEKDHGKDNLIEPYKYDEVV..L KDVQSRFSTMDMWTSCQNKS YMCVTIHWIDDDWCLQKRIVGFFH.V EGRHTGQRL

```

Bild 38: Sequenzvergleich mutmaßlicher DD(35)E-Motive der *Ac*-TPase mit bereits charakterisierten DDE-Motiven von Integrasen von Retroviren, Transposasen von Retrotransposons sowie bakterieller IS-Elemente. Die mutmaßlichen DDE-Motive der *Ac*-TPase befinden sich in den Regionen 147-260, 200-350 und 640-750. Konservierte Aminosäuren unter den bereits charakterisierten DDE-Motiven sind grau hinterlegt. Das DDE-Motiv ist dunkelgrau hinterlegt. Aminosäuren, die zwischen der *Ac*-TPase und mindestens einem weiteren Protein mit DDE-Motiv konserviert sind, sind fett geschrieben. Accession numbers: RSV-IN - 7245504; HIV-IN - 3660033; Tn3 - TQEC13; Copia - OFFFCP; Tf1 - A36373; RAG1 - P15918; Tn10 - NP 052934; Tn903 - TQEC93; Tc3 - AAF99976.

2.7.2 Effekte von Aminosäureaustauschen innerhalb der mutmaßlichen DDE-Motive auf die *in vivo*-Aktivität der TPase

Bei Untersuchungen zu den DDE-Motiven der Integrasen von HIV und RSV ergab sich, daß ein Austausch einer der drei Reste gegen Alanin zu einem *in vitro*-Funktionsverlust der Proteine führt (Kulkosky *et al.*, 1992). In Anlehnung daran wurden zunächst die *Ac*-TPase-Reste E₂₄₉, E₃₃₆ und E₇₄₂ gegen Alanin ausgetauscht. Dies geschah wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben mit Hilfe von Mutageneseprimern.

Für den Aktivitätstest der TPase wurde ein neu entwickeltes *in vivo*-Hefesystem gewählt (Weil und Kunze, 2000), das gegenüber dem bisher verwendeten Petuniensystem verschiedene Vorteile hat. So können viele unabhängige Mutanten parallel untersucht werden. Außerdem ist die Quantifizierung der Transpositionsergebnisse leichter. Zudem ist dieses System weniger anfällig gegenüber verschiedenen Einflüssen von außen. Die TPase-Derivate wurden mit dem Vektor pWL79 unter der Kontrolle des induzierbaren Promotors GAL10 exprimiert (Bild 39).

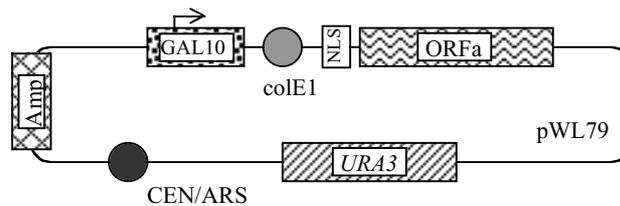


Bild 39: Schematische Darstellung des Hefe-TPase₁₀₃₋₈₀₇-Expressionsvektors pWL79. Die Expression der TPase steht unter der Kontrolle des induzierbaren GAL10-Promotors. Die TPase wird als Fusionsprotein mit dem Gal4-Kernlokalisierungssignal (NLS) exprimiert. Zur Selektion in Hefe trägt das CEN/ARS-Plasmid (Replikationsursprung für Hefe) ein *URA3*-Gen. Die Selektion in *E. coli* verläuft mit Ampicillin (Amp), dazu trägt pWL79 einen *coIE1*-Replikationsursprung.

Die verwendeten Hefestämme CWY1 und CWY2 (Weil und Kunze, 2000) enthalten eine chromosomale Insertion eines nicht-autonomen *Ds*-Elements im *ADE2*-Gen. Durch die Insertion ist die Adenin-Synthese gestört, die Zellen sind *ade2*. Bei CWY1 befindet sich die Insertion im offenen Leserahmen des Gens. Bei CWY2 liegt das *Ds*-Element in der nicht-translatierten Region des Adeningens. Wird in *trans Ac*-TPase exprimiert, so wird das *Ds*-Element ausgeschnitten. Die Reversionsfrequenz kann auf Ade⁻-Medium gemessen werden.

Für die TPase-Mutanten E249A und E336A ergab der Aminosäureaustausch eine im Vergleich zur WT-TPase hyperaktive Mutante (280% bzw. 309% in CWY1, Bild 40, schwarze Reihe). Die Mutation E742A reduzierte die Transpositionsfrequenz auf 8% WT-Aktivität (Bild 40). Aufgrund dieser Ergebnisse kann ausgeschlossen werden, daß E₂₄₉ und E₃₃₆ für die katalytische Reaktion essentielle Reste darstellen (zur Hyperaktivität siehe 2.8).

Um zu überprüfen, ob E₇₄₂ ein Teil eines mutmaßlichen DDE-Motivs sein kann, wurden die Reste D₆₅₀ und D₇₀₇ gegen Alanin ausgetauscht. Zusätzlich wurden die unter den Integrasen von HIV und RSV konservierten Reste Serin₇₁₄ (S₇₁₄) und Lysin₇₄₈ (K₇₄₈) gegen Alanin vertauscht. Dies führte bei den Integrasen zu einem sechs- bzw. zehnfachem Aktivitätsverlust *in vitro* (Kulkosky *et al.*, 1992).

Die TPase-Mutanten D650A und D707A waren im *in vivo*-Hefesystem genauso aktiv wie die WT-TPase (Bild 40, schwarze Reihe). Diese Reste sind somit ein nicht-essentieller Teil des mutmaßlichen aktiven Zentrums. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß andere Asparaginsäurereste in dieser Region mit E₇₄₂ ein DDE-Motiv bilden. Die Mutanten S714A und K748A zeigten jedoch ebenfalls eine kaum veränderte WT-Aktivität (Bild 40, schwarze Reihe). Allerdings ist die Konservierung unter verschiedenen DDE-Motiven nur moderat. Beispielsweise liegen an entsprechenden Positionen der bakteriellen Transposase von Tn10 ein Tryptophan bzw. ein Arginin vor (Bild 38).

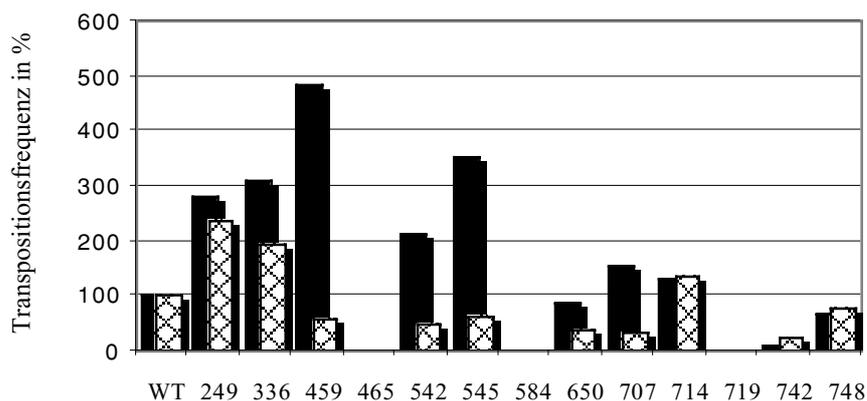


Bild 40: Aktivitäten der TPase-Mutanten in den Hefestämmen CWY1 und CWY2. Die durchschnittliche Aktivität der TPase-Mutanten *in vivo* wurde jeweils relativ zur Aktivität der WT-TPase ermittelt. Die Durchschnittswerte stammen aus einem bis vier Experimenten mit jeweils drei bis vier unabhängigen Transformanten. 11 ml SGAL-Medium +His/+Ade wurden mit einer Einzelkolonie angeimpft und 4 Tage bei 28°C inkubiert. Dann wurden 5 ml Kultur abgenommen, zentrifugiert und gewaschen. Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl wurden Verdünnungen auf Vollmedium (YPD) ausplattiert. Das restliche Kulturvolumen wurde auf SGal-Medium +His/-Ade ausplattiert und 4 Wochen bei 28°C inkubiert. Zur Bestimmung der Reversionsfrequenz wurden Ade⁺-Kolonien ausgezählt und die Anzahl durch die Lebendkeimzahl geteilt. Die WT-Reversionsfrequenz wurde dann auf 100% festgelegt. WT: TPase₁₀₃₋₈₀₇ (pWL79); 249: pWL79-TPase_{103-807/E249A}; 336: pWL79-TPase_{103-807/E336A}; 459: pWL79-TPase_{103-807/D459A}; 542: pWL79-TPase_{103-807/D542A}; 545: pWL79-TPase_{103-807/D545A}; 650: pWL79-TPase_{103-807/D650A}; 707: pWL79-TPase_{103-807/D707A}; 714: pWL79-TPase_{103-807/S714A}; 719: pWL79-TPase_{103-807/E719A}; 742: pWL79-TPase_{103-807/E742A}; 748: pWL79-TPase_{103-807/K748A}. In schwarz der Hefestamm CWY1, schraffiert der Hefestamm CWY2.

Im weiteren Verlauf konnte in Zusammenarbeit mit Clifford Weil (Universität Idaho, „Center for Reproductive Biology“) ein weiteres mutmaßliches DDE-Motiv durch Strukturvergleich der *Ac*-TPase mit RAG1 ermittelt werden: D₄₅₉D_{542/545}E₇₁₉ bzw. N₄₆₅D₅₈₄E₇₁₉. Beim Vergleich der Sekundärstrukturen der beiden Proteine liegen diese Reste an Positionen, die das DDE-Motiv in RAG1 einnimmt (C. Weil, persönliche Mitteilung).

Die genannten Reste der *Ac*-TPase wurden gegen Alanin ausgetauscht und die Mutanten auf ihre Funktionalität im Hefestamm CWY1 getestet. TPase_{N465A} und TPase_{D584A} wurden von Clifford Weil auf ihre Aktivität *in vivo* unter den gleichen Bedingungen getestet wie die übrigen Mutanten. Es stellte sich heraus, daß diese Mutationen zu einem totalen Aktivitätsverlust der TPase *in vivo* führen (C. Weil, persönliche Mitteilung). TPase_{E719A} zeigte nur noch 0,6% WT-Aktivität (Bild 40). Die Mutanten TPase_{D459A}, TPase_{D542A} und TPase_{D545A} waren aktiver als die WT-TPase (484%, 213% bzw. 353% relativ zur WT-TPase, Bild 40, schwarze Reihe). Als mutmaßliche essentielle Reste des aktiven Zentrums konnten somit die Reste N₄₆₅, D₅₈₄ und E₇₁₉ identifiziert werden. Die übrigen ausgewählten Asparaginsäuren sind nicht essentiell. Ein NDE-Motiv als aktives Zentrum einer Transposase oder Integrase wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß mit

dem Rest N465 eine andere essentielle Funktion der *Ac*-TPase getroffen und die zweite Asparaginsäure des mutmaßlichen DDE-Motivs noch nicht identifiziert wurde.

Die Transpositionsfrequenz der genannten Mutanten wurde anschließend im Hefestamm CWY2 ermittelt. Da hier die *Ds*-Element Insertion in der untranslatierten Region des Adenings liegt und die Translation nicht vollständig unterbunden ist, kommt es zu einer hohen Anzahl an Ade⁺-Hintergrund-Kolonien. Diese macht 10% der Ade⁺-Kolonien aus, die nach der Expression von TPase gezählt werden können. Die angegebenen prozentualen Transpositionsfrequenzen sind um diesen Wert korrigiert (Bild 40, schraffierte Reihe).

Die Mutanten TPase_{E249A}, TPase_{E336A}, TPase_{S714A}, TPase_{E742A} und TPase_{K748A} zeigten in CWY2 ungefähr die gleiche Aktivität relativ zur WT-TPase wie sie in CWY1 gemessen wurde. Erstaunlicherweise ergab sich, daß die in CWY1 hyperaktiven Mutanten TPase_{D459A}, TPase_{D542A} und TPase_{D545A} in CWY2 eine geringere Aktivität zeigten als die WT-TPase (60%, 47% bzw. 62%). Die Mutationen D650A und D707A, die in CWY1 keine Auswirkungen auf die TPase-Aktivität hatten, setzen in CWY2 die Transpositionsfrequenz herab (43% bzw. 39%). Die in CWY1 inaktive TPase_{E719A} (0% Aktivität) unterdrückt in CWY2 die Hintergrundexpression des Adenings (Bild 40, schraffierte Reihe, dieser Wert wurde nicht korrigiert, um keine negative Aktivität zu erhalten).

Das unterschiedliche Verhalten einiger TPase-Mutanten in den zwei Hefestämmen ist erstaunlich. Möglicherweise betreffen die Mutationen D459A, D542A und D545A eine andere Funktion der TPase als die Aminosäureaustausche E249A und E336A. Die inaktive TPase_{E719A} könnte die Hintergrundexpression dadurch unterdrücken, daß sie zwar an die Enden des *Ds*-Elements bindet, es aber nicht auszuschneiden vermag. Dadurch muß es zur Behinderung der Hintergrundtranskription kommen.

Die Expression der TPase-Derivate wurde im Westernblot nachgewiesen. Die Hefestämme CWY1 und CWY2 zeigen die gleichen Expressionsraten der jeweiligen Proteine (Daten nicht gezeigt). Die verschiedenen Transpositionsfrequenzen sind somit nicht auf eine unterschiedliche Expression der Proteine zurückzuführen.

Diese Experimente lassen keinen eindeutigen Schluß zu, ob die *Ac*-TPase ein DDE-Motiv als aktives Zentrum enthält, das mit der C-terminalen Dimerisierungsdomäne überlappt. Die Glutaminsäurereste E₇₁₉ oder E₇₄₂ könnten an einem solchen Motiv beteiligt sein. Eine beteiligte Asparaginsäure könnte D584 sein. Die Rolle von N465 in einem aktiven Zentrum bleibt jedoch Spekulation.

2.8 Hyperaktive TPase-Mutanten

2.8.1 Doppel- und Vierfachmutanten zeigen eine erhöhte TPase-Aktivität in Hefe

Mit den Mutationen E249A, E336A, D459A, D542A und D545A ist es zum ersten Mal gelungen, durch einfache Aminosäureaustausche hyperaktive TPase-Mutanten zu erzeugen. Die *Ac*-TPase unterliegt *in vivo* einer negativen Autoregulation, das heißt, daß bei hoher TPase-Konzentration in der Zelle die Transpositionsfrequenz zurückgeht (Scofield *et al.*, 1993). Dies wird wahrscheinlich durch Autoaggregation der TPase-Proteine bewirkt (Heinlein *et al.*, 1994). Wird diese Regulation gestört, könnten hyperaktive Mutanten entstehen. Die genannten Mutationen liegen in der oder benachbart zur Oligomerisierungsdomäne und könnten somit TPase-Interaktionen beeinflussen.

Der Hefeexpressionsvektor pWL79 ergibt durch den GAL10-Promotor eine so hohe Expression der TPase, daß die Transpositionsfrequenz negativ beeinflusst wird (Weil und Kunze, 2000). Ein Defekt in der Autoregulation könnte deshalb die Transpositionsfrequenz deutlich erhöhen. Bei verringerter TPase-Expression sollte dieser Effekt nicht mehr so dramatisch ausfallen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die bei Expression mit pWL79 hyperaktiven Mutanten in den Vektor pWL80 umklontiert. Hier steht die Expression der TPase unter der Kontrolle des schwächeren GALS-Promotors (Weil und Kunze, 2000). Die Transpositionsfrequenz wurde im Hefestamm CWY1 ermittelt (Bild 41).

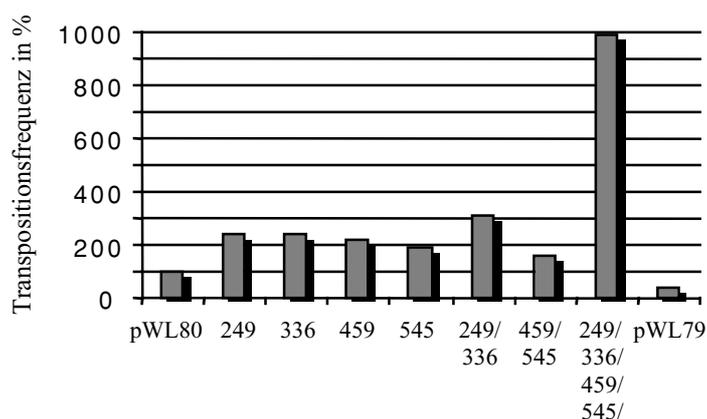


Bild 41: Transpositionsfrequenz der hyperaktiven TPase-Mutanten bei geringer Expressionsrate. Die durchschnittliche Aktivität der TPase-Mutanten *in vivo* wurde jeweils relativ zur Aktivität der WT-TPase ermittelt. Die Durchschnittswerte stammen im Falle der Einzelmutanten aus zwei, im Fall der Mehrfachmutanten aus einem Experiment(en) mit jeweils drei bis vier unabhängigen Transformanten. Die Reversionsfrequenzen wurden wie in Bild 40 beschrieben bestimmt. Die WT-Reversionsfrequenz (pWL80) wurde dann auf 100% festgelegt. pWL80: TPase₁₀₃₋₈₀₇ (pWL80, geringe TPase-Expressionsrate); 249: pWL80-TPase_{103-807/E249A}; 336: pWL80-TPase_{103-807/E336A}; 459: pWL80-TPase_{103-807/D459A}; 545: pWL80-TPase_{103-807/D545A}; 249/336: pWL80-TPase_{103-807/E249A/E336A}; 459/545: pWL80-TPase_{103-807/D459A/D545A}; 249/336/459/545: pWL80-TPase_{103-807/E249A/E336A/D459A/D545A}; 719: pWL79-TPase_{103-807/E719A}; pWL79: pWL79-TPase₁₀₃₋₈₀₇ (pWL79; hohe Expressionsrate). Der verwendete Hefestamm war CWY1.

Eine geringe Expressionsrate der TPase (pWL80) ergab wie erwartet eine deutlich höhere Transpositionsrate als bei hoher TPase-Konzentration in der Zelle (pWL79) erreicht wird. Die genannten Mutanten waren auch bei geringer Expression aktiver als die WT-TPase. Die Steigerung war im Vergleich zum jeweiligen WT-Protein für pWL80 jedoch geringer als für pWL79, was die Annahme bestätigt, daß die Mutationen die Autoregulation der TPase betreffen könnten.

Im weiteren stellte sich die Frage, ob Doppelmutanten oder eine Vierfachmutante noch höhere Reversionsfrequenzen zeigen können. Dazu wurden folgende mutante TPasen hergestellt: TPase_{E249A/E336A}, TPase_{D459A/D545A} und TPase_{E249A/E336A/D459A/D545A}. Die Expression erfolgte mit pWL80 in CWY1. Die Aktivität der Doppelmutante TPase_{E249A/E336A} ist gegenüber den Einfachmutanten leicht erhöht, während die Doppelmutation D459A/D545A nicht zu einer höheren Aktivität der TPase im Vergleich zu den Einzelmutanten führt (Bild 41). Die Vierfachmutante zeigt jedoch eine wesentlich höhere Aktivität als die beiden Doppelmutanten. Außerdem ist auffällig, daß diese Mutante viel schneller zu Ade⁺-revertanten Hefezellen führt als dies durch Expression der WT-TPase möglich war. Die Auswertung erfolgte hier bereits nach einer Woche statt wie sonst nach vier Wochen.

Da drei der vier betroffenen Aminosäuren innerhalb der Oligomerisierungsdomäne liegen, beeinflussen die Mutationen möglicherweise die TPase-TPase-Interaktionen der als Oligomer aktiven TPase und/oder unterbinden die Autoregulation der TPase.

2.8.2 Die Hyperaktivität der TPase-Mutanten kann auch in Petunienprotoplasten gezeigt werden

Die *Ac*-TPase ist in *S. cerevisiae* in der Lage, ein nicht-autonomes *Ds*-Element auszuschneiden (Weil und Kunze, 2000). Das Hefe-System ist ein neuartiger Assay zur Analyse der *Ac*-Transposition und bisher ist noch nicht untersucht worden, ob Ergebnisse aus dem Hefesystem auf ein pflanzliches System übertragbar sind. Aus diesem Grund wurden die hyperaktiven TPase-Mutanten in Petunienprotoplasten getestet. Analog zu den Hefexperimenten wurden die Transposase-Derivate stark (pcATG10) bzw. schwach (pcATG3-10) exprimiert. Als weitere Kontrolle wurden die Mutationen in den Vektor pcATG10-(R733A) eingebracht. Hier trägt die TPase eine Mutation in der Dimerisierungsdomäne. In der Immunfluoreszenz zeigte diese inaktive Mutante ein stark verändertes Aussehen der TPase-Aggregate (2.4.5). Es sollte geklärt werden, ob die überwiegend in der Oligomerisierungsdomäne liegenden Mutationen

einen weiteren Einfluss auf die Architektur der TPase_{R733A}-Aggregate haben. Die mit Hilfe von Mutageneseprimern eingebrachten Punktmutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt. Tabelle 3 zeigt zum einen die absoluten Aktivitäten der TPase-Mutanten sowie die prozentualen Aktivitäten bezogen auf 100% WT-Aktivität. Die TPase-Expression wurde in allen Fällen im Westernblot nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Bei geringer Expression (pcATG3-10) bestätigt sich die Hyperaktivität in den Pflanzenzellen. Eine Ausnahme bildet TPase_{E336A}, die eine etwas geringere Aktivität als die WT-TPase zeigt. Doppel- und Vierfachmutanten sind aktiver als die WT-TPase, zeigen aber eine geringere Transpositions-frequenz als die Einfachmutanten (Tabelle 3). Dies war in *S. cerevisiae* nur für die Doppelmutante TPase_{D459A/D545A} der Fall.

Tabelle 3: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Petunientransfektionen. Die in *S. cerevisiae* hyperaktiven Mutanten zeigen in Petunienprotoplasten abhängig von der Expressionsstärke unterschiedliche Aktivitäten. Die Vektoren pcATG3-10 und pcATG10 exprimieren jeweils TPase₁₀₃₋₈₀₇. Die Expression ist im ersten Fall schwach, im zweiten stark. Die *in vivo*-Aktivitäten der jeweiligen Mutanten sind in absoluten Zahlen pro 40000 Protoplasten und in % WT-Aktivität angegeben, die auf 100% festgesetzt wurde. Die Angaben sind Durchschnittswerte aus 2 unabhängigen Transfektionen.

	pcATG3-10	pcATG10
TPase _{E249A}	128 (853%)	256 (107%)
TPase _{E336A}	29 (85%)	100 (42%)
TPase _{D459A}	150 (1000%)	181 (76%)
TPase _{D545A}	264 (1760%)	238 (100%)
TPase _{E249A/E336A}	283 (1011%)	442 (149%)
TPase _{D459A/D545A}	140 (498%)	83 (28%)
TPase _{E249A/E336A/D459A/D545A}	140 (500%)	162 (55%)
WT-TPase	15 (100%)	239 (100%)

Werden die Mutanten in Petunienprotoplasten stark exprimiert, so steigt die Aktivität kaum über die WT-Aktivität. In einigen Fällen (E336A, D459A/D545A und E249A/E336A/D459A/D545A) liegt die Transpositions-frequenz sogar darunter (Tabelle 3). Werden die genannten Mutationen in die inaktive TPase_{R733A} eingeführt, so läßt sich wie erwartet keine Transposition messen.

Das unterschiedliche Verhalten der Mutanten bei verschiedenen Expressionsstärken läßt sich am besten damit erklären, daß das Petuniensystem durch eine begrenzte Transfektionsrate ausgelastet zu sein scheint. In diesen Experimenten betrug diese etwa 5% von 10⁶ eingesetzten

Protoplasten. Detektierbare Transposition findet bei starker Expression der WT-TPase in 15-20% der transfizierten Zellen statt, das entspricht etwa 300 bis 400 GUS-positiven pro 40000 getesteten Protoplasten. Diese Effizienz konnte nie gesteigert werden und entspricht wahrscheinlich einem Grenzwert. Damit entspricht die Aktivität der WT-TPase (pcATG) etwa der Transpositionsfrequenz der hyperaktiven Mutanten bei geringer Expression (pcATG3-10). Die Hyperaktivität einer stark exprimierten TPase bei hoher Expression (pcATG10) wäre daher nicht meßbar.

2.8.3 Hyperaktive Mutanten sind nur begrenzt in der Aggregatbildung gestört

Da die Mutationen, die teilweise zu Hyperaktivität führen, im Bereich der Oligomerisierungsdomäne liegen, könnten sie einen Einfluss auf die Aggregatbildung *in vivo* haben. Dies wurde mit Hilfe von Immunfluoreszenz untersucht. Die TPase der mit pcATG3-10 transfizierten Protoplasten ist dabei nicht nachweisbar, da die Expression zu gering ist. Bei hoher Expression (pcATG10) verändert sich das Aussehen der TPase-Aggregate im Vergleich zur WT-TPase durch die eingefügten Mutationen nicht. Ein anderes Bild ergibt sich, wenn die Mutationen zusätzlich in TPase_{R733A} eingeführt werden. TPase_{R733A}, die eine Mutation in der Dimerisierungsdomäne trägt, zeigt *in vivo* kristallartige Aggregate (Bild 26 und Bild 42). Die zusätzlichen Mutationen E336A, D459A und D545A ergeben das gleiche Bild, während TPase_{E249A/R733A} keine kristallartigen Aggregate mehr ausbildet (Bild 42). Dasselbe gilt für die Mutanten TPase_{E249A/E336A/R733A} und TPase_{E249A/E336A/D459A/D545A/R733A}. Hier ist die Aggregation der TPase zu hochmolekularen Strukturen vollständig unterbunden (Bild 42).

Die N-terminale Region der TPase um die Aminosäure E249 ist damit zusammen mit der Dimerisierungsdomäne an der Aggregatbildung *in vivo* beteiligt. Dies kann aber nur bei schon gestörter Proteininteraktion gezeigt werden. Die Hyperaktivität scheint somit wenigstens im Fall von TPase_{E249A} auf eine gestörte Autoregulation zurückzuführen sein. Möglicherweise bleibt das Protein im WT-Hintergrund durch die eingeführte Mutation länger in Lösung, was zu Hyperaktivität führen könnte, wenn auch die Aggregation der TPase prinzipiell noch stattfinden kann.

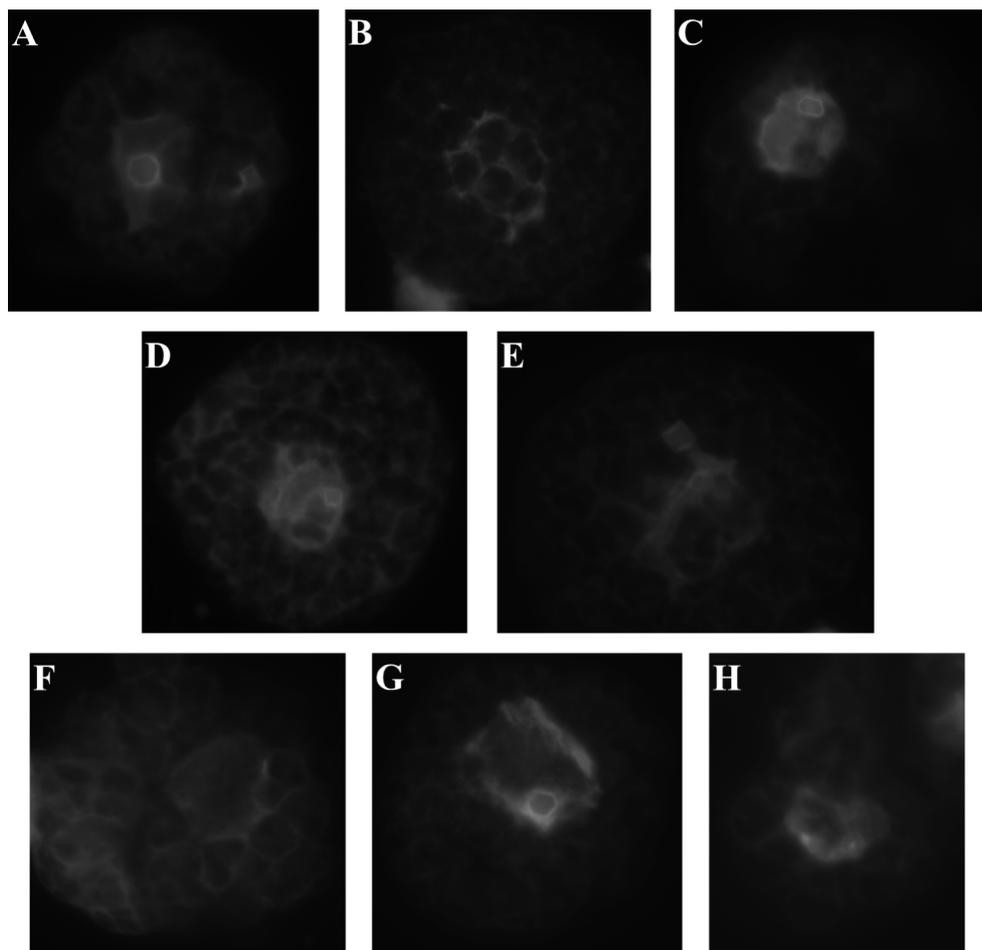


Bild 42: Immunfluoreszenz von TPase-Mutanten-exprimierenden Petunienprotoplasten. Die zusätzliche Mutation E249A in TPase_{R733A} führt dazu, daß die TPase keine Aggregate mehr ausbilden kann. Der Nachweis der TPase erfolgte mit anti-TPase-Antikörper („anti-10.ATG“). Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt (näheres siehe Material und Methoden). **A:** TPase_{R733A}, **B:** TPase_{E249A/R733A}, **C:** TPase_{E336A/R733A}, **D:** TPase_{D459A/R733A}, **E:** TPase_{D545A/R733A}, **F:** TPase_{E249A/E336A/R733A}, **G:** TPase_{D459A/D545A/R733A}, **H:** TPase_{E249A/E336A/D459A/D545A/R733A}.

3 Diskussion

3.1 *In vitro*-Ac-Transpositionsassays

In bisherigen Arbeiten war es nicht gelungen, mit renaturierter *Ac*-Transposase (TPase) *in vitro* eine endonukleolytische Aktivität des Proteins nachzuweisen. Durch die Expression der TPase in löslicher Form in *E. coli* und die Isolierung löslicher TPase in Kernproteinextrakten aus transgenem Tabak war es zum ersten Mal möglich, nicht-renaturiertes Protein in *in vitro*-Assays einzusetzen. Dabei stellte sich heraus, daß auch diese Präparationen ungeeignet waren, die enzymatische Aktivität der TPase *in vitro* nachzuweisen. Es kann nicht unterschieden werden, ob das Protein selbst in diesen Extrakten inaktiv ist, oder ob die gewählten Puffer- und Reaktionsbedingungen sowie DNA-Substrate eine *in vitro*-Reaktion nicht zulassen.

Für verschiedene pro- und eukaryotische Transposons wurde mit isolierter Transposase ein *in vitro*-System etabliert. Im Unterschied zu Versuchen mit der *Ac*-TPase wurde in den meisten Fällen Protein verwendet, das durch mehrere aufeinanderfolgende Gelfiltrationsschritte gereinigt worden war. Auf diesem Weg konnte die prokaryotische Tn10/IS10-Transposase in monomerischer, aktiver Form gereinigt werden (Chalmers und Kleckner, 1994). Das gleiche gilt für die Transposase des P-Elements aus *D. melanogaster* (Beall und Rio, 1997; Beall und Rio, 1998). Die endonukleolytische Aktivität der HIV-codierten Integrase, die die Integration der doppelsträngigen DNA-Kopie des HI-Virus in die Wirtszell-DNA katalysiert (Donehower und Varmus, 1984; Panganiban und Temin, 1984; Schwartzberg *et al.*, 1984), wurde ebenfalls mit hochgereinigtem Protein *in vitro* nachgewiesen (Sherman und Fyfe, 1990). Die in dieser Arbeit verwendete, lösliche *Ac*-TPase aus transgenem Tabak lag in einem Kernproteinextrakt vor, da dieser auch pflanzliche Proteine enthalten sollte, die möglicherweise während der Transposition *in vivo* eine Rolle spielen. Solche Faktoren könnten am Aufbau der Chromatinstruktur oder an der DNA-Reparatur beteiligte Proteine sein. Andererseits kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, daß der relativ geringe Reinigungsgrad der TPase ein Grund dafür ist, daß *in vitro* keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Reinigung mittels Gelfiltration erwies sich als nicht praktikabel, da die TPase-Konzentration in den vorliegenden Extrakten zu gering und die Verluste pro Reinigungsschritt zu hoch waren. Eine weitere Erklärung und vielleicht der eigentliche Hauptgrund für die Inaktivität der isolierten TPase könnte die hohe Aggregationsbereitschaft des Proteins in Lösung sein, die durch Gelfiltration nachgewiesen wurde und die sich indirekt in der Ausbildung

hochmolekularer DNA-Protein-Komplexe in Gelretardationsexperimenten äußert. *In vivo* wird die TPase bei hoher Expression durch Selbstaggregation inaktiviert (Heinlein *et al.*, 1994). Es könnte also möglich sein, daß ein hoher Proteinanteil in den verwendeten Kernproteinextrakten in inaktiver Form vorliegt. Ist dies der Fall, so kann ein *in vitro*-System erst dann Erfolg haben, wenn es gelingt, den Anteil nicht-aggregierter TPase in der Präparation zu erhöhen.

Auch bei anderen Transposons wurde die Isolierung der Transposon-codierten Proteine dadurch erschwert, daß sie nicht in ausreichender Menge in löslicher Form zu gewinnen waren. Dies gilt zum Beispiel für die beiden von *En/Spm* codierten Proteine TnpA und TnpD (Gierl *et al.*, 1988; Raina *et al.*, 1998). Zum Nachweis, daß beide Proteine am Aufbau eines synaptischen Komplexes beteiligt sind, wurde nicht weiter gereinigtes TnpD aus Kernproteinextrakten eingesetzt (Raina *et al.*, 1998). *In vitro* konnte bisher noch kein Transpositionssystem etabliert werden. Auch funktionelle Untersuchungen von MURA, der mutmaßlichen Transposase des autonomen *MuDR*-Elements (Eisen *et al.*, 1994), waren zunächst unmöglich, da die cDNA von MURA, *mudrA*, in *E.coli* nicht ohne eine Anhäufung von Punktmutationen und Deletionen zu propagieren war. Erst mit Protein exprimiert in *S. cerevisiae* wurde die DNA-Bindekapazität von MURA nachgewiesen (Benito und Walbot, 1997). Der Nachweis einer endonukleolytischen Aktivität von MURA steht jedoch noch aus.

In einigen Fällen war es erst nach Modifikationen der Transposase möglich, *in vitro* ein Transpositionssystem zu etablieren. Das *in vitro*-System zur Untersuchung des Transpositionsmechanismus des prokaryotischen Transposons Tn5 beruht auf einer hyperaktiven Transposase-Mutante (Wiegand und Reznikoff, 1992; Goryshin und Reznikoff, 1998). Die WT-Transposase von Tn5 zeigt *in vitro* keinerlei Aktivität.

Die Proteine RAG1 und RAG2, die die V(D)J-Rekombination der Immunglobulingene der Säuger nach einem Mechanismus katalysieren, der der „cut-and-paste“-Transposition ähnelt (Agrawal *et al.*, 1998), zeigen bei Überexpression ebenfalls nur eine geringe Löslichkeit (Bailin *et al.*, 1999). *In vitro* konnte die enzymatische Aktivität nur mit verkürzten Versionen von RAG1 und RAG2 nachgewiesen werden, die *in vivo* die gleichen Reaktionen ausführen können wie die vollständigen Proteine (Bailin *et al.*, 1999).

Für die *Ac*-TPase wurden im Verlauf dieser Arbeit neue Mutanten gefunden, die *in vivo* Hyperaktivität zeigen (TPase_{E249A}, TPase_{E336A}, TPase_{D459A} und TPase_{D545A}). Möglicherweise sind diese Proteine, in löslicher Form exprimiert und gereinigt, geeignet, *in vitro* enzymatische Aktivitäten der TPase nachzuweisen. Insbesondere TPase_{E249A} sollte für weitere Versuche ein guter Kandidat sein, da der Aminosäureaustausch E249A dazu führt, daß die Inaktivierung der TPase durch Selbstaggregation eingeschränkt ist (siehe auch 3.9).

3.2 Sind Wirtsfaktoren an der *Ac*-Transposition beteiligt?

Kernproteinextrakte aus untransformierten Tabakpflanzen enthalten ein neues, unbekanntes Protein, das *in vitro* spezifisch an die subterminalen DNA-Bindestellen der *Ac*-TPase bindet. Auch in *Petunia hybrida* liegen ein oder mehrere Faktoren vor, die spezifisch die TPase-Bindestellen binden. Bei diesen Proteinen könnte es sich um bisher noch nicht identifizierte Faktoren handeln, die an der Regulation oder der Transpositionsreaktion selbst beteiligt sind.

In Kernproteinextrakten aus Zellsuspensionen von *Nicotiana glauca* und *Nicotiana glauca*, wurde ein unbekannter Faktor nachgewiesen, der an die subterminalen Enden des *Ac*-Elements bindet (Levy *et al.*, 1996). Die gleichen Sequenzmotive erkennt *in vitro* ein unbekanntes Protein aus Endosperm-Kernproteinextrakten aus *Zea mays* (Becker und Kunze, 1996). In beiden Fällen wurde eindeutig gezeigt, daß diese Proteine andere Sequenzen als die TPase-Bindestellen erkennen. Sie sind somit mit den hier entdeckten Faktoren nicht identisch. Für die Exzision eines nicht-autonomen *Ds1*-Elements ist jedoch die Bindung des Faktors aus *Zea mays* nicht essentiell, wie durch die Mutagenese sämtlicher potentieller Bindestellen in den Enden des Transposons gezeigt wurde (Gorbunova *et al.*, 2000), was die Beteiligung des Proteins an der Transposition fragwürdig macht.

In vitro konkurrieren die in dieser Arbeit entdeckten unbekannt Proteine mit der TPase um die subterminalen Bindestellen im *Ac*-Element und könnten *in vivo* als Repressor funktionieren. Die Bindung der TPase *in vitro* wird aber nicht vollständig unterbunden, wie die Ausbildung eines „Supershifts“ in Gelretardationsversuchen anzeigt. Bestätigt wird dies dadurch, daß *Ac* sowohl in Tabak als auch in *Petunia hybrida* aktiv ist (Hehl und Baker, 1990; Houba-Hérin *et al.*, 1990). Die Transposition könnte alternativ auch durch die Unterdrückung der Transkription der TPase unterbunden werden. Die Bindestellen der TPase liegen in der Nähe des Promotors für das offene Leseraster der TPase (Kunze und Starlinger, 1989). Verschiedene Allele von *Ac* in *Zea mays* sind während der Mais Korn-Entwicklung nicht gleichbleibend aktiv (Fedoroff, 1989; Levy und Walbot, 1990). Möglicherweise wird die Transkription durch einen Wirtsfaktor reguliert, der in verschiedenen Pflanzenstadien unterschiedlich exprimiert wird.

Es ist auch vorstellbar, daß Transposasen endogener *Ac*-ähnlicher Tabak-Transposons die Bindestellen der *Ac*-TPase erkennen. Das Genom von Tabak enthält viele Kopien des autonomen *hAT*-Elements *Slide* (Grappin *et al.*, 1996). Dieses DNA-Element trägt subterminale Sequenzmotive, die identisch sind mit den Bindestellen der *Ac*-TPase im *Ac*-Element in *Zea mays*. Die drei überlappenden offenen Leseraster von *Slide* zeigen darüber

hinaus hohe Homologien zu dem ORFa der *Ac*-TPase. Auch Petunien enthalten DNA-Elemente (*dTph*-Elemente), die aufgrund ihrer 8 bp-Sequenzduplikationen an Insertionsstellen im Genom und der Sequenz der „terminal inverted repeats“ (TIR) der Gruppe der *hAT*-Elemente zugeordnet werden (Gerats *et al.*, 1990; vanHouwelingen *et al.*, 1998).

Da die *Ac*-Transposition in vielen verschiedenen transgenen Pflanzenarten ablaufen kann (Übersicht in: Kunze *et al.*, 1997) und sogar in *S. cerevisiae* ein nicht-autonomes *Ds*-Element *in trans* durch die TPase aktiviert werden kann (Weil und Kunze, 2000), wird ausgeschlossen, daß pflanzliche Wirtsfaktoren eine für die Transposition essentielle Rolle übernehmen. Eine Bestätigung dafür ist, daß die Einfügung verschiedener Mutanten zu einer enormen Steigerung der Transpositionsfrequenz in Hefe und Petunienprotoplasten führt, ohne daß Wirtsfaktoren eine limitierende Rolle einnehmen (siehe dazu auch 3.9).

3.3 TPase bindet DNA als Oligomer

Bei der Größenbestimmung der Proteinaggregate, die die TPase in Lösung bildet, stellte sich heraus, daß der größte Teil der TPase in Komplexen mit einem Molekulargewicht weit über 1000 kDa vorliegt. Monomere TPase wurde nur in äußerst geringen Mengen nachgewiesen. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, daß die TPase *in vivo* ab einer bestimmten Proteinkonzentration in Maisendospermzellen, in transgenen Tabaklinien und in transfizierten Petunienprotoplasten hochmolekulare Aggregate ausbildet (Heinlein *et al.*, 1994; I. Kornacker und R. Kunze, unveröffentlicht). Es wurde gezeigt, daß die TPase *in vitro* die Transposonenden als Monomer und als Oligomer bindet. Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese zum Aufbau des synaptischen Komplexes, der durch mehrere TPase-Untereinheiten zustande kommen soll. Der gleiche Mechanismus zum Aufbau eines Transpososoms wurde für die Transposase (MURA) des *Mutator*-Elements aus *Zea mays* gezeigt. Das Protein bindet wahrscheinlich nicht nur als Monomer, sondern auch als Dimer und Multimer die Zielsequenz an den Enden des Transposons und baut über Proteininteraktionen einen synaptischen Komplex auf (Benito und Walbot, 1997). Für dieses Protein wurde jedoch keine Aggregatbildung beschrieben.

Die Bindung hochmolekularer *Ac*-TPase-Aggregate könnte ebenso zu einer Hemmung der Transposition führen. *In vivo* findet man TPase₁₋₈₀₇-Aggregate fast ausschließlich im oder auf dem Kern (Heinlein *et al.*, 1994), sie könnten die Transposition nicht nur durch Inaktivierung der TPase durch Autoaggregation hemmen, sondern auch, indem Aggregate DNA binden und

so den Aufbau eines funktionellen Transpososoms behindern (zur Autoregulation durch TPase-Aggregation siehe auch 3.6).

3.4 Hochkonservierte Domänen der Ac-TPase enthalten Proteininteraktionsdomänen

3.4.1 Die C-terminale Dimerisierungsdomäne enthält ein Sequenzmotiv, das unter Transposasen der *hAT*-Familie hochkonserviert ist

Zur *hAT*-Familie der transponierbaren Elemente gehören unter anderem Tam3 aus *Antirrhinum majus*, Slide aus Tabak und das Hobo-Element aus *Drosophila melanogaster*. Die Transposasen bzw. mutmaßlichen Transposasen dieser Familie zeichnen sich durch den Besitz dreier hochkonservierter Domänen aus (*hAT*-Domänen 1 bis 3). Die Dimerisierungsdomäne der *Ac*-Transposase entspricht der dritten *hAT*-Domäne, womit zum ersten Mal eine Funktion für einen der konservierten Bereiche geklärt wurde. Das hochkonservierte Sequenzmotiv der Dimerisierungsdomäne WWxxxxxxxPxLxxAxxVLxIxxSxxAxExxFSxxGxxxxxxRNRLxxxx-VxxLx kann als typisches Motiv für *hAT*-Transposasen bezeichnet werden. Es ist anzunehmen, daß diese Domäne in den übrigen Transposasen dieser Familie die gleiche Funktion erfüllt. Dies ist biochemisch bisher jedoch nicht untersucht worden.

Innerhalb der *Ac*-TPase liegt dieses Motiv in einer Region mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für helikale Strukturen, wie sie oft in Proteininteraktionsdomänen gefunden werden. Verschiedene hydrophobe Reste sind hochkonserviert, ein typischer Leucin-Zipper ist jedoch nicht vorhanden. Ein Sequenzmotiv mit einer Wiederholung hydrophober Aminosäuren nach jeweils sieben Resten findet sich im C-terminalen Bereich der Domäne (F722/V729/L736/A743/W750). Dieses Motiv entspricht jedoch nicht einem klassischen Zipper, der die Sequenz LxxJxxx hat, wobei L für Leucin, J für hydrophobe Aminosäuren und x für hydrophile Reste steht (zusammengefaßt in: Lupas, 1996). Die Mutation R733A, die innerhalb der heptamerischen Sequenzwiederholung liegt, unterbindet jedoch *in vitro* die Dimerisierung der Domäne und führt auch *in vivo* zu auffallenden Aggregatveränderungen. Sollte das gefundene Sequenzmotiv eine Funktion in der Proteininteraktion haben, könnte die Mutation einer basischen Aminosäure zu Konformationsänderungen führen, die eine stabile TPase-TPase-Interaktion unmöglich machen. Die Dimerisierung der Domäne ist aber nicht ausschließlich auf dieses Heptamermotiv zurückzuführen, da auch Aminosäureaustausche außerhalb dieser Domäne

dazu führen, daß TPase_{His674-777} *in vitro* nicht mehr dimerisieren kann und *in vivo* TPase₁₀₃₋₈₀₇ inaktiviert wird.

3.4.2 Die Oligomerisierungsdomäne enthält mehrere Motive, die basischen Leucinzippern ähneln

Die Oligomerisierungsdomäne (AS 103-465) weist *in vitro* ein sehr komplexes Muster von Proteininteraktionsreaktionen auf. Die Region umfasst die für die Transposition essentielle PQ-Domäne (siehe dazu 3.5), zwei von drei Kernlokalisierungssignalen, die DNA-Bindedomäne, die vollständige erste *hAT*-Domäne und den N-Terminus der zweiten *hAT*-Domäne. Die Strukturvorhersage für den gesamten Bereich ergibt einen hohen Anteil an helikalen Strukturen. Außerdem ist diese Region stark basisch.

Innerhalb der Domäne wurden zahlreiche Wiederholungen hydrophober Aminosäuren nach jeweils sieben Resten identifiziert. Im weniger konservierten Bereich kommen viele nur einfache Heptamere mit dem Sequenzmotiv JxxJxxx vor und eine dreifache Wiederholung L229/I236/F243. Im hochkonservierten C-Terminus der Domäne finden sich längere Motive: 1) I316/W323/V330/G337/L344/I351, 2) A350/I357/L364/A371, 3) A369/V376/L383/L390/F397, 4) A395/A402/V409/V416 und 5) A410/I417/I424/V431/W438/A445. Keines der Motive entspricht einem klassischen Leucinzipper, der von den Sequenzheptameren LxxJxxx ausgeht. Meistens sind diese Bedingungen nur zum Teil erfüllt (vergleiche Sequenz in Bild 27). Dennoch kann postuliert werden, daß diese Heptamere an TPase-TPase-Interaktionen beteiligt sind. Auch für das Strukturprotein p15-Protein des CaM-Virus wurde eine „coiled coil“-Struktur charakterisiert, die essentiell zur Tetramerisierung des Proteins benötigt wird, aber nicht streng dem Motiv LxxJxxx entspricht. Vielmehr sind hydrophobe Positionen in einigen Fällen anders besetzt (Leclerc *et al.*, 1998).

Wie bei bZip-Proteinen liegen die mutmaßlichen heptameren Zipper der *Ac*-TPase in direkter Nachbarschaft zur basischen DNA-Bindedomäne der TPase (AS 159-206). Dimerisierung der Heptamere könnte dazu führen, daß die DNA-Bindedomäne so positioniert wird, daß sie mit den palindromischen Bindemotiven in den subterminalen Regionen des *Ac/Ds*-Transposons interagieren könnte. Diese Art der DNA-Bindung durch Proteindimere wurde für verschiedene Transkriptionsfaktoren nachgewiesen (Baxevanis und Vinson, 1993). Auch in der prokaryotischen IS911-Transposase wurde ein Leucinzipper neben der DNA-Bindedomäne lokalisiert (Haren *et al.*, 1998).

Der gesamte Bereich der Oligomerisierungsdomäne ist mit heptameren Sequenzwiederholungen abgedeckt, was erklären könnte, warum eine weitere Einschränkung der Region nicht möglich ist. Zieht man in Betracht, daß unter diesen Motiven Unregelmäßigkeiten auftreten (zusammengefaßt in: Lupas, 1996), wie z.B. eine zusätzliche Aminosäure im Motiv, wie bei der DNA-Polymerase I (Motiv abcdefg wird zu abcdeffg), oder das „Fehlen“ von drei Aminosäuren (abcdabcdefg), so wird die Zahl der mutmaßlichen hydrophoben Zipper in der N-terminalen Region noch größer.

Bis auf die Deletion TPase_{His136-191} enthielten alle exprimierten TPase-Derivate mindestens ein Heptamer und/oder die PQ-Domäne, die auch an TPase-Interaktionen beteiligt ist (siehe auch 3.5). Die Expression von TPase_{His136-191} war sehr schwierig, Proteinmonomer und mutmaßlicher Dimer konnten erst nach Ultrafiltration der renaturierten „inclusion bodies“ im Western blot schwach sichtbar gemacht werden. *In vitro* läßt sich für Proteine mit dem ersten mutmaßlichen Zipper (L229/I236/F243) zeigen, daß sie in Anwesenheit der PQ-Domäne multimerisieren, mit deletierter PQ-Domäne aber nur noch Dimere ausbilden. Die Anwesenheit so vieler mutmaßlicher Zipper würde die hohe Aggregationsbereitschaft der TPase erklären. Mehrere Zippermotive führen jedoch nicht automatisch zur Ausbildung von Multimeren, denn es können auch mehrere Heptamer motive an der Ausbildung nur einer Proteininteraktionsdomäne beteiligt sein (Lupas, 1996).

Teile der Oligomerisierungsdomäne überlappen mit der ersten hochkonservierten *hAT*-Domäne (Reste 293-376). In dieser Region finden sich zwei mutmaßliche Zipper, die auch in den anderen Transposasen dieser Familie an Proteininteraktionen beteiligt sein könnten. Diese Region der TPase ist *in vitro* außerdem essentiell am Zusammenbringen (Synapsis) der Transposonenden beteiligt (siehe auch 3.6). TPase_{His136-321} fördert *in vitro* die Ligation freier *Ds*-Enden, TPase_{His136-292} aber nicht mehr.

3.5 Die PQ-Domäne als Proteininteraktionsdomäne

Die *Ac*-Transposase trägt N-terminal eine Prolin-/Glutamin-reiche Domäne, die essentiell für die Transposition ist. *In vitro* stabilisiert diese Region, bestehend aus zehn Wiederholungen des Dipeptids P/Q(E), die oligomerisierte Form der Transposase. *In vivo* wurde gezeigt, daß die Ausbildung von TPase-Aggregaten trotz der Deletion der Domäne (TPase₁₃₆₋₈₀₇) weiterhin in geringem Umfang möglich ist. Lange, filamentartige Aggregate fehlen jedoch ganz, was darauf schließen läßt, daß die PQ-Domäne *in vivo* an der Stabilisierung der inaktiven TPase-

Aggregate beteiligt zu sein scheint. Da die Deletion der Domäne zur Inaktivierung der TPase führt (Kunze *et al.*, 1993), kann davon ausgegangen werden, daß sie nicht nur beim Aufbau der inaktiven Aggregate eine Rolle spielt, sondern auch am Aufbau des Transpososoms beteiligt ist.

In vitro wurde jedoch gezeigt, daß verschiedene Teile der Oligomerisierungsdomäne am Aufbau eines synaptischen Komplexes beteiligt sind. Im Gegensatz zu TPase_{His103-292} kann TPase_{His136-292} die Ligation freier Transposon-Enden *in vitro* nicht fördern. Dies bedeutet, daß die PQ-reiche Domäne an Proteininteraktionen der TPase im Transpososom beteiligt ist. TPase_{His136-321} vermittelt die *in vitro*-Ligation der freien Transposonenden durch die Anwesenheit der Region AS 292-321 (siehe auch 3.4.2). *In vivo* müssen verschiedene Interaktionsdomänen der TPase am Aufbau und der Stabilisierung des synaptischen Komplexes beteiligt sein (siehe auch 3.6). Unter weniger stringenten *in vitro*-Bedingungen, bei denen DNA-Fragmente benutzt werden, könnte es möglich sein, daß schon wenige Proteininteraktionen freie DNA-Enden komplexieren können.

Auch in anderen Proteinen wurden glutaminreiche Domänen als Proteininteraktionsdomänen charakterisiert, die an der Bildung von Aggregaten beteiligt sind. In Hefe wurde gezeigt, daß der Translations-Terminationsfaktor Sup35p über eine glutaminreiche Domäne von einer löslichen, monomeren und aktiven Form in eine inaktive, unlösliche amyloide Fibrillenstruktur umgewandelt wird (DePace *et al.*, 1998). In dieser Interaktionsdomäne liegt jedoch kein Prolinrest vor.

Anders sieht es im Fall des menschlichen Huntingtin-Proteins aus. Die autosomal dominante Erbkrankheit Chorea Huntington ist auf eine Verlängerung eines Poly(CAG)-Motivs im ersten Exon des Gens für das etwa 350 kDa-Protein Huntingtin zurückzuführen (Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993). Das Codon CAG codiert für Glutamin. Gesunde Menschen tragen ein Allel des Gens mit 6 bis 39 Wiederholungen, bei kranken Menschen ist das Motiv auf bis zu 180 (CAG)-Wiederholungen vergrößert (Rubinsztein *et al.*, 1996; Sathasivam *et al.*, 1997). Es wurde gezeigt, daß die glutaminreiche Domäne für die Aggregatbildung von Huntingtin verantwortlich ist (Scherzinger *et al.*, 1997). Dabei soll sie als polarer „Zipper“ funktionieren, der Proteinmoleküle zusammenfügt (Perutz *et al.*, 1994). Auf lange Sicht führt dies zu Ablagerungen großer Huntingtin-Aggregate im Gehirn. Das Sequenzmotiv beinhaltet auch zahlreiche Prolinreste, und PQ-Dipeptide, wie sie auch in der *Ac*-TPase gefunden werden. Für Huntingtin wurde gezeigt, daß eine Verkürzung des glutaminreichen Motivs auf 30 Reste zum Verlust der Aggregierungsbereitschaft führt (Scherzinger *et al.*, 1997). Die PQ-Domäne der TPase besteht aus nur 10 PQ-Motiven, die aber ausreichend sind,

Aggregate *in vitro* und *in vivo* zu stabilisieren. Da die TPase noch zahlreiche andere Proteininteraktionsdomänen besitzt, ist es nicht verwunderlich, daß Oligomerisierung und Aggregatbildung auch bei Deletion der PQ-Domäne weiterhin möglich sind.

3.6 Die Rolle der Interaktionsdomänen

3.6.1 Die *Ac*-Transposition erfolgt wahrscheinlich über einen synaptischen Komplex als Zwischenprodukt

Die Transposition verschiedener pro- und eukaryotischer DNA-Transposons, die nach dem „cut-and-paste“ Mechanismus transponieren, verläuft nach einem ähnlichen grundsätzlichen Prinzip: Die Transposase bindet spezifisch an *cis*-Elemente in den Enden des Transposons und bildet durch Oligomerisierung einen stabilen synaptischen Komplex aus (Transpososom). Anschließend werden die Enden des DNA-Elements an beiden Seiten geschnitten, so daß freie 3'-OH Gruppen entstehen. Das Schneiden der DNA erfolgt erst im Transpososom. So wird sicher gestellt, daß beide Enden des Transposons geschnitten werden. Danach tritt die Ziel-DNA in den Komplex ein und wird stabilisiert. Die freien 3'-OH Gruppen begeben einen nukleophilen Angriff auf die Rezipientenstelle und es kommt zum Transfer des Transposons. Da auch das *Ac*-Element nach dem „cut-and-paste“-Mechanismus transponiert und bekannt ist, daß zur Transposition das Vorhandensein der beiden unterschiedlichen Transposonenden essentiell ist (Coupland *et al.*, 1989) und die Transposase außerdem als Oligomer aktiv ist (Kunze *et al.*, 1993), wird postuliert, daß auch während der Transposition von *Ac/Ds* ein synaptischer Komplex ausgebildet wird. Die *Ac*-codierte TPase besitzt mindestens drei verschiedene Proteininteraktionsdomänen, die für den Aufbau des Transpososoms in Frage kommen. *In vitro* spielt die C-terminale Dimerisierungsdomäne keine Rolle bei der TPase-vermittelten Ligation freier Transposonenden. Die PQ-Domäne und die direkt anschließende Oligomerisierungsdomäne sind jedoch *in vitro* an der Reaktion beteiligt. Es ist nicht auszuschließen, daß *in vivo* alle drei Domänen beim Aufbau des synaptischen Komplexes eine Rolle spielen. Da die Oligomerisierungsdomäne nicht von der DNA-Bindedomäne zu trennen ist, konnte *in vitro* nicht getestet werden, ob die weiter C-terminal gelegene Dimerisierungsdomäne die Ligation freier Transposonenden allein zu fördern vermag.

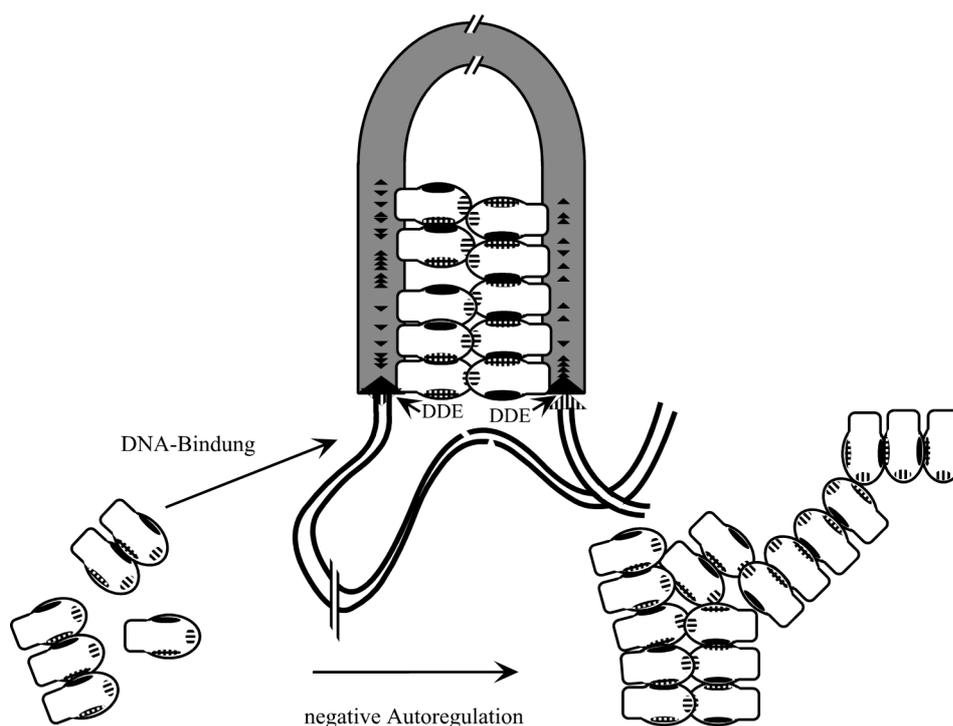


Bild 43: Modell zum Aufbau des *Ac*-Transpososoms. TPase bindet als Monomer und auch als Oligomer DNA und baut über verschiedene Proteininteraktionsdomänen den synaptischen Komplex auf. Darin wird das aktive Zentrum (DDE) so positioniert, daß das Transposon aus der DNA ausgeschnitten wird. Die TPase-Aggregate entstehen wahrscheinlich aus aktiven Oligomeren. Die Proteininteraktionsdomänen der TPase sind schematisch eingezeichnet und entsprechen der PQ-Domäne, der Oligomerisierungs- und der Dimerisierungsdomäne. Es ist bisher nicht möglich, die verschiedenen Domänen eindeutig einer postulierten Interaktion zuzuordnen. *In vitro* sind die beiden erstgenannten am Zusammenbringen freier DNA-Enden beteiligt. *In vivo* sind mindestens die PQ-Domäne und die Dimerisierungsdomäne an der Ausbildung inaktiver Aggregate beteiligt. Wahrscheinlich können die Domänen in verschiedenen Kombinationen miteinander interagieren.

Bild 43 zeigt ein Modell zum Aufbau des *Ac*-Transpososoms. Die *Ac*-TPase bindet als Monomer und auch als Oligomer spezifisch die Enden des Transposons. In diesem Schritt kommt es bereits zu Proteininteraktionen zwischen TPase-Molekülen, die auf einer Seite des Transposons binden. Über mindestens eine weitere TPase-TPase-Interaktionsdomäne oligomerisieren dann diese TPase-Moleküle, und bringen die Enden des Transposons in einem Multi-Protein/DNA-Komplex zusammen. Das Modell setzt mindestens drei verschiedene Proteininteraktionsdomänen voraus. *In vivo* wurde gezeigt, daß die PQ-Domäne und auch die Dimerisierungsdomäne der TPase essentiell für die Transposition sind und damit mutmaßlich am Aufbau des synaptischen Komplexes beteiligt sind. *In vitro* wurde die Beteiligung der Oligomerisierungsdomäne gezeigt. Über zahlreiche Proteininteraktionen wird zum einen sichergestellt, daß das Transposon nicht wegdiffundiert und seine Ziel-DNA finden kann. Zum anderen ist auch sichergestellt, daß die verschiedenen Funktionen der TPase, wie zum Beispiel

das aktive Zentrum (DDE), in der richtigen Konformation zueinander angeordnet werden. Die Tatsache, daß die *Ac*-TPase als Oligomer aktiv ist (Kunze *et al.*, 1993), bestätigt die Annahme, daß die Transposition von *Ac* in einem synaptischen Komplex abläuft.

Die Transpositionsreaktion und der Aufbau des synaptischen Komplexes wurde bereits für einige prokaryotische DNA-Elemente bis ins Detail aufgeklärt. Die Strukturanalyse von Tn5-codierter Transposase gebunden an freie Transposonenden ergab, daß die Transposase als Dimer im synaptischen Komplex vorliegt, wobei jede Untereinheit ein DNA-Molekül bindet (Davies *et al.*, 2000). Die Dimerisierung erfolgt über eine C-terminale Proteininteraktionsdomäne (Davies *et al.*, 2000; Steiniger-White und Reznikoff, 2000). Das Schneiden der DNA erfolgt nicht in *cis* sondern in *trans*. Eine DNA-gebundene Transposase-Untereinheit schneidet das Transposonende, an das das zweite Proteinmolekül gebunden ist, und umgekehrt. Dies erklärt, warum das Ausschneiden des Transposons erst im synaptischen Komplex möglich ist (Davies *et al.*, 2000).

Auch für Tn10 wurde gezeigt, daß die Transposition in einem synaptischen Komplex abläuft, der durch einen Transposase-Dimer stabilisiert wird (Haniford *et al.*, 1991; Sakai *et al.*, 1995; Bolland und Kleckner, 1996; Kennedy *et al.*, 1998). Dabei durchläuft der Komplex zwei verschiedene Stadien: der Aufbau erfolgt in Abhängigkeit des DNA-krümmenden Faktors IHF, der Transfer des Transposons zur Ziel-DNA kann nur in einem Komplex ohne IHF erfolgen (Sakai *et al.*, 2000). Die Ziel-DNA kann erst spät während der Transposition in den synaptischen Komplex eintreten, wenn die Enden des Transposon bereits geschnitten sind (Sakai und Kleckner, 1997).

Auch die Transposition des Phagen Mu verläuft über einen synaptischen Komplex, in dem die Mu-codierte Transposase MuA als Tetramer die Enden von Mu zusammenbringt (Mizuuchi *et al.*, 1992). Das Transpososom wird somit über mehrere Proteininteraktionsdomänen stabilisiert, wie es auch für *Ac* postuliert wird. Im Tetramer wird außerdem das katalytische Zentrum von verschiedenen Untereinheiten zusammengesetzt, MuA ist wie die TPase als Oligomer aktiv (Baker *et al.*, 1994; Wu und Chaconas, 1995).

Auch für verschiedene eukaryotische Transposons wurde gezeigt, daß die Transposition über einen synaptischen Komplex abläuft, der durch Interaktionen der DNA-bindenden Transposasen gebildet wird. Durch Röntgenstrukturanalyse wurde gezeigt, daß die DNA-bindende Domäne der Tc3-Transposase Dimere ausbildet, wobei jede Untereinheit ein anderes DNA-Molekül bindet (van Pouderooyen *et al.*, 1997). *In vitro*-Versuche mit *En/Spm*-codiertem TnpA und der Transposase TnpD schlagen auch für die *En*-Transposition die Ausbildung eines

synaptischen Komplexes vor, wobei mehrere TnpA-Moleküle die DNA binden, dann dimerisieren und so die Transposonenden zusammenbringen (Raina *et al.*, 1998).

Die Transposase des eukaryotischen P-Elements soll ebenfalls als Oligomer aktiv sein und die Transposition in einem synaptischen Komplex katalysieren (Beall und Rio, 1997; Beall und Rio, 1998). Die Integrase (IN) des HI-Virus katalysiert die Integration der Virus-DNA in Wirts-DNA nach einem transpositionsähnlichen Mechanismus, für den der Aufbau eines synaptischen Komplexes *in vitro* eine absolute Voraussetzung ist (Ellison und Brown, 1994). Dabei ist IN ebenfalls als Oligomer aktiv. *In vitro*-Experimente zeigen, daß Komplementation zwischen inaktiven Mutanten möglich ist, die gemeinsam ein aktives IN-Oligomer aufbauen können (Engelman *et al.*, 1993; van Gent *et al.*, 1993). Auch für die Proteine RAG1 und RAG2, die die V(D)J-Rekombination der Säuger katalysieren, die nach einem ähnlichen Mechanismus wie die „cut-and-paste“ Transposition abläuft, wurde gezeigt, daß sie *in vitro* nur in einem (RAG1)₂/(RAG2)₂-Tetramer DNA schneiden können (Bailin *et al.*, 1999).

Die Ausbildung eines synaptischen Komplexes findet während der Transposition verschiedenster DNA-Elemente statt und scheint sich in der Evolution mehrfach unabhängig voneinander entwickelt zu haben.

3.6.2 Regulation der *Ac*-Transposition durch die Ausbildung inaktiver TPase-Oligomere

In Mais wurde schon früh beobachtet, daß die Transpositionshäufigkeit von *Ac* abnimmt, je höher die Kopienzahl der *Ac*-Elemente im Genom ist. Barbara McClintock nannte dieses Phänomen „inverse dosage effect“ (McClintock, 1948). Nach einem Modell von Scofield ist dafür die erhöhte TPase-Konzentration in der Zelle verantwortlich, überschreitet diese eine bestimmte Menge, so wirkt sich das auto-inhibitorisch auf die TPase-Aktivität aus (Scofield *et al.*, 1993). In Maisendospermzellen und in Protoplasten von transgenem Tabak und transfizierten Petunienprotoplasten bilden sich bei hoher TPase-Konzentration hochmolekulare TPase-Aggregate, die für die Autoregulation der TPase verantwortlich gemacht werden. Die Aggregate sollen aus inaktiven TPase-Oligomeren bestehen (Heinlein *et al.*, 1994).

Die Ausbildung der sehr großen, filamentartigen Aggregate setzt das Vorhandensein mehrerer Proteininteraktionsdomänen voraus. Im Falle der *Ac*-TPase sind das die PQ-Domäne, die Oligomerisierungsdomäne sowie die Dimerisierungsdomäne. Die Beteiligung der PQ-Domäne sowie der Dimerisierungsdomäne wurde *in vivo* direkt gezeigt. Bereits früher wurde

beschrieben, daß die TPase-Reste 103-188 an der Aggregatbildung beteiligt sein müssen, da TPase₁₈₉₋₈₀₇ ungewöhnliche Aggregate formt (Boehm *et al.*, 1995). TPase_{E249A/R733A} gibt erste Hinweise darauf, daß auch die N-terminale Oligomerisierungsdomäne beteiligt ist. Die Doppelmutation führt *in vivo* dazu, daß keine Aggregate mehr ausgebildet werden können. Dies bestätigt auch die Beteiligung mehrerer Interaktionsdomänen an der Aggregatbildung, denn TPase_{E249A} zeigt keinen veränderten Phänotyp.

Es stellt sich die Frage, wie die Oligomerisierung der TPase abläuft (Bild 43). Entstehen inaktive Aggregate unabhängig von den aktiven Oligomeren oder entstehen sie aus den vorhandenen aktiven Oligomeren? Der Aminosäureaustausch R733A führt nicht nur zu veränderten Aggregaten sondern auch zur Inaktivierung der TPase, was dafür spricht, daß die transpositions-kompetenten Oligomere eine Vorstufe in der inaktivierenden Aggregatbildung darstellen. Das gleiche gilt für die Deletion der PQ-Domäne.

Die Inaktivierung von Transposasen durch Protein-Protein-Interaktionen ist eine weitverbreitete Art der Regulation pro- und eukaryotischer Transposition. Das bakterielle Transposon Tn5 codiert für zwei Proteine, die Transposase Tnp und ein Inhibitorprotein Inh. Tnp schneidet DNA bevorzugt *in cis* (Johnson und Reznikoff, 1983). Die Inaktivierung der Transposase erfolgt über die Ausbildung von Tnp-Inh-Dimeren, die wahrscheinlich eine DNA-gebundene Transposase voraussetzt (Mahnke Braam *et al.*, 1999). Die *cis*-Präferenz von Tnp soll zusätzlich durch die Ausbildung inaktiver Tnp-Tnp-Dimere im Cytoplasma kontrolliert werden (Weinreich *et al.*, 1994). Die Aktivität der Transposase des eukaryotischen P-Elements wird unter anderem durch die Ausbildung von Heteromultimeren mit verkürzten Transposasemolekülen, die als Repressorproteine fungieren, reguliert. Das Protein bindet normalerweise als Dimer oder Oligomer spezifisch die DNA-Enden des P-Elements, als Heterodimer ist keine DNA-Bindung mehr möglich (zusammengefaßt in: Rio, 1991).

3.7 Das mutmaßliche aktive Zentrum der Ac-TPase gleicht einem DDE-Motiv

Das DDE-Sequenzmotiv stellt in vielen prokaryotischen Transposasen wie Tn7, Tn10 und IS911 und unter anderem auch in der HIV-codierten Integrase und der eukaryotischen RAG1 Rekombinase das katalytische Zentrum dar (Kulkosky *et al.*, 1992; Polard und Chandler, 1995; Polard *et al.*, 1996; Sarnovsky *et al.*, 1996; Allingham *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 1999).

In dieser Arbeit wurden erstmalig auch in der Aminosäuresequenz der Ac-TPase drei potentielle DDE-Motive gefunden. Wie in vielen der oben erwähnten Transposasen sind auch

in den hypothetischen DDE-Motiven der *Ac*-TPase (D₁₅₇D₂₁₄E₂₄₉, D₂₁₄D₃₀₁E₃₃₆ und D₆₅₀D₇₀₇E₇₄₂) die zweite Asparaginsäure und die Glutaminsäure durch 35 Reste getrennt. Ein Austausch der beteiligten Glutamatreste gegen Alanin ergab nur für E₇₄₂ *in vivo* eine verminderte Transposase-Aktivität. Die Mutagenese der mutmaßlich dazugehörigen Aspartatreste D650A und D707A ergab keine Reduktion der TPase-Aktivität *in vivo*. Keines der drei theoretischen DD(35)E-Motive ist somit funktionell. Die Reduktion der TPase-Aktivität durch die Mutation von E₇₄₂, die in der Dimerisierungsdomäne der TPase liegt, könnte auf eine verminderte TPase-Interaktion zurückzuführen sein.

Durch den Vergleich der Sekundärstruktur von RAG1 und der *Ac*-TPase ergab sich ein weiteres mutmaßliches Motiv, N₄₆₅D₅₈₄E₇₁₉. Die Mutagenese dieser Reste nach Alanin führte zu einem totalen Aktivitätsverlust der TPase *in vivo*. Dieses Motiv ist in zweierlei Hinsicht im Vergleich zu bereits charakterisierten DDE-Motiven ungewöhnlich. Zum einen beträgt der Abstand zwischen dem zweiten und dritten Rest keine 34 oder 35 Aminosäuren sondern ist wesentlich größer. Dies wurde jedoch auch schon für Transposasen bakterieller Transposons beschrieben. Die Reste D₉₇D₁₆₁E₂₉₂ bilden das aktive Zentrum von Tn10 und für die Transposase des Transposons IS903 sind es die Reste D₁₂₁D₁₉₃E₂₅₉ (Bolland und Kleckner, 1996; Tavakoli *et al.*, 1997). Der Abstand von 135 Aminosäuren der Reste DE in der *Ac*-TPase könnte somit durchaus die Ausbildung eines funktionellen DDE-Motivs ermöglichen. Was wesentlich ungewöhnlicher ist, ist die Tatsache, daß das erste Aspartat durch ein ungeladenes Asparagin ersetzt ist. Ein NDE-Motiv ist bisher nicht beschrieben worden. Ebenso wenig kann man aus Mutationsstudien bei denen D gegen N ausgetauscht wäre, Rückschlüsse auf die Funktionalität des genannten Motivs ziehen. Obwohl in der TPase-Sekundärstruktur der Asparaginrest genau an der Position der ersten Asparaginsäure im DDE-Motiv von RAG1 liegt, muß auch in Betracht gezogen werden, daß der Aminosäureaustausch N465A zur Inaktivierung einer anderen unbekanntes Funktion geführt haben könnte. Andererseits ergaben Strukturanalysen der aktiven Zentren der Integrasen von HIV1 und RSV sowie der Mu Transposase und Tn5 Transposase, daß die jeweiligen DDE Motive für die Bindung eines Mg²⁺-Ions nur zwei der drei sauren Reste benötigen. Die DDE-Motive sollen zu groß sein, um gemeinsam eine Bindestelle aufbauen zu können. Die potentiellen Bindestellen liegen zwischen den ersten beiden Asparaginsäureresten oder zwischen der ersten Asparaginsäure und der Glutaminsäure (zusammengefaßt in: Davies *et al.*, 2000). Eine Röntgenstrukturanalyse des synaptischen Komplexes von Tn5 ergab, daß ein Mn²⁺-Ion durch den Glutaminsäurerest, den ersten Aspartatsäurerest und ein freies 3'-OH Ende der zu transferierenden DNA koordiniert wird und sich somit in einer günstigen Position befindet, die 3'-OH-Gruppe zu aktivieren

(Davies *et al.*, 2000). In allen genannten Fällen zerstört jedoch ein Aminosäureaustausch einer der drei DDE-Reste gegen Alanin die Proteinaktivität. Diese Betrachtungen lassen es möglich erscheinen, daß auch das NDE-Motiv der *Ac*-TPase in der Lage ist ein zweiwertiges Metallion zu binden. Ein Unterschied zu den beschriebenen Fällen ist jedoch, daß der zweite Asparaginsäurerest an der Koordination des Ions beteiligt wäre. Das aktive Zentrum bestünde damit mindestens aus einem DE-Motiv. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß der erste Asparaginsäurerest noch nicht identifiziert und zugeordnet werden konnte.

In früheren Versuchen wurde gezeigt, daß die rezessiven Insertionsmutanten 462TR und 585TR inaktiv sind (Kunze *et al.*, 1993). Bisher wurde nicht geklärt, welche Funktion in diesen Mutanten zerstört wurde. Die Einführung einer hydrophilen und einer positiv geladenen Aminosäure in unmittelbare Nachbarschaft zu einem Asparaginsäurerest (bzw. eines Asparaginrests) im aktiven Zentrum könnte dazu führen, daß ein Mg^{2+} -Ion nicht mehr erfolgreich koordiniert werden kann und die TPase damit inaktiviert wird. Die Deletion der Aminosäuren 710 bis 807 am C-Terminus führt auch zur Inaktivierung der TPase (Kunze *et al.*, 1993), was dafür spricht, daß E₇₁₉ Teil des aktiven Zentrums ist. Den genannten Mutanten gemein ist, daß sie bei Co-Expression mit WT-TPase rezessiv sind (Kunze *et al.*, 1993). Für die Insertionsmutanten 585TR und die C-terminale Deletion wurde außerdem gezeigt, daß bei der Co-Expression mit anderen inaktiven Mutanten die Transpositionsaktivität teilweise wieder hergestellt werden konnte (Behrens-Jung *et al.*, 1994). Da die TPase als Oligomer aktiv ist und nicht jede Funktion in jeder Untereinheit aktiv sein muß, bestätigt dies, daß in der Region um Aminosäure 585 und ab Rest 710 eine essentielle TPase-Aktivität vorliegt, die aber nur in einzelnen Molekülen eines Transpososoms vorhanden sein muß. Für ein NDE-Motiv wären dies diejenigen monomerischen Untereinheiten, die endonukleolytische Schnitte während der Transposition ausführen. Werden TPase_{585TR} und TPase_{Δ(710-807)} co-exprimiert, so kann auch in dieser Kombination die Transposase-Aktivität teilweise wiederhergestellt werden (Behrens-Jung *et al.*, 1994). Dies steht im Gegensatz zu der Annahme, daß die Regionen um die Aminosäuren 585 und 719 eine gemeinsame Funktion erfüllen. Eine mögliche Erklärung wäre, daß das aktive Zentrum der TPase von unterschiedlichen TPase-Monomeren im Transpososom gestellt wird. Ein ähnliches Prinzip des „domain sharing“ wird für die Transposase MuA des Bakteriophagen Mu beschrieben, die ebenfalls ein DDE-Motiv enthält (Wu und Chaconas, 1995). MuA bindet als Dimer an die Enden des Transposons, über Proteininteraktionen wird der synaptische Komplex aufgebaut und durch ein MuA-Tetramer stabilisiert (Lavoie *et al.*, 1991; Mizuuchi *et al.*, 1992). Das katalytische Zentrum der Transposase wird dabei aus der Domäne II eines MuA-Monomers (Mg^{2+} -Bindung) und der Domäne III (Endonuklease-

Aktivität) eines anderen MuA-Monomers aufgebaut (Wu und Chaconas, 1995). Im Falle der *Ac*-TPase wäre es somit durchaus möglich, daß in einem Komplementationsexperiment die Aktivität zu einem geringen Grad wieder hergestellt wird, wenn das aktive Zentrum aus zwei der recht großen NDE-Motive zusammengesetzt wird.

3.8 **Suppressorphänotyp der inaktiven TPase_{E719A}**

Untersuchungen zum mutmaßlichen aktiven Zentrum der *Ac*-TPase erfolgten in einem neu entwickelten *Ac/Ds*-Transpositionssystem in Hefe. Der Hefestamm CWY2 (Weil und Kunze, 2000) beherbergt eine Insertion eines nicht-autonomen *Ds*-Elements in der untranslatierten 5'-Region des *ADE2*-Gens. Auf Selektionsmedium ohne Adenin entstehen trotz der Abwesenheit von TPase Ade⁺-Kolonien. Das heißt, daß das *ADE2*-Gen exprimiert werden kann, wenn auch im Vergleich zum WT-Stamm nur in geringem Maße. Möglicherweise ist die Effizienz der Transkription oder auch der Translation durch die *Ds*-Insertion zwar gestört, aber nicht vollständig unterbunden. Eine zweite Möglichkeit ist, daß nahe dem Ende der *Ds*-Element-Insertion ein verdeckter Promotor sitzt, der zur Transkription des *ADE2*-Gens führt. Dieses Phänomen wurde zum Beispiel für eine Insertion des nicht-autonomen Mutator-Elements *Mu1* in der 5'-nicht-translatierten Region des *Hcf106*-Gens in *Zea mays* beschrieben (Martienssen *et al.*, 1990). *hcf106*-Mutanten haben einen Defekt in der Photosynthese. In Abwesenheit eines aktiven *Mutator*-Elements wird *Hcf106*-mRNA aufgrund einer Promotortätigkeit am Ende der *Mu*-Insertion transkribiert (Barkan und Martienssen, 1991).

Die Expression der inaktiven TPase_{E719A} in CWY2 führt dazu, daß die *ADE2*-Aktivität vollkommen reprimiert wird. Die einfachste Erklärung dafür ist, daß die inaktive TPase zwar an die *cis*-Elemente des nicht-autonomen *Ds*-Transposons bindet, dieses aber nicht ausschneiden kann. Da die TPase als Oligomer an die DNA bindet, wird die RNA-Polymerase wahrscheinlich blockiert, es kann keine Transkription mehr stattfinden. Dieser Phänotyp erinnert an die Suppressorfunktion von *Mutator* oder auch *En/Spm*. Das *Hcf106*-Allel mit einer *Mu1*-Insertion wird in Anwesenheit eines aktiven *Mutator*-Elements nicht mehr exprimiert (Martienssen *et al.*, 1990). In diesem Fall könnte die MURA-Transposase, die spezifisch an *cis*-Elemente in den Enden von *Mutator* bindet (Benito und Walbot, 1997), die Transkription sterisch behindern (Barkan und Martienssen, 1991).

Die Suppression der Genaktivität durch eine *I/dSpm*-Insertion in Anwesenheit eines autonomen *Spm*-Elements wurde schon von Barbara McClintock beschrieben, was sie animierte, dieses

mobile Element *Suppressor (Spm)* zu nennen (McClintock, 1954). Aus verschiedenen Allelen, in denen die Insertion im offenen Leserahmen eines Gens liegt, wird das *I/dSpm*-Element wie ein Intron aus der Vorläufer-mRNA ausgespleißt, was zu einer geringen Genaktivität führt (Kim *et al.*, 1987; Menssen *et al.*, 1990). In *trans* exprimiertes TnpA bindet in mehreren Kopien an *cis*-Elemente im nicht-autonomen *I/dSpm*-Transposon (Gierl *et al.*, 1985; Pereira *et al.*, 1986; Masson *et al.*, 1987; Trentmann *et al.*, 1993) und blockiert so die RNA-Polymerase, so daß die Genaktivität supprimiert wird (Grant *et al.*, 1990; Grant, *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu *Mutator* ist hier nicht die Transposase (TnpD), sondern das zweite *En/Spm*-codierte Protein, TnpA, für den *Suppressor*-Phänotyp verantwortlich, welches *in vitro* die Transposonenden über Proteininteraktionen in einem synaptischen Komplex in räumliche Nähe zueinander bringt (Raina *et al.*, 1998). Somit ähnelt TnpA der inaktiven *Ac*-TPase_{E719A}. TPase_{E719A} trägt eine Mutation im mutmaßlichen aktiven Zentrum des Proteins, die anderen Funktionen wie DNA-Bindung und Proteininteraktionen sollten nicht gestört sein.

Wird in CWY2 die WT-TPase exprimiert, steigt die Anzahl der Ade⁺-revertanten Kolonien um mehr als das zehnfache an. Die Transpositionsfrequenz und damit die Ausbildung von echten Ade⁺-Revertanten in Anwesenheit funktioneller TPase liegt weit über der Hintergrundaktivität des *Ade::Ds*-Locus.

3.9 Hyperaktive TPase-Mutanten

Mutationen einiger saurer Aminosäurereste in den postulierten aktiven Zentren ergaben hyperaktive TPase-Mutanten. Dies waren TPase_{E249A} und TPase_{E336A}, sowie TPase_{D459A}, TPase_{D542A} und TPase_{D545A}. Bei geringer Expression zeigen sie sowohl in Hefe (CWY1) als auch in transfizierten Petunienprotoplasten eine erhöhte Transpositionsfrequenz. Eine Ausnahme bildet TPase_{E336A}, die nur in Hefe Hyperaktivität zeigt. Durch Doppelmutationen E249A/E336A und D459A/D545A wurde die Hyperaktivität nicht gesteigert. Die Vierfachmutante zeigte in Petunien eine fünffach höhere Aktivität als die WT-TPase, aber das Protein war weniger aktiv als die Einzelmутanten. In Hefe (CWY1) ergab sich jedoch eine enorme Steigerung der Transpositionsfrequenz durch die Vierfachmutation gegenüber den Einzel- und Doppelmutanten, außerdem entstanden revertante Kolonien wesentlich schneller. Die genannten Mutationen liegen in oder in direkter Nachbarschaft zu der N-terminalen Oligomerisierungsdomäne der *Ac*-TPase. Mutationen in diesem Bereich könnten einen Einfluß auf die Interaktionseigenschaften der TPase haben. Zum einen könnte die Ausbildung inaktiver

TPase-Aggregate gestört sein, wodurch mehr aktive Monomere in Lösung blieben. Zum anderen ist es denkbar, daß Proteininteraktionen innerhalb des Transpososoms so verändert werden, daß die Fähigkeit der TPase einen synaptischen Komplex aufzubauen, zunimmt. Da sämtliche Mutationen auf dem Austausch einer sauren Aminosäure gegen ein hydrophobes Alanin beruhen, ist auch diese Möglichkeit in Betracht zu ziehen. Dies schließt nicht aus, daß auch die Inaktivierung der TPase durch die Aggregatbildung gestört ist, da diese vermutlich aus einer aktiven, oligomerisierten Form der TPase entstehen (Heinlein *et al.*, 1994). TPase_{E249A/R733A} bildet *in vivo* in transfizierten Petunienprotoplasten keinerlei Aggregate mehr aus, somit ist wenigstens die Hyperaktivität von TPase_{E249A} auf eine Störung der TPase-Interaktionen zurückzuführen. Für die übrigen Mutanten konnte dies nicht gezeigt werden, die Aggregatbildung war normal.

Auch für das bakterielle Transposon Tn5 wurden unabhängige hyperaktive Mutanten isoliert. Die Aminosäureaustausche E110K, E345K und L372P führen dazu, daß sowohl die Bildung inaktiver Heterodimere von Tnp mit dem Repressor der Transposition Inh gestört ist, als auch die Ausbildung inaktiver Tnp-Multimere (Wiegand und Reznikoff, 1992; Weinreich *et al.*, 1994). In diesen Fällen führt ein Defekt in der Autoregulation der Transposase zu einer hyperaktiven Mutante. Wie im Fall der *Ac*-TPase ist ein solcher Defekt auch durch den Austausch eines Glutaminsäurerestes zustande gekommen. Da auch Tn5 unter Ausbildung eines synaptischen Komplexes transponiert (Bhasin *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 2000; Steiniger-White und Reznikoff, 2000), enthält auch dieses Protein mindestens zwei verschiedene Interaktionsdomänen.

Die Expression der im Hefestamm CWY1 hyperaktiven Mutanten in CWY2 ergab für TPase_{E249A} und TPase_{E336A} den gleichen hyperaktiven Phänotyp, während TPase_{D459A} und TPase_{D545A} in CWY2 etwas weniger aktiv als die WT-TPase waren. Dieser Unterschied ist nicht auf eine unterschiedliche Expressionsstärke der beiden Proteine in den Hefestämmen zurückzuführen, diese ist in beiden Fällen gleich. Ein Unterschied zwischen den beiden Hefestämmen ist der Insertionsort des *Ds*-Elements im *ADE2*-Gen. In CWY1 liegt das *Ds* im offenen Leseraster des Gens, in CWY2 ist es in der 5'-untranslatierten Sequenz lokalisiert. Das bedeutet, daß in CWY1 ein Teil der Transpositionereignisse nicht detektiert werden kann, wenn der „Footprint“ nach der *Ac*-Exzision das offene Leseraster des *ADE2*-Gens zerstört, in CWY2 spielt das keine Rolle. Führt nun eine Mutation in der TPase dazu, daß vermehrt „Footprints“ gebildet werden, die den offenen Leserahmen des *ADE2*-Gens nicht stören, so sollte dies in CWY1 zu einer apparenten Steigerung der Transposition führen. In CWY2 sollte eine solche Mutation aber keine Auswirkungen haben, da alle gebildeten „Footprints“ toleriert

werden. Da die Mutationen E249A und E336A in CWY2 andere Auswirkungen auf die Aktivität der TPase haben als die Austauschungen D459A und D545A, sind wahrscheinlich jeweils andere Funktionen der TPase betroffen. Dies wird auch dadurch bestätigt, daß in CWY1 die Doppelmutanten nicht zu einer noch höheren Transpositionsfrequenz führen, die Vierfachmutante jedoch eine weitaus höhere Aktivität aufweist. Dies wurde auch für die Doppelmutante E345K/L372P der Tn5-codierten Transposase gezeigt (Weinreich *et al.*, 1994). Die Vierfachmutation in der *Ac*-TPase_{E249A/E336A/D459A/D545A} führte in Petunienprotoplasten jedoch nicht zu einer noch höheren Transpositionsfrequenz, vielmehr war diese Mutante weniger aktiv als die Einzelmutanten, aber aktiver als die WT-TPase. Möglicherweise unterliegt die *Ac*-Transposition in pflanzlichen Systemen einer anderen Kontrolle als im Hefesystem. Eine Bestätigung dafür könnte sein, daß die Vierfachmutante in Hefe wesentlich schneller zu Revertanten führt. Dies scheint in Petunienprotoplasten nicht der Fall zu sein, da augenfällig nicht mehr β -Glucuronidase exprimiert wurde, was allerdings nur indirekt an der Färbeintensität der Protoplasten bestimmt werden könnte.

Die zum Teil enorme Steigerung der Transpositionsfrequenz sowohl in Hefe als auch in Petunienprotoplasten zeigt an, daß die Transposition von *Ac* nicht von Wirtsfaktoren limitiert wird. Das bekräftigt wiederum die Vermutung, daß außer der TPase zusätzliche Proteine keine essentielle Rolle während der Transposition haben.

3.10 Ergebnisse aus dem neuartigen Hefesystem zur Transposition von *Ac/Ds* sind auf pflanzliche Systeme übertragbar

Das System zur Transposition von *Ac/Ds* in *Saccharomyces cerevisiae* wurde neu entwickelt, um die einzelnen Schritte der Transposition in einem einfachen System untersuchen zu können (Weil und Kunze, 2000). Die Expression hyperaktiver Mutanten in Hefe und im bereits etablierten Petuniensystem (Houba-Hérin *et al.*, 1990; Heinlein *et al.*, 1994) ergab tendenziell die gleichen Phänotypen, wenn auch mit quantitativen Unterschieden. Die Einzel- und Doppelmutanten zeigten in Petunien eine wesentlich größere Steigerung der Aktivität als in Hefe. Die Vierfachmutante, die in Hefe zu einer enormen Erhöhung der Transpositionsfrequenz führt, zeigte in Petunien nur die halbe bzw. viertel Aktivität der Einzelmutanten. Obwohl auszuschließen ist, daß pflanzliche Wirtsfaktoren eine essentielle Rolle bei der *Ac*-Transposition einnehmen, scheinen doch unterschiedliche Regulationsmechanismen in den beiden Systemen die Transpositionsfrequenz zu beeinflussen. So treten nach der Transposition

in Hefe häufig „Footprints“ auf, die aus einer palindromischen Wiederholung von *Ds*-flankierenden Sequenzen um das terminale Basenpaar des *Ds*-Elements bestehen (Weil und Kunze, 2000). Diese „Footprints“ sind in pflanzlichen Systemen selten zu beobachten (Peterson und Yoder, 1993; Rinehart *et al.*, 1997), was bedeutet, daß zumindest unterschiedliche Reparaturmechanismen an der *Ac/Ds*-Transposition beteiligt sein müssen.

Prinzipiell kann man in beiden Systemen die gleichen Effekte einer Mutation in der *Ac*-TPase zeigen. Im Falle der hyperaktiven Mutanten ist dies in Petunien aber nur bei geringer Expressionsstärke der TPase möglich. Bei hoher Expression ist es nicht möglich, hyperaktive TPase-Mutanten zu ermitteln, da die maximale Detektierbarkeit der GUS-positiven Protoplasten durch die Transformationsrate limitiert ist. Hyperaktivität könnte in diesem Fall nur ermittelt werden, wenn die Protoplasten eine intensivere GUS-Färbung annehmen würden. Dies wäre aber nur ein indirekter und auch subjektiver Nachweis. Das Hefesystem hat den Vorteil, daß nur Kulturen verwendet werden, deren Zellen zu 100 Prozent mit TPase-exprimierendem Plasmid transformiert sind. Dies wird durch permanenten Selektionsdruck sicher gestellt. Eine Selektion der Petunienprotoplasten nach der Transformation erfolgt im hier verwendeten System nicht.

3.11 Ausblick

Die in dieser Arbeit charakterisierten Proteininteraktionsdomänen sind an der Autoregulation der TPase und/oder am Aufbau des synaptischen Komplex während der Transposition beteiligt. Die relativ große Oligomerisierungsdomäne konnte *in vitro* nicht genauer eingegrenzt werden, daher wäre es interessant zu untersuchen, ob die gesamte Domäne auch *in vivo* essentiell für die Transposition notwendig ist. Interne Deletionen dieser Region sollten dazu in Hefe oder in Petunienprotoplasten exprimiert werden. Sollte sich herausstellen, daß ein Teil der Domäne deletiert werden kann, könnte dadurch auch die Löslichkeit der TPase *in vitro* heraufgesetzt werden, was die Reinigung des aktiven Proteins für *in vitro*-Studien erleichtern würde. Dies könnte wahrscheinlich auch durch die gezielte Mutagenese der hydrophoben Zipper-Motive in dieser Region erreicht werden. Mit der Isolierung von hyperaktiven TPase-Mutanten liegen bereits Proteine vor, die möglicherweise besser geeignet sind als die WT-TPase, *in vitro* Transposition nachzuweisen. Ein wichtiges Ziel zukünftiger Arbeiten zur Aufklärung des Transpositionsmechanismus *in vitro* wird sein, die Reinigung der eingesetzten TPase-Derivate zu optimieren.

Besonders interessant wird die weitere Charakterisierung des postulierten aktiven Zentrums der TPase sein. Dazu sollten die beteiligten Aminosäuren (N)DE einzeln gegen Cystein ausgetauscht werden. Die Aktivität der TPase sollte dadurch in Anwesenheit von Mn^{2+} teilweise wiederhergestellt werden, das durch die Cysteinreste als Ersatz für Mg^{2+} koordiniert werden würde (Allingham *et al.*, 1999). Sollte sich das postulierte NDE-Motiv als katalytisches Zentrum manifestieren, so wäre die *Ac*-TPase das erste Protein, für das ein solches Motiv beschrieben wird.

Die TPase ist in allen Pflanzen aktiv, in denen sie bisher exprimiert wurde, allerdings mit sehr unterschiedlichen Frequenzen. In *A. thaliana* ist die Transpositionshäufigkeit von *Ac* beispielsweise nur gering. Das Vorhandensein von hyperaktiven TPase-Mutanten macht *Ac* wesentlich attraktiver für die Herstellung großer Transposon-Tagging Populationen in heterologen Systemen. So könnte zum Beispiel die Transpositionshäufigkeit in *A. thaliana* stark erhöht werden. Da die Transposition von *Ac* nicht essentiell abhängig von Wirtsfaktoren ist, sollten die hyperaktiven TPase-Mutanten auch geeignet sein, Transposonmutagenese in nicht-pflanzlichen Organismen wie pathogenen Pilzen oder auch Säugerzelllinien durchzuführen.

4 Zusammenfassung

Das *Ac*-Element aus *Zea mays*, das zur Familie der *hAT*-Elemente gehört, codiert für ein einzelnes Protein, die Transposase (TPase). Dieses Protein ist *in vivo* als einziges essentiell für die Transposition von *Ac* notwendig. Die Expression der TPase in *E. coli* war bisher nur in unlöslicher Form möglich. Der Nachweis, daß die TPase *in vitro* an die subterminalen Enden des Transposons bindet, wurde mit de- und wieder renaturiertem Protein erbracht (Kunze und Starlinger, 1989). In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal TPase in löslicher Form in *E. coli* exprimiert bzw. aus transgenen Tabakpflanzen isoliert. Die Reinigung des Proteins bis zur Homogenität war nicht möglich. Das lösliche Protein besitzt eine hohe Aggregationsneigung. *In vitro* wurde gezeigt, daß die TPase als Oligomer DNA bindet. Ein *in vitro*-Nachweis der endonukleolytischen Aktivität der TPase konnte jedoch nicht erbracht werden.

Die Transposition von *Ac* läuft wahrscheinlich in einem synaptischen Komplex ab, in dem über zahlreiche Proteininteraktionen die Enden des Transposons in räumliche Nähe zueinander gebracht werden. Dabei ist die TPase als Oligomer aktiv (Kunze *et al.*, 1993). Gleichzeitig unterliegt die TPase einer negativen Autoregulation. Bei hoher TPase-Konzentration in der Zelle oligomerisiert das Protein zu inaktiven Aggregaten. Die Transposition von *Ac* hängt vom Vorhandensein mehrerer Proteininteraktionsdomänen ab. In dieser Arbeit wurde eine C-terminale Dimerisierungsdomäne der TPase charakterisiert, die unter den Transposasen der *hAT*-Elemente hochkonserviert ist und sowohl an der Transposition als auch an der negativen Autoregulation von *Ac* beteiligt zu sein scheint. Damit ist es zum ersten Mal gelungen, einer der drei *hAT*-Domänen eine Funktion zuzuschreiben. Am N-Terminus der TPase wurde eine Oligomerisierungsdomäne identifiziert, die mehrere hydrophobe „Zippermotive“ enthält. *In vitro* ist diese zum Teil ebenfalls konservierte Domäne am Aufbau eines synaptischen Komplexes beteiligt. Als weitere Proteininteraktionsdomäne der TPase wurde die PQ-Domäne identifiziert, deren essentielle Funktion bisher unbekannt war. Diese Domäne ist *in vitro* am Aufbau des Transpososoms beteiligt, aber auch in die Ausbildung vermutlich inaktiver TPase-Aggregate verwickelt. Als mutmaßliches katalytisches Zentrum der *Ac*-TPase wurde durch Sequenzvergleiche mit bakteriellen Transposasen und *in vivo*-Transposition entsprechender Mutanten ein (N)DE-Motiv postuliert. Durch einfache Aminosäureaustausche wurden dabei zum ersten Mal hyperaktive TPase-Mutanten isoliert, die teilweise defekt in der Aggregatbildung sind. Der Aktivitätstest der TPase-Mutanten erfolgte unter anderem in einem neu entwickelten Transpositionssystem in Hefe (Weil und Kunze, 2000).

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Bezugsquellen von Chemikalien, Enzymen, Radioisotopen, Materialien

5.1.1.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham-Pharmacia, BIO101, BioRad, BIOSYNTH AG, Biozym, Duchefa, Difco, Merck, Roche-Boehringer, Roth, Serva, Sigma-Aldrich-Fluka. Radioaktive Isotope [(α - ^{32}P)-ATP, (α - ^{32}P)-CTP und (γ - ^{32}P)-ATP], je 10mCi/ml stammten von NEN. Die verwendeten Enzyme stammten von AGS, Amersham-Pharmacia, Clontech, Gibco BRL, MBI Fermentas, New England Biolabs (NEB), Promega, Roche-Boehringer, Serva, Stratagene.

5.1.1.2 Kits

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Kits

Kit	Firma
QIAGEN Plasmid Midi Kit, Maxi Kit und QiaPrepMini	QIAGEN
High Pure Isolation Kit	Roche-Boehringer
Quick change mutagenesis kit	Stratagene
Micro Spin TM S-300HR, Micro Spin TM 25G	Amersham-Pharmacia
Westernblot Detektionskit	NEB
Ready To Go TM DNA Labelling Beads	Amersham-Pharmacia
Gfx TM PCR and Gel Band Purification Kit	Amersham-Pharmacia

5.1.1.3 Sonstiges

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Materialien

Bezeichnung	Firma	Verwendung
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP)	PEQLAP	PCR, Auffüllreaktionen von überhängenden DNA-ENden
Plastikpipetten Petrischalen Gewebekultur Röhren (12ml)	Greiner Labortechnik	Petunientransfektion
Glasperlen 150-212 Microns	Sigma-Aldrich	Proteinextrakt aus Hefezellen
Cellulose Nitrate Membrane Filters (0,45 μm)	Whatman	<i>GUS</i> -Assay

Bezeichnung	Firma	Verwendung
Diethylaminoethyl Cellulose (DE81)	Whatman	Gelretardation, TPase-vermittelte <i>in vitro</i> -Ligation freier Transposonenden
Ion Exchange chromatography paper	Whatman	Southernblot Gelretardation
Hybond™-N ⁺ Nylon Transfer Membrane	Amersham-Pharmacia	Southernblot
Röntgenfilme	Kodak	Exposition radioaktiver DNA
Steril Filters - 45µm - Vacuflo PV 050/2	Schleicher & Schuell	Sterilfiltration
Glasfaser Vorfilter	Sartorius AG	GUS-Assay
Vitro Vent Steril Containers	Duchefa	Anziehen steriler Petunien
1 kbp-Extension-Ladder	GibcoBRL™	Größenmarker für die Agarose-Gelelektrophorese
Dialysefilter Nitrocellulose White VSWP, 13 mm, 0,0025µm	Millipore	Dialyse von DNA

5.1.1.4 Verwendete Antikörper

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper	Verwendung
„anti-10.ATG“	Primärer Antikörper Nachweis der TPase Region 103-465
„C-terminal“	Primärer Antikörper Nachweis der TPase-Region 663-807
„N-terminal“	Primärer Antikörper Nachweis der TPase-Region 1-97
Anti-Rabbit IgG (H&L) HRP-linked (New England Biolabs, NEB)	Sekundärer Antikörper Westernblot
Anti-Kaninchen IgG Fluorescin Isothiocyanat Konjugat (Sigma)	Sekundärer Antikörper <i>in situ</i> -Immunfluoreszenz

Die verwendeten polyklonalen anti-TPase-Antikörper lagen als Antiserum vor und wurden je nach Anwendung bis zu 1:13000 verdünnt. Die sekundären Antikörper wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.1.2 *Escherichia coli*-Stämme

DH5α: Für sämtliche Klonierungen ohne nähere Angaben wurde der Stamm DH5α (Hanahan, 1983) verwendet, bei dem es sich um ein Derivat des *E.coli*-Stammes K12 mit folgendem Genotyp handelt: F⁻ /*endA1*, *hsdR17* (r_K⁻m_K⁺), *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *gyrA* (NAL^r), *relA1*, Δ(*lycZYA-argF*) U169 *deoR*(φ80*dlac*Δ(*ZacZ*)M15).

BL21DE3: Zur Expression von Proteinen wurde der Stamm BL21DE3 verwendet, der durch folgenden Genotyp beschrieben ist: *E.coli* B, F⁻, *ompT*, *hsdS_B*(r_B⁻m_B⁻), *gal*, *dcm*, λ(DE3).

XL1Blue/TOP10: Mutagenisierte Plasmide wurden zur Klonierung in die superkompetenten Stämme Epicurian Coli® XL1 Blue supercompetent (Stratagene; *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [*F*ϕ*proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)*]) oder TOP 10 (Invitrogen; F⁻, *mcrA*, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ80*dlac*Δ(*ZacZ*)*M15*, Δ*lacX74*, *recA1*, *deoR*, *araD139*, Δ(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rps* (*Str*^R), *endA1*, *nupG*) transformiert.

JS4: Plasmid-DNA aus *in vitro*-Assays wurde zur Klonierung in elektrokompente JS4-Zellen transformiert (BioRad; F⁻, *araD139*, Δ(*ara, leu*)7697, Δ(*lac*)_{x74}, *galU*, *galK*, *hsdR2*(*rk⁻ mk⁻*), *mcrA*, *mcrBc*, *rpsL* (*Str*^r), *thi*, *recA1*).

5.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

CWY1 (*MATα*, *his3Δ0*, *ura3Δ0*, *ade2::Ds-1* (Weil und Kunze, 2000))

CWY2 (*MATα*, *leu2Δ0*, *lys2Δ0*, *ura3Δ0*, *ade2::Ds-2* (Weil und Kunze, 2000))

5.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ampicillin-Lösung	100 mg/ml Ampicillin in H ₂ O _{dd} , sterilfiltriert
APS-Lösung	10% (w/v) APS in H ₂ O _{dd}
Auftragspuffer	0,1% (w/v) Bromphenolblau 0,1% (w/v) Xylenblau 50% (v/v) Glycerin
Blockreagenz	10% (w/v) Milchpulver in 1x TBS-T _{0,5}
IPTG-Lösung	0,1 M IPTG in H ₂ O
Chlorbleiche	10% (v/v) Chlorbleiche 0,2% (w/v) SDS
Chloroform	Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)
Co ²⁺ -Elutionspuffer 1, denat.	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 4,5 8 M Harnstoff 20 mM Tris-HCl pH 6,3 100 mM NaCl
Co ²⁺ -Elutionspuffer 1, nativ	20 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl 50 mM Imidazol

Material und Methoden

Bezeichnung	Zusammensetzung
Co ²⁺ -Elutionspuffer 2, denat.	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 4,5 8 M Harnstoff 20 mM Tris-HCl pH 4,5 100 mM NaCl
Co ²⁺ -Elutionspuffer 2, nativ	20 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl 100 mM Imidazol
Co ²⁺ -Lysepuffer, denat.	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8,0 10 mM Tris-HCl pH 8,0 6 M GuHCl 100 mM NaCl
Co ²⁺ -Waschpuffer, denat.	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,0 8 M Harnstoff 100 mM NaCl
Co ²⁺ -Waschpuffer, nativ	20 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl 5 mM Imidazol
Coomassie Brilliant Blue	45% (v/v) H ₂ O 45% (v/v) Methanol 10% (v/v) Eisessig 92% (w/v) Coomassie
Denaturierungspuffer	6 M GuHCl 100 mM DTT 2 mM EDTA 100 mM Tris-HCl pH 8,8
Denhardt-Reagenz (100x)	2% (w/v) Ficoll 2% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP) 2% (w/v) BSA
Dialysepuffer	10 mM Tris-HCl pH 9,5 5 mM MgCl ₂ 25% (v/v) Glycerin 10 mM DTT 5 mM EDTA 50 µg/µl Pefabloc
EMSA-Bindepuffer (5x)	75 mM Tris-HCl pH 8,0 300 mM NaCl 15 mM MgCl ₂ 10 µM ZnCl ₂ 50 mM DTT 0,25% (v/v) Triton-X-100 20% (v/v) Glycerin

Bezeichnung	Zusammensetzung
Entfärbelösung	73% (v/v) H ₂ O 20% (v/v) Methanol 7% (v/v) Essigsäure
Fixierlösung	10,9 mM MES 300 mM Mannitol in H ₂ O, pH 5,6 (NaOH)
Gelfiltration-Laufpuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,3 150 mM NaCl 3 mM MgCl ₂ 0,2% (v/v) Triton-X-100 10% (v/v) Glycerin filtriert und entgast
He-Puffer	2,5 M LiCl 50 mM Tris-HCl pH 8,0 4% (v/v) Triton-X-100 62,5 mM EDTA
Hybridisierungslösung	6x SSPE 5x Denhardts Reagenz 0,1% (w/v) SDS 10 mM EDTA 100 µg/ml sonifizierte, denaturierte ST-DNA
IB-0	50 mM Tris-HCl pH 8,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 10% (v/v) Glycerin
IB-1	20 mM Tris-HCl pH 8,5 1 mM EDTA 0,2% (v/v) Triton-X-100
IB-2	20 mM Tris-HCl pH 8,5 2 mM MgCl ₂ 0,5% (v/v) Triton-X-100
IB-3	20 mM Tris-HCl pH 8,5 0,5 M NaCl 5 mM EDTA 0,5% (v/v) Triton-X-100

Material und Methoden

Bezeichnung	Zusammensetzung
K3	0,362% (w/v) Kao und Michayluk Mikro- und Makro-Salze (Duchefa) 3 mM CaCl ₂ ·2 H ₂ O 6 mM KNO ₃ 4,4 mM NH ₄ NO ₃ 1 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,8 mM MgSO ₄ 0,1% (v/v) Vitamin Stock (Duchefa, 8 mM Nicotinsäure, 5 mM Pyridoxin HCl, 30 mM ThiaminHCl) 1% (v/v) Ca-Phosphat-Stock, Fluka (36,6 mM CaHPO ₄ ·2 H ₂ O, pH 3,0 mit 25% HCl) 0,6 mM myo-Inosit (Sigma) 1,7 mM D(+)-Xylose (Sigma) 0,4 M Saccharose (Duchefa) pH 5,6 mit 1 M KOH einstellen 0,001% (w/v) NAA-Stock (Sigma) 0,002% (w/v) Kinetin-Stock (Sigma) Osmolarität 0,56 +/- 0,02, sterilfiltriert Osmomat 030 (Gonotec)
Kanamycin-Lösung	50 mg/ml Kanamycin, sterilfiltriert
Laemmli-Laufpuffer (10x)	0,25 M Tris 0,5 M Glycin 1% (w/v) SDS
Laemmli-Probenpuffer (2x)	1% (w/v) DTT 4% (w/v) SDS 140 mM Tris-HCl pH 6,8 20% (v/v) Glycerin 0,01% (v/v) Bromphenolblau
Li-Acetat	1 M LiAc pH 7,5 mit 2% (v/v) Essigsäure
Ligase-Puffer (5x)	250 mM Tris-HCl pH7,6 50 mM MgCl ₂ 5 mM ATP 5 mM DTT 25% (w/v) PEG 8000
Lösung 1	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA
Lösung 2	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS
Lösung 3	3 M NaOAc pH 5,2
low ionic strength Puffer	8 mM Tris-HCl pH 8,0 3,3 mM Natriumacetat 1 mM EDTA

Bezeichnung	Zusammensetzung
Co ²⁺ -Lysepuffer, denat.	50 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8,0 10 mM Tris-HCl pH 8,0 6 M GuHCl 100 mM NaCl
Ma-Mg-Lösung	0,4 M Mannit 15 mM MgCl ₂ ·6H ₂ O 0,1% (w/v) MES pH 5,6 (KOH); sterilfiltriert
Na-Phosphatpuffer	20,4 mM NaH ₂ PO ₄ 29,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,0, sterilfiltriert
Paraformaldehyd/PBS	4% (w/v) Paraformaldehyd in 1x PBS
PBS (10x)	1,37 M NaCl 130 mM KCl 81 mM Na ₂ HPO ₄ 15 mM KH ₂ PO ₄
PBS-T	0,5% (v/v) Tween 20 in 1x PBS
PEG 6000	40% (w/v) PEG ₆₀₀₀ 0,1 M Ca(NO ₃)·H ₂ O 0,4 M Mannit pH 9,0-9,4 (0,1 M KOH); sterilfiltriert
PEG/LiAc	40% (w/v) PEG ₃₃₅₀ 0,1M LiAc in 1x TE pH7,5; sterilfiltriert
Phenol/Chloroform	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)
poly(dI-dC)	1 µg/µl in H ₂ O _{dd} , sonifiziert
Poly-L-Lysin	Poly-L-Lysin (Sigma) 1:10 in H ₂ O
Puffer A	2,5% (w/v) Ficoll 400 5% (w/v) Dextran T40 0,5% (v/v) Triton-X-100 25 mM Tris-HCl pH 8,0 25 mM EDTA 0,44 M Saccharose 10 mM DTT 2 mM Spermin

Material und Methoden

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer B	10 mM Tris-HCl pH 9,5 5 mM MgCl ₂ 25% Glycerin 10 mM DTT 5 mM EDTA 1 mM PMSF 2 mM DTT
Renaturierungspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,8 50 mM NaCl 2 mM Mg ₂ Cl 5 µM ZnCl ₂ 0,2% (v/v) Triton-X-100 5 mM Glutathion red. 0,5 mM Glutathion oxid. 10% (v/v) Glycerin
Sonifizierungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl
SSC (20x)	300 mM Na-Citrat pH 7,0 3 M NaCl pH 7 (NaOH)
SSPE (20x)	0,4 M EDTA 4 M NaH ₂ PO ₄ ·2 H ₂ O 60 M NaCl pH 7,4 (NaOH)
STE-Puffer (2x)	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl pH 8 10 mM EDTA
STET	10 mM Tris-HCl pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA 5% (v/v) Triton-X-100
Stop-Puffer	100 mM EDTA 1% (w/v) SDS 0,02% (w/v) Bromphenolblau
Substratlösung	2 mM 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronid (X-Gluc) in 50 mM Na-Phosphat-Puffer
TBE (10x)	1 M Tris-Borat pH 7,9 20 mM EDTA
TBS-T _{0,1} (10x)	0,2 M Tris-HCl pH 7,6 1,37 M NaCl 0,1% (v/v) Tween-20

Bezeichnung	Zusammensetzung
TE (10x)	100 mM Tris-HCl pH 7,9 10 mM EDTA
TFB-I	30 mM KOAc 50 mM MnCl ₂ 100 mM RbCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerin
TFB-II	10 mM MOPS pH 7,0 10 mM RbCl ₂ 15 mM CaCl ₂
TTE (20x)	1,78 M Tris 0,57 M Taurin 2,7 mM EDTA
Chlorbleiche	10% (v/v) Chlorbleiche 0,2% (w/v) SDS
W5	154 mM NaCl 125 mM CaCl ₂ 5 mM KCl

5.1.5 Medien

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
<i>E. coli</i> -Medien	
LB-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7,5 (NaOH) 15g/l Agar
NZCYM-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	10 g/l NZ-Amine 5 g/l Hefeextrakt 1 g/l Casaminoäuren 2 g/l MgSO ₄ ·H ₂ O

Bezeichnung	Zusammensetzung
<i>S.cerevisia</i> -Medien	
YPD-Medium	20 g/l Bacto Pepton 10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Glucose pH 6,5 20 g/l Agar
SGal-Medium (+/- Adenin)	1,7 g/l YNB 5 g/l Ammoniumsulfat 20 g/l Galactose 30 mg/l Histidin +/- 30 mg/l Adenin pH 6,5 20 g/l Agar
ura ⁻ -Medium	2 g/l YNB 5,5 g/l Ammoniumsulfat 11g /l Casaminosäuren 20 g/l Glucose 55 mg/l Thyrosin 50 mg/l Tryptophan 50 mg/l Leucin 10 mg/l Adenin pH 6,5 22 g/l Agar
Petunien-Medium	
Gamborg`s B5-Medium	3,1 g/l „Gamborg`s basic“ Salze (Sigma) 20 g/l Saccharose pH 5,6 (KOH) 8 g/l Agar

5.1.6 Oligonukleotide

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Nummer	Sequenz 5`→ 3`	Verwendung
PLo085	CCTATTCTCACCCAACCTGCAAGGGATG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase I704A
PLo086	CATCCCTTGCAGGTTGGGTGAGAATAGG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase I704A
PLo089	GAGATTGTTGAAGCTCCGATATGCACAAAAG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase L744P

Nummer	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
PLo090	CTTTTGTGCATATCGGAGCTTCAACAATCTC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase L744P
RA-o001	ACCGTTACCGACCGTTTTTCATCCCTATCTCCA TGAGCTGCGGGA	3'-Ende <i>Ac</i> in wx-m9, 3 subterminale Bindestellen für die TPase, 11 bp TIR, 8bp target site duplication, Substrat für <i>in vitro</i> -Assay
RA-o006	ACCGTTACCGACCGTTTTTCATCTGAGTCTCCA TGAGCTGCGGGA	Wie RA-o001, aber mu- tierter TIR (Hehl und Baker, 1989), neg. Kontrolle für <i>in vitro</i> - Assay
RA-o009	TCCCGCAGCTCATGGAGATAGGGATGAAAAC GGTCGGTAACGGT	Komplementär zu RA- o001, Substrat für <i>in vitro</i> - Assay
RA-o010	TCCCGCAGCTCATGGAGACTCAGATGAAAAC GGTCGGTAACGGT	Komplementär zu RA- o006, Substrat für <i>in vitro</i> - Assay, Negativkontrolle
RA-o011	GATAGGGATGAAAACGGTCGGTAACGGT	Komplementär zur ersten Hälfte von RA-o001, er- gibt mit RA-o001 und RA- o012 Substrat für <i>in vitro</i> - Assay mit Einzel- strangbruch
RA-o012	TCCCGCAGCTCATGG	Komplementär zur zweiten Hälfte von RA-o001, er- gibt mit RA-o001 und RA- o011 Substrat für <i>in vitro</i> - Assay mit Einzelstrang- bruch
RA-o013	GA CTCAGATGAAAACGGTCGGTAACGGT	Komplementär zur ersten Hälfte von RA-o006, er- gibt mit RA-o006 und RA- o012 Negativkontrolle für <i>in vitro</i> -Assay mit Einzel- strangbruch
RA-o015	CAGGGATGAAAGTAGGATGGGAAAATCCCG	Amplifizierung von Mini- <i>Ds</i> (<i>Ds</i> 2ok)
RA-o016	GATCCCGGTGAAACGGTCGGGAAACTAGA	Amplifizierung von 5'- Ende <i>Ac</i> (1-185) (<i>Ds</i> 22)
RA-o017	GATCGTATCGGTTTTTCGATTACCGTATTTA	Amplifizierung von 3'- Ende <i>Ac</i> (4419-4565) (<i>Ds</i> 1(T)2)
RA-o020	GCAGAATATGCTATTGCCACCCAAATTGC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase P699A L701A
RA-o021	GCAATTTGGGTGGCAATAGCATATTCTGC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase P699A L701A

Nummer	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
RA-o022	GATATTTTATCAGCGGCGAGGGGAAGGG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase W690A W691A
RA-o023	CCCTTCCCCTCGCCGCTGATAAAATATC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase W690A W691A
RA-o024	CACCCAAATTCCAAGGGATGTGC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase A705P
RA-o025	GCACATCCCTTGAATTTGGGTG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase A705P
RA-o026	GTTGATCCTTACGCCAATCGTCTTGG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase R733A
RA-o027	CCAAGACGATTGGCGGTAAGGATCAAC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase R733A
RA-o028	CAAATTGCAAGGGATGCGGCAGCAATACA AGTG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase V708A L709A
RA-o029	CACTTGTATTGCTGCCGCATCCCTTGCAATTT GG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase V708A L709A
RA-o035	GGTTATGCCGGTACTGCC	Sequenzieren von pET Vektoren
RA-o037	TCAAGATCATATGGCTATTGT	<i>Nde</i> I-Schnittstelle 5' von Position 307 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o042	CCTGATCACAAAGACAAGGCAAACAA	<i>Bcl</i> I-Schnittstelle 3' von Position 1200 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o043	GCTGATCAATCATCAATCCAATGGATGG	<i>Bcl</i> I-Schnittstelle 3' von Position 963 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o044	CGTGATCAAACATCTTTTAGTTTTCC	<i>Bcl</i> I-Schnittstelle 3' von Position 876 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o048	CAGTGCTGGTGCTCGTGTTGTTGATCC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase G726A
RA-o049	GGATCAACAACACGAGCACCAGCACTG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase G726A
RA-o050	CAATATTGTAGAACATGCGTACTTTGTTGAG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase E249A
RA-o051	CTCAACAAAGTACGCATGTTCTACAATATTG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase E249A
RA-o052	GCTTTTTTTCATGTTGCAGGGCGCCACACTGG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase E336A
RA-o053	CCAGTGTGGCGCCCTGCAACATGAAAAAAGC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase E336A
RA-o054	CGGAGATTGTTGCAGCTTTGATATGCAA	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase E742A
RA-o055	GTGCATATCAAAGCTGCAACAATCTCCG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase E742A

Nummer	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
RA-o056	CGTGATCAGTCTTTGCCATGATCC	<i>Bcl</i> I-Schnittstelle 3' von Position 643 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o057	CGTGATCAGTACTCATGTTCTAC	<i>Bcl</i> I-Schnittstelle 3' von Position 750 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o058	CCACAGCATATGGCAAAGAAGTGCAC	<i>Nde</i> I-Schnittstelle 5' von Position 406 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o061	CGTGATCAGTGATTTTCGAAATCC	<i>Bcl</i> I-Schnittstelle 3' von Position 573 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o065	CGTGATCAATCCATCTAGTTGAGAC	<i>Bcl</i> I-Schnittstelle 3' von Position 1395 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o066	GGAAAATGAAGATGCTGAATTC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase D650A
RA-o067	GAAATTCAGCATCTTCATTTTCC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase D650A
RA-o068	CCCAAATTGCAAGGGCTGTGCTAGC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase D707A
RA-o069	GCTAGCACAGCCCTTGCAATTTGGG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase D707A
RA-o070	GATATGCACAGCAGATTGGGTAGC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase K748A
RA-o071	GCTACCCAATCTGCTGTGCATATC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase K748A
RA-o072	GCTAGCAATACAAGTGGCAACTGTTGC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase S714A
RA-o073	GCAACAGTTGCCACTTGTATTGCTAGC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase S714A
RA-o075	CCACAGCATATGTTGAGAACATCACATAG	<i>Nde</i> I-Schnittstelle 5' von Position 576 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o077	CCACAGCATATGGAGGTCGATGGAAAG	<i>Nde</i> I-Schnittstelle 5' von Position 465 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o079	CCACAGCATATGGCTAAGTATAGGGC	<i>Nde</i> I-Schnittstelle 5' von Position 525 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o081	GGGATCTCATATGCTGTCTCAACTAGATGG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase D459A
RA-o082	CCATCTAGTTGAGACAGCATATGAGATCCC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase D459A
RA-o083	GTGAGATAAAGGCTTTGATTGACC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase D542A
RA-o084	GGTCAATCAAAGCCTTTATCTCAC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase D542A

Nummer	Sequenz 5' → 3'	Verwendung
RA-o085	GGATTTGATTGCCCAATGGTGTGTTC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase D545A
RA-o086	GAACACACCATTGGGCAATCAAATCC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase D545A
RA-o087	CTGTTGCTTCTGCGTCTGCGTTCAGTGC	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase E719A
RA-o088	GCACTGAACGCAGACGCAGAAGCAACAG	Mutageneseprimer <i>Ac</i> -TPase E719A
RA-o092	CGTGATCAAGATTGGTGTCTCCAAAAAAG	<i>Bcl</i> I-Schnittstelle 5' von Position 963 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o093	CGTGATCAAGATAATGCTAGTGCAAATGAAG	<i>Bcl</i> I-Schnittstelle 5' von Position 1101 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o096	CCACAGCATATGCTAAAAAGTGAAAAGGATC	<i>Nde</i> I-Schnittstelle 5' von Position 615 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o097	CGTGATCAAGATGTCCACATATCCATAG	<i>Bcl</i> I-Schnittstelle 3' von Position 915 im ORFa der <i>Ac</i> -TPase
RA-o098	CTCCTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG	Sequenzierung von pWL79/80
RA-o099	AAGAAGCCATATAAGTCTACTAGC	Amplifizierung Mini- <i>Ds</i> , 329-352
RA-0100	TGTTAGCCAAGAGCCCAAGACTTATCAC	Amplifizierung Mini- <i>Ds</i> , 354-381

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert.

5.1.7 Plasmide

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Bezeichnung	Selektions- marker	Referenz	Anmerkung
pBR322	Amp ^R	(Watson, 1988)	Ziel-DNA in <i>in vitro</i> -System
pBS- Tetramer	Amp ^R	(Kaufman und Rio, 1992)	Rezipientenplasmid <i>in vitro</i> -System
pcATG10	Amp ^R	(Kunze <i>et al.</i> , 1993)	Pflanzenexpressionsvektor für TPase ₁₀₃₋₈₀₇ , starke Expression
pcATG3-10	Amp ^R	(Kunze <i>et al.</i> , 1993)	Pflanzenexpressionsvektor schwache Expression TPase ₁₀₃₋₈₀₇

Bezeichnung	Selektions- marker	Referenz	Anmerkung
pDs/Amp	Amp ^R /Km ^R	R. Kunze, unveröffentlicht	Exzisionsplasmid <i>in vitro</i> -System
pET15b	Amp ^R	Novagen	Induzierbarer <i>E.coli</i> -Expressionsvektor
pET3a	Amp ^R	Novagen	Induzierbarer <i>E.coli</i> -Expressionsvektor
pLE112	Amp ^R	(Essers, 1996)	Induzierbarer <i>E.coli</i> -Expressionsvektor für TPase _{His674-777}
pNT150 MiniDs, f.ori	Amp ^R	(F. Ros und R.Kunze, 2000)	Kontrollplasmid <i>in vivo</i> -System Petunien
pORF (H-1-807)	Amp ^R	R. Kunze, unveröffentlicht	Induzierbarer <i>E.coli</i> -Expressionsvektor für TPase _{His1-807}
pORF (H-103-807)	Amp ^R	R. Kunze, unveröffentlicht	Induzierbarer <i>E.coli</i> -Expressionsvektor für TPase _{His103-807}
pORFa (H103-465)	Amp ^R	R. Kunze, unveröffentlicht	Induzierbarer <i>E.coli</i> -Expressionsvektor für TPase _{His103-465}
pP1-Ds	Amp ^R /Km ^R	(Pal und Chatteraj, 1988)	Donorplasmid <i>in vitro</i> -System
pTY/DIR (DH5 α)	Amp ^R	(F. Ros und R.Kunze, 2000)	Reporterplasmid <i>in vivo</i> -System Petunien mit Replikon
pUB408	Amp ^R	(Kunze <i>et al.</i> , 1993)	Pflanzenexpressionsvektor für TPase _{His103-807/585TR}
pWL79R	Amp ^R	(Weil und Kunze, 2000)	induzierbarer Expressionsvektor für TPase ₁₀₃₋₈₀₇ in <i>S.cerevisiae</i> , GAL10-Promotor
pWL80R	Amp ^R	(Weil und Kunze, 2000)	induzierbarer Expressionsvektor für TPase ₁₀₃₋₈₀₇ in <i>S.cerevisiae</i> , GAL5- Promotor

5.1.8 Plasmidkonstruktionen

Tabelle 11: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide. Punktmutationen wurden mit Hilfe des Quick change mutagenesis kit (Stratagene) nach Angaben des Herstellers in den jeweiligen Ausgangsvektor eingeführt.

Bezeichnung	Selektionsmarker	Verwendung und Klonierung
pcATG10-(P699A/L701A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/P699A/L701A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o020 und RA-o021 Ausgangsvektor: pcATG10
pcATG10-(W690A/W691A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/W690A/W691A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o022 und RA-o023 Ausgangsvektor: pcATG10
pcATG10-(A705P)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/A705P} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o024 und RA-o025 Ausgangsvektor: pcATG10
pcATG10-(R733A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/R733A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o026 und RA-o027 Ausgangsvektor: pcATG10
pcATG10-(V708A/L709A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/V708A/L709A} in Petunienprotoplasten. Mutageneseprimer: RA-o028 und RA-o029 Ausgangsvektor: pcATG10
pcATG10-(I704P/V708A/L709A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/I704P/V708A/L709A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: PLo85 und PLo86 Ausgangsvektor: pcATG10-(V708A/L709A)
pcATG10-(V708A/L709A/L744P)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/V708A/L709A/L744P} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: PLo89 und PLo90 Ausgangsvektor: pcATG10-(V708A/L709A)
pcATG10-(G726A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/G726A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o048 und RA-o049 Ausgangsvektor: pcATG10
pcATG10-(I704P)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/I704P} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: PLo85 und PLo86 Ausgangsvektor: pcATG10
pcATG10-(E249A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/E249A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o050 und RA-o051 Ausgangsvektor: pcATG10

Bezeichnung	Selektions- marker	Verwendung und Klonierung
pcATG10-(E336A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/E336A} in Petunien- protoplasten Mutageneseprimer: RA-o052 und RA-o053 Ausgangsvektor: pcATG10
pcATG10-(D459A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/D459A} in Petunien- protoplasten Mutageneseprimer: RA-o081 und RA-o082 Ausgangsvektor: pcATG10
pcATG10-(D545A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/D545A} in Petunien- protoplasten. Mutageneseprimer: RA-o085 und RA-o086 Ausgangsvektor: pcATG10
pcATG10- (E249A/E336A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/E249A/E336A} in Petunien- protoplasten. Der Vektor pcATG10-(E336A) wurde <i>PflM I/Xho</i> I-verdaut und das entstehende Fragment wurde in den <i>PflM I/Xho</i> I-verdauten Vektor pcATG10-(E249A) eingesetzt.
pcATG10- (D459A/D545A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/D459A/D545A} in Petunien- protoplasten. Der Vektor pcATG10-(D545A) wurde <i>Bsg I/Xho</i> I-verdaut und das entstehende Fragment wurde in den <i>Bsg I/Xho</i> I-verdauten Vektor pcATG10-(D459A) eingesetzt.
pcATG10- (E249A/E336A/D459A/ D545A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/E249A/E336A/D459A/D545A} in Petunienprotoplasten. Der Vektor pcATG10- (D459A/D545A) wurde <i>BsaB I/Xho</i> I-verdaut und das entstehende Fragment wurde in den <i>BsaB I/ Xho</i> I-verdauten Vektor pcATG10-(E249A/ E336A) eingesetzt.
pcATG3-10-(E249A)	Amp ^R	Schwache Expression der TPase _{103-807/E249A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o050 und RA-o051 Ausgangsvektor: pcATG3-10
pcATG3-10-(E336A)	Amp ^R	Schwache Expression der TPase _{103-807/E336A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o052 und RA-o053 Ausgangsvektor: pcATG3-10
pcATG3-10-(D459A)	Amp ^R	Schwache Expression der TPase _{103-807/D459A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o081 und RA-o082 Ausgangsvektor: pcATG3-10
pcATG3-10-(D545A)	Amp ^R	Schwache Expression der TPase _{103-807/D545A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o085 und RA-o086 Ausgangsvektor: pcATG3-10

Bezeichnung	Selektionsmarker	Verwendung und Klonierung
pcATG3-10-(E249A/E336A)	Amp ^R	Schwache Expression der TPase _{103-807/E249A/E336A} in Petunienprotoplasten. Der Vektor pcATG10-(E336A) wurde <i>PflM I/Xho</i> I-verdaut und das entstehende Fragment wurde in den <i>PflM I/Xho</i> I-verdauten Vektor pcATG3-10-(E249A) eingesetzt.
pcATG3-10-(D459A/D545A)	Amp ^R	Schwache Expression der TPase _{103-807/D459A/D545A} in Petunienprotoplasten. Der Vektor pcATG10-(D545A) wurde <i>Bsg I/Xho</i> I-verdaut und das entstehende Fragment wurde in den <i>Bsg I/Xho</i> I-verdauten Vektor pcATG3-10-(D459A) eingesetzt.
pcATG3-10-(E249A/E336A/D459A/D545A)	Amp ^R	Schwache Expression der TPase _{103-807/E249A/E336A/D459A/D545A} in Petunienprotoplasten. Der Vektor pcATG3-10-(D459A/D545A) wurde <i>BsaB I/Xho</i> I-verdaut und das entstehende Fragment wurde in den <i>BsaB I/Xho</i> I-verdauten Vektor pcATG3-10-(E249A/E336A) eingesetzt.
pcATG10-(E249A/R733A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/E249A/R733A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o050 und RA-o051 Ausgangsvektor: pcATG10-(R733A)
pcATG10-(E336A/R733A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/R733A/E336A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o052 und RA-o053 Ausgangsvektor: pcATG10-(R733A)
pcATG10-(D459A/R733A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/R733A/D459A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o081 und RA-o082 Ausgangsvektor: pcATG10-(R733A)
pcATG10-(D545A/R733A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/R733A/D545A} in Petunienprotoplasten Mutageneseprimer: RA-o085 und RA-o086 Ausgangsvektor: pcATG10-(R733A)
pcATG10-(E249A/E336A/R733A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/E249A/E336A/R733A} in Petunienprotoplasten. Der Vektor pcATG10-(E336A/R733A) wurde <i>PflM I/Xho</i> I-verdaut und das entstehende Fragment wurde in den <i>PflM I/Xho</i> I-verdauten Vektor pcATG3-10-(E249A/R733A) eingesetzt.
pcATG10-(D459A/D545A/R733A)	Amp ^R	Expression der TPase _{103-807/D459A/D545A/R733A} in Petunienprotoplasten. Der Vektor pcATG10-(D545A/R733A) wurde <i>Bsg I/Xho</i> I-verdaut und das entstehende Fragment wurde in den <i>Bsg I/Xho</i> I-verdauten Vektor pcATG10-(D459A/R733A) eingesetzt.

Bezeichnung	Selektions- marker	Verwendung und Klonierung
pcATG10- (E249A/E336A/D459A/ D545A/R733A)	Amp ^R	Expression der TPase ₁₀₃₋₈₀₇ , E249A/E336A/D459A/D545A/ R733A in Petunienprotoplasten. Der Vektor pcATG10-(D459A/D545A/R733A) wurde <i>BsaB</i> I/ <i>Xho</i> I-verdaut und das entstehende Fragment wurde in den <i>BsaB</i> I/ <i>Xho</i> I-verdauten Vektor pcATG10-(E249A/E336A/R733A) eingesetzt.
pORFa-(H674-777/ P699A/L701A)	Amp ^R	Expression des TPase-Fragments TPase _{His674-777/ P699A/L701A} in <i>E.coli</i> Mutageneseprimer: RA-o020 und RA-o021 Ausgangsvektor: pLE112
pORFa-(H674-777/ W690A/W691A)	Amp ^R	Expression des TPase-Fragments TPase _{His674- 777/W690A/W691A} in <i>E.coli</i> Mutageneseprimer: RA-o022 und RA-o023 Ausgangsvektor: pLE112
pORFa-(H674-777/ A705P)	Amp ^R	Expression des TPase-Fragments TPase _{His674-777/ A705P} in <i>E.coli</i> Mutageneseprimer: RA-o024 und RA-o025 Ausgangsvektor: pLE112
pORFa-(H674-777/ R733A)	Amp ^R	Expression des TPase-Fragments TPase _{His674-777/ R733A} in <i>E.coli</i> Mutageneseprimer: RA-o026 und RA-o027 Ausgangsvektor: pLE112
pORFa-(H674-777/ V708A/L709A)	Amp ^R	Expression des TPase-Fragments TPase _{His674-777/ V708A/L709A} in <i>E.coli</i> Mutageneseprimer: RA-o028 und RA-o029 Ausgangsvektor: pLE112
pORFa-(H674-777/ I704P/V708A/L709A)	Amp ^R	Expression des TPase-Fragments TPase _{His674-777/ I704P/V708A/L709A} in <i>E.coli</i> Mutageneseprimer PLo85 und PLo86 Ausgangsvektor: pORFa(H674-777/V708A/ L709A)
pORFa-(H674-777/ V708A/L709A/L744P)	Amp ^R	Expression des TPase-Fragments TPase _{His674-777/ V708A/L709A/L744P} in <i>E.coli</i> Mutageneseprimer: PLo89 und PLo90 Ausgangsvektor: pORFa-(H674-777/V708A/ L709A)
pORFa-(H674-777/ I704P)	Amp ^R	Expression des TPase-Fragments TPase _{His674-777/ I704P} in <i>E.coli</i> Mutageneseprimer: PLo85 und PLo86 Ausgangsvektor: pLE112
pORFa-(H674-777/ I744P)	Amp ^R	Expression des TPase-Fragments TPase _{His674-777/ I744P} in <i>E.coli</i> Mutageneseprimer: PLo89 und PLo90 Ausgangsvektor: pLE112

Bezeichnung	Selektionsmarker	Verwendung und Klonierung
pORFa-(H136-465)	Amp ^R	Die TPase-Region 136-465 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o058 und RA-o065 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H103-366)	Amp ^R	Die TPase-Region 103-366 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o037 und RA-o042 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H103-321)	Amp ^R	Die TPase-Region 103-321 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o037 und RA-o043 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H136-321)	Amp ^R	Die TPase-Region 136-321 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o058 und RA-o043 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H175-321)	Amp ^R	Die TPase-Region 175-321 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o079 und RA-o043 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H103-292)	Amp ^R	Die TPase-Region 103-292 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o037 und RA-o044 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H136-292)	Amp ^R	Die TPase-Region 136-292 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o058 und RA-o044 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H192-292)	Amp ^R	Die TPase-Region 192-292 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o075 und RA-o044 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.

Bezeichnung	Selektionsmarker	Verwendung und Klonierung
pORFa-(H103-250)	Amp ^R	Die TPase-Region 103-250 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o037 und RA-o057 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H136-250)	Amp ^R	Die TPase-Region 136-250 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o058 und RA-o057 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H155-250)	Amp ^R	Die TPase-Region 155-250 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o077 und RA-o057 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H103-214)	Amp ^R	Die TPase-Region 103-214 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o038 und RA-o056 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H103-191)	Amp ^R	Die TPase-Region 103-191 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o038 und RA-o061 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H136-191)	Amp ^R	Die TPase-Region 136-191 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o058 und RA-o061 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H205-305)	Amp ^R	Die TPase-Region 205-305 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o096 und RA-o097 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde I/Bcl I</i> -verdaut und in den <i>Nde I/BamH I</i> -geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H322-465)	Amp ^R	Die TPase-Region 322-465 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o092 und RA-o065 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Bcl I</i> -verdaut und in den <i>BamH I</i> -geschnittenen, dephosphorylierten Expressionsvektor pET15b eingesetzt.

Bezeichnung	Selektions- marker	Verwendung und Klonierung
pORFa-(H367-465)	Amp ^R	Die TPase-Region 367-465 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o092 und RA-o065 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Bcl</i> I-verdaut und in den <i>Bam</i> H I-geschnittenen, dephosphorylierten Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pORFa-(H499-630)	Amp ^R	Die TPase-Region 499-630 wurde mit den ORFa-spezifischen Oligonukleotiden RA-o094 und RA-o095 PCR-amplifiziert (<i>Pfu</i> , Stratagene). Das Fragment wurde <i>Nde</i> I/ <i>Bcl</i> I-verdaut und in den <i>Nde</i> I/ <i>Bam</i> H I-geschnittenen Expressionsvektor pET15b eingesetzt.
pWL79-E249A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/E249A} in <i>S. cerevisiae</i> Mutageneseprimer: RA-o050 und RA-o051 Ausgangsvektor: pWL79
pWL79-E336A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/E336A} in <i>S. cerevisiae</i> Mutageneseprimer: RA-o052 und RA-o053 Ausgangsvektor: pWL79
pWL79-D459A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/D459A} in <i>S. cerevisiae</i> Mutageneseprimer: RA-o081 und RA-o082 Ausgangsvektor: pWL79
pWL79-D542A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/D542A} in <i>S. cerevisiae</i> Mutageneseprimer: RA-o083 und RA-o084 Ausgangsvektor: pWL79
pWL79-D545A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/D545A} in <i>S. cerevisiae</i> Mutageneseprimer: RA-o085 und RA-o086 Ausgangsvektor: pWL79
pWL79-D650A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/E650A} in <i>S. cerevisiae</i> Mutageneseprimer: RA-o066 und RA-o067 Ausgangsvektor: pWL79
pWL79-D707A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/E707A} in <i>S. cerevisiae</i> Mutageneseprimer: RA-o068 und RA-o069 Ausgangsvektor: pWL79
pWL79-S714A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/S714A} in <i>S. cerevisiae</i> Mutageneseprimer: RA-o072 und RA-o073 Ausgangsvektor: pWL79
pWL79-E719A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/E719A} in <i>S. cerevisiae</i> Mutageneseprimer: RA-o087 und RA-o088 Ausgangsvektor: pWL79

Bezeichnung	Selektions- marker	Verwendung und Klonierung
pWL79-E742A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/E742A} in <i>S. cerevisiae</i> Mutageneseprimer: RA-o054 und RA-o055 Ausgangsvektor: pWL79
pWL79-K748A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/E748A} in <i>S. cerevisiae</i> Mutageneseprimer RA-o070 und RA-o071 Ausgangsvektor: pWL79
pWL80-E249A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/E249A} in <i>S. cerevisiae</i> . Der Vektor pWL79-E249A wurde <i>BamH</i> I-verdaut. Das entstehende Fragment wurde in den <i>BamH</i> I-verdauten und dephosphorylierten Vektor pWL80 kloniert.
pWL80-E336A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/E336A} in <i>S. cerevisiae</i> . Der Vektor pWL79-E336A wurde <i>BamH</i> I-verdaut. Das entstehende Fragment wurde in den <i>BamH</i> I-verdauten und dephosphorylierten Vektor pWL80 kloniert.
pWL80-D459A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/D459A} in <i>S. cerevisiae</i> . Der Vektor pWL79-D459A wurde <i>BamH</i> I-verdaut. Das entstehende Fragment wurde in den <i>BamH</i> I-verdauten und dephosphorylierten Vektor pWL80 kloniert.
pWL80-D545A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/D545A} in <i>S. cerevisiae</i> . Der Vektor pWL79-D545A wurde <i>BamH</i> I-verdaut. Das entstehende Fragment wurde in den <i>BamH</i> I-verdauten und dephosphorylierten Vektor pWL80 kloniert.
pWL80-E719A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/D719A} in <i>S. cerevisiae</i> . Der Vektor pWL79-E719A wurde <i>BamH</i> I-verdaut. Das entstehende Fragment wurde in den <i>BamH</i> I-verdauten und dephosphorylierten Vektor pWL80 kloniert.
pWL80-E249A/E336A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/E249A/E336A} in <i>S. cerevisiae</i> . Der Vektor pWL80-E249A wurde <i>Spe</i> I/ <i>Pf</i> IM I doppelverdaut und das entstandene Fragment in den <i>Spe</i> I/ <i>Pf</i> IM I-verdauten Vektor pWL80-E336A eingesetzt.
pWL80-D459A/D545A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/D459A/D545A} in <i>S. cerevisiae</i> . Der Vektor pWL80-D545A wurde <i>EcoR</i> I-geschnitten und das entstehende Fragment in den <i>EcoR</i> I-geschnittenen Vektor pWL80-D459A eingesetzt.

Bezeichnung	Selektions- marker	Verwendung und Klonierung
pWL80- E249A/E336A/ D459A/D545A	Amp ^R (<i>E.coli</i>) <i>URA3</i> (<i>S.cerevisiae</i>)	Expression der TPase _{103-807/E249A/E336A/D459A/D545A} in <i>S. cerevisiae</i> . Der Vektor pWL80-E249A/E336A wurde <i>Nar I/Nhe I</i> -doppelverdaut und das entstehende Fragment in den <i>Nar I/Nhe I</i> -doppelverdauten Vektor pWL80-D459A/D545A eingesetzt.

5.2 Mikrobiologische und genetische Methoden

5.2.1 Bestimmung der Zelldichte von *E. coli*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer) bei 600 nm bestimmt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des entsprechenden Kulturmediums gemessen. Eine OD₆₀₀ von 1 entspricht ca. 1x10⁹ Zellen pro ml Kultur (je nach verwendetem Stamm und Wachstumsstadium).

5.2.2 Kultivierung und Transformation von *E. coli*

E. coli-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedium unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Das Medium der Wahl war, wenn nicht anders angegeben, LB-Medium.

Die Herstellung RbCl₂-kompetenter Zellen (BL21DE3, DH5α) erfolgte nach Hannahan (Hanahan, 1983). Die Transformation richtete sich nach Cohen *et al.* (1972). Die Elektroporation von JS4 verlief nach dem Protokoll von Sambrook *et al.*, 1989. Nach der Transformation wurden die Bakterien auf LB-Selektionsmedium ausplattiert und 16 h bei 37°C inkubiert.

5.2.3 Bestimmung der Zelldichte von *Saccharomyces cerivisiae*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer) bei 600 nm bestimmt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des entsprechenden Kulturmediums gemessen.

5.2.4 Kultivierung und Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedium unter aeroben Bedingungen bei 28°C kultiviert. Das Medium der Wahl war, wenn nicht anders angegeben, YPD-Vollmedium.

Die Transformation von *S. cerevisiae*-Stämmen erfolgte nach der Lithium-Acetat-Methode (Schiestl und Gietz, 1989; Gietz und Woods, 1994).

5.3 Molekularbiologische Standardmethoden

5.3.1 Handhabung von Nukleinsäuren

Die Handhabung von Nukleinsäuren nach Standardmethoden erfolgte nach Sambrook *et al.*, 1989. Dazu gehörten unter anderem die Phenol-/Chloroform-Extraktion und die Präzipitation von DNA, ebenso wie deren elektrophoretische Auftrennung. Restriktionsenzyme sowie DNA-modifizierende Enzyme wurden nach den Empfehlungen der jeweiligen Hersteller eingesetzt.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe von Filterfaser (für Aquarien- und Schwimmbadfilter, Falke Agrar Zoo). Durch diesen Filter wurde ein Agarosegelstück bei 13000 Upm zentrifugiert. Aus der wässrigen Lösung wurde anschließend die DNA gefällt. Auf anderem Weg wurde DNA aus Agarose-Gelen mit Hilfe des GfxTM PCR and Gel Band Purification Kit von Pharmacia unter Angaben des Herstellers gereinigt.

5.3.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Absorptionswert von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger DNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine DNA sollte dieser Wert bei ca. 1,8 liegen. Niedrigere Werte deuten Verunreinigungen durch Proteine, höhere Werte Verunreinigungen durch Salze und Zucker an.

Die Messungen erfolgten mit einem Lambda Bio UV-Spektralphotometer (Perkin Elmer).

5.3.3 Isolierung von Nukleinsäuren

Die Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des High Pure Plasmid Isolation Kits von Roche/Boehringer bzw. des QIAprep Plasmid Mini-Kit von QIAGEN jeweils nach Angaben des Herstellers. Weitere Methoden richteten sich nach den Protokollen von Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989), Birnboim und Doly (1979) oder M. He (1989).

5.3.3.1 Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA wurden der QIAprep Midi- bzw. Maxikit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

5.3.4 Mutagenese von Plasmid-DNA

Die Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNA erfolgte mit dem Quick change mutagenesis kit von Stratagene nach Angaben des Herstellers. In Abwandlung dazu wurden Reaktionsansätze in TOP10 kompetente Zellen nach Angaben des Herstellers transformiert (Invitrogen). Die eingebrachten Punktmutationen wurden durch Sequenzierung verifiziert.

5.3.5 Reinigung von DNA mit Hilfe des Cäsiumchloridgradienten

Zu je 4 ml DNA wurden 4 g CsCl gegeben. Die Lösung wurde dann in jeweils ein Zentrifugenröhrchen gefüllt (Polyallomer Quick-Seal Centrifuge Tubes, 13 x 51 mm, Beckmann). Anschließend wurden 150 µl Ethidiumbromid luftblasenfrei zugegeben. Nach dem Austarieren wurden die Röhrchen mit Hilfe eines Metalldeckelchens verschweißt. Die Zentrifugation erfolgte in einem VT180 Rotor bei 55000 Upm bei 20°C für 16 h in einer L8-55M Ultrazentrifuge. Die Bremse wurde auf DECEL 9 eingestellt.

Nach der Zentrifugation wurde die superhelikale Plasmid-DNA aus dem Röhrchen gesaugt. Dazu wurde zunächst am oberen Ende ein kleines Loch eingestochen. Dann wurde mit einer zweiten Nadel unterhalb der Zonenbande der Plasmid-DNA eingestochen und die DNA vorsichtig abgesaugt.

Die DNA wurde in einem 15 ml Falconröhrchen fünfmal mit 1 Volumen CsCl-gesättigtem Isopropanol gewaschen. Dabei bildeten sich jeweils zwei Phasen, von denen die obere die Plasmid-DNA enthielt. Zur Fällung der DNA wurden zu 1 Volumen DNA 4 Volumen H₂O und 4 Volumen Isopropanol gegeben und 15 min bei Raumtemperatur gefällt. Danach wurde für 30

min bei 15000 Upm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 500 µl Tris-HCl pH 5,6 gelöst.

5.3.6 Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA und DNA-Fragmente wurden mit einem ABI Prism 377 Sequenzierautomat von Perkin Elmer sequenziert. Die Sequenzreaktion wurde mit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction mit 30 Zyklen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip entspricht der Didesoxy-Methode nach Sanger *et al.* (1977). Im Reaktionsansatz lagen ddNTPs vor, durch deren Einbau ein Kettenabbruch erfolgte. Die verschiedenen Basen waren mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert.

Nach der Sequenzreaktion wurde die DNA gefällt. Dazu wurden zu 20 µl Reaktion 50 µl Ethanol und 2 µl NaAcetat pH 5,2 gegeben und für 30 min bei 15000 Upm (RT) zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 4 µl Formamid/25 mM EDTA (4:1) aufgenommen. Die Proben wurden vor dem Auftragen für 5 min bei 95°C gekocht.

Die Banden wurden nach der Auftrennung und Anregung durch einen Laser von einer Photozelle detektiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software des ABI 377 Systems mit einem Apple Macintosh ausgewertet. Zur Sequenzanalyse wurden folgende Programme benutzt: SequenceNavigator, DNA-Strider 1.2 und GeneWorks.

5.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen wurden in einem Standardvolumen von 50 µl angesetzt.

Ein typischer PCR-Ansatz enthielt:

- 10 ng DNA
- 40 pmol Primer 1
- 40 pmol Primer 2
- 0,2 mM dNTP
- 5 µl 10x Reaktionspuffer
- 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (AGS)

Die Reaktionen wurden in den Geräten Thermocycler Gene E, Hybaid Omnigene oder Robocycler Gradient® (Stratagene) durchgeführt. Die DNA wurde zunächst bei 95°C 5 min denaturiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation in 30 Zyklen, wovon ein Zyklus wiederum in 3 Phasen unterteilt war. Zunächst erfolgte eine Denaturierung für 20 sec bei 95°C.

Anschließend erfolgte für 20 sec das Binden der Primer an die DNA und für 1 min pro zu amplifizierenden 1 kb eine Inkubation bei 72°C. Abschließend wurde die Reaktion weitere 8 min bei 72°C inkubiert. Zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten zu Klonierungszwecken wurde die *Pfu*-Polymerase der Firma Stratagene verwendet. Für einfache Kontroll-PCR-Reaktionen wurde die *Taq*-DNA-Polymerase der Firma AGS verwendet.

5.3.8 Southernblot

DNA aus einem Exzisionsassay wurde in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 1 bis 2 min mit UV bestrahlt und dann 30 min in 0,4 M NaOH equilibriert. Die DNA wurde gemäß der Anleitung von Sambrook *et al.* durch alkalischen Kapillartransfer (Southern, 1975) auf eine Hybond-N⁺ Nylonmembran (Amersham) übertragen. Dazu wurden 12 Lagen 3MM Papier in 0,4 M NaOH getränkt. Das Gel wurde unten rechts markiert und umgekehrt auf den Stapel gelegt. Die Ränder wurden mit Plastikstreifen abgedichtet. Die Nylonmembran wurde kurz in 0,4 M NaOH getränkt und dann auf das Gel gelegt. Dann wurden wiederum 2 Lagen 3MM Papier in 0,4 M NaOH getränkt und auf die Membran gelegt, obenauf folgten 2 Lagen trockenes 3MM Papier, darauf ein Stapel Saugpapier, der leicht beschwert wurde. Der Transfer erfolgte über Nacht.

Nach dem Transfer wurde die Membran 10 min in 0,4 M NaOH gelegt, nachdem die Geltaschen und die Orientierung markiert worden waren. Anschließend wurde die Membran 2 min in 2x SSC gewaschen, auf 3MM Papier getrocknet und die DNA anschließend durch UV-Bestrahlung kovalent an die Membran gebunden. Um den Transfer zu überprüfen wurde das Gel in H₂O/Tris pH 7,6 neutralisiert und mit EtBr nachgefärbt.

Die Vorhybridisierung und Hybridisierung erfolgten bei 65°C in Hybridisierungspuffer. Die Sonde wurde mit Hilfe von Ready to go DNA labelling beads (-dCTP, Amersham-Pharmacia) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Die Membran wurde in 2x SSPE/0,5% SDS und in 0,2x SSPE/0,1% SDS gewaschen. Die Auswertung erfolgte mit einem Phosphorimager (Molecular Dynamics Storm 840).

5.4 *In vivo* Systeme zum Nachweis von Transposition

5.4.1 Petuniensystem

Die Durchführung des *in vivo*-Transpositionsassays erfolgte mit einigen Einschränkungen nach Heinlein und Houba-Hérin (Heinlein *et al.*, 1994; Houba-Hérin *et al.*, 1990).

5.4.1.1 Anziehen von sterilen Petunienpflanzen

- Sterilisieren von Petuniensamen

Petuniensamen wurden oberflächensterilisiert. Nach zweiminütiger Inkubation in 70% EtOH und zehnminütiger Inkubation in Chlorbleiche wurden die Samen zweimal 5 min mit autoklaviertem H₂O_{dd} gewaschen und anschließend getrocknet.

- Prozedur zum Anziehen von sterilen Petunienpflanzen

Die sterilisierten Samen wurden zu fünfzig Stück auf Gamborg`s-B5-Medium in einer großen Petrischale ausgelegt. Nach 10 Tagen bei 26°C in einem Lichtschrank (KBK/LS 4600, EHERET, 16 h Licht/8 h Dunkelheit-Rhythmus) wurden die Keimlinge in größere Boxen (Vitro Vent Steril Containers, Duchefa) mit gleichem Medium umgesetzt. Nach drei bis vier Wochen waren die Pflanzen im für die Protoplastierung geeigneten Stadium.

5.4.1.2 Präparation von Petunienprotoplasten

- Ansetzen der Enzymlösung

Für ca. 70 sterile Petunienblätter wurden in einer sterilen, mit Alufolie verdunkelten 100 ml-Flasche in 30 ml K3 0,45 g Cellulase (SERVA) und 0,15 g Maceroenzym gelöst (SERVA). Dazu wurde die Lösung 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung wurde anschließend in eine autoklavierte 500 ml Flasche sterilfiltriert.

- Protoplastierung

Mit einem abgeflammten Skalpell (26) und einer Pinzette wurden von sterilen Petunienpflanzen Blätter ohne Stiel abgeschnitten und in einer sterilen Petrischale einzeln in feine Streifen geschnitten. Dabei weiste die Blattoberfläche nach unten. Diese wurden dann in die Enzymlösung transferiert. Die Blätterstreifen wurden in der Flasche kurz geschwenkt und anschließend bei Raumtemperatur im Dunkeln über Nacht inkubiert.

- Protoplastenaufarbeitung

Die Protoplasten wurden für eine halbe Stunde alle 10 min geschwenkt. Dann wurden sie mit einer sterilen 10 ml Weithals-Plastikpipette in ein steriles Metallsieb (Porengröße 0,5 mm und 0,25 mm) überführt. Das Filtrat wurde wiederum mit einer sterilen 10 ml Weithals-Plastikpipette in drei 12 ml Gewebekulturröhrchen gefüllt. Das Volumen wurde unter Umständen mit K3 auf 15 ml aufgefüllt. Dann wurde 10 min bei 1000 Upm ohne Bremse zentrifugiert, wonach die Protoplasten oben auf der Lösung schwammen. Die Zelltrümmer und K3 wurden mit einer sterilen Glaskapillare abgezogen. Die Protoplasten wurden dann mit einer sterilen 10 ml Weithals-Plastikpipette in insgesamt 16 ml W5 resuspendiert und auf zwei Schraubdeckelröhrchen verteilt. Nun wurde für 10 min bei 600 Upm mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer sterilen 5 ml Plastikpipette abgenommen. Das Pellet wurde mit einer sterilen 10 ml Weithals-Plastikpipette in insgesamt 10 ml W5 resuspendiert. Zur Bestimmung der Protoplastenanzahl wurden 200 µl Protoplasten 1:5 mit W5-Medium verdünnt. Die übrigen Protoplasten ruhten dann 90 min bei 4°C.

5.4.1.3 PEG-vermittelte Transformation von Petunienprotoplasten

- Vorbereitung der zu transformierenden DNA

Insgesamt wurden in ein Schraubdeckelröhrchen 60 µg DNA in einem Volumen von 60 µl vorgelegt. Ein typischer Ansatz sah folgendermaßen aus:

10 µg pcATG10 (Transposase-Expressionsvektor)
10 µg pTY/DIR (Reporterplasmid)
40 µg ST-DNA (10 µg/µl)
x µl H₂O
60 µl

5.4.1.4 PEG-vermittelte Protoplasten-Transformation

Die Transformation erfolgte nach der Ca(NO₃)₂-PEG-Methode. Nach der Ruhezeit von 90 min bei 4°C wurden die Protoplasten 10 min bei 600 Upm zentrifugiert (Raumtemperatur). Der Überstand wurde mit einer sterilen 5 ml Plastikpipette abgenommen. Die pelletierten Protoplasten wurden in sterilfiltrierter MaMg-Lösung aufgenommen, dabei wurde eine Protoplastendichte von 10⁶ Protoplasten/300 µl eingestellt.

Je 300 µl Protoplasten wurden dann zu der vorbereiteten DNA gegeben, es wurde vorsichtig gemischt. Dann wurden langsam 300 µl PEG zugetropft und wieder vorsichtig gemischt. Der Transformationsansatz wurde 14 min inkubiert. Dann wurden langsam 5 ml W5 vorsichtig zugetropft und gemischt. Wieder wurde für 10 min bei 600 Upm zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit einer sterilen 5 ml Plastikpipette abgenommen und sofort wurde das Pellet in 5 ml K3 vorsichtig resuspendiert. Dazu wurden zunächst 2 bis 3 Tropfen zugegeben, gemischt und dann das restliche Volumen pipettiert. Die Protoplasten wurden anschließend in kleine Petrischalen überführt, die mit Parafilm verschlossen wurden und für 3 Nächte bei 26°C im Dunkeln inkubiert wurden.

5.4.1.5 *Histochemischer GUS-Nachweis*

200 ml Fixierlösung wurden mit 810 µl Formaldehyd versetzt (Endkonzentration 0,029% (v/v)) und auf kleine Petrischalen verteilt. Nitrocellulose-Filter wurden beschriftet in die Lösung gelegt. Die nassen Filter wurden dann auf zwei trockene Glasfilter gelegt, die Fixierlösung wurde dadurch abgesaugt. Anschließend wurden 200 µl Protoplasten (Kontrolle 1:10 mit Seewasser verdünnt) mit einer abgeschnittenen Spitze auf die Filter aufgebracht. Die Filter wurden 30 min auf 3MM Papier getrocknet und dann mit den Protoplasten nach unten 30 min in Fixierlösung gelegt. Nachdem die Filter zweimal 20 min in Na-Phosphat-Puffer gewaschen worden waren, wurde 1 ml Substratlösung zugegeben, die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und 16 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Filter wurden dann mit Wasser gespült und konnten mit einem Binokular ausgewertet werden. Die Transformationsrate wurde mit Hilfe des Kontrollplasmids pNT150 bestimmt.

5.4.2 *Saccharomyces cerevisiae*-System

Zur Bestimmung der Transpositionsfrequenz in Hefe wurden 11 ml SGal-Medium (+Ade, 30 mg/ml; +His, 30 mg/ml für CWY1; +Ade, 30 mg/ml; +Leu, 50 mg/ml; +Lys, 50 mg/ml für CWY2) mit einer einzelnen Transformanten angeimpft und für 3 bis 4 Tage bei 28°C inkubiert. 5 ml Kultur wurden für 2 min bei 2500 Upm (RT) abzentrifugiert, das Pellet wurde in H₂O_{dd} resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml H₂O_{dd} resuspendiert.

5.4.2.1 *Bestimmung der Lebendkeimzahl*

Von der Resuspension wurden 250er, 500er und 1000er Verdünnungen angefertigt. 1 µl dieser Verdünnungen wurden auf YPD-Vollmedium ausplattiert und 2 Tage bei 28°C inkubiert. Die ausgezählte Kolonienanzahl ergab die Lebendkeimzahl x 10⁷/ml.

5.4.2.2 *Bestimmung der Transpositionsfrequenz*

5 ml Resuspension wurden abzentrifugiert und in 500 μ l H₂O_{dd} gelöst. Die Zellen wurden dann auf SGal-Medium (-Ade/+His für CWY1; -Ade/+Leu/+Lys für CWY2) ausplattiert und zwei bis vier Wochen bei 28°C inkubiert. Nach dem Auszählen der Ade⁺-Kolonien konnte die Transpositionsfrequenz in Revertanten $\times 10^7$ /ml angegeben werden.

5.5 *Zellbiologische Methoden*

5.5.1 *In situ-Immunfluoreszenz*

Die Immunfärbung von Transposase exprimierenden Petunienprotoplasten erfolgte mit Abwandlungen nach einem Protokoll von Heinlein (Heinlein *et al.*, 1994).

5.5.1.1 *Aufbringen der Protoplasten auf Objektträger*

Zunächst wurden Objektträger mit Poly-L-Lysin nach Angaben des Herstellers beschichtet (Sigma). Dann wurden auf die Objektträger jeweils eine Filterkammer mit 4 Trichtern (Eppendorf) montiert. In jeden Trichter wurden 50 μ l Protoplasten pipettiert. Die Objektträger wurden dann 10 min bei 2000 Upm und 15°C in einer Varifuge 3.0R (Heraeus Sepatech) mit Ausschwingrotor zentrifugiert. Der Überstand wurde aus den Trichtern mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen. Um überflüssige Flüssigkeit zu entfernen, wurde als nächstes eine Zytozentrifugationskammer mit Filter (Eppendorf) montiert und ein weiteres Mal für 2 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Aufsatzes wurden die Objektträger eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend über Nacht bei 4°C gelagert, wodurch die Bindung der Protoplasten an das Poly-L-Lysin verstärkt werden sollte.

5.5.1.2 *Fixieren der Protoplasten*

Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Objektträger wurden für 10 min in 4% Paraformaldehyd/PBS gegeben. Anschließend wurden sie zweimal 5 min in PBS gewaschen. Dann wurden die Protoplasten für 10 min in eiskaltem 100%igen Methanol extrahiert. Dazu wurde das Methanol zunächst bei -20°C vorgekühlt. Nach der Extraktion wurden die Objektträger zweimal 5 min in PBS-T (0,5%) gewaschen, die Waschlösung wurde abgetropft und die Objektträger bei 4°C gelagert.

5.5.1.3 Immunfärbung

Alle Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Um potentielle unspezifische Bindestellen auf dem Objektträger abzusättigen, wurden zunächst 120 µl 1x PBS-T/10% FCS aufpipettiert. Nachdem diese Lösung wieder abgetropft war, wurden 60 µl 1. Antikörper aufpipettiert. Der Antikörper „anti-10. ATG“ wurde dazu 1:25 in PBS-T/10% FCS/0,2% Triton-X-100 verdünnt. Es wurde 90 min inkubiert. Nachdem zweimal 20 min mit PBS-T gewaschen worden war, wurde wiederum für 30 min mit PBS-T/10% FCS inkubiert.

Der zweite Antikörper (anti-Kaninchen IgG Fluorescein Isothiocyanat Konjugat; Sigma) wurde 1:80 in PBS-T/10% FCS/0,2% Triton-X-100 verdünnt. Es wurden jeweils 60 µl auf die Objektträger aufpipettiert und 90 min inkubiert. Danach wurde wieder zweimal mit PBS-T_{0,5} gewaschen.

Zur Färbung der Kerne wurde 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) 0,1 µg/ml in PBS-T_{0,5} verwendet. Die Objektträger wurden 10 min mit dieser Lösung inkubiert und anschließend ein weiteres Mal für 20 min mit PBS-T gewaschen.

Zur Einbettung der Protoplasten wurden 25 µl PBS/Glycerin 1:9 mit 0,1% n-Propylgallat auf die Objektträger aufpipettiert. Ein Deckglas wurde möglichst blasenfrei aufgelegt und mit Nagellack abgedichtet. Die Objektträger wurden dunkel bei 4°C gelagert.

5.5.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem x100 1,4 numerische Aparentur Plan-APO-CHROMAT Objektiv (Zeiss). Im Falle der DAPI-Färbungen wurde ein Filter mit einem Anregungsspektrum von 365 nm und einem Emissionsspektrum von >397 nm eingesetzt. Für die FITC-Fluoreszenzmikroskopie wurde ein anderer Filter mit einem Anregungsspektrum von 470 +/- 10 nm und einem Emissionsspektrum von 505-530 nm verwendet. Digitale Aufnahmen wurden mit einer hochauflösenden CCD-Kamera (C4742-25, Hamamatsu) gemacht, mit dem Programm Image Pro Plus (Media Cybernetics) bearbeitet und als TIFF-Bilder abgespeichert. In diesem Format konnten sie in das Programm ADOBE-PHOTOSHOP exportiert werden und dort bei gleichbleibender Auflösung auf die richtige Größe reduziert werden. Die weitere Beschriftung erfolgte mit dem Programm CANVAS.

5.6 Biochemische Methoden

5.6.1 Expression pflanzlicher Proteine in *E. coli*

Zur Klonierung und Expression pflanzlicher Proteine in *E. coli* wurden die Expressionsvektoren pET3a oder pET15b (Novagen) verwendet. Der verwendete *E. coli*-Stamm war BL21DE3. Von einer frischen Transformationsplatte wurden 2 ml antibiotikahaltiges LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 16 h bei 37°C inokuliert. Dann wurden 50 ml antibiotikahaltiges LB- bzw. NZCYM-Medium 1:100 mit der frischen Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,7 inkubiert. Die Induktion erfolgte für 4 h mit 0,6 mM IPTG. Erfolgte die Expression bei 16°C oder 25°C, so wurde die zu induzierende Kultur bereits bei 16°C bzw. 25°C bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,7 inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion mit 0,6 mM IPTG. Zur Überprüfung der Induktion wurden vor und nach der Induktion 800 µl Zellen abgenommen, zentrifugiert, in 80 µl 1x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und bei -20°C gelagert. Die Proteine wurden in der Western-Analyse weiter untersucht.

5.6.2 Isolierung von unlöslichen Proteinen aus *E. coli*

5.6.2.1 Isolierung von „inclusion bodies“

50 ml Induktionskultur wurden abzentrifugiert und mit vorgekühltem IB-0 gewaschen. Das Homogenat wurde abzentrifugiert (4°C) und in 3 ml vorgekühltem IB-1 resuspendiert. Nach zweimaligem Aufschluß der Zellen durch eine Frenchpress wurden lösliche von unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (4°C) voneinander getrennt. Das Pellet wurde in 4 ml vorgekühltem IB-2 gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (4°C) wurde das Pellet („inclusion bodies“) in 2 ml vorgekühltem IB-3 resuspendiert und bei -80°C gelagert.

5.6.2.2 De- und Renaturierung von „inclusion bodies“

Die De- und Renaturierung erfolgte nach Feldmar und Kunze (1991). 2,5 mg „inclusion bodies“ wurden auf Eis aufgetaut, abzentrifugiert (4°C, 12000 Upm, 10 min) und in 1 ml Denaturierungspuffer resuspendiert. Dann wurde das Protein 2 h bei Raumtemperatur und anschließend für 15 min bei 50°C inkubiert. Danach wurden nicht-denaturierte Bestandteile abzentrifugiert (15 min, 15000 Upm, 10°C). Zur Renaturierung wurde das denaturierte Protein 1:100 in Renaturierungspuffer verdünnt und bis zu 72 h bei 4°C inkubiert. Nach der Renaturierung wurde nochmals kurz zentrifugiert (4°C), der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

5.6.2.3 Acetonfällung von Proteinen

Zur Fällung der renaturierten Proteine wurde ein Anteil Protein mit 5 Anteilen eiskaltem Aceton versetzt und mindestens 20 min bei -70°C gefällt. Anschließend wurden die Proben 40 min bei 15000 Upm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 1x Laemmli-Probenpuffer gelöst.

5.6.2.4 Denaturierende Reinigung mittels Co^{2+} -Affinitätschromatographie

Die denaturierende Reinigung von Histidin-„getaggt“ Proteinen erfolgte mit Co^{2+} -Resin (Talon, Clontech) nach Anweisung des Herstellers. Die Induktionskultur wurde jeweils direkt nach der Induktion gewaschen, sofort in Lysepuffer aufgenommen und für eine Stunde bei Raumtemperatur gevortext. Das Lysat wurde für 10 min bei 15000 Upm abzentrifugiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Reinigung erfolgte nach dem Mini-Batch-Protokoll. Eluiert wurde durch Herabsetzen des pH-Wertes des Elutionspuffers.

Zur Überprüfung der Induktion und Reinigung in der SDS-PAGE mussten Guanidiniumhaltige Proben zunächst aufbereitet werden. Dazu wurden 20 μl Probe mit 80 μl H_2O und 100 μl 10% TCA versetzt. Nach einer 20 minütigen Inkubation auf Eis wurde 15 min bei 14000 Upm (RT) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 μl 100%igem EtOH gewaschen (2 min, 14000 Upm, RT) und nach dem Trocknen in 40 μl 1x Laemmli gelöst.

5.6.3 Isolierung und native Reinigung löslicher Proteine aus *E. coli*

Die native Reinigung von Histidin-„getaggt“ Proteinen erfolgte entweder mittels NiNTA-Resin der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers oder durch Co^{2+} -Affinitätschromatographie (Talon, Clontech) mit einigen Abwandlungen zur Anleitung des Herstellers: 100 ml Induktionskultur wurden abzentrifugiert und bis zur Reinigung bei -80°C aufbewahrt. Zur Reinigung wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und in 8 ml Sonifizierungspuffer resuspendiert. Anschließend wurden 0,75 mg/ml Lysozym zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer kurzen Inkubation auf Eis wurden die Zellen sonifiziert und 20 min bei 4°C bei 13000 Upm zentrifugiert.

600 μl Co^{2+} -Resin wurden 2 min bei 750 Upm abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Co^{2+} -Resin wurde mit 1,5 ml Sonifizierungspuffer equilibriert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand der sonifizierten Zellen zum Co^{2+} -Resin gegeben und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 5 min bei 750 Upm zentrifugiert, der

Überstand abgenommen und 2x mit Sonifizierungspuffer gewaschen. Das Pellet wurde dann in 300 µl Sonifizierungspuffer aufgenommen, kurz gemischt (Vortex) und auf eine verschlossene Fertigsäule geladen (Faust, Köln). Nachdem sich das Co²⁺-Resin abgesetzt hatte, konnte die Säule einlaufen. Anschließend wurde 1x mit Sonifizierungspuffer und 1x mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte mit Imidazol.

5.6.4 Isolierung von Kernproteinen aus transgenem Tabak

Die Isolierung von Kernproteinen aus transgenem Tabak erfolgte mit Abwandlungen nach einem Protokoll von Maier *et al.* (Maier *et al.*, 1987).

Die Tabakpflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Nach sieben bis acht Wochen wurden Blätter aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien geerntet. Die weiteren Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Blätter wurden zunächst in kleinere Stücke zerschnitten. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Blätter in einem Plastikgefäß in Puffer A (sechsfaches Volumen) mit Hilfe eines Polytrons (Ultra-Turrax T25, Jahnke und Kunkel KA Labortechnik; Einsatz: UT Dispersing Tool for T25 S25..-8G/10G). Das Homogenat wurde filtriert (Nylonfilter; 1. 300 µm; 2. 80 µm) und dann 5 min bei 4000 Upm (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde viermal in Puffer A gewaschen, die Überstände jedesmal verworfen. Das Pellet wurde dann in Puffer B (1/38 des Ausgangsvolumens) resuspendiert. Anschließend wurde 4 M NaCl bis zu einer Endkonzentration von 0,4 M hinzugegeben. Die Kerne wurden dann mittels Ultraschall zertrümmert und danach 30 min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile der Kernproteinpräparation wurden 20 min bei 16000 Upm (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80° gelagert.

5.6.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Bradfordreagenz (BioRad, Bradford, 1976). Die Lösung wurde 1:5 mit H₂O verdünnt und dann zu 20 µl Proteinlösung gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die OD₅₉₅ gemessen. Zum Erstellen einer Eichkurve diente BSA:

0,2 mg BSA/ml	OD ₅₉₅ = 0,2
0,5 mg BSA/ml	OD ₅₉₅ = 0,5
0,8 mg BSA/ml	OD ₅₉₅ = 0,8

5.6.6 Dialyse von Proteinen

Zur Dialyse von TPase (MW = 92 kDa) wurden die Dialyseschläuche VISKING DIALYSIS TUBING 8132 verwendet (6 mm x 5 m). 18 g NaHCO₃ wurden in 900 ml 1 mM EDTA gelöst. Die Schlauchstücke wurden in dieser Lösung 10 min ausgekocht und anschließend mit autoklaviertem H₂O_{dd} gespült. Anschließend wurden sie ein weiteres Mal in 1 mM EDTA 10 min gekocht. Nach dem Abkühlen wurden sie bei 4°C gelagert. Dialyseschläuche wurden mit TPase-haltigem Proteinextrakt gefüllt und gut verschlossen. Die Dialyse erfolgte in Dialysepuffer für 16 h bei 4°C in einem 1000fachen Volumen.

5.6.7 Ultrafiltration von Proteinen

Zur Ultrazentrifugation wurden verwendet: Centricon concentrator 30 (Centricon), Microcon 30 (Centricon) oder Vivaspin 500 VSO111 5000PES (Sartorius). Die Zentrifugationsschritte erfolgten nach Angaben des jeweiligen Herstellers.

5.6.8 Native Gelfiltration von Proteinen

Die native Gelfiltration erfolgte mit einer Superose-6-Säule von Pharmacia. Der Laufpuffer war eine Abwandlung des Renaturierungspuffers. Der Puffer war sterilfiltriert und entgast. Zur Anfertigung einer Eichkurve wurde der Gelfiltrationsstandard von BioRad verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,3 ml/min. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 4°C, die Detektion bei 280 nm.

Proteinstandard:	Thyroglobulin	670000 Da
	Gammaglobulin	158000 Da
	Ovalbumin	44000 Da
	Myoglobin	17000 Da
	Vitamin B12	1350 Da

5.6.9 Proteinextrakt aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Präparation eines Rohextrakts von Hefeproteinen wurden 2 OD₆₀₀ Hefe-Flüssigkultur abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 30 µl 1x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und für 3 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit Glasperlen aufgefüllt und für 2 min gevortext. Dann wurde das Volumen mit 1x Laemmli-Probenpuffer auf 100 µl erhöht.

Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Zur Analyse der Proteinextrakte wurden die Proben für 10 min bei 95°C inkubiert und für 1 min bei 14000 Upm zentrifugiert. Im Westernblot wurden jeweils 15 µl eingesetzt.

5.6.10 Proteinextrakt aus Petunienprotoplasten

3 ml transformierte Petunienprotoplasten aus dem *in vivo*-Transpositionsassay wurden 10 min bei Raumtemperatur und 10000 Upm zentrifugiert. Die pelletierten Protoplasten wurden anschließend in 100 µl 1x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert, gevortext und dann 15 min bei 95°C unter Schütteln inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend bei 14000 Upm (Raumtemperatur) für 1 min pelletiert. Der Überstand wurde weiter im Western Blot analysiert. Erfolgte dies nicht direkt, wurden die Proben bei -20°C gelagert und vor der SDS-PAGE ein weiteres Mal für 10 min bei 95°C inkubiert und anschließend für 1 min bei 14000 Upm zentrifugiert.

5.6.11 SDS-PAGE von Proteinen und Coomassie-Färbung

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen unterschiedlicher Konzentrationen (Polyacrylamidlösung: Rotiphorese Gel40 19:1; ROTH) über eine diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970). Das Protein wurde 1:1 mit 2x Laemmli-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C denaturiert. Unlösliche Bestandteile wurden abzentrifugiert, der Überstand für die Elektrophorese verwendet. Die Elektrophorese verlief bei 200 V. Der direkte Nachweis der Proteine im Gel erfolgte durch eine Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue und durch schrittweises Entfärben in Entfärberlösung. Das Gel wurde dann unter Vakuum auf 3MM-Papier (Whatman) getrocknet.

	Sammelgel (Angaben für 2 Gele)					2 Trenngele
	7,5%	10%	12,5%	15%	17,5%	5%
40% PAA	1,218 ml	1,625 ml	2,031 ml	2,4 ml	2,844 ml	0,5 ml
1 M Tris pH 8,8	2,4 ml (0,375M)	2,4 ml (0,375M)	2,4 ml (0,375M)	2,4 ml (0,375M)	2,4 ml (0,375M)	526 µl pH 6,8 (0,132 M)
H ₂ O	2,770 ml	2,362 ml	1,957 ml	1,588 ml	1,144 ml	2,898 ml
10% SDS	65 µl (0,1%)	65 µl(0,1%)	65 µl (0,1%)	65 µl (0,1%)	65 µl (0,1%)	40 µl (0,1%)
10% APS	43,2 µl (0,066%)	43,2 µl (0,066%)	43,2 µl (0,066%)	43,2 µl (0,066%)	43,2 µl (0,066%)	32 µl (0,08%)
TEMED	4,3 µl	4,3 µl	4,3 µl	4,3 µl	4,3 µl	3,2 µl

5.6.12 Immunologischer Nachweis von Proteinen im Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Semi-Phor Blotting Apparatur (Hoefer Scientific Instruments) auf Nitrocellulose übertragen (0,45 µm, Schleicher & Schuell). Die Größe der Proteine und der Erfolg des Transfers konnten mit Hilfe eines vorgefärbten Proteingrößenstandards verfolgt werden (Broad range protein molecular weight marker; 6,5-175 kDa, NEB). Nach dem Transfer wurde die Membran für 1 h in Blockreagenz abgesättigt. Anschließend wurde der erste Antikörper (anti-TPase-Antiserum) nach Bedarf in Blockreagenz verdünnt und die Membran darin 1 h inkubiert. Die Membran wurde dann 3x 5 min in 1xTBS-T_{0,5} gewaschen, bevor der zweite Antikörper (anti-rabbit IgG HRP-linked, NEB), 1:6000 in Blockreagenz verdünnt, für eine Stunde auf die Membran gegeben wurde. Wiederum wurde die Membran 3x 5 min in 1x TBS-T_{0,5} gewaschen. Der Nachweis erfolgte mit dem Westernblot-Detektionskit von NEB. Die Membran wurde 1 min mit Substrat inkubiert, kurz abgetropft und auf einen Röntgenfilm exponiert.

5.6.13 Gelretardation zum Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen

Die Bindung eines Proteins an DNA kann standardmäßig in einem nativen PAA-Gel durch verändertes Laufverhalten der DNA gezeigt werden. Für den Nachweis der Transposase-DNA-Wechselwirkungen mussten in dieser Arbeit Agarosegele verwendet werden, da die entstehenden Komplexe aufgrund ihrer Größe nicht in eine PAA-Matrix einlaufen können. Standardmäßig wurde ein 1,2%iges Agarosegel verwendet, der Laufpuffer war 0,5x TBE oder „low ionic strength buffer“. Die Elektrophorese erfolgte für 3 h bei 90 V bei 4°C. Die DNA wurde mit Klenow-Polymerase (MBI) und (α-³²P)-dATP oder (α-³²P)-dCTP radioaktiv markiert. Eine Standardreaktion sah folgendermaßen aus:

0,5 µl DNA (30 ng)
 2 µl 5x Klenowpuffer
 je 1 µl dCTP, dTTP, dGTP
 1 µl (α-³²P)-ATP
 1 µl Klenow-Fragment (1U/µl)
2,5 µl H₂O
 10 µl

Die markierten Fragmente wurden mit Microspin S300 HR oder Microspin G25-Säulen gereinigt (Amersham-Pharmacia). 20000 cpm DNA-Fragment wurde anschließend mit Protein gemischt. Die Inkubation erfolgte 30 min bei RT in 1x EMSA-Bindepuffer in einem Proben-

volumen von 25 µl. Als Kompetitor-DNA wurden 3 µg poly(dI-dC) verwendet. Nach der Inkubation wurden die Reaktionen direkt geladen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf DE81-Cellulose getrocknet und exponiert.

5.6.14 Transposase-vermittelte *in vitro*-Ligation

Die verwendete DNA wurde mit Klenow-Polymerase wie unter 5.6.13 angegeben radioaktiv markiert. Die 1 kb-Leiter wurde mit T4-Polynukleotidkinase (MBI Fermentas) nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert. Die gereinigte DNA (25000 cpm) wurde 15 min mit Proteinextrakt bei RT in einem Probenvolumen von 15 µl inkubiert. Reaktionspuffer war der 5x Ligationpuffer von GibcoBRL. Zum Zeitpunkt Null wurden 2,5 µl Reaktion abgenommen und 1:1 mit Stop-Puffer vermischt. Die Denaturierung des Proteins erfolgte für 10 min bei 65°C. Zur restlichen Reaktion wurde Ligase (Gibco BRL) gegeben. Nach gegebenen Zeitpunkten wurden jeweils wieder 2,5 µl Reaktion abgenommen und die Reaktion mit Stop-Puffer abgestoppt. Nach dem Abzentrifugieren der Proben wurden diese mit einem 1,5%igem Agarosegel (1x TTE) elektrophoretisch bei Raumtemperatur aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend auf DE81-Cellulose getrocknet. Die Auswertung erfolgte mit einem Phosphorimager (Storm 840[®], Molecular Dynamics).

5.7 *In vitro*-Studien zur endonukleolytischen Aktivität der TPase

5.7.1 *In vitro*-Transpositionssystem zur Exzision und Integration

Die Grundbedingungen für diesen *in vitro*-Assay richteten sich nach P.D. Kaufmann und D.C. Rio (Kaufman und Rio, 1992).

Die verwendeten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

- HGKED: 20 mM Hepes-KOH pH 7,6; 20% Glycerin; 100 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 µg/ml BSA
- 2x GTP-Puffer: 0,7x HGKED ohne BSA, 20 mM MgCl₂, 4 mM GTP
- Stop-Puffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM EDTA; 0,3 M NaCl; 250 µg/ml Hefe-tRNA; 0,1 mg/ml Proteinase K

250 ng Donorplasmid wurden mit 150 fmol TPase 15 min auf Eis inkubiert. Dazu wurde die TPase in HGKED-Puffer verdünnt. Anschließend wurden 100 ng Zielplasmid zugegeben, sowie 2x GTP-Puffer, dabei wurde das Volumen auf 20 µl erhöht. Nun wurde für 2h bei 25°C

inkubiert. Nach Zugabe von 125 µl Stop-Puffer wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsvolumen wurde auf 200 µl erhöht. Anschließend wurde eine einmalige Phenol-/Chloroformextraktion vorgenommen und die DNA mit EtOH gefällt. Das Pellet wurde in 8 µl H₂O gelöst. Anschließend wurde die DNA in JS4 elektrokompetente Zellen elektroporiert. Zur Auswertung der Transpositionsfrequenz wurde 1/100 des Transformationsansatzes auf Ampicillin-haltigem Medium (Transformationsrate) und 99/100 auf Kanamycin/Ampicillin-haltigem Medium (Transpositionseignisse) ausgestrichen.

Diese Grundreaktionen wurden in verschiedenen Punkten immer wieder abgewandelt:

- Die Menge der eingesetzten Donor-DNA wurde auf 125 ng herabgesetzt. Die Menge der eingesetzten Target-DNA variierte zwischen 100 ng und 300 ng. Die eingesetzte Menge Kernprotein-Extrakt aus Tabak (TPase₁₋₈₀₇ und TPase₁₀₃₋₈₀₇) variierte zwischen 50 fmol (=1,8 ng) und 31 pmol (1150 ng).
- Der Reaktionspuffer HGKED wurde gegen den EMSA-Bindepuffer ausgetauscht (5.6.13) oder gegen 10x MOPS-Puffer (Abwandlung nach Craigie (Craigie *et al.*, 1990), 750 mM NaCl; 200 mM MOPS pH 7,0; 30 mM MnCl₂; 100 mM DTT; 40% Glycerin; 0,1 mg/ml BSA). Außerdem wurde der HGKED-Puffer ohne EDTA hergestellt, dafür aber mit 30 mM MnCl₂. Zum Reaktionspuffer 2x GTP wurde zusätzlich 20 mM MnCl₂ gegeben.
- Die Bindung der TPase an die Donor-DNA wurde sowohl auf Eis als auch bei RT inkubiert. Die eigentliche Transpositionsreaktion wurde nicht nur bei 25°C sondern auch bei 30°C und 37°C durchgeführt, außerdem wurde die Inkubationszeit vereinzelt auf 16h verlängert.
- Die Reaktion wurde in einem Schritt ausgeführt, Donor- und Ziel-DNA wurden gemeinsam mit TPase inkubiert.
- Die ursprüngliche Reaktion wurde auch mit bakteriell exprimierter TPase_{His1-807} durchgeführt, dabei wurde 1 µg Proteinextrakt eingesetzt.

5.7.2 *In vitro*-Transpositionssystem zur Exzision

Im *in vitro*-Transpositionssystem zur Exzision des *Ac*-Elements wurde das Plasmid pDs/Amp verwendet. 300 ng Plasmid-DNA wurden mit 1 µg Kernproteinextrakt aus Tabak für 1 h bei 30°C in einem Volumen von 10 µl inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Stop-Puffer zugegeben (5.7.1) und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einer Phenol-/Chloroform-Extraktion

wurde die DNA gefällt, in H₂O gelöst und mit Millipore-Dialysefiltern gegen H₂O dialysiert. Anschließend wurde die DNA in elektrokompetente JS4-Zellen transformiert. 1/100 des Transformationsansatzes wurden auf Kanamycin-haltige Platten ausgestrichen, um die Transformationsrate zu bestimmen. Um die Häufigkeit der Transpositionereignisse zu bestimmen, wurden 99/100 des Transformationsansatzes auf Ampicillin-haltigem Medium hoher Konzentration (550 mg/l) ausgestrichen.

Folgende Reaktionsbedingungen wurden gewählt:

Reaktionspuffer:

2x GTP-Puffer (5.7.1)

10x MOPS-Puffer (5.7.1)

10x MOPS-Puffer, aber nur 50 mM NaCl und 4 mM ATP, zusätzlich 5% DMSO

10x A (Vink *et al.*, 1991): 200 mM MOPS pH 7,0; 250 mM NaCl; 30 mM MnCl₂; 30 mM DTT

10x B (Craigie *et al.*, 1990): 850 mM KCl; 200 mM MOPS pH 7,0; 30 mM MnCl₂; 100 mM DTT

10x C (Vink *et al.*, 1993): 200 mM MOPS pH 7,0; 50 mM NaCl; 30 mM MnCl₂; 30 mM DTT; 10 mM Tris HCl pH 7,6; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 40% Glycerin

10x D (van Gent *et al.*, 1993): 200 mM MOPS pH 7,0; 250 mM NaCl; 10 mM MnCl₂; 100 mM DTT (sowie 10% Glycerin in der Reaktion)

10x E (van Gent *et al.*, 1993): 200 mM MOPS pH 7,0; 250 mM NaCl; 100 mM DTT

10x F (Beall und Rio, 1997): 100 mM MgCl₂; 20 mM GTP

(zusätzlich zur Reaktion geben: 0,35x HGKED + BSA, 5.7.1)

10x G (Ton-Hoang *et al.*, 1998): 100 mM MgCl₂; 20 mM DTT (zusätzlich direkt zur Reaktion geben: 0,3 M KCl, 10% DMSO, 200 µg/ml BSA, 14% Glycerin, 25 mM Hepes pH 7,5)

Verwendete Proteine:

TPase₁₋₈₀₇ als Kernproteinpräparation aus transgenem Tabak

TPase_{His1-807} allein und zusammen mit WT-Kernproteinextrakt aus nicht-transgenem Tabak

WT-Kernproteinpräparation aus nicht-transgenem Tabak als Negativkontrolle

Die Proteinmenge variierte zwischen 13,5 ng und 1 µg.

Zugabe von Ligase: Wurde zur Reaktion Ligase gegeben, so geschah dies, bevor der Stop-Puffer zugegeben wurde. Dazu wurde die DNA zunächst über eine Microspin 300HR Säule von Pharmacia gereinigt. Anschließend wurden 2 U T4-Ligase (GibcoBRL) zugegeben und für 2h bei 16°C inkubiert. Dann wurde die Prozedur fortgesetzt wie oben beschrieben.

Inkubationszeiten: 1h bis 16h 30°C, 1h 27°C

Wurde die DNA nach der Reaktion nicht in JS4 transformiert sondern für einen Southernblot verwendet (5.3.8), so wurde die in H₂O-gelöste DNA direkt auf ein 0,9%iges Agarosegel geladen.

5.7.3 Spezifische Endonukleaseaktivität der *Ac*-Transposase

5.7.3.1 Radioaktive Markierung und Hybridisierung der DNA-Fragmente

Die Standardmarkierungsreaktion für die zu hybridisierenden Oligonukleotide sah folgendermaßen aus:

2 µl Oligonukleotid (20 pmol)
 2,5 µl 10x Polynukleotid-Kinase-Puffer
 2 µl ³²PγATP
 2 µl T4-Polynukleotid-Kinase
16,5 µl H₂O
 25 µl

Die Reaktion wurde für 1h bei 37°C inkubiert. Dann wurden 1,25 µl 0,5 M EDTA zugegeben.

Die Reaktion wurde für 20 min bei 65°C inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte über Microspin G25-Säulen (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers.

- Hybridisierung der Oligonukleotide:

jeweils 8 pmol zu hybridisierendes Oligonukleotid
 2 µl 5x STE
x µl H₂O
 20 µl

Die Reaktionen wurden für 3 min im Wasserbad bei 100°C gekocht. Anschließend wurden die Proben im Wasserbad langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

5.7.3.2 Reaktion mit TPase

Eine Standardreaktion sah folgendermaßen aus:

5000 cpm doppelsträngiges DNA-Substrat
0,5 µl Proteinextrakt (0,94 mg/ml)
1 µl 10x Reaktionspuffer
x µl H₂O
10 µl

Die Reaktionen wurden 1h bei 30°C inkubiert und anschließend direkt auf ein natives Polyacrylamid-Gel geladen (17% PAA; 0,5x TBE). Nach der Elektrophorese erfolgte die Auswertung mit einem Phosphorimager (Image Quant STORM840[®]) und der zugehörigen Software Image Quant[®].

Die Reaktionen unterschieden sich in der Zusammensetzung des Reaktionspuffers:

- 10x 0 (Vink *et al.*, 1991): 750 mM NaCl; 200 mM Mops pH 7,0; +/- 30 mM MnCl₂; 100 mM DTT; 40% Glycerin; 0,1 mg/ml BSA; +/- 2,1 µg/µl ST-DNA; +/- 30 µg/µl poly(dI-dC)
- 10x 1: 750 mM NaCl; 200 mM Mops pH 7,0; +/- 30 mM MgCl₂; 100 mM DTT; 40% Glycerin; 0,1 mg/ml BSA; +/- 2,1 µg/µl ST-DNA; +/- 30 µg/µl poly(dI-dC)

5.7.4 Unspezifische Endonukleaseaktivität der *Ac*-Transposase

Um die unspezifische Endonuklease-Aktivität zu zeigen, wurde als DNA-Substrat 150 ng pBR322 verwendet. Das Protokoll richtete sich nach Sherman (Sherman und Fyfe, 1990). Die DNA wurde mit 0,5 µg Kernproteinextrakt aus Tabak in 10x MOPS-Puffer (5.7.1) in einem Reaktionsvolumen von 10 µl für 1h bei 30°C inkubiert. Die Reaktionen wurden anschließend auf einem 0,9%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Verwendete Proteinpräparationen waren:

- Kernproteine TPase₁₋₈₀₇, Tabak
- Negativkontrollen: Kernproteine WT-Tabak
Kernproteine TPase₁₈₉₋₈₀₇, Tabak

5.7.5 Integration eines vorgeschneideten *Ds*-Elements in eine Ziel-DNA

Die radioaktive Markierung erfolgte mit T4 Polynukleotidkinase und ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP nach Angaben des Herstellers. Die Reinigung erfolgte mit Microspinsäulen 300 HR (Pharmacia) nach Angaben des Herstellers.

Reaktion mit TPase

25000 cpm Mini-*Ds*
1 μg Proteinextrakt WT, Tabak bzw. TPase₁₋₈₀₇, Tabak
5 μl 5x Bindepuffer (siehe 5.6.13)
2 μl poly(dI-dC), 1mg/ml
x μl H₂O
25 μl

Die Reaktion wurde 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden 100 ng pBR322 als Ziel-DNA zugegeben und für 16 h bei 30°C inkubiert.

Die Proben wurden Phenol-/Chloroform extrahiert und die DNA mit EtOH gefällt. Das Pellet wurde in 1x Blaumarker resuspendiert und sofort auf ein 1,2%iges Agarosegel (0,5x TBE) geladen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf DE 81-Cellulose getrocknet und mit einem Phosphorimager (STORM840[®]) ausgewertet.

In Abwandlungen zur Standard-Reaktion wurde die NaCl-Konzentration im 5x Bindepuffer auf 300 mM erhöht. Ausserdem wurde die Reaktionstemperatur auf 30°C erhöht bzw. auf 25°C gesenkt.

6 Literaturverzeichnis

Agrawal, A., Q. M. Eastman und D. G. Schatz (1998). "Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system [see comments]." *Nature* 394(6695): 744-51.

Allingham, J. S., P. A. Pribil und D. B. Haniford (1999). "All three residues of the Tn 10 transposase DDE catalytic triad function in divalent metal ion binding." *J Mol Biol* 289(5): 1195-206.

Bailin, T., X. Mo und M. J. Sadofsky (1999). "A RAG1 and RAG2 tetramer complex is active in cleavage in V(D)J recombination." *Mol Cell Biol* 19(7): 4664-71.

Baker, B., J. Schell, H. Lörz und N. V. Fedoroff (1986). "Transposition of the maize controlling element "*Activator*" in tobacco." *PNAS* 83: 4844-4848.

Baker, T. A., E. Kremenstova und L. Luo (1994). "Complete transposition requires four active monomers in the Mu transposase tetramer." *Gene Develop* 8(20): 2416-2428.

Barkan, A. und R. A. Martienssen (1991). "Inactivation of maize transposon Mu suppresses a mutant phenotype by activating an outward-reading promoter near the end of Mu1." *PNAS* 88(8): 3502-6.

Baxevanis, A. D. und C. R. Vinson (1993). "Interactions of coiled coils in transcription factors: where is the specificity?" *Curr Opin Genet Dev* 3(2): 278-85.

Beall, E. L. und D. C. Rio (1997). "Drosophila P-element transposase is a novel site-specific endonuclease." *Genes & Development* 11(16): 2137-2151.

Beall, E. L. und D. C. Rio (1998). "Transposase makes critical contacts with, and is stimulated by, single-stranded DNA at the P element termini *in vitro*." *EMBO J.* 17(7): 2122-2136.

Becker, D., R. Lütticke, M.-G. Li und P. Starlinger (1992). "Control of excision frequency of maize transposable element *Ds* in *Petunia* protoplasts." *PNAS* 89: 5552-5556.

Becker, H.-A. und R. Kunze (1996). "Binding sites for maize nuclear proteins in the subterminal regions of the transposable element *Activator*." *MGG* 251: 428-435.

Becker, H.-A. und R. Kunze (1997). "Maize *Activator* transposase has a bipartite DNA binding domain that recognizes subterminal motifs and the terminal inverted repeats." *MGG* 254(3): 219-230.

Behrens-Jung, U., S. Kühn und R. Kunze (1994). "The *Ac* transposase consists of several, functionally distinct domains." *MGCN* 68: 20-21.

Benito, M. I. und V. Walbot (1997). "Characterization of the maize Mutator transposable element MURA transposase as a DNA-binding protein." *Molecular and Cellular Biology* 17(9): 5165-5175.

- Bhasin, A., I. Y. Goryshin und W. S. Reznikoff (1999). "Hairpin formation in Tn5 transposition." *J Biol Chem* 274(52): 37021-9.
- Bhasin, A., I. Y. Goryshin, M. Steiniger-White, D. York und W. S. Reznikoff (2000). "Characterization of a Tn5 pre-cleavage synaptic complex." *J Mol Biol* 302(1): 49-63.
- Boehm, U., M. Heinlein, U. Behrens und R. Kunze (1995). "One of three nuclear localization signals of maize *Activator (Ac)* transposase overlaps the DNA-binding domain." *The Plant Journal* 7(3): 441-451.
- Bolland, S. und N. Kleckner (1996). "The three chemical steps of Tn10/IS10 transposition involve repeated utilization of a single active site." *Cell* 84(2): 223-233.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Calvi, B. R., T. J. Hong, S. D. Findley und W. M. Gelbart (1991). "Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: *hobo*, *Activator* and *Tam3*." *Cell* 66: 465-471.
- Chalmers, R. M. und N. Kleckner (1994). "Tn10/IS10 transposase purification, activation and *in vitro* reaction." *JBC* 269: 8029-8035.
- Chatterjee, S. und P. Starlinger (1995). "The role of subterminal sites of transposable element *Ds* of *Zea mays* in excision." *MGG* 249: 281-288.
- Chen, J., I. M. Greenblatt und S. L. Dellaporta (1992). "Molecular analysis of *Ac* transposition and DNA replication." *Genetics* 130: 665-676.
- Coen, E. S., R. Carpenter und C. Martin (1986). "Transposable elements generate novel spatial patterns of gene expression in *Antirrhinum majus*." *Cell* 47: 285-296.
- Cohen, S., Chang, A.C.Y. und C. Hse (1972). "Nonchromosomal antibiotics resistance in bacteria: genetic transformation of *E. coli* R-factor DNA." *PNAS* 69: 2110-2114.
- Coupland, G., B. Baker, J. Schell und P. Starlinger (1988). "Characterization of the maize transposable element *Ac* by internal deletions." *EMBO J.* 7: 3653-3659.
- Coupland, G., C. Plum, S. Chatterjee, A. Post und P. Starlinger (1989). "Sequences near the termini are required for transposition of the maize transposon *Ac* in transgenic tobacco plants." *PNAS* 86: 9385-9388.
- Craigie, R., T. Fujiwara und F. Bushman (1990). "The IN protein of Moloney murine leukemia virus processes the viral DNA ends and accomplishes their integration *in vitro*." *Cell* 62(4): 829-37.
- Cuff, J. A., M. E. Clamp, , A. S. Siddiqui, M. Finlay und G.J. Barton (1998). "Jpred: A Consensus Secondary Structure Prediction Server." *Bioinformatics* 14: 892-893.

Cuff, J. A. und G. J. Barton (1999). "Evaluation and Improvement of Multiple Sequence Methods for Protein Secondary Structure Prediction." *Proteins: Structure, Function and Genetics*(34): 508-519.

Davies, D. R., I. Y. Goryshin, W. S. Reznikoff und I. Rayment (2000). "Three-dimensional structure of the Tn5 synaptic complex transposition intermediate [see comments]." *Science* 289(5476): 77-85.

Dean, C., C. Sjodin, T. Page, J. D. G. Jones und C. Lister (1992). "Behavior of the maize transposable element *Ac* in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* 2: 69-81.

DePace, A. H., A. Santoso, P. Hillner und J. S. Weissman (1998). "A critical role for amino-terminal glutamine/asparagine repeats in the formation and propagation of a yeast prion." *Cell* 93(7): 1241-52.

Doak, T. G., F. P. Doerder, C. L. Jahn und G. Herrick (1994). "A proposed superfamily of transposase genes: Transposon-like elements in ciliated protozoa and a common "D35E" motif." *PNAS* 91: 942-946.

Donehower, L. A. und H. E. Varmus (1984). "A mutant murine leukemia virus with a single missense codon in pol is defective in a function affecting integration." *PNAS* 81(20): 6461-5.

Dooner, H. K., J. English und E. J. Ralston (1988). "The frequency of transposition of the maize element *Activator* is not affected by an adjacent deletion." *MGG* 211: 485-491.

Dooner, H. K. und A. Belachew (1989). "Transposition pattern of the maize element *Ac* from the *bz-m2(Ac)* allele." *Genetics* 122: 447-457.

Eisen, J. A., M.-I. Benito und V. Walbot (1994). "Sequence similarity of putative transposases links the maize *Mutator* autonomous element and a group of bacterial insertion sequences." *NAR* 22(13): 2634-2636.

Ellison, V. und P. O. Brown (1994). "A stable complex between integrase and viral DNA ends mediates human immunodeficiency virus integration *in vitro*." *PNAS* 91(15): 7316-7320.

Engelman, A., F. D. Bushman und R. Craigie (1993). "Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex." *EMBO J.* 12: 3269-3275.

Essers, L. (1996). Dissertationsschrift.

Essers, L., R. H. Adolphs und R. Kunze (2000). "A highly conserved domain of the maize activator transposase is involved in dimerization." *Plant Cell* 12(2): 211-24.

Fedoroff, N., S. Wessler und M. Shure (1983). "Isolation of the transposable maize controlling elements *Ac* and *Ds*." *Cell* 35: 235-242.

Fedoroff, N. V. (1989). "About maize transposable elements and development." *Cell* 56(2): 181-91.

- Feldmar, S. und R. Kunze (1991). "The ORFa protein, the putative transposase of maize transposable element *Ac*, has a basic DNA binding domain." *EMBO J.* 10: 4003-4010.
- Gerats, A. G. M., H. Huits, E. Vrijlandt, C. Marane, E. Souer und M. Beld (1990). "Molecular Characterization of a Nonautonomous Transposable Element (dTph1) of *Petunia*." *Plant Cell* 2: 1121-1128.
- Gierl, A., Z. Schwarz-Sommer und H. Saedler (1985). "Molecular interactions between the components of the *En-1* transposable element system of *Zea mays*." *EMBO J.* 4: 579-583.
- Gierl, A., S. Lütticke und H. Saedler (1988). "TnpA product encoded by the transposable element *En-1* of *Zea mays* is a DNA binding protein." *EMBO J.* 7: 4045-4053.
- Gietz, R. D. und R. A. Woods (1994). High efficiency transformation with lithium acetate. *Molecular genetics of yeast, a practical approach.* R. J. Johnston. Oxford, UK, IRL Press: 121-134.
- Gorbunova, V., C. Ramos, B. Hohn und A. A. Levy (2000). "A nuclear protein that binds specifically to several maize transposons is not essential for Ds1 excision." *MGG* 263(3): 492-7.
- Goryshin, I. Y. und W. S. Reznikoff (1998). "Tn5 *in vitro* transposition." *Journal of Biological Chemistry* 273(13): 7367-7374.
- Grant, S. R., A. Gierl und H. Saedler (1990). "En/Spm encoded tnpA protein requires a specific target sequence for suppression." *EMBO* 9: 2029-2035.
- Grant, S., S. Hardenack, S. Trentmann und H. Saedler (1993). "Functional cis-element sequence requirements for suppression of gene expression by the TNPA protein of the *Zea mays* transposon En/Spm." *MGG* 241: 153-160.
- Grappin, P., C. Audeon, M. C. Chupeau und M. A. Grandbastien (1996). "Molecular and functional characterization of *Slide*, an *Ac*-like autonomous transposable element from tobacco." *MGG* 252(4): 386-397.
- Greenblatt, I. M. und R. A. Brink (1962). "Twin mutations in medium variegated pericarp maize." *Genetics* 47: 489-501.
- Greenblatt, I. M. (1984). "A chromosomal replication pattern deduced from pericarp phenotypes resulting from movements of the transposable element, *Modulator*, in maize." *Genetics* 108: 471-485.
- Grevelding, C., D. Becker, R. Kunze, A. von Menges, V. Fantes, J. Schell und R. Masterson (1992). "High rates of *Ac/Ds* germinal transposition in *Arabidopsis* suitable for gene isolation by insertional mutagenesis." *PNAS* 89: 6085-6089.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *J Mol Biol* 166(4): 557-80.

Haniford, D. B., H. W. Benjamin und N. Kleckner (1991). "Kinetic and structural analysis of a cleaved donor intermediate and a strand transfer intermediate in Tn10 transposition." *Cell* 64(1): 171-9.

Haren, L., P. Polard, B. Ton Hoang und M. Chandler (1998). "Multiple oligomerization domains in the IS911 transposase: A leucine zipper motif is essential for activity." *Journal of Molecular Biology* 283(1): 29-41.

Hehl, R. und B. Baker (1989). "Induced transposition of *Ds* by a stable *Ac* in crosses of transgenic tobacco plants." *MGG* 217: 53-59.

Hehl, R. und B. Baker (1990). "Properties of the maize transposable element *Activator* in transgenic tobacco plants: a versatile inter-species genetic tool." *Plant Cell* 2: 709-721.

Hehl, R., W. K. F. Nacken, A. Krause, H. Saedler und H. Sommer (1991). "Structural analysis of *Tam3*, a transposable element from *Antirrhinum majus*, reveals homologies to the *Ac* element from maize." *Plant Mol Biol* 16: 369-371.

Heinlein, M., T. Brattig und R. Kunze (1994). "*In vivo* aggregation of maize *Activator (Ac)* transposase in nuclei of maize endosperm and *Petunia* protoplasts." *The Plant Journal* 5: 705-714.

Houba-Hérin, N., D. Becker, A. Post, Y. Larondelle und P. Starlinger (1990). "Excision of a *Ds*-like maize transposable element (*Ac* Δ) in a transient assay in *Petunia* is enhanced by a truncated coding region of the transposable element *Ac*." *MGG* 224: 17-23.

Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993). "A Novel Gene Containing a Trinucleotide Repeat That Is Expanded and unstable on Huntington's Disease Chromosomes." *Cell* 72: 971-983.

Izawa, T., C. Miyazaki, M. Yamamoto, R. Terada, S. Iida und K. Shimamoto (1991). "Introduction and transposition of the maize transposable element *Ac* in rice (*Oryza sativa* L.)." *MGG* 227: 391-396.

Johnson, R. C. und W. S. Reznikoff (1983). "DNA sequences at the ends of transposon Tn5 required for transposition." *Nature* 304(5923): 280-2.

Jones, D. T. (1999). "Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices." *Journal of Molecular Biology* 292: 195-202.

Jones, J. D. G., F. M. Carland, P. Maliga und H. K. Dooner (1989). "Visual detection of transposition of the maize element *Activator (Ac)* in tobacco seedlings." *Science* 244: 204-207.

Kaufman, P. D. und D. C. Rio (1992). "P element transposition in vitro proceeds by a cut-and-paste mechanism and uses GTP as a cofactor." *Cell* 69: 27-39.

Keller, J., J. D. G. Jones, E. Harper, E. Lim, F. Carland, E. J. Ralston und H. K. Dooner (1993). "Effects of gene dosage and sequence modification on the frequency and timing of transposition of the maize element *Activator (Ac)* in tobacco." *Plant Mol Biol* 21: 157-170.

- Kennedy, A. K., A. Guhathakurta, N. Kleckner und D. B. Haniford (1998). "Tn10 transposition via a DNA hairpin intermediate." *Cell* 95(1): 125-134.
- Kim, D. R., Y. Dai, C. L. Mundy, W. Yang und M. A. Oettinger (1999). "Mutations of acidic residues in RAG1 define the active site of the V(D)J recombinase." *Genes Dev* 13(23): 3070-80.
- Kim, H. Y., J. W. Schiefelbein, V. Raboy, D. B. Furtek und O. E. Nelson (1987). "RNA splicing permits expression of a maize gene with a defective *Suppressor-mutator* transposable element insertion in an exon." *PNAS Usa* 84: 5863-5867.
- Knapp, S., G. Coupland, H. Uhrig, P. Starlinger und F. Salamini (1988). "Transposition of the maize transposable element *Ac* in *Solanum tuberosum*." *MGG* 213: 285-290.
- Kulkosky, J., K. S. Jones, R. A. Katz, J. P. Mack und A. M. Skalka (1992). "Residues critical for retroviral integrative recombination in a region that is highly conserved among retroviral/retrotransposon integrases and bacterial insertion sequence transposases." *Mol Cell Biol* 12(5): 2331-8.
- Kunze, R., U. Stochaj, J. Laufs und P. Starlinger (1987). "Transcription of transposable element *Activator (Ac)* of *Zea mays* L." *EMBO J.* 6: 1555-1563.
- Kunze, R. und P. Starlinger (1989). "The putative transposase of transposable element *Ac* from *Zea mays* L. interacts with subterminal sequences of *Ac*." *EMBO J.* 8: 3177-3185.
- Kunze, R., G. Coupland, H. Fußwinkel, S. Feldmar, U. Courage, S. Schein, H.-A. Becker, S. Chatterjee, Li M.-G. und P. Starlinger (1991). Structure and function of the maize transposable element *Activator (Ac)*. *Plant Molecular Biology 2*. NATO ASI Series, Life Sciences. R. G. Herrmann und B. A. Larkins. New York, Plenum Press: 285-298.
- Kunze, R., U. Behrens, U. Courage-Franzkowiak, S. Feldmar, S. Kühn und R. Lütticke (1993). "Dominant transposition-deficient mutants of maize *Activator (Ac)* transposase." *PNAS* 90: 7094-7098.
- Kunze, R., S. Kühn, J. D. G. Jones und S. R. Scofield (1995). "Somatic and germinal activities of maize *Activator (Ac)* transposase mutants in transgenic tobacco." *The Plant Journal* 8(1): 45-54.
- Kunze, R. (1996). The *Activator (Ac)* element of *Zea mays* L. *Transposable Elements*. H. Saedler und A. Gierl. Heidelberg, Springer. 204: 161-194.
- Kunze, R., H. Saedler und W.-E. Lönnig (1997). "Plant transposable elements." *Advances in Botanical Research* 27: 331-470.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* 227(259): 680-5.
- Laufs, J., U. Wirtz, M. Kammann, V. Matzeit, S. Schaefer, J. Schell, A. P. Czernilofsky, B. Baker und B. Gronenborn (1990). "Wheat dwarf virus *Ac/Ds* vectors: Expression and excision of transposable elements introduced into various cereals by a viral replicon." *PNAS*: 7752-7756.

Lavoie, B. D., B. S. Chan, R. G. Allison und G. Chaconas (1991). "Structural aspects of a higher order nucleoprotein complex: Induction of an altered DNA structure at the Mu-host junction of the Mu type 1 transpososome." *EMBO J.* 10: 3051-3059.

Leclerc, D., L. Burri, A. V. Kajava, J. L. Mougeot, D. Hess, A. Lustig, G. Kleemann und T. Hohn (1998). "The open reading frame III product of cauliflower mosaic virus forms a tetramer through a N-terminal coiled-coil." *J Biol Chem* 273(44): 29015-21.

Levy, A. A. und V. Walbot (1990). "Regulation of the timing of transposable element excision during maize development." *Science* 248: 1534-1537.

Levy, A. A., M. Fridlender, U. Hanania, E. Rubin und Y. Sitrit (1996). "Binding of *Nicotiana* nuclear proteins to the subterminal regions of the *Ac* transposable element." *MGG* 251: 436-441.

Lupas, A. (1996). "Coiled coils: new structures and new functions." *Trends Biochem Sci* 21(10): 375-82.

Mahnke Braam, L. A. und W. S. Reznikoff (1998). "Functional characterization of the Tn5 transposase by limited proteolysis." *Journal of Biological Chemistry*, May 273(18): 10908-10913.

Mahnke Braam, L. A., I. Y. Goryshin und W. S. Reznikoff (1999). "A mechanism for Tn5 inhibition: Carboxyl-terminal dimerization." *Journal of Biological Chemistry*, Jan 274(1): 86-92.

Maier, U.-G., J. W. S. Brown, C. Tolocyki und G. Feix (1987). "Binding of a nuclear factor to a consensus sequence in the 5' flanking region of zein genes from maize." *EMBO J.* 6: 17-22.

Martienssen, R., A. Barkan, W. C. Taylor und M. Freeling (1990). "Somatically heritable switches in the DNA modification of *Mu* transposable elements monitored with a suppressible mutant in maize." *Genes & Dev* 4: 331-343.

Masson, P., R. Surosky, R. Surosky, J. A. Kingsbury und N. V. Fedoroff (1987). "Genetic and molecular analysis of the *Spm*-dependent *a-m2* alleles of the maize *a* locus." *Genetics* 177: 117-137.

McClintock, B. (1944). "Maize genetics." *Carnegie Inst. Wash. Year Book* 43: 127-135.

McClintock, B. (1945). "Cytogenetic studies of maize and *Neurospora*." *Carnegie Inst. Wash. Year Book* 44: 108-112.

McClintock, B. (1948). "Mutable Loci in Maize." *Carnegie Inst Wash Year Book* 47: 155-169.

McClintock, B. (1951). "Chromosome organization and genic expression." *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 16: 13-47.

McClintock, B. (1954). "Mutations in maize and chromosomal aberrations in *Neurospora*." *Carnegie Inst Wash Year Book* 53: 254-260.

- Menssen, A., S. Höhmann, W. Martin, P. S. Schnable, P. A. Peterson, H. Saedler und A. Gierl (1990). "The *En/Spm* transposable element of *Zea mays* contains splice sites at the termini generating a novel intron from a *dSpm* element." *EMBO J* 9: 3051-3057.
- Mizuuchi, M., T. A. Baker und K. Mizuuchi (1992). "Assembly of the Active Form of the Transposase-Mu DNA Complex: A Critical Control Point in Mu Transposition." *Cell* 70: 303-311.
- Müller-Neumann, M., J. I. Yoder und P. Starlinger (1984). "The DNA sequence of the transposable element *Ac* of *Zea mays* L." *Mol Gen Genet* 198: 19-24.
- Odell, J. T., F. Nagy und N. H. Chua (1985). "Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter." *Nature* 313(6005): 810-2.
- Pal, S. K. und D. K. Chattoraj (1988). "P1 plasmid replication: initiator sequestration is inadequate to explain control by initiator-binding sites." *J Bacteriol* 170(8): 3554-60.
- Panganiban, A. T. und H. M. Temin (1984). "The retrovirus pol gene encodes a product required for DNA integration: identification of a retrovirus int locus." *PNAS* 81(24): 7885-9.
- Pargellis, C. A., S. E. Nunes-Düby, L. Moitoso de Vargas und A. Landy (1988). "Suicide Recombination Substrates Yield Covalent Lambda Integrase-DNA Complexes and Lead to Identification of the Active Site Tyrosine." *J Biol Chem* 263: 7678-7685.
- Pereira, A., H. Cuypers, A. Gierl, Z. Schwarz-Sommer und H. Saedler (1986). "Molecular analysis of the *En/Spm* transposable element system of *Zea mays*." *EMBO J.* 5: 835-841.
- Perutz, M. F., T. Johnson, M. Suzuki und J. T. Finch (1994). "Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases." *PNAS* 91(12): 5355-8.
- Peterson, P. W. und J. I. Yoder (1993). "*Ac*-induced instability at the *Xanthophyllin* locus of tomato." *Genetics* 134: 931-942.
- Plasterk, R. (1998). "V(D)J recombination. Ragtime jumping [news; comment]." *Nature* 394(6695): 718-9.
- Pohlman, R. F., N. V. Fedoroff und J. Messing (1984). "The nucleotide sequence of the maize controlling element *Activator*." *Cell* 37: 635-643.
- Polard, P. und M. Chandler (1995). "Bacterial transposases and retroviral integrases." *Molecular Microbiology* 15(1): 13-23.
- Polard, P., B. Tonhoang, L. Haren, M. Betermier, R. Walczak und M. Chandler (1996). "IS911-mediated transpositional recombination in vitro." *Journal of Molecular Biology* 264(1): 68-81.
- Raina, R., M. Schlappi, B. Karunanandaa, A. Elhofy und N. Fedoroff (1998). "Concerted formation of macromolecular *Suppressor-mutator* transposition complexes." *PNAS* 95(15): 8526-31.

- Rinehart, T. A., C. Dean und C. F. Weil (1997). "Comparative analysis of non-random DNA repair following *Ac* transposon excision in maize and *Arabidopsis*." *Plant Journal* 12(6): 1419-1427.
- Rio, D. C. (1991). "Regulation of *Drosophila P* element transposition." *Trends Genet* 7: 282-287.
- Ros, F. und K., R. (2000). "Regulation of maize *Ac/Ds* transposition by replication and DNA methylation." eingereicht.
- Rubinsztein, D. C., J. Leggo, *et al.* (1996). "Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats." *Am J Hum Genet* 59(1): 16-22.
- Saedler, H. und P. Nevers (1985). "Transposition in plants: a molecular model." *EMBO J.* 4: 585-590.
- Sakai, J., R. M. Chalmers und N. Kleckner (1995). "Identification and characterization of a pre-cleavage synaptic complex that is an early intermediate in Tn 10 transposition." *EMBO Journal* 14(17): 4374-4383.
- Sakai, J. und N. Kleckner (1997). "The Tn10 synaptic complex can capture a target DNA only after transposon excision." *Cell* 89(2): 205-214.
- Sakai, J. S., N. Kleckner, X. Yang und A. Guhathakurta (2000). "Tn10 transpososome assembly involves a folded intermediate that must be unfolded for target capture and strand transfer." *Embo J* 19(4): 776-85.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1989). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarnovsky, R. J., E. W. May und N. L. Craig (1996). "The Tn7 transposase is a heteromeric complex in which DNA breakage and joining activities are distributed between different gene products." *EMBO J* 15(22): 6348-6361.
- Sathasivam, K., I. Amaechi, L. Mangiarini (1997). "Identification of an HD patient with a (CAG)¹⁸⁰ repeat expansion and the propagation of highly expanded CAG repeats in lambda phage." *Hum Genet* 99(5): 692-5.
- Scherzinger, E., R. Lurz, M. Turmaine, L. Mangiarini, B. Hollenbach, R. Hasenbank, G. P. Bates, S. W. Davies, H. Lehrach und E. E. Wanker (1997). "Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and *in vivo*." *Cell* 90(3): 549-58.
- Schiestl, R. H. und R. D. Gietz (1989). "High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as carrier." *Current Genetics* 16: 339-346.
- Schmidt, R. und L. Willmitzer (1989). "The maize autonomous element *Activator (Ac)* shows a minimal germinal excision frequency of 0.2%-0.5% in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants." *MGG* 220: 17-24.

- Schwartzberg, P., J. Colicelli und S. P. Goff (1984). "Construction and analysis of deletion mutations in the pol gene of Moloney murine leukemia virus: a new viral function required for productive infection." *Cell* 37(3): 1043-52.
- Scofield, S. R., K. Harrison, S. J. Nurrish und J. D. G. Jones (1992). "Promoter fusions to the *Activator* transposase gene cause distinct patterns of *Dissociation* excision in tobacco cotyledons." *Plant Cell* 4: 573-582.
- Scofield, S. R., J. J. English und J. D. G. Jones (1993). "High level expression of the *Activator* (*Ac*) transposase gene inhibits the excision of *Dissociation* (*Ds*) in tobacco cotyledons." *Cell* 75: 507-517.
- Sherman, P. A. und J. A. Fyfe (1990). "Human immunodeficiency virus integration protein expressed in *Escherichia coli* possesses selective DNA cleaving activity." *PNAS* 87(13): 5119-23.
- Steiniger-White, M. und W. S. Reznikoff (2000). "The C-terminal alpha helix of Tn5 transposase is required for synaptic complex formation." *J Biol Chem* 275(30): 23127-33.
- Studier, F. W., A. H. Rosenberg, J. J. Dunn und J. W. Dubendorff (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." *Methods Enzymol* 185: 60-89.
- Tavakoli, N. P., J. Devost und K. M. Derbyshire (1997). "Defining Functional Regions Of the Is903 Transposase." *Journal of Molecular Biology* 274(4): 491-504.
- Ton-Hoang, B., P. Polard und M. Chandler (1998). "Efficient transposition of IS911 circles in vitro." *EMBO J* 17(4): 1169-81.
- Trentmann, S. M., H. Saedler und A. Gierl (1993). "The transposable element *En/Spm*-encoded TNPA protein contains a DNA binding and a dimerization domain." *MGG* 238: 201-208.
- van Gent, D. C., C. Vink, A. A. M. Oude Groeneger und R. H. A. Plasterk (1993). "Complementation between HIV integrase proteins mutated in different domains." *EMBO J.* 12: 3261-3267.
- van Pouderooyen, G., R. F. Ketting, A. Perrakis, R. H. Plasterk und T. K. Sixma (1997). "Crystal structure of the specific DNA-binding domain of Tc3 transposase of *C.elegans* in complex with transposon DNA." *EMBO J* 16(19): 6044-54.
- van Houwelingen, A., E. Souer, K. Spelt, D. Kloos, J. Mol und R. Koes (1998). "Analysis of flower pigmentation mutants generated by random transposon mutagenesis in *Petunia hybrida*." *Plant Journal* 13(1): 39-50.
- Vink, C., D. C. van Gent, Y. Elgersma und R. H. Plasterk (1991). "Human immunodeficiency virus integrase protein requires a subterminal position of its viral DNA recognition sequence for efficient cleavage." *J Virol* 65(9): 4636-44.
- Vink, C., A. M. Oude Groeneger und R. H. Plasterk (1993). "Identification of the catalytic and DNA-binding region of the human immunodeficiency virus type I integrase protein." *Nucleic Acids Res* 21(6): 1419-25.

Vink, C., E. Yehekiely, et al. (1991). "Site-specific hydrolysis and alcoholysis of human immunodeficiency virus DNA termini mediated by the viral integrase protein." *Nucleic Acids Res* 19(24): 6691-8.

Wang, L. und R. Kunze (1998). "Transposase binding site methylation in the epigenetically inactivated *Ac* derivative *Ds-cy*." *The Plant Journal* 13(4): 577-582.

Watson, N. (1988). "A new revision of the sequence of plasmid pBR322." *Gene* 70(2): 399-403.

Weil, C. F. und R. Kunze (2000). "Transposition of maize *Ac/Ds* transposable elements in the yeast *saccharomyces cerevisiae* [In Process Citation]." *Nat Genet* 26(2): 187-90.

Weinreich, M. D., A. Gasch, et al. (1994). "Evidence that the *cis* preference of the Tn5 transposase is caused by nonproductive multimerization." *Gene Develop* 8(19): 2363-2374.

Wiegand, T. W. und W. S. Reznikoff (1992). "Characterization of two hypertransposing Tn5 mutants." *J Bacteriol* 174(4): 1229-39.

Wu, Z. G. und G. Chaconas (1995). "A novel DNA binding and nuclease activity in domain III of Mu transposase: Evidence for a catalytic region involved in donor cleavage." *EMBO Journal* 14(15): 3835-3843.

Zhou, J. H. und A. G. Atherly (1990). "In situ detection of transposition of the maize controlling element (*Ac*) in transgenic soybean tissues." *Plant Cell Rep* 8: 542-545.

7 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. Reinhard Kunze für die Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit bedanken. Sein Interesse blieb auch auf die Entfernung immer bestehen, so daß ich durch viele mündliche und später auch schriftliche Diskussionen, viel dazu lernen konnte. Während meiner Arbeit gewährte er mir besonders in den letzten Monaten viele Freiheiten, die ich auch gerne genutzt habe. Damit daß ich in München weiterarbeiten durfte, hat er mir großes Vertrauen entgegen gebracht, vielen Dank dafür.

Bei den ehemaligen Mitgliedern der Kunze-Gruppe, Monika und Melli, möchte ich mich für ihre Hilfe im Labor bedanken. Bei Monika auch für die aufbauenden e-mails in der Endphase.

Francesca Ros hat mit mir zusammen die letzten kargen Monate im Labor überstanden. Bei Ihr bedanke ich mich herzlich für unzählige Dinge: für die nette Aufnahme in die Gruppe, für den Spaß bei der Arbeit, für zahlreiche wissenschaftliche und eher weniger wissenschaftliche Diskussionen, dafür daß ich bei ihr immer Frust ablassen konnte, für Espresso und pasta a la mama, und für viele, viele andere Dinge in und außerhalb des Labors!

Mein Dank gilt auch vielen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Regine Kahmann, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und die mir so manches unvergessliche Erlebnis beschert haben. Dazu gehören: Dr. Feldi, Philip, Mark, Georgi, Jörg, Gerhard, Siegi, Alex, Olli, Andreas, Christine, Roland und Michael u.a. und auch ehemalige Mitglieder wie Angelika und Johannes.

Bei Andrea, die dem Ableger Gin/FIS angehörte, möchte ich mich bedanken, daß sie immer da war und ein offenes Ohr für mich hatte, für Krankenschwesterdienste, für leckere Mittagessen, Sweeties zum Espresso und vieles mehr, was weit über das Labor hinaus reicht. Letzteres betrifft auch ihren Mann Bertram, vielen Dank Euch beiden.

Mein Dank gilt auch meiner Familie, die mich immer unterstützt hat und meinen Eltern, die mir vieles erst möglich gemacht haben.

Der größte Dank gilt Theo, der immer bedingungslos für mich da ist und ein ganz wunderbarer Freund ist. Seine Geduld wurde im Laufe dieser Arbeit stark strapaziert!

Lebenslauf

Personalien

Ruth Hedwig Adolphs
geboren am 10. Dezember 1971
in Gummersbach

Schulbildung

1978 - 1982 Katholische Grundschule Engelskirchen
1982 - 1991 Aggertal-Gymnasium Engelskirchen
Juni 1991 Abitur

Studium

Okt. 1991 - Jan. 1997 Studium der Biologie an der Universität zu Köln
Jan. 1996 - Jan. 1997 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für
Züchtungsforschung, Köln-Vogelsang, Abteilung Prof. Dr.
Heinz Saedler (Molekulare Pflanzengenetik),
Arbeitsgruppe Dr. Peter Huijser
3. Februar 1997 Diplom

Promotion

Jan. 1997 - Dez. 2000 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für
Genetik und Mikrobiologie der LMU München betreut
von PD Dr. Reinhard Kunze