

# **Die dreidimensionale Struktur nativer Editosomen aus afrikanischen Trypanosomen**

vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt  
zur  
Erlangung des akademischen Grades eines  
*Doctor rerum naturalium*  
genehmigte  
Dissertation von

Dipl.-Biol.  
**Cordula Böhm**  
aus Rüsselsheim

Referent: Prof. Dr. H. Ulrich Göringer  
Koreferentin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer

Tag der Einreichung: 14. Mai 2008  
Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni 2008

Darmstadt 2008  
D17

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Ulrich Göringer am Institut für Mikrobiologie und Genetik des Fachbereichs Biologie der Technischen Universität Darmstadt im Zeitraum von Juli 2003 bis Mai 2008 angefertigt. Die elektronenmikroskopischen Teile der Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Monika Golas, Dr. Björn Sander und Dr. Holger Stark am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt.

Teile dieser Arbeit gehen in die folgenden Veröffentlichungen ein:

Göringer, H.U.; Brecht, M.; Böhm, C.; Kruse, E. (2008): RNA-Editing Accessory Factors- the Example of mHel61p. In: RNA-Editing, Springer Verlag, ISSN 0933-1891, S. 165-179.

Golas, M.M.; Brecht, M.; Sander, B.; Böhm, C.; Stark, H.; Göringer, H.U. (2008) Molecular Snapshots of the Native RNA-Editing Machinery in African Trypanosomes Captured at Different Assembly Stages *in vivo*. Zur Veröffentlichung eingereicht.

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
2.1	RNA-Editing Phänomene in Eukaryoten und Viren	6
2.2	RNA-Editing im Mitochondrium von Trypanosomen	9
2.3	Zielsetzung	18
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>19</b>
3.1	Isolierung und biochemische Charakterisierung von Editosomen in unterschiedlichen funktionalen Stadien der RNA-Editing-Reaktion	19
3.2	Strukturanalyse von funktionalen Editosomen	34
3.3	Biochemische Charakterisierung von funktionalen 20 S und 40 S Editosomen	42
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>50</b>
4.1	Isolierung und biochemische Charakterisierung von Editosomen in unterschiedlichen funktionalen Stadien der RNA-Editing-Reaktion	51
4.2	Visualisierung funktionaler Editosomen durch TEM	56
4.3	Biochemische Charakterisierung von funktionalen 20 S und 40 S Editosomen	59
4.4	Ausblick	62
<b>5</b>	<b>MATERIALIEN</b>	<b>63</b>
5.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	63
5.2	Enzyme und Inhibitoren	64
5.3	Organismen	64
5.4	Plasmide	65
5.5	Nukleinsäuren	65
5.6	Standardpuffer und Medien	66
5.7	Geräte	67
5.8	Computersoftware	68

<b>6</b>	<b>METHODEN</b>	<b>69</b>
6.1	Mikrobiologische Methoden	69
6.2	Parasitologische Arbeiten	70
6.3	Standardmethoden im Umgang mit NS	71
6.4	DNA-Arbeitstechniken	75
6.5	Techniken der DNA-Klonierung	76
6.6	RNA-Arbeitstechniken	77
6.7	Protein-Arbeitstechniken	78
6.8	Isolierung von nativen Editosomen	82
6.9	<i>In vitro Assays</i>	83
6.10	Massenspektrometrische Analyse	84
6.11	Strukturanalyse durch TEM	85
6.12	RNA-Bindestudien durch <i>surface plasmon resonance</i> -Messung	86
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>88</b>
7.1	pLew100:	88
7.2	TAP- <i>tag</i> :	89
7.3	gBP21:	89
7.4	TbMP42:	90
7.5	mHel61p:	91
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>104</b>
<b>10</b>	<b>EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>107</b>
<b>11</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>108</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>109</b>

## 1 Zusammenfassung

RNA-Editing im Mitochondrium afrikanischer Trypanosomen generiert durch die Insertion und Deletion von ausschließlich Uridylatresten aus kryptischen Transkripten translationskompetente mRNAs. Dieser posttranskriptionale Prozess wird durch einen als Editosom bezeichneten Ribonukleoproteinkomplex bestehend aus mRNA, gRNA und bis zu 20 Proteinen katalysiert. Während die RNA- und Proteinkomponenten des Editosoms identifiziert und charakterisiert sind, ist über dessen strukturelle Organisation sowie über dessen Assemblierung und Dissoziation wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden Editosomen in unterschiedlichen Stadien der Editing-Reaktion durch *tandem affinity purification* unter physiologischen Bedingungen isoliert. Editosomen in der Initiations-, Prozessierungs- und Terminationsphase enthalten mRNA, gRNA und 12-15 Proteine in unterschiedlicher Zusammensetzung. Nur in der Prozessierungsphase der Editing-Reaktion konnten funktionale Editosomen isoliert werden. Editosomen in der Initiations- und Terminationsphase zeigten keine Aktivität. In allen Stadien der Editing-Reaktion liegen Editosomen unter *steady state*-Bedingungen sowohl als 20 S und 40 S Subpopulationen vor.

Durch Transmissionselektronenmikroskopie wurden funktionale 20 S und 40 S Editosomen visualisiert. Durch eine als *random conical tilt* bezeichnete Methode wurde ihre dreidimensionale Struktur mit einer Auflösung von  $\sim 2$  nm bestimmt. 20 S Editosomen haben eine elongierte, leicht gekrümmte Form. Sie bestehen aus zwei Subdomänen ähnlicher Größe, die über eine schmale Brücke miteinander verbunden sind. 20 S Editosomen haben eine Dimension von  $21 \times 15,5 \times 14$  nm, ein Molekulargewicht von  $800 \pm 80$  kDa, und einen Svedberg-Koeffizient von 21-26 S. 40 S Editosomen bestehen aus einer konvexen, elongierten Plattform, die sich an gegenüberliegenden Seiten zu globulären Domänen ausweitet. Auf die Plattform ist eine runde, asymmetrische Domäne aufgelagert. 40 S Editosomen haben eine Dimension von  $26,5 \times 20 \times 17,5$  nm, ein Molekulargewicht von  $1,45 \pm 0,15$  MDa, und einen Svedberg-Koeffizienten von 35-41 S.

20 S Editosomen stellen ein frühes Assemblierungsstadium der 40 S Editosomen dar. In einem dreidimensionalen *Alignment* konnte gezeigt werden, dass es sich bei den 20 S Editosomen um einen Teil der Plattform der 40 S Editosomen handelt. 20 S und 40 S Editosomen weisen ein ähnliches Proteinprofil auf, der Unterschied besteht hauptsächlich in ihrem RNA-Gehalt. 20 S Editosomen werden durch die Bindung von mRNA und gRNA in 40 S Editosomen konvertiert. *Surface plasmon resonance*-Messungen ergaben, dass sowohl gRNAs und mRNAs als auch ein gRNA/mRNA-Duplex mit einer Dissoziationskonstante im nanomolaren Bereich an 20 S Editosomen binden. *Immunogold labeling*-Experimente zeigten, dass 20 S Editosomen eine RNA-Bindestelle aufweisen.

## 2 Einleitung

Das "zentrale Dogma der Molekularbiologie", das 1957 von Francis Crick beschrieben wurde, galt Jahrzehnte lang als unumstößlich. Es besagt, dass die genetische Information, die in der DNA-Sequenz gespeichert ist, zunächst in RNA umgeschrieben wird, die dann als Matrize für die Synthese von Proteinen dient (Crick, 1957). Auch die These „ein Gen – ein Protein“ drückt die damals vorherrschende Ansicht aus, dass ein Gen die exakte Aminosäuresequenz genau eines Proteins kodiert.

Als 1986 das RNA-Editing im Mitochondrium von Trypanosomen von Benne und Mitarbeitern entdeckt wurde musste dieser direkte Fluss der genetischen Information erweitert werden (Benne et al., 1986).

Als RNA-Editing bezeichnet man die ko-oder posttranskriptionale Modifikation der RNA durch Insertion, Deletion oder Modifikation von Basen. Mittlerweile sind in Eukaryoten und Viren verschiedenartige Prozesse beschrieben worden, die auf unterschiedlichste Weise die genetische Information auf RNA-Ebene verändern.

### 2.1 RNA-Editing Phänomene in Eukaryoten und Viren

#### 2.1.1 Guanylat-Insertion bei Paramyxoviren

Die Familie Paramyxoviridae umfasst behüllte Viren mit einem Genom aus einzelsträngiger, linearer RNA negativer Polarität. Diese in Säugetieren und Vögeln verbreiteten Viren sind die Erreger von Krankheiten wie Staupe, Masern oder Mumps.

Bei Paramyxoviren werden durch RNA-Editing Guanylatreste in das RNA-Genom inseriert, die Anzahl der Insertionen variiert je nach Virus zwischen eins und sechs. Durch die RNA-Editing-Reaktion entstehen alternative Leserahmen im Transkript des P-Proteins, ein Strukturprotein und Bestandteil des Transkriptasekomplexes, und des V-Proteins, dessen Funktion noch unbekannt ist (Cattaneo et al., 1989; Thomas et al., 1988; Vidal et al., 1990).

Die Insertion der Guanylatreste erfolgt bei den Paramyxoviridae über einen kotranskriptionalen Mechanismus, der auf ein "Stottern" der RNA-Polymerase zurückzuführen ist. Während der Transkription kommt es zu einem Pausieren der viralen Polymerase an einer cytosinreichen Sequenz, wobei das naszierende Transkript an der Template-DNA "zurückrutscht". Beim Fortschreiten der Transkription wird die cytosinreiche Sequenz erneut abgelesen, und es kommt zum erneuten Einfügen von Guanylatresten (Thomas et al., 1988; Hausmann et al., 1999; Vidal et al., 1990)

### **2.1.2 Insertion, Deletion und Basenmodifikation im Mitochondrium von *Physarum polycephalum***

Im Mitochondrium des Schleimpilzes *Physarum polycephalum* finden zwei voneinander unabhängige RNA-Editing-Reaktionen statt. Zum einen kommt es zur Insertion von Mono- und Dinukleotiden in fast alle mitochondrialen mRNAs sowie in einige rRNAs und tRNAs (Mahendran et al., 1991; Gott et al., 1993; Antes et al., 1998; Wang et al., 1999). Dieser RNA-Editing-Mechanismus läuft vermutlich kotranskriptional ab (Gott, 2000). Die Insertion erfolgt nahe der RNA-Synthesestelle in 5'-3'-Richtung (Visomorski-Robic und Gott, 1997) und resultiert aus einer Kondensation von Nukleotiden an das 3'-Ende des naszierenden Transkripts (Cheng et al., 2000). Weniger häufig kommt es zur Deletion von Nukleotiden, bisher ist nur die Deletion von drei Adenosinen aus dem Transkript der NADH-Dehydrogenase Untereinheit 2 beschrieben (Gott et al., 2005).

Außerdem findet im Transkript der Cytochrom-Oxidase Untereinheit 1 an vier Positionen eine Cytosin zu Uracil-Transition statt (Gott et al., 1993). Bislang ist ungeklärt, welche Faktoren an dieser Reaktion beteiligt sind und wodurch sie spezifiziert wird.

### **2.1.3 Cytidin-Desaminierung im Transkript des Apolipoprotein B von Säugetieren**

Die gewebsspezifische Sequenzmodifikation der Apolipoprotein B (ApoB)-mRNA war die erste RNA-Editing-Reaktion, die in Vertebraten beschrieben wurde (Chen et al., 1987; Powell et al., 1987). ApoB liegt in humanen Zellen in zwei Formen vor: als ApoB-100 und als ApoB-48, welches 48 % der Länge des ApoB-100 repräsentiert. Beide Formen spielen eine wichtige Rolle im Cholesterin-Stoffwechsel (Chan, 1992). ApoB-100 wird von Leberzellen sezerniert und transportiert durch rezeptorvermittelte Endozytose Cholesterin in die Zellen. Hierzu bindet es an den LDL (*low-density lipoprotein*)-Rezeptor, die dafür notwendige Bindedomäne befindet sich am Carboxyterminus des Proteins (Borén et al., 1998). ApoB-48 fehlt diese carboxyterminale Bindedomäne, es wird im Dünndarm gebildet und dient der Absorption und dem Transport von Nahrungsfetten.

Beide ApoB-Formen werden von einem Gen kodiert, die Expression des ApoB-48 resultiert aus einer Modifikation der mRNA-Sequenz (Driscoll et al., 1989). An Position 6666 kommt es zu einer Cytidin zu Uracil-Transition, die dazu führt, dass anstelle eines Glutamin-Kodons (CAA) ein Stopp-Kodon (UAA) entsteht.

Diese Cytidin zu Uracil-Transition ist ein posttranskriptionaler Prozess, der nach erfolgter Spleißing-Reaktion im Kern abläuft (Sowden et al., 1996; Sowden und Smith, 2001; Davidson, 2002). Katalysiert wird die Reaktion durch APOBEC1 (*apoB editing catalytic subunit 1*), der ersten in Säugern identifizierten Cytidin-Deaminase (Teng et al., 1993), die Spezifität der Reaktion wird in *cis* durch drei regulatorische Elemente innerhalb der mRNA vorgegeben (Backus und Smith, 1992; Backus et al.,

1994). Die Reaktion wird nach Strukturvorhersagen in einer Stem-Loop-Struktur vollzogen, die die Editing-Stelle für die Editing-Maschinerie zugänglich macht (Richardson et al., 1998).

### **2.1.4 Adenosin-Desaminierung im Transkript des Glutamatrezeptors von Säugetieren**

Im zentralen Nervensystem von Säugern findet eine Modifikation der Transkripte von glutamatabhängigen Ionenkanälen statt (Sommer et al., 1991). Am besten untersucht ist das RNA-Editing bei AMPA-Rezeptoren. Diese Rezeptoren sind nach ihrem Agonisten AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxyl-5-methyl-isoaxol-4-propionat) benannt und setzt sich aus den Untereinheiten GluR-A, GluR-B, GluR-C und GluR-D zusammen (Ferrer-Montiel und Montal, 1996; Mano und Teichberg, 1998). AMPA Rezeptoren weisen in Abhängigkeit von der Gehirnregion und des Nervenzelltyps eine unterschiedlich hohe Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen auf. Eine geringe  $\text{Ca}^{2+}$ -Leitfähigkeit korreliert mit dem Auftreten der GluR-B-Untereinheit. Die verminderte Permeabilität für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ist die Folge einer RNA-Editing-Reaktion (Hume et al., 1991; Burnashev et al., 1995).

Während die GluR-A, -C und -D-Transkripte an Position 585 die Aminosäure Arginin kodieren gibt, die GluR-B-mRNA ein Glutamin-Kodon vor. Dieser Aminosäureaustausch basiert auf der Transition von Adenosin zu Inosin, durch die ein CAG-Kodon in ein CIG-Kodon konvertiert wird. Da Inosin von der Translationsmaschinerie als Guanodin gelesen wird, resultiert die Modifikation in einem Austausch von Glutamin gegen Arginin.

Bei der Transition von Adenosin zu Inosin handelt es sich um eine hydrolytische Desaminierung, bei der ein Wassermolekül am C6-Atom des Adenins angreift. Die Abspaltung der Aminogruppe führt zur Entstehung der Carbonylgruppe des Endproduktes Inosin (Polson *et al.*, 1991). Die Reaktion wird von einer Gruppe von Enzymen katalysiert, die nach ihrer Spezifität als ADARs (*adenosine deaminase that act on RNA*) benannt sind. Für die Spezifität der Reaktion ist in *cis* ein als ECS (*editing complementary sequence*) bezeichnetes, intronisches Element der mRNA von Bedeutung. Dieses führt zur Ausbildung einer doppelsträngigen RNA-Struktur (Higuchi et al., 1993), die von den ADARs erkannt wird (Melcher et al., 1995).

### **2.1.5 Basenmodifikation in Pflanzenorganellen**

In Pflanzen wurde RNA-Editing sowohl in den Mitochondrien als auch in den Chloroplasten nachgewiesen (Gualberto et al., 1989; Covello und Gray, 1989; Hiesel et al., 1989; Hoch et al., 1991; Kudla et al., 1992). In beiden Organellen handelt es sich bei 90 % der Sequenzmodifikationen um die Transition von Cytidin zu Uridin, weniger häufig kommt es zur reversen Reaktion, bei der Uridin in Cytidin konvertiert wird.

Welche Faktoren an der Katalyse der Reaktionen beteiligt sind und wodurch sie spezifiziert werden ist bislang noch nicht geklärt. Möglicherweise werden die Reaktionen durch unabhängige Enzyme katalysiert. Für die Transition von Cytidin zu Uracil ist die Katalyse durch eine Cytidin-Deaminase ähnlich der APOBECs denkbar. Eine Alternative wäre, dass beide Reaktionen von einem Enzym in einer Transaminierungsreaktion katalysiert werden (Yu und Schuster, 1995).

Da keine Konsenselemente auf Primär- oder Sekundärstrukturebene identifiziert werden konnten, wird davon ausgegangen, dass die Information für die Sequenzmodifikation durch in *trans* agierende Faktoren beigesteuert wird (Chaudhuri et al., 1995).

## 2.2 RNA-Editing im Mitochondrium von Trypanosomen

In dieser Arbeit wurde das RNA-Editing im Mitochondrium von afrikanischen Trypanosomen untersucht. Afrikanische Trypanosomen sind einzellige, flagellare, protozoische Parasiten aus der Ordnung der Kinetoplastida. Kinetoplastiden stellen eine in der Entwicklungsgeschichte der Eukaryoten früh abgezweigte Gruppe dar und sind phylogenetisch weit von den höheren Eukaryoten entfernt (Cavalier-Smith, 1993). Alle Arten innerhalb der Familie der Trypanosomatidae leben parasitisch und verursachen z.T. schwerwiegende Krankheiten bei Menschen und Säugetieren. *Trypanosoma brucei* (*T. brucei*) ist der Erreger der humanen afrikanischen Schlafkrankheit, und wird durch den Stich einer infizierten Tsetsefliege (*Glossina spec.*) auf den Menschen übertragen. Die afrikanische Schlafkrankheit ist eine in Zentralafrika verbreitete Seuche, an der jährlich über 50000 Menschen sterben (WHO, 2006), und für deren Behandlung derzeit keine effektiven Therapeutika mit akzeptablen Nebenwirkungen zur Verfügung stehen. Die Erforschung von für den Parasiten spezifischen biologischen Prozessen ist daher von großem Interesse. Als Modellorganismus wird die für den Menschen nicht pathogene Art *T. brucei brucei* verwendet, die in Rindern die Nagana auslöst.

Die sehr entfernte Verwandtschaft der Kinetoplastiden mit anderen Eukaryoten spiegelt sich in einigen zellulären und molekulargenetischen Besonderheiten wieder. Eine dieser Besonderheiten ist der Kinetoplast, ein konkatenates Netzwerk doppelsträngiger, ringförmiger DNA, der das Genom des singulären Mitochondriums darstellt (Englund et al., 1982; Stuart et al., 1997).

Das mitochondriale Genom von *T. brucei* besteht aus 5000-10000 Minizirkeln mit einer Größe von ca. 1 kbp und 40-50 Maxizirkeln mit einer Größe von ca. 22 kbp. Maxizirkel kodieren für rRNAs sowie für einige Enzyme der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung. Diese mitochondrialen Prozesse sind für die Energieversorgung der Trypanosomen im Insektendarm, der sogenannten prozyklischen Lebensform, essentiell (Tielens und Hellemond, 1998). Zur Expression von 12 aus 18 mitochondrialen Genen ist die posttranskriptionale Modifikation der prä-mRNA durch RNA-Editing nötig.

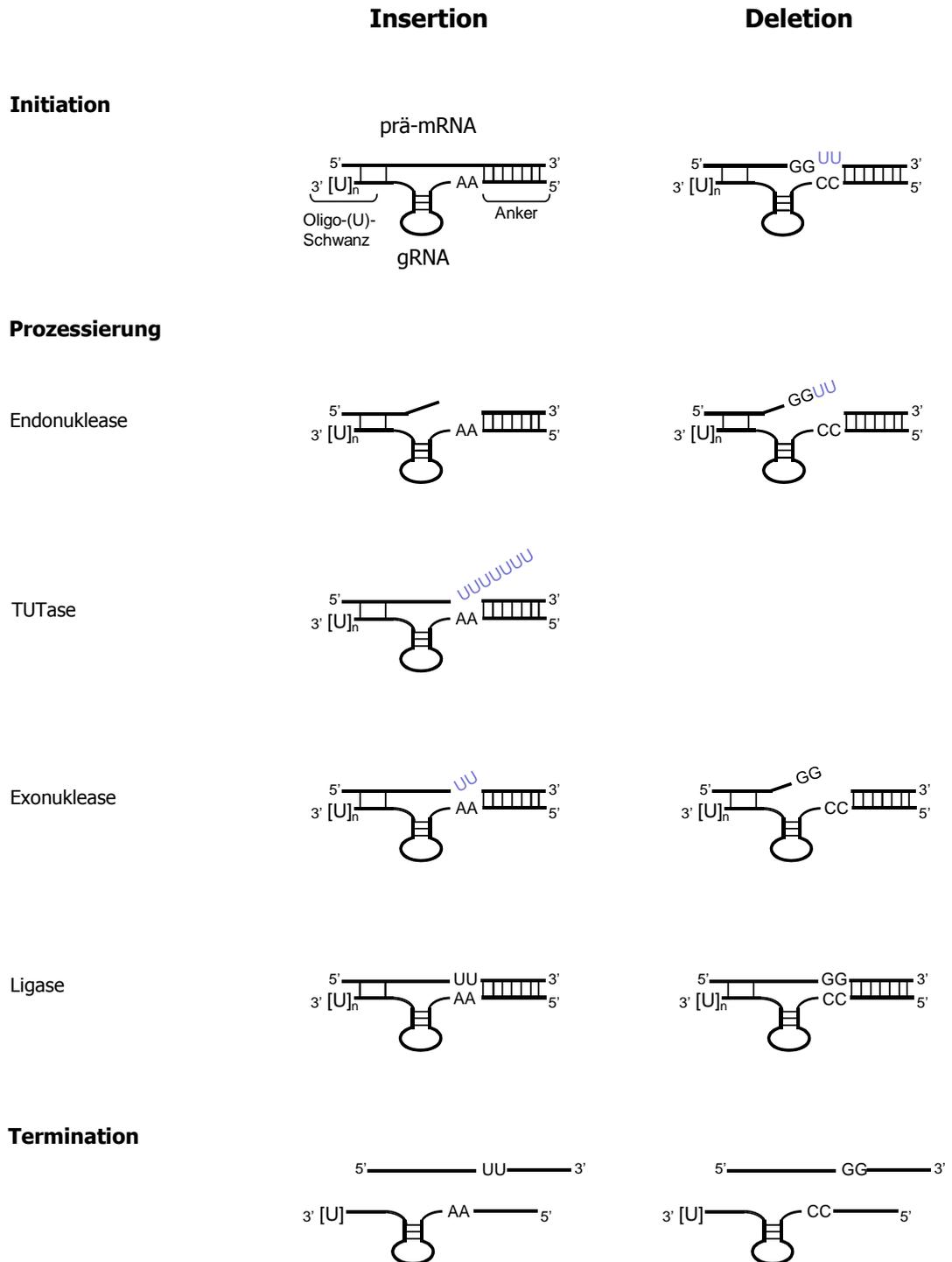


von 55-70 nt. Die Informationssequenz ist komplementär zur vollständig editierten mRNA, wobei nicht kanonische Basenpaarungen und G-U-Wobbel-Basenpaarungen möglich sind und spezifiziert die Position und die Art der Sequenzmodifikation. Die 3'-terminale Region der gRNA besteht aus einem Oligo(U)-Schwanz. Die 5-25 Uridine werden posttranskriptional an die gRNAs angefügt. Es wird vermutet, dass der Oligo(U)-Schwanz das 5'-Fragment der mRNA durch Interaktion mit einer purinreichen Sequenz stromaufwärts der Editing-Stelle während der Reaktion in Position hält (Blum und Simpson, 1990; Seiwert et al., 1996; Burgess et al., 1999). Trotz unterschiedlicher Primärsequenzen bilden gRNAs ähnliche Sekundärstrukturen aus. Die Faltung in eine 3'-terminale und eine 5'-terminale Haarnadelstruktur als gemeinsame Sekundärstruktur ermöglicht eine sequenzunspecifische Erkennung von gRNA-bindenden Proteinen (Schmid et al., 1995; Hermann et al., 1997).

In den meisten Fällen ist in das Editing einer prä-mRNA mehr als eine gRNA involviert, da eine gRNA mit 55-70 nt nur die Informationssequenz für 15-40 nt enthält (Maslov und Simpson, 1992). Das RNA-Editing der prä-mRNA erfolgt in 3'-5'-Direktionalität (Decker und Sollner-Webb, 1990; Sturm und Simpson, 1990). Dies wird dadurch gewährleistet, dass nur für die 3'-terminale Editing-Stelle eine kognate gRNA vorhanden ist. Erst der durch diese gRNA vermittelte Editing-Prozess führt zur Entstehung der Ankerregion für die nächste gRNA (Abraham et al., 1988; Maslov und Simpson, 1992).

### **2.2.2 Modell der RNA-Editing-Reaktion**

Das RNA-Editing im Mitochondrium von Trypanosomen läuft wahrscheinlich nach dem 1990 von Blum et al. vorgeschlagenen Enzymkaskadenmodell ab (Abb. 2; Blum et al., 1990). Während der Initiationsphase hybridisiert die gRNA stromabwärts der ersten Editing-Stelle mit der prä-mRNA und definiert so die Position der Sequenzmodifikation. Während der Prozessierungsphase erkennt eine spezifische Endonuklease das Ende des RNA-Doppelstranges und hydrolysiert die Phosphodiesterbindung 5'-proximal zum Ankerduplex. Im Falle einer Insertionsreaktion werden durch eine terminale Uridylyl-Transferase (TUTase) Us an das freie 3'-Ende des 5'-Fragments der prä-mRNA kondensiert. Die addierten Us bilden Basenpaare mit der internen Informationssequenz der gRNA, was zur Verlängerung des gRNA/mRNA-Duplex führt. Durch die TUTase angehängte, ungepaarte Us werden durch eine U-spezifische 3'-5'-Exonuklease hydrolysiert. Im Falle einer Deletionsreaktion werden ungepaarte Us durch eine 3'-5'-Exonuklease entfernt. Nach der Insertion bzw. Deletion werden die modifizierten mRNA-Fragmente durch eine RNA-Ligase verbunden. Dieser Zyklus wiederholt sich an der 5'-proximalen Editing-Stelle bis die mRNA vollständig komplementär zur Informationssequenz der gRNA ist. In der Terminationsphase wird der gRNA/mRNA-Duplex aufgelöst.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des RNA-Editing-Mechanismus.** Die enzymatischen Reaktionsschritte des Insertions-Editings sind auf der linken Seite, die des Deletions-Editings sind auf der rechten Seite dargestellt (nach dem Enzymkaskadenmodell von Blum et al., 1990).

### 2.2.3 Das Editosom

Das RNA-Editing im Mitochondrium von Trypanosomen wird von einem makromolekularen Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex katalysiert, der analog zu den bereits gut untersuchten RNP-Komplexen Ribosom und Spleißosom, als Editosom bezeichnet wird. Das Editosom bietet eine Plattform für die Katalyse aller enzymatischen Reaktionen während der Insertions- und Deletionsreaktion.

Die an der Reaktion beteiligten Proteinkomponenten wurden in den letzten Jahren identifiziert und charakterisiert. Es wurden etwa 20 editingassoziierte Proteine beschrieben, wobei die enzymatischen Kernaktivitäten wie Endo- und Exonuklease-Aktivität, TUTase-Aktivität und Ligase-Aktivität einzelnen Proteinen zugeordnet werden konnten (Tab. 1; zusammengefasst in Carnes und Stuart, 2008).

Untersuchungen zur strukturellen Organisation des Editosoms ergaben bisher kein klares Bild. Es wurden verschiedene Komplexe isoliert und beschrieben, die je nach Reinigungsverfahren eine unterschiedliche Protein- bzw. RNA-Zusammensetzung und unterschiedliche Sedimentationsverhalten aufwiesen: Ein Komplex mit einem apparenten Svedberg (S)-Koeffizienten von 10 S enthielt gRNA und zeigte TUTase- und RNA-Ligase-Aktivität (Peris et al., 1994; Peris et al., 1997). Komplexe mit einem apparenten S-Wert von 20 S wiesen eine *in vitro* Editing-Aktivität auf, wenn kognate gRNA und prä-mRNA zugeführt wurde (Pollard et al., 1992; Seiwert et al., 1994; Kable et al., 1996). Diese Partikel bestanden aus mindestens sieben und bis zu 20 Proteinen und enthielten keine RNA (Ruschéet al., 1997; Apasizhev et al., 2003; Panigrahi et al., 2001). Komplexe mit einem apparenten S-Wert von 35-40 S enthielten ebenfalls alle für die Katalyse einer *in vitro* RNA-Editing-Reaktion notwendigen Proteine, zusätzlich wurden prä-mRNAs assoziiert mit diesen Partikeln nachgewiesen. (Pollard et al., 1992; Corell et al., 1996; Madison-Antenucci et al., 2002). In welcher Beziehung diese Komplexe zueinander stehen ist bislang nicht bekannt. Es konnte z.B. noch nicht geklärt werden, ob das Insertions- und das Deletions-Editing von unterschiedlichen RNP-Komplexen oder von einem Komplex mit zwei Reaktionszentren katalysiert werden.

Auch dynamische Aspekte, wie die Assemblierung oder Dissoziation des Editosoms, wurden bisher nicht untersucht. Der basale Reaktionsmechanismus lässt sich in drei funktionale Stadien unterteilen, doch ob sich Initiations- Prozessierungs- und Terminationskomplexe in ihrem Sedimentationsverhalten und ihrer RNA- oder Proteinkomposition unterscheiden ist noch nicht geklärt.

Für jedes dieser funktionalen Stadien wurden Proteine identifiziert, die nur in dieser Reaktionsphase aktiv sind und somit als "Marker"-Proteine betrachtet werden können. Drei solche "Marker"-Proteine für die Initiations-, Prozessierungs- und Terminationsphase werden im Folgenden näher beschrieben.

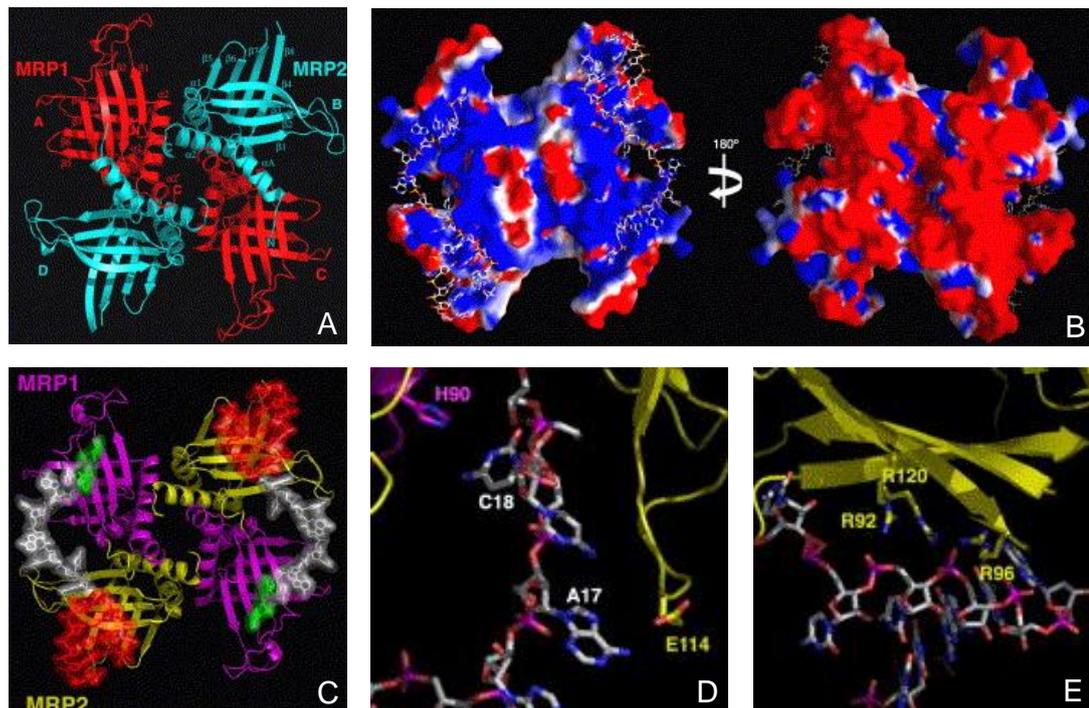
<b>editingassoziiertes Protein</b>	<b>nachgewiesene Funktion</b>	<b>bekannte Motive</b>
MP100	Exonuklease	Endo/Exo/Phosphatase
MP99	Exonuklease	Endo/Exo/Phosphatase
MP90	Endonuklease	RNaseIII
MP81	Interaktion	Zn <sup>2+</sup> -Finger
MP67	Endonuklease	RNaseIII
MP64	-	-
MP63	Interaktion	OB-Fold
MP61	Endonuklease	RNaseIII
MP57	TUTase	Nukleotidyltransferase
MP52	Ligase	Ligase
MP49	-	Zn <sup>2+</sup> -Finger
MP48	Ligase	Ligase
MP47	-	Zn <sup>2+</sup> -Finger
MP46	-	Zn <sup>2+</sup> -Finger
MP44	Interaktion	Zn <sup>2+</sup> -Finger
MP42	Endo/Exonuklease	OB-Fold, Zn <sup>2+</sup> -Finger
MP41	-	Zn <sup>2+</sup> -Finger
MP24	Interaktion	OB-Fold
MP19	-	OB-Fold
MP18	Interaktion	OB-Fold
gBP21	<i>RNA-Annealing</i>	RNA-Bindedomäne
gBP25	<i>RNA-Annealing</i>	RNA-Bindedomäne
mHel61	-	DExH/D-box
REAP-1	RNA-Bindung	RNA-Bindedomäne
TbRGG1	RNA-Bindung	RNA-Bindedomäne
RBP16	RNA-Bindung	RNA-Bindedomäne
RBP32	RNA-Bindung	RNA-Bindedomäne

**Tab. 1: Proteinkomponenten des Editosoms.** Mit dem RNA-Editing im Mitochondrium von Trypanosomen assoziierte Proteine, ihre bekannten Motive und nachgewiesenen Funktionen.

## 2.2.4 Das RNA-Bindeprotein gBP21 und seine Funktion in der Initiationsphase der RNA-Editing-Reaktion

Zu Beginn eines RNA-Editing-Zyklus' müssen die beteiligten RNAs hybridisieren. Da es sich um polyanionische Moleküle handelt, kommt es dabei zu einer elektrostatischen Abstoßungsreaktion. Das RNA-Bindeprotein gBP21 hat eine *Annealing*-Aktivität und stimuliert *in vitro* die Hybridisierung von mRNA und gRNA als *matchmaker* (Köller et al., 1997; Müller et al., 2001). gBP21 bindet gRNA in einer 1+1-Stöchiometrie mit einem  $K_d$  von 10 nM, wobei bis zu 6 Ionenbrücken den gBP21/gRNA-Komplex stabilisieren. Die gBP21-Bindung reduziert die negative Ladung der gRNA und ermöglicht somit die Interaktion mit der prä-mRNA. Nach erfolgtem *Annealing* dissoziiert gBP21 vom gRNA/mRNA-Komplex, da gBP21 eine ca. 100x höhere Affinität für einzelsträngige RNA als für doppelsträngige RNA aufweist (Müller und Göringer, 2002).

Durch eine Immunopräzipitation konnten assoziiert mit gBP21 editingaktive Editosomen isoliert werden (Allen et al., 1998), doch es wurde postuliert, dass die Hybridisierung der RNAs von einem kleineren *mitochondrial RNA binding protein* (MRP)-Komplex katalysiert wird.



**Abb. 3: Kristallstruktur des gBP21/gBP25 Heterotetramers.** (A) Schleifendiagramm des gBP21/gBP25-Komplexes. (B) Präsentation des elektrostatischen Oberflächenpotentials, blau: positiv geladene Aminosäuren; rot: negativ geladene Aminosäuren; weiss: neutrale Aminosäuren. (C) Schleifendiagramm des gBP21/gBP25-Komplexes gebunden an gRNA, grün: Ankersequenz; weiss: Informationssequenz; rot: Oligo-U-Schwanz. (D+E) Interaktion des gBP21/gBP25-Komplexes mit der gRNA. MRP1 = gBP21, MRP2 = gBP25 (aus Schumacher et al., 2006).

Aus *T. brucei* konnte ein heterotetramerer Komplex aus je zwei Kopien von gBP21 und gBP25, einem weiteren RNA-Bindeprotein, das durch Sequenzvergleich identifiziert wurde (Blom et al., 2001), kristallisiert werden. Die Analyse der Kristallstruktur des gBP21/gBP25-Komplexes bestätigte den *matchmaking*-Mechanismus (Abb. 3; Schumacher et al., 2006). Der gBP21/gBP25-Komplex hat eine pseudozyklische C4-Struktur. Beide Proteine weisen eine ähnliche Faltung auf, obwohl nur 18 % Sequenzidentität bestehen, sie bilden eine  $\beta$ - $\beta$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ -Sekundärstruktur (Abb. 3A). Die  $\beta$ -Faltblätter bilden eine basische Oberfläche, die  $\alpha$ -Helices bilden die Kontaktstellen der vier Untereinheiten (Abb. 3B). Der gBP21/gBP25-Komplex konnte gebunden an gRNA kristallisiert werden (Abb. 3C). gRNA bindet mit dem elektronegativen Phosphatrückgrat an die elektropositive  $\beta$ -Faltblatt-Oberfläche. Das Fehlen spezifischer Interaktionen wie Basen-*Stacking* erklärt die sequenzunabhängige Bindung der gRNA (Abb. 3D+E). Der gBP21/gBP25-Komplex stabilisiert die gRNA in ungefalteter Konformation und macht dadurch die Interaktion der Informationssequenz der gRNA mit der komplementären prä-mRNA möglich.

gBP21 ist nicht essentiell für die Editing-Reaktion, aber für das Überleben von prozyklischen Trypanosomen. gBP21-Nullmutanten waren nur als Blutstromform lebensfähig und konnten nicht in die prozyklische Form differenzieren. Die Blutstrom-Nullmutanten enthielten editierte mRNA, doch die Menge war signifikant reduziert (Lambert et al., 1999).

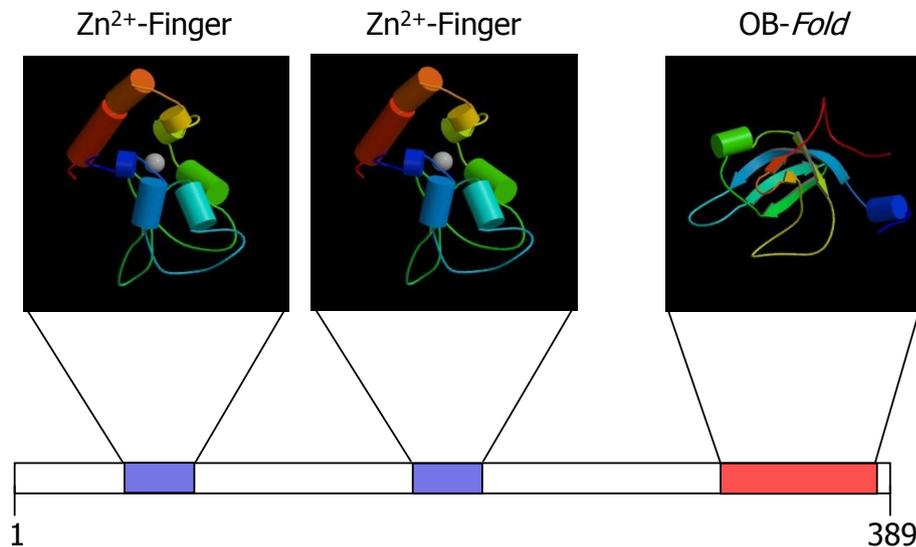
### **2.2.5 Die Endo-Exonuklease TbMP42 und ihre Funktion in der Prozessierungsphase der RNA-Editing-Reaktion**

TbMP42 wurde durch Koimmunopräzipitation mit der Insertions- bzw. Deletionsaktivität als Kernkomponente der Editosoms identifiziert (Panigrahi et al., 2001). Die essentielle Funktion von TbMP42 bei der RNA-Editing-Reaktion wurde durch RNAi-Experimente bestätigt. Der *knockdown* von TbMP42 führte zu einer Reduktion der Editing-Aktivität auf eine Restaktivität von 10% und war letal für prozyklische Trypanosomen. Durch Zugabe von rekombinantem TbMP42 konnte dieser Phänotyp aufgehoben werden (Brecht et al., 2005).

Rekombinantes TbMP42 degradiert einzelsträngige RNA durch eine distributive 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und zeigt zusätzlich eine Endonuklease-Aktivität, die präferenziell einzelsträngige U-reiche Sequenzen hydrolysiert. Die Substratbindung erfolgt an doppelsträngige RNA, der  $K_d$  wurde auf 10 nM bestimmt (Brecht et al., 2005).

TbMP42 weist keine klassischen Nuklease-Domänen auf, sondern zwei interne  $Zn^{2+}$ -Finger und einen OB-*Fold* am Carboxyterminus (Abb. 4). Aktivitätstests mit trunkierten Versionen des Proteins ergaben, dass der carboxyterminale Teil mit dem OB-*Fold* die nukleolytische Aktivität trägt, während die  $Zn^{2+}$ -Finger nicht in die Substraterkennung und Bindung involviert sind (Brecht et al., 2005). Die gezielte, chemische Modifikation von Aminosäureseitenketten ergab, dass Aspartat, Glutamat

und Histidin in die Katalyse der Hydrolyse-Reaktion involviert sind, außerdem wurde für die Hydrolyse eine  $Zn^{2+}$ -Abhängigkeit festgestellt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass TbMP42 durch *two-metal-catalysis* das Phosphatrückrad der RNA hydrolysiert (Niemann, persönliche Kommunikation).



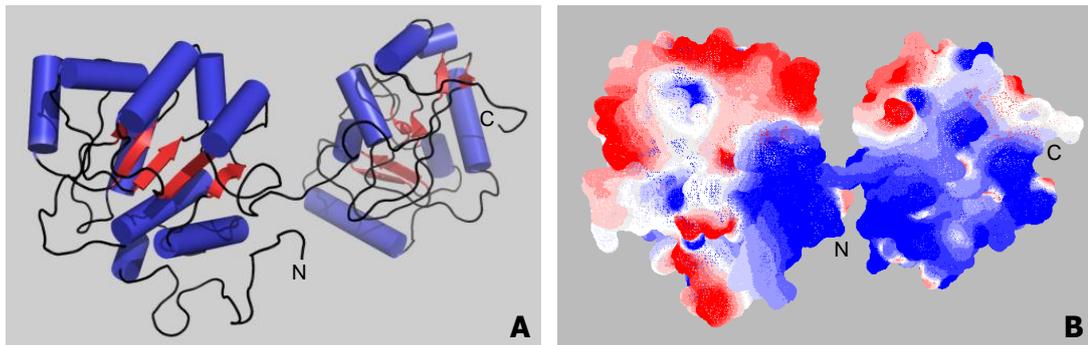
**Abb. 4: Schematische Darstellung der Domänen von TbMP42.** TbMP42 weist keine klassischen Nuklease-Domänen auf, sondern zwei interne  $Zn^{2+}$ -Finger und einen *OB-Fold* am Carboxyterminus. Der carboxyterminale Teil mit dem *OB-Fold* trägt die nukleolytische Aktivität, während die  $Zn^{2+}$ -Finger nicht in die Substraterkennung und Bindung involviert sind.

### 2.2.6 Das *DEAD-box* Protein mHel61p und seine Funktion in der Terminationsphase der RNA-Editing-Reaktion

Einige mitochondriale Transkripte werden über ihre gesamte Länge editiert. Dies erfordert die sequentielle Bindung mehrerer gRNAs, deren Bindestellen auf der prä-mRNA z.T. überlappen (Maslon und Simpson, 1992). Um einen gRNA/mRNA-Duplex aufzulösen und die Bindung einer weiteren gRNA zu ermöglichen, wird demnach eine Helikase-Aktivität benötigt. Im Mitochondrium von Trypanosomen wurde eine solche Aktivität nachgewiesen, die in der Lage ist ein RNA-Duplex mit einzelsträngigem Überhang zu entwinden, ein DNA-Duplex aber nicht auflösen kann. (Missel und Göringer, 1994).

Die Mehrheit der RNA-Helikasen gehört zur Superfamilie der DExH/*D-box* Proteine (Fuller-Pace, 1994). Diese enthalten neun hoch konservierte Aminosäuremotive und modulieren die RNA-Struktur ATP-abhängig (Linder, 2006). Bei der Suche nach Genen für DExH/*D-box* Proteine in *T. brucei* wurde mHel61p identifiziert. Diese putative Helikase hat eine mitochondriale Importsequenz und wurde experimentell im Mitochondrium von *T. brucei* nachgewiesen. mHel61p spielt eine wichtige Rolle in der Stabilisierung von editierter mRNA. mHel61p-Nullmutanten zeigten eine

Reduktion der Menge an editierter mRNA, während die Menge an nicht editierten mitochondrialen RNAs und nukleären Transkripten unverändert blieb. Dieser Phänotyp konnte durch die ektopische Expression von mHel61p in den Nullmutanten aufgehoben werden. mHel61p ist nicht essentiell für die RNA-Editing-Reaktion, die Editing-Aktivität von mHel61p-Nullmutanten war nicht beeinflusst. Dies deutet auf eine Funktion von mHel61p nach erfolgter Katalyse der Reaktion hin (Missel et al., 1997). mHel61p ist als akzessorisches Protein nur transient an das Editosom gebunden. Unter *steady state* Bedingungen liegt der Großteil von mHel61p als freies Protein im Mitochondrium vor, nur ein kleiner Teil wurde gebunden an einen 20 S Komplex nachgewiesen (Missel et al., 1997).



**Abb. 5: Mögliche 3D-Struktur von mHel61p.** (A) 3D Homologie-Modell von mHel61p basierend auf der Struktur von eIF4A aus *Saccharomyces cerevisiae* (PDB-File 1fuuB) und mjDEAD aus *Methanococcus jannaschii* (PDB file 1hv8B). (B) Präsentation des elektrostatischen Oberflächenpotentials von mHel61p (Guex und Peitsch, 1997), blau: positiv geladene Aminosäuren; rot: negativ geladene Aminosäuren; weiss: neutrale Aminosäuren (aus Göringer et al., 2008).

### 2.3 Zielsetzung

Beim RNA-Editing im Mitochondrium afrikanischer Trypanosomen werden durch die Insertion und Deletion von Us aus kryptischen Transkripten translationskompetente mRNAs generiert. Diese posttranskriptionalen Sequenzmodifikationen werden von Editosomen, RNP-Komplexen bestehend aus mRNA, gRNA und bis zu 20 Proteinen, katalysiert. Während die einzelnen editosomalen Komponenten gut untersucht sind, ist über den strukturellen Aufbau des Editosoms sowie über dessen Assemblierung und Dissoziation wenig bekannt.

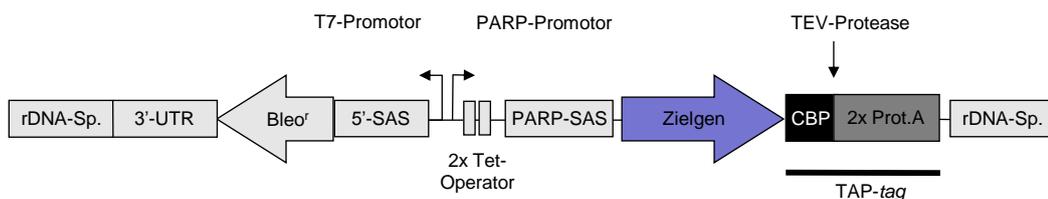
In dieser Arbeit sollten native Editosomen unter physiologischen Bedingungen durch Affinitätsreinigung isoliert werden. Um Editosomen in unterschiedlichen funktionalen Stadien der Reaktion zu isolieren, sollten Affinitätsreinigungen mit drei bereits gut untersuchten editosomalen Proteinen gBP21, TbMP42 und mHel61p, die in der Initiations-, Prozessierungs- und Terminationsphase der Reaktion aktiv sind, durchgeführt werden. Die Zusammensetzung der nativen Editosomen sollte auf Protein- und RNA-Ebene untersucht werden und die Struktur der Komplexe sollte durch elektronenmikroskopische Studien analysiert werden.

### 3 Ergebnisse

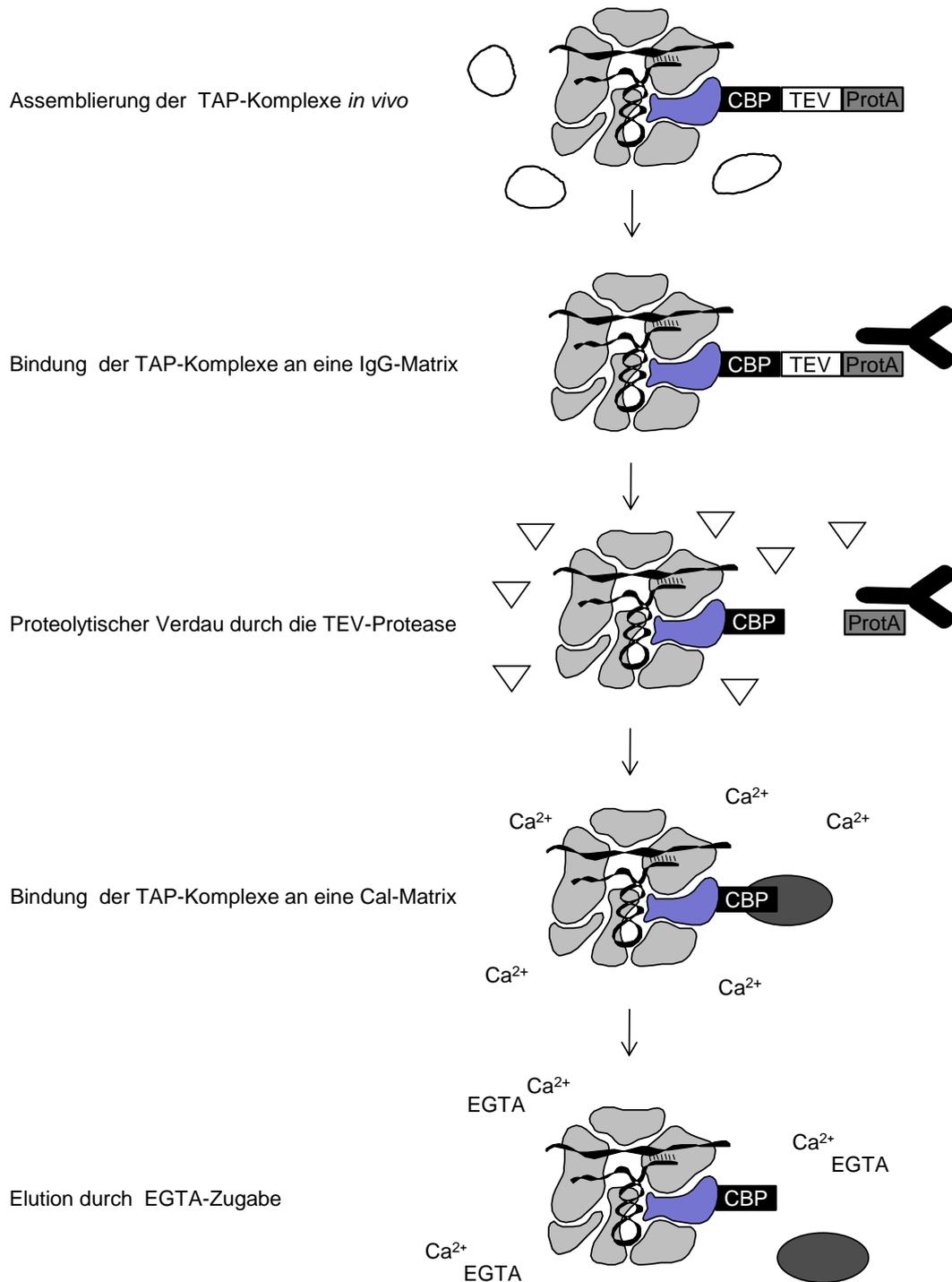
#### 3.1 Isolierung und biochemische Charakterisierung von Editosomen in unterschiedlichen funktionalen Stadien der RNA-Editing-Reaktion

Zur Reinigung von nativen Editosomen wurde die *tandem affinity purification* (TAP) verwendet (Rigaut et al., 1999). Die TAP ermöglicht durch die Fusion des TAP-tags mit einem Zielprotein die Isolation assoziierter Komponenten über zwei Affinitätsreinigungsschritte. Diese Methode bietet folgende Vorteile: (1) Das mit dem TAP-tag fusionierte editosomale Protein wird in den Trypanosomenzellen unter natürlichen Bedingungen exprimiert und die Editosomen assemblieren *in vivo*. (2) Die Reinigung erfolgt unter nahezu physiologischen Bedingungen. Auf den Einsatz von Hochsalz oder starken Detergenzien wird verzichtet.

Zur Expression des TAP-Fusionsproteins in Trypanosomenzellen wurde der TAP-tag an den Carboxyterminus des Zielgens fusioniert (Abb. 6). Hierzu wurden die kodierenden Sequenzen von gBP21, TbMP42 und mHel61p in den induzierbaren Expressionsvektor pLew100-TAP kloniert (Wirtz et al., 1999). Der Vektor enthält eine Genkassette, die die Expression des TAP-Fusionsproteins durch den *procyclic acidic repetitive protein* (PARP)-Promotor unter Kontrolle von zwei vorgeschalteten Tetrazyklin (Tet)-Operatoren ermöglicht. Die Expressionskassette wurde über homologe Rekombination in die rDNA-spacer des Genoms integriert. Durch serielle Verdünnung wurden Bleomycin (Bleo)-resistente Klone selektioniert.



**Abb. 6: Expressionskassette von pLew100-TAP.** Die Expression eines TAP-Fusionsproteins erfolgt durch den PARP-Promotor und wird durch ein "Tet on/off"-System kontrolliert. Die Resistenz gegenüber Bleo dient als Selektionsmarker, die Expression der Bleo-Phosphotransferase erfolgt durch einen T7-Promotor. *T. brucei* 29-13-Zellen, die den Tet-Repressor und die T7-Polymerase konstitutiv exprimieren, wurden mit linearisierter pLew100-TAP-DNA transfiziert. Über homologe Rekombination in die rDNA-spacer (rDNA Sp.) erfolgte die Integration ins Genom. UTR = *untranslated region*; SAS = *splice acceptor site*

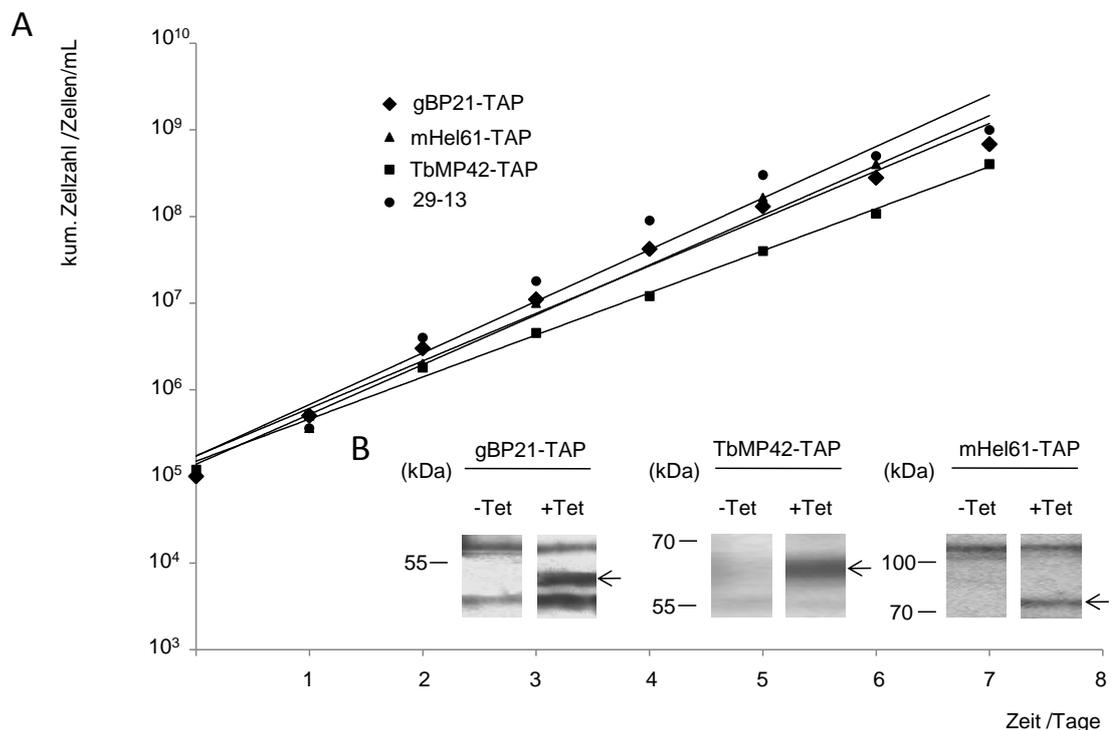


**Abb. 7: Schematische Darstellung der TAP-Methode.** Komplexe, die ein TAP-Fusionsprotein enthalten, werden im ersten Affinitätsreinigungsschritt an eine IgG-Matrix durch Interaktion der ProteinA-Bindestellen mit IgG gebunden. Kontaminationen werden durch Waschen entfernt. Durch einen proteolytischen Verdau mit der TEV-Protease werden die gebundenen Komplexe von der IgG-Matrix eluiert. Durch die Interaktion des CBP mit Cal werden die Komplexe im zweiten Affinitätsreinigungsschritt an eine Cal-Matrix gebunden. Residual vorhandene Verunreinigungen sowie die TEV-Protease werden durch Waschen entfernt. Die Elution erfolgt durch Zugabe von EGTA.

Der 21 kDa große TAP-tag besteht aus drei Komponenten: (1) Zwei Kopien der ProteinA-Sequenz aus *Staphylococcus aureus*, (2) einer Erkennungssequenz für eine Protease des *tobacco etch virus* (TEV) und (3) einem Calmodulin (Cal)-bindenden Protein (CBP). Die Fusion des TAP-tags an ein Zielprotein ermöglicht die Isolation assoziierter Komponenten über zwei Affinitätsreinigungsschritte (Abb. 7). Im ersten Schritt erfolgt die Bindung von Komplexen, die ein TAP-Fusionsprotein enthalten, an eine IgG-Matrix über die ProteinA-Bindestellen. Die Komplexe werden durch den proteolytischen Verdau mit der TEV-Protease unter nativen Bedingungen von der IgG-Matrix eluiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Bindung des CBP an eine Cal-Matrix. In diesem Schritt werden die TEV-Protease und noch vorhandene Kontaminationen entfernt. Die CBP/Calmodulin-Bindung ist  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, die Komplexe werden durch Komplexierung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch EGTA nativ von der Cal-Matrix eluiert.

### 3.1.1 Charakterisierung der transgenen TAP-Zelllinien

Die ektopische Expression der Fusionsproteine gBP21-TAP, TbMP42-TAP und mHel61p-TAP hatte keinen Einfluss auf das Wachstum und die Morphologie der Zellen.



**Abb. 8: Charakterisierung der transgenen TAP-Zelllinien.** (A) Wachstumsverhalten der TAP-Zelllinien in Gegenwart von Tet über einen Zeitraum von sieben Tagen. Die TAP-Zelllinien weisen wie der Wildtyp eine Verdopplungszeit von 12 h auf. (B) Nachweis der TAP-Fusionsproteine in Gesamtzellextrakten von 10<sup>6</sup> Zellen 72 h nach Tet-Zugabe (+Tet). Als Vergleich dienten nicht induzierte Zellen (-Tet).

Wachstumsstudien von Tet-induzierten TAP-Zelllinien zeigten keine Unterschiede im Vergleich zu parentalen *T. brucei* 29-13-Zellen (Abb. 8A). Die transgenen Zellen wiesen wie die Wildtyp-Zellen eine Verdopplungszeit von 12 h auf. Lichtmikroskopische Untersuchungen der transgenen Zellen zeigten keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Zum Nachweis der Expression der TAP-Fusionsproteine wurden Western Blot-Analysen mit Gesamtzellextrakten von induzierten und nicht induzierten transgenen Zellen durchgeführt. Hierzu wurde ein mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Antikörper verwendet, der an den ProteinA-Teil des TAP-*tags* bindet. Die TAP-Varianten von gBP21 (42 kDa), TbMP42 (63 kDa) und mHel61p (82 kDa) konnten bereits 24 h nach Tet-Induktion in den Gesamtzellextrakten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das höchste Expressionsniveau wurde in allen TAP-Zelllinien 72 h nach der Induktion festgestellt (Abb. 8B). Durch Western Blot-Analysen mit mitochondrialen Lysaten (ML) konnte weiterhin gezeigt werden, dass die TAP-Varianten wie die Wildtyp-Proteine ins Mitochondrium importiert wurden (Daten nicht gezeigt).

### **3.1.2 Charakterisierung von Editosomen in der Initiationsphase der RNA-Editing-Reaktion**

#### **3.1.2.1 Isolierung von frühen Editosomen durch gBP21-TAP**

Das RNA-bindende Protein gBP21 ist als *matchmaker* an der Hybridisierung von gRNA und prä-mRNA beteiligt und damit zu einem frühen Zeitpunkt eines RNA-Editing-Zyklus aktiv. Durch die TAP von gBP21 assoziierten Komplexen sollten frühe Editosomen, die sich in der Initiationsphase der RNA-Editing-Reaktion befinden, isoliert werden.

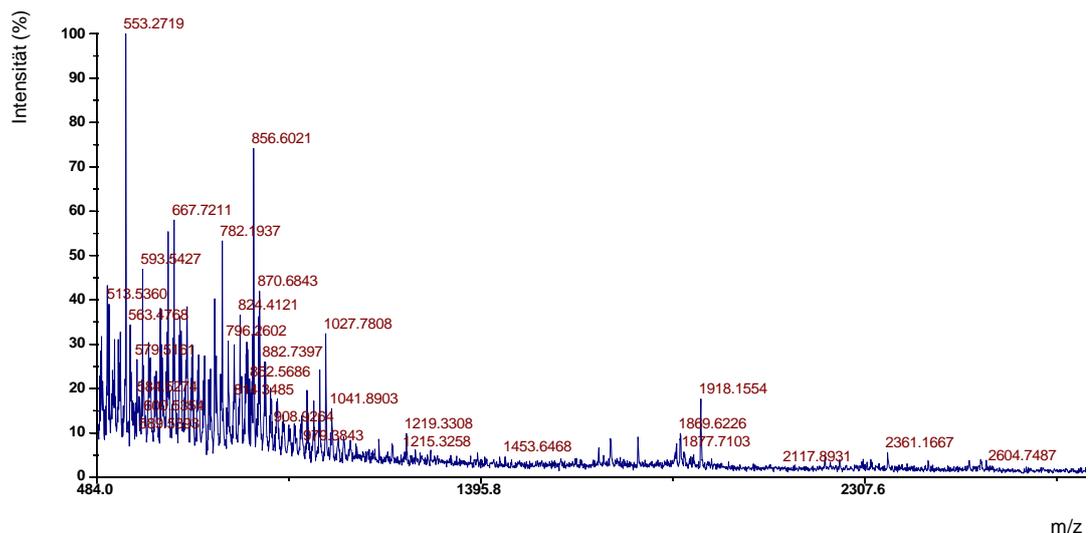
Frühe Editosomen konnten nicht durch eine TAP mit konsekutiver IgG- und Cal-Affinitätsreinigung isoliert werden, da eine Bindung der TAP-Komplexe an die Cal-Matrix nach erfolgtem Verdau mit der TEV Protease nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden bei der gBP21-TAP die Affinitätsreinigungsschritte in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Die zur Elution von der IgG-Matrix verwendete TEV-Protease verblieb im IgG-Eluat.

Als Ausgangsmaterial für die TAP dienten  $1-2 \cdot 10^{11}$  *T. brucei* 29-13/gBP21/TAP-Zellen, die 72-84 h in Gegenwart von Tet kultiviert, und in der spätlogarithmischen Wachstumsphase bei einer Zelldichte von  $1-2 \cdot 10^7$  Zellen/ml geerntet wurden. Aus diesen Zellen konnten  $\sim 20$  mg ML gewonnen werden, aus dem durch zwei Affinitätsreinigungsschritte über eine Cal-gekoppelte und eine IgG-gekoppelte Matrix frühe Editosomen isoliert werden konnten. Die Proteinausbeute einer typischen gBP21-TAP lag mit  $\sim 200$   $\mu$ g nach dem ersten Schritt und  $\sim 20$   $\mu$ g nach dem zweiten Schritt bei durchschnittlich  $\sim 0,1$  % des Ausgangsmaterials. Der typische Verlauf einer gBP21 TAP ist in Abb. 10A gezeigt. Die elektrophoretische Analyse von ML, Cal-Eluat und IgG-Eluat zeigte eine Abnahme der Komplexität des Bandenmusters.

Während im ML  $\geq 30$  Banden identifiziert werden konnten, sind im IgG-Eluat nur noch sieben Banden im Größenbereich von 20-90 kDa detektierbar (Abb. 10A).

### 3.1.2.2 Analyse der Proteinkomposition von frühen Editosomen

Die in den TAP-Eluaten enthaltenen Proteine wurden durch massenspektrometrische Methoden und radioaktive Markierung identifiziert. Es wurden *matrix assisted laser desorption/ionisation*-Verfahren gekoppelt an einen Flugzeitmesser (MALDI-ToF, ToF=*time of flight*) durchgeführt. Dazu wurde das IgG-Eluat durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) separiert und alle nach Silberfärbung sichtbaren Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Die Proteine wurden mit Trypsin proteolytisch verdaut, und die Masse/Ladungsverhältnisse ( $m/z$ ) der entstandenen Peptide wurden im Massenspektrometer bestimmt. In Abb. 9 ist exemplarisch ein Spektrum der monoisotopischen  $m/z$  einer Probe gezeigt. Die erhaltenen Werte wurden mit Datenbanken theoretischer Verdauung trypanosomaler Proteine unter der Verwendung der Suchmaschine "MS-FIT" (Clauser et al., 1999) verglichen. Durch MALDI-ToF konnten den sieben Proteinbanden des IgG-Eluats zehn bereits charakterisierte Proteinkomponenten des Editosoms zugewiesen werden (Abb. 10A). Neben der TAP-Variante von gBP21 wurde ein weiteres RNA-Bindeprotein RBP38 identifiziert (Sbicego et al., 2003). Mit den Ligasen TbMP48 und TbMP52 (McManus et al., 2001; Rusché et al., 2001; Gao und Simpson, 2003), den Endonukleasen TbMP61 und TbMP90 (Carnes et al., 2005; Trotter et al., 2005), und der TUTase TbMP57 (Ernst et al., 2003) wurden für die Katalyse der RNA-Editing-Reaktion wichtige Enzymaktivitäten nachgewiesen.



**Abb. 9: Typisches Spektrum einer MALDI-TOF-Analyse.** Die relativen Signalintensitäten sind gegen das  $m/z$  aufgetragen.

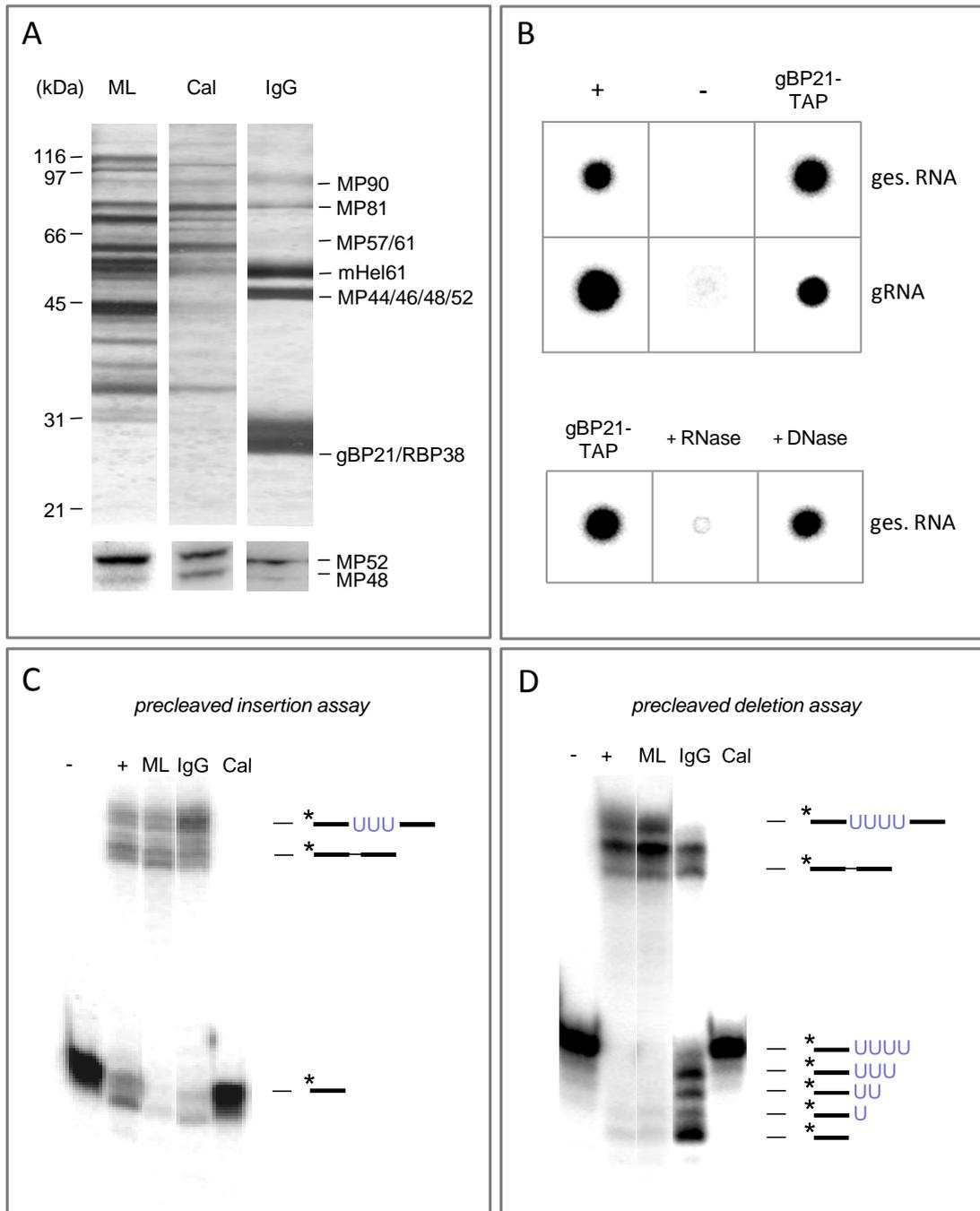
Außerdem wurde die putative Helikase mHel61p (Missel et al., 1997) und die Proteine TbMP44, TbMP46 (Barbbarwal et al., 2007), TbMP63 und TbMP81 mit noch ungeklärter Funktion identifiziert. Das Molekulargewicht der zugewiesenen Proteine stimmte häufig nicht mit den aus dem Gel geschätzten Größen der Proteinbanden überein. Es scheint zu Proteindegradationen während der TAP gekommen zu sein. Durch radioaktive Markierung konnte die Anwesenheit der beiden am RNA-Editing beteiligten Ligasen TbMP48 und TbMP52 bestätigt werden. Da Ligasen durch die kovalente Bindung von AMP aktiviert werden, können sie durch die Inkubation mit  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP radioaktiv markiert und somit detektiert werden. Abb. 10A zeigt einen solchen Autoadenylierungs-Assay. Neben den beiden bekannten editingassoziierten Ligasen waren keine weiteren adenylierbaren Ligasen in den Eluaten enthalten (Abb. 10A).

### 3.1.2.3 Analyse des Nukleinsäure-Gehalts von frühen Editosomen

Zur Gewinnung von mit frühen Editosomen assoziierten Nukleinsäuren (NS) wurde das IgG-Eluat von  $1\text{-}2\cdot 10^{11}$  Zellen phenolisiert und die eventuell vorhandenen NS präzipitiert. Das Vorhandensein von NS wurde durch die Dephosphorylierung und die anschließende radioaktive Markierung der 5'-Enden überprüft. Hierzu wurde die Probe in Anwesenheit von  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP mit T4-Polynukleotidkinase (PNK) inkubiert. PNK katalysiert die Übertragung der  $\gamma$ -Phosphatgruppe von ATP auf die terminale 5'-Hydroxylgruppe von NS. Mit diesen Methoden konnte das Vorhandensein von endogenen NS im gBP21-TAP-Eluat gezeigt werden (Abb. 10B). Die Hydrolyse der markierten NS mit RNasen spezifisch für einzel- und doppelsträngige RNA sowie mit DNase zeigte, dass es sich bei den mit frühen Editosomen assoziierten NS ausschließlich um RNA handelt. Das Vorhandensein von gRNA wurde durch die Inkubation mit dem Enzym Guanylyltransferase (GT) in Anwesenheit von  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-GTP überprüft. Mit dieser Methode können selektiv Primärtranskripte wie gRNAs markiert werden. GT transferiert GMP von GTP auf Di- oder Triphosphat-Enden und führt zur Bildung einer 5'-*Cap*-Struktur. Durch die GT-Markierung konnte das Vorhandensein von endogener gRNA im gBP21-TAP-Eluat gezeigt werden (Abb. 10B).

### 3.1.2.4 *In vitro* Editing-Assays von frühen Editosomen

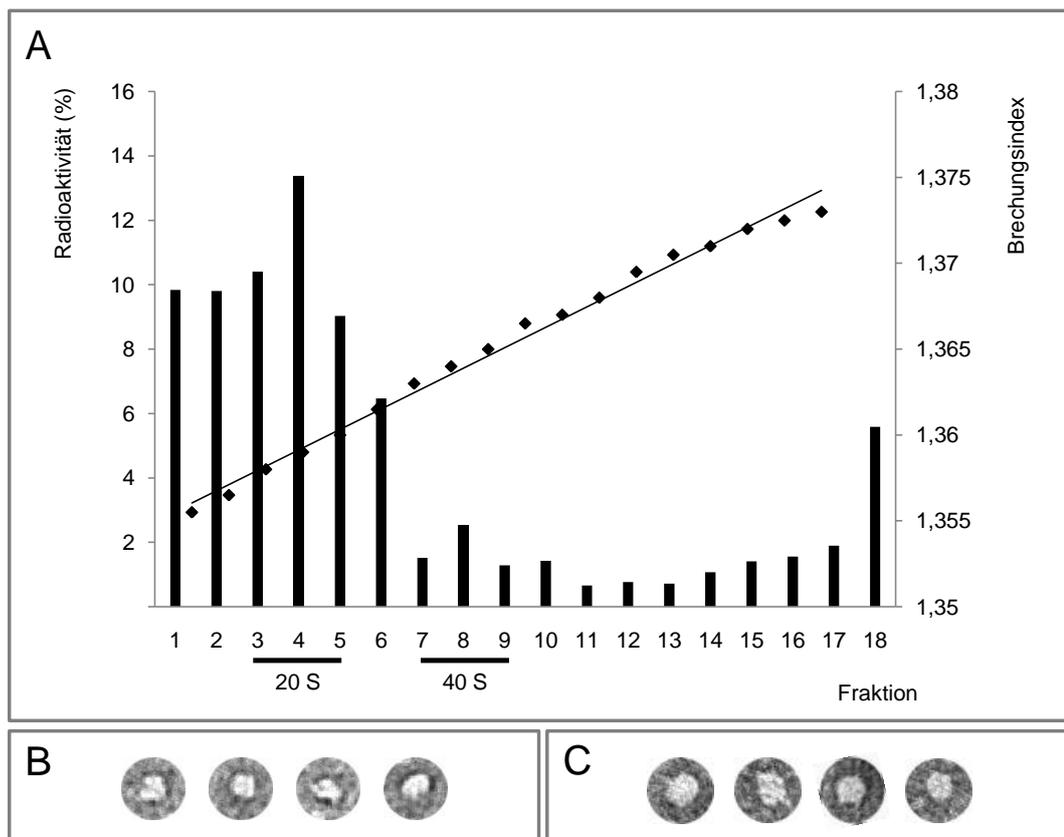
Zum Nachweis der RNA-Editing-Aktivität wurden der *precleaved insertion assay* (PIA) und der *precleaved deletion assay* (PDA) durchgeführt (Igo et al., 2000). Im Falle des PIA wurde auf die gRNA vermittelte Insertion von 3 Us in eine synthetischen prä-mRNA getestet. Im Falle des PDA wurde Aktivität durch die gRNA vermittelte Deletion von 4 Us aus einer synthetischen prä-mRNA nachgewiesen. Für das Cal-Eluat der gBP21-TAP konnte *in vitro* sowohl eine Insertions- als auch eine Deletionsaktivität gezeigt werden. Im IgG-Eluat konnte unter den verwendeten Bedingungen keine Aktivität festgestellt werden (Abb. 10C+D).



**Abb. 10: Biochemische Charakterisierung von frühen Editosomen.** (A) Native, frühe Editosomen wurden durch die gBP21-TAP isoliert. Die Proteinzusammensetzung des IgG-Eluats wurde durch eine SDS-PAGE und MALDI-ToF-Analysen untersucht (oben). Die Anwesenheit der RNA-Editing-Ligasen wurde durch die Autoadenylierung verifiziert (unten). Durch die gBP21-TAP wurden zehn mit dem RNA-Editing assoziierte Proteine isoliert. (B) Radioaktive Markierungsmethoden zeigen das Vorhandensein von endogener mRNA und endogener gRNA im TAP-Eluat. (C+D) *in vitro* Editing-Aktivität konnte im PIA und im PDA für das Cal-, nicht aber für das IgG-Eluat der gBP21-TAP nachgewiesen werden. + = Positivkontrolle, - = Negativkontrolle

### 3.1.2.5 Bestimmung des apparenten Sedimentations-Koeffizienten

Zur Bestimmung des apparenten Svedberg (S)-Koeffizienten von frühen Editosomen wurde das Cal-Eluat der gBP21-TAP durch isokinetische Ultrazentrifugation in einem linearen 10-35 % (v/v) Glyzeringradient (GG) fraktioniert. Zur Detektion kleinster Proteinmengen wurden die Editosomen radioaktiv markiert. Hierzu wurden Tyrosin-Reste mit  $^{125}\text{I}$ odiodiert. Durch eine Szintillations-Messung wurden zwei Subpopulationen von frühen Editosomen im GG detektiert. Die Glyzerinkonzentration der Fraktionen wurde durch die Messung der Brechungsindizes bestimmt, eine Standardisierung des GG wurde durch die Fraktionierung von Molekülen bekannter S-Werte vorgenommen. Frühe Editosomen sedimentierten als 20 S und 40 S Partikel im GG. Die Menge an 20 S Editosomen war um den Faktor 5-10 höher als die Menge an 40 S Editosomen. In den ersten Fraktionen waren zerfallene Komplexe, in der letzten Fraktion Aggregate zu beobachten (Abb. 11A). Durch Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) wurden die 20 S (Abb. 11B) bzw. 40 S (Abb. 11C) Editosomen visualisiert. Die TEM der 20 S Editosomen zeigte eine monodisperse Populationen von globulären Partikeln mit einer Dimension von  $\sim 20 \times 15 \text{ nm}$ . 40 S Editosomen sind globuläre Partikel mit einer Dimension von  $\sim 20 \times 20 \text{ nm}$ .



**Abb. 11: Bestimmung des apparenten S-Koeffizienten von frühen Editosomen.** (A) Fraktionierung von radioaktiv markierten frühen Editosomen in einem 10-35 % (v/v) GG. Frühe Editosomen sedimentieren in zwei Subpopulationen als 20 S und 40 S Partikel. (B) TEM von frühen 20 S Editosomen. (C) TEM von frühen 40 S Editosomen.

### **3.1.3 Charakterisierung von Editosomen in der Prozessierungsphase der Editing-Reaktion**

#### **3.1.3.1 Isolierung von funktionalen Editosomen durch TAP**

TbMP42 besitzt Endo/Exonuklease-Aktivität. Nukleasen katalysieren wichtige Reaktionsschritte während des RNA-Editing-Zyklus'. Sie hydrolysieren die mRNA an einer durch gRNAs spezifizierten Position, außerdem katalysieren sie die Hydrolyse der überschüssigen Us während des Deletions-Editings. Durch die TbMP42-TAP sollten Editosomen, die sich in der Prozessierungsphase der RNA-Editing-Reaktion befinden, isoliert werden.

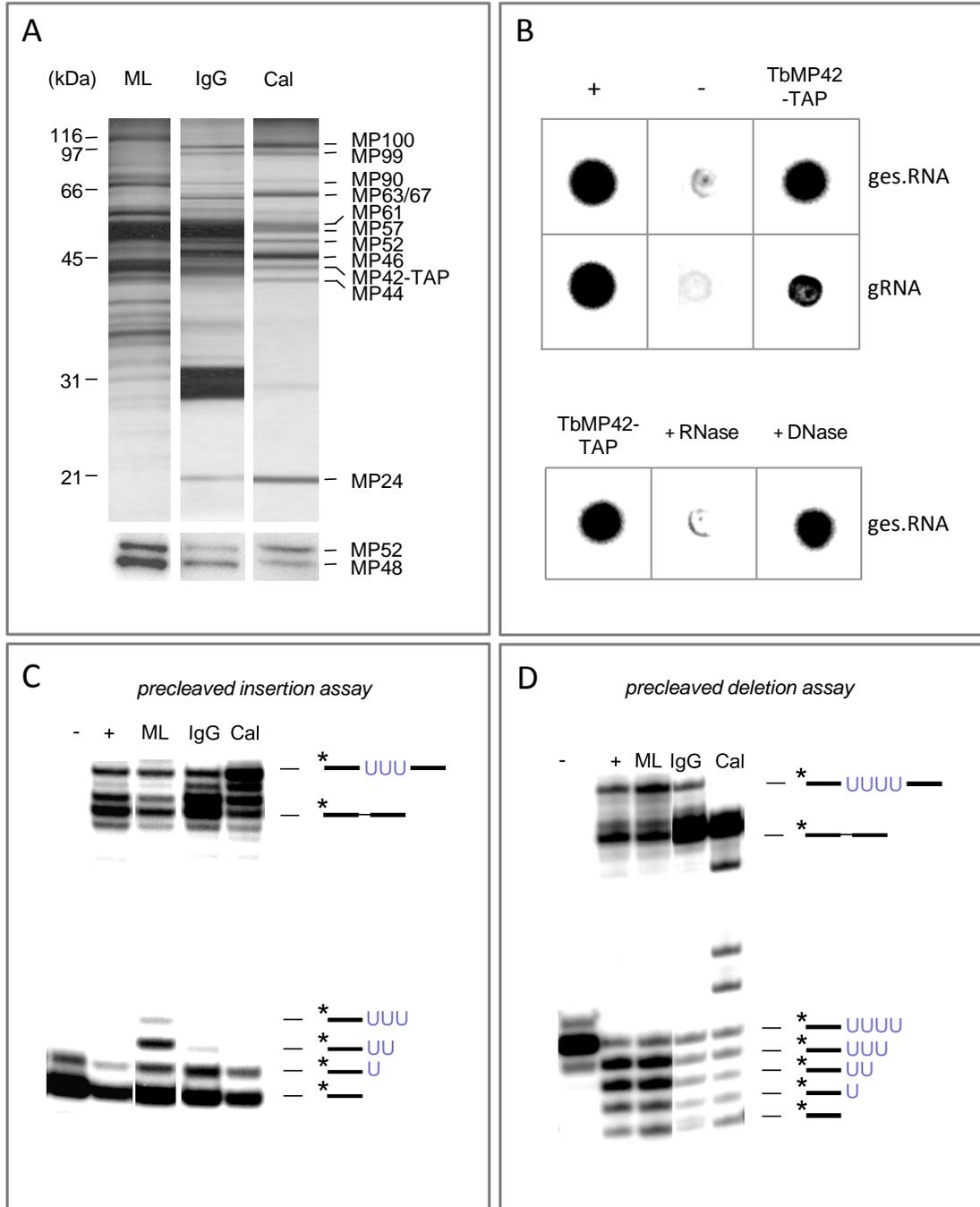
Die TbMP42-TAP wurde mit  $\sim 20$  mg ML aus  $1\text{-}2 \cdot 10^{11}$  spätlogarithmischen *T. brucei* 29-13/TbMP42/TAP-Zellen 72-84 h nach Tet-Induktion durchgeführt. Nach der Bindung an die IgG-Matrix lag die Proteinausbeute durchschnittlich bei  $\sim 200$   $\mu\text{g}/\sim 1$  % des Ausgangsmaterials, nach der Bindung an die Cal-Matrix bei  $\sim 20$   $\mu\text{g}/\sim 0,1$  % des Ausgangsmaterials. Die elektrophoretische Analyse zeigte eine Abnahme der Komplexität des Bandenmusters von  $\geq 30$  Banden im ML zu 14 Banden im Größenbereich von 24-100 kDa im Cal-Eluat (Abb. 12A).

#### **3.1.3.2 Analyse der Proteinkomposition von funktionalen Editosomen**

Durch MALDI-ToF-Analysen konnten den 14 Banden des Cal-Eluats zwölf editosomale Proteine zugeordnet werden. Neben der TAP-Variante von TbMP42 wurden die weiteren Nukleasen TbMP61, TbMP90, TbMP67, TbMP99 und TbMP100 (Carnes et al., 2005; Trotter et al., 2005; Kang et al., 2005; Carnes et al., 2007; Rogers et al., 2007) identifiziert. Außerdem wurde die Ligase TbMP52 (McManus et al., 2001; Rusché et al., 2001; Gao und Simpson, 2003), die TUTase TbMP57 (Ernst et al., 2003), und die Proteine TbMP46 (Barbbarwal et al., 2007) TbMP24 (Salavati et al., 2006), TbMP44 und TbMP63 mit noch unbekannter Funktion identifiziert. Bei den zwei anderen Banden handelte es sich um eine Kontamination mit  $\beta$ -Tubulin und um im Cal-Eluat verbliebene TEV-Protease. Durch Autoadenylierung konnte neben TbMP52 auch die durch MALDI-ToF nicht identifizierte RNA-Editing-Ligase TbMP48 nachgewiesen werden (Abb. 12A).

#### **3.1.3.3 Analyse des NS-Gehalts von funktionalen Editosomen**

Aus Editosomen von  $1\text{-}2 \cdot 10^{11}$  *T. brucei* 29-13/TbMP42/TAP-Zellen wurden NS isoliert. Das Vorhandensein von NS wurde durch die Dephosphorylierung und die radioaktive Markierung mit PNK nachgewiesen. Durch den Verdau mit RNasen sowie mit DNase wurde gezeigt, dass es sich bei den isolierten NS ausschließlich um RNA handelte. Das Vorhandensein von gRNA wurde durch die Markierung mit GT gezeigt (Abb. 12B).



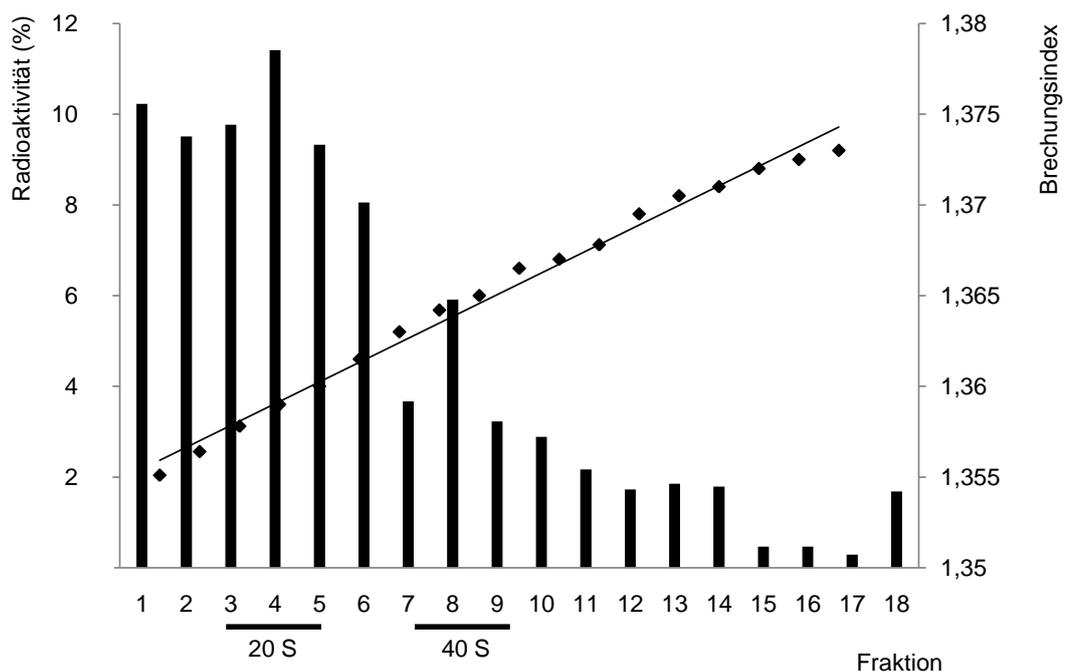
**Abb. 12: Biochemische Charakterisierung von funktionalen Editosomen.** (A) Native, funktionale Editosomen wurden durch die TbMP42-TAP isoliert. Die Proteinzusammensetzung des Cal-Eluats wurde durch SDS-PAGE und anschliessende MALDI-ToF-Analysen untersucht (oben). Die Anwesenheit der RNA-Editing-Ligasen wurde durch Autoadenylierung gezeigt (unten). Zwölf mit dem RNA-Editing assoziierte Proteine wurden identifiziert. (B) Radioaktive Markierungsmethoden zeigen das Vorhandensein von endogener mRNA und endogener gRNA. (C+D) *in vitro* Editingaktivität konnte im PIA und im PDA für das IgG- und das Cal-Eluat der TbMP42-TAP nachgewiesen werden. + = Positivkontrolle, - = Negativkontrolle

### 3.1.3.4 *In vitro* Editing-Assays mit funktionalen Editosomen

Durch die *in vitro* Assays wurde nachgewiesen, dass durch die TbMP42-TAP editingaktive Editosomen isoliert werden konnten. Sowohl für das IgG-Eluat als auch für das Cal-Eluat konnte eine *in vitro* Insertions- sowie eine *in vitro* Deletionsaktivität gezeigt werden (Abb. 12C+D). Die spezifische Editingaktivität, definiert als die Menge an editierter prä-mRNA pro eingesetzte Proteinmenge, stieg vom ML zum Cal-Eluat durchschnittlich um den Faktor  $10^4$  an.

### 3.1.3.5 Bestimmung des apparenten S-Koeffizienten

Zur Bestimmung des apparenten S-Werts von funktionalen Editosomen wurde das Cal-Eluat der TbMP42-TAP radioaktiv markiert und in einem linearen 10-35 % (v/v) GG fraktioniert. Funktionale Editosomen liegen in zwei Subpopulationen von 20 S und 40 S vor. Die Menge an 20 S Editosomen ist um den Faktor 2-5 höher als die Menge an 40 S Editosomen (Abb.13).



**Abb. 13: Bestimmung des apparenten S-Werts von funktionalen Editosomen.** Fraktionierung von radioaktiv markierten funktionalen Editosomen in einem 10-35 % (v/v) GG. Funktionale Editosomen sedimentieren in zwei Subpopulationen als 20 S und 40 S Partikel.

### **3.1.4 Charakterisierung von Editosomen in der Terminationsphase der RNA-Editing-Reaktion**

#### **3.1.4.1 Isolierung von späten Editosomen durch mHel61p-TAP**

Die putative Helikase mHel61p gehört zur Superfamilie der DExHD-Proteine. Es wird postuliert, dass mHel61p für die Auflösung des mRNA-gRNA-Duplex verantwortlich ist und somit am Ende eines Editing-Zyklus benötigt wird. Durch die TAP von mHel61p assoziierten Komponenten sollten späte Editosomen, die sich in der Terminationsphase der RNA-Editing-Reaktion befinden, isoliert werden.

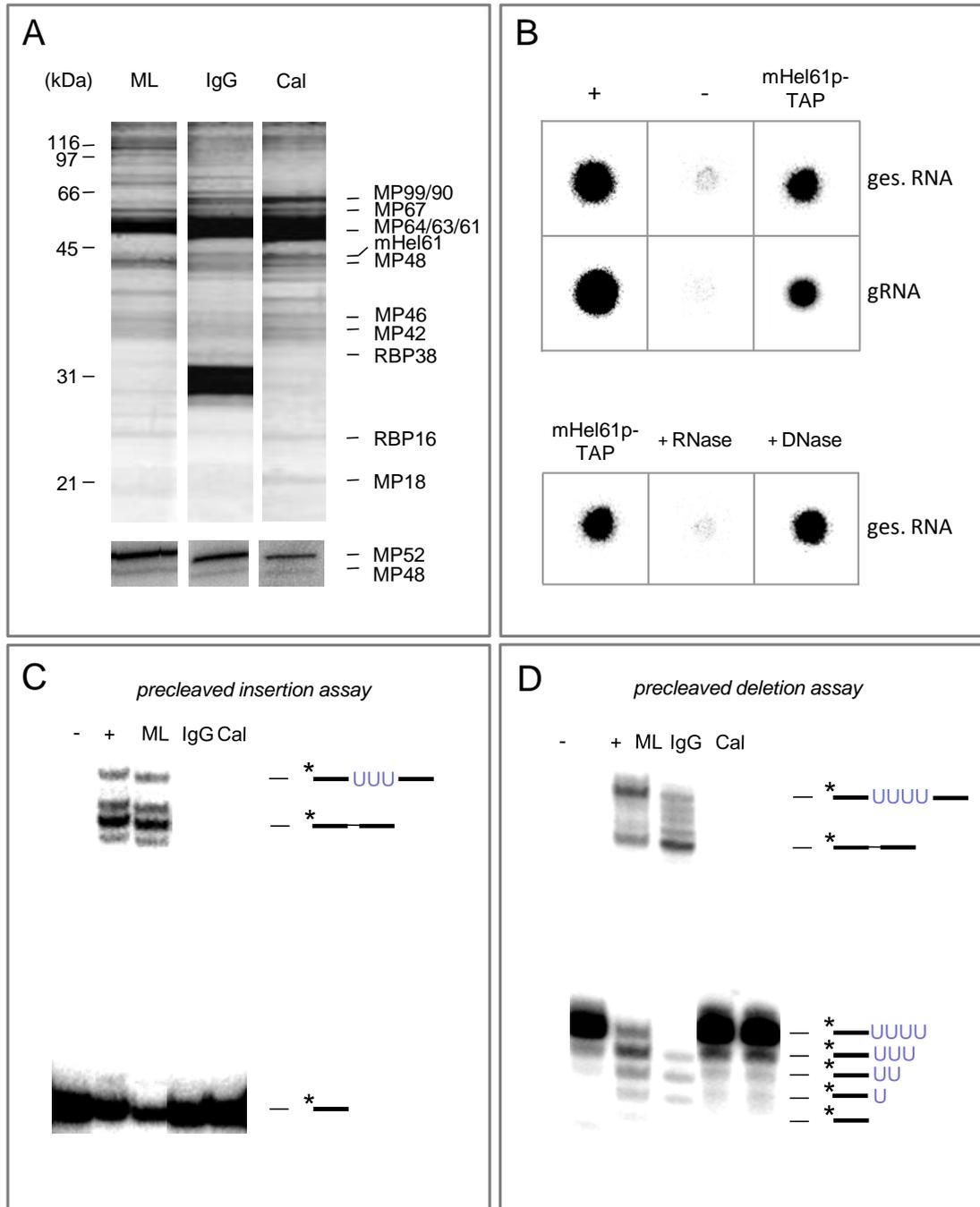
Die mHel61p-TAP wurde mit ~20 mg ML aus 1-2·10<sup>11</sup> spätlogarithmischen *T. brucei* 29-13/mHel61p/TAP-Zellen 72-84 h nach Tet-Induktion durchgeführt. Nach der Bindung an die IgG-Matrix lag die Proteinausbeute durchschnittlich bei ~200 µg/~1 %, nach Bindung an die Cal-Matrix bei ~10 µg/~0.05% des Ausgangsmaterials. Die Komplexität des Bandenmusters nahm von ≥30 Banden im ML zu 20 Banden im Größenbereich von 18-100 kDa im Cal-Eluat ab (Abb. 14A).

#### **3.1.4.2 Analyse der Proteinkomposition von späten Editosomen**

Den 20 Banden des Cal-Eluats konnten durch MALDI-ToF-Analysen 13 bekannte editosomale Komponenten zugeordnet werden. Es wurde die TAP-Variante von mHel61p sowie die weiteren RNA-Bindeproteine TbMP18 (Tarun et al., 2007), RBP16 (Hayman und Read; 1999; Pelletier et al., 2000; Miller und Read, 2003; Pelletier und Read, 2003), RBP38 (Sbicego et al., 2003) und REAP1 (Madison-Antenucci et al., 1999; Madison-Antenucci und Hajduk, 2001; Hans et al., 2007) gefunden. Für die Katalyse der RNA-Editing-Reaktion wichtige Enzyme wie die Ligase TbMP48 (Mc Manus et al., 2001; Rusché et al., 2001; Gao und Simpson, 2003) und die Nukleasen TbMP42, TbMP61, TbMP90, TbMP67 and TbMP99 (Brecht et al., 2005; Carnes et al., 2005; Trotter et al., 2005; Carnes et al., 2007; Kang et al., 2005; Rogers et al., 2007) wurden identifiziert. Außerdem wurden TbMP46 (Barbbarwal et al., 2007), TbMP46, TbMP63 und TbMP64 nachgewiesen. Durch Autoadenylierung konnte neben TbMP48 auch das Vorhandensein der durch MALDI-ToF nicht identifizierten Ligase TbMP52 gezeigt werden (Abb.14A).

#### **3.1.4.3 Analyse des NS-Gehalts von späten Editosomen**

Aus Editosomen von 1-2·10<sup>11</sup> *T. brucei* 29-13/mHel61p/TAP-Zellen wurden NS isoliert. Durch die Dephosphorylierung und die radioaktive Markierung mit PNK wurde das Vorhandensein von NS nachgewiesen. Der Verdau mit RNasen bzw. DNase zeigte, dass es sich bei den isolierten NS ausschließlich um RNA handelte. Durch die Markierung mit GT konnte das Vorhandensein von gRNA gezeigt werden (Abb. 14B+C).



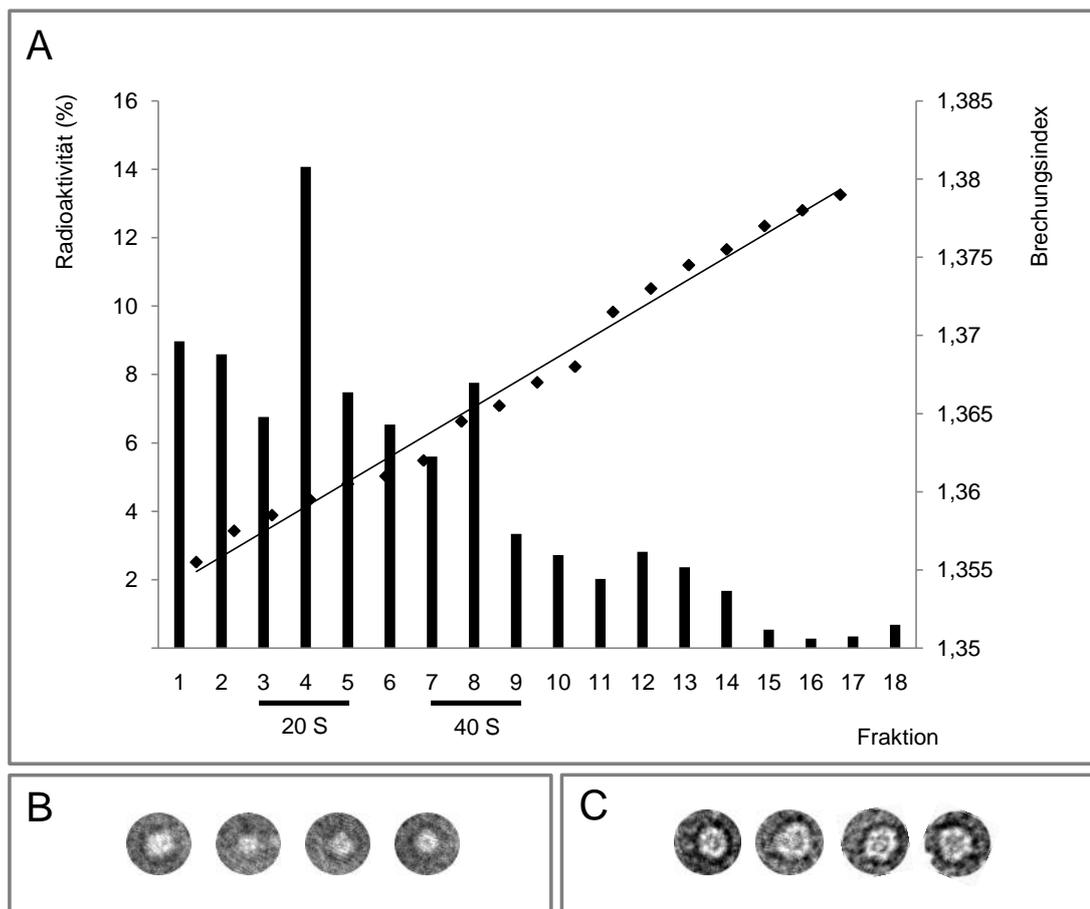
**Abb. 14: Biochemische Charakterisierung von späten Editosomen.** (A) Native, späte Editosomen wurden durch mHel61p-TAP isoliert. Die Proteinzusammensetzung des Cal-Eluats wurde durch SDS-PAGE und MALDI-ToF-Analysen untersucht (oben). Die Anwesenheit der RNA-Editing-Ligasen wurde durch Autoadenylierung gezeigt (unten). 13 mit dem RNA-Editing assoziierte Proteine wurden mit mHel61p isoliert. (B) Radioaktive Markierungsmethoden zeigen das Vorhandensein von endogener mRNA und endogener gRNA. (C+D) *in vitro* Editingaktivität konnte nicht nachgewiesen werden. + = Positivkontrolle, - = Negativkontrolle

### 3.1.4.4 *In vitro* Editing-Assays von späten Editosomen

Die durch die mHel61p-TAP isolierten späten Editosomen sind nicht in der Lage *in vitro* eine RNA-Editing-Reaktion zu katalysieren. Im PIA und PDA konnte sowohl für das IgG-Eluat als auch für das Cal-Eluat keine *in vitro* Insertions- oder Deletionsaktivität gezeigt werden (Abb. 14C+D).

### 3.1.4.5 Bestimmung des apparenten Sedimentationskoeffizienten

Späte Editosomen sedimentieren ebenfalls als 20 S und 40 S Partikel in einem linearen 10-35 % (v/v) GG. Die Menge an 20 S Editosomen ist im Vergleich zur Menge der 40 S Editosomen um den Faktor 2-5 höher (Abb. 15). Die TEM zeigte in beiden Fällen monodisperse Populationen von globulären Partikeln (Abb. 15 B+C). Die 20 S Partikel haben eine Dimension von  $\sim 20 \times 15$  nm, die 40S Partikel von  $\sim 20 \times 20$  nm.



**Abb. 15: Bestimmung des apparenten S-Werts von späten Editosomen.** (A) Fraktionierung von radioaktiv markierten späten Editosomen im 10-35 % (v/v) GG. Späte Editosomen sedimentieren in zwei Subpopulationen als 20 S und 40 S Partikel. (B) TEM von späten 20 S Editosomen. (C) TEM von späten 40 S Editosomen.

<b>gBP21-TAP</b>	<b>TbMP42-TAP</b>	<b>mHel61p-TAP</b>	<b>nachgewiesene Funktion</b>
	MP100		Exonuklease
	MP99	MP99	Exonuklease
MP90	MP90	MP90	Endonuklease
MP81			Interaktion
	MP67	MP67	Endonuklease
		MP64	
	MP63	MP63	Interaktion
MP61	MP61	MP61	Endonuklease
MP57	MP57		TUTase
MP52	MP52	MP52	Ligase
MP48	MP48	MP48	Ligase
MP46	MP46	MP46	Interaktion
MP44	MP44		Interaktion
	MP42	MP42	Endo/Exonuklease
	MP24		
		MP18	RNA-Bindung
gBP21, mHel61p, RBP38		mHel61p, RBP16, RBP38, REAP1	akzessorische Faktoren
-	+	-	Insertionsaktivität
-	+	-	Deletionsaktivität
+	+	+	mRNA
+	+	+	gRNA

**Tab. 2: Zusammenfassung der Ergebnisse der biochemischen Analysen.** gBP21, TbMP42 und mHel61p liegen *in vivo* assoziiert mit editosomalen Proteinen, mRNA und gRNA in Komplexen mit apparenten S-Werten von 20 S und 40 S vor. Die Proteinkomposition der Komplexe variiert in den unterschiedlichen funktionalen Stadien der RNA-Editing-Reaktion. Nur für Komplexe isoliert mit der TbMP42-TAP konnte *in vitro* Editingaktivität gezeigt werden.

## 3.2 Strukturanalyse von funktionalen Editosomen

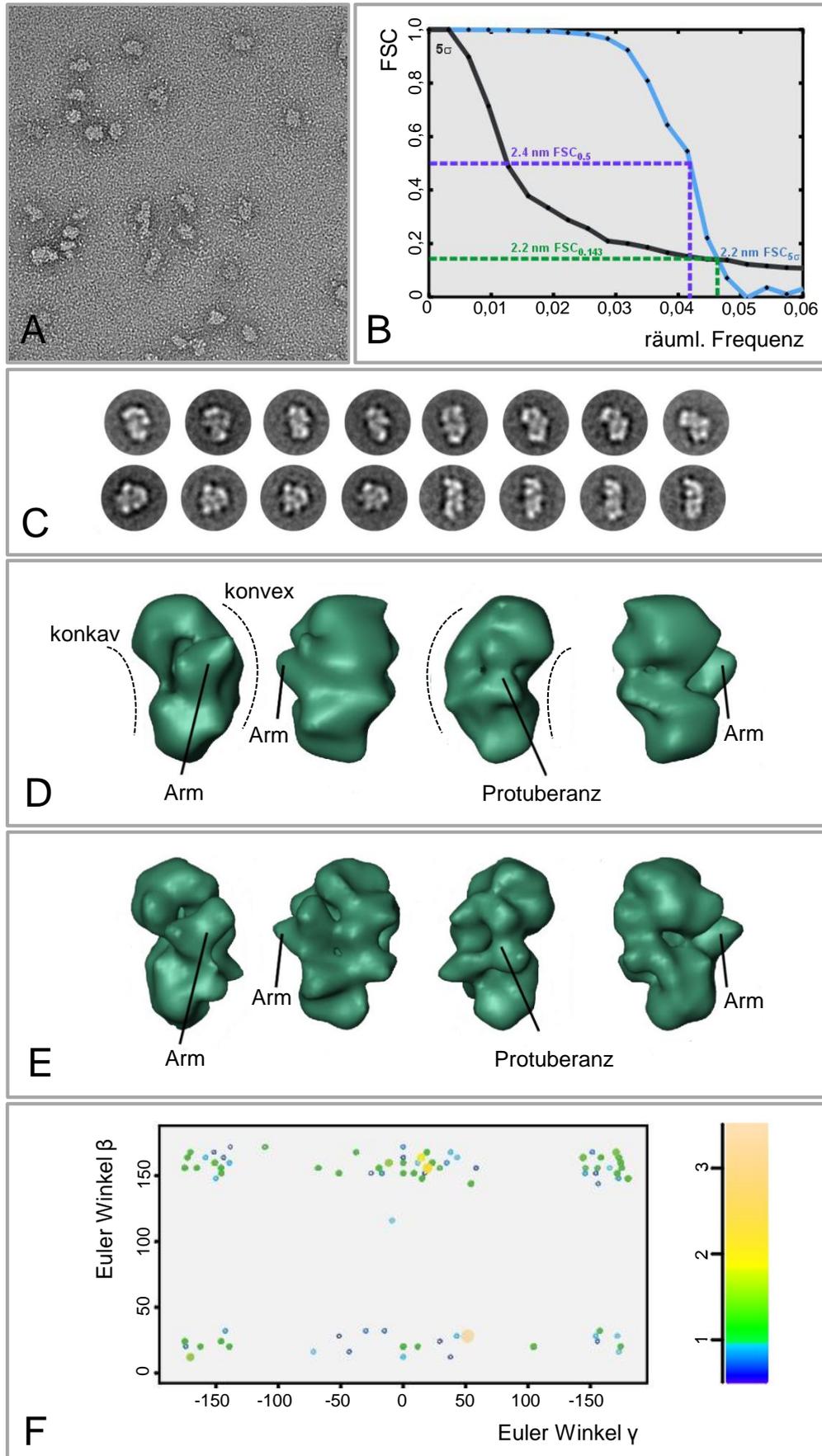
Um ein erstes Bild von der Struktur und der Morphologie nativer Editosomen zu erhalten, wurden die in Kapitel 3.1.3 charakterisierten funktionalen 20 S und 40 S Editosomen durch TEM visualisiert. Durch Einzel-Partikel-Rekonstruktion wurde aus den TEM-Aufnahmen ein dreidimensionales (3D) Konsensusmodell für die 20 S und die 40 S Subpopulation erstellt.

### 3.2.1 TEM von funktionalen 20 S Editosomen

20 S Editosomen, isoliert durch die TbMP42-TAP aus  $3\text{-}4\cdot 10^{11}$  Zellen, wurden nach der *sandwich carbon*-Methode für die TEM präpariert. Hierzu wurden die Partikel an einen Kohlefilm adsorbiert und auf einen mit einem zweiten Kohlefilm beschichteten Kupfergrid aufgebracht. Der Euler-Winkel-Plot (Abb. 16F) zeigte, dass die Partikel in zwei bevorzugten Orientierungen an den Kohlefilm adsorbiert haben. Anschließend erfolgte eine Negativ-Kontrastierung mit dem Schwermetallsalz Uranylformiat. Die TEM Aufnahmen wurden aus einem  $90^\circ$  Winkel und aus einem Kippwinkel von  $45^\circ$  aufgenommen. Durch das zusätzliche Kippen der Probe im Mikroskop werden zwei Ansichten eines Moleküls erhalten. Es können die Projektionsrichtungen beider Ansichten bestimmt und zur Berechnung der 3D-Struktur verwendet werden. Die TEM-Aufnahmen der 20 S Editosomen (Abb. 16A) zeigten eine monodisperse Population von elongierten, globulären Partikeln mit einem Durchmesser von 21-26 nm. Bereits auf dieser Ebene war eine Heterogenität der Partikel zu erkennen. Einige der Komplexe wiesen eine schmale, elongierte Form auf, andere Partikel erschienen breiter und leicht gekrümmt.

### 3.2.2 Berechnung einer 3D-Konsensusstruktur von funktionalen 20 S Editosomen

Für die Einzel-Partikel-Rekonstruktion wurden Aufnahmen von 20S Editosomen aus drei unabhängigen Präparationen herangezogen. Insgesamt wurden 12188 Kipp-Paare aus 20 Aufnahmen manuell ausgewählt, aus denen durch die *random conical tilt* (RCT)-Methode ein 3D-Konsensusmodell erstellt wurde. Hierzu wurden zunächst durch *multireference alignment* (MRA) die Partikel in Klassensummen (KS) eingeordnet. Eine KS wird von Partikeln gebildet, die in der  $90^\circ$  Ansicht in derselben Orientierung auf dem Grid abgebildet sind. Es wurden 609 KS mit je 20 individuellen Partikeln erstellt. Diese KS zeigten eine Vielfalt unterschiedlicher Strukturen (Abb. 16C). Die Mehrheit der Partikel hat eine zweigeteilte Form mit zwei annähernd gleich großen Subdomänen, die über eine schmale Brücke verbunden sind.

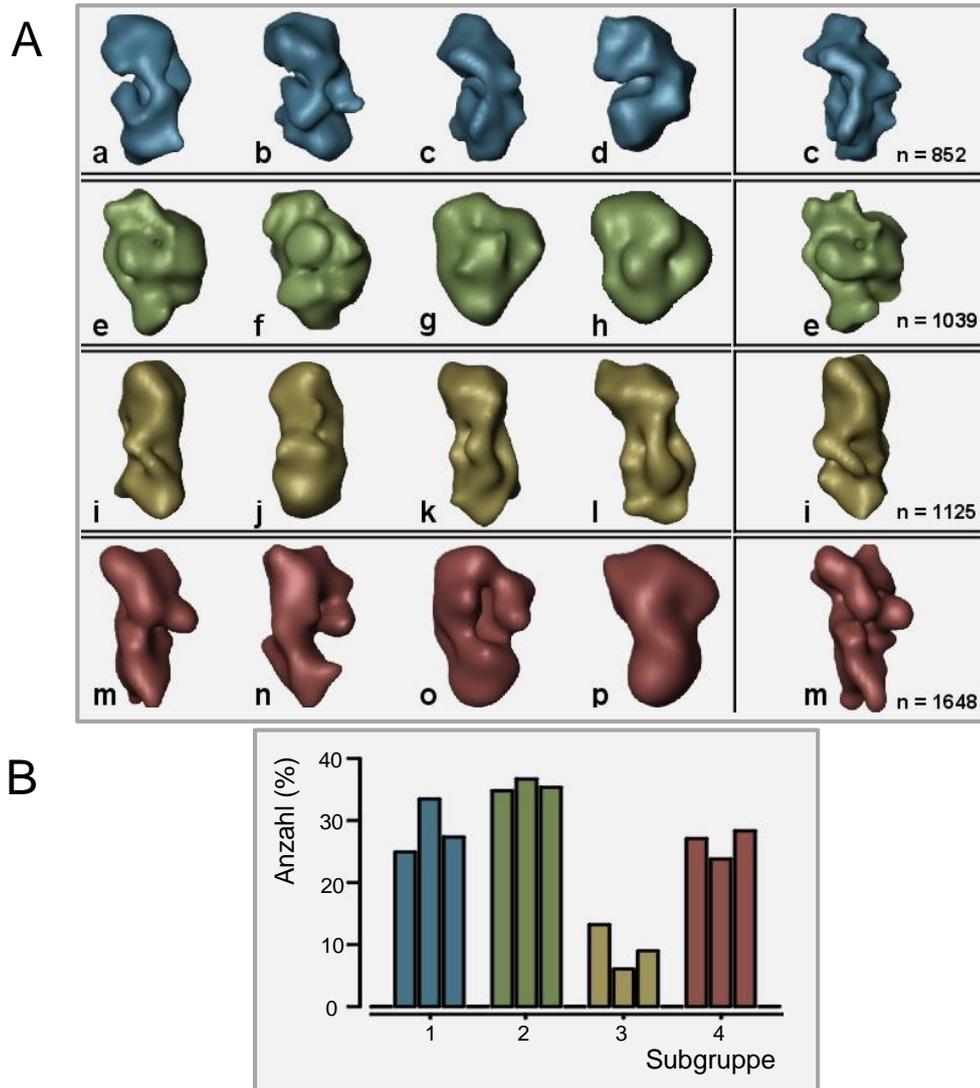


**Abb. 16: TEM-Analyse von 20S Editosomen.** (A) TEM-Aufnahme von 20 S Editosomen zeigen eine monodisperse Population von globulären und elongierten Partikeln mit einem Durchmesser von 21-26 nm. (B) Die FSC ergab für das 3D-Konsensus-Modell eine Auflösung von 2,1-2,4 nm. (C) Die KS zeigen in der Mehrheit zweiteilige elongierte Strukturen. (D) Das 3D-Konsensusmodell zeigt einen elongierten Partikel mit zwei globulären Subdomänen, die durch eine schmale Brücke verbunden sind. Die Ansichten sind um 90° gedreht. (E) Die 3D-Struktur der umfangreichsten KS hat große Ähnlichkeit mit dem Konsensusmodell. (F) Der Euler-Winkel-Plot zeigt zwei bevorzugte Orientierungen der Partikel auf dem Kohlefilm.

Mit der RCT-Methode wurden die Euler-Winkel der Einzelpartikel bestimmt und aus den einzelnen KS 3D-Modelle erstellt. Das 3D-Modell, errechnet aus der umfangreichsten Klassensumme, ist in Abb. 16E gezeigt. Aus den individuellen 3D-Modellen wurde durch *multivariate statistical analysis* (MSA) ein 3D Konsensus-Modell berechnet (Abb. 16D). Die *fourier shell correlation* (FSC) ergab für die Konsensusstruktur eine Auflösung von 2,1-2,4 nm (Abb. 16F). Das 20 S Editosom hat eine elongierte, leicht gekrümmte Form mit einer konkaven und einer konvexen Krümmung auf den gegenüberliegenden Seiten. Es besteht aus zwei Subdomänen ähnlicher Größe. Die obere Subdomäne ist globulär, die untere Subdomäne ist im Vergleich schmaler und leicht elongiert. Beide Subdomänen unterscheiden sich in feinstrukturellen Details, es scheint sich also nicht um ein Homodimer zu handeln. Die Verbindungsstelle zwischen den beiden Subdomänen weitet sich an den gegenüberliegenden Seiten zu zwei Protuberanzen aus, die als "Arm" und als "dreieckige Protuberanz" bezeichnet wurden. 20 S Editosomen haben eine Größe von 21x15,5x14 nm. Das errechnete Molekulargewicht der 3D-Konsensusstruktur beträgt 800±80 kDa, der S-Wert wurde auf 21-26 S bestimmt.

### 3.2.3 Variabilitäts-Analyse der 20 S Population

Die TEM-Aufnahmen von 20 S Editosomen, isoliert unter *steady state*-Bedingungen, zeigten eine strukturelle Heterogenität der Partikel, die sich bereits in den 2D KS widerspiegelte. Eine Variabilitäts-Analyse der 3D RCT-Strukturen durch MSA ergab vier 3D-Substrukturen. Die Subgruppe 1 (Abb. 17, Reihe1) enthielt Partikel mit einer klaren Unterteilung in die zwei globulären Subdomänen, Partikel aus der Subgruppe 2 (Abb. 17, Reihe2) zeigten zusätzlich ein auf die Zwischenregion aufgelagertes Strukturelement, das als "Rücken" bezeichnet wurde. Eine quantitative Auswertung ergab, dass den Subgruppen 1 und 2 mit 25-30 % bzw. 35 % der Großteil der Partikel zugeordnet wurden (Abb. 17B). Die Subgruppe 3 (Abb. 17, Reihe3) enthielt Komplexe mit einer schmaleren, in der Hauptachse gestreckteren Form, Partikel aus der Subgruppe 4 (Abb. 17, Reihe 4) wiesen eine weitere Protuberanz im Bereich der Zwischenregion auf. Das Ergebnis der Variabilitäts-Analyse zeigte, dass es sich bei den vier Substrukturen um denselben makromolekularen Komplex mit unterschiedlichen zusätzlichen Strukturelementen handelt. 20 S Editosomen scheinen unter *steady state-Bedingungen* in unterschiedlichen Assemblierungs-Stadien vorzuliegen.



**Abb. 17: Variabilitäts-Analyse der 20 S Population.** (A) 20 S Editosomen lassen sich in vier 3D-Subgruppen einteilen. (B) Die Mehrzahl der Partikel besteht aus zwei globulären miteinander verbundenen Subdomänen, die unterschiedliche zusätzliche Strukturelemente tragen. Es scheint sich um unterschiedliche Assemblierungs-Stadien der 20 S Editosomen zu handeln.

### 3.2.4 TEM von funktionalen 40 S Editosomen

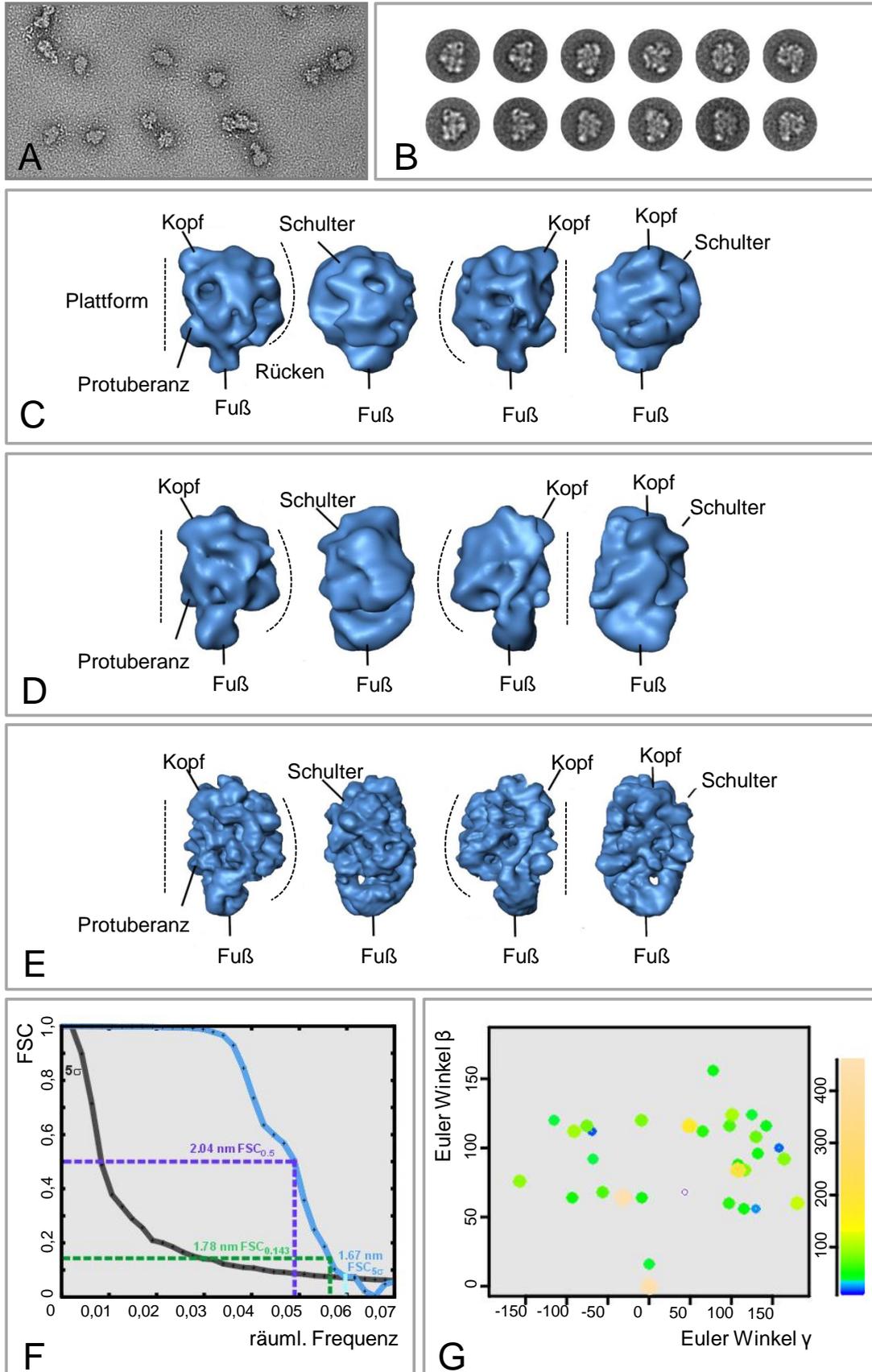
40 S Editosomen aus  $3\text{-}4\cdot 10^{11}$  Zellen wurden nach der *sandwich carbon*-Methode präpariert und negativ kontrastiert. Der Euler-Winkel-Plot zeigte, dass die Partikel in unterschiedlichen Orientierungen an den Kohlefilm gebunden haben (Abb. 18G). Die TEM-Aufnahmen (Abb. 18A) zeigten eine monodisperse Population von asymmetrischen Komplexen mit einem Durchmesser von 26 nm. 40S Editosomen haben eine kompakte, globuläre Form mit distinkten strukturellen Eigenschaften.

### 3.2.5 Berechnung einer 3D-Konsensusstruktur von funktionalen 40 S Editosomen

Für die Berechnung der 3D-Struktur wurden Aufnahmen von 4300 Kipp-Paaren aus 29 Aufnahmen von drei unabhängigen Editosomen-Präparationen manuell ausgewählt. Durch MRA wurden 214 KS mit je 20 individuellen Partikeln erstellt. Bereits auf dieser Ebene ließen sich für das 40 S Editosom charakteristische Strukturdetails erkennen. Typische KS zeigten einen asymmetrischen, globulären Partikel bestehend aus einer elongierten, konvexen Plattform mit einem aufgelagerten rundlichen Element (Abb. 18B). Aus den 214 KS wurden 175 zur weiteren Berechnung der 3D-Struktur durch RCT verwendet. Aus 58 individuellen 3D-Klassen wurde durch MSA ein 3D-Konsensusmodell erstellt. Das 40 S Editosom besteht aus einer konvexen, elongierten Plattform, die sich an gegenüberliegenden Seiten zu globulären Domänen ausweitet, die als "Kopf" bzw. "Fuß" bezeichnet wurden. Eine weitere kleinere Protuberanz ist in der Nähe des "Fußes" lokalisiert. Auf die Plattform ist eine runde, asymmetrische Domäne aufgelagert, die "Rücken" genannt wurde. Dieser "Rücken" weitet sich an einer Seite zu einer weiteren Protuberanz, "Schulter" genannt, aus.

### 3.2.6 Verfeinerung der 3D-Struktur durch Kryo-TEM

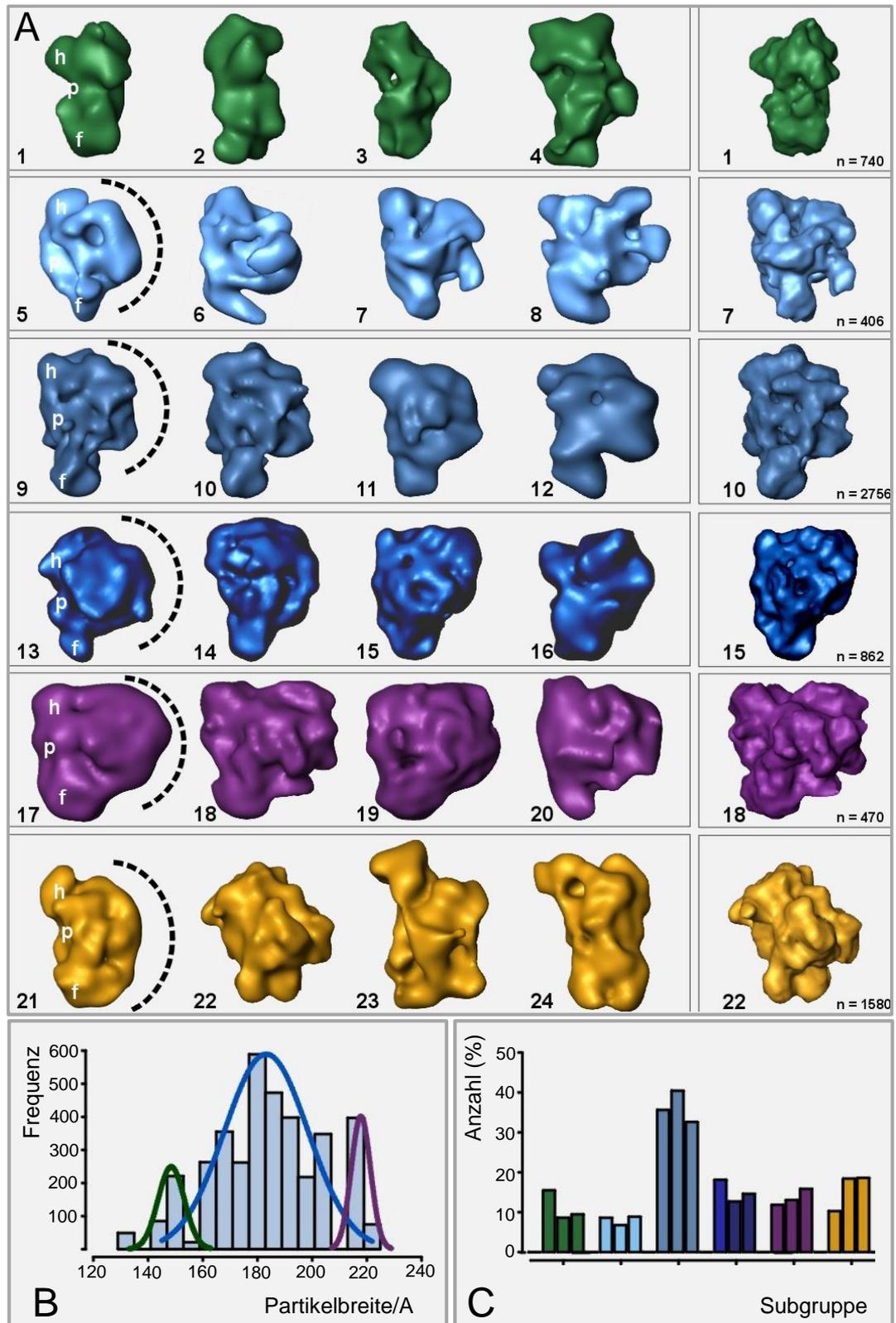
Die 3D-Struktur der umfangreichsten 3D-Klassensumme wurde als Ausgangspunkt für eine Strukturverfeinerung verwendet. Hierzu wurde eine Kryo-TEM durchgeführt. Es wurden Aufnahmen von 13000 Einzelpartikeln gemacht aus denen durch *projection matching* eine 3D-Konsensusstruktur errechnet wurde. Die Auflösung der 3D-Struktur wurde durch FSC auf 1,6-2,4 nm bestimmt (Abb. 18F). Die Kryo-TEM-Struktur bestätigt das Vorhandensein der strukturellen Elemente der RCT-Struktur. Zusätzlich sind durch die höhere Auflösung weitere Strukturdetails zu erkennen. Die Plattform sowie der "Rücken" bestehen aus einem dichten Netzwerk von Einzelelementen, die über multiple Kontakte verknüpft sind. 40 S Editosomen haben eine Dimension von 26,5x20x17,5 nm. Das errechnete Molekulargewicht der Kryo-3D-Struktur beträgt  $1,45\pm 0,15$  MDa, der S-Wert wurde auf 35-41 S bestimmt.



**Abb. 18: TEM-Analyse von 40 S Editosomen:** (A) TEM-Aufnahmen von 40 S Editosomen zeigen eine monodisperse Population von globulären, asymmetrischen Komplexen mit einem Durchmesser von 26 nm. (B) 2D KS zeigen einen Partikel bestehend aus einer elongierten Plattform mit einem aufgelagerten globulären Element. (C) Das 3D-Konsensusmodell zeigt weitere charakteristische Strukturelemente wie "Kopf", "Fuß" und "Schulter". Die Ansichten sind um 90°gedreht. (D) Die 3D-Struktur der umfangreichsten KS hat große Ähnlichkeit mit dem Konsensusmodell und wurde als Ausgangspunkt für die Strukturverfeinerung verwendet. (E) Weitere Feinstrukturdetails sind in der Kryo-3D-Struktur zu erkennen. (F) Die FSC ergab für das Kryo-3D-Modell eine Auflösung von 1,6-2,4 nm. (G) Der Euler-Winkel-Plot zeigt eine Vielfalt von Projektionswinkeln.

### 3.2.7 Variabilitäts-Analyse der 40 S Population

Eine Variabilitäts-Analyse der 3D RCT-Strukturen durch MSA offenbarte sechs unterschiedliche 3D-Substrukturen. Vier der sechs Substrukturen wiesen alle strukturellen Charakteristika des 3D-Konsensusmodells auf (Abb. 19, Reihe 2-5). Sie zeigten die in den Kopf und Fuß auslaufende Plattform mit dem aufgelagerten "Rücken". Diese Subgruppen 2-5 unterschieden sich allein durch die Breite des "Rücken"-Elements und machten ~80% der Gesamtpartikel aus. Eine Quantifizierung der Partikelbreite ergab für Komplexe der Subgruppen 2-5 eine Breite von  $18,5 \pm 2$  nm. Die Partikel der Subgruppe 1 (Abb. 19, Reihe 1) zeigten ebenfalls alle strukturellen Charakteristika mit Ausnahme des "Rücken"-Elements, sie wiesen eine Breite von  $15 \pm 1$  nm auf. Wahrscheinlich handelte es sich bei den Subgruppen 1-5 um 40 S Editosomen in unterschiedlichen Assemblierungsstadien. Die Subgruppe 6 (Abb. 19, Reihe 6) zeigte keine der typischen Struktureigenschaften, hierbei handelte es sich möglicherweise um Kontaminationen. Komplexe der Subgruppe 6 wiesen eine Breite von  $21,5 \pm 1$  nm auf.



**Abb. 19: Variabilitäts-Analyse von 40 S Editosomen.** (A) 40 S Editosomen lassen sich in sechs 3D-Subgruppen einteilen. (B+C) 80 % der Partikel bestehen aus der in den "Kopf" und "Fuß" auslaufenden Plattform mit dem aufgelagerten "Rücken"-Element. Diese Partikel (Reihe 2-4) unterscheiden sich allein durch die Breite des "Rücken"-Elements.

### **3.3 Biochemische Charakterisierung von funktionalen 20 S und 40 S Editosomen**

In Kapitel 3.1.3 ist gezeigt, dass durch die TbMP42-TAP funktionale Editosomen isoliert werden konnten. Im TbMP42-TAP Eluat wurden 13 editosomale Proteine sowie mRNA und gRNA nachgewiesen. Die Bestimmung des apparenten S-Werts ergab, dass die funktionalen Editosomen in zwei Subpopulationen von 20 S und 40 S vorlagen. Die durch TEM bestimmten 3D-Strukturen der 20 S und 40 S Editosomen wurde in Kapitel 3.2 vorgestellt. Im folgenden Kapitel soll die Protein- bzw. RNA-Zusammensetzung der 20 S und der 40 S Populationen untersucht werden.

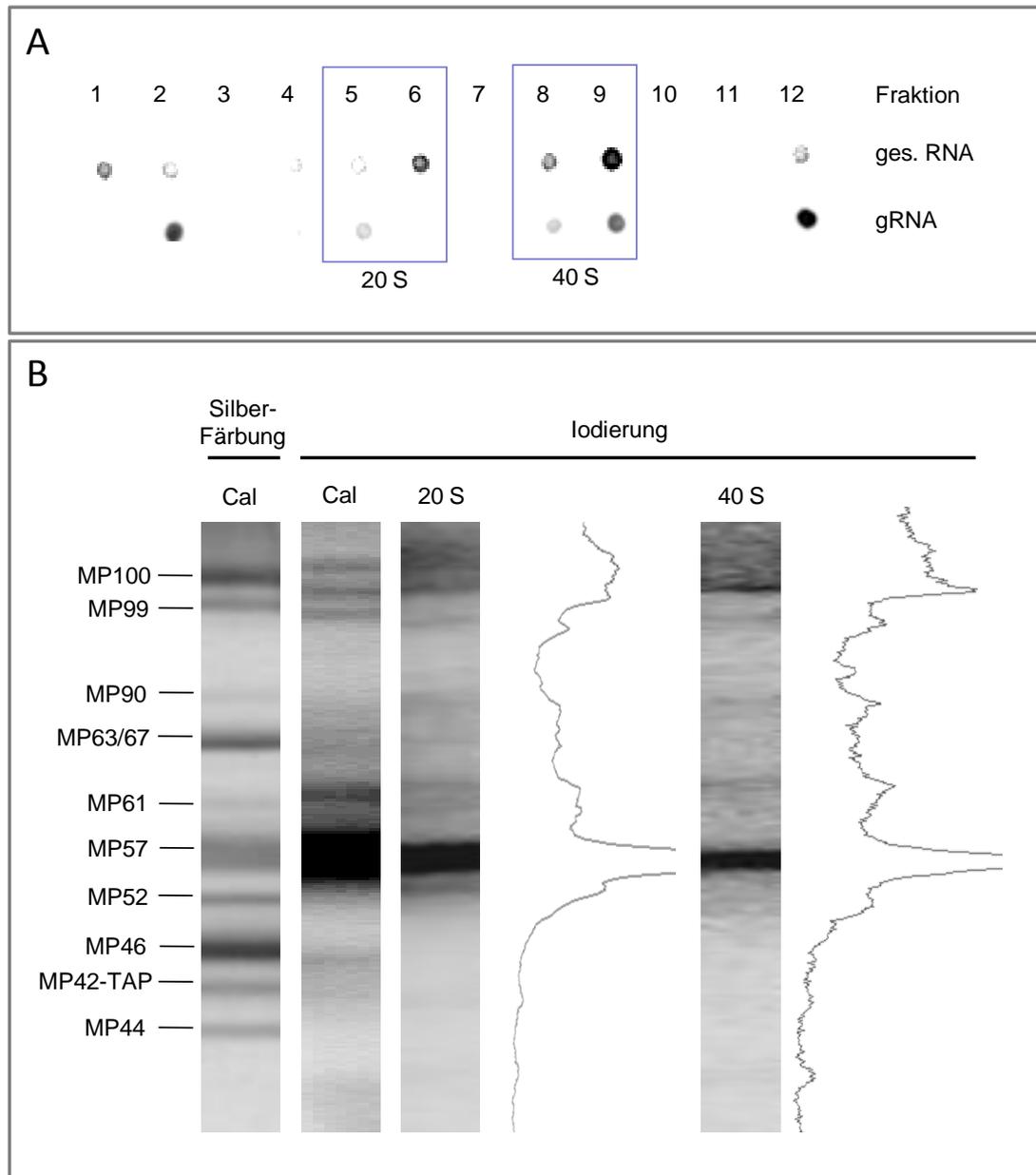
#### **3.3.1 Analyse der Proteinkomposition**

Zur Analyse der Proteinzusammensetzung wurde TbMP42-TAP-Eluat durch Iodierung mit  $^{125}\text{I}$  radioaktiv markiert. Das Bandenmuster des radioaktiv markierten TAP-Eluats ist in Abb. 20B dem Bandenmuster einer Silberfärbung des TAP-Eluats gegenübergestellt. Das Proteinprofil ist ähnlich, die Intensitäten der einzelnen Banden unterscheiden sich durch die unterschiedlichen Markierungs- bzw. Färbemethoden. Durch Ultrazentrifugation in einem 10-40 % GG wurde das TAP-Eluat in die 20 S und 40 S Subpopulationen fraktioniert. Die Proteinkomposition der Subpopulationen wurde durch eine SDS-PAGE analysiert. Das TAP-Eluat sowie die 20 S und 40 S Populationen wiesen ein ähnliches Bandenmuster auf, d.h. 20 S und 40 S Editosomen zeigen auf Proteinebene kaum Unterschiede.

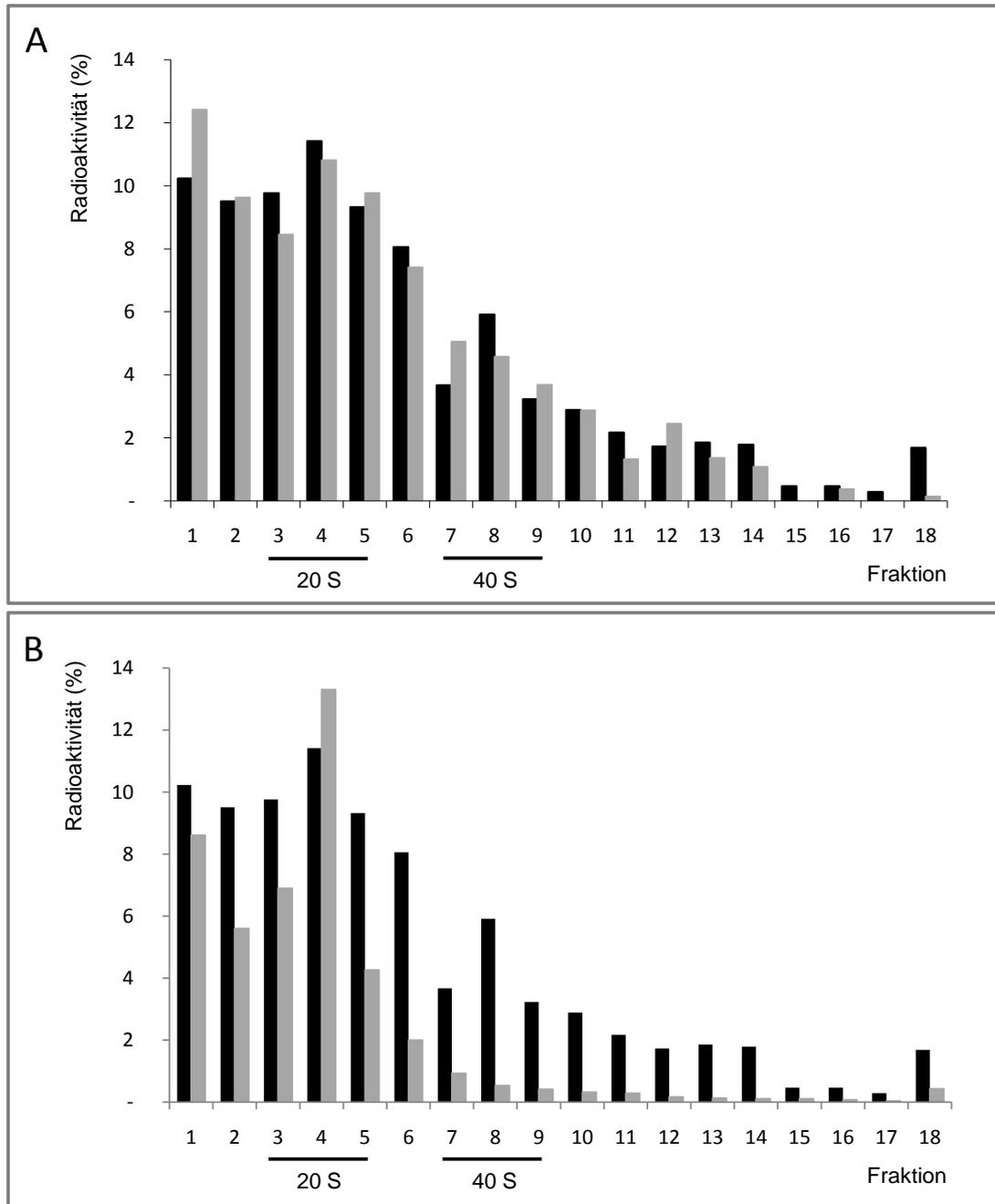
#### **3.3.2 Analyse des NS-Anteils**

##### **3.3.2.1 Nachweis von endogener mRNA und gRNA**

Funktionale 20 S und 40 S-Editosomen wurden im 10-35 % (v/v) GG fraktioniert, und die assoziierten RNAs wurden isoliert. Durch eine Dephosphorylierung und die radioaktive Markierung mit PNK wurde das Vorhandensein von RNA nachgewiesen, durch die radioaktive Markierung mit GT wurde selektiv auf das Vorhandensein von Primärtranskripten wie gRNAs getestet. Gesamt-RNA konnte assoziiert mit 20 S und 40 S Editosomen nachgewiesen werden (Abb. 20A). Die Signalintensität der 40 S Fraktion war bei vergleichbarer Markierungseffizienz um den Faktor 2 höher als die der 20 S Fraktion. Die in Kapitel 3.1.2.4 gezeigte Fraktionierung von radioaktiv markierten Editosomen im GG ergab, dass im TbMP42-TAP-Eluat 2-5x weniger 40 S als 20 S Editosomen vorlagen, d.h. die Menge an Gesamt-RNA assoziiert mit 40 S Editosomen war um den Faktor 4-10 höher als die Menge an Gesamt-RNA assoziiert mit 20S Editosomen. gRNA konnte nur assoziiert mit 40 S Editosomen nachgewiesen werden (Abb. 20A).



**Abb. 20: Biochemische Charakterisierung der funktionalen 20 S und 40 S Editosomen.** (A) Die radioaktive Markierung der RNA zeigt, dass der Anteil an Gesamt-RNA in den 40 S Fraktionen um den Faktor 4-10 höher ist als in den 20 S Fraktionen. gRNA konnte nur assoziiert mit 40 S Editosomen nachgewiesen werden (B) Die SDS-PAGE von radioaktiv markierten Editosomen zeigte kaum Unterschiede in der Proteinkomposition von 20 S und 40 S Editosomen.



**Abb. 21:** (A) RNase-Verdau von TbMP42-TAP-Eluat. Die schwarzen Balken zeigen die typische Verteilung von Editosomen im GG, die grauen Balken zeigen die Verteilung von Editosomen nach erfolgtem RNase-Verdau. Der Verdau endogener RNA führte zum Zerfall der 40 S Editosomen in Monomere. Die 20 S Subpopulation blieb stabil. (B) Bindung von synthetischer RNA an TbMP42-TAP-Eluat. Die schwarzen Balken zeigen die Verteilung von 20 S und 40 S Editosomen, die grauen Balken zeigen die Verteilung der synthetischen RNA über den GG. Nur die 20 S Subpopulation konnte synthetische RNA binden.

### 3.3.2.2 Verdau von 20 S und 40 S Editosomen mit RNasen

Um zu verifizieren, dass 40 S Editosomen endogene RNA enthalten, wurde <sup>125</sup>Iod-markiertes TbMP42-TAP-Eluat mit RNasen spezifisch für einzelsträngige und doppelsträngige RNA inkubiert und anschließend im GG fraktioniert. In Abb. 21A ist der prozentuale Anteil an Radioaktivität gegen die GG-Fraktionen aufgetragen. Die schwarzen Balken zeigen die typische Verteilung von Editosomen im GG, die grauen Balken zeigen die Verteilung von Editosomen nach erfolgtem RNase-Verdau. Während die Menge an 20 S Editosomen stabil blieb, führte der Verdau der endogenen RNA zum Zerfall der 40 S Editosomen. 40 S Editosomen wurden durch den RNase-Verdau nicht in 20 S Editosomen konvertiert, der Verlust der RNA führte zum Zerfall der 40 S Population in monomere Proteine oder Komplexe mit geringem S-Wert.

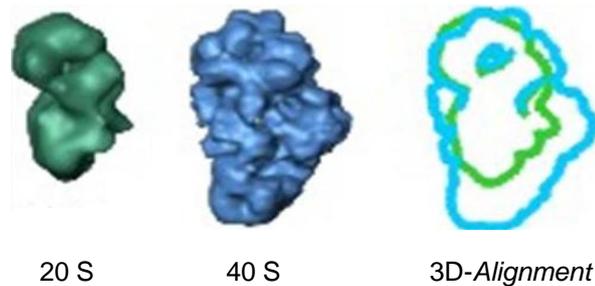
### 3.3.2.3 Bindung von synthetischer RNA an 20 S und 40 S Editosomen

Um die Hypothese zu überprüfen, dass RNA hauptsächlich Teil der 40 S Subpopulation ist, wurde getestet, ob synthetische RNA an 20 S bzw. 40 S Editosomen binden kann. Hierzu wurde <sup>125</sup>Iod markiertes TbMP42-TAP-Eluat mit der mit <sup>32</sup>Phosphor markierten RNA des PIA im Verhältnis 1:2 inkubiert, anschließend wurden 20 S und 40 S Editosomen im GG fraktioniert. Durch eine Szintillationsmessung wurden der Anteil von Editosomen und der Anteil von synthetischer RNA in den einzelnen Fraktionen bestimmt. In Abb. 21B ist der prozentuale Anteil der Gesamtradioaktivität gegen die Fraktionen aufgetragen. Die schwarzen Balken zeigen die Verteilung von 20 S und 40 S Editosomen im GG, die grauen Balken zeigen die Verteilung der synthetischen RNA über den GG. Synthetische RNA konnte ausschließlich an 20 S Editosomen binden, es erfolgte keine Bindung an 40 S Editosomen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die RNA-Bindestellen der 40 S Editosomen mit endogener RNA belegt waren.

### 3.3.3 3D-Alignment von 20 S und 40 S Editosomen

Die vorgestellten Ergebnisse zeigten, dass die 20 S und 40 S Editosomen auf Protein-Ebene ähnlich sind. Der Unterschied zwischen den Subpopulationen besteht im Vorhandensein von endogener mRNA und gRNA. Dies deutete darauf hin, dass die 20 S Editosomen durch Bindung von mRNA und gRNA in 40 S Editosomen konvertieren, d.h. dass 20 S Editosomen ein Assemblierungsstadium der 40 S Editosomen sind. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die 3D-Strukturen der 20 S und 40 S Partikel auf strukturelle Gemeinsamkeiten überprüft. Es fiel auf, dass die Dimension der Plattform der 40 S Komplexe mit der Gesamtgröße der 20 S Partikel übereinstimmen. Diese Plattform der 40 S Editosomen läuft in zwei globuläre Domänen den "Kopf" und den "Fuß" aus, während der 20 S Komplex aus zwei miteinander verbundenen globulären Subdomänen besteht. Um festzustellen, ob die 20 S 3D-Konsensusstruktur in das 40 S 3D-Konsensus-Modell integriert

werden kann, wurde ein *3D-Alignment* durchgeführt. Die Überlagerung der globulären Subdomänen des 20 S Partikels mit der "Kopf"- und "Fuß"-Domäne des 40 S Komplexes führte ebenfalls zu einer Überlagerung der "Arm"-Struktur des 20 S Editosoms mit einer ähnlich geformten Protuberanz des 40 S Editosoms. Das in Abb. 22 gezeigte *3D-Alignment* deutete darauf hin, dass es sich bei dem 20 S Editosom tatsächlich um einen Teil der Plattform des 40 S Editosoms handelt, d.h. dass 20 S Editosomen ein Assemblierungsstadium der 40 S Editosomen darstellen.



**Abb. 22: 3D-Alignment der 20 S und 40 S 3D-Konsensusstrukturen.** Die 20 S Konsensusstruktur kann in die 40 S Konsensusstruktur integriert werden. Das 20 S Editosom ist ein Teil der Plattform-Struktur des 40 S Editosoms.

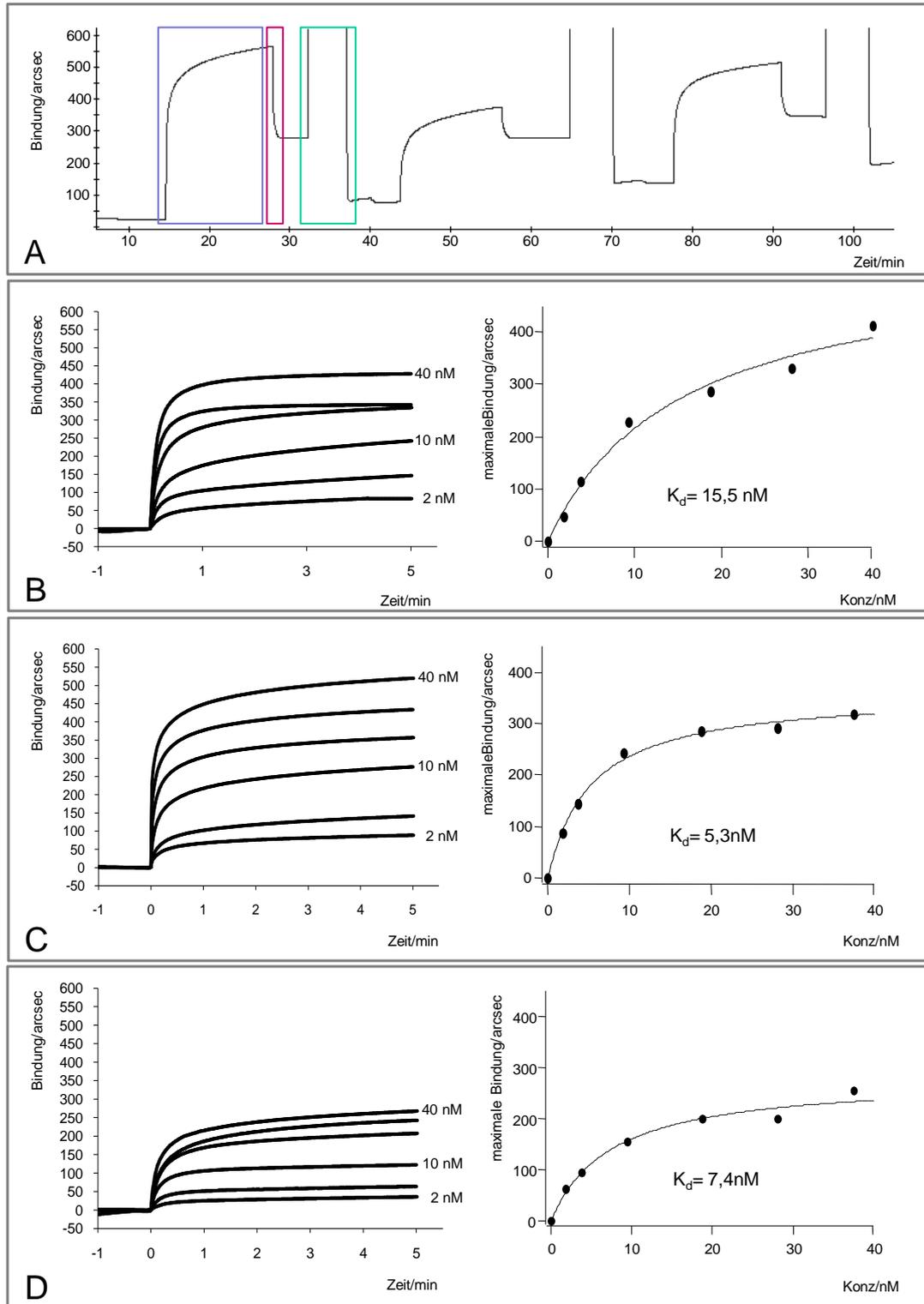
### 3.3.4 Charakterisierung der RNA-Bindung an 20 S Editosomen

#### 3.3.4.1 Echtzeit RNA-Bindestudien mit 20 S Editosomen durch *surface plasmon resonance*-Messungen

Um die RNA-Editosom-Interaktion näher zu charakterisieren, wurden die Bindeeigenschaften von gRNA, mRNA und eines gRNA/mRNA-Duplex` an 20 S Editosomen durch *surface plasmon resonance* (SPR)-Messungen analysiert.

Hierzu wurden die RNAs kovalent an eine Aminosilanoberfläche immobilisiert. Für diese Verknüpfung wurden die 2'- und 3'-Positionen der 3'-terminalen Ribose der RNAs zu Aldehyden oxidiert. Aldehyde bilden mit primären Aminen Schiff'sche Basen, die unter reduzierenden Bedingungen in eine kovalente Bindung überführt werden können.

Auf die auf der Detektoroberfläche immobilisierten RNAs wurden steigende Konzentrationen (2-40nM) einer 20 S GG-Fraktion in randomisierter Reihenfolge appliziert. Durch SPR-Messungen wurde eine Änderung des Brechungsindex` im Medium das die Detektoroberfläche überschichtet detektiert. Kam es zur Interaktion von Molekülen auf der Detektoroberfläche, wurde der Brechungsindex des Mediums verändert. Diese Änderung des Brechungsindex` wurde über die Interaktion mit der durch einen Laser induzierten Plasmonwelle in eine Winkeländerung des Lasers überführt.



**Abb. 23: Echtzeit RNA-Bindestudien mit 20 S Editosomen durch SPR-Messungen.** (A) Ausschnitt eines Signalverlaufs in Bogensekunden über der Zeit für die Interaktion von gRNA mit 20 S Editosomen, blau: Bindung; rot: Dissoziation, grün: Regeneration. (B) Bindedaten für die konzentrationsabhängige Interaktion von mRNA an 20 S Editosomen. Der  $K_d$  für die Bindung wurde auf 15,5 nM bestimmt. (C) Interaktion von gRNA und 20 S Editosomen. Der  $K_d$  wurde auf 5,3 nM bestimmt. (D) Interaktion eines mRNA/gRNA-Duplex mit 20 S Editosomen. Der  $K_d$  wurde auf 7,4 nM bestimmt.

Ein Ausschnitt eines typischen Versuchsverlaufs ist in Abb. 23A für die Interaktion von gRNA mit 20 S Editosomen exemplarisch gezeigt. Der Signalverlauf zeigt eine Bindung zwischen Ligand und Ligat, die nach 1-2 min eine Sättigung erreicht. Durch Waschen mit Editingpuffer kam es zu einer Dissoziation von ca. 50 %, durch Zugabe von 6 M GuHCl wurde eine vollständige Dissoziation der Editosomen von der RNA erreicht.

Die Signalverläufe der einzelnen Bindeereignisse wurden graphisch zusammengestellt. Hierbei zeigte sich, dass sowohl der gRNA/mRNA-Duplex als auch mRNA und gRNA konzentrationsabhängig an die 20 S Editosomen binden (Abb. 23B-D).

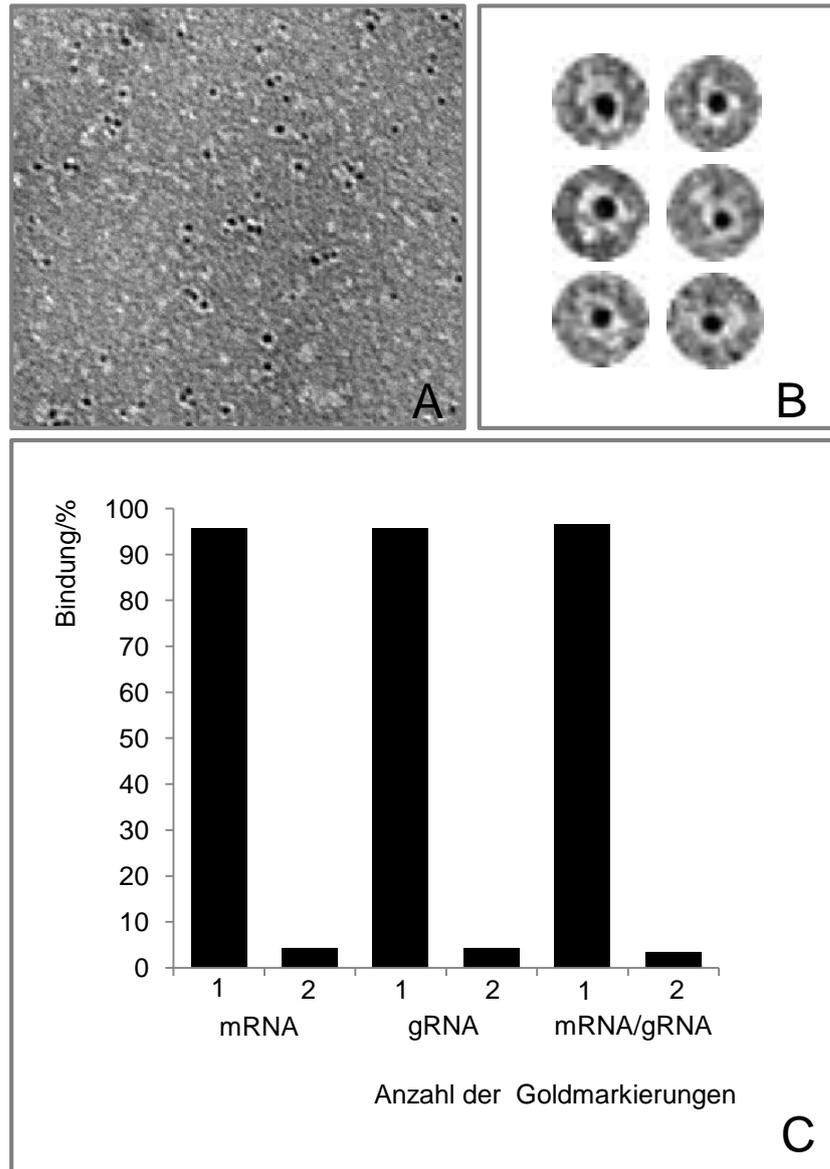
Zur Bestimmung des  $K_d$  wurde die maximale Bindung gegen die Proteinkonzentration aufgetragen und die halbmaximale Bindung anhand der Kurvenanpassung über die Langmuir-Beziehung bestimmt. Der  $K_d$  für die Bindung von mRNA an 20 S Editosomen wurde auf 15 nM, der  $K_d$  für die Bindung von gRNA an 20 S Editosomen wurde auf 5,3 nM bestimmt. Der gRNA/mRNA-Duplex bindet mit einem  $K_d$  von 7,4 nM an 20 S Editosomen.

### **3.3.4.2 RNA-Bindestudien mit 20 S Editosomen durch *Immunogold labeling*-Experimente**

Um die Ergebnisse der SPR-Messung zu bestätigen, wurde ein *Immunogold labeling* (IGL) durchgeführt. Hierzu wurden biotinylierte mRNAs, gRNAs sowie gRNA/mRNA-Duplexe, die entweder eine biotinylierte mRNA oder eine biotinylierte gRNA enthielten, mit der 20 S Fraktion einer TbMP42-TAP im 10x molaren Überschuss inkubiert. Die an die 20 S Editosomen gebundenen RNAs wurden mit Streptavidin-Goldpartikeln ( $\varnothing$ : 6 nm) markiert und die RNP-Partikel wurden nach der *sandwich carbon*-Methode präpariert, mit Uranylacetat negativ kontrastiert und durch TEM visualisiert.

Durch das IGL konnte die Bindung von mRNA, gRNA und des gRNA/mRNA-Duplex an 20 S Editosomen verifiziert werden. Ein repräsentativer Ausschnitt aus einer TEM-Aufnahme für die Bindung von gRNA an 20 S Editosomen ist in Abb. 24A gezeigt. 80-90 % der abgebildeten RNP-Partikel wiesen eine Goldmarkierung auf.

Um die Anzahl der RNA-Bindestellen pro 20 S Editosom zu bestimmen wurden für die Bindung der mRNA, gRNA, und des gRNA/mRNA-Duplex jeweils 1000 goldmarkierte RNP-Partikel ausgewertet. Die Statistiken ergaben, dass 95-97 % der Partikel eine Goldmarkierung und 3-5 % der Partikel zwei Goldmarkierungen aufwiesen, d.h. dass an den Großteil der 20S Editosomen jeweils eine mRNA, gRNA oder ein gRNA/mRNA-Duplex gebunden hatte.



**Abb. 24: RNA-Bindestudien mit 20 S Editosomen durch IGL.** (A) TEM Aufnahmen der gRNA-Bindung an 20 S Editosomen zeigen, dass 80-90 % der 20 S Editosomen durch die Bindung der RNA markiert wurden. (B) Vergrößerung einiger goldmarkierter RNP-Partikel. (C) Statistik zur Anzahl der RNA-Bindestellen pro 20 S Editosom. Es wurden jeweils 1000 markierte RNP-Partikel ausgewertet. 95-97 % der Partikel zeigten eine Markierung, 3-5 % der Partikel zeigten zwei Markierungen.

## 4 Diskussion

Das RNA-Editing im Mitochondrium von Trypanosomen ist charakterisiert durch die posttranskriptionale Insertion und Deletion von Us und generiert aus kryptischen Transkripten translationskompetente mRNAs. Seit der Entdeckung dieses Prozesses 1986 durch Benne und Mitarbeiter, wurden die daran beteiligten Komponenten identifiziert und charakterisiert. Es wurden etwa 20 editingassoziierte Proteine beschrieben, dabei wurden enzymatische Kernaktivitäten wie Endo- und Exonuklease-Aktivität, TUTase-Aktivität und Ligase-Aktivität editosomalen Proteinen zugeordnet (zusammengefasst in Carnes und Stuart, 2008). Auch die am RNA-Editing beteiligten RNA-Komponenten wurden umfassend untersucht. Durch Sequenzierung des mitochondrialen Genoms wurden etwa 1200 potentielle gRNAs identifiziert (Souza et al., 1997; Souza und Göringer, 1998; Simpson, 1998; Ochsenreiter, 2006), durch Strukturanalysen konnte die für gRNAs typische Sekundärstruktur aufgeklärt werden (Schmid et al., 1995; Hermann et al., 1997).

Die Organisation der editosomalen Komponenten zu einem makromolekularen RNP-Komplex ist dagegen noch wenig erforscht. Bisherige Beschreibungen des Editosoms aus *T. brucei* basierten auf chromatographischen Methoden, Zentrifugationsverfahren oder auf Affinitätsreinigungen. Je nach Reinigungsprotokoll wurden Komplexe mit unterschiedlicher Protein- bzw. RNA-Zusammensetzung und unterschiedlichen Sedimentationsverhalten isoliert: Es wurde ein Komplex von apparenten 10 S beschrieben, der gRNA enthielt und eine TUTase- und RNA-Ligase-Aktivität aufwies (Peris et al., 1994; Peris et al., 1997). Es wurden Komplexe mit einem apparenten S-Wert von 20 S isoliert, die eine *in vitro* Editing-Aktivität zeigten, wenn kognate gRNA und prä-mRNA zugeführt wurden (Pollard et al., 1992; Seiwert et al., 1994; Kable et al., 1996). Diese Partikel bestanden aus mindestens sieben und bis zu 20 Proteinen und enthielten keine RNA (Rusché et al., 1997; Apasizhev et al., 2003; Panigrahi et al., 2001). Außerdem wurden Komplexe mit einem apparenten S-Wert von 35-40 S isoliert. Sie enthielten ebenfalls alle für die Katalyse einer *in vitro* RNA-Editing-Reaktion notwendigen Proteine, zusätzlich wurden prä-mRNAs assoziiert mit diesen Partikeln gefunden (Pollard et al., 1992; Corell et al., 1996; Madison-Antenucci et al., 2002).

In welcher Beziehung diese Komplexe zueinander stehen, ist bisher nicht bekannt. Es ist z.B. noch nicht geklärt, ob die Insertions- und die Deletionsreaktion von unterschiedlichen Multienzymkomplexen oder von einem Komplex mit zwei Reaktionszentren katalysiert werden. Auch dynamische Aspekte wie die Assemblierung oder Dissoziation des Editosoms sind nicht untersucht. Es ist bekannt, dass in unterschiedlichen funktionalen Stadien der Reaktion unterschiedliche Enzymaktivitäten benötigt werden und dass einige editingassoziierte Proteine nur temporär an das Editosom gebunden vorliegen. Bisher konnte aber noch nicht geklärt werden, ob akzessorische Komponenten mit einem katalytischen Kernkomplex dynamisch interagieren, oder ob der Komplex aus verschiedenen Untereinheiten besteht, die dynamisch miteinander interagieren.

## **4.1 Isolierung und biochemische Charakterisierung von Editosomen in unterschiedlichen funktionalen Stadien der RNA-Editing-Reaktion**

### **4.1.1 Experimentelle Vorgehensweise**

In dieser Arbeit wurden Editosomen unter nativen Bedingungen isoliert. Im ersten Schritt wurden aus prozyklischen Trypanosomen der transgenen TAP-Zelllinien mitochondriale Vesikel isoliert. Hierbei erfolgte die Zellyse unter isotonischen Bedingungen durch Stickstoff-Kavitation (Hauser et al., 1996). Frühere Protokolle zur Präparation mitochondrialer Vesikel basierten auf hypotonischer Zellyse (Braly et al., 1975) und führten zur Gewinnung von mitochondrialen Vesikeln, die zwar editingaktiv waren (Harris et al., 1990), aber kein Membranpotential über die innere mitochondriale Membran besaßen. Das Vorhandensein eines intakten Membranpotentials ist von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der natürlichen Salzkonzentrationen und konnte nur für mitochondriale Vesikel, die unter isotonischen Bedingungen isoliert wurden, nachgewiesen werden. Für diese wurde gezeigt, dass ein Import von Proteinen über die mitochondrialen Membranen in die Mitochondrienmatrix stattfindet (Hauser et al., 1996), was nur bei einem bestehenden elektrochemischen Potential über die innere Mitochondrienmembran möglich ist (Gasser et al., 1982).

Die mitochondrialen Vesikel wurden unter Verwendung eines nichtionischen Detergenz lysiert, und aus dem ML wurden Editosomen unter physiologischen Bedingungen durch TAP isoliert. Hierzu wurde der TAP-*tag* carboxyterminal an die Sequenz der Zielgene fusioniert, da es sich bei den editosomalen Komponenten um kernkodierte Proteine handelt, die über eine aminoterminal Importsequenz ins Mitochondrium transportiert werden. Die Integration der TAP-Konstrukte ins Genom erfolgte über homologe Rekombination in die transkriptionsinaktiven rDNA-*Spacer*. Die Expression der TAP-Fusionsproteine erfolgte über den gut untersuchten PARP-Promotor (Sherman et al., 1991; Brown et al., 1992), dessen Aktivität über zwei nachgeschaltete Tet-Operatoren kontrolliert werden konnte. Diese ektopische Expression der TAP-Fusionsproteine hatte den Nachteil, dass die TAP-Varianten neben den Wildtyp-Proteinen exprimiert wurden. Dies hatte zum einen zur Folge, dass das Expressionsniveau der editosomalen Komponenten in der Zelle verändert wurde, was möglicherweise einen Einfluss auf die Assemblierung der Editosomen hatte. Zum anderen enthielt ein Teil der Editosomen die Wildtyp-Variante der Zielproteine und war somit für die TAP nicht zugänglich.

Die Proteinzusammensetzung der isolierten Editosomen wurde durch MALDI-ToF-Analysen untersucht. Hierzu wurde das TAP-Eluat durch SDS-PAGE separiert und die nach einer Silberfärbung sichtbaren Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten. Proteine die in Mengen isoliert wurden, die unterhalb der Detektionsgrenze einer Silberfärbung liegen, wurden nicht identifiziert. Nur die Ligasen TbMP52 und TbMP48 konnten durch radioaktive Markierung auch in geringeren Mengen im TAP-

Eluat nachgewiesen werden. Da Ligasen durch die kovalente Bindung von AMP aktiviert werden, können sie durch die Inkubation mit  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP radioaktiv markiert werden. Das Ergebnis der Autoadenylierung zeigte, dass Proteine, die massenspektrometrisch nicht identifiziert wurden, durch sensitivere Detektionsmethoden nachgewiesen werden konnten. Im Eluat der TbMP42- bzw. mHel61p-TAP wurde jeweils nur eine der Ligasen durch MALDI-ToF identifiziert, durch Autoadenylierung konnte aber das Vorhandensein beider Ligasen nachgewiesen werden. Die Stöchiometrie der Ligasen im TAP-Eluat konnte durch die Autoadenylierung nicht bestimmt werden. TbMP52 zeigte zwar meist ein stärkeres Signal als TbMP48, dies deutete aber nicht unbedingt auf ein höheres Expressionsniveau hin. Dass TbMP52 stärker nachweisbar ist, ist beschrieben (Gao und Simpson, 2003; Panigrahi et al., 2003). Da die Ligasen unterschiedliche Funktionen ausüben (Schnauffer et al., 2003) ist es wahrscheinlich, dass sich der Adenylierungszustand der beiden Ligasen *in vivo* unterscheidet.

Zur Analyse des NS-Gehalts wurden die mit den Editosomen assoziierten RNAs isoliert und radioaktiv markiert. Zum einen wurden die RNAs mit PNK in Anwesenheit von  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-ATP inkubiert. PNK katalysiert die Übertragung der  $\gamma$ -Phosphatgruppe von ATP auf die terminale 5'-Hydroxylgruppe von NS (Richardson, 1971) und markiert sowohl mRNAs als auch gRNAs. Zum anderen wurden gRNAs durch die Inkubation mit GT in Anwesenheit von  $\alpha$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-GTP nachgewiesen. gRNAs sind Primärtranskripte, die selektiv durch GT markiert werden können, da GMP von GTP auf Di- oder Triphosphat-Enden transferiert wird (Moss und Koczo, 1976).

Die Editing-Aktivität der Eluate wurde durch *in vitro Assays* überprüft (Igo et al., 2000). Hierbei wurde die gRNA-vermittelte Prozessierung einer synthetischen prä-mRNA untersucht. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten *precleaved Assays* handelt es sich um die Weiterentwicklung eines Insertions-Editing-*Assays* (Kable und Seiwert, 1996). Die Ausbeute an editierter mRNA war in diesem *Assay* gering da der erste Schritt der Editing-Reaktion, die Hydrolyse der prä-mRNA durch eine Riboendonuklease, ineffizient war. Bei den *precleaved Assays* wird die prä-mRNA in zwei Fragmenten zugegeben, die der bereits hydrolysierten prä-mRNA entsprechen. Die Ausbeute an editiertem Produkt konnte auf diese Weise von zehn auf 40 % der Ausgangsmenge an uneditierter prä-mRNA erhöht werden. Durch die verwendeten *in vitro Assays* ließ sich nur die Katalyse eines einzelnen RNA-Editing-Zyklus` nachweisen, d. h. es wurde nur auf das Vorhandensein von Kernaktivitäten, wie TUTase- oder Ligase-Aktivität getestet, da akzessorische Komponenten wie Helikasen für die Katalyse eines einzelnen Reaktions-Zyklus` nicht benötigt werden. Erst kürzlich wurde ein *in vitro* System etabliert, durch das sich die Katalyse aufeinanderfolgender Deletions-Ereignisse nachweisen lässt (Alatortsev et al., 2008).

Das Sedimentationsverhalten der isolierten Partikel wurde durch die Bestimmung von apparenten S-Koeffizienten analysiert. Hierzu wurde das TAP-Eluat durch isokinetische Ultrazentrifugation in linearen GG fraktioniert. Zur Detektion kleinster Proteinmengen wurden die Editosomen durch Iodierung der Tyrosin-Reste mit  $^{125}\text{I}$  radioaktiv markiert. Die Glyzerinkonzentration der Fraktionen wurde durch die

Messung der Brechungsindizes bestimmt. Eine Standardisierung der GG wurde durch die Fraktionierung von Molekülen bekannter S-Werte vorgenommen.

#### 4.1.2 Biochemische Charakterisierung von frühen Editosomen

gBP21 ist ein RNA-bindendes Protein, das als *matchmaker* an der Hybridisierung von gRNA und prä-mRNA zu Beginn eines RNA-Editing-Zyklus beteiligt ist (Köller et al.; 1997; Müller et al. 2001). Es wurde postuliert, dass die Hybridisierung der RNAs von einem MRP-Komplex katalysiert wird, dessen Kopplung an das Editosom über eine RNA-Brücke erfolgt (Simpson et al., 2004). In *Leishmania tarentolae* konnte durch RNA-*crosslink*-Experimente ein stabiler 100 kDa-Komplex bestehend aus je zwei Kopien der RNA-Bindeproteine Ltp28 und Ltp26, dem gBP21- und dem gBP25-Ortholog aus *T. brucei*, isoliert werden. Durch TAP des gBP21-Orthologs Ltp28 in *Leishmania tarentolae* konnte gezeigt werden, dass der MRP Komplex mit weiteren editosomalen Komponenten wie den Ligasen, der TUTase sowie mit gRNA interagiert (Apasizhev et al., 2003). Aus Gesamtzelllysat von *T. brucei* konnte ein heterotetramerer Komplex aus je zwei Kopien von gBP21 und gBP25 gebunden an gRNA kristallisiert werden (Schumacher et al., 2006).

In dieser Arbeit wurden frühe Editosomen aus ML von *T. brucei* durch TAP von gBP21 isoliert. Hierzu konnte keine TAP mit konsekutiver IgG- und Cal-Affinitätsreinigung durchgeführt werden. Die Bindung der gBP21-TAP-Komplexe aus dem ML war sowohl an die IgG als auch an die Cal-Matrix möglich, aber es erfolgte keine Bindung der TAP-Komplexe an die Cal-Matrix nach erfolgtem Verdau mit der TEV Protease (Daten nicht gezeigt). Der TAP-*tag* hat mit 21 kDa dieselbe Größe wie gBP21. Vermutlich kam es nach der Abspaltung des Protein A-Teils des TAP-*tags* zur Umfaltung des Proteins. Dies führte möglicherweise dazu, dass der CBP-Teil des *tags* nicht für die Bindung an die Cal-Matrix zugänglich war. Aus diesem Grund wurden bei der gBP21-TAP die Affinitätsreinigungsschritte in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt.

Die Bestimmung des apparenten S-Werts der unter physiologischen Bedingungen isolierten Partikel ergab, dass gBP21 unter *steady state*-Bedingungen in der Zelle hauptsächlich als Bestandteil eines 20 S Komplexes mit einer Größe von 20x15 nm vorliegt. gBP21 konnte aber auch weniger häufig assoziiert mit einem 40 S Partikel der Größe 20x20 nm nachgewiesen werden. Im Eluat der gBP21-TAP wurden mindestens elf editosomale Proteine, gRNA und mRNA nachgewiesen. Unter den identifizierten Proteinen befanden sich für die Katalyse der RNA-Editing-Reaktion wichtige Kernaktivitäten, wie Exonukleasen und Ligasen, gBP25 wurde im TAP-Eluat nicht identifiziert. Entweder liegt gBP25 unter *steady state*-Bedingungen im Mitochondrium nicht gebunden an gBP21 vor, oder es konnte aufgrund einer geringen Proteinmenge im TAP-Eluat oder der bei der gBP21-TAP beobachteten Proteindegradation nicht nachgewiesen werden. Möglich ist auch, dass gBP25 ein ähnliches Laufverhalten aufwies wie die in großen Mengen im TAP-Eluat enthaltene

30 kDa große TEV-Protease, und wegen der geringeren Menge im Proteingemisch über MALDI-ToF nicht identifiziert werden konnte.

Eine *in vitro* RNA-Editing-Aktivität konnte nur für das Eluat des ersten Reinigungsschrittes der gBP21-TAP gezeigt werden. Schon frühere Experimente zeigten, dass durch eine einstufige Affinitätsreinigung mit einem gBP21-spezifischen Antikörper editingkompetente Multienzymkomplexe isoliert werden konnten (Allen et al., 1998). Nach dem zweiten Reinigungsschritt der gBP21-TAP konnte keine Editing-Aktivität festgestellt werden, beim zweiten Reinigungsschritt gingen für die Aktivität wichtige Komponenten verloren, die möglicherweise nur durch schwache Interaktionen mit den frühen Editosomen assoziiert waren.

#### 4.1.3 Biochemische Charakterisierung von funktionalen Editosomen

Editosomen, die sich in der Prozessierungsphase der RNA-Editing-Reaktion befinden, wurden in dieser Arbeit durch die TAP der Endo/Exonuklease TbMP42 isoliert. Neben TbMP42 sind weitere am RNA-Editing beteiligte Nukleasen beschrieben. Für die Proteine TbMP99 und TbMP100 konnte *in vitro* eine Exonuklease-Aktivität nachgewiesen werden (Kang et al., 2005; Rogers et al., 2007) Für TbMP90 konnte gezeigt werden, dass es als Endonuklease im Deletions-Editing agiert, TbMP61 agiert als Endonuklease im Insertions-Editing (Carnes et al., 2005; Trotter et al., 2005). Für eine dritte Endonuklease TbMP67 wurde postuliert, dass sie ausschließlich für die endonukleolytische Spaltung der prä-mRNA der Cytochromoxidase Untereinheit 2 verantwortlich ist (Carnes et al., 2007). Es wurde bereits beschrieben, dass durch die TAP der Endonukleasen TbMP90, TbMP61 und TbMP67 drei editingaktive 20 S Komplexe isoliert werden konnten, die sich in ihrer Proteinzusammensetzung unterscheiden. In diesen Komplexen wurden durch MALDI-ToF-Analysen zwölf bis 15 editosomale Komponenten, darunter Exonukleasen, Ligasen, und die TUTase identifiziert. Auffällig war, dass in diesen Komplexen jeweils nur die Endonuklease, die mit dem TAP-*tag* fusioniert war gefunden wurde, die Endo/Exonuklease TbMP42 dagegen als Komponente aller isolierten Partikel nachgewiesen wurde (Panigrahi et al., 2006). Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass durch die TAP von TbMP42 Komplexe mit unterschiedlicher Proteinkomposition isoliert werden.

In dieser Arbeit wurden durch die TAP von TbMP42 RNP-Partikel bestehend aus mRNA, gRNA und mindestens 13 editosomalen Proteinen isoliert, die *in vitro* sowohl eine Insertions- als auch eine Deletions-Aktivität zeigten. Die massenspektrometrischen Analysen ergaben, dass Editosomen, die TbMP42 enthielten, ebenfalls die Nukleasen TbMP100, TbMP99, TbMP90, TbMP67 und TbMP61 aufwiesen. Weitere für die Katalyse der RNA-Editing-Reaktion wichtige Kernaktivitäten wie die TUTase TbMP57 und die Ligase TbMP52 wurden ebenfalls identifiziert. Die zweite Ligase TbMP48 wurde massenspektrometrisch nicht nachgewiesen, aber durch Autoadenylierung detektiert. Die Fraktionierung des TbMP42-TAP-Eluats im isokinetischen Dichtegradient zeigte, dass Editosomen die

TbMP42 enthielten in zwei Subpopulationen mit apparenten S-Werten von 20 S und 40 S vorlagen.

#### **4.1.4 Biochemische Charakterisierung von späten Editosomen**

Durch die TAP von mHel61p sollten Editosomen in der Terminationsphase eines RNA-Editing-Zyklus' isoliert werden. Die putative RNA-Helikase mHel61p ist vermutlich nach erfolgter Katalyse der Reaktion aktiv, da die Editing-Aktivität von mHel61p-Nullmutanten nicht beeinflusst ist (Missel et al., 1997). Von mHel61p wurde gezeigt, dass es als akzessorisches Protein nur transient an das Editosom bindet. Der Großteil an mHel61p wurde als freies Protein im Mitochondrium nachgewiesen, nur ein kleiner Teil wurde gebunden an einen 20 S Komplex identifiziert (Missel et al., 1997).

In dieser Arbeit konnte durch die Fraktionierung später Editosomen im isokinetischen Dichtgradient gezeigt werden, dass mHel61p sowohl gebunden an 20 S als auch an 40 S Editosomen vorliegt. Die durch die mHel61-TAP isolierten Komplexe zeigten *in vitro* keine Editing-Aktivität, dem Terminations-Komplex fehlen wichtige Enzymaktivitäten für die Katalyse der RNA-Editing-Reaktion. Im mHel61p-TAP-Eluat wurden durch Massenspektrometrie und Autoadenylierung die Endo- und Exonukleasen und die Ligasen nachgewiesen, die TUTase wurde nicht detektiert. Assoziiert mit mHel61p wurden durch radioaktive Markierung mRNA und gRNA nachgewiesen. Auffällig war, dass ebenfalls eine Vielzahl an RNA-Bindeproteinen identifiziert wurde. Es wurde das RNA-Bindeprotein TbMP18 gefunden, das eine wichtige Rolle für die Integrität der 20 S Editosomen spielt (Tarun et al., 2008). Es wurden RBP16 und RBP38 detektiert, die sowohl an gRNA und mRNA binden und diese stabilisieren (Hayman und Read, 1999; Pelletier et al., 2000; Sbicego et al., 2003). Außerdem wurde REAP1 gefunden, von dem vermutet wird, dass es hauptsächlich in der Initiationsphase der RNA-Editing-Reaktion aktiv ist, da es bevorzugt an prä-mRNA bindet (Madison-Antenucci und Hajduk, 2001).

#### **4.1.5 Zusammenfassung**

Die biochemische Analyse von in unterschiedlichen funktionalen Stadien der RNA-Editing-Reaktion isolierten Komplexen zeigte, dass es sich beim Editosom um einen dynamischen Partikel handelt, der während eines RNA-Editing-Zyklus' in seiner Proteinzusammensetzung variiert. Einige editosomale Proteine wurden assoziiert mit frühen, funktionalen und späten Editosomen identifiziert, hierbei handelte es sich hauptsächlich um Proteine die Kernaktivitäten katalysieren oder für die Integrität des Komplexes eine wichtige Rolle spielen. Diese Proteine scheinen einen Kern-Komplex zu bilden, an den akzessorische Proteine, wie z.B. RNA-Bindeproteine oder Helikasen nur zu einem definierten Zeitpunkt eines RNA-Editing-Zyklus binden. Eine *in vitro* Editing-Aktivität zeigten nur Editosomen die durch TAP von TbMP42 in der Prozessierungsphase isoliert wurden. Komplexe die sich in der Initiations- oder der

Terminationsphase befanden enthielten nicht alle zur Katalyse der Reaktion benötigten Proteinkomponenten.

In allen drei funktionalen Stadien wurden zwei Subpopulationen des Editosoms mit apparenten 20 S und 40 S gefunden. Möglicherweise handelt es sich beim 20 S Editosom um den stabilen Kernkomplex, der durch temporäre Bindung zusätzlicher Proteine oder RNAs zum 40 S Editosom konvertiert wird.

## 4.2 Visualisierung funktionaler Editosomen durch TEM

### 4.2.1 Experimentelle Vorgehensweise

Durch TEM wurden die durch die TbMP42-TAP isolierten funktionalen Editosomen visualisiert und strukturell analysiert. Elektronenmikroskopische Verfahren bieten im Vergleich zur Röntgenkristallographie den Vorteil, auch bei heterogenen Proben von geringer Konzentration angewendet werden zu können (Crowther und Prasad, 2004). Die Röntgenkristallographie wurde in der Vergangenheit zwar häufig zur Analyse makromolekularer Komplexe verwendet, wie die 3D-Strukturaufklärung des Ribosoms zeigte (Yusupov et al., 2001), es ist aber schwierig, Kristalle in ausreichender Menge und Qualität zu erhalten. Das Ribosom liegt in einer hohen Kopienzahl in der Zelle vor und kann in ausreichenden Mengen isoliert werden. Das Editosom ist in deutlich niedrigerer Kopienzahl in der Zelle vertreten, die großen Probenmengen und hohen Probenkonzentrationen, die für die Röntgenkristallografie benötigt werden können nicht hergestellt werden. Ein weiterer Vorteil der Strukturanalyse durch TEM ist die schnelle und einfache Art der Probenpräparation, durch die auch instabile makromolekulare Komplexe analysiert werden können. Die schnelle Fixierung von Strukturen wie sie unter physiologischen Bedingungen existieren, ermöglicht Momentaufnahmen von dynamischen Prozessen.

Die Einzel-Partikel-Rekonstruktion von makromolekularen Komplexen aus TEM-Aufnahmen wird mittels RCT durchgeführt (Radermacher, 1989). Hierbei wird aus tausenden von zweidimensionalen Projektionsbildern, aufgenommen aus unterschiedlichen Orientierungen, die dreidimensionale Struktur eines Partikels berechnet. Das Problem bei der Strukturanalyse der editosomalen Komplexe bestand darin, dass es sich bei den 20 S bzw. 40 S Fraktionen der TbMP42-TAP um heterogene Partikelpopulationen handelte. Biochemische Untersuchungen von Editosomen in der Prozessierungsphase der RNA-Editing-Reaktion zeigten, dass die Proteinzusammensetzung der Partikel variiert (Panigrahi et al., 2006). Aus diesem Grund wurde die RCT-Methode mit einem *maximum likelihood*-Ansatz kombiniert. Zusätzlich wurde eine Variabilitäts-Analyse ausgehend von den 3D-RCTs der einzelnen KS durchgeführt.

#### **4.2.2 Berechnung einer 3D-Konsensusstruktur von funktionalen 20 S Editosomen**

Durch die Einzel-Partikel-Rekonstruktion mittels RCT wurde aus TEM Aufnahmen von 20 S Editosomen aus drei unabhängigen Präparationen ein 3D-Konsensusmodell mit einer Auflösung von 2,1-2,4 nm erstellt. Durch bioinformatische Verfahren wurde für das 3D-Modell eine Größe von 21x15,5x17,4 nm, und ein Molekulargewicht von 800±80 kDa berechnet. Der S-Wert wurde auf 21-26 S bestimmt und bestätigte das Ergebnis der experimentellen Bestimmung des apparenten S-Koeffizienten durch isokinetische Dichtegradientenzentrifugation. Das 3D-Konsensusmodell zeigt ein Partikel mit einer elongierten, leicht gekrümmten Form. Es besteht aus zwei Subdomänen ähnlicher Größe, die über eine schmale Brücke verbunden sind. Die Verbindungsstelle zwischen den beiden Subdomänen weitet sich an gegenüberliegenden Seiten in den "Arm" und eine dreieckige Protuberanz aus. Beim 20 S Editosom scheint es sich nicht um ein Homodimer zu handeln. Die obere Subdomäne ist globulär, die untere Subdomäne ist im Vergleich schmaler und elongiert, außerdem unterscheiden sich die beiden Subdomänen in feinstrukturellen Details. Die Organisation des 20 S Komplexes in zwei Subdomänen könnte auf eine strukturelle Unterteilung in einen Insertions- und einen Deletions-Subkomplex hindeuten. Biochemische Charakterisierungen der editosomalen Proteine zeigten, dass für die RNA-Editing-Reaktion wichtige Enzymaktivitäten meist durch zwei Proteine katalysiert werden. Es wurden z.B. zwei Ligasen, zwei Endonukleasen und zwei Exonukleasen identifiziert, die jeweils eine Präferenz für die Katalyse des Insertion- oder des Deletions-Editings zeigten (Schnauffer et al., 2003; Carnes et al., 2005; Trotter et al., 2005; Kang et al., 2005; Rogers et al., 2007). Auch ein *two-hybrid*-Experiment deutete auf die Organisation des Editosoms in zwei Subkomplexe hin. Es konnte eine Interaktion zwischen den für das Deletions-Editing benötigten Proteinen, der Ligase TbMP52, der Endonuklease TbMP63 und der Exonuklease TbMP99, gezeigt werden. Ebenfalls wurde die Interaktion der für das Insertions-Editing benötigten Ligase TbMP48 mit der TUTase und TbMP81 nachgewiesen (Ernst et al., 2003; Schnauffer et al., 2003).

#### **4.2.3 Variabilitäts-Analyse der 20 S Population**

Die biochemischen Analysen von Editosomen, die in der Prozessierungsphase des RNA-Editing-Zyklus isoliert wurden, deuteten darauf hin, dass es sich um eine heterogene Population von Komplexen mit variierender Proteinzusammensetzung handelt (Panigrahi et al., 2006). Die Heterogenität der durch TbMP42-TAP isolierten 20 S Population zeigte sich bereits in den TEM-Aufnahmen und spiegelte sich auch in den 2D-KS wider. Aus diesem Grund wurde der Berechnung des 3D-Konsensusmodells eine Variabilitäts-Analyse der individuellen 3D-RCT-Strukturen durch MSA angeschlossen. Die Variabilitäts-Analyse klassifizierte die Partikel der 20 S Fraktion in vier 3D-Subgruppen. Der Vergleich der Substrukturen ließ

vermuten, dass es sich bei den vier Substrukturen um denselben Komplex mit unterschiedlichen zusätzlichen Strukturelementen handelte. Subgruppe 1 enthielt Partikel mit der typischen Unterteilung in die zwei globulären Subdomänen, Partikel aus Subgruppe 2 zeigten zusätzlich ein auf die Zwischenregion aufgelagertes "Rücken"-Element. Subgruppe 3 enthielt Komplexe mit einer schmaleren, gestreckteren Form, Partikel aus Subgruppe 4 wiesen eine weitere Protuberanz im Bereich der Zwischenregion auf. Das Ergebnis der Variabilitäts-Analyse verdeutlichte, dass funktionale 20 S Editosomen unter *steady state*-Bedingungen in unterschiedlichen Assemblierungszuständen vorliegen. 20 S Editosomen scheinen aus einer stabilen Kernstruktur, den beiden miteinander verbundenen globulären Subdomänen, zu bestehen. Bei der "Rücken"-Domäne scheint es sich um ein variables Element zu handeln, das durch die temporäre Bindung editingassoziierter Komponenten in seiner Größe und Struktur variiert.

#### **4.2.4 Berechnung der 3D-Konsensusstruktur von funktionalen 40 S Editosomen**

Aus TEM Aufnahmen der 40 S Populationen dreier unabhängiger Präparationen wurde durch RCT ein 3D-Konsensusmodell erstellt. Das 40 S Editosom besteht aus einer konvexen, elongierten Plattform, die sich an gegenüberliegenden Seiten zu zwei globulären Domänen, dem "Kopf" und dem "Fuß" ausweitet. Eine weitere kleinere Protuberanz ist in der Nähe des "Fußes" lokalisiert. Auf die Plattform ist eine runde, asymmetrische Domäne, der "Rücken", aufgelagert, die sich an einer Seite zur "Schulter" ausweitet. Zur Verfeinerung der RCT-Struktur wurde eine Kryo-TEM durchgeführt. Der Vorteil des Gefrierverfahrens besteht darin, dass der native, hydratisierte Zustand des Objekts erhalten bleibt, was zur Abbildung feinerer Strukturdetails führt. Um das zu erreichen, wurden die Proben im Bruchteil einer Sekunde auf Temperaturen unter  $-130^{\circ}\text{C}$  gebracht, wodurch die Bildung von Eiskristallen verhindert wurde. Die Kryo-TEM-Struktur erreichte eine Auflösung von 1,6-2,4 nm und bestätigte das Vorhandensein der strukturellen Elemente der RCT-Struktur. Außerdem sind zusätzliche Details zu erkennen: die Plattform sowie der "Rücken" bestehen aus einem dichten Netzwerk aus Einzelelementen, die über multiple Kontakte verknüpft sind. Bioinformatische Verfahren berechneten für die Kryo-TEM-Struktur eine Größe von  $26,5 \times 20 \times 17,5$  nm und ein Molekulargewicht von  $1,45 \pm 0,15$  MDa. Der S-Wert wurde auf 35-41 S berechnet und bestätigte das Ergebnis der experimentellen apparenten S-Wert-Bestimmung. Möglicherweise deuten auch die für die 40 S Population charakteristischen "Kopf"- und "Fuß"-Domänen auf eine strukturelle Unterteilung in einen Insertions- und einen Deletions-Subkomplex hin.

#### **4.2.5 Variabilitäts-Analyse der 40 S Population**

Auch die Variabilitäts-Analyse der 40 S Population spiegelt die strukturelle Heterogenität der durch TbMP42-TAP isolierten Partikel wider. Die Variabilitäts-Analyse ergab sechs unterschiedliche 3D-Substrukturen. Vier der sechs Substrukturen wiesen alle strukturellen Charakteristika des 3D-Konsensusmodells auf und machten ~80 % der Gesamtpartikel aus. Wahrscheinlich handelte es sich bei den Subgruppen 1-5 um 40 S Editosomen in unterschiedlichen Assemblierungszuständen. Alle Partikel zeigten die in den "Kopf" und "Fuß" auslaufende Plattform mit dem aufgelagerten "Rücken" und unterschieden sich allein durch die Breite des "Rücken"-Elements. Partikel der Subgruppe 1 zeigten ebenfalls alle strukturellen Charakteristika mit Ausnahme des "Rücken"-Elements. Nur Partikel der Subgruppe 6 zeigten keine der typischen Struktureigenschaften, hierbei handelte es sich möglicherweise um eine Kontamination mit anderen Partikeln oder um zerfallene Editosomen. Das Ergebnis der Variabilitäts-Analyse ergab, dass es sich bei der Plattform-Struktur um ein stabiles Kernelement der 40 S Editosomen handelt. An diese Plattform scheinen temporär editosomale Komponenten zu binden und eine "Rücken"-Struktur mit unterschiedlicher Zusammensetzung und unterschiedlichem Ausmaß zu bilden.

#### **4.2.6 Zusammenfassung**

Die strukturelle Analyse von funktionalen 20 S und 40 S Populationen ergab, dass Editosomen in der Prozessierungsphase der RNA-Editing-Reaktion in unterschiedlichen Assemblierungsstadien vorlagen. Sowohl bei der 20 S als auch bei der 40 S Fraktion handelte es sich um eine heterogene Population aus Partikeln, die gemeinsame strukturelle Charakteristika aufwiesen, aber in einigen strukturellen Details variierten. Beide Partikel scheinen aus einem stabilen Kernkomplex zu bestehen, an den akzessorische Komponenten temporär binden und zu einer funktionellen und strukturellen Variabilität innerhalb der 20 S und 40 S Subpopulation führen.

### **4.3 Biochemische Charakterisierung von funktionalen 20 S und 40 S Editosomen**

#### **4.3.1 Experimentelle Vorgehensweise**

Zur Fraktionierung der durch TbMP42-TAP isolierten funktionalen Editosomen in die 20 S bzw. 40 S Subpopulationen wurden isokinetische Ultrazentrifugationen in linearen GG durchgeführt. Da nur geringe Mengen an 20 S und 40 S Editosomen isoliert werden konnten, wurden zur Analyse der NS- bzw. Proteinzusammensetzung radioaktive Markierungsverfahren angewendet. NS, die mit den 20 S bzw. 40 S

Editosomen assoziiert waren, wurden mit PNK bzw. GT terminal mit  $^{32}$ Phosphor markiert (Richardson, 1971; Moss und Koczot, 1976). Zur Detektion kleinster Proteinmengen wurde eine Iodierung von Tyrosin-Reste mit  $^{125}$ Iod nach dem Verfahren von Hunter und Greenwood durchgeführt (Hunter und Greenwood, 1962).

Die RNA-Bindung an die 20 S Subpopulation wurde zum einen durch SPR-Messungen analysiert. Diese Methode hat den Vorteil, dass Molekül-Interaktionen in Echtzeit verfolgt werden können, und dass sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage über die Interaktion getroffen werden kann. Der  $K_d$  für die Interaktion von editingassoziierten RNAs mit 20 S Editosomen konnte über dieses Verfahren bestimmt werden.

Außerdem wurde die Bindung der RNA an 20 S Editosomen visualisiert. Hierzu wurden die an die 20 S Editosomen gebundenen RNAs mit Streptavidin-Goldpartikeln markiert, und die markierten RNP-Partikel anschließend durch TEM analysiert. Mit dieser Methode konnte die Anzahl der RNA-Bindestellen bestimmt werden.

### **4.3.2 Analyse des NS-Anteils und der Proteinkomposition**

Die Separation radioaktiv markierter 20 S und 40 S Fraktionen der TbMP42-TAP durch SDS-PAGE ergab ein ähnliches Bandenmuster. Es scheinen nur wenige Unterschiede auf Proteinebene zu bestehen. Diese Hypothese wurde durch die bioinformatische Analyse der 3D-Strukturen gestützt. Das Molekulargewicht des 20 S Konsensusmodells wurde auf  $800 \pm 80$  kDa bestimmt. Addiert man das Molekulargewicht der im TbMP42-TAP-Eluat durch MALDI-ToF und Autoadenylierung identifizierten Proteine erhält man ein Molekulargewicht von 726 kDa. Geht man davon aus, dass die identifizierten Proteine mit jeweils einer Kopie im Editosom vorliegen, ist das errechnete Molekulargewicht der 20 S Konsensusstruktur erreicht. Der Hauptunterschied zwischen 20 S und 40 S Editosomen scheint also auf RNA-Ebene zu bestehen. Das Molekulargewicht der 40 S Partikel wurde auf  $1,45 \pm 0,15$  MDa bestimmt. Die Differenz im Molekulargewicht von 20 S und 40 S Editosomen beträgt also 650 kDa, das entspricht dem Molekulargewicht einer RNA mit einer Länge von 2 Kbp.

Durch radioaktive Markierungsverfahren wurde gezeigt, dass die Menge an Gesamt-RNA in der 40 S Fraktion um den Faktor vier bis zehn höher ist als in der 20 S Fraktion. gRNA konnte nur assoziiert mit 40 S Editosomen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde durch einen RNase-Verdau bestätigt. Der Verdau der endogenen RNA mit einzel- und doppelstrangspezifischen RNasen führte zum Zerfall der 40 S Population, während die 20 S Fraktion stabil blieb. Der RNA-Anteil der 40 S Partikel scheint also eine wichtige Rolle für die Integrität des Komplexes zu spielen. Die biochemische Analyse deutete darauf hin, dass die 20 S Editosomen durch Bindung von mRNA und gRNA in 40 S Editosomen konvertieren, d.h. dass 20 S Editosomen ein Assemblierungsstadium der 40 S Editosomen darstellen. Allerdings

konnten 40 S Editosomen durch den Verdau der endogenen RNA nicht in 20 S Editosomen konvertiert werden. Es muss zu einer strukturellen Umordnung kommen, da 40 S Editosomen durch den Verlust der RNA in monomere Proteine oder Komplexe mit geringem S-Wert zerfallen.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass 20 S Editosomen durch die Bindung zusätzlicher Komponenten in 40 S Editosomen konvertieren, wurden die 3D-Strukturen der 20 S und 40 S Partikel auf strukturelle Gemeinsamkeiten überprüft. Die Dimension der Plattform des 40 S Komplexes stimmt mit der Gesamtgröße der 20 S Partikel überein. Diese Plattform der 40 S Editosomen läuft in zwei globuläre Domänen den "Kopf" und den "Fuß" aus, während der 20 S Komplex aus zwei miteinander verbundenen globulären Untereinheiten besteht. Um festzustellen, ob die 20 S 3D-Struktur in das 40 S 3D-Modell integriert werden kann, wurde ein 3D-*Alignment* durchgeführt. Das *Alignment* zeigte, dass die Überlagerung der globulären Untereinheiten des 20 S Partikels mit der "Kopf"- und "Fuß"-Domäne des 40 S Komplexes ebenfalls zu einer Überlagerung der "Arm"-Struktur des 20 S Editosoms mit einer ähnlich geformten Protuberanz des 40 S Editosoms führt. Beim 20 S Editosom scheint es sich tatsächlich um einen Teil der Plattform des 40 S Editosoms und somit um ein Assemblierungsstadium des 40 S Editosoms zu handeln.

#### **4.3.3 Charakterisierung der RNA-Bindung an 20 S Editosomen**

Zur Charakterisierung der RNA-Editosom-Interaktionen wurden die Bindeeigenschaften von gRNA, mRNA und eines gRNA/mRNA-Duplex` an 20 S Editosomen durch SPR-Messungen analysiert. Hierzu wurden die RNAs auf der Detektoroberfläche immobilisiert und die Interaktion mit einer mitochondrialen 20 S Fraktion in Echtzeit beobachtet. Es zeigte sich, dass sowohl mRNA und gRNA als auch ein gRNA/mRNA-Duplex an 20 S Editosomen binden. In allen Fällen zeigte der Signalverlauf eine Bindung zwischen Ligand und Ligat, die nach 1-2 min eine Sättigung erreichte. Die maximale Bindung variierte um den Faktor zwei, der aus den SPR-Messungen errechnete  $K_d$  lag in allen Fällen im nanomolaren Bereich und variierte um den Faktor drei. Dieses Ergebnis deutete daraufhin, dass mRNA, gRNA und der gRNA/mRNA-Duplex mit derselben Bindestelle interagieren.

Um die RNA-Editosom-Interaktion zu visualisieren wurden an 20 S Editosomen gebundene RNAs mit Streptavidin-Goldpartikeln markiert und die RNP-Partikel durch TEM analysiert. Mit diesem Verfahren wurde bestätigt, dass sowohl mRNA und gRNA als auch ein gRNA/mRNA-Duplex an 20 S Editosomen binden. Die TEM-Analyse zeigte, dass 95-97 % der markierten RNP-Partikeln eine RNA-Bindestelle aufwiesen.

#### 4.3.4 Zusammenfassung

Die biochemischen und strukturellen Analysen der editosomalen Subpopulationen ließen vermuten, dass es sich bei 20 S Editosomen um Assemblierungsstadien der 40 S Editosomen handelt, und dass 20 S Editosomen durch Bindung von mRNA und gRNA in 40 S Editosomen konvertieren. Pro 20 S Editosom scheint es eine RNA-Bindestelle zu geben, an die sowohl mRNA und gRNA als auch ein gRNA/mRNA-Duplex mit einem  $K_d$  im nanomolaren Bereich binden.

#### 4.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass es sich beim Editosom um einen dynamischen Komplex handelt, der unter *steady state*-Bedingungen in unterschiedlichen funktionalen Stadien und unterschiedlichen Assemblierungszuständen in der Zelle vorliegt. Für die Katalyse des RNA-Editings in Trypanosomen scheinen also Komplexe mit großer funktionaler und struktureller Variabilität benötigt zu werden. Dies lässt sich eventuell durch einige in den letzten Jahren beschriebene Abweichungen vom basalen Reaktionsmechanismus erklären.

Möglicherweise werden Editosomen mit variierender Proteinzusammensetzung für das Editing unterschiedlicher Transkripte benötigt. Es wurde postuliert, dass die Endonuklease TbMP67 ausschließlich für die endonukleolytische Spaltung der prä-mRNA der Cytochromoxidase Untereinheit 2 verantwortlich ist (Carnes et al., 2007). Außerdem wurde gezeigt, dass das Editing dieses Transkripts in *cis* durch eine Sequenz in der 3'-*untranslated region* spezifiziert wird.

Ein weiterer interessanter Fakt ist, dass im Mitochondrium von Trypanosomen ein hoher Anteil an alternativ editierten RNAs nachgewiesen wurde. Es wurde postuliert, dass das RNA-Editing zur Erhöhung der Proteindiversität im Mitochondrium von Trypanosomen führt (Ochsenreiter und Hajduk, 2006; Ochsenreiter et al., 2008).

Um die genaue Funktion der unterschiedlich zusammengesetzten Editosomen untersuchen zu können, ist es nötig homogene Partikelpopulationen zu isolieren. Dies konnte durch die Affinitätsreinigung mit Proteinkomponenten, die in unterschiedlichen funktionalen Stadien der Reaktion aktiv sind, nicht erreicht werden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Editosomen in einem definierten Stadium der Reaktion "einzufrieren". Dies kann durch kleine Moleküle erreicht werden, die die RNA-Editing-Reaktion in einem spezifischen Reaktionsschritt inhibieren. Von einigen Molekülen ist bekannt, dass sie Reaktionen inhibieren die von RNP-Partikeln katalysiert werden. Aminoglykosid-Antibiotika z.B. inhibieren die Translation durch Bindung an die *A-site* innerhalb der 16 S rRNA und das Spleißing durch Bindung an Gruppe 1-Introns (Garvin et al., 1974; Moazed und Noller, 1987; v. Ahsen et al., 1991). Erste Experimente zeigten, dass auch die Editing-Reaktion durch Aminoglykosid-Antibiotika inhibiert werden kann (Brecht, persönliche Kommunikation).

## 5 Materialien

### 5.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

#### 5.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid (19:1; 40 %;w/v)	Roth
$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartman analytic
$\gamma$ -[ <sup>32</sup> P]-ATP (3000 Ci/mmol)	Hartman analytic
Ammoniumpersulfat (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Roth
Bleomycin	Calbiochem
Bradford-Reagenz	Biorad
BSA (Rinder-Serumalbumin, Fraktion V)	Biomol
ChloraminT	Acros
Fötales Kälberserum (FCS)	Sigma
$\alpha$ -[ <sup>32</sup> P]-GTP	Hartman analytic
Hämin	Sigma
Hygromycin B	Roche
Medium 199	Gibco BRL
MEM	Gibco BRL
MEM-Aminosäuren	Gibco BRL
MEM-nichtessentielle Aminosäuren	Gibco BRL
Natrium [ <sup>125</sup> I]-Iodid (50-200 mCi/mL)	Hartman analytic
Neomycin G418	Calbiochem
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth
Nonidet P-40 (NP40)	Roche
Penicillin/Streptomycin-Stammlösung	Gibco BRL
Percoll <sup>®</sup>	Amersham
Rotiszint <sup>®</sup>	Roth
SYPRO <sup>®</sup> -Orange	Molecular Probes
Tetrazyklin	Merck
Triton X-100	Roth
Stickstoff	Air Liquide
Vitamin-Mix	Gibco BRL

#### 5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
"ECL Advance Western Blotting Detection Kit"	Amersham
Glaskugeln (∅: 4 mm)	Sigma
Glaswolle	Merck
Geltrocknungsfolien	Promega
Grids für Elektronenmikroskopie (Cu)	Plano
IAsys Aminosilan-Küvetten	Neo-Sensors
"Micro Bio Spin P6 <sup>®</sup> "	Biorad
Pasteurpipetten	Volac
Plastikküvetten	Roth
Polyethylenimin-Platten	Schleicher und Schüll

Nitrozellulose-Membran	Biorad, Roth
Reaktionsgefäße (0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL)	Eppendorf, Sarstedt
Röntgenfilme	Kodak (Biomax MR)
Sephadex G-50	Sigma
Säulen für Plasmidpräparationen	Qiagen
Sterilfilter (0,22 µm + 0,45 µm)	Roth, Millipore
Streptavidingold (∅: 6 nm)	Aurion
Tropfdialysefilter (Nitrozellulose; 0,025 µm)	Millipore
Whatman 3 MM Papier	Whatman
Mikrotiterplatten	Nalge Nunc Int., Greiner
Zellkulturflaschen	IBS Integra, Sarstedt
Zentrifugenröhrchen	Greiner, Beckmann
„ZipTip“	Millipore

## 5.2 Enzyme und Inhibitoren

### 5.2.1 Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Roche
Guanylyl-Transferase	Gibco
DNase I	Sigma
DNase I/RNase-frei	Fermentas
Restriktionsendonukleasen	Roche, NEB, Fermentas
RNase T1	Fermentas
RNase A	Roth
T4-DNA-Ligase	Fermentas
T4-RNA-Ligase	Fermentas

### 5.2.2 Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
Leupeptin	Roche
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
RNasin (RNase-Inhibitor)	Promega
Trypsin Inhibitor	Roche

## 5.3 Organismen

### 5.3.1 Trypanosomen

<i>T. brucei</i> 29-13	Wirtz et al., 1999
<i>T. brucei</i> 427	Cross, 1975

### 5.3.2 Bakterien

*Escherichia coli* (*E.coli*) DH5 $\alpha$

Hanahan, 1983

### 5.4 Plasmide

pBS1479  
pBluescript II SK<sup>-</sup>  
pLew100

Rigaut et al., 1999  
Short et al., 1988  
Wirtz et al., 1999

### 5.5 Nukleinsäuren

#### 5.5.1 Oligodesoxyribonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendung
gBP21-5'	CCG CTC GAG ATG ATT CGA CTC GCA TGC CTG	Amplifizierung von gBP21
gBP21-3'	TGC TCT AGA ATG GTA TCG CGA TGT GTC ACT	Amplifizierung von gBP21
TbMP42-5'	CCG CTC GAG ATG AAG CGT GTT ACT TCA CAT ATT TCG	Amplifizierung von TbMP42
TbMP42-3'	TGC TCT AGA CAC CCT CAA CAC TGA CCC AAG CC	Amplifizierung von TbMP42
mHel61p-5'	CCG CTC GAG ATG AGG GCC CTG CGT TGT GTT AGG	Amplifizierung von mHel61p
mHel61p-3'	TGC TCT AGA CCA ACC ACT GTC ACG AGG TGC CGG	Amplifizierung von mHel61p

#### 5.5.2 Oligoribonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Verwendung
5'CL 18	GGA AGU AUG AGA CGU AGG	PIA
3'CL 13	AUU GGA GUU AUA G-NH <sub>2</sub>	PIA
gPC A6	CUA UAA CUC CGA UAA ACC UAC GUC UCA UAC UUC C	PIA
5'CI22	GGAAAGGGAAAGUUGUGAUUUU	PDA
3'CI15	GCGAGUUUAUAGAAUA-NH <sub>2</sub>	PDA
gA6[14]PC	GGU UCU AUA ACU CGC UCA CAA CUU UCC CUU UCC	PDA

## 5.6 Standardpuffer und Medien

Alle Lösungen, Puffer und Medien wurden mit entionisiertem Wasser angesetzt und für 20 min bei 121°C und 1 bar autoklaviert, sofern diese nicht thermisch instabil waren. Hitzelabile Lösungen wurden über Nitrozellulosefilter (Porendurchmesser: 0,22 µm) sterilfiltriert.

### 5.6.1 Puffer

<b>TE (pH 7,5/pH 8):</b>	10 mM	Tris-HCl
	1 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
<b>TBE (pH 8,3):</b>	80 mM	Tris-HCl
	80 mM	B(OH) <sub>3</sub>
	2,5 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
<b>Editingpuffer (pH 7,5):</b>	20 mM	HEPES-KOH
	30 mM	KCl
	10 mM	Mg(OAc) <sub>2</sub>
	5 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	DTT
<b>PBS (pH 7,3):</b>	0,43 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,14 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	13,7 mM	NaCl
	0,27 mM	KCl
<b>SDS-Laufpuffer:</b>	25 mM	Tris
	190 mM	Glyzerin
	0,1% (w/v)	SDS

### 5.6.2 Medien

#### LB-Medium:

Zur Kultivierung von Bakterien wurde das folgende Medium angesetzt. Der pH wurde mit NaOH auf 7,0 eingestellt und das Medium durch Autoklavieren sterilisiert.

<b>LB:</b>	1 % (w/v)	Bacto-Trypton
	0,5 % (w/v)	Bacto-Hefe-Extract
	1 % (w/v)	NaCl

#### SDM79-Medium: (*Semi Defined Medium*)

Zur Kultivierung von prozyklischen Trypanosomen wurde das folgende Medium angesetzt (Brun und Schönenberger, 1979). Der pH wurde mit NaOH auf 7,3 eingestellt und die Lösung steril filtriert (Nitrozellulosefilter, Porendurchmesser 0,22 µm). Es wurden 3 mL Hämin-Stammlösung (2,5 mg/mL in 50 mM NaOH; steril filtriert), 5 mL Penicillin/Streptomycin-Stammlösung (Endkonzentration: je 50 U/mL)

und 5-10 % FCS zugegeben. Das FCS wurde vor Verwendung 30 min bei 55°C hitzeinaktiviert. Die Lagerung des Mediums erfolgte bei 4°C.

pro Liter:	7 g	MEM
	2 g	Medium 199
	1 g	Glukose
	8 g	HEPES
	5 g	MOPS
	2 g	NaHCO <sub>3</sub>
	100 mg	Natriumpyruvat
	200 mg	L-Alanin
	100 mg	L-Arginin
	300 mg	L-Glutamin
	70 mg	L-Methionin
	80 mg	L-Phenylalanin
	600 mg	L-Prolin
	60 mg	L-Serin
	160 mg	L-Taurin
	350 mg	L-Threonin
	100 mg	L-Tyrosin
	10 mg	Adenosin
	10 mg	Guanosin
	50 mg	Glukosamin-HCl
	10 mL	Vitamin-Mix (100x)
	8 mL	MEM-Aminosäuren (50x)
	6 mL	MEM-nichtessentielle Aminosäuren (100x)

## 5.7 Geräte

### Gerät

Entwicklermaschine für Filme  
Elektronenmikroskop  
"Fluoro Image Analyzer  
FLA-5000"  
Geiger-Müller-Zähler  
Gelelektrophoresekammern  
Geltrockner  
"Gene Pulser"  
Gradientenmischer  
Kamera  
Mikroskop  
N<sub>2</sub>-Bombe zum Zellaufschluss  
Oberflächenplasmonresonanz-  
Gerät  
PCR- *Thermocycler*  
pH-Meter  
Refraktometer  
Rotoren:  
  
Spektrophotometer  
Szintillationszähler

### Hersteller

Agfa  
Philips CM200 FEG, Zeiss EM 109  
FujiFilm  
  
Berthold Technologies  
Biorad  
Appligene  
Biorad  
Eigenbau  
TVIPS TEMCam F415  
Zeiss Axioskop 2  
PARR  
IASys, Neo Sensors  
  
Biometra T3 Thermocycler  
Knick  
A. Krüss, Optronic  
Sorvall: SLC-6000, GS3, GSA, SS34  
Beckman: SW41Ti, TLS55  
Amersham Ultrospec 3100 pro  
Hewlett Packard

Zellzählgerät  
Zentrifugen:  
Präparative Zentrifugen  
Tischzentrifugen  
Ultrazentrifugen

Schärfe System, CASY 1  
  
Sorvall Evolution RC; Heraeus  
Minifuge, Eppendorf 5417R  
Beckman Optima XL-100k;  
Beckmann TLA-100

## 5.8 Computersoftware

### **Programm**

Gatan DigitalMicrograph  
IASys FASTfit  
Igor Pro, 5.0  
Image Gauge 3.41  
IPLab, 3.9.5 für Mac OS X  
Voyager Data Explorer

### **Hersteller**

Gatan  
Neo Sensors  
WaveMetrix  
FujiFilm  
Scanalytics  
Voyager

## 6 Methoden

### 6.1 Mikrobiologische Methoden

#### 6.1.1 Kultivierung von *E. coli*

Bakterienkulturen wurden unter sterilen Bedingungen in Erlenmeyerkolben gezogen. Dafür wurden Einzelkulturen von Festmedien oder Zellen aus Dauerkulturen in LB-Medium überimpft und bei 37°C unter guter Belüftung inkubiert. Einzelkolonien wurden auf Festmedien in Kunststoff-Petrischalen ausgestrichen und bei 37°C inkubiert. Im Falle einer Resistenzselektion wurde das Medium mit Antibiotika supplementiert. Das Wachstumsverhalten wurde durch Turbiditätsmessung bei 600 nm verfolgt.

#### 6.1.2 Konservierung von *E. coli*

Für Dauerkulturen wurden 500 µL einer Bakterienkultur in der stationären Wachstumsphase mit einem Volumen Glycerin (100 %; v/v) versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgte bei -80°C.

#### 6.1.3 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Die Elektroporation ist eine physikalische Methode zum Transfer von DNA in lebende Bakterienzellen. Die Durchlässigkeit von Biomembranen kann kurzfristig durch elektrische Hochspannungspulse erhöht werden, ohne die Membranstrukturen zu zerstören. Dadurch kann ein Stoffaustausch erfolgen, der auch zum Einschleusen von Makromolekülen wie DNA genutzt wird. Die Elektroporationsbedingungen wurden gemäß Dower et al., 1988 gewählt.

Plasmid-DNA (10 pg-25 ng) wurde mit einer Suspension kompetenter *E. coli*-Zellen vermischt und in einer gekühlten Elektroporationsküvette (1 cm<sup>2</sup> Fläche; 2 mm Elektrodenabstand) einem elektrischen Impuls (2,5 kV; 25 µF; 200 Ω; 4 ms ≤ τ ≤ 6 ms) ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen in 800 µL SOC-Medium (37°C; 60 min) inkubiert und auf Festmedium ausplattiert.

#### 6.1.4 Herstellung elektrokompenter Bakterienzellen

Um elektrokompente Bakterien zu erhalten, muss eine Entsalzung durchgeführt werden, die zu einer Herabsetzung der Leitfähigkeit der Zellsuspension führt. Der Einsatz von Glycerin schwächt den Zellwandaufbau und erhöht die Transformations-effizienz.

Die Herstellung elektrokompenter Bakterien erfolgte nach Sambrook et al., 2001. *E. coli*-Zellen des Stammes DH5α wurden in LB-Medium gezogen und nach Erreichen einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,3-0,4 für 15-30 min auf Eis inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Nach der Sedimentation (15 min; 1000 g) wurden die Zellen in gleichem Volumen entionisiertem Wasser resuspendiert. Nach zweimaligem Waschen des Zellsedimentes mit 0,5 Volumen 10% (v/v) Glycerin wurden die Zellen auf eine Zelldichte von 2,5·10<sup>10</sup> Zellen/mL eingestellt (1 OD<sub>600</sub> ≅ 2,5·10<sup>8</sup> Zellen/mL). Jeweils 40 µL Zellsuspension wurden in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren, die Lagerung erfolgte bei -80°C.

## 6.2 Parasitologische Arbeiten

### 6.2.1 Kultivierung von Trypanosomen

Prozyklische *T. brucei brucei* Zelllinien wurden *in vitro* in Zellkulturflaschen unter aseptischen Bedingungen kultiviert (Brun und Schönenberger, 1979). Die Vermehrung der Dauerkulturen erfolgte in 10 mL axenischem SDM79-Medium + 10 % (v/v) FCS. Die Inkubation erfolgte aerob bei 27°C. Antibiotika wurden je nach Resistenzmarker (Neomycin G418: 15 µg/mL; Hygromycin B: 50 µg/mL; Bleomycin: 1 µg/mL) zugegeben. Durch repetitives Verdünnen wurden die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase mit Zelldichten von  $3 \cdot 10^5$ - $3 \cdot 10^7$  Zellen/mL gehalten.

Zur präparativen Anzucht von 10-40 L Kulturen wurde aus der Dauerkultur eine 200-800 mL Vorkultur hergestellt. Aus der logarithmischen Vorkultur wurden die 10-40 L-Kulturen in SDM79 + 5-10% (v/v) FCS angeimpft. Um die Expression der TAP-Fusionsproteine zu induzieren, wurde 1 µg/mL Tetrazyklin zugesetzt. Die Inkubation erfolgte in Erlenmeyerkolben unter sterilen Bedingungen im Schüttelinkubator (100 rpm) bei 27°C bis zum Erreichen einer Zellzahl von  $1-2 \cdot 10^7$  Zellen/mL.

### 6.2.2 Konservierung von Trypanosomen-Stammkulturen

Logarithmisch wachsende Zellen wurden sedimentiert (10 min; 1500 g; 4°C) und mit SDM79 + 20% (v/v) FCS und 10% (v/v) Glycerin auf eine Zelldichte von  $1 \cdot 10^8$  Zellen/mL eingestellt. Die Temperatur wurde in zwei Schritten abgesenkt (60 min auf Eis; 2-12 h bei -20°C). Die Lagerung erfolgte in flüssigem N<sub>2</sub>. Für die erneute Kultivierung wurden die Zellen bei Raumtemperatur aufgetaut und in einer 1:5 Verdünnung in SDM79-Medium + 20% (v/v) FCS kultiviert.

### 6.2.3 Transfektion von Trypanosomen

Die stabile Integration von Fremd-DNA ins Genom von Trypanosomen erfolgte über homologe Rekombination in die transkriptionell stillen rDNA-*spacer*.

Plasmid-DNA wurde linearisiert und mit Ethanol präzipitiert. *T. brucei* 29-13-Zellen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase sedimentiert (1500 g; 10 min) und durch zweimaliges Resuspendieren und Sedimentieren in 0,5 Volumen eiskaltem ZPFM gewaschen. Mit der Aufnahme des Zellsediments in ZPFM wurde die Zelldichte auf  $1 \cdot 10^9$  Zellen/mL eingestellt.  $1 \cdot 10^9$  Zellen wurden mit 10 µg DNA gemischt und in einer Elektroporationsküvette (2 cm<sup>2</sup> Fläche; 4 mm Elektrodenabstand) zwei elektrischen Impulsen (1,6 kV; 25 µF; 200 Ω; τ: 1.6 ms) im Abstand von 10 s ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen in 100 mL SDM79-Medium + 20% (v/v) FCS + 50% konditioniertes Medium transferiert. Antibiotika für eine Resistenzselektion wurden 12-18 h nach der Elektroporation zugegeben (ten Asbroek et al., 1990).

**ZPFM:** 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 132 mM NaCl; 0,5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>; 8 mM KCl; 0,09 mM Ca(OAc)<sub>2</sub>

### **6.2.4 Herstellung klonaler Trypanosomen-Zelllinien**

Die Klonierung der prozyklischen Trypanosomen erfolgte durch mehrfache serielle Verdünnung. Dazu wurden Flüssigkulturen auf theoretische Zellzahlen von  $1 \cdot 10^1$ - $1 \cdot 10^{-1}$  Zellen in SDM79 + 20 % (v/v) FCS + 50 % konditioniertes Medium verdünnt. Die Inkubation erfolgte in Mikrotiterplatten bei 27°C. Das Wachstum wurde lichtmikroskopisch verfolgt.

### **6.2.5 Messung der Zelldichte von Trypanosomen**

Die Zelldichten von Trypanosomenkulturen wurden automatisiert über den steigenden elektrischen Widerstand beim Durchgang der Zellen durch eine Kapillare bestimmt.

Zur Messung wurden die Zellkulturen direkt vor der Dichtebestimmung in PBS + 0,03% (w/v) NaF auf Konzentrationen von  $10^4$ - $10^5$  Zellen/mL verdünnt. Folgende Parameter wurden bei der Messung angelegt: Kapillardurchmesser 60  $\mu$ m, Messvolumen 400  $\mu$ L, Größenfenster von 2,5-6  $\mu$ m (volumenäquivalenter Durchmesser).

## **6.3 Standardmethoden im Umgang mit NS**

### **6.3.1 Reinigung und Isolierung von NS**

#### **6.3.1.1 Fällung von NS aus wässrigen Lösungen**

NS besitzen die Eigenschaft, in Gegenwart von 300 mM monovalenten Kationen in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag zu bilden. Durch die Veränderung der Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels und der Verringerung der effektiven negativen Ladung der NS durch die Erhöhung der Salzkonzentration sowie Erniedrigung des pH kommt es zur Aggregation der NS.

NS-Lösungen wurden auf eine Endkonzentration von 300 mM Natriumacetat/Essigsäure pH 4,8 gebracht. Nach Zugabe von 2 Volumina (doppelsträngige DNA), 2,5 Volumina (RNA) oder 4 Volumina (Oligonukleotide) eiskaltem, absoluten Ethanol wurden die Proben 20 min bei -20°C gefällt und die DNA pelletiert (30 min; 20000 g; 4°C). Überstände wurden dekantiert und die Präzipitate mit eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min; 20000 g; 4°C) wurden die Präzipitate an der Luft getrocknet und in geeignetem Puffer und Volumen gelöst.

#### **6.3.1.2 Extraktion mit organischen Lösungsmitteln**

In NS-Lösungen vorhandene Proteine werden durch die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln entfernt, indem sie denaturiert werden und sich nach der Extraktion in der Phasengrenzschicht zwischen beiden Lösungsmitteln befinden. Während Phenol eine denaturierende Funktion hat, dient Chloroform neben der Denaturierung zur besseren Trennung der Phasen und Isoamylalkohol zur Vermeidung von Schaumbildung (Sambrook und Russell, 2001).

NS-Lösungen wurden mit 1 Volumen äquilibriertem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI, 25:24:1; v/v) versetzt. Nach Emulgieren der beiden Phasen wurden diese durch Zentrifugation getrennt (5 min; 20000 g; 4°C). Der wässrige Überstand wurde analog mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1; v/v) extrahiert.

### 6.3.1.3 Gelfiltration

Zur Entfernung niedermolekularer Substanzen aus NS-Lösungen wurde eine Gelfiltration mit quervernetztem Dextran (Sephadex G50) als Säulenmatrix durchgeführt.

Das Säulenmaterial wurde vor der Benutzung in entionisiertem Wasser oder TE pH 7,5 für 4-16 h aufgeschwemmt. Die Verengung einer Pasteurpipette wurde mit einer Glaskugel ( $\varnothing$ : 4 mm) blockiert, und die Pipette wurde mit dem äquilibrierten Säulenmaterial befüllt. Die Probe wurde auf die Säule geladen und fraktionell mit dem entsprechenden Puffer eluiert.

## 6.3.2 Gelelektrophoretische Methoden

### 6.3.2.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

NS wurden in Polyacrylamidgelen unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch separiert. Dabei wurden Gele mit Konzentrationen von 8-15 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) verwendet. Als denaturierendes Agens enthielten die Gele sowie der Auftragspuffer 8 M Harnstoff.

Die Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel in Auftragspuffer hitzedenaturiert (5 min; 95°C) und elektrophoretisch bei konstanter Leistung von 20-45 W separiert. Zur gleichmäßigen Wärmeableitung dienten Aluminiumplatten. Die Detektion der NS erfolgte durch Färbung mit SYBR-Green® II oder durch Autoradiographie.

**Geldimensionen:** 200 mm Breite; 200-400 mm Länge; 0,4 mm Tiefe.

**Gelzusammensetzung:** TBE pH 8,3; 8-15 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (19:1); 8 M Harnstoff, 0,06 % (w/v) APS; 0,06 % (v/v) TEMED

**Laufpuffer:** TBE pH 8,3

**Auftragspuffer:** TBE pH 8,3; 8 M Harnstoff; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 0,1 % (w/v) Xylencyanol

### 6.3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

NS wurden unter nativen Bedingungen in Agarosegelen in horizontalen Flachbettkammern separiert. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden Agarosegele von 0,8-2% (w/v) Agarose verwendet. Die aufzutragenden Proben wurden mit Auftragspuffer versetzt und mit 7 V/cm für 1-3 h elektrophoretisch getrennt. Die Detektion der NS erfolgte mit Ethidiumbromid oder SYBR-Green® II.

**Geldimension:** 80-100 mm Breite; 5-140 mm Länge; 5 mm Tiefe

**Laufpuffer:** TBE pH 8,3

**Auftragspuffer:** TBE pH 8,3; 6,5 % (w/v) Saccharose; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau; 0,05 % (w/v) Xylencyanol

### 6.3.2.3 Isolierung von NS aus Polyacrylamidgelen

Durch PAGE getrennte NS wurden über ihren "UV-Schatten" oder über Autoradiographie im Gel visualisiert. Die entsprechenden Gelfragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Elution erfolgte durch Inkubation in 5 Volumen TE pH 7,5 + 20 % (v/v) Phenol (4-16 h; 37°C). Die flüssige Phase wurde durch Extraktion mit PCI und Ethanolfällung von Gelbestandteilen gereinigt.

#### **6.3.2.4 Isolierung von NS aus Agarosegelen**

Die im präparativen Agarosegel aufgetrennten NS wurden unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten. Das die NS enthaltende Agarosegelstück wurde in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß überführt, das zuvor am Boden mit einer Kanüle ( $\varnothing$ : 0,7 mm) durchstoßen und zu einem Viertel mit Glaswolle gefüllt wurde. Nachdem der Ansatz für 10 min in flüssigem N<sub>2</sub> gefroren wurde, erfolgte ein Zentrifugationsschritt (5 min; 4°C; 20000 g). Die NS-Lösung wurde in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß aufgefangen.

### **6.3.3 Analyse und Detektion von NS**

#### **6.3.3.1 Spektrophotometrie**

Die Konzentration von wässrigen NS-Lösungen wurde UV-spektrophotometrisch bestimmt, basierend auf dem gemittelten Absorptionsmaximum der heterozyklischen Basen bei einer Wellenlänge von 260 nm und dem Lambert Beer'schen Gesetz:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

Das Lambert-Beer'sche Gesetz beschreibt die Absorption als proportionale Funktion des molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon$  (L/mol·cm), der molaren Konzentration  $c$  und der Schichtdicke der absorbierenden Flüssigkeit  $d$  (in cm). Die Absorption ist als Quotient der dekadischen Logarithmen von eingedrungener und ausgetretener Strahlungsleistung gegeben.

NS-Lösungen wurden in Wasser verdünnt und über einen Wellenlängenbereich von 210-310 nm vermessen. Über die Absorption bei  $\lambda=260$  nm wurde die Konzentration berechnet. Nach Ausubel et al. (1994) entsprechen Konzentrationen von 50  $\mu\text{g/mL}$  (doppelsträngige DNA), 33  $\mu\text{g/mL}$  (einzelssträngige DNA) bzw. 40  $\mu\text{g/mL}$  (RNA) einer  $\text{OD}_{260}=1$ . Diese Werte ergeben sich aus der Tatsache, dass ungepaarte NS eine höhere Absorption als doppelsträngige NS besitzen (Hyperchromie). Die Reinheit der NS-Lösungen wurde über ein Absorptionsspektrum im Bereich von 210 nm bis 310 nm überprüft. Dabei weist ein Verhältnis  $A_{260}/A_{280}$  kleiner als 1,8 auf Verunreinigungen durch Protein und/oder Phenol hin.

#### **6.3.3.2 Szintillationsmessung**

Radioaktive Zerfälle wurden über Flüssigkeits-Szintillationsmessungen quantifiziert. Ionisierende Strahlung regt Szintillatoren zur Aussendung von Lichtblitzen an, deren Auszählung elektronisch erfolgt. Die Elektronen werden über Sekundärelektronenvervielfacher detektiert und quantifiziert. Das Messergebnis wird in Impulsen pro Minute (cpm) angegeben.

Flüssige Proben wurden in einem Zählfläschchen mit 2 mL Szintillations-Cocktail emulgiert und maximal 30 Minuten im Szintillationszähler vermessen. Beim Erreichen einer Standardabweichung des Messwertes von unter 2% wurde die Zählung beendet. Der Wert der Hintergrundstrahlung wurde von den Messwerten abgezogen und betrug in jedem Fall weniger als 3 % des Messwertes.

#### **6.3.3.3 Autoradiographie**

Radioaktiv markierte Moleküle wurden aufgrund der entstehenden ionisierenden Strahlung während des radioaktiven Zerfalls autoradiographisch auf zwei Weisen

detektiert. Zum einen durch Schwärzung von Röntgenfilmen, wobei der Grad der Schwärzung in einem gewissen Bereich proportional zur Intensität der emittierten Strahlung ist, und zum anderen durch reversible Anregung von *imaging plates*. Die Energie des radioaktiven Zerfalls wurde in Form von energetisch angeregten Elektronen in einer "phosphorhaltigen" Schicht der *imaging plates* gespeichert und durch Stimulation mit energiereicher Laserstrahlung über emittierte Fluoreszenzsignale detektiert. Im Vergleich zur Exposition auf Röntgenfilmen bietet sich hier die Möglichkeit einer quantitativen Auswertung der Signale.

Nach der elektrophoretischen Trennung der NS wurden die Gele auf Whatman-Papier transferiert, mit einer Kunststoffolie bedeckt und im Vakuum getrocknet. Die getrockneten Gele wurden mit einer *imaging plate* in einer Filmkassette inkubiert (30 min-2 Tage; RT). Das Auslesen der *imaging plate* erfolgte mit dem "Fluoro Image Analyzer FLA-5000", indem die Oberfläche mit einem Laser der Wellenlänge 635 nm angeregt und Fluoreszenzsignale durch einen Sekundärelektronenverstärker detektiert wurden. Für Gelelutionszwecke wurde das nicht getrocknete Gel mit einem Röntgenfilm in einer Filmkassette exponiert (5-30 min; RT).

### 6.3.3.4 SYBR-Green® II-Färbung

SYBR-Green® II ist ein Fluoreszenzfarbstoff zur Detektion von RNA in Agarose- und Polyacrylamidgelen (Jin et al., 1994).

Die Gele wurden 15-20 min im Dunkeln unter Schütteln in der Färbelösung (1:10000 in TBE pH 7,5) inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem "Fluoro Image Analyzer FLA-5000" durch Anregung des Farbstoffes bei einer Wellenlänge von 473 nm in Verbindung mit einem monochromatischen Emissionsfilter ( $\lambda=510$  nm).

### 6.3.3.5 Ethidiumbromid-Färbung

Die Detektion von doppelsträngigen NS in Agarosegelen erfolgte durch die Interkalierung des Farbstoffes Ethidiumbromid. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm werden Ethidiumbromid-Moleküle zu einer sichtbaren Fluoreszenz ( $\lambda=560$  nm) angeregt (Sharp et al., 1973).

Die Elektrophorese wurde in Gegenwart von 0,5  $\mu\text{g/mL}$  Ethidiumbromid durchgeführt oder das Agarosegel nach erfolgter Elektrophorese in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) 20 min gefärbt und anschließend 10 min in Wasser entfärbt.

## 6.3.4 Modifizierung von NS

### 6.3.4.1 Dephosphorylierung der 5'-Termini von NS

Alkalische Phosphatase aus dem Kälberdarm (CIAP, *Calf intestine alkaline phosphatase*) katalysiert die Hydrolyse von 5'- und 3'-terminalen Phosphatgruppen von NS. Die Reaktion wurde zur Vorbehandlung von NS verwendet, die am 5'-Ende mit  $^{32}\text{P}$  markiert werden oder kein Substrat für Ligasen darstellen sollten.

Zur Dephosphorylierung linearisierter Plasmide wurden 0,2 U CIAP pro  $\mu\text{g}$  DNA verwendet. Zur Vorbereitung radioaktiver 5'-Markierungen wurden 200 pmol RNA mit 2 U CIAP inkubiert (30-60 min; 37°C).

**Dephosphorylierungspuffer:** 50 mM Tris-HCl pH 8,5; 0,1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ .

## 6.4 DNA-Arbeitstechniken

### 6.4.1 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Präparation von Plasmiden aus *E. coli*-Zellen wurde das "QIAprep® Spin Miniprep Kit" (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Methode basiert auf der alkalischen Detergenzlyse nach Birnboim und Doly (1979).

Es wurden 5 mL einer stationären Bakterienkultur sedimentiert (30 sec; 14000 g; RT) und unter alkalischen Bedingungen in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) lysiert. Durch die rasche Neutralisation präzipitieren Proteine und chromosomale DNA mit dem schwerlöslichen Kaliumsalz des Detergenz. Durch Sedimentation werden diese von der gelösten Plasmid-DNA getrennt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgt durch die Bindung an eine Silica-Membran und das Waschen mit ethanolhaltigem Puffer. Die gereinigte Plasmid-DNA wird von der Membran mit einem Niedrigsalzpuffer (5 mM Tris-HCl pH 8,5) im leicht alkalischen pH eluiert.

### 6.4.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus *T. brucei*

Gesamt-DNA wurde durch Detergenzlyse und Hydrolyse mit RNase A und Proteinase K isoliert. Durch Phenolextraktion und Ethanolfällung wurde die DNA von Lipiden, Proteinen und niedermolekularen Verbindungen getrennt.

$1\text{-}5\cdot 10^9$  Zellen wurden pelletiert (10 min; 1500 g; 20°C) und in 10 mL SDM79 ohne FCS und Hämin gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 mL Lysepuffer resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei 70°C und Abkühlen auf 37°C wurde 100 µg/mL RNase A zugegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C lysiert. Durch Zugabe von 500 µg/mL Proteinase K (90 min; 37°C) und anschließende Phenolextraktion wurden die Proteine von der DNA getrennt. Die DNA wurde durch Ethanol präzipitiert und in TE pH 8 gelöst (5 min; 65°C).

**Lysepuffer:** 50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 20 mM EDTA; 1% (w/v) SDS

### 6.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die zu amplifizierende DNA-Matrize (10-100 ng) wurde in 100 µL Reaktionsvolumen mit 1 U *Taq*-DNA-Polymerase, dNTPs (je 0,25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und je 1 µM der komplementären Oligodesoxynukleotide in Reaktionspuffer gemischt. Nach einer Denaturierung der DNA (5 min; 95°C) wurden 25-35 Zyklen der folgenden Inkubationsschritte durchgeführt: Denaturierung (1 min; 95°C), Hybridisierung (1 min; 40-65°C), Polymerisation (30 sec–3 min; 72°C). Alle Inkubationsschritte erfolgten in einem *Thermocycler*.

**Reaktionspuffer:** 10 mM Tris-HCl pH 9,0; 50 mM KCl; 6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1% (v/v) Triton X-100

### 6.4.4 Kolonie-PCR

Zur Analyse von *E. coli*-Transformanten wurden Bakteriensuspensionen direkt einer PCR unterzogen. Dazu wurden Einzelkolonien "gepickt", die zum einen im PCR-Ansatz suspendiert und zum anderen auf einer Nährmediumplatte zum Erhalt des Klons ausgestrichen wurden.

## 6.5 Techniken der DNA-Klonierung

### 6.5.1 Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA

Durch den Verdau mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen wird doppelsträngige DNA an meist palindromischen Erkennungssequenzen an definierten Positionen hydrolysiert. Es entstehen 3'-Hydroxylenden und 5'-Phosphatenden.

In einem Mindestvolumen von 20 µL wurden die DNA und das Restriktionsenzym (1 U-10 U/µg DNA) unter enzyspezifischen Pufferbedingungen bei 25-65°C für 1-24 h inkubiert.

### 6.5.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die kovalente Verbindung von doppelsträngigen DNA-Enden durch Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen benachbarten 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphatgruppen in Gegenwart von ATP (Weiss et al., 1968). Es wurden DNA-Moleküle mit kohäsiven oder mit glatten Enden nach unterschiedlichen Protokollen ligiert.

Für die Ligation kohäsiver DNA-Termini wurden 100 fmol Plasmid-DNA mit 300-600 fmol Insertionsfragment in Reaktionspuffer mit 1-2 U T4-DNA-Ligase in einem Volumen von 10-20 µL gemischt. Im Fall von DNA-Molekülen mit glatten Termini enthielt der Reaktionsansatz analog 5 U T4-DNA-Ligase und zusätzlich 5% (w/v) PEG 4000. Die Inkubation erfolgte bei 22°C für 3-12 h.

### 6.5.3 Klonierung der Plasmid-Vektoren

Die Sequenzen von gBP21, TbMP42 und mHel61p wurden ausgehend von Plasmid-DNA oder genomischer DNA aus *T. brucei* mittels PCR amplifiziert. Die für die PCR verwendeten Oligodesoxynukleotide enthielten Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme. Für die Klonierung der Sequenzen in den die TAP-Sequenz tragenden pLEW100-TAP-Vektor wurden Vektor und Zielsequenz mit den gleichen Restriktionsenzymen hydrolysiert und die gewünschten DNA-Fragmente durch Gelelektion gereinigt. Der Vektor wurde zusätzlich dephosphoryliert. Nach Ligation von Vektor und Insert erfolgte die Transformation in *E. coli* DH5α-Zellen. Positive Transformanten wurden durch Kolonie-PCR und Kontrollrestriktionen isolierter Plasmide identifiziert und zur Verifizierung sequenziert. Der pLEW100-TAP-Vektor, der alle für eine ektopische Genexpression der TAP-Fusionsproteine in *T. brucei* notwendigen Komponenten enthält, wurde linearisiert und in *T. brucei* transfiziert.

### 6.5.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA erfolgte automatisiert nach einer Kombination der Didesoxy-Kettenabbruchsequenzierung (Sanger et al., 1977) und der *thermal cycling*-Methode (Murray, 1989) in Gegenwart fluoreszenzmarkierter Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP).

## 6.6 RNA-Arbeitstechniken

### 6.6.1 Radioaktive Markierung der Termini

#### 6.6.1.1 Markierung der 3'-Termini

Für eine Markierung der 3'-Termini wurde die zu markierende RNA in einer Ligasereaktion mit 3',5'-[<sup>32</sup>P]-pCp modifiziert. Hierbei katalysiert die T4-RNA-Ligase die ATP-abhängige kovalente Verknüpfung der 5'-Phosphatgruppe des pCp mit einer 3'-Hydroxyl-terminierten Akzeptor-RNA (England et al., 1980).

In einem Reaktionsvolumen von 20 µL wurden 250 pmol RNA mit 10-50 µCi 3',5'-[<sup>32</sup>P]-pCp (spez. Aktivität: 3000 µCi/mmol) und 10 U T4-RNA-Ligase im Ligationspuffer für 1 h bei 37°C inkubiert.

**Ligationspuffer:** 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM DTT; 1 mM ATP; 300 mg/L BSA

#### 6.6.1.2 Markierung der 5'-Termini

PNK katalysiert die kovalente Übertragung einer γ-Phosphatgruppe von ATP auf die terminale, freie 5'-Hydroxylgruppe von Oligonukleotiden (Richardson, 1971).

Die Kinasierung erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20-50 µL in Kinasierungspuffer mit 250 pmol 5'-dephosphorylierter RNA und 10 U T4-PNK. Zusätzlich wurden 50 µCi γ-[<sup>32</sup>P]-ATP (spez. Aktivität: 3000 Ci/mmol) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert.

**Kinasierungspuffer:** 50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT; 1 mM Spermidin; 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA.

#### 6.6.1.3 Markierung von 5' Di- und Triphosphat-Termini

GT transferiert GMP von GTP auf Di- oder Triphosphat-Enden und führt zur Bildung einer 5'-Cap-Struktur. Mit GT können selektiv Primärtranskripte markiert werden (Moss und Koczot, 1976).

Die Reaktion erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20-50 µL in Reaktionspuffer mit 10 U GT in Anwesenheit von 50 µCi α-[<sup>32</sup>P]-GTP (spez. Aktivität: 3000 Ci/mmol). Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert.

**Reaktionspuffer:** 50 mM Tris-HCl, pH 8; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 6 mM KCl; 2,5 mM DTT

### 6.6.2 Enzymatische Spaltung mit RNasen

Die Endoribonukleasen RNase T1 und RNase A katalysieren die Hydrolyse von einzelsträngiger RNA. RNase T1 spaltet die Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Phosphat von Guanin und dem 5'-OH des benachbarten Nukleotides, RNase A spaltet die Phosphodiesterbindung zwischen dem 3' Phosphat von Pyrimidinen und dem 5'-OH des benachbarten Nukleotides. RNase V hydrolysiert spezifisch doppelsträngige RNA.

Der RNase-Verdau erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 20-50 µl in Anwesenheit von 50 ng RNase A, 50 U RNase T1 und 1 U RNase V für 15-30 min bei 37°C.

### 6.6.3 Nachweis von RNA auf Polyethylenimin-Platten

Radioaktiv markierte RNA wurde auf Polyethylenimin-Platten aufgebracht und getrocknet. Der Nachweis erfolgte über Autoradiographie.

### 6.6.4 Chemische Synthese von Ribonukleotiden

Die Synthese von Oligoribonukleotiden erfolgte durch Festphasensynthese unter Verwendung von 2'-t-butyl-dimethylsilyl-geschützten Phosphoramiditen (Caruthers, 1985; Kierzek et al., 1986).

## 6.7 Protein-Arbeitstechniken

### 6.7.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von wässrigen Proteinlösungen wurde nach der Methode von Bradford (1976) ermittelt. Der Bradford-*Assay* basiert auf der unspezifischen Bindung von Coomassie Brilliant Blue an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine. Im sauren Milieu liegt das Absorptionsmaximum des gebundenen Farbstoffes bei 595 nm. Zur Einstellung des sauren Milieus enthält das Bradford-Reagenz ortho-Phosphorsäure.

Bis zu 20 µL Proteinlösung wurden mit dH<sub>2</sub>O auf 800 µL aufgefüllt und mit 200 µL des Bradford-Reagenz` (0,05% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250; 30 % (v/v) Ethanol; 40% (v/v) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) vermischt. Die Absorption bei 595 nm wurde gegen eine Referenz gemessen. Aus diesem Wert wurde anhand einer Standardkurve über lineare Regression die Konzentration der Probe bestimmt.

### 6.7.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die stöchiometrische Bindung von SDS an Polypeptide ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht, da die Eigenladung durch das SDS überdeckt wird. Das komplexierte Proteinmolekül trägt eine negative Gesamtladung, die proportional zur molekularen Masse ist. Ein auf das Trenngel polymerisiertes Sammelgel ermöglicht durch einen niedrigeren pH und größere Poren die Fokussierung der Proteine an der Grenzfläche der Gele. Dadurch werden schärfere Banden erzeugt. Die diskontinuierliche SDS-PAGE erfolgte nach Laemmli (1970).

Die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen in SDS-Auftragspuffer hitzedenaturiert (5 min; 95°C), um Proteinfaltungen aufzulösen. Der Gellauf erfolgte in SDS-Laufpuffer für 1-2 h bei einer Spannung von 120-150 V.

**Geldimensionen:** 10-40 cm Breite; 8-40 cm Länge; 0,75-1 mm Tiefe.

**Laufpuffer:** SDS-Laufpuffer

**Auftragspuffer:** 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 1,5 % (w/v) SDS; 1 mM 2-Mercaptoethanol; 5 % (v/v) Glycerin; 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol

**Gelzusammensetzung:**

	Sammelgel	Trenngel
Tris-HCl	0,19 M pH 6,8	0,38 M pH 8,8
SDS	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
Acrylamid/Bis-Acrylamid (19:1)	5% (w/v)	7-15% (w/v)
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	0,1% (w/v)	0,1% (w/v)
TEMED	0,1% (v/v)	0,05% (v/v)

**6.7.3 Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen**

**6.7.3.1 Coomassie-Färbung**

Bei der Coomassie-Färbung bindet der Indigofarbstoff Coomassie Brilliant Blue durch hydrophobe Interaktionen an Proteine. Essigsäure fixiert die Proteine im Gel und verleiht ihnen eine positive Ladung. Die Nachweisgrenze liegt bei ca. 100 ng pro Proteinbande.

Nach der Elektrophorese wurden die SDS-Polyacrylamid-Minigele mit 50 mL Färbelösung (0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250; 20% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure) 30-120 min gefärbt und zur Entfärbung des Hintergrunds für mindestens 2 h mit 20% (v/v) Methanol + 10% (v/v) Essigsäure entfärbt.

**6.7.3.2 Silberfärbung**

Die Silberfärbung beruht auf der Bindung von Silberionen an Proteine, bevorzugt an Carboxyl- und Sulfhydrylgruppen. Während der Entwicklung findet die Reduktion von Silberionen zu metallischem Silber statt. Die Nachweisgrenze liegt bei 1-5 ng/Bande (Blum et al., 1987).

SDS-Polyacrylamid-Minigele wurden dem folgenden Färbeprotokoll unterzogen, wobei pro Gel 50 mL der angegebenen Lösungen eingesetzt wurden:

- 2x15 min fixieren in 30 % (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure
- 30 min äquilibrieren in 0,1 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; 0,1 M Natriumacetat pH 6; 30 % (v/v) Ethanol
- 3x10 min waschen in  $\text{dH}_2\text{O}$
- 25 min färben in 0,1 % (w/v)  $\text{AgNO}_3$ ; 3 mM Methanal
- 1 min waschen in  $\text{dH}_2\text{O}$
- 5-30 min entwickeln in 2,5 % (w/v)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ; 6 mM Methanal
- Entwicklung stoppen in 10 % (v/v) Essigsäure in Entwicklerlösung

### **6.7.3.3 SYPRO® Orange-Färbung**

Die Färbung von Proteinen durch den Fluoreszenzfarbstoff SYPRO® Orange in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen beruht auf der Interaktion des Farbstoffes mit dem SDS (Steinberg et al., 1996). Daher ist eine Proportionalität zwischen Proteinkonzentration und Färbintensität gegeben. Die Sensitivität ist mit der einer Silberfärbung vergleichbar. Die Anregungsmaxima von SYPRO® Orange liegen bei 300 und 470 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 570 nm.

SDS-haltige Polyacrylamidgele wurden 30-60 min lichtgeschützt in SYPRO Orange Lösung (1:5000 verdünnt in 7,5 % (v/v) Essigsäure) inkubiert. Nichtgebundener Farbstoff wurde zur Hintergrundminimierung durch kurzes Waschen mit 7 % (v/v) Essigsäure entfernt. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte durch den "Fluoro Image Analyzer FLA-5000" bei einer Anregungswellenlänge von 473 nm in Verbindung mit einem 575 nm-Emissionsfilter.

### **6.7.4 Präzipitation von Proteinen**

#### **6.7.4.1 Azeton-Fällung**

Azeton reduziert die Polarität der Lösung und setzt die Löslichkeit der Proteine herab.

Durch Zugabe von 5 Volumen kaltem Aceton, Inkubation für 30 min bei -20°C und Präzipitation (20 min; 20000 g, 4°C) wurden Proteine aus wässrigen Lösungen isoliert.

#### **6.7.4.2 Trichloressigsäure-Fällung**

Proteine werden durch Trichloressigsäure denaturiert und ionische Gruppen werden abgesättigt. Durch hydrophobe Kontakte zwischen den Proteinen aggregieren die Polypeptide.

Durch Zugabe von einem Volumen 10 % (w/v) Trichloressigsäure und Inkubation für 20 min bei -20°C wurden die Proteinaggregate durch Sedimentation (20 min; 20000 g; 4°C) isoliert.

#### **6.7.4.3 Dialyse von Proteinlösungen**

Zum Entfernen niedermolekularer Verbindungen oder zur Separation von Molekülen einer definierten Größe wurden Proteinlösungen dialysiert. Je nach Volumen der zu dialysierenden Probe wurden entweder Dialysemembranen aus regenerierter Zellulose oder Tropfendialysefilter verwendet. Abhängig von der Größe der zu trennenden Moleküle wurde die Ausschlussgröße der Dialysemembran (MWCO: 1-15 kDa) gewählt.

Bei der Dialyse im Schlauch wurde dieser zu ca. 3/4 mit Proteinlösung gefüllt, verschlossen und in mindestens 100-fachem Volumen des entsprechenden Puffers unter Rühren inkubiert (4-24 h; 4°C). Die Tropfendialysen wurden in Plastikpetrischalen auf Eis durchgeführt. Der Dialysefilter wurde auf den Dialysepuffer aufgelegt, Tropfen von 20 µL Proteinlösung aufgegeben und für 30 min dialysiert.

### 6.7.5 Western Blot und Chemilumineszenz-Nachweis

Mit Hilfe der Western Blot-Technik werden die in einem Polyacrylamidgel separierten Proteine elektrophoretisch auf eine Membran transferiert und immunochemisch nachgewiesen.

Durch einen Elektrotransfer wurden Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, an deren Oberfläche sie durch hydrophobe Wechselwirkungen binden. Der Transfer der Proteine erfolgte nach dem *semi dry*-Verfahren (90 min; 90 V). Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden, wurde die Membran 1 h in Blockierungslösung gesättigt. Dann wurde die Membran in einer Erstantikörper-Lösung inkubiert (1 h; RT), wobei der Erstantikörper spezifisch an das nachzuweisende Protein bindet. Nach Waschen mit Waschpuffer (4x15 min; RT) erfolgte die Bindung des gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörpers an den eine Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war (1 h; RT). Um ungebundene Antikörper zu beseitigen, wurde die Membran erneut gewaschen (4x15 min; RT). Die an den Zweitantikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase ermöglichte eine indirekte Detektion des Proteins mittels Chemilumineszenz durch Zugabe von Lumigen PS-3 als Substrat für die Peroxidase. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des Substrats zu Acridiniumester, der mit Peroxid unter alkalischen Bedingungen reagieren kann. Hierbei wird eine Chemilumineszenz produziert, die durch Belichtung von Röntgenfilmen visualisiert werden kann.

**Transferpuffer:** 20% (v/v) Methanol in SDS-Laufpuffer

**Blockierungslösung:** 5 % (w/v) BSA; 0,4 % (v/v) Tween-20 in PBS

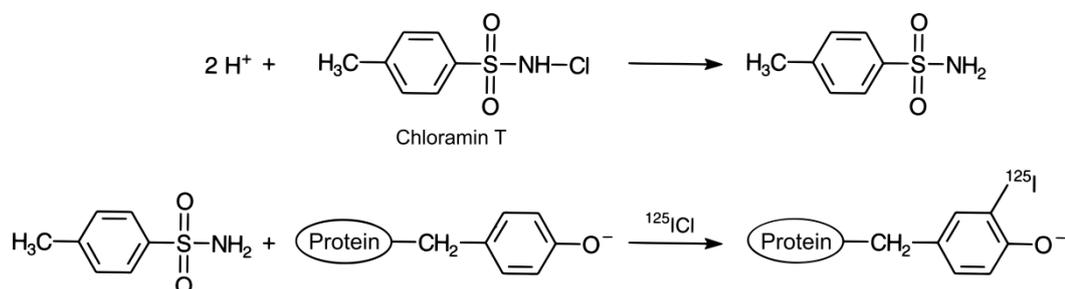
**Antikörper-Lösung:** 1 % (w/v) BSA; 0,4 % (v/v) Tween-20 in PBS

**Waschpuffer:** 0,2 % (w/v) BSA; 0,4 % (v/v) Tween-20 in PBS

### 6.7.6 Radioaktive Markierung von Proteinen

Die radioaktive Markierung von Proteinen erfolgte über die Iodierung von Tyrosinen nach der Chloramin T-Methode (Hunter und Greenwood, 1962). Iodid-Ionen werden mit starken Oxidantien wie Chloramin T zu molekularem Iod oder Iod-Chlorid oxidiert. Diese reaktiven Spezies binden kovalent an Tyrosin-Reste.

500 ng TAP-Eluat wurden mit 100  $\mu\text{Ci}$   $\text{Na}^{125}\text{I}$  in Anwesenheit von 0,5 mg/mL Chloramin T für 2 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 mg/mL  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  gestoppt.



**Abb. 25:** Reaktionsschema der Iodierung von Tyrosinen nach Hunter und Greenwood. (modifiziert nach Lottspeich, 2006).

### 6.7.7 Präparation von Gesamtzellextrakten aus *T. brucei*

1·10<sup>7</sup> Zellen wurden sedimentiert (5 min; 5000 g; 4°C), in kaltem PBS gewaschen und in 20 µL PBS aufgenommen. Durch Inkubation bei 95°C für 5 min wurden proteolytische Enzyme inaktiviert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 100 µL 2x Puffer aufgenommen und für 10 min bei 95°C inkubiert. Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation (10 min; 20000 g; 4°C) vom Überstand getrennt.

**2x-Puffer:** 125 mM Tris-HCl pH 7,5; 4% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol

## 6.8 Isolierung von nativen Editosomen

### 6.8.1 Isolierung und Lyse mitochondrialer Vesikel

Mitochondriale Vesikel wurden modifiziert nach dem Verfahren von Hauser et al., 1996 isoliert. Trypanosomenzellen wurden durch Stickstoff-Kavitation unter isotonischen Bedingungen lysiert, und mitochondriale Vesikel wurden durch isokinetische Ultrazentrifugation in einem Percoll<sup>®</sup>-Stufengradient angereichert. Die gereinigten Mitochondrien wurden durch eine Detergenzlyse aufgeschlossen (Göringer et al., 1994).

Zellen einer spätlogarithmischen Kultur (10-40 L) wurden in SBG gewaschen und mit SoTE auf 2·10<sup>9</sup> Zellen/mL eingestellt. Nach Zugabe von Proteaseinhibitoren wurden die Zellen in der Kavitationsbombe aufgeschlossen (25 min; 70 bar). Lösliche Proteine wurden durch Zentrifugation abgetrennt (16100 g; 10 min; 4°C) und das Sediment in SoTE auf 2·10<sup>9</sup> Zellen/mL eingestellt. Nach einem DNase I-Verdau wurde das Lysat mittels Kanülen (25 G) homogenisiert und durch Zentrifugation von Zellwandbestandteilen getrennt (500 g; 10 min; 4°C). Um die mitochondrialen Vesikel aus dem Überstand zu isolieren wurden diese sedimentiert (16100 g; 10 min; 4°C), in SoTE + 50% (v/v) Percoll<sup>®</sup> aufgenommen (4x 10<sup>10</sup> Zellen/mL) und in einen Percoll<sup>®</sup>-Stufengradient (15-25 %; v/v) angereichert (45 min; 24000 rpm; 4°C). Die mitochondrialen Vesikel bildeten eine Bande an der Phasengrenze zwischen 18,3 % und 21,7 % Percoll<sup>®</sup> (v/v). Die Vesikel wurden mehrfach in SoTE gewaschen und in 1 mL Lysepuffer lysiert (1 h; 4°C).

**SBG:** 20 mM Na<sub>x</sub>H<sub>y</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,9; 20 mM Glukose; 150 mM NaCl

**SoTE:** 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,6 M Sorbitol; 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA

**Lysepuffer:** 1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 µg/mL Leupeptin; 10 µg/mL Trypsininhibitor; 1% (v/v) NP40 in Editingpuffer

### 6.8.2 Tandem Affinity Purification

Die zweistufige Affinitätsreinigung wurde nach dem Protokoll von Rigaut et al., 1999 durchgeführt. Das Verfahren basiert auf der spezifischen Interaktion des TAP-*tags* mit Affinitätsmatrizes. Die Komplexisolierung erfolgt unter nativen Bedingungen.

10-50 mg ML wurde mit 2 Volumen IgG-Bindepuffer verdünnt und mit 0,5-1 mL äquilibrierter IgG-Sepharose inkubiert (1h; 4°C; rotierend). Das Säulenmaterial wurde mit 30 Säulenvolumen IgG-Bindepuffer gewaschen, mit 10 Säulenvolumen TEV-Puffer äquilibriert und in 10 ml TEV-Puffer aufgenommen. Durch Zugabe von 50 µg TEV-Protease wurde der Komplex von der IgG-Sepharose eluiert (2 h; 16°C; rotierend). Das TEV-Eluat wurde mit 2 Volumen Cal-Bindepuffer verdünnt und mit 500 µL äquilibrierter Cal-Sepharose inkubiert (1 h; 4°C; rotierend). Das Säulenmaterial wurde mit 30

Säulenvolumen Cal-Bindepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch wiederholte Zugabe von 1 mL Cal-Elutionspuffer.

	IgG-Bindepuffer	TEV-Puffer	Cal-Bindepuffer	Cal-Elutionspuffer
Tris-HCl pH 8	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaCl	150 mM	150 mM	150 mM	150 mM
NP40 (v/v)	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
Na <sub>2</sub> EDTA	-	0,5 mM	-	-
DTT	-	1 mM	-	-
2-Mercaptoethanol	-	-	10 mM	10 mM
Mg(OAc) <sub>2</sub>	-	-	1 mM	1 mM
Imidazol	-	-	1 mM	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	-	-	2 mM	-
EGTA	-	-	-	5 mM

### 6.8.3 Dichtegradientenzentrifugation

Editosomen wurden durch isokinetische Ultrazentrifugation in linearen GG nach ihrer Dichte fraktioniert.

10 µg TAP-Eluat wurden entweder in einem linearen 2 mL GG mit Glycerinkonzentrationen von 10-40 % (v/v) (2 h; 100000 g; 4°C) oder in einem 11 mL GG mit Glycerinkonzentrationen von 10-35 % (v/v) (5 h; 250000g; 4°C) fraktioniert. Es wurden 100 µL bzw. 1 mL Fraktionen entnommen und die Glycerinkonzentration durch Messung der Refraktionsindizes bestimmt.

## 6.9 In vitro Assays

### 6.9.1 Adenylierungs-Assay

Ligasen benötigen zur Aktivierung die kovalente Bindung von AMP. Durch Inkubation mit  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-ATP können Ligasen autoadenyliert und damit nachgewiesen werden.

Die RNA-Editing-Ligasen TbMP52 und TbMP48 wurden durch Inkubation von 2,5 µCi  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-ATP mit 2 µg Proteinextrakt radioaktiv markiert (30 min; 27°C). Die Proben wurden durch SDS-PAGE analysiert und durch Autoradiographie detektiert.

### 6.9.2 Editing-Assays

Zum *in vitro* Nachweis der Editingaktivität wurden der PIA und der PDA nach Igo et al., 2000 verwendet. Bei diesen *Assays* liegt die prä-mRNA im Gegensatz zum natürlichen Substrat in Form von zwei Fragmenten vor. Die prä-mRNA wird entsprechend der gRNA-Vorlage editiert. Die verwendeten gRNAs vermitteln die Insertion von drei Us bzw. die Deletion von vier Us.

Die für den Assay verwendeten Oligoribonukleotide wurden durch Festphasen-Phosphoramidit-Synthese hergestellt. Die 5'-Fragmente der prä-mRNA wurden 5'-terminal unter Verwendung von PNK und  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP radioaktiv markiert und durch denaturierende PAGE gereinigt. Die 3'-Fragmente waren am 3'-Ende aminomodifiziert und wurden durch denaturierende PAGE gereinigt und 5' kinasiert. 50 fmol 5'-Fragment, 1 pmol 3'-Fragment der prä-mRNA und 0,5 pmol gRNA wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 µL hybridisiert. Um Sekundärstrukturen der RNA-Moleküle aufzuheben,

wurde der Ansatz 2 min auf 65°C erhitzt, bevor das *Annealing* 15 min bei RT durchgeführt wurde. In einem Reaktionsvolumen von 30 µL wurden die RNA-Moleküle mit 500 ng Proteinextrakt in Gegenwart von 500 µM ATP inkubiert (3 h; 27°C). Die RNAs wurden extrahiert, präzipitiert und in einem 15% (w/v) denaturierenden Polyacrylamidgel separiert. Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie.

### 6.10 Massenspektrometrische Analyse

Die Massenspektrometrie ist eine Technik zur Bestimmung der molekularen Masse freier Ionen im Hochvakuum, wobei für die Analyse von Proteinen eine Variante der Massenspektrometrie, die MALDI-ToF-Analyse, eingesetzt wird. Die Probe wird hierzu in eine Matrix eingebettet. Diese kristalline Oberfläche wird im Hochvakuum einem Impuls kurzwelliger Laserstrahlung von wenigen Nanosekunden Dauer ausgesetzt, was zur Ionisierung und zum Übergang von Proben- und Matrixmolekülen in die Gasphase führt. Die ionisierten Moleküle werden in einem elektrostatischen Feld auf eine kinetische Energie von einigen keV beschleunigt und nach dem Eintritt in eine feldfreie Driftstrecke nach ihrem m/z-Verhältnis getrennt. Die Detektion erfolgt durch einen Flugzeitmesser: Da die Geschwindigkeit, auf die sich die Probenmoleküle beschleunigen lassen, proportional zur Wurzel aus dem m/z-Quotienten ist, kann bei bekannter Wegstrecke aus der Flugzeit der ionisierten Moleküle das m/z ermittelt werden.

Proteinbanden silbergefärbter SDS-Polyacrylamidgels wurden unter sterilen Bedingungen ausgeschnitten, in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke zerteilt und in eine 96-well-Membranplatte überführt. Durch Zugabe von 70 µL 30 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> und 70 µL 100 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> wurden die Proteinstücke 10-15 min entfärbt und im Anschluss 2x für 15 min mit 200 µL destilliertem Wasser gewaschen. Zur Vorbereitung des Trypsin-Verdau wurden die entfärbten Gelstücke 20 min mit 200 µL 50 mM (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub> und 2x mit 200 µL 25 mM (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>/50% (v/v) Acetonitril je 20 min gewaschen. Durch Zugabe von 200 µL Acetonitril wurde den Gelstücken das Wasser entzogen. Pro Probe wurden 50 µL Trypsinlösung (2,5 µg/mL Schweinetrypsin in 25 mM (NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>) zugegeben, die Proben 20 min bei 4°C und für 6-8 h bei 37°C im Heizschüttler inkubiert. Zur Extraktion der Peptide wurden je 70 µL 50% (v/v) Acetonitril/1% (v/v) Trifluoressigsäure zugegeben und 20 min inkubiert. Die Extrakte wurden anschließend im Vakuum getrocknet. Zur Resolubilisierung wurden die Proben in 20 µL 50% (v/v) Acetonitril/1% (v/v) Trifluoressigsäure für 15 min im Ultraschallbad behandelt. Die Peptide wurden durch wiederholtes Aufziehen von 10 µL Peptidlösung an "ZipTips" gebunden. Zur Entfernung von Salzen wurden die beladenen "ZipTips" mit 0.5% (v/v) Trifluoressigsäure gewaschen. Die an den "ZipTips" angereicherten Peptide wurden durch Aufziehen von 2 µL 50% (v/v) Acetonitril/0,1% (v/v) Trifluoressigsäure eluiert und auf den Probenhalter aufgebracht. Sofort wurden 0,5 µL der Matrixverdünnung zugegeben. Als Matrix wurde α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure in 50% (v/v) Acetonitril/0,1% (v/v) Trifluoressigsäure verwendet. Ein Peptidgemisch aus kleinen und mittelgroßen Peptiden fungierte als Standard. Die Spektrenauswertung wurden mit der Software "Data Explorer" durchgeführt. Die Basislinie jedes Spektrums wurde geglättet und intern anhand der Peptide der Autokatalyse von Trypsin kalibriert. Die Peaklisten wurden ausgelesen. Zur Identifizierung der hydrolysierten Proteine wurden die aus der MALDI-ToF-Analyse erhaltenen Peptidmassenlisten mit einer Datenbank (NCBI) unter Verwendung der Suchmaschine "MS-FIT" verglichen (Clauser et al., 1999).

#### Verwendete Suchparameter:

Tolerierte Massenabweichung: 50 ppm

Zahl der ungenutzten Brücken: 1

Feste Modifikationen: alkylierte Cysteinreste

Mögliche Modifikationen: Oxidation von Methionin, Phosphorylierung der Aminosäuren

Größeneinschränkung: +/- 20 kDa

## 6.11 Strukturanalyse durch TEM

### 6.11.1 TEM

TEM Grids wurden nach der *sandwich carbon*-Methode präpariert (Tischendorf et al, 1974) (1,5-6 h; auf Eis) und mit 2 % (w/v) Uranylformiat negativ kontrastiert (10 min; auf Eis). Die TEM wurde mit einem CM200 FEG (Philips/FEI) durchgeführt, die TEM Aufnahmen wurden mit einer TemCam-F415 (TVIPS) aus einem 90° Winkel und aus einem Kippwinkel von 45° aufgenommen. Einzelpartikel-Aufnahmen wurden manuell ausgewählt und hinsichtlich der Kontrast-Transfer-Funktion korrigiert (Sander et al., 2003; Sander et al., 2005).

### 6.11.2 Berechnung eines 3D-Konsensusmodells

Die Einzel-Partikel-Rekonstruktionen wurden mit dem Programm "Imagic-5" durchgeführt (van Heel et al., 1996). Für die Rekonstruktion des 20 S Editosoms wurden 12188 Kipp-Paare aus 20 Aufnahmen manuell ausgewählt. Durch iteratives MRA wurden 609 KS mit je 20 individuellen Partikeln erstellt (Frank und van Heel, 1982; van Heel, 1996). Für die Rekonstruktion des 40 S Editosoms wurden 4300 Kipp-Paare aus 29 Aufnahmen ausgewählt, die in 214 KS eingeteilt wurden, 175 KS wurden zur weiteren Berechnung der 3D-Struktur verwendet. Durch RCT wurden die Projektionsrichtungen beider Ansichten bestimmt und zur Berechnung der 3-Struktur herangezogen (Radermacher et al., 1988). Individuelle 3D-RCTs wurden mittels eines iterativen Verfahrens, das *gaussian noise* als unverzerrte Referenz nutzt, zu einer Konsensusstruktur kombiniert (Sander et al., in Vorbereitung). Die Oberflächenrepräsentationen wurden mit "AmiraDev 2.3" (TGS Europe) erstellt. Die Auflösung der 3D-Konsensusmodelle wurde über FSC bestimmt (Harauz et al., 1986).

### 6.11.3 Variabilitäts-Analyse

Die individuellen 3D-RCTs der 20 S bzw. 40 S Population wurden einem MSA mit 4°-Referenz-Intervallen aus den 3D-KS unterzogen. 20 S Editosomen wurden in 22 3D-KS, 40 S Editosomen in 58 3D-KS eingeteilt. Die 3D-KS wurden in 4 bzw. 6 Subgruppen klassifiziert

### 6.11.4 Verfeinerung der 3D-Struktur durch Kryo-TEM

40 S Editosomen wurden in flüssigem Stickstoff vitrifiziert und einer Kryo-TEM unterzogen (Golas et al, 2003). 12751 Einzelpartikel-Aufnahmen wurden zur Struktur-Verfeinerung durch *projection matching* ausgewählt. Als Referenz wurde die umfangreichste KS der 40 S Population herangezogen. Die Auflösung der Kryo-Struktur wurde über FSC bestimmt (Harauz et al., 1986).

### 6.11.5 Bioinformatische Charakterisierung

Zur bioinformatischen Bestimmung des Molekulargewichts der 3D-Strukturen wurde das eingeschlossene Volumen der Einzelpartikel unter der Annahme einer Partikeldichte von  $0,844 \text{ Da}/\text{\AA}^2$  abgeschätzt. Der S-Koeffizient wurde mittels "HYDROMIC" bestimmt (Garcia de la Torre et al., 2001).

### 6.11.6 3D-Alignment von 20 S und 40 S Editosomen

Die 3D-Konsensusstruktur der 20 S Editosomen wurde manuell in die 3D-Konsensusstruktur der 40 S Editosomen integriert. Durch ein 3D-Alignment wurde die Überlagerung mit einer Genauigkeit von  $0,25^\circ/0,5 \text{ nm}$  verfeinert. (Sander et al., 2006).

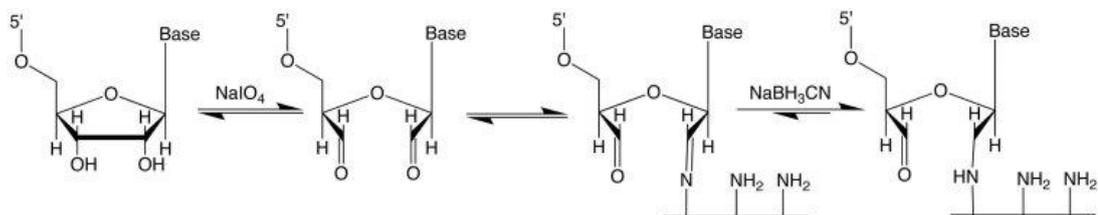
### 6.11.7 Immunogold labeling

100 fmol der 20 S Fraktion einer TbMP42-TAP wurden mit 1 pmol biotinylierter mRNA, gRNA oder einem mRNA/gRNA-Duplex und 1 pmol Streptavidingold ( $\varnothing$ : 6 nm) inkubiert ( $27^\circ\text{C}$ ; 30 min). TEM-Grids wurden nach der *sandwich carbon*-Methode präpariert (5 h; auf Eis) und mit 2 % (w/v) Uranylformiat negativ kontrastiert.

## 6.12 Echtzeit RNA-Bindestudien durch *surface plasmon resonance*-Messung

### 6.12.1 Kopplung von RNA an eine Aminosilan-Oberfläche

Versetzt man RNA mit  $\text{NaIO}_4$ , wird die 3'-Ribose an der 2'- und 3'-Position oxidiert und die Hydroxylgruppen werden in Aldehyde überführt. Aldehyde und primäre Amine bilden Schiff-Basen, die unter reduktiven Bedingungen in eine sekundäre Amin-Bindung überführt werden.



**Abb. 26: Kopplung von RNA an eine Aminosilan-Oberfläche:**  $\text{NaIO}_4$  dient als Oxidationsmittel für die 3'-terminale-Ribose der RNA. In Anwesenheit von  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  wird die Schiff-Base in eine kovalente Amin-Bindung überführt.

10 µg RNA wurden in Oxidationspuffer in Anwesenheit von 5 mM NaIO<sub>4</sub> oxidiert (5-12 h; 4°C; unter Lichtausschluss). Eine Aminosilan-Küvette wurde in das IAsys-Gerät eingespannt und mit Kopplungspuffer gewaschen, bis eine stabile Basislinie erreicht wurde. Durch Zugabe von 5-10 µg 3'-oxidiertes RNA in Kopplungspuffer wurde die Reaktion gestartet. Nach 3 h wurde die Reaktion durch Absaugen der Reaktionslösung und Waschen mit Kopplungspuffer gestoppt.

**Oxidationspuffer:** 50 mM NaAc, pH 4,8; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl

**Kopplungspuffer:** 100 mM Na<sub>x</sub>H<sub>y</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2; 150 mM NaCl; 50 mM NaBH<sub>3</sub>CN

### 6.12.2 SPR-Messungen

Wird Laserlicht in ein hochbrechendes Prisma geleitet und trifft dort unter dem kritischen Winkel auf die Sensoroberfläche wird es total reflektiert, und es entsteht ein evaneszentes Feld. Molekül-Interaktionen auf der Sensoroberfläche verändern den Brechungsindex des Mediums und damit auch den Resonanzwinkel. Um diesen bestimmen zu können, verändert der Laser seinen Einfallswinkel auf das Prisma. Stimmen Einfallswinkel und Resonanzwinkel überein, erreicht das eingestrahelte Licht seine maximale Intensität. Die detektierte Lichtintensität wird im IAsys-Gerät als Funktion des Einfallswinkels analysiert und als Änderung des Resonanzwinkels über die Zeit dargestellt. Das Signal wird daher in Bogensekunden angegeben.

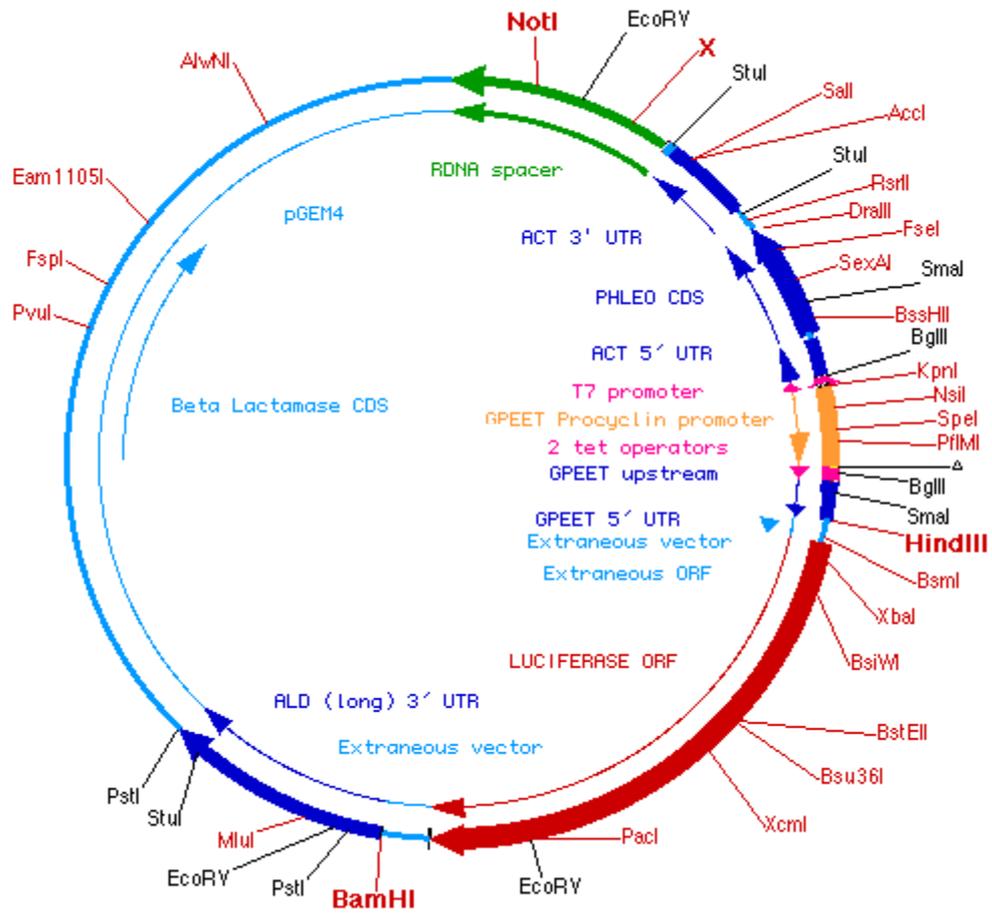
Alle Messungen erfolgten bei 27°C mit einer Rührer-Frequenz von 85 Hz. Die Küvette wurde mit Editingpuffer äquilibriert, bis eine stabile Basislinie erreicht wurde. Zur Analyse der Interaktion von mitochondrialen 20 S Fraktionen mit der gekoppelten RNA, wurden die Fraktionen in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Küvette geladen. Die Bindung erfolgte für 5-10 min, die Dissoziation erfolgte durch Waschen mit 3x 200 µl Editingpuffer. Die Oberfläche wurde zur vollständigen Dissoziation des Editosoms mit GuHCl für 2 min regeneriert. Danach wurde mit Editingpuffer gewaschen, um das Signal wieder auf die Basislinie zurückzuführen. Anschließend wurde der Zyklus mit der nächsten Probe wiederholt.

### 6.12.3 Bestimmung des K<sub>d</sub>

Die maximale Bindung wurde mittels der "FASTfit" Software für eine biphasische Bindung bestimmt. Eine Fehlerberechnung wurde mit 50 Zyklen des Monte Carlo-Algorithmus durchgeführt. Die extrapolierten Werte wurden anschließend gegen die Proteinkonzentrationen aufgetragen und der K<sub>d</sub> anhand der Kurvenanpassung über die Langmuir-Beziehung bestimmt.

## 7 Anhang

### 7.1 pLew100 (7418 bp):



[www.tryps.rockefeller.edu/crosslab\\_sequences.html](http://www.tryps.rockefeller.edu/crosslab_sequences.html)

## 7.2 TAP-tag: aus pBS1479

rot: CBP; grün: TEV-Schnittstelle; blau: ProteinA

```

1  K R R W K K N F I A V S A A N R F K K I
1  AAGAGAAGATGGAAAAAGAATTTTCATAGCCGTCCTCAGCAGCCAACCGCTTTAAGAAAATC

21  S S S G A L D Y D I P T T A S E N L Y F
61  TCATCCTCCGGGGCACTTGATTATGATATTCCAACACTGCTAGCGAGAATTTGTATTTT

41  Q G E L K T A A L A Q H D E A V D N K F
121  CAGGGTGAGCTCAAAAACCGCGGCTCTTGCGCAACACGATGAAGCCGTGGACAACAAATTC

61  N K E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E E
181  AACAAAGAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAA

81  Q R N A F I Q S L K D D P S Q S A N L L
241  CAACGAAACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTA

101  A E A K K L N D A Q A P K V D N K F N K
301  GCAGAAGCTAAAAAGCTAAATGATGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACAACAAATTC AACAAA

121  E Q Q N A F Y E I L H L P N L N E E Q R
361  GAACAACAAAACGCGTTCTATGAGATCTTACATTTACCTAACTTAAACGAAGAACAACGA

141  N A F I Q S L K D D P S Q S A N L L A E
421  AACGCCTTCATCCAAAGTTTAAAAGATGACCCAAGCCAAAGCGCTAACCTTTTAGCAGAA

161  A K K L N G A Q A P K V D A N S A G K S
481  GCTAAAAAGCTAAATGGTGCTCAGGCGCCGAAAGTAGACGCGAATTC CGCGGGGAAGTCA

181  T -
541  ACCTGA

```

## 7.3 gBP21: 621 bp; 206 AS; 23,2 kDa; pI 10,3

```

1  M I R L A C L R G P A M R S A W S R G A
1  ATGATTCGACTCGCATGCCTGCGTGGACCGCCATGCGCTCAGCCTGGTCTCGTGGCGCT

21  S T F S G V Q S L P K F E I H D V R D D
61  TCTACTTTTTCCGGCGTTCAGTCACTGCCCAAATTTGAAATTCACGACGTGCGGGATGAC

41  P A L G T M T R V A V D G K L L L I S Q
121  CCTGGCTCGGAACAATGACGCGTGTGCGGTTGATGGGAAGCTGCTTCTCATTCTCAG

61  Y P Q L G P R K V D P N D L S P Q F D A
181  TACCCACAACCTGGGCCACGCAAAGTGGATCCAAATGATTTAAGTCCTCAGTTTGATGCG

```

81 D R R I S V R L R H V D L A Y L V G V C  
 241 GACCGTCGCATTTCCGTAAGGCTGCGTCATGTAGACCTTGCCTATCTTGTCCGGCGTATGT

101 K E R V P R H R M E T K A Y T L D F E K  
 301 AAGGAGCGGGTGCCACGTCATCGCATGGAAACAAAGGCGTATACGCTCGATTTTGAGAAG

121 S A Q G Y H L H G K V H R V A S Q R M E  
 361 TCTGCACAGGGGTATCACCTTCACGGGAAGGTGCATCGCGTGGCCTCGCAGCGGATGGAG

141 D W S V K F D N H F A V T L E H F L E S  
 421 GACTGGTCTGTTAAATTTGATAACCATTTTCGCCGTGACGTTGGAGCACTTTTTGGAGAGT

161 A L D E S F G F R Q H Y A T R A A E G G  
 481 GCATTGGACGAGAGCTTCGGGTTTCGTCAGCACTATGCCACGGGGCCGAGAGGGAGGG

181 E K I A A T S S A E G G A R R K R S V S  
 541 GAGAAAATTGCAGCGACATCTTCAGCGGAGGGAGGCGCAAGGCGGAAGCGATCTGTAAGT

201 D T S R Y H  
 601 GACACATCGCGATACCAT

## 7.4 TbMP42: 1182 bp; 393 AS; 42,2 kDa; pI 7,4

1 M K R V T S H I S R F L P L V L S Q R G  
 1 ATGAAGCGTGTTACTTCACATATTTTCGCGGTTTTTACCACCTGTGTGTGTCGCAGCGTGGC

21 L S T Y A S P H V S S I R Y Y G A T K C  
 61 TTGTGCACTTACGCATCACCTCATGTCTCGTCCATACGTTACTATGGAGCTACAAAATGT

41 L L A S T P D T P S F Q C G E C G K A F  
 121 CTTTTGGCTTCCACACCAGACACTCCCTCCTCCAGTGCAGCGAGTGGGTAAGGCTTTT

61 R L I N A L N H H I M T K H A G K A K A  
 181 CGTCTTATAAATGCCTTAAATCATCATTATGACCAAGCACGCGAGGGAAGGCAAAGGCT

81 M M N K G G K L E E V N P E E I K N K P  
 241 ATGATGAACAAGGGGGTAAGTTGGAGGAAGTAAACCCTGAAGAAATAAAAACAAACCG

101 Q G A M S Q P T S P P P S S S T S G T E  
 301 CAAGGGCAATGTGCAACCAACATCACCGCCACCGTCATCTTCGACGTCCGGTACGGAG

121 A A S T S P T H S S F P G I P F S P V G  
 361 GCCGCATCAACCTACCAACGCATTCAAGCTTTCCCGGAATACCGTTTTTACCCGTGGGT

141 G I G L V G T P V G A A S H V V N T T T  
 421 GGCATAGGGCTCGTTGGAACCTCCAGTAGGTGCTGCCTCTCATGTGCTTAATACTACTACC

161 T A A N S A S G N A L S D E N A D K K T  
 481 ACTGTGCTAATTCTGCTTCTGGAAATGCCCTTTCCGACGAGAACGCGGACAAAAAACA

181 F V C T I C Q K T F R L E A A L Q H H Y  
 541 TTTGCTGTACGATTTGTTCAGAAAACATTTTCGGTTGGAAGCCGCCCTTCAACACCATTAC

201 Q A K H N M E M P T S S S S S G G A S A  
 601 CAGGCGAAGCACAACATGGAGATGCCGACATCATCTCAAGTTCTGGCGGGCCAGTGCT

221 Q P V L Q G G A T T A G V G S V G F S H  
 661 CAACCAGTGTGCAGGGTGGCGCCACTACAGCAGGTGTTGGAAGTGTGGTTTTTCCCAT

241 T E E E T G R S A M G T Q Y V H S Q E T  
 721 ACTGAGGAGGAAACTGGCAGATCAGCCATGGGAACACAGTATGTTTACAGTCAAGAAAAC  
  
 261 I L P Q A P Q Y H L D V A P N A P E E G  
 781 ATACTCCCGCAAGCCCGCAATATCATCTTGATGTCGCGCCGAACGCACCTGAGGAGGGT  
  
 281 E V A A H W R C V N H C V M L G V V Q N  
 841 GAAGTGGCTGCACATGGCGTTGTGTCAATCATTGTGTTATGTTGGGCGTGGTGCAAAAC  
  
 301 I Q E G F V F E D K V L Q F T L I T D F  
 901 ATTCAGGAAGGGTTTGTATTTGAAGACAAAGTTCTCCAGTTTACACTCATCAGACTTC  
  
 321 E G P S P G D P D K D F H T V R V F D S  
 961 GAGGGACCCTCTCCTGGGGACCCGGATAAGGACTTTCATACAGTTCGTGTGTTTGATAGC  
  
 341 D Y S S R V K E Q L R D G E W F L V T G  
 1021 GATTATAGTTCGAGGGTGAAGAGCAACTCCGTGACGGTGAGTGGTTCCTCGTCACTGGC  
  
 361 R L R M V P Q Y D G S M R K Y Y H Y P V  
 1081 AGACTGCGCATGGTGCCTCAATATGATGGTCCATGCGAAAGTATTACCACTATCCTGTG  
  
 381 I Q V H P G C G S V L R V -  
 1141 ATACAAGTACACCCGGGCTGTGGGTCAAGTGTGAGGGTGTGA

## 7.5 mHel61p: 1641 bp; 546 AS; 60,6 kDa; pI 8,3

1 M K R V T S H I S R F L P L V L S Q R G  
 1 ATGAAGCGTGTACTTCACATATTTTCGCGGTTTTTACCCTTGTGTGTGTCGAGCGTGGC  
  
 21 L S T Y A S P H V S S I R Y Y G A T K C  
 61 TTGTCGACTTACGCATCACCTCATGTCTCGTCCATACGTTACTATGGAGCTACAAAATGT  
  
 41 L L A S T P D T P S F Q C G E C G K A F  
 121 CTTTTGGCTTCCACACCAGACACTCCCTCCTTCCAGTGGCGAGTGGCGTAAAGGCTTTT  
  
 61 R L I N A L N H H I M T K H A G K A K A  
 181 CGTCTTATAAATGCCTTAAATCATCATTATGACCAAGCACGCAGGGAAGGCAAAGGCT  
  
 81 M M N K G G K L E E V N P E E I K N K P  
 241 ATGATGAACAAGGGGGTAAGTTGGAGGAAGTAAACCTGAAGAAATAAAAAACAAACCG  
  
 101 Q G A M S Q P T S P P P S S S T S G T E  
 301 CAAGGGGCAATGTCGCAACCAACATCACCGCCACCGTCATCTTCGACGTCCGGTACGGAG  
  
 121 A A S T S P T H S S F P G I P F S P V G  
 361 GCCGCATCAACCTCACCAACGCATTCAAGCTTTCCCGGAATACCGTTTTACCCGTGGGT  
  
 141 G I G L V G T P V G A A S H V V N T T T  
 421 GGCATAGGGCTCGTTGGAACCTCAGTAGGTGCTGCCTCTCATGTGCTTAATACTACTACC  
  
 161 T A A N S A S G N A L S D E N A D K K T  
 481 ACTGCTGCTAATTCTGCTTCTGGAAATGCCCTTTCCGACGAGAACGCGGACAAAAAAC  
  
 181 F V C T I C Q K T F R L E A A L Q H H Y  
 541 TTTGTCTGTACGATTTGTTCAGAAAACATTTTCGGTTGGAAGCCGCCCTTCAACACCATTAC  
  
 201 Q A K H N M E M P T S S S S S G G A S A  
 601 CAGCGAAGCACAAACATGGAGATGCCGACATCATCTTCAAGTTCCTGGCGGCCAGTGTCT

221 M R A L R C V R R G V Y R Q S V R L C Y  
661 ATGAGGGCCCTGCGTTGTGTTAGGAGGGGTGTTTATCGCCAGTCAGTACGACTCTGTAT

241 F M S L E C S L R P I T G A S A R L L C  
721 TTTATGTGCTGGAGTGTTCACTACGTCCAATCACAGGTGCCTCCGCACGATTACTGTGC

261 R F T A P T W P R K N E V E E G D V G T  
781 CGATTTACTGCTCCGACTTGGCCCAGAAAAATGAGGTGGAGGAAGGGGATGTGGGGACG

281 T E S T S Q D V R S I F R S N I E T H S  
841 ACAGAGTCCACTTCGCAAGATGTGCGGTCAATATTTTCGTAGTAACATCGAAACACACTCC

301 E V S L E S S A S P A L P P K T A A L D  
901 GAAGTATCGCTCGAATCCTCAGCAAGTCCAGCTTTGCCACCCAAAACCTGCGGCGTTGGAT

321 V S V L D S K G N A V P V N P V K L F S  
961 GTGTCGTGTTTCGACAGTAAGGGTAACGCGGTCCAGTGAATCCTGTTAAGCTCTTTTCT

341 D L D N L P D W L S K G L Q S S G F S C  
1021 GATCTCGACAATCTACCTGATTTGGCTGTGCAAGGGACTCCAGTCGTCCGGATTTTCATGT

361 T T P I Q S Y T I P V L D E G H D M I G  
1081 ACCACCCCATTTCAAAGCTATACTATTCAGTCCTTGACGAGGGTCACGATATGATCGGC

381 L A P T G S G K T V A F A V P A L K K F  
1141 CTGGTCTCTACAGGTTGCGGGAAAACTGTAGCCTTCGCCGTTCCCGCCCTAAAAAAGTTT

401 Q W S P N G S P R I V V L A P T R E L V  
1201 CAGTGGAGTCCGAACGGTTCACCAAGGATAGTGGTTCGACCAACAAGGGAGCTAGTT

421 Q Q T A K V F H Q L S S G K V R V C E A  
1261 CAACAACTGCGAAAGTGTTCATCAGTTGAGTTCGGGGAAAGTTCGTGTGTGCGAAGCG

441 Y G G A P R E A Q A R R L H N G C D V L  
1321 TACGGTGGTCCCCACGTGAAGCGCAGGCCCGTTCGGTTGCACAATGGTTGCGATGTTTCTC

461 V A C P G R L K D F L Q N G D V I F D E  
1381 GTGGCGTGCCAGGTGCGTTGAAGGACTTCTGCGAAGCGGACGTGATCTTTGATGAA

481 V S F L V F D E A D R L L D M G F K V Q  
1441 GTGTCGTTTTTGGTCTTCGATGAGGCTGATCGTCTACTGGACATGGGGTTCAAGGTCCAA

501 L D D I L G Y F S S H R P A Q T M M W S  
1501 TTAGACGACATCTGGGTTACTTTTCGAGCCACCGCCCTGCTCAAACGATGATGTGGTCC

521 A T W P P V V E Q L A Q E Y L S Q N R Y  
1561 GCTACCTGGCCCCAGTTGTGGAGCAACTGGCCCAAGAGTATCTCTCACAGAATCGCTAC

541 V I R S G T A G T G L Q V N E N I K Q H  
1621 GTAATCCGGTCTGGAAGTCCCGGAACGGGACTTCAGGTCAACGAGAATATTAAGCAGCAC

561 I F F A D A P E E R V K T L V S L I K E  
1681 ATTTCTTTGCTGATGCCCCGAAGAGCGCGTGAAAACACTGTTTTCTCTCATTAAAGGAG

581 G K I D E N T A K M M I F V E R Q T D T  
1741 GGGAAAATTGACGAGAATACCGCTAAGATGATGATATTTGTCGAGCGTCAAACCTGACACA

601 E N A A Y A L A R M L G I H S R C I G V  
1801 GAGAATGCAGCCTACGCGTGCCCGTATGTTGGGGATTCATAGCAGATGCATTGGAGTG

621 V H G G M Q Q R Q R D H I M G I F K E G  
1861 GTGCACGGCGGGATGCAACAGCGGCAGAGGGATCATATAATGGGCATATTC AAGGAAGGA

641 R I R I L V A T D V A S R G L D F P D V  
1921 CCGATTCCGGATACTTGTAGCCACTGACGTGGCCTCTCGTGGACTTGACTTCCCGGATGTA

661 T C V V N L I A P K N I D S Y C H R I G  
1981 ACTTGGCTTGTAACTCATAGCCCCAAGAACATTGACAGCTACTGCCACCGCATGGT

681 R T G R A G R T G E S F T F I G R S D G  
2041 CGGACCGGAAGGGCTGGTCGCACCGGTGAGTCCTTTACCTTATTGGCGTTCGGATGGA

701 S L A K D L I N Y L E K C G M D V P Q R  
2101 TCTCTGGCGAAGGACTTGATAAATTACCTGGAAAAATGTGGTATGGACGTCCCTCAGCGG

721 L V E F A E E H A Q G E E I K R M K R P  
2161 TTAGTGGAGTTTGCTGAAGAGCACGCCCAAGGGGAGGAGATAAAGCGTATGAAACGACCG

741 W R G R Q Q R E G R S Q S R G G R E P A  
2221 TGGCGCGGTAGGCAGCAGCGTGAGGGGAGGAGCCAGTCGCGGGGTGGTCGTGAGCCGGCA

761 P R D S G W -  
2281 CCTCGTGACAGTGGTTGGTAG

## 8 Literatur

- Abraham, J. M.; Feagin, J. E.; Stuart, K. (1988): Characterization of cytochrome c oxidase III transcripts that are edited only in the 3' region. In: *Cell*, Jg. 55, H. 2, S. 267–272.
- Alatortsev, V. S.; Cruz-Reyes, J.; Zhelonkina, A. G.; Sollner-Webb, B. (2008): *Trypanosoma brucei* RNA-Editing: coupled cycles of U deletion reveal processive activity of the editing complex. In: *Molecular and Cellular Biology*, Jg. 28, H. 7, S. 2437–2445.
- Allen, T. E.; Heidmann, S.; Reed, R.; Myler, P. J.; Göringer, H. U.; Stuart, K. D. (1998): Association of guide RNA binding protein gBP21 with active RNA-Editing complexes in *Trypanosoma brucei*. In: *Molecular and Cellular Biology*, Jg. 18, H. 10, S. 6014–6022.
- Antes, T.; Costandy, H.; Mahendran, R.; Spottswood, M.; Miller, D. (1998): Insertional editing of mitochondrial tRNAs of *Physarum polycephalum* and *Didymium nigripes*. In: *Molecular and Cellular Biology*, Jg. 18, H. 12, S. 7521–7527.
- Aphasizhev, R.; Aphasizheva, I.; Nelson, R. E.; Gao, G.; Simpson, A. M.; Kang, X.; Falick, A. M.; Sbicego, S.; Simpson, L. (2003): Isolation of a U-insertion/deletion editing complex from *Leishmania tarentolae* mitochondria. In: *The EMBO Journal*, Jg. 22, H. 4, S. 913–924.
- Aphasizhev, R.; Aphasizheva, I.; Nelson, R. E.; Simpson, L. (2003): A 100-kDa complex of two RNA-binding proteins from mitochondria of *Leishmania tarentolae* catalyzes RNA annealing and interacts with several RNA-Editing components. In: *RNA*, Jg. 9, H. 1, S. 62–76.
- Ausubel, F. M.; (Hrsg.) (1994): *Current protocols in molecular biology*. Wiley & Sons. ISBN 0-471-50338-X.
- Babbarwal, V. K.; Fleck, M.; Ernst, N. L.; Schnauffer, A.; Stuart, K. (2007): An essential role of KREPB4 in RNA-Editing and structural integrity of the editosome in *Trypanosoma brucei*. In: *RNA*, Jg. 13, H. 5, S. 737–744.
- Backus, J. W.; Smith, H. C. (1992): Three distinct RNA sequence elements are required for efficient apolipoprotein B (apoB) RNA-Editing in vitro. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 20, H. 22, S. 6007–6014.
- Backus, J. W.; Smith, H. C. (1994): Specific 3' sequences flanking a minimal apolipoprotein B (apoB) mRNA-Editing 'cassette' are critical for efficient editing in vitro. In: *Biochimica et Biophysica Acta*, Jg. 1217, H. 1, S. 65–73.
- Birnboim, H. C.; Doly, J. (1980): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 7, H. 6, S. 1513–1523.
- Blom, D.; Burg J.; Breek, C. K.; Speijer, D.; Muijsers, A. O.; Benne, R. (2001): Cloning and characterization of two guide RNA-binding proteins from mitochondria of *Crithidia fasciculata*: gBP27, a novel protein, and gBP29, the orthologue of *Trypanosoma brucei* gBP21. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 29, H. 14, S. 2950–2962.
- Blum, B.; Bakalara, N.; Simpson, L. (1990): A model for RNA-Editing in kinetoplastid mitochondria: "guide" RNA molecules transcribed from maxicircle DNA provide the edited information. In: *Cell*, Jg. 60, H. 2, S. 189–198.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. In: *Electrophoresis*, H. 8, S. 93–99.

- Boren, J.; Lee, I.; Zhu, W.; Arnold, K.; Taylor, S.; Innerarity, T. L. (1998): Identification of the low density lipoprotein receptor-binding site in apolipoprotein B100 and the modulation of its binding activity by the carboxyl terminus in familial defective apo-B100. In: *The Journal of Clinical Investigation*, Jg. 101, H. 5, S. 1084–1093.
- Borén, J.; Olin, K.; Lee, I.; Chait, A.; Wight, T. N.; Innerarity, T. L. (1998): Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. In: *The Journal of Clinical Investigation*, Jg. 101, H. 12, S. 2658–2664.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical Biochemistry*, Jg. 72, S. 248–254.
- Braly, P.; Simpson, L.; Kretzer, F. (1975): Isolation of kinetoplast-mitochondrial complexes from *Leishmania tarentolae*. In: *The Journal of Protozoology*, Jg. 21, H. 5, S. 782–790.
- Brecht, M.; Niemann, M.; Schlüter, E.; Müller, U. F.; Stuart, K.; Göringer, H. U. (2005): TbMP42, a protein component of the RNA editing complex in African trypanosomes, has endo-exoribonuclease activity. In: *Molecular Cell*, Jg. 17, H. 5, S. 621–630.
- Brown, S. D.; Huang, J.; Van der Ploeg, L. H. (1992): The promoter for the procyclic acidic repetitive protein (PARP) genes of *Trypanosoma brucei* shares features with RNA polymerase I promoters. In: *Molecular and Cellular Biology*, Jg. 12, H. 6, S. 2644–2652.
- Brun, R.; Schönenberger M. (1980): Cultivation and in vitro cloning of procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. In: *Acta Tropica*, Jg. 36, H. 3, S. 289–292.
- Burnashev, N.; Zhou, Z.; Neher, E.; Sakmann, B. (1995): Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. In: *The Journal of Physiology*, Jg. 485, S. 403–418.
- Carnes, J.; Stuart, K.D. (2007): Uridine insertion/deletion editing activities. In: *Methods in Enzymology*, Jg. 424, S. 25–54.
- Carnes, J.; Stuart, K.D. (2008): Working together: the RNA-Editing Machinery in *Trypanosoma brucei*. In: *RNA-Editing*, Springer-Verlag, ISSN 0933-1891, S. 143-164.
- Carnes, J.; Trotter, J. R.; Ernst, N. L.; Steinberg, A.; Stuart, K. (2005): An essential RNase III insertion editing endonuclease in *Trypanosoma brucei*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 102, H. 46, S. 16614–16619.
- Caruthers, M. H. (1985): Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. In: *Science*, Jg. 230, H. 4723, S. 281–285.
- Cattaneo, R.; Kaelin, K.; Baczko, K.; Billeter, M. A. (1989): Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. In: *Cell*, Jg. 56, H. 5, S. 759–764.
- Cavalier-Smith, T. (1994): Kingdom protozoa and its 18 phyla. In: *Microbiological Reviews*, Jg. 57, H. 4, S. 953–994.
- Chan, L.; Boerwinkle, E. (1992): Structure, function, molecular genetics, and epidemiology of apolipoprotein B. In: *Seminars in Liver Disease*, Jg. 12, H. 3, S. 311–320.
- Chaudhuri, S.; Carrer, H.; Maliga, P. (1995): Site-specific factor involved in the editing of the psbL mRNA in tobacco plastids. In: *The EMBO Journal*, Jg. 14, H. 12, S. 2951–2957.

- Chen, S. H.; Habib, G.; Yang, C. Y.; Gu, Z. W.; Lee, B. R.; Weng, S. A.; Silberman, S. R.; Cai, S. J.; Deslypere, J. P.; Rosseneu, M. (1987): Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop Kodon. In: *Science*, Jg. 238, H. 4825, S. 363–366.
- Cheng, Y. W. and Gott, J.M. (2000): Transcription and RNA-Editing in a soluble in vitro system from *Physarum* mitochondria. In: *Nucleic Acids Research.*, Jg. 19, H. 28, S. 3695–3701.
- Clauser, K. R.; Baker, P.; Burlingame, A. L. (1999): Role of accurate mass measurement (+/- 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. In: *Analytical Chemistry*, Jg. 71, H. 14, S. 2871–2882.
- Corell, R. A.; Myler, P.; Stuart, K. (1994): *Trypanosoma brucei* mitochondrial CR4 gene encodes an extensively edited mRNA with completely edited sequence only in bloodstream forms. In: *Molecular and Biochemical Parasitology*, Jg. 64, H. 1, S. 65–74.
- Corell, R. A.; Read, L. K.; Riley, G. R.; Nellissery, J. K.; Allen, T. E.; Kable, M. L.; Wachal, M. D.; Seiwert, S. D.; Myler, P. J.; Stuart, K. (1996): Complexes from *Trypanosoma brucei* that exhibit deletion editing and other editing-associated properties. In: *Molecular and Cellular Biology*, Jg. 16, H. 4, S. 1410–1418.
- Covello, P. S.; Gray, M. W. (1989): RNA-Editing in plant mitochondria. In: *Nature*, Jg. 341, H. 6243, S. 662–666.
- Crowther, R. A.; Prasad, B. V. (2004): Macromolecular assemblages - putting the pieces together. In: *Current Opinion in Structural Biology*, Jg. 14, H. 2, S. 117–120.
- Davidson, N. O. (2002): The challenge of target sequence specificity in C-->U RNA-Editing. In: *The Journal of Clinical Investigation*, Jg. 109, H. 3, S. 291–294.
- Decker, C. J.; Sollner-Webb, B. (1990): RNA-Editing involves indiscriminate U changes throughout precisely defined editing domains. In: *Cell*, Jg. 61, H. 6, S. 1001–1011.
- Dower, W. J.; Miller, J. F.; Ragsdale, C. W. (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 16, H. 13, S. 6127–6145.
- Driscoll, D. M.; Wynne, J. K.; Wallis, S. C.; Scott, J. (1989): An in vitro system for the editing of apolipoprotein B mRNA. In: *Cell*, Jg. 58, H. 3, S. 519–525.
- England, T. E.; Bruce, A. G.; Uhlenbeck, O. C. (1980): Specific labeling of 3' termini of RNA with T4 RNA ligase. In: *Methods of Enzymology*, H. 65, S. 65–74.
- Englund, P. T.; Hajduk, S. L.; Marini, J. C. (1982): The molecular biology of trypanosomes. In: *Annual Review of Biochemistry*, Jg. 51, S. 695–726.
- Ernst, N. L.; Panicucci, B.; Igo, R. P.; Panigrahi, A. K.; Salavati, R.; Stuart, K. (2003): TbMP57 is a 3' terminal uridylyl transferase (TUTase) of the *Trypanosoma brucei* editosome. In: *Molecular Cell*, Jg. 11, H. 6, S. 1525–1536.
- Feagin, J. E.; Abraham, J. M.; Stuart, K. (1988): Extensive editing of the cytochrome c oxidase III transcript in *Trypanosoma brucei*. In: *Cell*, Jg. 53, H. 3, S. 413–422.
- Ferrer-Montiel, A. V.; Montal, M. (1996): Pentameric subunit stoichiometry of a neuronal glutamate receptor. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 93, H. 7, S. 2741–2744.
- Frank, J.; van Heel, M. (1983): Correspondence analysis of aligned images of biological particles. In: *Journal of Molecular Biology*, Jg. 161, H. 1, S. 134–137.

- Gao, G.; Simpson, L. (2003): Is the *Trypanosoma brucei* REL1 RNA ligase specific for U-deletion RNA-Editing, and is the REL2 RNA ligase specific for U-insertion editing? In: The Journal of Biological Chemistry, Jg. 278, H. 30, S. 27570–27574.
- García de la Torre, J.; Llorca, O.; Carrascosa, J. L.; Valpuesta, J. M. (2001): HYDROMIC: prediction of hydrodynamic properties of rigid macromolecular structures obtained from electron microscopy images. In: European Biophysics Journal, Jg. 30, H. 6, S. 457–462.
- Garvin, R. T.; Biswas, D. K.; Gorini, L. (1974): The effects of streptomycin or dihydrostreptomycin binding to 16 S RNA or to 30 S ribosomal subunits. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 71, H. 10, S. 3814–3818.
- Gasser, S. M.; Daum, G.; Schatz, G. (1982): Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent uptake of precursors by isolated mitochondria. In: The Journal of Biological Chemistry, Jg. 257, H. 21, S. 13034–13041.
- Golas, M. M.; Sander, B.; Will, C. L.; Lührmann, R.; Stark, H. (2003): Molecular architecture of the multiprotein splicing factor SF3b. In: Science, Jg. 300, H. 5621, S. 980–984.
- Göringer, H. U.; Koslowsky, D. J.; Morales, T. H.; Stuart, K. (1994): The formation of mitochondrial ribonucleoprotein complexes involving guide RNA molecules in *Trypanosoma brucei*. In: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Jg. 91, H. 5, S. 1776–1780.
- Gott, J. M.; Parimi, N.; Bundschuh, R.: Discovery of new genes and deletion editing in *Physarum* mitochondria enabled by a novel algorithm for finding edited mRNAs. In: Nucleic Acids Research, Jg. 2005, H. 33, S. 5063–5072.
- Gott, J. M.; Visomirski, L. M.; Hunter, J. L. (1993): Substitutional and insertional RNA-Editing of the cytochrome c oxidase subunit 1 mRNA of *Physarum polycephalum*. In: The Journal of Biological Chemistry, Jg. 34, H. 268, S. 25483–25486.
- Gott, J. M.; Parimi, N.; Bundschuh, R. (2005): Discovery of new genes and deletion editing in *Physarum* mitochondria enabled by a novel algorithm for finding edited mRNAs. In: Nucleic Acids Research, Jg. 33, H. 16, S. 5063–5072.
- Gott J.M. and Emeson, R.B. (2000): Functions and mechanisms of RNA-Editing. In: Annual Review in Genetics, H. 34, S. 499–531.
- Gualberto, J. M.; Lamattina, L.; Bonnard, G.; Weil, J. H.; Grienenberger, J. M. (1989): RNA-Editing in wheat mitochondria results in the conservation of protein sequences. In: Nature, Jg. 341, H. 6243, S. 660–662.
- Guex, N.; Peitsch, M. C. (1998): SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. In: Electrophoresis, Jg. 18, H. 15, S. 2714–2723.
- Hans, J.; Hajduk, S. L.; Madison-Antenucci, S. (2007): RNA-editing-associated protein 1 null mutant reveals link to mitochondrial RNA stability. In: RNA, Jg. 13, H. 6, S. 881–889.
- Harauz, G.; van Heel, M. (1986): Exact filters for general geometry three dimensional reconstruction. In: Optik, H. 73, S. 146–156.
- Harris, M. E.; Moore, D. R.; Hajduk, S. L. (1990): Addition of uridines to edited RNAs in trypanosome mitochondria occurs independently of transcription. In: The Journal of Biological Chemistry, Jg. 265, H. 19, S. 11368–11376.
- Hauser, R.; Pypaert, M.; Häusler, T.; Horn, E. K.; Schneider, A. (1996): In vitro import of proteins into mitochondria of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania tarentolae*. In: Journal of Cell Science, Jg. 109 (Pt 2), S. 517–523.

- Hausmann, S.; Garcin, D.; Delenda, C.; Kolakofsky, D. (1999): The versatility of paramyxovirus RNA polymerase stuttering. In: *Journal of Virology*, Jg. 73, H. 7, S. 5568–5576.
- Hayman, M. L.; Read, L. K. (1999): *Trypanosoma brucei* RBP16 is a mitochondrial Y-box family protein with guide RNA binding activity. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 274, H. 17, S. 12067–12074.
- Hermann, T.; Schmid, B.; Heumann, H.; Göringer, H. U. (1997): A three-dimensional working model for a guide RNA from *Trypanosoma brucei*. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 25, H. 12, S. 2311–2318.
- Hiesel, R.; Wissinger, B.; Schuster, W.; Brennicke, A. (1989): RNA-Editing in plant mitochondria. In: *Science*, Jg. 246, H. 4937, S. 1632–1634.
- Higuchi, M.; Single, F. N.; Köhler, M.; Sommer, B.; Sprengel, R.; Seeburg, P. H. (1993): RNA-Editing of AMPA receptor subunit GluR-B: a base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. In: *Cell*, Jg. 75, H. 7, S. 1361–1370.
- Hinz, S.; Göringer, H. U. (1999): The guide RNA database (3.0). In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 27, H. 1, S. 168.
- Hoch, B.; Maier, R. M.; Appel, K.; Igloi, G. L.; Kössel, H. (1991): Editing of a chloroplast mRNA by creation of an initiation Kodon. In: *Nature*, Jg. 353, H. 6340, S. 178–180.
- Hume, R. I.; Dingledine, R.; Heinemann, S. F. (1991): Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. In: *Science*, Jg. 253, H. 5023, S. 1028–1031.
- Hunter, W. M.; Greenwood, F. C. (1962): Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. In: *Nature*, Jg. 194, S. 495–496.
- Igo, R. P. Jr.; Palazzo, S. S.; Burgess, M. L.; Panigrahi, A. K.; Stuart, K. (2000): Uridylate addition and RNA ligation contribute to the specificity of kinetoplastid insertion RNA-Editing. In: *Molecular and Cellular Biology*, Jg. 20, H. 22, S. 8447–8457.
- Jin, X.; Yue, S.; Wells, K. S.; Singer, V. L. (1994): SYBR Green I and SYBR Green II: New Ultrasensitive Fluorescent Stains for Detecting Picogram Levels of Nucleic Acids in Polyacrylamide or Agarose Gels. In: *FASEB Journal*, H. 8, S. 1266.
- Kable, M. L.; Seiwert, S. D.; Heidmann, S.; Stuart, K. (1996): RNA-Editing: a mechanism for gRNA-specified uridylate insertion into precursor mRNA. In: *Science*, Jg. 273, H. 5279, S. 1189–1195.
- Kable, M. L.; Seiwert, S. D.; Heidmann, S.; Stuart, K. (1996): RNA-Editing: a mechanism for gRNA-specified uridylate insertion into precursor mRNA. In: *Science*, Jg. 273, H. 5279, S. 1189–1195.
- Kang, X.; Gao, G.; Rogers, K.; Falick, A. M.; Zhou, S.; Simpson, L. (2006): Reconstitution of full-round uridine-deletion RNA-Editing with three recombinant proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 103, H. 38, S. 13944–13949.
- Kierzek, R.; Kopp, D. W.; Edmonds, M.; Caruthers, M. H. (1986): Chemical synthesis of branched RNA. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 14, H. 12, S. 4751–4764.
- Köller, J.; Müller, U. F.; Schmid, B.; Missel, A.; Kruff, V.; Stuart, K.; Göringer, H. U. (1997): *Trypanosoma brucei* gBP21. An arginine-rich mitochondrial protein that binds to guide RNA with high affinity. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 272, H. 6, S. 3749–3757.

- Kudla, J.; Igloi, G. L.; Metzloff, M.; Hagemann, R.; Kössel, H. (1992): RNA-Editing in tobacco chloroplasts leads to the formation of a translatable psbL mRNA by a C to U substitution within the initiation Kodon. In: *The EMBO Journal*, Jg. 11, H. 3, S. 1099–1103.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*, Jg. 227, H. 5259, S. 680–685.
- Lambert, L.; Müller, U. F.; Souza, A. E.; Göringer, H. U. (1999): The involvement of gRNA-binding protein gBP21 in RNA-Editing- an in vitro and in vivo analysis. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 27, H. 6, S. 1429–1436.
- Madison-Antenucci, S.; Hajduk, S. L. (2001): RNA-Editing-associated protein 1 is an RNA binding protein with specificity for preedited mRNA. In: *Molecular Cell*, Jg. 7, H. 4, S. 879–886.
- Madison-Antenucci, S.; Sabatini, R. S.; Pollard, V. W.; Hajduk, S. L. (1999): Kinetoplastid RNA-editing-associated protein 1 (REAP-1): a novel editing complex protein with repetitive domains. In: *The EMBO Journal*, Jg. 17, H. 21, S. 6368–6376.
- Madison-Antenucci, S.; Grams, J.; Hajduk, S. L. (2002): Editing machines: the complexities of trypanosome RNA-Editing. In: *Cell*, Jg. 108, H. 4, S. 435–438.
- Mahendran, R.; Spottswood, M. R.; Miller, D. L. (1991): RNA-Editing by cytidine insertion in mitochondria of *Physarum polycephalum*. In: *Nature*, Jg. 349, H. 6308, S. 434–438.
- Mano, I.; Teichberg, V. I. (1998): A tetrameric subunit stoichiometry for a glutamate receptor-channel complex. In: *Neuroreport*, Jg. 9, H. 2, S. 327–331.
- Maslov, D. A.; Simpson, L. (1992): The polarity of editing within a multiple gRNA-mediated domain is due to formation of anchors for upstream gRNAs by downstream editing. In: *Cell*, Jg. 70, H. 3, S. 459–467.
- Mc Manus, M. T.; Shimamura, M.; Grams, J.; Hajduk, S. L. (2001): Identification of candidate mitochondrial RNA-Editing ligases from *Trypanosoma brucei*. In: *RNA*, Jg. 7, H. 2, S. 167–175.
- Melcher, T.; Maas, S.; Higuchi, M.; Keller, W.; Seeburg, P. H. (1995): Editing of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR-B pre-mRNA in vitro reveals site-selective adenosine to inosine conversion. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 270, H. 15, S. 8566–8570.
- Miller, M. M.; Read, L. K. (2003): *Trypanosoma brucei*: functions of RBP16 cold shock and RGG domains in macromolecular interactions. In: *Experimental Parasitology*, H. 105, S. 140–148.
- Missel, A.; Göringer, H. U. (1994): *Trypanosoma brucei* mitochondria contain RNA helicase activity. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 22, H. 20, S. 4050–4056.
- Missel, A.; Nörskau, G.; Shu, H. H.; Göringer, H. U. (1997): A putative RNA helicase of the DEAD box family from *Trypanosoma brucei*. In: *Molecular and Biochemical Parasitology*, Jg. 75, H. 1, S. 123–126.
- Missel, A.; Nörskau, G.; Shu, H. H.; Göringer, H. U. (1997): A putative RNA helicase of the DEAD box family from *Trypanosoma brucei*. In: *Molecular and Biochemical Parasitology*, Jg. 75, H. 1, S. 123–126.
- Moazed, D.; Noller, H. F. (1987): Interaction of antibiotics with functional sites in 16 S ribosomal RNA. In: *Nature*, Jg. 327, H. 6121, S. 389–394.

- Missel, A.; Souza, A. E.; Nörskau, G.; Göringer, H. U. (1997): Disruption of a gene encoding a novel mitochondrial DEAD-box protein in *Trypanosoma brucei* affects edited mRNAs. In: Molecular and Cellular Biology, Jg. 17, H. 9, S. 4895–4903.
- Moss, B.; Koczot, F. (1976): Sequence of methylated nucleotides at the 5'-terminus of adenovirus-specific RNA. In: Journal of Virology, Jg. 17, H. 2, S. 385–392.
- Müller, U. F.; Lambert, L.; Göringer, H. U. (2001): Annealing of RNA-Editing substrates facilitated by guide RNA-binding protein gBP21. In: The EMBO Journal, Jg. 20, H. 6, S. 1394–1404.
- Müller, U. F.; Göringer, H. U. (2002): Mechanism of the gBP21-mediated RNA/RNA annealing reaction: matchmaking and charge reduction. In: Nucleic Acids Research, Jg. 30, H. 2, S. 447–455.
- Murray, V. (1989): Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. In: Nucleic Acids Research, Jg. 21, H. 17, S. 8889.
- Chen, S. H.; Habib, G.; Yang, C. Y.; Gu, Z. W.; Lee, B. R.; Weng, S. A. et al. (1987): Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop Kodon. In: Science, Jg. 238, H. 4825, S. 363–366.
- Ochsenreiter, T.; Cipriano, M.; Hajduk, S. L. (2006): KISS: the kinetoplastid RNA-Editing sequence search tool. In: RNA, Jg. 13, H. 1, S. 1–4.
- Panigrahi, A. K.; Allen, T. E.; Stuart, K.; Haynes, P. A.; Gygi, S. P. (2003): Mass spectrometric analysis of the editosome and other multiprotein complexes in *Trypanosoma brucei*. In: Journal of the American Society for Mass Spectrometry, Jg. 14, H. 7, S. 728–735.
- Panigrahi, A. K.; Ernst, N. L.; Domingo, G. J.; Fleck, M.; Salavati, R.; Stuart, K. D. (2006): Compositionally and functionally distinct editosomes in *Trypanosoma brucei*. In: RNA, Jg. 12, H. 6, S. 1038–1049.
- Panigrahi, A. K.; Schnauffer, A.; Ernst, N. L.; Wang, B.; Carmean, N.; Salavati, R.; Stuart, K. (2003): Identification of novel components of *Trypanosoma brucei* editosomes. In: RNA, Jg. 9, H. 4, S. 484–492.
- Pelletier, M.; Miller, M. M.; Read, L. K. (2000): RNA-binding properties of the mitochondrial Y-box protein RBP16. In: Nucleic Acids Research, Jg. 28, H. 5, S. 1266–1275.
- Pelletier, M.; Read, L. K. (2003): RBP16 is a multifunctional gene regulatory protein involved in editing and stabilization of specific mitochondrial mRNAs in *Trypanosoma brucei*. In: RNA, Jg. 9, H. 4, S. 457–468.
- Pollard, V. W.; Harris, M. E.; Hajduk, S. L. (1992): Native mRNA-Editing complexes from *Trypanosoma brucei* mitochondria. In: The EMBO Journal, Jg. 11, H. 12, S. 4429–4438.
- Pollard, V. W.; Rohrer, S. P.; Michelotti, E. F.; Hancock, K.; Hajduk, S. L. (1990): Organization of minicircle genes for guide RNAs in *Trypanosoma brucei*. In: Cell, Jg. 63, H. 4, S. 783–790.
- Polson, A. G.; Crain, P. F.; Pomerantz, S. C.; McCloskey, J. A.; Bass, B. L. (1991): The mechanism of adenosine to inosine conversion by the double-stranded RNA unwinding/modifying activity: a high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis. In: Biochemistry, Jg. 30, H. 49, S. 11507–11514.
- Powell, L. M.; Wallis, S. C.; Pease, R. J.; Edwards, Y. H.; Knott, T. J.; Scott, J. (1987): A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. In: Cell, Jg. 50, H. 6, S. 831–840.

- Radermacher, M. (1989): Three-dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series. In: *Journal of Electron Microscopy Technique*, Jg. 9, H. 4, S. 359–394.
- Rigaut, G.; Shevchenko, A.; Rutz, B.; Wilm, M.; Mann, M.; Séraphin, B. (1999): A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. In: *Nature Biotechnology*, Jg. 17, H. 10, S. 1030–1032.
- Riley, G. R.; Corell, R. A.; Stuart, K. (1994): Multiple guide RNAs for identical editing of *Trypanosoma brucei* apocytochrome b mRNA have an unusual minicircle location and are developmentally regulated. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 269, H. 8, S. 6101–6108.
- Rogers, K.; Gao, G.; Simpson, L. (2007): Uridylate-specific 3' 5'-exoribonucleases involved in uridylate-deletion RNA-Editing in trypanosomatid mitochondria. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 282, H. 40, S. 29073–29080.
- Rusché, L. N.; Cruz-Reyes, J.; Piller, K. J.; Sollner-Webb, B. (1997): Purification of a functional enzymatic editing complex from *Trypanosoma brucei* mitochondria. In: *The EMBO Journal*, Jg. 16, H. 13, S. 4069–4081.
- Rusché, L. N.; Huang, C. E.; Piller, K. J.; Hemann, M.; Wirtz, E.; Sollner-Webb, B. (2001): The two RNA ligases of the *Trypanosoma brucei* RNA-Editing complex: cloning the essential band IV gene and identifying the band V gene. In: *Molecular and Cellular Biology*, Jg. 21, H. 4, S. 979–989.
- Salavati, R.; Ernst, N. L.; O'Rear, J.; Gilliam, T.; Tarun, S., Jr.; Stuart, K. (2006): KREPA4, an RNA binding protein essential for editosome integrity and survival of *Trypanosoma brucei*. In: *RNA*, Jg. 12, H. 5, S. 819–831.
- Sambrook, J.; Russell, D. W. (2001): *Molecular cloning: A laboratory manual – 3. ed.* - Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-577-3.
- Sander, B.; Golas, M. M.; Stark, H. (2003): Automatic CTF correction for single particles based upon multivariate statistical analysis of individual power spectra. In: *Journal of Structural Biology*, Jg. 142, H. 3, S. 392–401.
- Sander, B.; Golas, M. M.; Stark, H. (2005): Advantages of CCD detectors for de novo three-dimensional structure determination in single-particle electron microscopy. In: *Journal of Structural Biology*, Jg. 151, H. 1, S. 92–105.
- Sander, B.; Golas, M. M.; Makarov, E. M.; Brahms, H.; Kastner, B.; Lührmann, R.; Stark, H. (2006): Organization of core spliceosomal components U5 snRNA loop I and U4/U6 Di-snRNP within U4/U6.U5 Tri-snRNP as revealed by electron cryomicroscopy. In: *Molecular Cell*, Jg. 24, H. 2, S. 267–278.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1992): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Biotechnology*, Jg. 24, S. 104–108.
- Sbicego, S.; Alfonzo, J. D.; Estévez, A. M.; Rubio, M. A. T.; Kang, X.; Turck, C. W.; Peris, M.; Simpson, L. (2003): RBP38, a novel RNA-binding protein from trypanosomatid mitochondria, modulates RNA stability. In: *Eukaryotic Cell*, Jg. 2, H. 3, S. 560–568.
- Schmid, B.; Riley, G. R.; Stuart, K.; Göringer, H. U. (1995): The secondary structure of guide RNA molecules from *Trypanosoma brucei*. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 23, H. 16, S. 3093–3102.
- Schnauffer, A.; Ernst, N. L.; Palazzo, S. S.; O'Rear, J.; Salavati, R.; Stuart, K. (2003): Separate insertion and deletion subcomplexes of the *Trypanosoma brucei* RNA-Editing complex. In: *Molecular Cell*, Jg. 12, H. 2, S. 307–319.

- Schumacher, M. A.; Karamooz, E.; Zíková, A.; Trantírek, L.; Lukes, J. (2006): Crystal structures of *T. brucei* MRP1/MRP2 guide-RNA binding complex reveal RNA matchmaking mechanism. In: *Cell*, Jg. 126, H. 4, S. 701–711.
- Seiwert, S. D.; Stuart, K. (1994): RNA-Editing: transfer of genetic information from gRNA to precursor mRNA in vitro. In: *Science*, Jg. 266, H. 5182, S. 114–117.
- Sharp, P. A.; Sugden, B.; Sambrook, J. (1973): Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. In: *Biochemistry*, Jg. 12, H. 16, S. 3055–3063.
- Sherman, D. R.; Janz, L.; Hug, M.; Clayton, C. (1991): Anatomy of the *parp* gene promoter of *Trypanosoma brucei*. In: *The EMBO Journal*, Jg. 10, H. 11, S. 3379–3386.
- Simpson, L.; Shaw, J.; Campbell, D.; Bakalara, N. (1989): RNA-Editing-a novel RNA processing phenomenon in trypanosome mitochondria. In: *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Jg. 83 Suppl 1, S. 243.
- Simpson, L.; Wang, S. H.; Thiemann, O. H.; Alfonzo, J. D.; Maslov, D. A.; Avila, H. A. (1998): U-insertion/deletion Edited Sequence Database. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 26, H. 1, S. 170–176.
- Souza, A. E.; Göringer, H. U. (1998): The guide RNA database. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 26, H. 1, S. 168–169.
- Souza, A. E.; Hermann, T.; Göringer, H. U. (1997): The guide RNA database. In: *Nucleic Acids Research*, Jg. 25, H. 1, S. 104–106.
- Sowden, M.; Hamm, J. K.; Spinelli, S.; Smith, H. C. (1996): Determinants involved in regulating the proportion of edited apolipoprotein B RNAs. In: *RNA*, Jg. 2, H. 3, S. 274–288.
- Sowden, M. P.; Smith, H. C. (2001): Commitment of apolipoprotein B RNA to the splicing pathway regulates cytidine-to-uridine editing-site utilization. In: *The Biochemical Journal*, Jg. 359, H. Pt 3, S. 697–705.
- Steinberg, T. H.; Jones, L. J.; Haugland, R. P.; Singer, V. L. (1996): SYPRO orange and SYPRO red protein gel stains: one-step fluorescent staining of denaturing gels for detection of nanogram levels of protein. In: *Analytical Biochemistry*, Jg. 239, H. 2, S. 223–237.
- Stuart, K.; Allen, T. E.; Heidmann, S.; Seiwert, S. D. (1997): RNA-Editing in kinetoplastid protozoa. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Jg. 61, H. 1, S. 105–120.
- Stuart, K. D.; Schnauffer, A.; Ernst, N. L.; Panigrahi, A. K. (2005): Complex management: RNA-Editing in trypanosomes. In: *Trends in Biochemical Sciences*, Jg. 30, H. 2, S. 97–105.
- Tarun, S. Z., Jr.; Schnauffer, A.; Ernst, N. L.; Proff, R.; Deng, J.; Hol, W.; Stuart, K. (2008): KREPA6 is an RNA-binding protein essential for editosome integrity and survival of *Trypanosoma brucei*. In: *RNA*, Jg. 14, H. 2, S. 347–358.
- ten Asbroek, A. L.; Mol, C. A.; Kieft, R.; Borst, P. (1993): Stable transformation of *Trypanosoma brucei*. In: *Molecular and Biochemical parasitology*, Jg. 59, H. 1, S. 133–142.
- Teng, B.; Burant, C. F.; Davidson, N. O. (1993): Molecular cloning of an apolipoprotein B messenger RNA-Editing protein. In: *Science*, Jg. 260, H. 5115, S. 1816–1819.

- Thomas, S. M.; Lamb, R. A.; Paterson, R. G. (1988): Two mRNAs that differ by two nontemplated nucleotides encode the amino coterminal proteins P and V of the paramyxovirus SV5. In: *Cell*, Jg. 54, H. 6, S. 891–902.
- Tielens, A. G.; Van Hellemond, J. J. (2006): Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. In: *Parasitology today*, Jg. 14, H. 7, S. 265–272.
- Trotter, J. R.; Ernst, N. L.; Carnes, J.; Panicucci, B.; Stuart, K. (2005): A deletion site editing endonuclease in *Trypanosoma brucei*. In: *Molecular Cell*, Jg. 20, H. 3, S. 403–412.
- van der Spek, H.; Arts, G. J.; Zwaal, R. R.; van den Burg, J.; Sloof, P.; Benne, R. (1991): Conserved genes encode guide RNAs in mitochondria of *Crithidia fasciculata*. In: *The EMBO Journal*, Jg. 10, H. 5, S. 1217–1224.
- van Heel, M.; Harauz, G.; Orlova, E. V.; Schmidt, R.; Schatz, M. (1996): A new generation of the IMAGIC image processing system. In: *Journal of Structural Biology*, Jg. 116, H. 1, S. 17–24.
- Vidal, S.; Curran, J.; Kolakofsky, D. (1990): A stuttering model for paramyxovirus P mRNA-Editing. In: *The EMBO Journal*, Jg. 9, H. 6, S. 2017–2022.
- Visomirski-Robic, L. M.; Gott, J. M. (1997): Insertional editing in isolated *Physarum* mitochondria is linked to RNA synthesis. In: *RNA*, Jg. 3, H. 8, S. 821–837.
- von Ahsen, U.; Davies, J.; Schroeder, R. (1991): Antibiotic inhibition of group I ribozyme function. In: *Nature*, Jg. 353, H. 6342, S. 368–370.
- Wang, S. S.; Mahendran, R.; Miller, D. L. (1999): Editing of cytochrome b mRNA in *physarum* mitochondria. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 274, H. 5, S. 2725–2731.
- Weiss, B.; Jacquemin-Sablon, A.; Live, T. R.; Fareed, G. C.; Richardson, C. C. (1968): Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 243, H. 17, S. 4543–4555.
- Wirtz, E.; Leal, S.; Ochatt, C.; Cross, G. A. (1999): A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. In: *Molecular and Biochemical Parasitology*, Jg. 99, H. 1, S. 89–101.
- WHO: African trypanosomiasis Fact sheet No. 259 (August 2006). World Health Organisation. [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/)
- Yu, W.; Schuster, W. (1995): Evidence for a site-specific cytidine deamination reaction involved in C to U RNA-Editing of plant mitochondria. In: *The Journal of Biological Chemistry*, Jg. 270, H. 31, S. 18227–18233.
- Yusupov, M. M.; Yusupova, G. Z.; Baucom, A.; Lieberman, K.; Earnest, T. N.; Cate, J. H.; Noller, H. F. (2001): Crystal structure of the ribosome at 5.5 Å resolution. In: *Science*, Jg. 292, H. 5518, S. 883–896.

## 9 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
%	Prozent
$\varepsilon$	molarer dekadischer Extinktionskoeffizient
$\lambda$	Wellenlänge
<	kleiner
>	größer
Abb.	Abbildung
ApoB	Apolipoprotein B
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserum-Albumin
Bleo	Bleomycin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Cal	Calmodulin
CBP	Calmodulin-Bindepeptid
Ci	Curie
cpm	<i>counts per minute</i> = Impulse pro Minute
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et alterii</i> = und andere
FCS	fötales Kälberserum
FSC	<i>fourier shell correlation</i>
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
GG	Glyceringradient
gRNA	<i>guide</i> RNA
GT	Guanylyl-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
IGL	<i>immunogold labeling</i>
kbp	Kilobasenpaare

## Abkürzungen

---

K <sub>d</sub>	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KS	Klassensumme
MALDI-ToF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight</i>
ML	mitochondriales Lysat
MRA	<i>multireference alignment</i>
MRP	<i>mitochondrial RNA-binding protein</i>
MSA	<i>multivariate statistical analysis</i>
m/z	Masse/Ladungsverhältnis
NP40	Nonidet P-40
NS	Nukleinsäure
nt	Nukleotide
NTP	Nukleosid-5'-triphosphat
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PARP	<i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	<i>precleaved deletion assay</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIA	<i>precleaved insertion assay</i>
PNK	Polynukleotidkinase
Prot.A	Protein A aus <i>Staphylococcus aureus</i>
RCT	<i>random conical tilt</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
T	Temperatur
TAP	<i>tandem affinity purification</i>
<i>T. brucei</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
Tet	Tetracyclin
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	<i>tobacco etch virus</i>
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt
tRNA	transfer-RNA

## Abkürzungen

---

TUTase	Terminale Uridylyl-Transferase
U	Uridylatrest
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## **10 Eidesstattliche Erklärung**

Hierdurch erkläre ich an Eides Statt, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe. Die vorliegende Dissertation habe ich selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt.

Darmstadt, den 14. Mai 2008

Cordula Böhm

## 11 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Cordula Michaela Böhm  
geboren: 20.02.1976  
in: Rüsselsheim

### Schulbildung

1982 – 1986 Grundschule, Georg Büchner Schule in Goddelau  
1986 – 1988 Förderstufe, Martin Niemöller-Schule in Goddelau  
1988 – 1995 Gymnasium Gernsheim  
1995 Allgemeine Hochschulreife

### Universitätsausbildung

1996 – 2002 Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt  
03/1999 Vordiplom Biologie  
04/2002 – 12/2002 Anfertigung der Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr. H. U. Göringer am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Darmstadt.  
Titel: Charakterisierung des editosomalen RNP-Komplexes in afrikanischen Trypanosomen  
12/2002 Abschluss des Studiums der Biologie als Diplom-Biologin an der Technischen Universität Darmstadt.  
07/2003– 05/2008 Anfertigung der Dissertation im Labor von Prof. Dr. H. U. Göringer am Institut für Mikrobiologie und Genetik der Technischen Universität Darmstadt.  
Titel: Die dreidimensionale Struktur nativer Editosomen aus afrikanischen Trypanosomen

## 12 Danksagung

### Danke...

**Uli Göringer**, für die Betreuung dieser Arbeit, für den Enthusiasmus, die Anregungen und Ideen und auch für die Kritik.

**Felicitas Pfeifer**, für die spontane und unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens für diese Arbeit.

**Michael Brecht**, für die vielen Jahre gemeinsamer Arbeit, Frustration, Erfolgserlebnisse, ... an unserem gemeinsamen Projekt.

**Kerstin Effenberger**, für die harte Arbeit und den Optimismus, der auch zwischen unzähligen Litern Medium und unzähligen Mitopräps nie verloren ging.

**Monika Golas, Björn Sander und Holger Stark**, für die ersten Bilder und die 3D-Struktur der Editosomen.

**Helena Schwaßmann** und der **AG Dencher**, für die Hilfe bei den MALDI-ToF-Analysen.

**Alexander Best, Anne Fuß, Mathias Homann, Heike Kaibel, Elisabeth Kruse, Elke Schlüter, Kerstin Weitzel**, und allen **Diplomanden** und **Praktikanten**, dafür dass ich jeden Tag gerne ins Labor gekommen bin.

**Sabrina Fröhls, Moritz Niemann** und ganz besonders **Annette Adler**, für geteilte Freude über Erfolgserlebnisse und tröstende Worte in den harten Zeiten einer Promotion.

**meinen Eltern**, für Ihre Unterstützung und den unerschütterlichen Glauben an mich.