

**Untersuchung des RNA-Editings in Pflanzenorganellen:  
Entwicklung eines Verfahrens zur Identifizierung  
von *cis*-Elementen am Beispiel der *atp9*-RNA  
in *in vitro*- und *in organello*-Systemen**

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades**  
vorgelegt am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

von Helma Heisler

Berlin 2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Schmülling
2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Schuster

Tag der Disputation: 11.02.2003

Die vorliegende Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Stiftung Stipendien-Fonds des Verbandes der Chemischen Industrie gefördert.

# INHALTSVERZEICHNIS

|  |    |
|--|----|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....   | IV |
| 1 EINLEITUNG.....  | 1  |
| 1.1 Uridin-Insertion und Deletion bei Trypanosomen .....                               | 2  |
| 1.2 Guanosin-Insertion bei Paramyxoviren .....   | 3  |
| 1.3 Nucleotid-Insertion bei <i>Physarum polycephalum</i> .....                         | 4  |
| 1.4 Adenosin-Desaminierung bei der mRNA des Säugetier-Glutamatrezeptors.....           | 4  |
| 1.5 Cytidin-Desaminierung bei der Apolipoprotein B-mRNA von Säugern .....              | 6  |
| 1.6 RNA-Editing in Pflanzen.....   | 8  |
| 1.6.1 Funktion des RNA-Editings in Pflanzen.....                                       | 9  |
| 1.6.2 Zeitpunkt des RNA-Editings innerhalb der Genexpression .....                     | 10 |
| 1.6.3 Mechanismus der Editingreaktion .....  | 11 |
| 1.6.4 Erkennung der Editingstelle.....   | 12 |
| 1.6.4.1 Erkennung von <i>cis</i> -Elementen der RNA durch <i>trans</i> -Faktoren ..... | 14 |
| 1.6.5 Evolutionäre Aspekte des RNA-Editings.....                                       | 19 |
| 1.7 Bisherige RNA-Editing-Detektionssysteme.....                                       | 20 |
| 1.8 Ziel der Arbeit .....  | 22 |
| 2 MATERIAL.....  | 24 |
| 2.1 Materialien und Chemikalien.....   | 24 |
| 2.2 Pufferlösungen und Bakterienmedien .....   | 26 |
| 2.3 Enzyme und Kits .....  | 26 |
| 2.4 Versuchspflanzen und Organismen .....  | 28 |
| 2.5 Vektoren und DNA-Längenstandards .....   | 28 |
| 2.6 Geräte.....  | 29 |
| 3 METHODEN .....   | 30 |
| 3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Erbse.....   | 30 |
| 3.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Erbse .....  | 30 |
| 3.3 <i>In vitro</i> -Transkription .....   | 30 |
| 3.4 Reverse Transkription .....  | 31 |
| 3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR).....  | 31 |
| 3.6 Restriktionsverdau.....  | 31 |

---

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.7      | Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....                                       | 32 |
| 3.8      | Gelelektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren.....                         | 32 |
| 3.9      | Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....                                 | 32 |
| 3.10     | Ligation von DNA-Fragmenten.....   | 32 |
| 3.10.1   | Ligation von PCR-Produkten über die TA-Überhang-Methode.....                     | 33 |
| 3.11     | Transformation von Bakterien.....  | 33 |
| 3.11.1   | Herstellung kompetenter Zellen.....  | 33 |
| 3.12     | Plasmidisolierung.....   | 34 |
| 3.13     | DNA-Sequenzierung.....   | 34 |
| 3.14     | Radioaktive Markierung von Oligonucleotiden.....                                 | 35 |
| 3.15     | Detektion radioaktiv markierter Nucleinsäuren.....                               | 35 |
| 3.16     | Insertionsmutagenese.....  | 36 |
| 3.16.1   | Herstellung der Transprimer-Insertionsmutanten.....                              | 36 |
| 3.17     | Mitochondrienpräparation aus Kartoffel und Erbse.....                            | 37 |
| 3.17.1   | DNA-Präparation aus isolierten Mitochondrien.....                                | 38 |
| 3.17.2   | RNA-Präparation aus isolierten Mitochondrien.....                                | 38 |
| 3.18     | Präparation von Erbsenchloroplasten.....   | 38 |
| 3.19     | Das <i>in vitro</i> -RNA-Editingsystem.....                                      | 39 |
| 3.19.1   | Herstellung editingaktiver Mitochondrienlysate.....                              | 39 |
| 3.19.2   | Herstellung editingaktiver Chloroplastenlysate.....                              | 39 |
| 3.19.3   | Inkubation von RNA-Template und Lysat.....                                       | 40 |
| 3.19.3.1 | Kompetitionsanalyse mit Oligonucleotiden.....                                    | 40 |
| 3.20     | Das <i>in organello</i> -RNA-Editingsystem.....                                  | 40 |
| 3.21     | Die „Gap“-Ligation als RNA-Editing-Detektionssystem.....                         | 41 |
| 3.21.1   | Durchführung der „Gap“-Ligation.....   | 42 |
| 3.22     | Die Primer-Ligation als RNA-Editing-Detektionssystem.....                        | 43 |
| 3.22.1   | Durchführung der Primer-Ligation.....  | 44 |
| 4        | ERGEBNISSE.....  | 45 |
| 4.1      | Die „Gap“-Ligation als RNA-Editing-Detektionssystem.....                         | 45 |
| 4.1.1    | Die Entwicklung der Primer-Ligation.....   | 49 |
| 4.1.2    | Optimierung der Primer-Ligation für die <i>atp9</i> -Sequenz.....                | 51 |
| 4.1.2.1  | Optimierung der Primer-Ligation für die <i>atp9</i> -Sequenz aus Kartoffel... 51 | 51 |

---

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 4.1.2.2 | Optimierung der Primer-Ligation für die <i>atp9</i> -Sequenz aus Erbse.....                     | 53  |
| 4.1.3   | Sensitivität der Primer-Ligation.....   | 54  |
| 4.2     | Das <i>in vitro</i> -RNA-Editingsystem.....   | 55  |
| 4.2.1   | Mitochondriales <i>in vitro</i> -RNA-Editingsystem der Kartoffel.....                           | 57  |
| 4.2.2   | Mitochondriales <i>in vitro</i> -RNA-Editingsystem der Erbse .....                              | 59  |
| 4.2.3   | RNA-Editing im heterologen <i>in vitro</i> -System .....  | 60  |
| 4.2.3.1 | Vergleich des <i>atp9</i> -Gens aus Kartoffel und Erbse.....                                    | 61  |
| 4.3     | Identifizierung funktioneller Bereiche der <i>atp9</i> -RNA .....                               | 63  |
| 4.3.1   | Kompetitionsanalyse zur Identifizierung von <i>cis</i> -Elementen.....                          | 63  |
| 4.3.2   | Mutagenese des <i>atp9</i> -Templates aus Erbse.....  | 67  |
| 4.4     | Chloroplasten- <i>in vitro</i> -RNA-Editingsystem der Erbse .....                               | 71  |
| 4.5     | RNA-Editing in organellenheterologen Ansätzen.....  | 74  |
| 4.6     | Das <i>in organello</i> -RNA-Editingsystem .....  | 76  |
| 5       | DISKUSSION.....   | 80  |
| 5.1     | Entwicklung der Primer-Ligation als RNA-Editing-Detektionssystem .....                          | 80  |
| 5.2     | Etablierung mitochondrialer <i>in vitro</i> -Systeme aus Kartoffel und Erbse.....               | 82  |
| 5.3     | Vergleich der <i>in vitro</i> -RNA-Editingsysteme aus Kartoffel und Erbse.....                  | 83  |
| 5.4     | Erbse und Kartoffel – gemeinsame Editingfaktoren für die <i>atp9</i> -RNA.....                  | 84  |
| 5.5     | Identifizierung eines essentiellen <i>cis</i> -Elementes für das <i>atp9</i> -RNA-Editing ..... | 85  |
| 5.6     | Die Relevanz des Abstands zwischen <i>cis</i> -Element und Editingstelle .....                  | 89  |
| 5.7     | Modell zur Auswahl eines Cytidins für das RNA-Editing .....                                     | 91  |
| 5.8     | Organellenheterologes RNA-Editing .....   | 92  |
| 5.9     | Ausblick.....   | 94  |
| 6       | ZUSAMMENFASSUNG.....  | 95  |
| 7       | SUMMARY.....  | 96  |
| 8       | LITERATUR .....   | 97  |
| 9       | ANHANG .....  | 108 |
| 9.1     | Primer für die (RT-)PCR.....  | 108 |
| 9.2     | Sequenzierprimer .....  | 108 |
| 9.3     | Primer für die Primer-Ligation .....  | 109 |
|         | PUBLIKATIONEN.....  | 110 |
|         | LEBENS LAUF.....  | 111 |
|         | DANKSAGUNG.....   | 113 |

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|          |  |
|----------|--|
| % (w/v)  | Prozentgehalt Masse am Gesamtvolumen (g/ 100ml)                |
| %        | Prozentgehalt Volumen am Gesamtvolumen (ml/ 100ml)             |
| A        | Adenosin   |
| Ac       | Acetat   |
| ACF      | engl.: APOBEC-1 complementation factor                         |
| ADAR     | engl.: adenosine deaminase that act on RNA                     |
| AMPA     | $\alpha$ -Amino-3-hydroxyl-5-methyl-isoaxol-4-propionat        |
| ApoB     | Apolipoprotein B   |
| APOBEC-1 | engl.: <i>apoB</i> mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 1 |
| ATP      | Adenosin-5'-Triphosphat  |
| A-zu-I   | Adenosin zu Inosin   |
| bp       | Basenpaare   |
| BSA      | Rinderserumalbumin   |
| C        | Cytidin  |
| cDNA     | „complementary“ DNA  |
| CTP      | Cytidin-5'-Triphosphat   |
| C-zu-U   | Cytidin zu Uridin  |
| dATP     | Desoxyadenosin-5'-Triphosphat                                  |
| dCTP     | Desoxycytidin-5'-Triphosphat                                   |
| dGTP     | Desoxyguanosin-5'-Triphosphat                                  |
| DEPC     | Diethylpyrocarbonat  |
| DNA      | Desoxyribonucleinsäure   |
| dNTP     | Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)   |
| dsRBM    | dsRNA-Bindungsmotiv  |
| dsRNA    | doppelsträngige RNA  |
| DTT      | Dithiothreitol   |
| dTTP     | Desoxythymidin-5'-Triphosphat                                  |
| engl.    | aus dem Englischen   |
| G        | Glycin   |
| GluR     | Glutamatrezeptor   |
| gRNA     | „Guide“-RNA  |
| GTP      | Guanosin-5'-Triphosphat  |

---

|        |   |
|--------|---|
| HEPES  | N-[2-Hydroxymethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] |
| LDL    | engl.: low-density lipoprotein                        |
| MES    | 2-[N-Morpholino]-ethansulfonsäure                     |
| MOPS   | 3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure                    |
| mRNA   | „Messenger“-RNA                                       |
| nt     | Nucleotide  |
| NTP    | Ribonucleosid-5'-Triphosphate (ATP, CTP, GTP, TTP)    |
| PAA    | Polyacrylamid   |
| PCR    | Polymerasekettenreaktion                              |
| PEG    | Polyethylenglycol                                     |
| PIPES  | Piperazin-1,4-bis-[2-ethansulfonsäure]                |
| PMSF   | Phenylmethylsulfonylfluorid                           |
| PVP    | Polyvinylpyrrolidon                                   |
| Q/R    | Austausch von Glutamin gegen Arginin                  |
| R/G    | Austausch von Arginin gegen Glycin                    |
| RNA    | Ribonucleinsäure                                      |
| rRNA   | ribosomale RNA  |
| RT-PCR | Reverse Transkriptions-PCR                            |
| S100   | Überstand der Zentrifugation bei 100.000g             |
| S60    | Überstand der Zentrifugation bei 60.000g              |
| T      | Thymidin  |
| TEMED  | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin                    |
| Tris   | 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol                |
| tRNA   | Transfer-RNA  |
| T-zu-C | Thymidin zu Cytidin                                   |
| U      | Uridin  |
| UTP    | Uridin-5'-Triphosphat                                 |
| U-zu-C | Uridin zu Cytidin                                     |
| VLDL   | engl.: very low-density lipoprotein                   |