

3 METHODEN

3.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus Erbse

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Erbse wurde mittels des Qiagen RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Durch Bindung an die mitgelieferten Anionenaustauschersäulen und anschließendes Waschen der Säule mit einem KCl-Gradienten wurden die Nucleinsäuren fraktioniert. RNAs eluieren bei einer KCl-Konzentration zwischen 0,45 M (tRNAs) und 1,1 M (rRNAs).

Für die RNA-Präparation wurde 200 mg Blattmaterial von 9 Tage alten Erbsenpflanzen eingesetzt. Dieses wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff im Mörser aufgeschlossen und entsprechend den Angaben des Herstellers (Qiagen) weiterbearbeitet.

3.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Erbse

Die Isolierung der Gesamt-DNA aus Erbse wurde mit dem Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Die Methode beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Gesamt-RNA-Isolierung (vgl. 3.1). Es wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

3.3 *In vitro*-Transkription

Bei der *in vitro*-Transkription wird mittels einer DNA-abhängigen Phagen-RNA-Polymerase (z.B T7 oder SP6) in einem zellfreien System ein RNA-Strang synthetisiert. Voraussetzung dafür ist ein 5' der zu transkribierenden Sequenz gelegener entsprechender phagenspezifischer Promotor.

Die *in vitro*-Transkription wurde mittels des T7-Phagen-Systems in einem Volumen von 20 μ l durchgeführt. Es wurden 5 pmol linearisierte DNA eingesetzt, auf ein Volumen von 10,5 μ l mit DEPC-behandeltem *Aqua bidest* aufgefüllt, mit 4 μ l NTP-Mix (je 10 mM ATP, CTP, GTP, UTP), 2 μ l des vom Hersteller (Q-BIOgene) empfohlenen 10fach Transkriptionspuffers und 0,5 U RNase-Inhibitor (40 U/ μ l) versetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μ l T7-RNA-Polymerase (20 U/ μ l) gestartet und bei 37 °C für 2 h inkubiert. Es folgte ein 20minütiger DNase I-Verdau bei 37 °C, für den 15 U RNase-freie DNase I zu dem *in vitro*-Transkriptionsansatz zugesetzt wurde. Nach anschließender Denaturierung der DNase I bei 70 °C für 15 min wurde die RNA über Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert und ethanolpräzipitiert.

3.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription dient dem Umschreiben einer RNA in eine einzelsträngige DNA-Sequenz. Sie wird nach ihrem Produkt, der cDNA („complementary“ DNA) auch als cDNA-Synthese bezeichnet. Als Templates kamen sowohl aus Gewebe isolierte RNAs als auch *in vitro*-Transkripte zum Einsatz. Als Primer wurden ausschließlich sequenzspezifische Primer verwendet. Für einen Standardansatz von 20 µl wurde die RNA auf ein Volumen von 12,5 µl mit DEPC-behandeltem *Aqua bidest* aufgefüllt, mit 0,5 µl Primer (20 pmol) versetzt und 5 min bei 70 °C denaturiert. Anschließend wurden 4 µl des vom Hersteller (MBI Fermentas, Q-BIOgene) angegebenen 5fach Puffers, 2 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 0,5 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) zugesetzt. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37 °C folgte der Zusatz von 0,5 µl M-MuLV-Reverser Transkriptase (40 U/µl). Die cDNA-Synthese wurde bei 42 °C für 60 min durchgeführt. Zur Denaturierung des Enzyms wurde bei 70 °C für 10 min inkubiert. Im Anschluß wurde ein RNase A-Verdau für 5 min bei 37 °C vorgenommen. Dem cDNA-Syntheseansatz wurden dazu 4 µg RNase A zugesetzt, die zuvor durch Hitzeinaktivierung (80 °C, 20 min) von möglichen DNase-Kontaminationen befreit wurde.

3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Sequenzen kann aus einzelsträngiger (z.B. cDNA) oder doppelsträngiger DNA erfolgen. Standardmäßig wurden in einem 50 µl-PCR-Ansatz 5-20 ng DNA, je 50 pmol sequenzspezifischer 5'- und 3'-Primer und je 200 µM dGTP, dATP, dCTP und dTTP in dem vom Hersteller (Q-BIOgene) empfohlenen Puffer eingesetzt. Die Reaktion wurde mit 2,5 U *Taq*-Polymerase gestartet.

Nach einem 3minütigen Denaturierungsschritt bei 94 °C folgten 30 Cyclen nach folgendem Temperatur- und Zeitschema: 45 sec Denaturierung bei 94 °C, 1 min bei 45-65 °C (Hybridisierungstemperatur je nach Wahl der Primer), 30-90 sec bei 72 °C (Elongationszeit je nach Länge der zu amplifizierenden DNA).

Zur direkten Klonierung von PCR-Produkten über die TA-Überhang-Methode wurde noch ein weiterer Schritt der Elongation über 10 min bei 72 °C angefügt.

Neben der *Taq*-Polymerase wurde zur DNA-Amplifikation zum Zwecke des Klonierens auch die Biotherm-Polymerase mit „Proof reading“-Funktion (GeneCraft) eingesetzt.

3.6 Restriktionsverdau

DNA-Spaltungen mittels Restriktionsendonukleasen wurden in 15 µl-Standardansätzen nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden die mitgelieferten Puffer verwendet und pro µg DNA und Schnittstelle 1 U Enzym eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei den empfohlenen Temperaturen über 1-16 h.

3.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Im Anschluß an einen Restriktionsverdau wurden die 5'-Termini des gewünschten Fragmentes durch Alkalische Phosphatase („Calf intestinal alkaline phosphatase“) dephosphoryliert. Dazu wurden 3-4 µg DNA (entsprechend 1 pmol freier 5'-Enden) in einem Gesamtvolumen von 30 µl mit 0,02 U Enzym im vom Hersteller (Invitrogen) empfohlenen Dephosphorylierungspuffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Das Enzym wurde abschließend durch Hitze (30 min, 65 °C) in Gegenwart von 5 mM EDTA inaktiviert.

3.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren

DNA wurde je nach Länge über 0,6-2 %ige Agarosegele aufgetrennt (Sambrook & Russell, 2001). Dazu wurden sowohl TAE- als auch TBE-Agarosegele verwendet. Als Elektrophoreselaufpuffer diente entsprechend der zur Bereitung der Gellösung verwendete Puffer TAE- bzw. TBE-Puffer. Als Probenauftragungspuffer wurde ein Puffer mit 10 mM EDTA, pH 8,0, 50 % Glycerol und 0,1 % Bromphenolblau verwendet, der den Proben im Volumenverhältnis 1 : 10 zugesetzt wurde. Die Detektion der DNA erfolgte über die Ethidiumbromid-Färbemethode (Sambrook & Russell, 2001). Für kurze DNA-Fragmente (bis 100 bp) und solche, die sich in ihrer Länge um nur wenige Nucleotide unterscheiden, fanden höher vernetzte denaturierende Polyacrylamid (PAA)-Gele (6-8 %) Anwendung. Diese enthielten neben dem Acrylamid/Bisacrylamid-Mix (19 : 1) zur Denaturierung 7 M Harnstoff in TBE-Puffer und für die Polymerisation 0,05 % (w/v) Ammoniumpersulfat und 0,05 % (v/v) TEMED. Das Gel wurde unbeladen bei 60 W erwärmt, bis es eine für die Auftrennung von DNA-Fragmenten optimale Temperatur von 50 °C erreicht hatte. Die Proben wurden bei 90 °C für 2 min denaturiert, sogleich auf das Gel aufgetragen und der Gellauf bei 60 W fortgeführt. Als Elektrophoresepuffer diente TBE-Puffer.

3.9 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Reinigung eines DNA-Fragments nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau wurde die Probe im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde die DNA unter Verwendung des „Qiaquick Extraction Kit“ nach Angaben des Herstellers (Qiagen) zurückgewonnen.

3.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Für einen Standardligationsansatz von 10 µl wurde zum linearisierten Vektor (10-30 ng) das DNA-Fragment im 3-10fachen molaren Überschuß zugegeben. Dieser Ansatz wurde auf Eis gestellt und mit *Aqua bidest* auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt. Nach Zusatz von 1 µl des vom Hersteller (Q-BIOgene) empfohlenen 10fach Ligasepuffers

wurde die Ligationsreaktion mit 1 µl T4-DNA-Ligase (2,5 U) gestartet. Die Ligation erfolgte bei 14 °C für 4-16 h.

3.10.1 Ligation von PCR-Produkten über die TA-Überhang-Methode

Zur Ligation von PCR-Fragmenten in einen Vektor wurde die TA-Überhang-Methode verwendet. Diese Methode beruht auf der Tatsache, daß die *Taq*-DNA-Polymerase während der Elongation an die 3'-Termini der PCR-Produkte zusätzliche Adenosine anhängt. Jedes beliebige PCR-Produkt kann auf diese Weise mit einem linearisierten Vektor mit komplementären Thymidin-Überhängen verknüpft werden. Solche Vektoren sind kommerziell erhältlich, hier wurde standardmäßig der pCR2.1-Vektor als Bestandteil des TA-Cloning-Kit (Invitrogen) verwendet. Die Ligationsreaktion erfolgte nach Herstellerangaben (Invitrogen).

3.11 Transformation von Bakterien

Die als Transformation bezeichnete Aufnahme von Fremd-DNA in Bakterienzellen wurde durch Hitzeschocktransformation und Elektroporation erzielt.

Die Hitzeschocktransformation wurde nach Cohen *et al.* (1972) durchgeführt. Dazu wurden 50 µl hitzeschockkompetente Zellen zusammen mit 1-5 µl des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 42 °C über 45 sec und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Nach Zugabe von 450 µl des auf 37 °C vorgewärmten LB-Mediums wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C unter Schütteln bei 250 rpm regeneriert. Zur Selektion wurden sie abschließend auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausgestrichen.

Für die Elektroporation wurden 50 µl elektrokompetente Zellen zunächst in einer auf Eis gestellten Elektroporationsküvette (0,2 cm breit) mit der zu transformierenden DNA (1-2 µl des Ligationsansatzes) vorsichtig vermischt. Die Küvette wurde in den Elektroporator gestellt und kurzzeitig ein Spannungsfeld von 15 kV/cm angelegt. Nach Zugabe von 750 µl LB-Medium folgte die Regeneration der Zellen bei 37 °C für 1 h unter Schütteln (250 rpm). Abschließend wurden die Zellen auf antibiotikahaltigen LB-Platten selektiert.

3.11.1 Herstellung kompetenter Zellen

Hitzeschockkompetente Zellen wurden nach der CaCl₂-Methode nach Hanahan *et al.* (1983) hergestellt. Bakterienzellen wurden als 100 ml-LB-Flüssigkultur bis zur exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0,4) angezogen. Diese wurden anschließend durch Zentrifugation (2.500 g, 10 min, 4 °C) pelletiert und in 10 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (60 mM CaCl₂, 15 % Glycerol, 10 mM PIPES, pH 6,8) resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Beim letzten Waschen wurden die Zellen in nur 1 ml CaCl₂-Lösung aufgenommen, zu Volumina von je 50 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Für die Herstellung elektrokompenter Zellen wurde auf die gleiche Weise vorgegangen. Als Waschpuffer diente statt der CaCl_2 -Lösung jedoch beim ersten Waschschrift eiskaltes *Aqua bidest*, bei allen weiteren Waschschriften eine eisgekühlte Lösung mit 10 % Glycerol in *Aqua bidest*.

3.12 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde das Verfahren der Firma Macherey & Nagel angewendet. Dazu wurde Plasmid-DNA aus 100-500 ml-Kulturen über Affinitätsäulen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Für Restriktions- und Sequenzanalysen wurde nach dem verkürzten Verfahren von Birnboim und Doly (1979) gearbeitet. Dieses Verfahren verzichtet auf die Verwendung von Affinitätsäulen und nutzt stattdessen zur Reinigung der Plasmid-DNA die Ethanolfällung. Als Ausgangskulturen zur Plasmidisolierung dienten 10 ml-Übernachtskulturen. Die verwendeten Puffer unterschieden sich geringfügig von denen des Macherey & Nagel-Systems und setzten sich wie folgt zusammen:

Zellaufschlußpuffer I:

50 mM Glucose
25 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg RNase A/ml
2 mg/ml Lysozym

Denaturierungspuffer II:

200 mM NaOH
1 % SDS

Fällungspuffer III:

3 M KAc
1,8 M Ameisensäure

3.13 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzanalyse wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977) verwendet. Hierzu wurden 5 µg Plasmid-DNA in 0,25 M NaOH für 10 min bei Raumtemperatur denaturiert und anschließend über eine Sepharose CL-6B-Minisäule von Salzen, RNA und Proteinen abgetrennt. Die so erhaltene DNA wurde direkt unter Verwendung des T7-Sequencing Kit (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers zur Annealingreaktion mit dem Sequenzierprimer (2 pmol) eingesetzt. Für die Sequenzierreaktion wurde das Radioisotop $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ verwendet. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte erfolgte über 8 %ige PAA-Harnstoffgele.

Alternativ dazu wurde die Sequenzanalyse bei der Firma Seqlab in Göttingen in Auftrag gegeben. Dazu wurde die DNA nach Angaben der beauftragten Firma zur Sequenzierung vorbereitet.

3.14 Radioaktive Markierung von Oligonucleotiden

Die Markierung von Oligonucleotiden wurde mittels 5'-Endmarkierung unter Verwendung der T4-Polynucleotid-Kinase durchgeführt. Dabei katalysiert das Enzym die Übertragung der γ -Phosphatgruppe aus Adenosin-Triphosphat auf 5'-Termini dephosphorylierter DNAs. Der Einsatz von ATP mit radioaktiver Markierung an der γ -Position führt zur Markierung des Oligonucleotids.

Zur Markierungsreaktion wurden 4 pmol dephosphoryliertes Oligonucleotid mit 50 μCi [γ - ^{32}P]ATP und 10 U T4-Polynucleotid-Kinase bei 37 °C für 30 min im vom Hersteller (Rapidozym) empfohlenen Puffer inkubiert. Nachfolgend wurde das Enzym durch Inkubation bei 65 °C für 15 min denaturiert. Nicht eingebautes [γ - ^{32}P]ATP-Substrat wurde über Nap-5-Säulen (Amersham Biosciences) nach dem Prinzip der Gelfiltration abgetrennt. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren, als Wasch- und Elutionspuffer wurde *Aqua bidest* verwendet.

3.15 Detektion radioaktiv markierter Nucleinsäuren

Für die Detektion radioaktiv markierter Nucleinsäuren wurden die Proben zunächst in einem denaturierenden PAA-Harnstoffgel aufgetrennt, auf Whatman-Papier (3MM) übertragen und mit PVC-Folie abgedeckt. Zur Verminderung des „Quenching“ durch die Wasserschicht, wurde es anschließend unter Vakuum bei 80 °C getrocknet. Nach Entfernen der Folie wurde das Gel über Autoradiographie oder Phosphorimaging analysiert.

Für die Autoradiographie wurde in einer Expositionskassette der Röntgenfilm in Kontakt mit dem Gel gebracht und unterschiedliche Zeiten bei Raumtemperatur exponiert. Bei Verwendung des Isotops ^{32}P wurden Expositionskassetten mit einer Verstärkerfolie (Cronex Lightning Plus, DuPont) verwendet, die die Sensitivität der Röntgenfilme erhöht. Die Exposition erfolgte in diesem Fall bei -70 °C. Die Entwicklung erfolgte in einer Filmentwicklermaschine der Firma Fuji.

Im Gegensatz zur Autoradiographie wird die Detektion radioaktiv strahlender Moleküle beim Phosphorimaging nicht über Röntgenfilme erzielt, sondern über eine Platte, die eine Speziialschicht aus verschiedenen Phosphorkristallen enthält. Bei Exposition mit der strahlenden Probe werden durch die Strahlungsenergie Elektronen aus den Phosphorkristallen angeregt. In einem Prozeß, der photostimulierte Lumineszenz genannt wird, kehren durch Abtasten der Platte mit einem Laser die Elektronen schließlich wieder in ihren Grundzustand zurück. Dabei werden Photonen emittiert, die zur Erzeugung des digitalen Bildes wieder aufgefangen werden.

Für das Phosphorimaging wurde der Phosphorimager FLA-3000 der Firma Fuji verwendet. Die Auswertung wurde über die Software „AIDA“ (Fuji) vorgenommen.

3.16 Insertionsmutagenese

Die Insertionsmutagenese wurde unter Verwendung des GPS™-LS-Linker Scanning Systems der Firma New England Biolabs durchgeführt. Das Prinzip dieses Systems (Abb. 3.1) beruht auf einer Transpositionsreaktion, die von der TnsABC Transposase katalysiert wird. Das zunächst in die Ziel-DNA integrierte Transposon, auch als Transprimer bezeichnet, umfaßt einen Resistenzmarker und an seinen beiden Enden eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *PmeI*. Es befindet sich in dem alleine nicht replikationsfähigen Transprimer-Donor-Plasmid. Aus den nach der Transpositionsreaktion resultierenden Transprimer-Insertionsmutanten wird durch *PmeI*-Verdau das gesamte Transposon bis auf 10 bp aus der Ziel-DNA entfernt. Da die Transpositionsreaktion gleichzeitig am Insertionsort eine 5 bp-Duplikation der Ziel-DNA zufolge hat, resultiert die anschließende Ligation in einer 15 bp-Insertion mit einer *PmeI*-Schnittstelle.

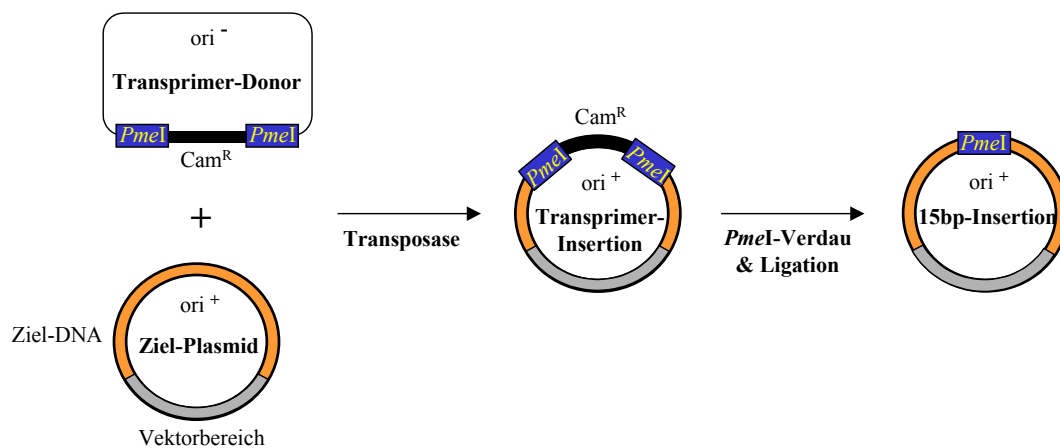


Abb. 3.1: Schema des Linker Scanning Systems (New England Biolabs) – In einer Transpositionsreaktion wird das auf dem Transprimer-Donor-Plasmid enthaltene Transposon (schwarzer Balken) mit seinen zwei *PmeI*-Schnittstellen (blau) und einer Chloramphenicolresistenz (Cam^R) an zufälliger Position in das Ziel-Plasmid integriert. Die resultierenden Transprimer-Insertionsmutanten werden anschließend mit *PmeI* verdaut und religiert. Folge ist eine 15 bp-Insertion, die eine *PmeI*-Schnittstelle aufweist.

3.16.1 Herstellung der Transprimer-Insertionsmutanten

Die Durchführung der Mutagenese erfolgte nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs). Zur Mutagenese wurden 40 ng Ziel-DNA eingesetzt. Als Ziel-DNA diente hier das in den pCR2.1-Vektor TA-klonierte *atp9*-Gen aus Erbse. Als Transprimer-Donor-Plasmid wurde das mitgelieferte Plasmid pGPS4 (20 ng) verwendet, welches einen Chloramphenicol-Resistenzmarker trägt. Nach Vollendung

der Transprimer-Insertion wurde der Ansatz transformiert und selektiert. Zur Herstellung der 15 bp-Insertionsmutanten wurde die Plasmid-DNA in weiteren Schritten mit *PmeI* verdaut und religiert.

3.17 Mitochondrienpräparation aus Kartoffel und Erbse

Die Mitochondrienpräparationen aus Kartoffel und Erbse erfolgten in Anlehnung an Yu *et al.* (1998) und Yu und Schuster (1995). Alle Arbeitsschritte zur Mitochondrienisolierung wurden bei 4 °C durchgeführt.

Zur Isolierung von Erbsenmitochondrien wurde 1 kg Futtererbsen auf Kies ausgelegt und zur Keimung im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5-7 Tagen wurden die Erbsenkeimlinge geerntet, in Wasser gewaschen und mit Homogenisationspuffer (25 mM MOPS, pH 7,8, 0,4 M Mannitol, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF) im Verhältnis 1:1 zum Keimlinggewicht im Waring Blender mit dreimal 15 sec-Intervallen aufgeschlossen. Nach Filtration durch eine Lage Gaze und drei Lagen Miracloth wurde das Homogenat zur Abtrennung von Zellbruchstücken und ganzen Zellen zentrifugiert (2.000 g, 5 min, 4 °C). Die Mitochondrien im Überstand wurden einem erneuten Zentrifugationsschritt unterworfen (15.000 g, 30 min, 4 °C). Das Mitochondrienpellet wurde einmal in Resuspensionspuffer (20 mM MOPS, pH 7,8, 0,4 M Mannitol, 1 mM EGTA, 1 mM DTT) gewaschen, erneut durch Zentrifugation (15.000 g, 10 min, 4 °C) pelletiert und schließlich in 20 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Diese Suspension wurde nachfolgend auf sechs dreistufige Percollgradienten (14 %, 28 %, 45 %) geladen und zentrifugiert (70.000 g, 50 min, 4 °C). Die intakten Mitochondrien befinden sich dabei an der Grenze zwischen der 28 %- und der 45 %-Percoll-Stufe. Sie wurden den Gradienten entnommen und zur Entfernung des Percolls mehrmals in Resuspensionspuffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation (15.000 g, 15 min, 4 °C) pelletiert. Für den letzten Waschschrift wurde Resuspensionspuffer verwendet, dem zusätzlich 15 % Glycerol zugesetzt war. Die aus diesem Schritt stammenden Mitochondrienpellets wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Isolierung von Kartoffelmitochondrien wurden Kartoffeln der Sorte Bintje und Sante verwendet. Es wurden für eine Präparation 3 kg geschälte Kartoffelknollen eingesetzt. Der Homogenisationspuffer enthielt im Gegensatz zu der Mitochondrienpräparation aus Erbse noch zusätzlich 1 % BSA. Die Filtration des Homogenats wurde durch je drei Lagen Gaze und Miracloth durchgeführt. Als Resuspensionspuffer diente hier ein Puffer mit 10 mM KH_2PO_4 , pH 7,2, 0,4 M Mannitol und 1 % BSA. Die weitere Aufarbeitung entsprach der oben beschriebenen für Erbsenmitochondrien.

3.17.1 DNA-Präparation aus isolierten Mitochondrien

Zur groben Präparation mitochondrialer DNAs wurden gereinigte Mitochondrien als Ausgangsmaterial eingesetzt. Dazu wurde ein Mitochondrienaliquot zu 200 µl auf ein Volumen von 400 µl mit *Aqua bidest* aufgefüllt und Triton X-100 in einer Endkonzentration von 0,2 % zugesetzt. Durch Phenol-Chloroform-Extraktion wurden die mitochondrialen Proteine denaturiert und von der DNA abgetrennt. Die DNA wurde anschließend über Ethanolpräzipitation gereinigt.

3.17.2 RNA-Präparation aus isolierten Mitochondrien

Die Präparation mitochondrialer RNAs erfolgte aus gereinigten Mitochondrien. Dazu wurden Mitochondrienaliquots von 400 µl zunächst mit 800 µl Z6-Puffer (8 M Guanidiniumhydrochlorid, 20 mM MES, pH 7,0, 20 mM EDTA) versetzt. Nacheinander wurden je 0,6 ml Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1, v/v) zugegeben und die Probe jedesmal gut durchmischt. Zur Abtrennung der Proteinphase von der wässrigen Phase schloß sich ein Zentrifugationsschritt (12.000 g, 20 min) an. Zur wässrigen Phase wurde 1/20 Volumenteil 1 M Essigsäure und 7/10 Volumenteile Ethanol zugesetzt. Das Gemisch wurde dann 1 h bei -20 °C kaltgestellt. Das nach einem Zentrifugationsschritt (15.000 g, 20 min) gewonnene Nucleinsäurepellet wurde zweimal mit je 2 ml 3 M NaAc, pH 5,2 und anschließend mit je 2 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte ein Zentrifugationsschritt (15.000 g, 10 min). Das resultierende Pellet wurde getrocknet und in 30 µl DEPC-behandeltem *Aqua bidest* aufgenommen. Zur vollständigen Beseitigung vorhandener DNAs schloß sich ein DNase I-Verdau an. Dazu wurde der gesamte Ansatz in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 20 mM Tris-HCl, pH 7,4 und 3 mM MgCl₂ unter Zusatz von 10 U RNase-freier DNase I für 20 min bei 37 °C inkubiert. Die DNase I wurde nachfolgend durch Zusatz von EDTA in einer Endkonzentration von 4 mM inaktiviert und anschließend über Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation aus dem Reaktionsansatz entfernt.

3.18 Präparation von Erbsenchloroplasten

Alle Arbeitsschritte zur Chloroplastenisolierung wurden bei 4 °C durchgeführt. Zur Chloroplastenpräparation wurden Futtererbsen vier Wochen im Gewächshaus angezogen, dann zum Abbau der Stärke für 2 Tage in Dunkelheit inkubiert und anschließend das grüne Pflanzenmaterial geerntet. 150 g Pflanzenmaterial wurden in 1 l Isolationspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,33 M Sorbitol, 20 mM NaCl, 0,5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,15 % PVP, 2 mM Natriumascorbat) im Waring Blender in zweimal 10 sec-Intervallen aufgeschlossen. Das Homogenat wurde zur Abtrennung von Zellbruchstücken durch je 1 Lage Gaze und Miracloth filtriert und zentrifugiert (2.000 g, 2 min, 4 °C). Das resultierende Chloroplastenpellet wurde in Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,3 M

Saccharose, 2 mM EDTA) aufgenommen und erneut zentrifugiert (2.000 g, 2 min, 4 °C). Die Chloroplastenpellets wurden vorsichtig in 18 ml Waschpuffer resuspendiert und über sechs zweistufige Saccharosegradienten (25 % und 65 % Saccharose in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6) nach ihrer Dichte aufgetrennt. Im folgenden Zentrifugationsschritt (10.000 g, 80 min, 4 °C) wurden defekte Chloroplasten, die eine geringere Dichte haben, abgetrennt. Die jeweils auf dem Saccharosekissen befindliche Bande mit intakten Chloroplasten (Grenzschicht 25% zu 65% Saccharose) wurde vorsichtig abgenommen und unter Rühren mit zwei Volumina Waschpuffer aufgefüllt. Da die Chloroplasten während der Gradientenzentrifugation Saccharose aufnehmen und deren Osmolalität somit höher liegt als die des Waschpuffers, mußte hier sehr langsam vorgegangen werden, um ein Platzen der Chloroplasten zu verhindern. Nachfolgend wurden die Chloroplasten zentrifugiert (2.000 g, 3 min, 4 °C), die Pellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.19 Das *in vitro*-RNA-Editingsystem

Das *in vitro*-RNA-Editingsystem setzt sich einerseits aus den für das RNA-Editing notwendigen mitochondrialen bzw. plastidären Komponenten zusammen, andererseits aus einem RNA-Template, anhand dessen die RNA-Editingaktivität verfolgt werden kann.

3.19.1 Herstellung editingaktiver Mitochondrienlysate

1 g gereinigte Mitochondrien wurden auf Eis aufgetaut und in einem Gesamtvolumen von 3 ml im Potter homogenisiert. Der Aufschlußpuffer enthielt dabei 25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT und 0,5 mM PMSF, dem schrittweise Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 0,2 % und (NH₄)₂SO₄ bis zu einer Molarität von 1 M zugegeben wurde. Das Homogenat wurde 30 min bei 4 °C langsam gerührt und anschließend bei 100.000 g (80 min, 4 °C) zentrifugiert. Der von Membranbestandteilen abgetrennte Überstand des Ultrazentrifugationsschrittes wird als S100-Fraktion bezeichnet. Diese wurde zur weiteren Verwendung gegen 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT und 0,5 mM PMSF dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

3.19.2 Herstellung editingaktiver Chloroplastenlysate

1g isolierte und gereinigte Chloroplasten wurden auf Eis aufgetaut und in einem Gesamtvolumen von 2 ml in Extraktionspuffer (30 mM HEPES-KOH, pH 7,7, 10 mM MgAc, 2 M KCl, 2 mM DTT, 1 mM PMSF) im Potter unter schrittweiser Zugabe von Triton X-100 bis zu einer Endkonzentration von 0,2 % homogenisiert. Nach 20 min langsamen Rührens bei 4°C wurde die membranfreie S60-Fraktion hergestellt. Sie wurde als Überstand aus einem Zentrifugationsschritt bei 60.000 g (2 h, 4°C) gewonnen. Zur weiteren Verwendung wurde die S60-Fraktion gegen 30 mM HEPES-

KOH, pH 7,7, 3 mM MgAc, 45 mM KAc, 30 mM NH₄Ac und 0,5 mM PMSF dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

3.19.3 Inkubation von RNA-Template und Lysat

Für jede *in vitro*-RNA-Editingreaktion wurden zwischen 10-50 ng *in vitro*-Transkript zusammen mit 200-300 µg der mitochondrialen S100- bzw. der plastidären S60-Fraktion in einem 50 µl-Ansatz inkubiert. Die Ansätze enthielten außerdem 3 µg tRNA (aus Hefe). Als Kontrollen dienten Ansätze, denen statt der nativen hitzeinaktivierte Lysate zugesetzt waren. Diese wurden durch Denaturierung bei 85 °C für 15 min hergestellt.

Die Inkubationsbedingungen für das mitochondriale System lagen bei 37 °C für 45 min in einem Reaktionspuffer mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 5 mM MgAc, 15 mM KCl, 1 mM DTT und 50 U RNase-Inhibitor.

Für das plastidäre System wurde 40 min bei 28 °C inkubiert. Der Reaktionspuffer enthielt hier 30 mM HEPES-KOH, pH 7,7, 3 mM MgAc, 45 mM KAc, 1 mM DTT, 1 % PEG, 3 mM ATP und 50 U RNase-Inhibitor.

Die RNA wurde nach der Inkubation durch Phenol-Chloroform-Extraktion von den Proteinen abgetrennt, durch Ethanolpräzipitation gereinigt und abschließend in 10 µl DEPC-behandeltem *Aqua bidest* wiederaufgenommen.

3.19.3.1 Kompetitionsanalyse mit Oligonucleotiden

Diese Art der Kompetitionsanalyse basiert auf einer Konkurrenzreaktion zwischen Desoxyoligonucleotiden (Kompetitionsoligonucleotiden) und Editingfaktoren um die Interaktion mit dem Editingsubstrat. Die zur *in vitro*-Inkubation eingesetzte Template-RNA wurde dabei zunächst mit 100 fmol-10 pmol Desoxyoligonucleotiden im Reaktionspuffer in Anwesenheit von tRNA und RNase-Inhibitor für 5 min auf Eis prähybridisiert. Erst dann erfolgte die Zugabe von Mitochondrienlysate zum Starten der Editingreaktion und die Inkubation bei 37 °C für 45 min.

3.20 Das *in organello*-RNA-Editingsystem

Für das *in organello*-System wurden 50 µl frisch präparierte Mitochondrien (mehrmals in 0,33 M Mannitol gewaschen) zur Elektroporation eingesetzt. Dazu wurden die Mitochondrien zusammen mit 1 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA in eine eisgekühlte 0,1 cm-Elektroporationsküvette transferiert. Die Mitochondriensuspension wurde nach der Elektroporation (13 kV/cm, 25 µF, 400 Ω) entnommen und die Küvette einmal mit 0,33 M Mannitol gespült. Diese Waschfraktion wurde mit der Mitochondriensuspension vereinigt und anschließend zentrifugiert (15.000 g, 10 min, 4 °C). Das resultierende Mitochondrienpellet wurde in 150 µl Expressionspuffer (0,33 M Mannitol, 90 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 12 mM Tricin, pH 7,2, 5 mM KH₂PO₄, 1,2 mM EGTA, 1 mM GTP, 2 mM DTT, 2 mM ADP, 10 mM Natriumsuccinat,

0,15 mM CTP, 0,15 mM UTP) resuspendiert und für 18 h bei 25 °C unter Schütteln (150 rpm) inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (15.000 g, 10 min, 4 °C) wurden die Mitochondrien in 300 µl DEPC-behandeltem *Aqua bidest* unter Zusatz von 0,2 % Triton-X100 resuspendiert und die RNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolpräzipitation isoliert. Es folgte ein DNase I-Verdau (20 min, 37 °C) mit anschließender Hitzeinaktivierung des Enzyms (15 min 70 °C).

3.21 Die „Gap“-Ligation als RNA-Editing-Detektionssystem

Zur Detektion des RNA-Editings wurde die „Gap“-Ligation eingesetzt, die zur quantitativen Analyse von Punktmutationen in der DNA entwickelt wurde (Stewart *et al.*, 1998). Diese Ligationenreaktion basiert auf der streng template-abhängigen Ligation zweier Primer bei Hybridisierung an eine einzelsträngige DNA (Abb. 3.2). Werden die Primer so gewählt, daß sie direkt 5' (downstream) und 3' (upstream) von der zu untersuchenden Nucleotidposition hybridisieren, entsteht zwischen den beiden eine Lücke („Gap“) von einem Nucleotid. Durch Darbietung des zur untersuchten Stelle („Gap“-Position) komplementären Nucleotids wird der downstream gelegene Primer an seinem 3'-Ende um ein Nucleotid verlängert. Diese Reaktion wird durch eine hitzestabile DNA-Polymerase katalysiert. Im nächsten Schritt kommt es zur Ligation des verlängerten Downstreamprimers mit dem upstream zur „Gap“-Position gelegenen Primer. Diese Reaktion wird von einer thermostabilen DNA-Ligase katalysiert, die nur bei vollständiger Komplementarität der beiden DNA-Stränge an der Verknüpfungsstelle die Ligation vollziehen kann. Liegt die untersuchte „Gap“-Position modifiziert vor, wird aufgrund fehlender Komplementarität zum angebotenen Nucleotid kein Ligationprodukt generiert.

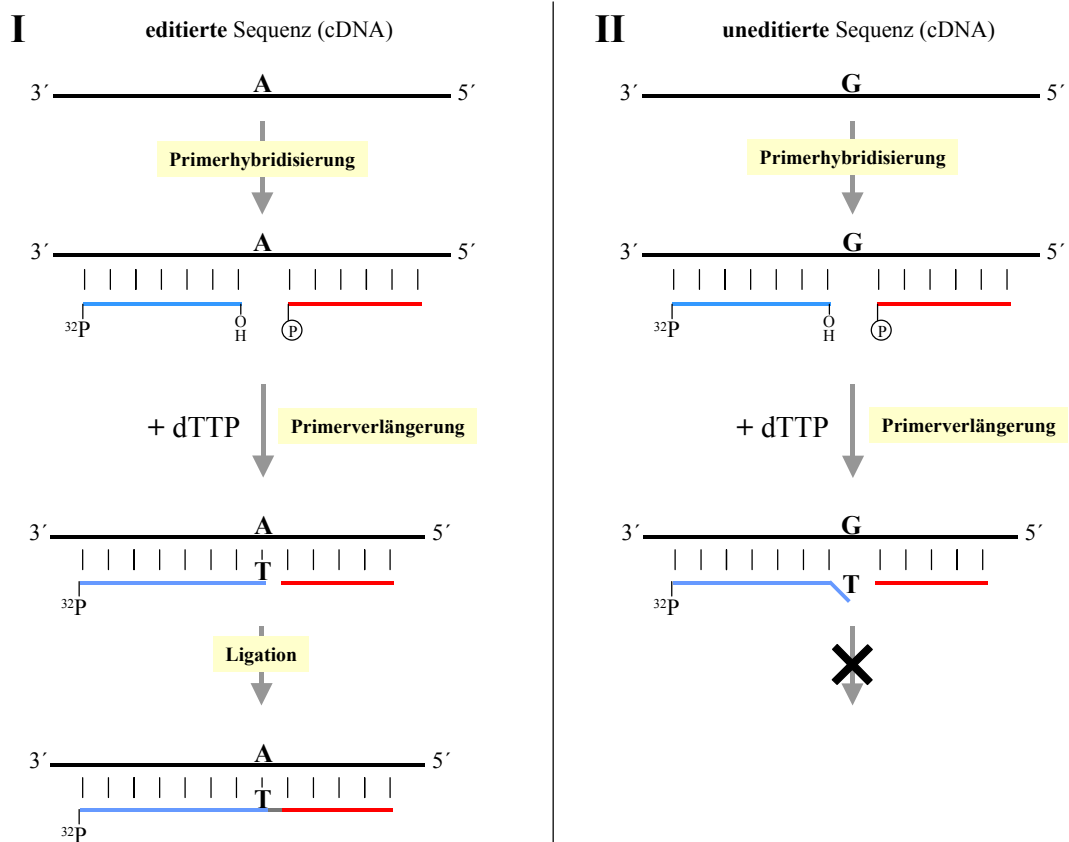


Abb. 3.2: Prinzip der „Gap“-Ligation zur Unterscheidung zwischen editierten und uneditierten Sequenzen – An das editierte Template (schwarze Linie mit hervorgehobenem „A“) und das uneditierte Template (schwarze Linie mit hervorgehobenem „G“) hybridisieren jeweils zwei Primer. Die Primer sind so gewählt, daß an der zu untersuchenden Nucleotidposition eine Lücke („Gap“) von einem einzigen Nucleotid verbleibt. Der radioaktiv markierte (^{32}P) Downstreamprimer (blaue Linie) wird durch die DNA-Polymerase um ein Nucleotid verlängert. Handelt es sich dabei um ein zur „Gap“-Position komplementäres Nucleotid im nächsten Schritt der verlängerte Primer durch die hitzestabile DNA-Ligase mit dem Upstreamprimer (rote Linie) verknüpft werden (I). Dieses Ligationsprodukt entsteht nicht, wenn die „Gap“-Position nicht komplementär ist zum angebotenen Nucleotid (II).

3.21.1 Durchführung der „Gap“-Ligation

Ein Standardansatz der „Gap“-Ligation wurde in einem Volumen von 50 μl durchgeführt. Als DNA-Template diente, wenn nicht anders angegeben, gereinigte Plasmid-DNA, die vor Einsatz in die Ligationsreaktion 5 min bei 95 $^{\circ}\text{C}$ denaturiert wurde. Zu 2 pmol denaturierter DNA wurden 60 pmol 5'-phosphorylierter Upstreamprimer, 20 fmol 5'-[^{32}P]-markierter Downstreamprimer, 1 nmol dCTP oder dTTP und 5 μl des vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen 10fach

Ligationspuffers gegeben. Die Reaktion wurde mit 40 U *Taq*-DNA-Ligase (New England Biolabs) und 0,25 U *Taq*-DNA-Polymerase (Q-BIOgene) gestartet. Nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min folgten 25 Cyclen bei 94 °C für 30 sec und bei 60 °C für 2 min. Die Ligationsansätze wurden nachfolgend unter Zugabe von 0,3 M NaAc ethanolpräzipitiert. Die Pellets wurden mit 70 % Ethanol gewaschen und in 0,04 % Bromphenolblau, 0,04 % Xylen-Cyanol und 5 % Glycerol in *Aqua bidest* resuspendiert. Nach 2minütiger Denaturierung bei 90 °C wurden die Ligationsreaktionen über 8 %ige PAA-Harnstoffgele aufgetrennt.

3.22 Die Primer-Ligation als RNA-Editing-Detektionssystem

Die Primer-Ligation wurde aus der „Gap“-Ligation entwickelt. Zur Analyse einer Nucleotidposition wird ebenfalls ein Primerpaar an die Template-DNA hybridisiert. Einer der Primer ist jedoch um ein Nucleotid verlängert, sodaß die untersuchte Stelle von ihm überspannt wird (Abb. 3.3). Die in der „Gap“-Ligation notwendige Primerverlängerung durch die DNA-Polymerase entfällt demzufolge. Die hybridisierten Primer können direkt im nächsten Schritt durch die DNA-Ligase verknüpft werden. Da dieser Schritt streng template-abhängig abläuft, kommt es nur zur Ligation, wenn beide Primer an der Verknüpfungsstelle eine vollkommene Duplexstruktur mit der Template-DNA ausbilden. Liegt an der Ligationsstelle jedoch eine Basenfahlpaarung vor, findet keine Ligrationsreaktion statt.

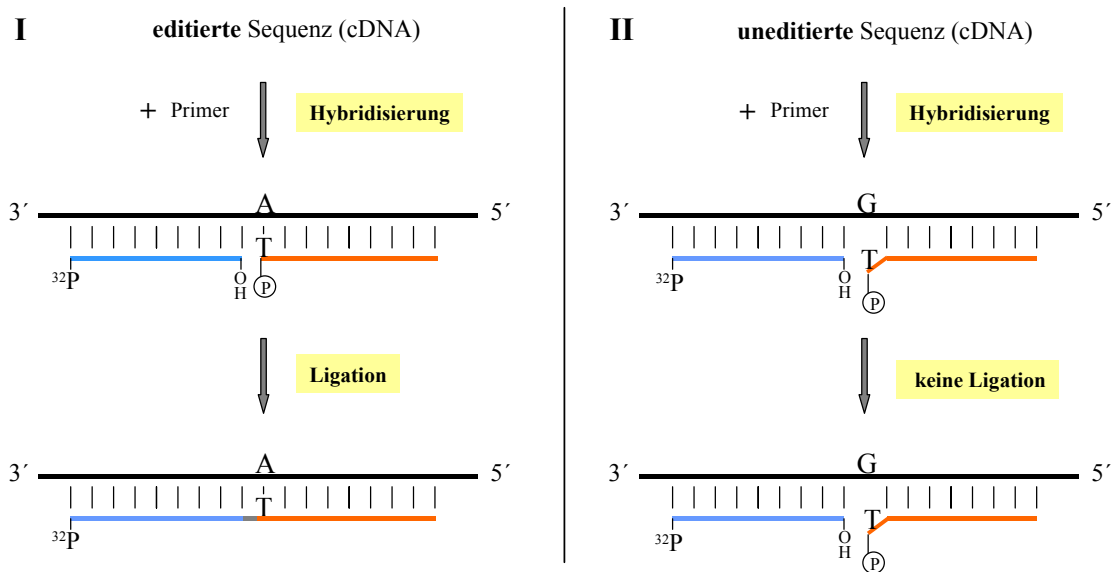


Abb. 3.3: Das Prinzip der Primer-Ligation zur Diskriminierung editierter und uneditierter Sequenzen – I: Nach der Hybridisierung von ^{32}P -markiertem Downstreamprimer (blaue Linie) und T-Detektionsprimer (rote Linie mit hervorgehobenem „T“) an das editierte Template (schwarze Linie mit hervorgehobenem „A“ an der Editingstelle) werden die beiden Primer über die Phosphatgruppe („P“ im Kreis) und die Hydroxylgruppe (-OH) miteinander verknüpft. II: Hier findet zwar die Hybridisierung der beiden Primer an das uneditierte Template (schwarze Linie mit hervorgehobenem „G“ an der Editingstelle) statt, die Ligationsreaktion kann jedoch aufgrund der Basenfehlpaarung an der Editingstelle nicht vollzogen werden.

3.22.1 Durchführung der Primer-Ligation

Die Primer-Ligation wurde in 50 μl -Ansätzen durchgeführt. Als Template diente DNA, die zuvor für 5 min bei 94 °C denaturiert worden war. Neben 0,2 pmol Template-DNA enthielten die Ligationsansätze 30 fmol ^{32}P -markierten Downstreamprimer und 60 pmol 5'-phosphorylierten Upstreamprimer in dem vom Hersteller (New England Biolabs) empfohlenen Ligationspuffer. Die Reaktion wurde mit 40 U *Taq*-DNA-Ligase gestartet. Nach einem ersten Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min folgten 25 Cyclen mit einer Denaturierung bei 94 °C für 25 sec und bei 55-67 °C (Temperaturoptimum je nach Template und Primer) für 2 min.

Die Primer-Ligationsansätze wurden nachfolgend unter Zugabe von 0,3 M NaAc ethanolpräzipitiert. Die Pellets wurden mit 70 % Ethanol gewaschen und in 0,04 % Bromphenolblau, 0,04 % Xylen-Cyanol und 5 % Glycerol in *Aqua bidest* resuspendiert. Nach 2minütiger Denaturierung bei 90 °C wurden die Primer-Ligationsreaktionen auf 8 %igen PAA-Harnstoffgelen getrennt.