

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Entwicklung der Primer-Ligation als RNA-Editing-Detektionssystem

Zur Untersuchung des RNA-Editings in Mitochondrien und Chloroplasten bedarf es eines zuverlässigen Detektionssystems, welches die Editingreaktion exakt verfolgen läßt. Da bisherige Detektionssysteme (Yu *et al.*, 1998, Hirose & Sugiura, 2001, Driscoll & Casanova, 1990) jedoch bei der Anwendung in Pflanzen entscheidende Nachteile zeigten, sollte in dieser Arbeit ein neues Detektionsverfahren entwickelt werden. Dafür wurde die „Gap“-Ligation gewählt, die sich bereits für die Detektion von Mutationen auf DNA-Ebene als geeignet erwiesen hatte (Stewart *et al.*, 1998). Sie erlaubt die Diskriminierung von Sequenzen, die sich in nur einer einzigen Base unterscheiden. Diese Ligationsreaktion verknüpft zwei Oligonucleotide, die downstream und upstream von der untersuchten Nucleotidposition hybridisieren. Bei der Hybridisierung entsteht jedoch zwischen den Oligonucleotiden eine Lücke („Gap“), die vor der Ligation durch eine DNA-Polymerase aufgefüllt werden muß. Da die DNA-Ligase nur DNA als Template akzeptiert, mußte die Detektion des RNA-Editings anhand der cDNA-Sequenz durchgeführt werden. Diese wurde zur Evaluierung des Systems zunächst in Form von Plasmid-DNA bereitgestellt. Anhand des *atp9*-Templates aus Kartoffel zeigte sich jedoch, daß die Verwendung der DNA-Polymerase ein nicht zu umgehendes Problem mit sich brachte. Bei Darbietung von dTTP als „Gap“-füllendem Nucleotid entstanden neben den erwarteten Ligationsprodukten auch geringfügig größere Produkte, die auf ein Template-unabhängiges Anhängen von Thymidinen durch die Polymerase zurückzuführen sind. Trotz Einsatz verschiedener DNA-Polymerasen konnte die Reaktion nicht optimiert werden. Drastisch verstärkt wurde die Bildung von Verlängerungsprodukten bei Verwendung einzelsträngiger cDNA als Template für die „Gap“-Ligation, die zur Detektion des RNA-Editings im *in vitro*-System jedoch zwangsläufig in der Form eingesetzt werden muß. Der Einsatz der mit Restnucleotiden aus der Synthese kontaminierten cDNA ermöglichte der DNA-Polymerase das Anhängen von allen vier Nucleotiden in der Elongationsreaktion und führte zu diversen unspezifischen Banden zwischen Primer und Ligationsprodukt. Folge waren eine verminderte Spezifität der Reaktion und eine Verhinderung der Quantifizierung der Ligationsprodukte. Trotz Anwendung verschiedener einfacher Methoden zur Abtrennung von Mononucleotiden gelang es nicht, die Nucleotidkontaminationen der cDNA soweit zu reduzieren, daß sie keinen Einfluß auf die Ligationsreaktion haben.

Aus diesem Grund wurde die „Gap“-Ligation zur Primer-Ligation weiterentwickelt, die auf die Verwendung der DNA-Polymerase verzichten kann. Um den mit Problemen behafteten Verlängerungsschritt überflüssig zu machen, wurden von vornherein über die

Editingstelle hinaus verlängerte Oligonucleotide zur Primer-Ligation eingesetzt. Für das Primerdesign boten sich dabei zwei Alternativen. Zum einen konnte der markierte Downstreamprimer an seinem 3'-Ende um ein Nucleotid verlängert werden. Als zweite Variante konnte ein am 5'-Ende um ein Nucleotid verlängerter Upstreamprimer zur Ligationsreaktion eingesetzt werden. Anhand des *atp9*-Templates aus Kartoffel konnte nachgewiesen werden, daß beide Varianten der Primer-Ligation keine verlängerten Ligationsprodukte zeigen und eine vergleichbare Genauigkeit bei der Erkennung des Nucleotids an der Editingstelle aufweisen. Die Variante der Primer-Ligation, bei der der Upstreamprimer verlängert ist und die Detektion des untersuchten Nucleotids übernimmt, hat jedoch den Vorteil, daß zur Detektion von editierten und nicht-editierten Sequenzen zwei unterschiedliche Upstreamprimer (C- und T-Detektionsprimer) benötigt werden, der radioaktiv markierte Downstreamprimer jedoch unverändert bleiben kann. Dieser ermöglicht den Einsatz von exakt gleichen Mengen an Primer und Radioaktivität in parallel durchgeführten Ligationsreaktionen. Aufgrund dieser Vorteile wurde im weiteren Verlauf der Arbeit ausschließlich mit der Primerkombination gearbeitet, bei der der Upstreamprimer verlängert ist. Dieser wird bei der Primer-Ligation zur Erkennung der editierten Sequenz als T-Detektionsprimer bezeichnet.

Die Spezifität der Ligationsreaktion wurde durch Veränderung der Hybridisierungstemperatur und Länge der verwendeten T-Detektionsprimer optimiert. Beide Parameter beeinflussen direkt die Stabilität der Duplex-DNA-Struktur, die bei der Hybridisierung von Primern an das Template entsteht. Wird die Stabilität herabgesetzt, kann die DNA-Ligase besser zwischen basengepaartem und ungepaartem Nucleotid an der Verknüpfungsstelle diskriminieren. Aufgrund des Temperaturoptimums der DNA-Ligase ist jedoch die Hybridisierungstemperatur auf max. 68 °C begrenzt.

Für die *atp9*-Sequenz aus Kartoffel konnten durch Erhöhung der Temperatur auf 67 °C und Verkürzung des T-Detektionsprimers auf 16 Nucleotide (Pos1B-T16) die Detektionsgrenze der Primer-Ligation auf unter 2 % C-zu-U-Umsatz gesenkt werden. Für die *atp9*-Sequenz aus Erbse wurde bei Verwendung des gleichen T-Detektionsprimers eine optimale Reaktionstemperatur von 59 °C ermittelt. Daß hier die Optimaltemperatur deutlich tiefer liegt als beim Kartoffeltemplate, ist durch die zwei Basenfehlpaarungen zwischen Erbsensequenz und T- bzw. C-Detektionsprimer zu erklären. Aufgrund der instabileren Paarung zwischen Template und Primern kann bereits bei niedrigerer Temperatur über das zu der Editingstelle komplementäre bzw. nicht passende 5'-Nucleotid des T-Detektionsprimers zwischen editierter und nicht-editierter Sequenz unterschieden werden. Für das Erbsentemplate konnte die Detektionsgrenze der Primer-Ligation sogar auf deutlich unter 1 % C-zu-U-Umsatz reduziert werden.

Aufgrund der einfachen Handhabung, der hohen Spezifität der Reaktion unter optimalen Bedingungen und ihrer äußerst niedrigen Detektionsgrenze kann die Primer-Ligation hervorragend zur Verfolgung des RNA-Editings eingesetzt werden. Im Gegensatz zum „Mobility-Shift-Assay“ (Yu *et al.*, 1998) ist die Primer-Ligation in der Lage, eine

einzigste Editingstelle in einem Transkript zu analysieren. Bei Verwendung von Transkripten mit wenigen Editingstellen oder solchen, deren Editingstellen in der Menge des C-zu-U-Umsatzes deutlich variieren, ist dies ein großer Vorteil. Da alle Cytidine der Template-RNA beim „Mobility-Shift-Assay“ markiert sind und in die Detektion mit eingehen, fällt ein großer Teil der eingesetzten Radioaktivität auf Cytidine, die kaum oder gar nicht umgesetzt werden können. Folglich ist die in der vorliegenden Arbeit angestrebte Identifizierung essentieller *cis*-Elemente innerhalb eines Editingsubstrates mit mehr als einer Editingstelle mit dieser Methode nicht möglich. Weiterhin problematisch ist beim „Mobility-Shift-Assay“ neben dem Einsatz unnötig hoher Mengen an Radioaktivität die mit  $^{32}\text{P}$ -CTP einhergehende Kontamination mit  $^{32}\text{P}$ -UTP. Bei Verwendung dieses Materials wird ein Editingsubstrat synthetisiert, das oft mehr  $^{32}\text{P}$ -UTP enthält, als in der Editingreaktion durch Umwandlung von Cytidinen hergestellt werden kann. Das im letzten Jahr von Hirose und Sugiura (2001) entwickelte Verfahren, welches ebenfalls auf der dünnschichtchromatographischen Auftrennung von Cytidinen und Uridinen beruht, umging den hohen Einsatz von Radioaktivität für die Markierungsreaktion. Durch Herstellung des RNA-Editingsubstrates in zwei Teilen, die in einer nachfolgenden Ligationsreaktion miteinander verknüpft werden, ist die spezifische Markierung des Cytidins an der untersuchten Editingstelle möglich und gleichzeitig die Identität der markierten Base gewährleistet. Die vorteilhafte Synthese der RNA in zwei Teilen bringt jedoch zugleich große Nachteile mit sich. Da der 3'-Teil als Ribooligonucleotid chemisch synthetisiert wird, fallen zum einen außerordentlich hohe Kosten an, zum anderen muß das zusammengesetzte Editingsubstrat aufwendig gereinigt werden. Auch das dritte gängige Verfahren der RNA-Editing-Detektion, die Primerextensionsmethode (Driscoll & Casanova, 1990), hat Vor- und Nachteile. Es kann genauso wie bei der Primer-Ligation gezielt eine Editingstelle analysiert werden, ohne dafür das RNA-Template selbst markieren zu müssen. Problematisch bei dieser Methode ist jedoch, daß die Spezifität der Detektionsreaktion durch die Reverse Transkriptase vorgegeben ist. Da dieses Enzym über kein „Proof reading“ verfügt, ist die Spezifität zur Verfolgung geringer C-zu-U-Umsätze im Pflanzen-RNA-Editing zu niedrig.

Aufgrund der einfachen Handhabung, der hohen Spezifität der Reaktion unter optimalen Bedingungen und ihrer äußerst niedrigen Detektionsgrenze kann die Primer-Ligation hervorragend zur Verfolgung eines geringen C-zu-U-Umsatzes eingesetzt werden.

## **5.2 Etablierung mitochondrialer *in vitro*-Systeme aus Kartoffel und Erbse**

In dieser Arbeit sollten die mitochondrialen *in vitro*-Systeme aus zwei Pflanzen unterschiedlicher Familien etabliert werden. Neben einem Vergleich der Aktivitäten sollte über heterologe RNA-Editingansätze Einsicht über die Ähnlichkeiten der beiden pflanzlichen RNA-Editingmaschinerien gewonnen werden. Als Versuchspflanzen wurden Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Erbse (*Pisum sativum*) gewählt. Die

Kartoffel hat den Vorteil, daß ihre Knollen jederzeit in großen Mengen als Ausgangsmaterial für die Mitochondrienisolierung auf den Wochenmärkten zur Verfügung stehen. Die anschließende Aufarbeitung ist einfach und bringt 0,6 g intakter Mitochondrien pro kg Kartoffel hervor. Für das Erbsensystem müssen zunächst Erbsenkeimlinge mehrere Tage angezogen werden. Um Chloroplasten-Kontaminationen zu verhindern, mußte die Anzucht im Dunkeln erfolgen, sodaß entsprechende Räumlichkeiten vorhanden sein müssen. Die Präparation von Erbsenmitochondrien ist genauso arbeitsintensiv und erzielt nur geringfügig weniger Ausbeute (0,4 g pro kg Keimlinge) als bei den Kartoffeln.

Für die beiden *in vitro*-Systeme wurde als Template die *atp9*-RNA ausgewählt. Das mitochondriale *atp9*-Gen codiert die Untereinheit 9 der ATP-Synthase. Diese ist für alle Lebewesen für die Atmungskette essentiell und hoch konserviert. Bei Pflanzen gibt es zahlreiche Sequenzdaten sowohl auf Nucleotid- als auch auf Proteinebene. Der Editingstatus ist ebenfalls gut untersucht. Demnach liegt die *atp9*-mRNA in vielen Pflanzen vollständig editiert vor (*Oenothera*, Schuster & Brennicke, 1990 und Kartoffel, Dell'Orto *et al.*, 1993). In anderen Pflanzen wie z.B. der Hirse (Salazar *et al.*, 1991), der Gerste (Rish & Breimann, 1993) und dem Weizen (Bégu *et al.*, 1990) sind ebenso partiell editierte Transkripte gefunden worden. Diese zeigen jedoch Editingstellen, die immer vollständig editiert sind.

Zur Analyse des RNA-Editings in der vorliegenden Arbeit wurde eine dieser vollständig editierten Stellen ausgesucht. Die gewählte Editingstelle 1 (Codonposition 7) codiert die Aminosäure Serin, die durch Editing des Codons TCA zu TTA in Leucin abgewandelt wird. Interessant an dieser Position ist besonders, daß alle bisher untersuchten Pflanzen, so auch Kartoffel und Erbse, dort das gleiche TCA-Codon genomisch vorgegeben haben, während andere Editingstellen auf DNA-Ebene in verschiedenen Pflanzen prä-editiert sind (Graves *et al.*, 1990). Aufgrund der hohen Konserviertheit des Codons in allen bislang untersuchten Pflanzen, der Vollständigkeit des Editings und nicht zuletzt des Vorhandenseins dieser Editingstelle in Kartoffel und Erbse wurde das Cytidin der Editingstelle 1 zur Analyse des *atp9*-RNA-Editings herangezogen.

### **5.3 Vergleich der *in vitro*-RNA-Editingsysteme aus Kartoffel und Erbse**

In dieser Arbeit ist es gelungen, sowohl für die Kartoffel als auch für die Erbse ein *in vitro*-System zu etablieren, welches eindeutige RNA-Editingaktivität am *atp9*-Template zeigt. Beide Systeme zeigten anfangs das Problem, daß aus Kontroll- und nativen Ansätzen ungleiche Mengen an Template-spezifischer cDNA gewonnen werden konnten. Dies ist auf unterschiedliche Aktivitäten RNA-abbauender Enzyme in den mitochondrialen Lysaten zurückzuführen. Der Zusatz von unspezifischer tRNA als RNase-Substrat zum Inkubationsansatz verbesserte zwar die Ausbeute an cDNA, hob die Mengenunterschiede jedoch nicht gänzlich auf. Um den Einsatz gleicher Template-Mengen für die Primer-Ligation zu gewährleisten, wurde aus diesem Grund eine

Amplifikation mittels PCR angeschlossen. Die nun in ausreichender Menge hergestellten Produkte konnten densitometrisch erfaßt und quantifiziert werden. Von großer Relevanz bei cDNA-Synthese und PCR war die Verwendung eines vektorspezifischen Primers. Durch ihn konnte die Amplifikation von organellenendogenen *atp9*-RNA-Molekülen verhindert werden. Die natürlicherweise in editierter Form vorliegenden RNAs hätten in der Primer-Ligation einen C-zu-U-Umsatz signalisiert, der nicht auf die Funktionalität des *in vitro*-Systems zurückzuführen wäre.

Obwohl bei beiden *in vitro*-Systemen die Editingraten niedrig lagen, konnte im Erbsensystem ein C-zu-U-Umsatz von 4 % gemessen werden. Die Aktivität des Kartoffelsystems lag bei 2 %. Eine mögliche Erklärung für diese Aktivitätsunterschiede könnte in den zur Mitochondrienpräparation eingesetzten Geweben liegen. Während es sich bei der Kartoffelknolle um ein ruhendes Speichergewebe handelt, zeigen Erbsenkeimlinge starke Teilungsaktivität. Somit wäre eine erhöhte Editingaktivität in Erbsen vorstellbar, um essentielle mitochondriale Transkripte schneller und effizienter editieren zu können.

Die dennoch niedrig liegenden *in vitro*-Aktivitäten von Kartoffel- und Erbsenmitochondrien, die auch von Araya *et al.* (1992) im mitochondrialen Weizensystem beobachtet wurden, spiegeln die allgemeinen Probleme bei *in vitro*-Untersuchungen des RNA-Editings in Pflanzen wider. Während beim Säugetier-*apoB*-Editing das *in vitro*-System beinahe vollständigen C-zu-U-Umsatz zeigt (Hersberger & Innerarity, 1998), scheinen die pflanzlichen Systeme immer noch weit entfernt zu sein von den optimalen *in vivo*-Bedingungen. Möglicherweise ist dies auf ein unbalanciertes Verhältnis von Komponenten des Editingsystems zurückzuführen. Da in den *in vitro*-Systemen mit isolierten Mitochondrien gearbeitet wird, ist zum Beispiel der Transport vom Cytosol in die Organellen unterbrochen. Cytoplasmatische Faktoren würden dann *in vitro* in geringerer Konzentration im Mitochondrium vorliegen als *in vivo*, wo sie stets nachgeliefert werden könnten. Denkbar wäre ebenso ein räumlich abgetrenntes System, das nach Lyse der Mitochondrien nur noch suboptimal arbeiten kann.

## **5.4 Erbse und Kartoffel – gemeinsame Editingfaktoren für die *atp9*-RNA**

Erstmalig konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß heterologes RNA-Editing in Mitochondrien möglich ist. In einem Erbsen-*in vitro*-System gelang der Nachweis der Editingaktivität für heterologe Kartoffel-*atp9*-RNA an der konservierten Editingstelle 1. Obwohl sich die heterologe Kartoffel- und die homologe *atp9*-Sequenz der Erbse in einigen Bereichen und vor allem in der Anzahl der Editingstellen (Kartoffel: 10, Erbse 2) unterscheiden, wurde die Kartoffel-*atp9*-RNA im homologen Kartoffel- und im heterologen Erbsensystem an den beiden konservierten Editingstellen gleichermaßen editiert. Folglich müssen alle Faktoren in beiden Pflanzen vorhanden sein, die für das RNA-Editing dieser Stellen notwendig sind. Bestätigt wurde diese Hypothese im umgekehrten heterologen Ansatz. Dazu wurden Untersuchungen an einem *in organello-*

System durchgeführt, das statt mitochondrialer Lysate intakte Mitochondrien als Quelle der RNA-Editingaktivität nutzt. Die hinsichtlich des RNA-Editings zu untersuchenden Transkripte wurden hier als DNA-Sequenzen mit mitochondrialem Promotor mittels Elektroporation in das Organell eingebracht und dort erst vom mitochondrieneigenen Transkriptionsapparat hergestellt. Über dieses System konnte anhand der mitochondrialen *atp9*-Sequenz gezeigt werden, daß auch Erbsen-RNAs vom mitochondrialen Editingapparat der Kartoffel editiert werden. Sowohl Erbse als auch Kartoffel ist demnach in der Lage, in ihren Mitochondrien konservierte Editingstellen in heterologen RNAs zu erkennen. Nach dem Modell von Covello und Gray (1993) ließe sich dies über einen frühen gemeinsamen Ursprung des RNA-Editings von Erbse und Kartoffel für die konservierten *atp9*-Editingstellen bestens erklären. Danach wäre eine Cytidin-Desaminaseaktivität schon früh erworben worden und im Laufe der Zeit unentbehrlich geworden, sodaß sie in Kartoffel und Erbse erhalten geblieben ist. Daß heterologes RNA-Editing an der konservierten Editingstelle 1 und 2 trotz der Unterschiede in der Anzahl der Editingstellen zwischen der Erbsen- und Kartoffel-*atp9*-Sequenz möglich ist, wird durch die Hypothese von Malek *et al.* (1996) unterstützt. Demnach kann die mangelnde Konserviertheit der Editingstellen eines Transkriptes zwischen den Arten auf einen mehrfachen unabhängigen Verlust einzelner Stellen zurückgeführt werden. Bei dieser Entwicklung müßten allerdings alle Faktoren erhalten geblieben sein, die für die noch anwesenden Editingstellen gebraucht werden. Es bleibt zu überprüfen, ob alle Faktoren in Erbse vorhanden sind, die am Kartoffel-*atp9*-RNA-Editing an den acht nicht konservierten Stellen beteiligt sind.

## **5.5 Identifizierung eines essentiellen *cis*-Elementes für das *atp9*-RNA-Editing**

Da über die spezifische Auswahl eines Cytidins für das C-zu-U-RNA-Editing immer noch äußerst wenig bekannt ist, sollte in dieser Arbeit auf die Identifizierung essentieller *cis*-Bereiche der *atp9*-RNA im Erbsen-*in vitro*-System Wert gelegt werden.

Erste Hinweise wurden bereits in dieser Arbeit durch den Nachweis des RNA-Editings homologer und heterologer *atp9*-RNAs im mitochondrialen Kartoffel- und Erbsen-RNA-Editingsystem gewonnen. Bestehende Sequenzabweichungen zwischen Erbse und Kartoffel zeigten keinen Einfluß auf die Editingaktivität des Erbsen-*in vitro*-Systems und können demzufolge für das RNA-Editing als nicht relevant eingestuft werden.

Die exakte Lokalisierung eines essentiellen Sequenzbereiches innerhalb einer mitochondrialen RNA gelang hier erstmalig unter Verwendung einer neu entwickelten Kompetitionsanalyse. Bei dieser Methode wurden kurze Bereiche der Erbsen-*atp9*-RNA in Nähe der Editingstelle während der *in vitro*-Inkubation mit mitochondrialem Lysat durch Hybridisierung mit 14 nt langen Desoxyribonucleotiden blockiert. Sind relevante *cis*-Bereiche betroffen, wird die Interaktion mit essentiellen Editingfaktoren kompetiert und somit die RNA-Editingaktivität reduziert.

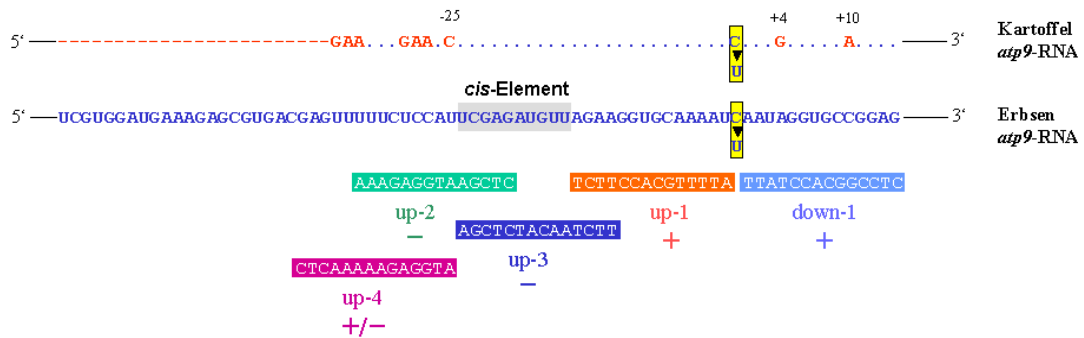
Erst vor kurzem untersuchten Hirose und Sugiura (2001) die Sequenzanforderung im Chloroplastensystem mit Hilfe eines Kompletionsansatzes. Als Kompetitoren wurden dazu jedoch Ribonucleotide eingesetzt, die identische Teilsequenzen des Editingsubstrates umfassen. Während in der vorliegenden Arbeit die Reduktion der RNA-Editingaktivität durch Konkurrenz zwischen einem zur RNA komplementären Desoxyoligonucleotid und dem *trans*-Faktor um die Interaktion mit der RNA erzielt wird, basiert die Identifizierung essentieller Bereiche bei jener Analyse auf einer Konkurrenz zwischen RNA-Kompetitor und Template-RNA. Aufgrund der Bindung dieser Kompetitoren durch die Editingfaktoren wird dort die Interaktion zwischen essentiellen Faktoren und dem Editingsubstrat verhindert. Ein großer Nachteil bei der Verwendung von Ribonucleotiden ist jedoch die außerordentlich kostspielige chemische Synthese und die schwierige Handhabung der Oligonucleotide aufgrund eines schnellen Abbaus durch RNase-Kontaminationen.

Aufgrund des einfachen Umgangs und der preisgünstigen chemischen Synthese ist der Einsatz von Desoxyoligonucleotid-Kompetitoren gegenüber dem von Ribooligonucleotiden eindeutig zu bevorzugen. So ist eine kostengünstige schnelle Untersuchung des Einflusses zahlreicher Kompetitoren auf die RNA-Editingaktivität sowohl in mitochondrialen als auch in plastidären *in vitro*-Systemen möglich.

Mittels der in dieser Arbeit entwickelten Kompletionsanalyse wurde ein Bereich der *atp9*-RNA aus Erbse von -38 bis +14 relativ zur Editingstelle 1 untersucht (Abb. 5.1). Die Kompetition von Desoxyoligonucleotiden mit essentiellen Faktoren um potentielle Bindungsstellen der *atp9*-RNA zeigte, daß das Blockieren des proximalen Downstreambereiches (+1 bis +14, Kompletionsoligonucleotid down-1) keine Reduktion des *atp9*-RNA-Editings an der untersuchten Editingstelle 1 zufolge hat. Dies wird durch die in dieser Arbeit gewonnenen Daten des heterologen Editings unterstützt. Sequenzabweichungen an Position +4 und +10 zeigten keinen Einfluß auf die Editierbarkeit der *atp9*-RNA. Erstaunlicherweise zeigte auch die Hybridisierung der proximalen Upstreamregion (-1 bis -14, Oligonucleotid up-1) keine Reduktion der Editingaktivität. Durch den Zusatz der beiden genannten Kompletionsoligonucleotide down-1 und up-1 konnte die RNA-Aktivität im Vergleich zu einem Ansatz ohne Kompletionsoligonucleotid sogar noch gesteigert werden. Dieses Phänomen trat ebenfalls in den Kontrollansätzen auf, bei denen ein Kompletionsoligonucleotid eingesetzt wurde, welches im Vektorbereich des *in vitro*-Transkriptes paart. Diese erhöhte Editingaktivität wäre über die Ausbildung von kurzen RNA-DNA-Duplexstrukturen an nicht essentiellen Bereichen zu erklären, die möglicherweise zum verminderten Abbau des zur Verfügung stehenden Editingsubstrates durch RNase-Kontaminationen führen. Auch die Stabilisierung eines potentiellen Editingkomplexes wäre hier denkbar. Die Untersuchung der distalen Upstreamregion (-20 bis -33) anhand des Kompletionsoligonucleotids up-2 zeigte eine drastische Reduktion des RNA-Editings. Dabei beinhaltet die betrachtete Region eine Sequenz hoher Varianz (5'-untranslatierte Sequenz) und eine mit absoluter Übereinstimmung zwischen Erbse und Kartoffel. Diese für das *atp9*-RNA-Editing offensichtlich essentielle Region wurde

mit Hilfe entsprechender Kompetitionsoligonucleotide up-3 und up-4 in einen konservierten und variablen Sequenzbereich unterteilt. Die anschließende Analyse zeigte, daß die Interaktion zwischen Kompetitionsoligonucleotid und dem zwischen Erbse und Kartoffel hoch konservierten Bereich (-11 bis -24, up-3) ebenfalls eine drastische Reduktion des Editings zur Folge hat. Der Bereich zahlreicher Sequenzunterschiede zwischen Erbse und Kartoffel (-25 bis -38, up-4) hingegen zeigte nur wenig Wirkung auf die Editingaktivität. Für diesen nicht konservierten Bereich ist jedoch durch die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten des heterologen Editings eindeutig gezeigt, daß die zwischen Erbse und Kartoffel abweichenden Nucleotide im Bereich -25 bis -38 keinerlei Einfluß auf die RNA-Editingaktivität haben, da sich die gemessenen Aktivitäten im Erbsen-*in vitro*-System für die heterologe Kartoffel-*atp9*-RNA und das homologe *atp9*-Template nicht unterschieden. Demzufolge ist das essentielle *cis*-Element für die Editingstelle 1 der *atp9*-RNA im Bereich -15 bis -24 lokalisiert (Abb. 5.1). Die leichte Reduktion des C-zu-U-Umsatzes durch das Kompetitionsoligonucleotid up-4, das außerhalb des identifizierten *cis*-Elementes hybridisiert, wäre darüber zu erklären, daß bei der Interaktion von Editingfaktor und *cis*-Element der direkt umgebende Bereich teilweise mit überspannt wird. Vorstellbar wäre hier beispielsweise die Wechselwirkung mit einem großen Proteinfaktor, der mit einer kleinen Erkennungs-/RNA-Bindungsdomäne das essentielle *cis*-Element im Bereich -15 bis -24 bindet und aufgrund seiner Größe einen größeren Teil der RNA bis über das Nucleotid -25 hinaus abdeckt. Ist die RNA in diesem Bereich mit einem Oligonucleotid hybridisiert, kann der Faktor nicht mit gleicher Effizienz wie an eine einzelsträngige RNA binden, sodaß die RNA-Editingaktivität leicht reduziert würde.





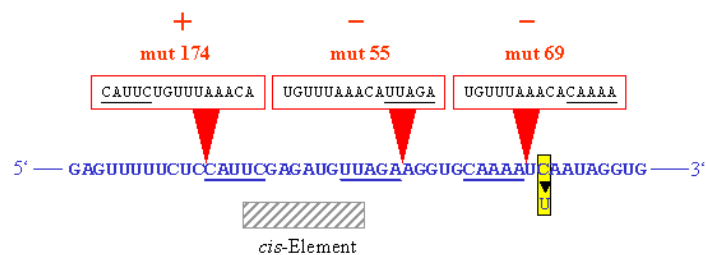
**Abb. 5.1: Identifizierung eines *cis*-Elementes für die Editingstelle 1 der Erbsen-*atp9*-RNA**  
 Dargestellt ist ein Ausschnitt des Sequenzvergleichs zwischen Erbsen- (blaue Schrift) und Kartoffel-*atp9*-RNA. Für die Kartoffel-*atp9*-RNA sind nur die Abweichungen zur Erbsensequenz angegeben (rot). Übereinstimmungen sind als blaue Punkte dargestellt, aufgrund der Klonierung fehlende Sequenzbereiche als rote Striche. Die Lage und Sequenz der zur Kompetitionsanalyse eingesetzten Oligonucleotide sind unter der Erbsensequenz als Balken dargestellt (down-1 hellblau, up-1 orange, up-2 grün, up-3 dunkelblau, up-4 lila). Die gemessenen Editingaktivitäten sind unterhalb des jeweiligen Kompetitionsoligonucleotids mit editingaktiv (+, kein Einfluß) und editinginaktiv (–, starker Einfluß) angegeben. Das über die Kompetitionsanalyse lokalisierte *cis*-Element ist als grauer Kasten in der *atp9*-Sequenz hervorgehoben.

Die in dieser Arbeit bislang einmalige Lokalisierung eines *cis*-Elementes auf einen Bereich von 10 Nucleotiden steht in gutem Einklang zu Untersuchungen des plastidären und mitochondrialen Pflanzen-RNA-Editings. Auch wenn bislang kein allgemeines Schema der für das RNA-Editing essentiellen Bereiche aufgestellt werden kann, so konnte für einige plastidäre Transkripte (Chaudhuri & Maliga, 1996, Reed *et al.*, 2001b, Bock *et al.*, 1996, Hermann & Bock, 1999, Hirose & Sugiura, 2001) und zumindest an einem Beispiel des mitochondrialen RNA-Editings (Farré *et al.*, 2001) über Deletionsexperimente gezeigt werden, daß der nahe Upstreambereich (schwankend zwischen 16 und 42 Nucleotide) für das RNA-Editing von Bedeutung ist.

Nach dem indirekten Nachweis einer Interaktion zwischen potentiellen Editingfaktoren und dem *cis*-Element der *atp9*-RNA in der vorliegenden Arbeit, bleibt die Frage offen, ob es sich bei diesem Faktor tatsächlich um ein Protein handelt, wie mittlerweile für das Pflanzen-Editing angenommen und zumindest für die plastidären Transkripte *psbL*, *psbE* (codieren beide für Proteine des Photosystems II) und *petB* (codiert Cytochrom *b<sub>6</sub>*) gezeigt wurde (Hirose & Sugiura, 2001, Miyamoto *et al.*, 2002). Zur Klärung der Frage böten sich UV-Cross-Linking-Versuche an, bei denen die Interaktion zwischen Protein und Editingsubstrat arrettiert wird und anhand einer Markierung der RNA bei der Proteinanalyse verfolgt werden kann.

## 5.6 Die Relevanz des Abstands zwischen *cis*-Element und Editingstelle

Nach der erfolgreichen Identifizierung eines *cis*-Elements in der vorliegenden Arbeit war die Grundlage geschaffen, die Relevanz des Abstandes zwischen *cis*-Element und Editingstelle („Spacing“) erstmalig direkt beim Pflanzen-RNA-Editing zu untersuchen. Anhand von drei Insertionsmutanten konnte im Erbsen-*in vitro*-System eindeutig gezeigt werden, daß für das RNA-Editing in Pflanzenorganellen „Spacing“ eine tragende Rolle spielt. Das Einfügen von 15 bp-Insertionen zwischen *cis*-Element und Editingstelle 1 der *atp9*-RNA (Mutanten 55 und 69, Abb. 5.2) führte zu einer drastischen Reduktion des RNA-Editings. In der Primer-Ligation konnte für diese Mutanten keine Aktivität mehr nachgewiesen werden, während die distale Mutante 174 noch über 60 % Editingaktivität im Vergleich zur Wildtyp-RNA zeigte.



**Abb. 5.2: Darstellung der Ergebnisse aus Kompetitionsanalyse und Insertionsmutagenese** – Die Erbsen-*atp9*-RNA ist als Ausschnitt in blau dargestellt. Die Lage der Insertionen in den Mutanten mut 55, mut 69 und mut 174 ist unter Angabe der insertierten Sequenzen rot hervorgehoben. Die gemessene Editingaktivität ist mit editingaktiv (+) und editinginaktiv (-) angegeben. Der schraffierte Balken unterhalb der *atp9*-Sequenz markiert die Lage des über die Kompetitionsanalyse identifizierten essentiellen *cis*-Elementes.

Da bereits im Verlauf der Arbeit gezeigt werden konnte, daß die *atp9*-RNA heterolog in Erbse und Kartoffel editiert wird, war die Verwendung eines heterologen Systems mit intakten Kartoffelmitochondrien zur weiteren Charakterisierung des RNA-Editings der Mutanten geeignet. In diesem *in organello*-System wurden chimäre Sequenzen (mit mitochondrialem *26S rRNA*-Promotor und *atpA*-Terminator durch Elektroporation in die Mitochondrien eingebracht und von dem mitochondrialen Transkriptionsapparat zu den beschriebenen RNAs der drei Mutanten umgesetzt. Die Analyse des RNA-Editings erfolgte über Sequenzierung der aus der Erbsen-*atp9*-RNA hergestellten RT-PCR-Produkte. Auf diese Weise konnte noch einmal eindrucksvoll belegt werden, daß die in dieser Arbeit vorgenommenen *in vitro*-Untersuchungen in Verbindung mit der für die Detektion des C-zu-U-Umsatzes entwickelten Primer-Ligation ein zuverlässiges System zur Funktionsanalyse des RNA-Editings darstellen. So konnte im *in organello*-System gezeigt werden, daß die Mutante 174 auch hier ein gleichermaßen wie die Wildtyp-

*atp9*-RNA geeignetes Editingsubstrat darstellt. Sowohl die Editingstelle 1 als auch die Editingstelle 2 lagen in gespleißten Transkripten vollständig editiert vor.

Die Analyse der Mutanten 69 und 55 im *in organello*-System bestätigte ausgezeichnet den im *in vitro*-System erbrachten Nachweis des „Spacing“ beim mitochondrialen *atp9*-Editing. Darüberhinaus gelang der Nachweis, daß die C-zu-U-Umwandlung der Editingstelle 2 von der Insertion im Upstreambereich der Editingstelle 1 unbeeinträchtigt ist. Diese beiden Stellen verfügen somit über unterschiedliche Elemente zur Erkennung eines Cytidins für das Editingereignis.

Mittels zweier unabhängiger Systeme konnte in dieser Arbeit anhand von Insertionsmutanten gezeigt werden, daß 15 bp-Insertionen zwischen dem *cis*-Element und der Editingstelle 1 der *atp9*-RNA eine drastische Reduktion des RNA-Editings zur Folge haben. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten (Hermann & Bock, 1999, Farré *et al.*, 2001) konnte hier erstmalig nachgewiesen werden, daß die Insertion selbst nicht zur Zerstörung eines essentiellen *cis*-Elementes führt, wie in dieser Arbeit durch die Kompetitionsanalyse anhand des Oligonucleotids up-1 eindeutig gezeigt wurde. Die Reduktion ist demzufolge auf die Veränderung des Abstandes zwischen *cis*-Element und Editingstelle direkt zurückzuführen.

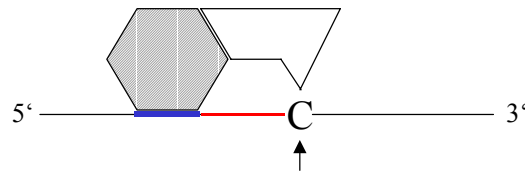
Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse stehen in außerordentlichem Einklang mit den ersten Hinweisen auf das „Spacing“ bei der *ndhB*-RNA (Hermann & Bock, 1999). Die Deletion von einem oder mehreren Nucleotiden im nahen Upstreambereich der Editingstelle V der *ndhB*-RNA führte dort zum Verlust der C-zu-U-Umwandlung der untersuchten Stelle. Wurde dabei jedoch ein entsprechend upstream gelegenes Cytidin in den richtigen Abstand zum weiter 5' gelegenen potentiellen *cis*-Element gesetzt, verschob sich das Editingereignis auf diese Position. Lag in der Sequenz jedoch im richtigen Abstand kein Cytidin vor, fiel das RNA-Editingereignis aus. In der vorliegenden Arbeit zeigte die Sequenzanalyse der Mutanten 55 und 69, daß die Veränderung des „Spacing“ auch hier zu einem Ausfall des RNA-Editings an der Editingstelle 1 der *atp9*-RNA führte und das Editingereignis nicht auf ein Cytidin außerhalb einer bekannten Editingstelle verschoben wurde. Dies korreliert bestens mit der Sequenz des untersuchten Upstreambereiches, in dem exakt 15 nt 5' von der Editingstelle 1 in keiner der Mutanten ein Cytidin vorliegt. Obwohl es für die *ndhB*-RNA bislang trotz ausführlicher Analysen im Tabak-*in vivo*-System nicht gelungen ist (Hermann & Bock, 1999, Bock *et al.*, 1996), ein essentielles *cis*-Element zu identifizieren, ist zumindest die Notwendigkeit des Upstreambereiches mittlerweile mehrfach belegt (Bock *et al.*, 1996, Hirose & Sugiura, 2001). Bei der begründeten Annahme, daß auch bei dieser plastidären RNA im Upstreambereich ein *cis*-Element liegt und die Deletion tatsächlich zwischen diesem und der auf „Spacing“ untersuchten Editingstelle V erfolgt ist, unterstützen die Ergebnisse des *ndhB*-Editings exakt das in dieser Arbeit gefundene „Spacing“ bei der *atp9*-RNA.

Untersuchungen der mitochondrialen *cox2*-RNA (Farré *et al.*, 2001) scheinen zunächst widersprüchlich sowohl zu der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Relevanz des

Abstandes zwischen upstream gelegentlichem *cis*-Element und Editingstelle als auch zu dem beobachteten „Spacing“ bei der *ndhB*-RNA (Hermann & Bock, 1999). Obwohl für die *cox2*-RNA keine exakte Lokalisierung eines essentiellen *cis*-Elementes vorgenommen, sondern lediglich durch Deletionsanalysen der Einfluß einer Region -16 bis +6 relativ zur untersuchten Editingstelle 259 ausfindig gemacht wurde, vermuten die Autoren, daß die Downstreamregion essentiell für die Positionierung des RNA-Editingereignisses ist. Dies begründen sie mit der Notwendigkeit eines Guanosins als direktes 3'-Nucleotid der Editingstelle (Codon TCG) und mit der Verschiebung des Editingereignisses auf ein heterologes Cytidin, wenn dieses direkt 3' von der Editingstelle eingefügt wird. Hierbei führte jedoch die Insertion selbst zu einem Austausch des 3'-Nucleotids Guanosin gegen Cytidin und resultiert zwangsläufig in einem Ausfall des RNA-Editings an der untersuchten Stelle, wie Farré *et al.* (2001) selbst zeigten. Eine solche Präferenz für das 3'-Nucleotid überrascht jedoch nicht, sie ist sogar ein allgemeines Motiv beim Organellen-Editing. Sie spiegelt sich in der Häufigkeit einer Purinbase an der 3'-Position der editierten Codons wider (Maier *et al.*, 1995, Covello & Gray, 1990, Wakasugi *et al.*, 1996) und könnte durch den C-zu-U-Desaminierungsmechanismus selbst bedingt sein. Daß nun tatsächlich bei der untersuchten *cox2*-RNA für die Verschiebung des Editingereignisses ein von Farré *et al.* (2001) postuliertes essentielles Element im Downstreambereich verantwortlich ist, ist eine zur Zeit nicht auszuschließende mögliche Erklärung. Erst die Lokalisierung eines *cis*-Elementes im Downstreambereich könnte die Annahme bestätigen, daß bei der *cox2*-RNA im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *atp9*-RNA und zahlreichen anderen mitochondrialen und plastidären Transkripten (Bock *et al.*, 1996, Chaudhuri & Maliga, 1996, Reed *et al.*, 2001b, Kubo & Kadowaki, 1997, Williams *et al.*, 1998), die alle die Relevanz des Upstreambereiches bestätigen, tatsächlich die Positionierung des editierten Cytidins über ein „Spacing“ im Downstreambereich läuft. Welche Funktion dann jedoch der von Farré *et al.* (2001) als relevant eingestufte Upstreambereich von 16 nt für das Editing der *cox2*-RNA hätte, bliebe eine unbeantwortete Frage.

## 5.7 Modell zur Auswahl eines Cytidins für das RNA-Editing

Aus den Ergebnissen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Kompetitionsanalyse und der Insertionsmutagenese der *atp9*-RNA läßt sich unter Betrachtung der bisher über das Editing in Pflanzenorganellen bekannten Daten ein Modell für das *atp9*-RNA-Editing aufstellen (Abb. 5.3).



**Abb. 5.3: Modell zur Erkennung des Cytidins an der Editingstelle 1 der mitochondrialen *atp9*-RNA aus Erbsen** – Ein spezifischer *trans*-Faktor (grau schraffiert) erkennt die RNA (schwarze Linie) an einem *cis*-Element (blau) und dirigiert die katalytische Einheit (weiß) in einem festgelegten Abstand (rote Linie) zum Cytidin der downstream gelegenen Editingstelle (markiert durch einen Pfeil).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, sind für die C-zu-U-Umwandlung einer Editingstelle ein upstream gelegenes *cis*-Element und ein festgelegter Abstand von diesem zum editierten Cytidin essentiell. Für die *atp9*-RNA konnte das *cis*-Element, das maximal 10 Nucleotide umfaßt, 15 Nucleotide upstream von der Editingstelle 1 lokalisiert werden. Über dieses *cis*-Element tritt ein potentieller *trans*-Faktor mit der zu editierenden RNA in Wechselwirkung, wie indirekt über die Kompetitionsanalyse gezeigt werden konnte. Der *trans*-Faktor, wahrscheinlich ein Protein (Hirose & Sugiura, 2001, Miyamoto *et al.*, 2002), dirigiert die katalytische Einheit zur Editingstelle. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine Cytidin-Desaminase (Blanc *et al.*, 1995, Yu & Schuster, 1995), deren Identifizierung jedoch bis heute nicht gelungen ist. Durch die Bindung des *trans*-Faktors an das *cis*-Element ist die Cytidin-Desaminaseaktivität so positioniert, daß das Cytidin an der Editingstelle editiert wird, wie in der vorliegenden Arbeit durch Analyse der hergestellten *atp9*-Insertionsmutanten gezeigt wurde. Ob die RNA-Bindungseigenschaft des *trans*-Faktors und die editingkatalysierende Funktionseinheit in ein und demselben Protein lokalisiert sind, bleibt offen, scheint aber eher unwahrscheinlich. So müßten alle Editingstellen mitochondrialer Transkripte ein gemeinsames Erkennungsmotiv für den Editingfaktor aufweisen, die Identifizierung eines solchen war jedoch bislang sowohl für die Primär- noch für die Sekundärstruktur editierter RNAs erfolglos (Williams *et al.*, 1998).

## 5.8 Organellenheterologes RNA-Editing

Mitochondrien und Chloroplasten zeigen Ähnlichkeiten beim RNA-Editing. Beide Organellen vollziehen die gleiche Art des Editings, die C-zu-U-, und nur selten die U-zu-C-Transition. Sie zeigen Präferenzen für das Editing bestimmter Codons und für Cytidine an der zweiten Codonposition. Konsequenz der Editingereignisse ist der Erhalt von Codons für konservierte Aminosäuren und korrekter Leserahmen. Beide Organellen weisen an einzelnen Editingstellen in den umgebenden Sequenzen hohe Ähnlichkeit auf. Inwieweit sich die Editingmaschinerien tatsächlich ähneln, sollte in dieser Arbeit in organellenheterologen RNA-Editingansätzen untersucht werden. Um solche Untersuchungen unabhängig von artspezifischen Faktoren durchzuführen zu können,

wurde zunächst in der Erbse zusätzlich zum beschriebenen mitochondrialen ein plastidäres *in vitro*-System etabliert. Anhand der als Editingsubstrat gewählten *ndhB*-RNA konnte die Funktionalität dieses plastidären *in vitro*-Systems nachgewiesen werden, sodaß nun erstmalig das RNA-Editing mitochondrialer Transkripte in einem plastidären *in vitro*-System untersucht werden konnte. Diese organellenheterologen Ansätze zeigten interessanterweise, daß Erbsenchloroplastenlysate gegenüber der mitochondrialen *atp9*-RNA Editingaktivität besitzen. Auch wenn nicht ganz ausgeschlossen werden kann, daß geringe Mengen an Mitochondrienkontaminationen, die mit der Isolierung der Chloroplasten möglicherweise einhergegangen sind, für die gemessene Editingaktivität mit verantwortlich sind, ist dies ein erster Hinweis darauf, daß sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten über alle notwendigen Faktoren für das *atp9*-RNA-Editing verfügen. Ähnliche Untersuchungen zum plastidären RNA-Editing eines mitochondrialen Templates wurden bislang nur an der *cox2*-RNA (codiert die Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase) durchgeführt (Sutton *et al.*, 1995). Durch Transformation konnte das Exon 2 des mitochondrial codierten *cox2*-Gens aus *Petunia* als Transgen in das Chloroplastengenom von Tabak eingebracht werden. Dort zeigte sich die Transkription zwar als erfolgreich, die RNA mitochondrialen Ursprungs wurde jedoch nicht editiert. In den Chloroplasten müssen demnach Faktoren abwesend sein, die spezifisch für das mitochondriale *cox2*-RNA-Editing sind. Dies unterscheidet sich vom Ergebnis der vorliegenden Arbeit am *atp9*-Editing in Chloroplasten. Bei dem *cox2*-Editing wurde allerdings eine heterologe Sequenz aus *Petunia* in einem Tabak-*in vivo*-System eingesetzt, für die bisher jedoch nicht gezeigt wurde, daß sie in Tabak auch heterolog editiert wird. Davon ausgehend, daß die konservierte Editingstelle aus *Petunia* tatsächlich ein geeignetes Editingsubstrat darstellt, wären die unterschiedlichen Ergebnisse des organellenheterologen Chloroplasten-Editings über die Verwendung unterschiedlicher Editingtemplates zu erklären. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete *atp9*-Sequenz codiert die Untereinheit 9 der ATPase. Da dieser Enzymkomplex hoch konserviert ist und sowohl in den Mitochondrien als auch in den Chloroplasten die ATP-Synthese gewährleistet, wäre es durchaus vorstellbar, daß beide Organellen über Faktoren verfügen, die den Erhalt der konservierten Sequenz über RNA-Editing gewährleisten. Die essentiellen Faktoren des *atp9*-RNA-Editings könnten im Kern codiert sein und in beide Organellen gleichermaßen transportiert werden. Alternativ dazu wäre ebenso denkbar, daß die Faktoren direkt in beiden Organellen codiert sind und dort synthetisiert werden. Im Gegensatz dazu sind für das *cox2*-RNA-Editing möglicherweise nur in den Mitochondrien die relevanten Editingfaktoren vorhanden, da das *cox2*-Gen im Chloroplastengenom gar nicht vorkommt und auch das Genprodukt in diesem Kompartiment ohne Funktion ist.

In einem weiteren organellenheterologen Ansatz wurde in dieser Arbeit geprüft, ob auch Erbsenmitochondrien in der Lage sind, plastidäre Transkripte zu editieren. Das mitochondriale *in vitro*-System zeigte jedoch gegenüber der *ndhB*-RNA als plastidärem Editingsubstrat keine Aktivität. Die an diesem Beispiel gezeigte Unfähigkeit der Mitochondrien, plastidäre Transkripte editieren zu können, wird durch die

Untersuchung an einer natürlichen RNA plastidären Ursprungs in Reismitochondrien bestätigt (Zeltz *et al.*, 1996). Bei diesem Editingsubstrat handelt es sich um eine Kopie des *rpoB*-Gens (codiert eine Untereinheit der plastidären RNA-Polymerase), die aus dem Chloroplasten im Laufe der Evolution als Fragment in das Mitochondriengenom integriert wurde. Diese Sequenz wird zwar organellenheterolog transkribiert, C-zu-U-Editing der konservierten Stellen findet jedoch ausschließlich in den Chloroplasten statt.

Sowohl bei dem in dieser Arbeit untersuchten *ndhB*-Editing als auch beim *rpoB*-Editing (Zeltz *et al.*, 1996) scheinen den Mitochondrien essentielle Faktoren für die C-zu-U-Umwandlung plastidärer Transkripte zu fehlen. Erklärbar wäre dies über die Beteiligung von chloroplastenspezifischen oder kerncodierten Editingfaktoren, die aufgrund ihrer Synthese bzw. ihres Transportes nur am Wirkungsort, dem Chloroplasten, vorhanden sind. Zu prüfen bleibt, ob essentielle Faktoren für das Editing plastidärer RNAs in den Mitochondrien im allgemeinen fehlen oder auf das *rpoB*- und *ndhB*-Editing beschränkt sind. In dieser Arbeit ist die Grundlage gelegt worden, weitere Transkripte diesbezüglich einfach und unabhängig von artspezifischen Einflüssen analysieren zu können.

## 5.9 Ausblick

Durch die Etablierung zuverlässiger *in vitro*-RNA-Editingsysteme für Chloroplasten und Mitochondrien ist die Grundlage geschaffen, einerseits die Anforderungen an das Editingsubstrat, andererseits Gemeinsamkeiten und Unterschiede des RNA-Editings sowohl zwischen verschiedenen Pflanzen als auch zwischen den beiden Organellen innerhalb einer Pflanze zu untersuchen. Verschiedene Editingsubstrate können in diesen Systemen sowohl in homologen als auch in heterologen Ansätzen schnell und einfach getestet werden. Um Hinweise auf eine mögliche Coevolution von Editingstellen und Editingfaktoren zu erhalten, sind weitere heterologe Untersuchungen interessant, die Auskunft über die Editierbarkeit heterologer RNAs an nicht konservierten Editingstellen geben. Darüberhinaus könnte der Zusatz von potentiellen Kandidaten der Editingaktivität zu mitochondrialen und plastidären Lysaten, wie etwa den Cytidin-Desaminasen, Hinweise auf die am RNA-Editing beteiligten Enzyme bringen.

Die in dieser Arbeit entwickelte Kompetitionsanalyse eröffnet die Möglichkeit, *cis*-Elemente editierter RNAs zu identifizieren. Über diese Methode kann schnell eine Vielzahl an Daten zur Lage von *cis*-Elementen gewonnen werden, die möglicherweise schon bald zu einem allgemeinen Verständnis für die Auswahl von Cytidinen beim RNA-Editing in Mitochondrien und Chloroplasten führt.