

1 EINLEITUNG

Nach dem Grundsatz der Molekularbiologie wurde lange Zeit davon ausgegangen, daß die genetische Information stets in der DNA festgelegt ist und direkt über die RNA in die Proteinsequenz umgesetzt wird. In den 70er Jahren mußte dieser direkte Weg der genetischen Information von der DNA über die RNA zum Protein erweitert werden. Bei der Genexpression in eukaryotischen Organismen liegen verschiedene Schritte zwischen der RNA-Synthese und der Herstellung von Proteinen. Diese post-transkriptionalen Prozessierungsmechanismen beinhalten das Anhängen einer 7-Methyl-Guanosin-Kappe an das 5'-Ende des Primärtranskriptes (Varani, 1997), die Polyadenylierung des 3'-Endes einer „Messenger“-RNA (mRNA, Keller & Minvielle-Sebastia, 1997) und das Spleißen (Wang & Manley, 1997). Während die erstgenannten u. a. erforderlich für die Stabilität einer mRNA und für die Bildung des Translationsinitiationskomplexes sind, werden durch das Spleißen Gensequenzen unterschiedlich miteinander kombiniert. Dabei werden codierende Bereiche (Exons) des Primärtranskriptes durch das Herausschneiden von nicht-codierenden Abschnitten (Introns) miteinander verknüpft. Erst dadurch wird in der Regel das Primärtranskript in eine reife mRNA mit durchgängiger genetischer Information umgewandelt.

Die Entdeckung des RNA-Editings im Jahre 1986 brachte einen weiteren Prozessierungsschritt zu Tage, bei dem nicht-codierte Uridine in mitochondriale RNAs von Trypanosomen eingefügt und/oder deletiert werden (Benne *et al.*, 1986). Mittlerweile sind verschiedenartige Prozesse beschrieben worden, die neben mRNAs auch Transfer-RNAs (tRNAs) und ribosomale RNAs (rRNAs) betreffen (Gott & Emeson, 2000). Sie ändern alle auf unterschiedliche Weise die genetische Information auf RNA-Ebene ab und werden daher zum RNA-Editing gezählt.

Mechanistisch kann das RNA-Editing in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Beim Insertions-/Deletions-Editing führt das Entfernen und Einfügen einzelner Nucleotide in die mRNA zu Transkripten veränderter Länge und zu Leserasterverschiebungen. Die Unterschiede zwischen der in der DNA vorgegebenen und der editierten Sequenz können dabei so groß sein, daß die Gene für die resultierenden Proteine in der DNA-Sequenz nicht aufzufinden sind. Beim Modifikations-Editing hingegen wird die Identität einzelner Basen verändert. Die Transkriptlänge bleibt im Gegensatz zum Insertions-/Deletions-Editing im allgemeinen gleich. Die aus den editierten mRNAs resultierenden Proteine weisen einzelne Aminosäureabänderungen zur genetisch vorgegebenen Sequenz auf.

Im folgenden sollen die unterschiedlichen Formen des RNA-Editings an Beispielen näher erläutert werden.

1.1 Uridin-Insertion und Deletion bei Trypanosomen

Erstmalig entdeckt wurde das RNA-Editing durch Benne *et al.* (1986) bei *Trypanosoma brucei*, dem Erreger der Schlafkrankheit. Bei diesem Organismus handelt es sich um einen Protozoen, der in die Gruppe der Kinetoplastiden eingeordnet werden kann. Die Kinetoplastiden zeichnen sich durch eine außergewöhnliche Mitochondriengenomstruktur aus, die sich als ein verkettetes Netzwerk aus sogenannten Maxicircles und Minicircles darstellt. Die Primärtranskripte der auf den Maxicircles codierten Proteine werden zum überwiegenden Teil editiert. Dabei werden sowohl Nucleotide in die RNA eingefügt als auch entfernt. Diese gezielten Insertionen und Deletionen umfassen hier ausschließlich Uridin-Nucleotide und werden durch mitochondrial codierte „Guide“-RNAs (gRNAs) vorgegeben. Die genetische Information dafür ist meist in der DNA der kleineren Komponente des Mitochondriengenoms, den Minicircles, enthalten, die mehr als 1000 verschiedene gRNAs codieren.

Den gRNAs werden drei funktionelle Regionen (Hinz & Göringer, 1999) zugeschrieben (Abb. 1.1). Die 5'-Region, die auch als Ankerregion bezeichnet wird, bildet mit der prä-mRNA eine Duplexstruktur aus. Diese legt den Editingstartpunkt fest. Die weiter downstream (stromabwärts) gelegene Informationsregion der gRNA ist im allgemeinen 35 nt lang und determiniert die editierte Sequenz. Die 3'-Region der gRNA trägt einen Oligo(U)-Schwanz, der posttranskriptional angehängt wird. Dieser stabilisiert die Paarung von gRNA und prä-mRNA während des Editingvorgangs (Kapushoc & Simpson, 1999, Blum & Simpson, 1990).

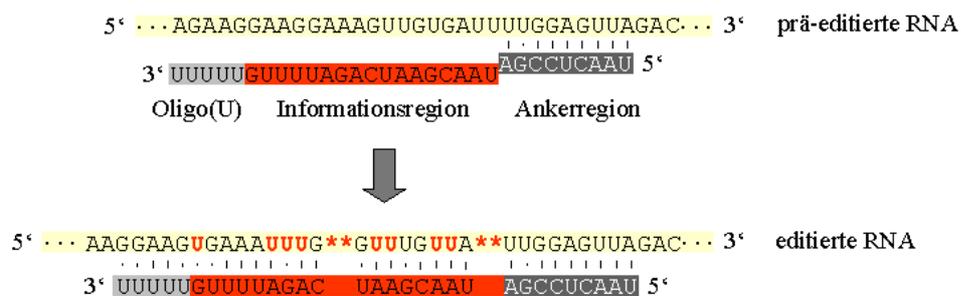


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Paarung zwischen gRNA und der zu editierenden RNA – Gezeigt ist die Paarung einer prä-editierten RNA (hellgelb) mit der passenden gRNA. Die gRNA besteht aus einem Oligo(U)-Schwanz (hellgrau), der Informationsregion (rot), die die zu editierende Sequenz vorgibt, und der Ankerregion (dunkelgrau). Die Ankerregion bildet mit der zu editierenden RNA eine Duplexstruktur aus und legt den Editingstartpunkt fest. Die Uridin-Insertionen (U) und Deletionen (*) sind rot hervorgehoben. Bei der Paarung zwischen gRNA und prä-mRNA sind Nicht-Watson-Crick-Basenpaarungen zwischen Guanin und Uracil erlaubt.

Katalysiert werden die Deletions- und Insertionsreaktionen nach dem Enzym-Kaskaden-Modell von Alfonzo *et al.* (1997) von mindestens drei Enzymen, die mit der gRNA und prä-mRNA einen Ribonucleoproteinkomplex ausbilden (Grams *et al.*, 2000, Stuart & Panigrahi, 2002, Stuart *et al.*, 2002). In den Editingprozeß greift als erstes Enzym eine Endoribonuclease ein. Sie schneidet die prä-mRNA, die mit der Ankerregion der gRNA gepaart vorliegt, direkt 5' von der letzten Basenpaarung. Bei der Deletionsreaktion entfernt nun die 3'-Uridylyl-Exonuclease nach und nach die überzähligen Uridine. Für die Insertionsreaktion wird die 3'-Uridylyl-Transferase benötigt, sie hängt die fehlenden Uridine entsprechend der Informationsregion der gRNA an die prä-mRNA an. Bei wiederhergestellter Komplementarität zur gRNA wird abschließend der RNA-Strang der zu editierenden RNA durch eine RNA-Ligase wieder geschlossen.

Für die Umwandlung einer prä-mRNA in eine vollständig editierte mRNA werden im allgemeinen mehrere gRNAs benötigt. Die gRNAs paaren dabei nacheinander mit der prä-mRNA jeweils direkt 5' zur vorherigen gRNA (Maslov & Simpson, 1992). Die Editingreaktion läuft demzufolge in 3'-5'-Richtung ab.

Das Ausmaß des Editings variiert bei den Trypanosomen stark. So wird die mRNA der Cytochrom *c*-Oxidase-Untereinheit II an 4 Stellen ausschließlich durch Uridin-Insertionen editiert. Die mRNA der Cytochrom *c*-Oxidase-Untereinheit III hingegen wird an weit über 500 Stellen sowohl durch Insertionen als auch durch Deletionen von Uridinen verändert (Simpson *et al.*, 1998).

1.2 Guanodin-Insertion bei Paramyxoviren

Auch bei den Paramyxoviren wurde RNA-Editing des Insertionstyps gefunden. Bislang konnte jedoch nur an einer einzigen Stelle des 15 kb großen Minus-Strang-RNA-Genoms eine solche Insertionsreaktion nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur U-Insertion bei Trypanosomen werden bei diesen Viren Guanosine in die RNA eingefügt (Cattanao *et al.*, 1989, Thomas *et al.*, 1988, Vidal *et al.*, 1990b). Die Anzahl der Guanosine variiert dabei je nach Virus zwischen eins und sechs. Durch die Insertionsreaktion werden alternative Leserahmen im P-Gen erzeugt, sodaß die Expression des P-Proteins (Strukturprotein und Bestandteil des Transkriptasekomplexes) und des V-Proteins mit bislang unbekannter Funktion erst ermöglicht wird. Die G-Insertionsreaktion erfolgt im Gegensatz zum Trypanosomen-Editing über einen cotranskriptionalen Mechanismus, der auf ein Stottern der RNA-Polymerase zurückgeführt wird (Hausmann *et al.*, 1999, Vidal *et al.*, 1990a). Während der Synthese des viralen RNA-Templates kommt es zum Pausieren der viralen Polymerase an einer C_nU_n-Sequenz (Thomas *et al.*, 1988, Vidal *et al.*, 1990b), sodaß die nascierende RNA innerhalb des aktiven Zentrums des Enzyms am Template „zurückkruscht“ (Hausmann *et al.*, 1999). Nach erneuter Hybridisierung schreitet die RNA-Synthese dem Template

entsprechend voran, was das Einfügen nicht-codierter Guanosine an der Editingstelle zur Folge hat.

1.3 Nucleotid-Insertion bei *Physarum polycephalum*

Wie die Trypanosomen und die Paramyxoviren zeigt auch *Physarum polycephalum* in den Mitochondrien RNA-Editing vom Insertionstyp. Bei diesem Schleimpilz können jedoch alle vier Nucleotide in Form von Mono- und Dinucleotiden in die RNA eingefügt werden. Interessanterweise hat man bei *Physarum polycephalum* zusätzlich zum Insertions-Editing bei der mRNA der Cytochrom *c*-Oxidase-Untereinheit I sogar RNA-Editing des Modifikationstyps gefunden (Gott *et al.*, 1993). Dieser wandelt Cytidine in Uridine (C-zu-U) um. Betroffen vom RNA-Editing sind neben fast allen mRNAs (Mahendran *et al.*, 1991, Gott *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 1999) in geringerem Maße auch rRNAs (Mahendran *et al.*, 1994) und tRNAs (Antes *et al.*, 1998).

Bei der Insertions- und C-zu-U-Modifikationsreaktion handelt es sich wahrscheinlich um zwei unabhängige Mechanismen (Visomirski-Robic & Gott, 1995). Ob auch die Mono- und Dinucleotid-Insertionen voneinander unabhängig ablaufen oder beide durch die Insertion einzelner Nucleotide zustande kommen, wird noch diskutiert (Visomirski-Robic & Gott, 1997a, Wang *et al.*, 1999). Über den Mechanismus der Insertionsreaktion ist bislang das folgende bekannt. Der Editingprozeß ist mit der Transkription eng gekoppelt (Visomirski-Robic & Gott, 1997a) und läuft vermutlich ähnlich der G-Insertion bei den Paramyxoviren cotranskriptional ab (Gott, 2000). Die Editingreaktion erfolgt nahe der RNA-Synthese-Stelle in 5'-3'-Richtung (Visomirski-Robic & Gott, 1997a, Visomirski-Robic & Gott, 1997b). Die beobachteten Insertionen resultieren aus einem Anhängen von Nucleotiden an das 3'-Ende der naszierenden RNA (Cheng *et al.*, 2000). Bislang ungeklärt ist, welche Enzyme und Faktoren an den Editingreaktionen beteiligt sind, woher die Spezifität des Editings kommt und wodurch die editierte Sequenz vorgegeben wird.

1.4 Adenosin-Desaminierung bei der mRNA des Säugetier-Glutamatrezeptors

Eine weitere Form des Modifikations-RNA-Editings, die Umwandlung von Adenosin zu Inosin (A-zu-I), wurde bei Säugetieren in den Transkripten von glutamatabhängigen Ionenkanälen im zentralen Nervensystem entdeckt (Sommer *et al.*, 1991). Der Neurotransmitter L-Glutamat aktiviert im Gehirn kationenselektive Rezeptorkanäle. Ionenselektivität und Durchflüsseigenschaften variieren je nach Zusammensetzung des Rezeptors. Am besten untersucht ist hier der AMPA-Rezeptor, der nach seiner Bindungseigenschaft gegenüber dem Agonisten AMPA (α -Amino-3-hydroxyl-5-methyl-isoaxol-4-propionat) benannt ist. Der AMPA-Rezeptor setzt sich entweder aus 4 oder 5 Untereinheiten zusammen (Ferrer-Montiel & Montal, 1996, Mano & Teichberg, 1998), die in Form der Glutamatrezeptor (GluR)-Untereinheiten GluR-A, GluR-B,

GluR-C und GluR-D in unterschiedlicher Weise kombiniert werden. Der Anteil der GluR-B-Untereinheit im Rezeptorkomplex bestimmt dabei die Permeabilität des Kanals für Ca^{2+} -Ionen. Während die GluR-A, -C, -D-Transkripte an Codonposition 585 die Aminosäure Arginin codieren, gibt die GluR-B-mRNA ein Glutamin codon vor. Dieser Unterschied basiert auf einer RNA-Editingreaktion vom Modifikationstyp. Das Codon CAG der GluR-B-prä-mRNA wird durch Desaminierung von Adenosin zu Inosin in das Codon CIG umgewandelt. Da Inosin während der Translation als Guanosin gelesen wird, resultiert das RNA-Editing in einem Austausch von Glutamin gegen Arginin (Q/R). Diese Codonveränderung, die in fast allen GluR-B-Transkripten im Ratten- und Mausgehirn auftritt (Sommer *et al.*, 1991, Burnashev *et al.*, 1992), hat eine verminderte Permeabilität der Rezeptoren mit GluR-B-Untereinheiten für Ca^{2+} -Ionen (Hume *et al.*, 1991, Burnashev *et al.*, 1995) zur Folge.

Weitere Modifikationen des AMPA-Rezeptors treten bei der GluR-B-, GluR-C und GluR-D-mRNA auf. Hier wird ein AGA-Codon in ein IGA-Codon umgewandelt. Dieser Austausch von Arginin gegen Glycin (R/G) hat einen Einfluß auf die Desensibilisierungseigenschaft heteromerer AMPA-Rezeptoren (Lomeli *et al.*, 1994).

Die RNA-Editingereignisse der GluR-Transkripte verlaufen hoch spezifisch. Bei den zu editierenden RNAs liegen die Editingstellen in Anordnung einer Duplex-RNA mit einigen Basenfehlpaarungen vor (Higuchi *et al.*, 1993, Egebjerg *et al.*, 1994). Diese Duplexregionen steuern die RNA-Editingenzyme zu den Editingstellen. Die Editingenzyme sind nach ihrer Spezifität als ADARs (adenosine deaminase that act on RNA) benannt. Die am besten untersuchten Vertreter dieser Familie sind ADAR1 und ADAR2. Sie haben überlappende Spezifitäten und erzeugen ähnliche, jedoch nicht die gleichen RNA-Editing-Muster (Melcher *et al.*, 1996a). Während ADAR1 nur geringe Aktivität für die Q/R-Editingstelle der GluR-B-mRNA zeigt (8 %), liegt die Editingaktivität von ADAR2 für diese Stelle *in vitro* bei 80 % (Hough & Bass, 2000). Für die R/G-Stelle hingegen zeigen beide Enzyme effizientes Editing. Die Enzyme unterscheiden sich in der Anzahl der Bindungsmotive (dsRBMs) für doppelsträngige RNA (Hough & Bass, 1994, O'Connell *et al.*, 1995), die für die Bindung der Substrat-RNA verantwortlich sind. Die Katalysedomäne ist hoch konserviert und vollzieht die Umwandlung von Adenosin zu Inosin in der Editingreaktion. Hierbei handelt es sich um einen hydrolytischen Desaminasemechanismus, bei dem ein Wassermolekül am C6-Atom der Base Adenin angreift (Polson *et al.*, 1991). Die nachfolgende Abspaltung der Aminogruppe führt zur Entstehung der Carboxylfunktion des Endproduktes Inosin.

Die Aktivität von ADAR1 und ADAR2 wird vermutlich über einen negativen Regulator moduliert. Hierbei handelt es sich um einen weiteren Vertreter der Adenosin-Desaminase-Familie, nämlich ADAR3 (Chen *et al.*, 2000). Da bislang für ADAR3 weder gegenüber künstlichen noch gegenüber bekannten Editingsubstraten eine Editingaktivität nachgewiesen werden konnte (Gott & Emeson, 2000, Melcher *et al.*, 1996b), wird für dieses Protein eine Kompetitionsfunktion angenommen. Durch die vorübergehende Bindung von RNA-Substrat durch ADAR3 würde den eigentlichen

Editingenzymen weniger Substrat zur Verfügung stehen und die RNA-Editingrate folglich herabgesetzt. Für ADAR2 wird ein weiterer Regulationsmechanismus postuliert. Durch A-zu-I-Editing der eigenen ADAR2-mRNA wird ein verkürztes instabiles Protein ohne RNA-Editingaktivität hergestellt. Die ADAR2-Aktivität wird demnach durch das RNA-Editing der eigenen mRNA autoreguliert (Rueter *et al.*, 1999).

1.5 Cytidin-Desaminierung bei der Apolipoprotein B-mRNA von Säugern

Bei Säugetieren tritt neben dem beschriebenen A-zu-I-Editing der GluR-B-mRNA ein weiterer Modifikationstyp auf. Es handelt sich hierbei um die Umwandlung von Cytidinen in Uridine in der mRNA des Apolipoprotein B (ApoB). ApoB wird beim Menschen durch eine lange Form, das ApoB-100, und eine kurze Form, das ApoB-48, vertreten, die beide eine wichtige Rolle im Cholesterin-Stoffwechsel spielen (Chan, 1992). ApoB-100 wird von der Leber sezerniert und ist Bestandteil der VLDLs (very low-density lipoproteins) und LDLs (low-density lipoproteins). Es dient dem LDL-Rezeptor als Ligand und transportiert über rezeptorvermittelte Endocytose Cholesterin zu den Zellen. Die dafür notwendige Rezeptorbindungsdomäne befindet sich am Carboxyterminus (Borén *et al.*, 1998). Die kurze Form des ApoB-48 repräsentiert 48 % der Länge des ApoB-100. Da die carboxyterminale Hälfte hier fehlt, weist sie im Gegensatz zum ApoB-100 keine Ligandenfunktion für den LDL-Rezeptor auf. ApoB-48 wird im Dünndarm gebildet und dient der Absorption und dem Transport von Nahrungsfetten.

Im Jahre 1987 konnte von Powell *et al.* und Chen *et al.* gezeigt werden, daß, obwohl beide ApoB-Formen von dem gleichen *apoB*-Gen codiert werden, sich deren cDNAs in einer Base unterscheiden. Die cDNA aus Lebergewebe zeigt wie die Gensequenz an Codonposition 6666 ein Cytidin, die cDNA aus Darmzellen jedoch ein Thymin an dieser Stelle (Abb. 1.2). Zwei Jahre später konnte in einem *in vitro*-System die Hypothese bestätigt werden, daß dieser Unterschied auf C-zu-U-RNA-Editing zurückzuführen ist (Driscoll *et al.*, 1989). Hierbei wird das Glutaminocodon (CAA) in ein Stoppcodon (UAA) umgewandelt, was in der Expression des verkürzten ApoB-48-Proteins resultiert.

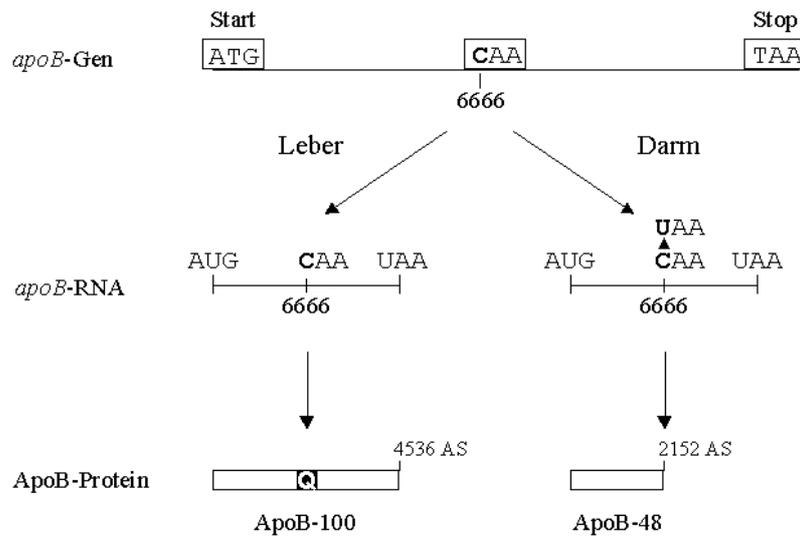


Abb. 1.2: Schema des apoB-RNA-Editings – Dargestellt ist das apoB-Gen mit seinem Start- und Stoppcodon und der Editingstelle an Position 6666. Die Umwandlung des C-6666 zu U-6666 in der RNA resultiert im verkürzten Protein ApoB-48 mit 2152 Aminosäuren (AS). Die Expression der nicht-editierten RNA führt zum ApoB-100-Protein mit Glutamin (Q) an Codonposition 6666 bei einer Gesamtlänge von 4536 Aminosäuren.

Die C-zu-U-Modifikation ist ein posttranskriptionaler Prozeß, der wahrscheinlich nach dem Spleißen im Kern abläuft (Sowden *et al.*, 1996, Sowden & Smith, 2001, Davidson, 2002). Für diese hochspezifische Reaktion sind Elemente auf der RNA selbst (*cis*-Elemente) verantwortlich. Drei solcher Motive sind bekannt, ein 5'-Regulatorelement, eine „Spacer“-Sequenz und die sogenannte „Mooring“-Sequenz. Bei letzterer handelt es sich um eine 11 nt lange Region, die 3' von der Editingstelle liegt und zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert ist. Veränderungen innerhalb dieser Sequenz führen zur Reduktion oder zum Verlust der Editingaktivität (Shah *et al.*, 1994, Backus *et al.*, 1994). Die „Spacer“-Sequenz liegt zwischen Editingstelle und Mooring-Sequenz und legt den Abstand der beiden zueinander und damit das zu editierende Cytidin fest (Backus *et al.*, 1994). Das 5'-Regulatorelement liegt direkt upstream (stromaufwärts) von der Editingstelle (Backus & Smith, 1992). Bei Veränderungen dieser Sequenz kommt es ebenfalls zum Aktivitätsverlust.

Die C-zu-U-Editingreaktion wird nach Strukturvorhersagen (Richardson *et al.*, 1998) in einer Stem-Loop-Struktur vollzogen, die die Editingstelle für die Editingmaschinerie freigibt. Als Katalysator der Reaktion dient das Enzym APOBEC-1 (*apoB* mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 1, Teng *et al.*, 1993), das ein für die Desaminaseaktivität essentielles Motiv zur Zinkkoordinierung in seinem aktiven Zentrum trägt (Yamanaka *et al.*, 1994, Driscoll & Zhang, 1994, MacGinnitie *et al.*, 1995). APOBEC-1 alleine ist jedoch nicht in der Lage, die apoB-mRNA *in vitro* zu editieren. Mindestens ein weiteres Protein wird dazu benötigt. Als solcher Hilfsfaktor

wurde das Protein ACF (APOBEC-1 complementation factor) identifiziert (Mehta *et al.*, 2000, Lellek *et al.*, 2000). ACF bindet an die *apoB*-RNA und vermittelt die Bindung von APOBEC-1 an die RNA in richtiger Position (Blanc *et al.*, 2001a). Weitere Proteine, die mit APOBEC-1 oder der *apoB*-mRNA interagieren können, wurden zwar identifiziert, sind jedoch im Gegensatz zu ACF nicht in der Lage, das *apoB*-Editing zu komplementieren (Blanc *et al.*, 2001b, Anant *et al.*, 2001). Ihnen wird eine Rolle bei der Regulation der RNA-Editingaktivität zugeschrieben.

1.6 RNA-Editing in Pflanzen

Auch im Pflanzenreich wurde RNA-Editing des Modifikationstyps gefunden. Bereits im Jahre 1989 gelang es drei Gruppen gleichzeitig, RNA-Editing in den Mitochondrien nachzuweisen (Gualberto *et al.*, Covello & Gray, Hiesel *et al.*). Zwei Jahre später konnte gezeigt werden, daß RNA-Editing auch in den Chloroplasten stattfindet (Hoch *et al.*, 1991, Kudla *et al.*, 1991). Dabei zeigt das RNA-Editing in beiden Organellen viele Gemeinsamkeiten (vgl. Tabelle 1). So werden genomisch vorgegebene Cytidine zu Uridinen in der RNA abgeändert. Bei Mitochondrien tritt dieser Prozeß bei fast allen Transkripten auf, bei Chloroplasten ist es nicht so verbreitet (Bock, 2000). Zusätzlich zum C-zu-U-Editing zeigen beide Organellen ein reverses RNA-Editing, bei dem Uridine in Cytidine (U-zu-C) in der RNA umgewandelt werden. Diese Reaktion tritt in den Mitochondrien höherer Pflanzen (Schuster *et al.*, 1990a, Gualberto *et al.*, 1990, Hiesel *et al.*, 1990) jedoch sehr begrenzt auf, etwas häufiger ist es bei niederen Pflanzen wie Moosen und Farnen (Malek *et al.*, 1996). Für die Chloroplasten gelang der Nachweis einer solchen Reaktion bislang nur in einem Organismus, dem Moos *Antheroceros formosa* (Yoshinaga *et al.*, 1996, Yoshinaga *et al.*, 1997).

Tabelle 1: Vergleich der RNA-Editingprozesse in pflanzlichen Mitochondrien und Chloroplasten

Merkm ^{al}	Mitochondrien	Chloroplasten
C-zu-U-Reaktion	Hauptform des Editings	
U-zu-C-Reaktion	selten in höheren Pflanzen, etwas häufiger bei Moosen und Farnen	nicht bei höheren Pflanzen, gefunden nur beim Moos <i>Antheroceros formosa</i>
Editingsubstrate	mRNAs, tRNAs, rRNAs	mRNAs
Häufigkeit des Editings	hoch	niedrig
Präferenz für editierte Codons	2. Codonposition bevorzugt	
Folgen des Editings	Aminosäureaustausch, Einführen neuer Start- und Stoppcodons, Entfernen von Stoppcodons, stilles Editing (ohne Veränderung der Proteinsequenz)	

Als Substrate des RNA-Editings dienen sowohl in den Mitochondrien als auch in den Chloroplasten hauptsächlich mRNAs. Für die Mitochondrien konnte darüberhinaus gezeigt werden, daß auch tRNAs vom RNA-Editing betroffen sind (Marechal-Drouard *et al.*, 1996a und 1996b, Binder, S. *et al.*, 1994). Daß auch rRNAs als Editingsubstrate dienen, konnte bislang nur an einem Beispiel gezeigt werden, der mitochondrialen 26S rRNA von *Oenothera* (Schuster *et al.*, 1991). Nicht-codierende Sequenzen wie Introns, 5'-, 3'- und untranslatierte Bereiche polycistronischer mRNAs werden sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten editiert (Covello & Gray, 1990, Schuster *et al.*, 1990b, Gualberto *et al.*, 1991, Kudla & Bock, 1999). Eine weitere Gemeinsamkeit des Editings in beiden Organellen zeigt sich in der Präferenz der C-zu-U-Editingereignisse für das Nucleotid an Codonposition 2. Weniger bevorzugt ist das Nucleotid an Position 1, nur sehr selten findet RNA-Editing an der 3. Position statt (zusammengefaßt in Bock, 2000).

Die Häufigkeit der Editingereignisse unterscheidet sich bei Mitochondrien und Chloroplasten deutlich. In den Mitochondrien von *Arabidopsis thaliana* wurden weit über 400 Editingstellen auf mRNAs identifiziert (Giegé & Brennicke, 1999), während im Chloroplastengenom des Mais nur 27 Editingstellen in den proteincodierenden Genen gefunden wurden (Peeter & Hanson, 2002, Maier *et al.*, 1995). Innerhalb beider Organellen variieren die Editingraten zwischen einzelnen Transkripten stark. Während im mitochondrialen *nad5*-Transkript (codiert eine Untereinheit der NADH-Dehydrogenase) aus Weizen beispielsweise nur 1,5 % der Cytidine in Uridine umgewandelt werden, wird die mitochondriale *orf206*-mRNA (codiert eine Untereinheit des ABC-Häm-Transporters in der Cytochrom *c*-Biogenese) zu über 15 % C-zu-U-editiert (zusammengefaßt in Maier *et al.*, 1996). Diese ungleiche Verteilung ist auch für Chloroplasten gültig. In Tabak liegen alleine ein Drittel der bekannten Editingstellen in einem einzigen Gen, dem *ndhB*-Gen (Bock, 2000), welches eine Untereinheit der NAD(P)H-Dehydrogenase codiert.

1.6.1 Funktion des RNA-Editings in Pflanzen

Die Funktion des RNA-Editings in Chloroplasten und Mitochondrien ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird angenommen, daß das Editing struktureller RNAs der Herstellung wichtiger Sekundärstrukturen dient. Durch das Einfügen oder Entfernen von Basenfehlpaarungen in Stem-Loop-Strukturen wird die Prozessierung von mRNAs (Spleißen von Introns), die Reifungsprozessierung von tRNAs und die funktionelle Struktur der rRNAs gewährleistet. Für das mRNA-Editing ist die Funktion klarer. Durch Erschaffung neuer Translationsstartcodons (Hoch *et al.*, 1991, Zanlungo *et al.*, 1995) und Stoppcodons (Schuster & Brennicke, 1991, Wakasugi *et al.*, 1996) werden Leseraster verändert und folglich Proteine synthetisiert, die ohne RNA-Editing nicht als funktionelle Proteine exprimiert werden könnten. Die genetische Information der genomischen Sequenz wird auf diese Weise auf Ebene der RNA „korrigiert“. Am häufigsten führt diese „Korrektur“ zur Änderung einzelner Aminosäuren in den resultierenden Proteinen, sodaß die konservierte Aminosäuresequenz wiederhergestellt

wird (Maier *et al.*, 1992a und 1992b). Die funktionelle Relevanz des RNA-Editings wird am Beispiel des plastidären *psbF*-Gens (codiert die β -Untereinheit von Cytochrom *b₅₅₉*) deutlich. Durch Einfügen einer Editingstelle des *psbF*-Gens aus Spinat in das entsprechende Tabak-Gen, welches diese Stelle bereits prä-editiert in der DNA-Sequenz trägt, entstand ein Photosystem II-defizienter Phänotyp (Bock *et al.*, 1994). Die Editingaktivität für das heterologe Spinat-*psbF*-Transkript fehlt folglich in Tabak und läßt ein PsbF-Protein entstehen, das eine einzige Phenylalanin-zu-Serin-Substitution trägt und funktionell inaktiv ist. Die Prozessierung des *psbF*-Transkriptes durch RNA-Editing ist folglich Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit des PsbF-Proteins.

Für Mitochondrien konnte ebenfalls nachgewiesen werden, daß die Expression uneditierter Transkripte zum Fehlen der Funktionalität von Proteinen führt. Die uneditierte Version des *atp9*-Gens (codiert eine Untereinheit der ATPase) aus Tabak wurde hierzu als Fusion mit einer mitochondrialen Transitsequenz und einem konstitutiven Promotor in das Kerngenom integriert (Hernould *et al.*, 1993). Die Expression des ATP9-Proteins und der Import in die Mitochondrien über ein Transitpeptid resultierte in einem Phänotyp mit Cytoplasmatischer Männlicher Sterilität (CMS). Dieser auf defekte Mitochondrienfunktion basierende Phänotyp ist Folge der Genexpression der uneditierten *atp9*-Sequenz. Möglicherweise konkurrieren die nicht-funktionellen ATP9-Untereinheiten konkurrieren mit den funktionsfähigen ATP9-Untereinheiten, die von dem endogenen mitochondrialen Gen exprimiert werden. Eine nachfolgende Anti-Sense-Inhibierung des eingebrachten *atp9*-Gens hob diesen Effekt auf und führte zur Wiederherstellung der Pollenfertilität in den doppelt-transgenen Tabakpflanzen (Zabaleta *et al.*, 1996).

1.6.2 Zeitpunkt des RNA-Editings innerhalb der Genexpression

Beim RNA-Editing in Pflanzenorganellen handelt es sich um einen post-transkriptionalen Prozeß. Dies konnte am Beispiel des mitochondrialen *nad7*-Transkriptes (codiert eine NADH-Dehydrogenase-Untereinheit) gezeigt werden. Hier trat das Editing ausschließlich in prozessierten (gespleißten) Transkripten auf (Carrillo & Bonen, 1997). RNA-Editing scheint trotz dieser klaren Hierarchie zugunsten des Spleißens beim *nad7*-Transkript im allgemeinen unabhängig von anderen RNA-Prozessierungsschritten abzulaufen. Sowohl an unvollständig als auch an vollständig prozessierten RNAs konnte C-zu-U-Editing aufgezeigt werden (Sutton *et al.*, 1991, Freyer *et al.*, 1993, Gualberto *et al.*, 1991). Somit scheint das Editing der *nad7*-mRNA eher eine Ausnahme darzustellen. Dies wäre darüber zu erklären, daß durch das Spleißen eine Sequenz hergestellt wird, welche das RNA-Editing überhaupt erst erlaubt.

RNA-Editing scheint auch von weiteren Schritten der Genexpression, wie der Translation, unabhängig zu sein. Am Beispiel der *rpoB*-RNA, die für eine Untereinheit der RNA-Polymerase codiert, konnte in verschiedenen Experimenten gezeigt werden, daß sich das RNA-Editingmuster durch Störung der plastidären Translation nicht ändert. Dies ist sowohl für Weizen, an einer bisher noch nicht weiter charakterisierten

Kerngenommutante (Zeltz *et al.*, 1993), als auch für Tabak gezeigt worden (Karcher & Bock, 1998). Beim Tabak brachten weder die Behandlung mit translationshemmenden Antibiotika eine Reduktion des *rpoB*-Editings noch eine erhöhte Anzuchttemperatur, die möglicherweise den Zerfall der Ribosomen zur Folge hat. Für das *ndhB*-Transkript des Tabaks, das für eine NAD(P)H-Dehydrogenase-Untereinheit codiert, gilt diese strenge Unabhängigkeit jedoch nicht. An der Editingstelle III kam es dort nach Antibiotikabehandlung bzw. Hitzeshock der Pflanzen zu einer drastischen Reduktion des RNA-Editings. Eine weitere Abweichung von diesem allgemeinen Schema ist beim Mais beobachtet worden (Nakajima & Mulligan, 2001). Dort zeigten die Transkripte der ribosomalen Proteine Rps14 und Rpl20 nach Hitzeshock der Pflanzen ebenfalls eine Reduktion der Editingrate. Diese Unterschiede in der Abhängigkeit von der plastidären Translation wären darüber zu erklären, daß für einige Editingstellen Faktoren notwendig sind, die in den Chloroplasten synthetisiert werden. Durch Ausfall der Translation könnten diese essentielle Faktoren nicht mehr hergestellt werden. Im Gegensatz dazu werden für andere Stellen zur Erkennung der zu editierenden Cytidine möglicherweise kerncodierte Faktoren benötigt, die in die Chloroplasten importiert werden. Das Editing dieser Stellen wäre demzufolge unabhängig von der Translation in den Chloroplasten.

1.6.3 Mechanismus der Editingreaktion

Als Mechanismen für die C-zu-U-Editingreaktion sind theoretisch drei Möglichkeiten vorstellbar (Abb. 1.3). Die Umwandlung von Cytidinen zu Uridinen innerhalb der RNA könnte durch eine Austauschreaktion der Nucleotide unter Trennung des Zuckerphosphatrückgrats vollzogen werden. Die Zuckerphosphatbindung bleibt jedoch nach Experimenten von Rajasekhar und Mulligan (1993) intakt. Stattdessen wäre als zweite Option eine Transglycosilierungsreaktion denkbar, bei der durch Trennung der N-glycosidischen Bindung zwischen Cytosin und Riboserest nur die Base ausgetauscht wird. Für das Editing in Mitochondrien konnte von zwei Arbeitsgruppen (Blanc *et al.*, 1995, Yu & Schuster, 1995) gezeigt werden, daß die N-Glycosidbindung erhalten bleibt und folglich nur der Desaminierungsmechanismus zur C-zu-U-Umwandlung in Frage kommt.

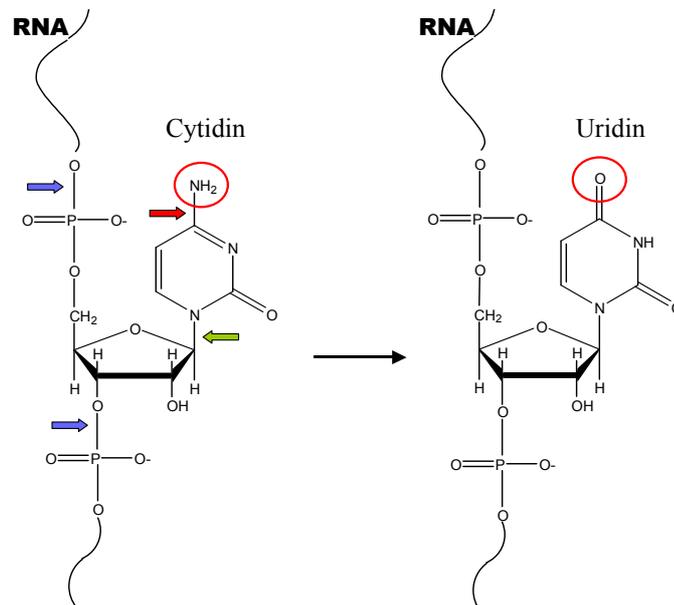


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der möglichen Mechanismen zur C-zu-U-Editingreaktion
 Der Austausch der Aminogruppe durch die Carboxylfunktion ist rot hervorgehoben. Blaue Pfeile kennzeichnen die Trennung der Bindungen beim Austausch des ganzen Nucleotids. Der grüne Pfeil markiert die betroffene Bindung bei der Transglycosylierungsreaktion, der rote Pfeil die der Desaminierungsreaktion.

Welches Enzym diese Reaktion katalysiert, ist bislang unbekannt. Favorisiert wird eine Cytidin-Desaminase, die bereits beim C-zu-U-Editing der Säugetier-*apoB*-mRNA als Katalysator identifiziert wurde. Die reverse RNA-Editingreaktion von Cytidin zu Uridin kann jedoch mit einer solchen enzymatischen Aktivität nicht vollzogen werden. Möglicherweise ist für diese Reaktion ein unabhängiges Enzym verantwortlich. Eine andere Alternative wäre, daß beide Reaktionen, sowohl die C-zu-U- als auch die U-zu-C-Umwandlung von dem gleichen Enzym in einer Transaminierungsreaktion vollzogen werden (Yu & Schuster, 1995). Hierbei würde in der C-zu-U-Reaktion die Aminogruppe nicht direkt freigesetzt, sondern an ein Akzeptorsubstrat weitergegeben. Für die U-zu-C-Reaktion wäre der umgekehrte Weg denkbar, die Aminogruppe würde von einem Donor auf das Uridin als Akzeptor übertragen.

1.6.4 Erkennung der Editingstelle

Beim RNA-Editing handelt es sich um einen hoch spezifischen Prozeß, der ausschließlich exakt festgelegte Cytidine in Uridine umwandelt. Eine wichtige Frage ist, worauf die Erkennung eines Cytidins für die Editingreaktion basiert. Eine Möglichkeit wäre, daß die Information für die Umwandlung eines Cytidins in der RNA selbst liegt. Beim Vergleich verschiedener Editingstellen unterschiedlicher mitochondrialer und plastidärer Transkripte wird die Präferenz der Editingreaktion für bestimmte Codons deutlich. In beiden Organellen wird am häufigsten das Cytidin innerhalb des Codons

UCR (R = Purin), fast nie hingegen im Codon GCN (N = A, C, G oder U) umgewandelt (Bock, 2000). Diese gleichen Präferenzen können sogar z. T. auf flankierende Sequenzen der Editingstellen erweitert werden. Maier *et al.* (1992b) konnten durch Vergleich der umgebenden Sequenzen mitochondriale und plastidäre Editingstellen verschiedenen Gruppen zuordnen, für die jeweils eine Konsensussequenz von acht Nucleotiden in Nachbarschaft zur Editingstelle formuliert werden kann. Da aber die Mehrzahl der bekannten Editingstellen in dieses Schema nicht hineinpaßt und bisher auch keine Konsensuselemente für die Sekundärstruktur aufgestellt werden konnte, wird davon ausgegangen, daß die Information für die C-zu-U-Umwandlung nicht nur auf der RNA alleine liegen kann, sondern durch von außen wirkende Faktoren (*trans*-Faktoren) beigesteuert wird. Chaudhuri *et al.* (1995) ist es gelungen, eine Beteiligung von *trans*-Faktoren für das *psbL*-Editing (*psbL* codiert ein Protein des Photosystems II) indirekt nachzuweisen. Durch die Etablierung einer Transformationstechnik für Tabakchloroplasten (Svab & Maliga, 1993) war es möglich, überzählige Kopien des *psbL*-Gens in das Chloroplastengenom zu integrieren. Während das *psbL*-Editing dadurch erstaunlicherweise deutlich reduziert wurde, hatten die überzähligen *psbL*-Kopien keinerlei Einfluß auf das RNA-Editing anderer Transkripte. Eine sinnvolle Erklärung hierfür wäre, daß für das RNA-Editing ein *trans*-Faktor notwendig ist, der begrenzt in den Chloroplasten vorliegt und für das Editing des *psbL*-Transkriptes spezifisch ist. Auch am Beispiel des Editings der *psbF*-RNA (codiert eine Untereinheit des Cytochrom *b₅₅₉*) konnte die Notwendigkeit eines *trans*-Faktors für das RNA-Editing aufgezeigt werden (Bock & Koop, 1997). Dazu wurde im Chloroplastengenom des Tabaks die natürliche *psbF*-Sequenz gegen die homologe aus Spinat ersetzt. Die beiden Sequenzen unterschieden sich lediglich an einer Editingstelle. Während die Editingstelle der natürlichen Sequenz bereits prä-editiert in Form von Thymin in der DNA vorliegt, trägt die Sequenz aus Spinat dort ein Cytidin, welches durch RNA-Editing zu Uridin umgewandelt werden muß. Diese Umwandlung der Spinatsequenz schlug jedoch im transgenen Tabak fehl. Erst durch Fusion der Tabakzellen mit Spinatprotoplasten wurde die RNA-Editingaktivität für die Spinatsequenz hergestellt. Demzufolge bedarf es *trans*-Faktoren, die nur im Spinat vorhanden sind.

Weiterhin bleibt die Frage offen, ob es sich bei den im RNA-Editing involvierten *trans*-Faktoren ähnlich dem Insertions-/Deletions-Editing in den Trypanosomen (vgl. 1.1) um RNAs handelt, die die Information für die zu editierenden Nucleotide enthalten. Auf der Suche nach einer solchen hypothetischen RNA, gelang es Bock und Maliga (1995) anhand der bekannten Sequenzdaten des Chloroplastengenoms aus Tabak, eine Sequenz passend zur *psbL*-RNA ausfindig zu machen. Mutationsanalysen dieser zur editierten *psbL*-RNA komplementären Sequenz zeigten jedoch keinerlei Einfluß auf das *psbL*-Editing. Auch wenn bis heute nicht ausgeschlossen werden kann, daß eine gRNA-ähnliche Sequenz die zu editierenden Cytidine vorgibt, werden mittlerweile Proteine als wahrscheinlichere Kandidaten für die *trans*-Faktoren angesehen. Unterstützt wird diese Vermutung dadurch, daß auch andere C-zu-U-Editingtypen wie das *apoB*-RNA-Editing

bei Säugetieren (vgl. 1.5) offensichtlich auf die Beteiligung von gRNA-ähnlichen Sequenzen verzichten.

Erste Hinweise, daß es sich bei den *trans*-Faktoren um Proteine und nicht um RNAs handelt, konnten durch Untersuchungen an RNA-Editing-*in vitro*-Systemen gewonnen werden. Bei Einsatz nucleasevorbehandelter Mitochondrien- oder Chloroplastenlysate in solchen Systemen konnte für einige Transkripte keine Abnahme der in diesen Lysaten enthaltenen RNA-Editingaktivität festgestellt werden (Mulligan *et al.*, 1999, Hirose & Sugiura, 2001). Eine solche wäre aber zwangsläufig zu erwarten, wenn RNAs eine tragende Rolle beim RNA-Editing spielten. Vielmehr sprechen für die Beteiligung von Proteinen als Erkennungsfaktoren der Editingstellen Untersuchungen des Chloroplasten-Editings von Hirose und Sugiura (2001), die am ersten und bislang einzigen plastidären *in vitro*-System in Tabak vorgenommen wurden. Durch UV-Cross-Linking-Experimente konnte gezeigt werden, daß die RNA-Editingaktivität gegenüber der *psbL*-RNA, die ein Protein des Photosystems II codiert, mit der Bindung eines Proteins an die RNA in Zusammenhang steht.

1.6.4.1 Erkennung von *cis*-Elementen der RNA durch *trans*-Faktoren

Welche Elemente der RNA sind es nun, die durch die *trans*-Faktoren erkannt werden? Bei den Chloroplasten wurden mittlerweile einige Untersuchungen durchgeführt, aus denen sich allerdings kein striktes und einfaches Schema für essentielle Bereiche innerhalb der editierten RNAs ableiten läßt. In diesen Untersuchungen wurden durch die Transformationstechnik Transgene in das Chloroplastengenom des Tabaks eingebracht, die verschiedene Editingstellen in unterschiedlichen umgebenden Sequenzen enthielten. Am besten untersucht wurden dabei die plastidären Transkripte für eine Untereinheit der RNA-Polymerase (*rpoB*), einer NAD(P)H-Dehydrogenase-Untereinheit (*ndhB*) und eines Proteins des Photosystems II (*psbL*). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 1.4 gezeigt.

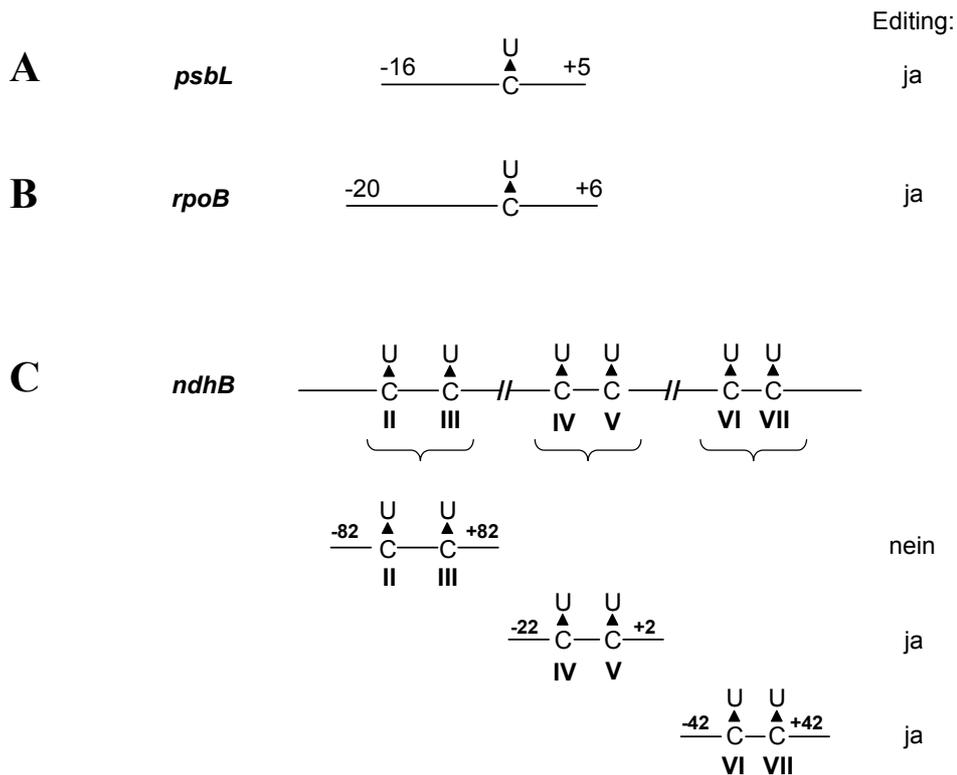


Abb. 1.4: Übersicht der Anforderungen des RNA-Editings an die Länge plastidärer RNAs – Die *psbL*-RNA (A) wird erfolgreich editiert bei einer minimalen Sequenzumgebung von -16/+5. Die *rpoB*-RNA (B) bedarf einer Sequenzumgebung von -20 bis +6. Das *ndhB*-Transkript (C) hingegen zeigt für die in Paaren untersuchten Editingstellen sehr unterschiedliche Anforderungen an die Länge des Editingsubstrates. Editingstelle II und III werden auch innerhalb eines -82 bis +82 umfassenden Substrates nicht editiert, die Editingstellen IV und V hingegen bei -22 bis +2 immer noch fast vollständig und die Editingstellen VI und VII bei einer Umgebung von -42 bis +42 nur unvollständig.

Beim *psbL*-Editing konnte anhand von Deletionsanalysen nachgewiesen werden (Chaudhuri & Maliga, 1996), daß eine Region von nur 22 Nucleotiden um die Editingstelle (16 nt upstream und 5 nt downstream) ausreicht, um die C-zu-U-Umwandlung zu gewährleisten (Abb. 1.4, A). Für das *rpoB*-Editing konnte auf gleiche Weise gezeigt werden (Reed *et al.*, 2001b), daß ein RNA-Substrat von 27 Nucleotiden (20 nt upstream und 6 nt downstream) die C-zu-U-Umwandlung der Editingstelle II in Tabakchloroplasten erlaubt (Abb. 1.4, B). Bei Verwendung eines heterologen Transgens mit gleicher Länge hingegen findet kein RNA-Editing mehr statt. Für die eingebrachte heterologe Sequenz aus der Schwarzkiefer, die an vier Positionen von der Tabaksequenz abweicht, konnte durch Mutationsanalysen gezeigt werden, daß die Identität des Nucleotids an Position -20 alleine für die fehlende C-zu-U-Umwandlung verantwortlich ist.

Die *ndhB*-RNA aus Tabak wurde bezüglich des Editings in Tabakchloroplasten an sechs Editingstellen analysiert (Bock *et al.*, 1996). Da jeweils zwei Editingstellen dicht beieinander liegen, wurden diese gemeinsam in einem transgenen Ansatz erfaßt. Die in

das Chloroplastengenom eingebrachten Transgene wurden alle gleich konstruiert, sodaß sie 42 nt ihrer jeweils natürlichen Sequenzen upstream von der 5'-Editingstelle und 42 nt downstream von der 3'-Editingstelle trugen. Während ein Paar (Editingstelle II und III) bei dieser Transkriptlänge gar kein Editing zeigte, wurden die Stellen VI und VII unvollständig editiert (Abb. 1.4, C). Für das dritte Paar (Editingstelle IV und V) fand hingegen ein vollständiger C-zu-U-Umsatz statt. Um für die Editingstellen II und III ein funktionelles RNA-Editingsubstrat herzustellen, wurde das Transgen am 5'- und am 3'-Ende verlängert. Es stellte sich jedoch heraus, daß selbst eine Verlängerung der Sequenz um 80 Nucleotide auf 82 nt upstream und 82 nt downstream von den beiden Editingstellen für das Editing nicht ausreichte. Für die Editingstellen IV und V konnte die transgene Sequenz sogar auf 22 nt upstream und 22 nt downstream ohne Verlust der Editingaktivität verkürzt werden. Erst bei einer weiteren Verkürzung des 5'-Endes der *ndhB*-RNA in der transgenen Sequenz auf 12 nt upstream von der Stelle IV, kam es zu einer drastischen Reduktion des Editings an den Stellen IV und V. Die Notwendigkeit des Upstreambereiches gilt nicht für den Downstreambereich. Bei Erhalt eines Downstreambereiches von nur 2 nt war die RNA-Editingaktivität der Stellen IV und V nur wenig reduziert (Abb. 1.4, C). Die hier gefundene Relevanz der upstream von der Editingstelle gelegenen Sequenz wird durch Untersuchungen der *psbL*-RNA (Chaudhuri & Maliga, 1996) und *rpoB*-RNA (Reed *et al.*, 2001b) bestätigt. Welcher Bereich nun innerhalb dieser in ihrer Länge sehr stark variierenden Sequenz 5' von der Editingstelle tatsächlich der Interaktion mit einem *trans*-Faktor dient, bleibt ungeklärt.

Über *cis*-Elemente mitochondrialer Editingstellen ist bislang aufgrund eines fehlenden Transformationssystems für Pflanzenmitochondrien nur wenig bekannt. Anhand des *atp6*- (codiert eine Untereinheit der ATPase) und des *rps12*-Gens (codiert das ribosomale Protein 12 der kleinen Untereinheit) konnte gezeigt werden, daß wie für Chloroplasten auch für Mitochondrien ein upstream von der Editingstelle gelegener Bereich für das C-zu-U-Editing notwendig ist. Die zwei untersuchten Gene liegen in den Mitochondrien natürlicherweise in jeweils zwei verschiedenen Sequenzumgebungen vor. Die *atp6*-Sequenz liegt in Reismitochondrien einmal als ATP6-Protein codierendes Gen und einmal als chimäre Sequenz vor. Letztere enthält am 5'-Ende einen Teil der *atp6*-Gensequenz, am 3'-Ende eine unbekannte Sequenz. Direkt 5' von der unbekanntem Sequenz liegt eine Editingstelle (Abb. 1.5, A). Diese wird sowohl in der Gensequenz als auch in der chimären Sequenz editiert (Kubo & Kadowaki, 1997). Demzufolge trägt die upstream gelegene Region alle für das RNA-Editing notwendigen Informationen, während die Downstreamsequenz nur wenig Relevanz haben kann. Die Lokalisierung essentieller Bereiche in der Upstreamregion einer Editingstelle konnte anhand des *rps12*-Editings bestätigt werden (Williams *et al.*, 1998). Das mitochondriale Genom des Mais enthält neben der *rps12*-Gensequenz eine zweite Kopie dieses Gens (*rps12b*), die durch Rekombination eines internen Teils der *rps12*-Gensequenz in einen anderen Bereich erzeugt wurde und die ersten vier Editingstellen des ursprünglichen *rps12* trägt (Abb. 1.5, B). Bis auf ein einziges Nucleotid an Position -5 relativ zur Editingstelle I erreichen Gensequenz und duplizierte

Sequenz bis sieben Nucleotide upstream von der Editingstelle I und sechs Nucleotide downstream von der Editingstelle IV absolute Übereinstimmung. Die Analyse des Editingstatus beider Transkripte zeigt jedoch Unterschiede. Während Editing an den Stellen II, III und IV bei beiden Transkripten stattfindet, wurde die Editingstelle I nur in der ursprünglicher Gensequenz editiert. Durch das 5'-Rekombinationsereignis ist somit die Editingaktivität für die direkt downstream gelegene 1. Editingstelle zerstört worden, während alle anderen Editingstellen davon unbeeinträchtigt blieben. Naheliegend ist hier, daß wie beim *atp6*-Editing die Upstreamsequenz für das Editing essentiell ist.

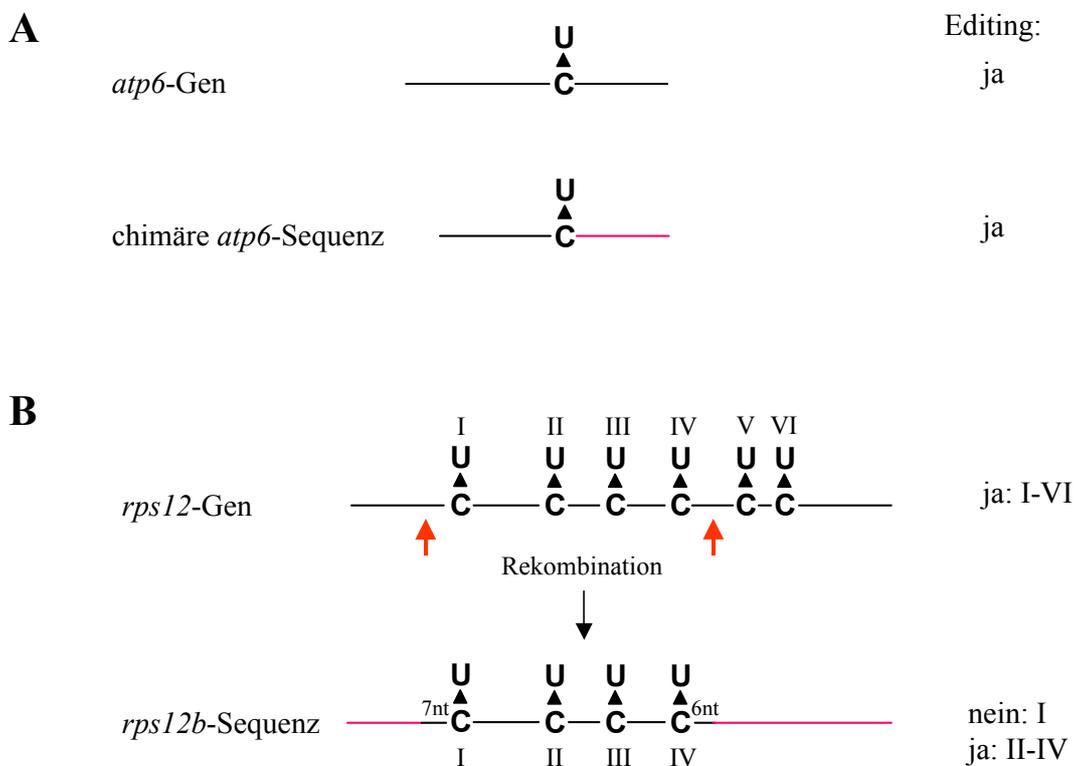


Abb. 1.5: Relevanz des Upstreambereiches für das Editing natürlicher mitochondrialer RNAs – Wird bei der *atp6*-Sequenz (A) der gesamte Downstreambereich der markierten Editingstelle verändert, hat dies keinen Einfluß auf die Editingaktivität. Bei der *rps12*-Sequenz (B) hingegen führt die durch Rekombination entstandenen Sequenzänderungen der *rps12b*-Sequenz im Vergleich zum *rps12*-Gen zum Ausfall des Editings an der Editingstelle I, während die Editingstellen II-IV weiterhin editiert werden. Schwarze Linien stellen die ursprüngliche Sequenz dar, rot hervorgehoben sind die veränderten Bereiche. Rote Pfeile kennzeichnen den Ort des Rekombinationsereignisses, das zur *rps12b*-Sequenz führt.

Die Etablierung einer Elektroporationsmethode für Weizenmitochondrien vor einem Jahr machte Untersuchungen essentieller Elemente der *cox2*-RNA (codiert die Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase) in intakten Mitochondrien möglich (Farré *et al.*, 2001). Plasmid-DNA, die die *cox2*-Sequenz enthielt, konnte durch diese Methode in die Mitochondrien eingebracht werden. Die *cox2*-RNA wurde stabil transkribiert und bezüglich ihres Editingstatus untersucht. Durch Deletionsmutagenese der eingeführten *cox2*-Sequenz wurde ein essentieller Bereich von 22 Nucleotiden (16 upstream und 5 downstream) um die Editingstelle identifiziert. Höhere Bedeutung für das RNA-Editing wurde hier jedoch im Gegensatz zu den beschriebenen plastidären und mitochondrialen Transkripten dem Downstreambereich zugeordnet (Farré *et al.*, 2001).

Ein weiteres Phänomen des pflanzlichen RNA-Editings wurde an der *ndhB*-RNA und an der *cox2*-RNA beobachtet. Es handelt sich dabei um das Verschieben des RNA-Editingereignisses auf ein außerhalb der bekannten Editingstelle gelegenes Cytidin, wenn Nucleotide nahe der Editingstelle künstlich eingefügt oder entfernt werden (Abb. 1.6). So führte bei der plastidären *ndhB*-RNA die Deletion von 2 nt upstream von der Editingstelle V zu einer Verschiebung des Editings auf ein 2 nt weiter 5' gelegenes Cytidin (Herrmann & Bock, 1999). Bei der *cox2*-RNA resultierte die Insertion eines einzelnen Cytidins direkt downstream von der Editingstelle in der Verschiebung des Editings auf dieses eingefügte heterologe Nucleotid (Farré *et al.*, 2001).

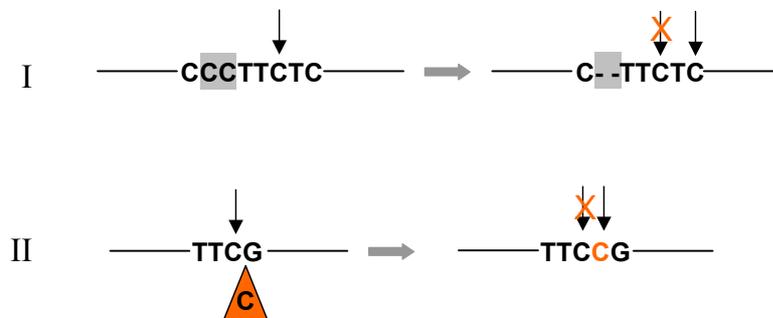


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des Effektes des „Spacing“ auf die Position des RNA-Editings (I) Die Deletion von zwei Nucleotiden (grau unterlegt) und (II) die Insertion eines Cytidins (rot unterlegt) führt zur Verschiebung des Editingereignisses (schwarzer Pfeil) auf ein heterologes Cytidin.

Es wird vermutet, daß bei beiden Beispielen, wie beim *apoB*-RNA-Editing bei den Säugetieren, das sogenannte „Spacing“ für die Verschiebung des RNA-Editingereignisses verantwortlich ist. Dort gibt die „Spacer“-Sequenz den Abstand eines essentiellen *cis*-Elementes zur Editingstelle („Spacing“) vor und legt das zu editierende Cytidin fest (Backus *et al.*, 1994).

1.6.5 Evolutionäre Aspekte des RNA-Editings

Bei all den Ähnlichkeiten und einigen Abweichungen zwischen dem RNA-Editing in Mitochondrien und Chloroplasten stellt sich die Frage, wie sich das RNA-Editing in Pflanzen entwickelt hat. Da inzwischen zahlreiche Editingstellen identifiziert oder aus Sequenzdaten abgeleitet wurden, ist mittlerweile ein guter Überblick über das Vorkommen des RNA-Editings im Pflanzenreich gegeben. RNA-Editing tritt demnach in höheren Pflanzen, Gymnospermen, Angiospermen, Farnen und Bryophyten auf (Freyer *et al.*, 1997). Eine einzige Ausnahme stellt hierbei das Lebermoos *Marchantia polymorpha* dar, bei dem weder in Mitochondrien noch in Chloroplasten RNA-Editing entdeckt wurde (zusammengefaßt in Bock, 2000), obwohl beide Genome bekannt sind. Auch bei Algen konnte noch kein Editing nachgewiesen werden und ebenso wenig in den Vorfahren der Mitochondrien und Chloroplasten, den α -Purpurbakterien und den Cyanobakterien. RNA-Editing scheint sich demnach erst spät in der Pflanzenevolution etabliert zu haben, möglicherweise während der Aufteilung der Bryophyten.

Die mangelnde Konserviertheit der Editingstellen eines Transkriptes zwischen den Arten, selbst bei nahe verwandten Arten, macht es wahrscheinlich, daß die RNA-Editingstellen mehrfach unabhängig entstanden sind (Malek *et al.*, 1996). In einem gemeinsamen Vorfahren könnten die Editingstellen vorhanden gewesen und dann in der Entwicklung unabhängig voneinander abhanden gekommen sein.

Wie die Editingaktivität selbst entstanden sein könnte, zeigt ein Modell von Covello und Gray (1993). Demnach hat sich im Laufe der Evolution ein Enzym entwickelt, z. B. eine Cytidin-Desaminase, die die Eigenschaft erworben hat, innerhalb einer RNA Cytidine in Uridine umzuwandeln. Genomisch entstandene T-zu-C-Mutationen könnten somit auf RNA-Ebene behoben werden. Diese einmal erworbene enzymatische Eigenschaft wäre dann nach einer gewissen Zeit unentbehrlich, um die korrekte Expression der mutierten Gensequenzen in funktionelle Proteine zu gewährleisten. Allerdings wird für dieses Modell die Existenz spezifischer *trans*-Faktoren vorausgesetzt, die schon vor dem Erwerb der Cytidin-Desaminase entstanden sein müßten. Ob dieses Modell tatsächlich zu halten ist, obwohl es Hinweise auf die Beteiligung vieler verschiedener *trans*-Faktoren am RNA-Editing in den Organellen gibt, bleibt noch zu prüfen.

1.7 Bisherige RNA-Editing-Detektionssysteme

Um die beteiligten Komponenten des RNA-Editings näher zu untersuchen, sind bereits *in vitro*-Systeme entwickelt worden. Da diese im allgemeinen nur geringe Editingaktivitäten aufweisen, bedarf die Detektion eines zuverlässigen und sensitiven Systems, welches die Änderung einzelner Basen exakt wiedergibt. Für den Nachweis des C-zu-U-Umsatzes im *in vitro*-System sind bislang folgende Methoden etabliert:

Bei der Primerextensionsmethode wird eine einzelne Editingstelle auf ihren Editingstatus untersucht. Diese Methode basiert auf der Verlängerung eines radioaktiv markierten Primers, der 3' von der untersuchten Editingstelle an die RNA paart (Abb. 1.7). Durch Einsatz des Nucleotids Guanosin in Form von Didesoxyguanosin (ddGTP) kann in dieser Reversen Transkriptionsreaktion zwischen editierter und uneditierter Sequenz diskriminiert werden (Driscoll & Casanova, 1990). Liegt die untersuchte Editingstelle uneditiert vor, wird bei der Primerverlängerung an dieser Stelle ein ddGTP in die entstehende cDNA eingebaut, was den Kettenabbruch zur Folge hat. Bei Vorliegen von Uridin kann die Reverse Transkription bis zum nächsten Cytidin in der RNA fortfahren. Die unterschiedlich langen cDNA-Produkte können über Gelelektrophorese aufgetrennt und über Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Probleme bei der Detektion eines geringen C-zu-U-Umsatzes macht jedoch die geringe Spezifität der Reversen Transkriptase. Das nicht korrekte „Durchlesen“ der Reaktion an einem nicht-editierten Cytidin zeigt fälschlicherweise ein RNA-Editingereignis durch das Entstehen des längeren Produktes an.

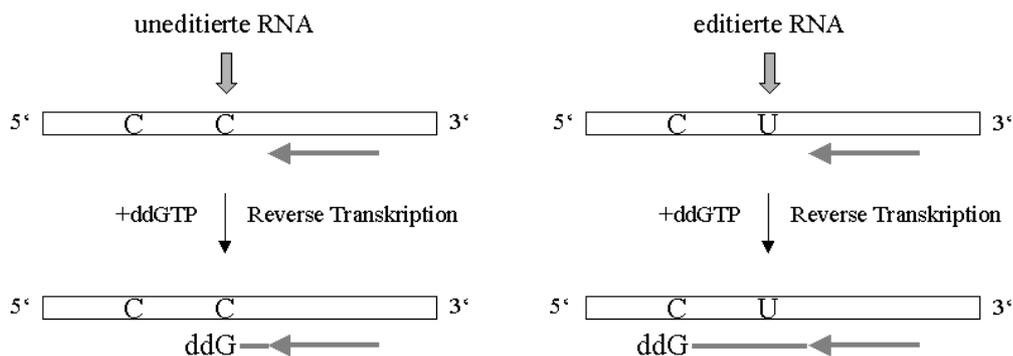


Abb. 1.7: Die Primerextensionsmethode zur Detektion der C-zu-U-Editingreaktion – Die RNA ist mit ihrer Editingstelle (C oder U) und dem in 5'-Richtung nächstgelegenen Cytidin dargestellt. Der graue Pfeil markiert die Lage des verwendeten Primers, der in der Reversen Transkription verlängert wird. Hat in der zu untersuchenden RNA eine C-zu-U-Umwandlung stattgefunden, entfällt an der Editingstelle der Einbau des Abbruchnucleotids ddGTP in die cDNA. Ein im Vergleich zur uneditierten Sequenz verlängertes Produkt ist die Folge.

Beim „Mobility-Shift-Assay“ (Yu *et al.*, 1998) werden alle C-zu-U-Umwandlungen in einem Transkript gemeinsam erfasst. Dieser Test nutzt die Dünnschichtchromatographie zur Auftrennung von Cytidinen und Uridinen, die bei der Hydrolyse der zu analysierenden RNA in Mononucleotide entstehen. Da die eingesetzte RNA durch *in vitro*-Transkription unter Zugabe von ^{32}P -CTP hergestellt wird, liegt jede Cytidinposition radioaktiv markiert vor (Abb. 1.8). So kann die RNA-Editingreaktion über die Entstehung radioaktiv markierter Uridine verfolgt werden. Eine Aussage über die C-zu-U-Umsetzung einzelner Editingstellen kann jedoch nicht getroffen werden. Problematisch bei diesem Testsystem ist die mit der Verwendung von ^{32}P -CTP häufig einhergehende Kontamination mit ^{32}P -UTP, die zur Markierung von Uridinpositionen in der RNA führt.

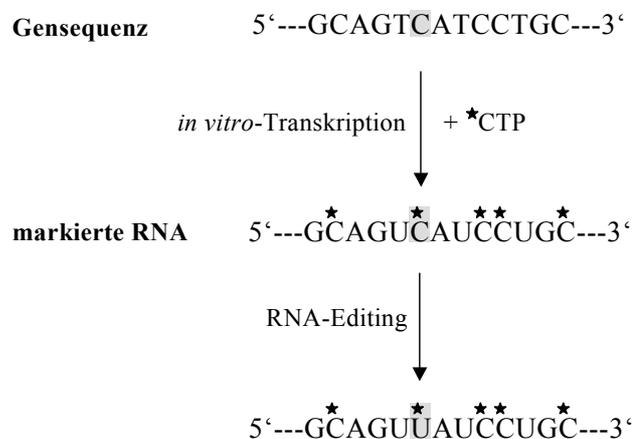


Abb. 1.8: Markierung der Template-RNA für den „Mobility-Shift-Assay“ – Gezeigt ist das aus der Gensequenz abgeleitete *in vitro*-Transkript, das für die Untersuchung des RNA-Editings eingesetzt wird. Die radioaktive ^{32}P -Markierung der Cytidine ist als Stern dargestellt. Bei der Editingreaktion wird das markierte Cytidin an der Editingstelle (grau unterlegt) zu einem Uridin umgesetzt. Da die Markierung an der Phosphatgruppe erhalten bleibt, kann nach Hydrolyse der RNA in Mononucleotide und anschließender Dünnschichtchromatographie die C-zu-U-Reaktion über die Entstehung markierter Uridine verfolgt werden.

Die Entwicklung des ersten plastidären *in vitro*-Systems in Tabak brachte auch ein neues RNA-Editing-Detektionssystem mit sich (Hirose & Sugiura, 2001). Es basiert wie der beschriebene „Mobility-Shift-Assay“ (Yu *et al.*, 1998) auf der dünnschichtchromatographischen Auftrennung von Mononucleotiden, benutzt im Gegensatz dazu jedoch ein RNA-Editingsubstrat, das nur an der zu untersuchenden Editingstelle markiert ist. Dies wird über die chemische Synthese der RNA in zwei Teilen, einem 5'- und einem 3'-Teil erreicht (Abb. 1.9). Der 5'-Teil ist upstream von der zu untersuchenden Editingstelle gelegen, der 3'-Teil beinhaltet sowohl die Editingstelle als auch ihren Downstreambereich. Mittels 5'-Endmarkierung des 3'-Teils wird spezifisch das Cytidin an der Editingstelle radioaktiv markiert. Durch Verwendung eines

überbrückenden Oligonucleotids werden beide Teile durch die T4-Ligase miteinander ligiert. Bevor diese künstliche RNA in das *in vitro*-System eingesetzt werden kann, muß sie von den unligierten Teilen abgetrennt werden. Problematisch bei diesem Testsystem sind vor allem die Schwierigkeiten, die mit der Aufreinigung von RNAs einhergehen.

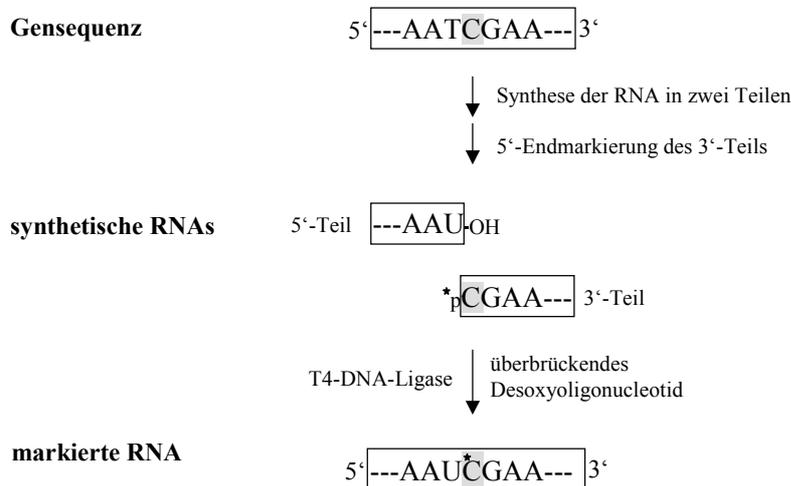


Abb. 1.9: Spezifische Markierung der Editingstelle nach Hirose und Sugiura (2001) – Das RNA-Editingsubstrat wird durch chemische Synthese von Ribooligonucleotiden in zwei Teilen (5'- und 3'-Teil) hergestellt. Der 3'-Teil trägt an seinem 5'-Ende das auf RNA-Editing zu untersuchende Cytidin, das durch 5'-Phosphorylierung spezifisch radioaktiv markiert (schwarzer Stern) wird. Durch Ligation des 5'-Teils mit dem 3'-Teil in Gegenwart eines überbrückenden Desoxyribonucleotids entsteht das RNA-Editingsubstrat mit einem markierten Cytidin an der Editingstelle. Die anschließende C-zu-U-Editingreaktion wird wie beim „Mobility-Shift-Assay“ über die Entstehung markierter Uridine verfolgt.

1.8 Ziel der Arbeit

Da zu Beginn der Arbeit Untersuchungen des Pflanzen-RNA-Editings für Chloroplasten nur in einer einzigen Pflanze, dem Tabak, und für Mitochondrien aufgrund fehlender Transformationssysteme nur anhand weniger existenter *in vitro*-Systeme durchgeführt werden konnten, sollten in dieser Arbeit sowohl für Mitochondrien als auch für Chloroplasten neue zuverlässige *in vitro*-Systeme etabliert werden. Zur Analyse dieser Systeme sollte wegen der Schwächen der bisherigen Nachweismethoden gleichzeitig ein neues RNA-Editing-Detektionssystem entwickelt werden.

Für das mitochondriale RNA-Editing sollten Erbsen- und Kartoffelsysteme entwickelt und hinsichtlich der Aktivitäten gegenüber der *atp9*-RNA (codiert die Untereinheit 9 der ATPase) miteinander verglichen werden. Die Etablierung zweier Systeme in unterschiedlichen Pflanzen sollte gleichzeitig Untersuchungen des heterologen RNA-Editings ermöglichen und über die Konserviertheit der RNA-Editingkomponenten Aufschluß geben.

Um darüberhinaus auch Untersuchungen über die Ähnlichkeit des RNA-Editingapparates von Mitochondrien und Chloroplasten in organellenheterologen Ansätzen durchführen zu können, sollte zusätzlich ein geeignetes plastidäres *in vitro*-System entwickelt werden.

Da immer noch äußerst wenig darüber bekannt ist, wie ein Cytidin für die C-zu-U-Editingreaktion spezifisch ausgewählt wird, sollte ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit auf die Frage gerichtet sein, worauf diese exakte Bestimmung des Editingereignisses in Pflanzenmitochondrien basiert. Geeignete Methoden sollten etabliert werden, um am Beispiel der *atp9*-RNA eine Identifizierung essentieller *cis*-Bereiche vornehmen und Aussagen über deren Interaktion mit *trans*-Faktoren treffen zu können.