

4 ERGEBNISSE

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

Für Untersuchungen eines *in vitro*-RNA-Editingsystems ist es essentiell, ein geeignetes Detektionssystem zur Verfügung zu haben, das zuverlässig die Änderung von Cytidinen zu Uridinen innerhalb der RNA nach Inkubation mit Lysaten wiedergibt. Aufgrund mangelnder Spezifität und Sensitivität bisheriger Detektionssysteme wurde in dieser Arbeit nach einem neuen System gesucht, welches diese Anforderungen erfüllt. Gewählt wurde die „Gap“-Ligation (s. unter 3.21) nach Stewart *et al.* (1998), die bislang zur Analyse von DNA-Polymorphismen eingesetzt wurde. Da die „Gap“-Ligation ausschließlich DNA als Template akzeptiert, wird im Gegensatz zur Analyse genomischer Sequenzen ein zusätzlicher Schritt bei der RNA-Analyse erforderlich. Die zu untersuchende RNA muß zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Zur Beurteilung der Editingreaktion wird somit der DNA-Gegenstrang herangezogen, der einen G-zu-A-Austausch zeigt.

Die Anforderungen an die „Gap“-Ligation als Detektionssystem für die Editinganalyse sind hoch. Bei Erwartungen einer Editingrate von nur wenigen Prozent in pflanzlichen *in vitro*-RNA-Editingsystemen (Araya *et al.*, 1992, Yu *et al.*, 1998) ist es notwendig, daß das verwendete Detektionssystem nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ arbeitet. Diese Bedingung ist erfüllt, wenn in der „Gap“-Ligation bei Darbietung der editierten Sequenz nur der Zusatz des komplementären „Gap“-füllenden Nucleotids, in diesem Fall dTTP, ein Ligationsprodukt ergibt. Umgekehrt darf bei einer nicht-editierten Sequenz als Template ausschließlich der Zusatz des Nucleotids dCTP zur Ligationsreaktion ein Ligationsprodukt erzeugen.

Um diese erforderliche Spezifität der „Gap“-Ligation zu überprüfen, wurden einerseits nicht-editierte und andererseits editierte Templates hergestellt. Dabei handelte es sich um genomische bzw. cDNA-Sequenzen des mitochondrial codierten *atp9*-Gens aus Kartoffel, die über PCR aus isolierter Mitochondrien-DNA (s. unter 3.17.1) bzw. über RT-PCR aus Mitochondrien-RNA (s. unter 3.17.2) gewonnen und anschließend hinter den T7-Promotor in den pCR2.1-Vektor kloniert wurden (Abb. 4.1).

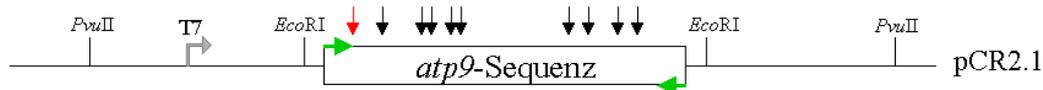


Abb. 4.1: Vektorkarte der in den pCR2.1-Vektor klonierten *atp9*-Sequenz aus Kartoffel – Gezeigt ist ein Ausschnitt des pCR2.1-Vektors (schwarze Linie) mit den Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *PvuII* und dem T7-Promotor. Die Klonierung der *atp9*-Sequenzen (genomisch und cDNA) wurde über die TA-Überhang-Methode vollzogen. Die grünen Pfeile markieren die zur Klonierung verwendeten Primer (Pot-*atp9*-5' und Pot-*atp9*-3'). Schwarze Pfeile zeigen die Editingstellen des *atp9*-Gens, die untersuchte Editingstelle 1 ist hervorgehoben (roter Pfeil).

Zur Evaluierung der „Gap“-Ligation wurde die Editingstelle 1 der *atp9*-Sequenz herangezogen. Als Template wurde die aus den beschriebenen genomischen und cDNA-*atp9*-Klonen isolierte Plasmid-DNA eingesetzt. Als Upstreamprimer diente der 5'-phosphorylierte Primer Pos1B, als Downstreamprimer der Primer Pos1A, der an seinem 5'-Ende radioaktiv markiert wurde (s. unter 3.14). Nach Vollendung der Reaktion wurden die Ligationsansätze über 8 %ige PAA-Harnstoffgele aufgetrennt und mittels Autoradiographie dargestellt. Ein schematischer Ablauf der „Gap“-Ligation und deren Auswertung ist am Beispiel eines editierten Templates in Abb. 4.2 gezeigt.

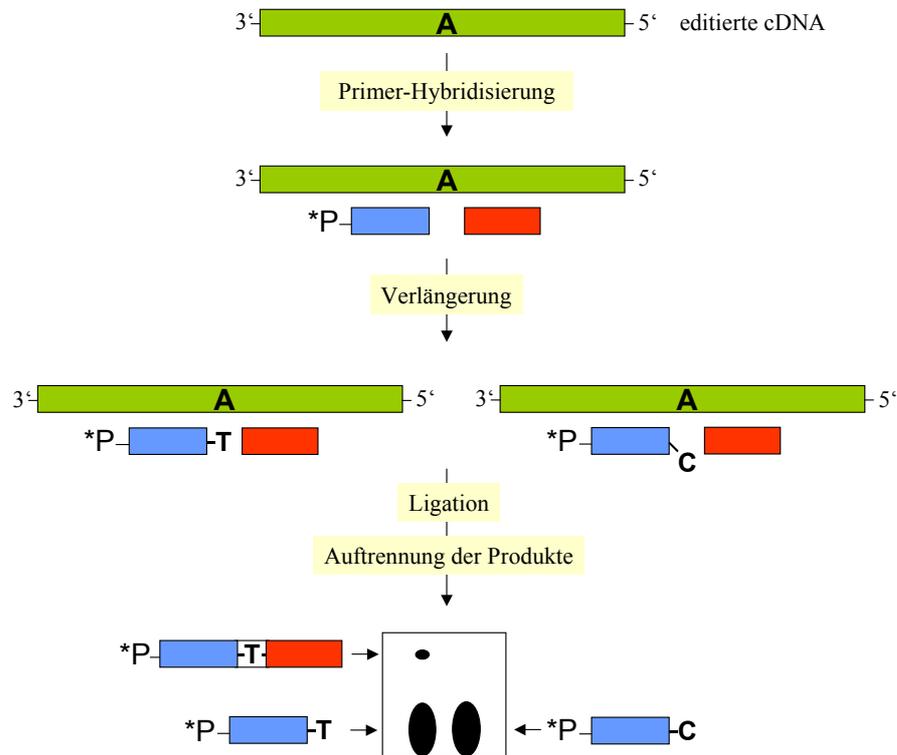


Abb. 4.2: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes der „Gap“-Ligation und deren Auswertung anhand eines editierten Templates – An das editierte Template (cDNA-Sequenz, grün dargestellt mit einem Adenosin („A“) an der Editingstelle) hybridisieren zunächst ein 5'-radiaktiv markierter Downstreamprimer (blauer Balken mit *P) und ein 5'-phosphorylierter Upstreamprimer (roter Balken). Durch Zugabe von dTTP bzw. dCTP in zwei getrennten Ansätzen kommt es durch die DNA-Polymerase zur Verlängerung des Downstreamprimers. Ist das angebotene Nucleotid komplementär zur Editingstelle (links) werden Upstream- und Downstreamprimer ligiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Ligrationsreaktionen und anschließender Autoradiographie wird die editierte Sequenz über das entstandene Ligrationsprodukt nachgewiesen. Auf der rechten Seite hingegen kann wegen der Basenfehlpaarung an der Editingstelle (Adenosin des Templates und Cytidin des verlängerten Upstreamprimers) kein Ligrationsprodukt entstehen. Die Zugabe von dCTP würde hier nur bei Anwesenheit der nicht-editierten Sequenz zu einem Ligrationsprodukt führen.

Zur Evaluierung der „Gap“-Ligation wurden für das editierte und nicht-editierte Template jeweils drei Ansätze vorgenommen. In einem Ansatz wurde das jeweils zur Editingstelle komplementäre Nucleotid als „Gap“-füllendes Nucleotid angeboten, in einem anderen Ansatz das nicht passende. Der jeweils dritte Ansatz war eine Kontrolle, er enthielt keine *Taq*-DNA-Ligase. Die vorgenommenen Ansätze und Ergebnisse sind in Abb. 4.3 dargestellt.

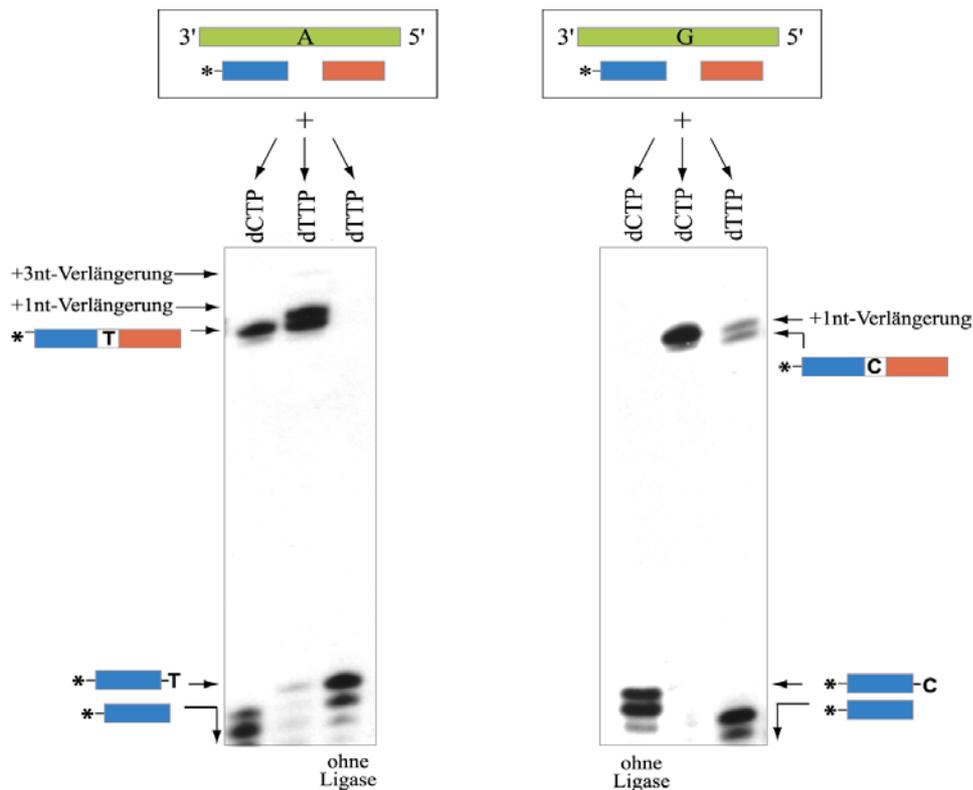


Abb. 4.3: Evaluierung der „Gap“-Ligation für die editierte und nicht-editierte *atp9*-Sequenz aus Kartoffel – Gezeigt ist die Autoradiographie der „Gap“-Ligationsreaktionen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Die Ligationsbedingungen betragen: 2 min 94 °C und 25 Cyclen bei 94 °C für 30 sec und bei 60 °C für 2 min. Im oberen Teil der Graphik sind die verwendeten editierten (hervorgehobenes „A“) und nicht-editierten (hervorgehobenes „G“) Templates (grün) dargestellt.

Bei Einsatz der editierten Sequenz (Abb. 4.3, links) traten nicht nur in Anwesenheit des komplementären Nucleotids dTTP, sondern auch bei Zusatz von dCTP Ligationen auf, während der Kontrollansatz (ohne Ligase) keine Ligationen zeigte. In den Ansätzen mit dTTP erschienen dabei mehrere Ligationen, die in ihrer Länge im Vergleich zum erwarteten Produkt um bis zu drei Nucleotide verlängert waren. Auch in Gegenwart der nicht-editierten Sequenz (Abb. 4.3, rechts) zeigte die Ligationenreaktion keine absolute Spezifität. Sowohl der Zusatz von dCTP, als auch von nicht zur Editingstelle komplementärem dTTP erzeugte Ligationen. Auch hier erschien das in Gegenwart von dTTP gebildete Ligationenprodukt als Doppelbande. Das Auftreten von Verlängerungsprodukten ist hierbei auf die Verwendung der DNA-Polymerase zurückzuführen, wie aus der Verwendung einzelsträngiger cDNAs als Template-DNA klar hervorgeht. Der Einsatz von cDNA erzeugte bei der „Gap“-Ligation zahlreiche Produkte, die in Form von Verlängerungen des Downstreamprimers und dessen Ligationenprodukten in Erscheinung traten (Ergebnisse nicht dargestellt). Dieser drastisch verstärkte Effekt läßt

sich möglicherweise auf Kontaminationen der eingesetzten DNA mit Restnucleotiden zurückführen, die es der DNA-Polymerase erlauben, die Elongationsreaktion an allen mit der DNA hybridisierten Oligonucleotiden zu vollziehen. Trotz Verwendung unterschiedlicher DNA-Polymerasen (*Taq* Pol: Q-BIOgene und Roche, BiothermTM: GeneCraft, *Tth*: Roche Diagnostics) und verschiedener Methoden zur Abtrennung von Mononucleotiden von den eingesetzten cDNA-Templates wie die Präzipitation, Säulenreinigung oder das Waschen des an magnetische Partikel gebundenen Templates, gelang es nicht, die ungewünschten Elongationsreaktionen der DNA-Polymerase zu unterdrücken.

4.1.1 Die Entwicklung der Primer-Ligation

Um die Probleme mit der DNA-Polymerase bei der „Gap“-Ligation zu umgehen, wurde durch Weglassen des von der DNA-Polymerase katalysierten Verlängerungsschrittes die Primer-Ligation (s. 3.22) entwickelt. Hierzu wurden als Primer über die Editingstelle verlängerte Desoxyoligonucleotide eingesetzt (s. Abb. 4.4). Dabei wurde einmal eine Variante gewählt, bei der der markierte Downstreamprimer an seinem 3'-Ende um ein Nucleotid verlängert ist (Abb. 4.4, II). Alternativ dazu wurde in einem anderen Ansatz getestet, einen am 5'-Ende verlängerten Upstreamprimer (Abb. 4.4, III) zur Detektion des RNA-Editings einzusetzen.

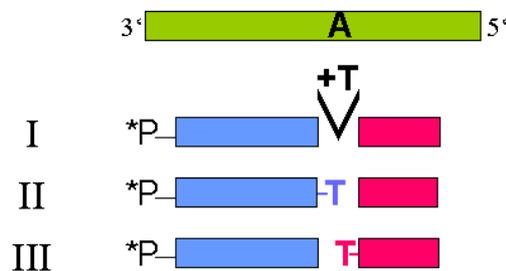


Abb. 4.4: Vergleich des Primerdesigns zwischen „Gap“-Ligation (I) und Primer-Ligation (II,III) In Blau ist der Downstreamprimer dargestellt. Er ist in allen Ansätzen an seinem 5'-Ende mit ³²P radioaktiv markiert. Die verwendeten Upstreamprimer sind in Rot gezeigt.

Wie groß die Spezifität der beiden möglichen Ansätze der Primer-Ligation ist, mußte zunächst geprüft werden. Dazu wurden für beide Varianten drei unterschiedliche Ansätze vorgenommen. Ein Ansatz enthielt jeweils die nicht-editierte, ein anderer die editierte Sequenz. Der jeweils dritte Ansatz war eine Kontrolle ohne Template-DNA. Bei den eingesetzten Templates handelte es sich um Plasmid-DNA derselben *atp9*-(cDNA)-Klone aus Kartoffel, die für die „Gap“-Ligation hergestellt wurden (vgl. Abb. 4.1, S. 46). Die verwendeten Primerkombinationen und Ligationsbedingungen können der Abb. 4.5 entnommen werden.

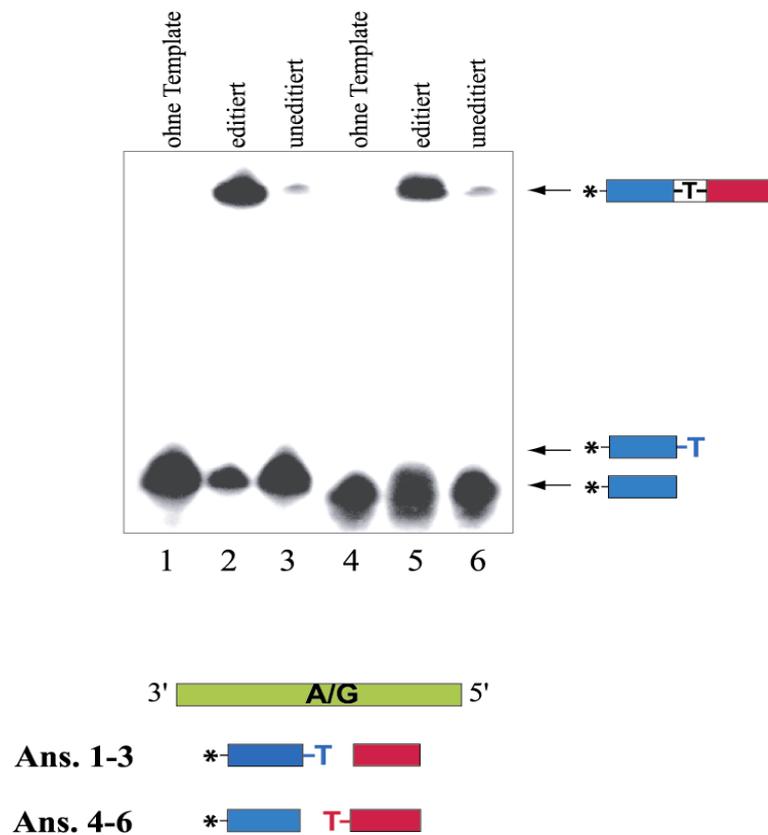


Abb. 4.5: Spezifitätsuntersuchung der möglichen Primerkombinationen für die Primer-Ligation –
 Im oberen Teil der Abbildung ist die Autoradiographie der Auftrennung der Primer-Ligationsreaktionen gezeigt. Die Ligationsbedingungen betragen: 2 min 94 °C und 25 Cyclen bei 94 °C für 25 sec und bei 60 °C für 2 min. Im unteren Teil sind die Versuchsansätze mit den verwendeten Primerkombinationen dargestellt. Die Ansätze 1-3 enthalten die Primer Pos1A-T26 und Pos1B, Ansätze 4-6 die Primer Pos1A und Pos1B-T26. Die Ansätze 1 und 4 waren Kontrollansätze ohne Template-DNA, die Ansätze 2 und 4 enthielten das editierte Template bzw. die Ansätze 3 und 5 das nicht-editierte Template.

Wie in Abb. 4.5 dargestellt, zeigte sich, daß beide möglichen Primerkombinationen gleichermaßen geeignet sind für die Detektion einer einzelnen G-zu-A-Änderung in der DNA. Das Verhältnis von unspezifischem Ligationsprodukt in den Ansätzen 3 bzw. 6 zu den Ansätzen 2 bzw. 5 ist vergleichbar. Die Kontrollansätze ohne Template (Ansätze 1 und 4) zeigen beide kein Ligationsprodukt. Ein Vergleich zur „Gap“-Ligation (Abb. 4.3) macht deutlich, daß die Primer-Ligation eindeutig zu bevorzugen ist, da nicht nur genau definierte Ligationsprodukte ohne Verlängerungen entstehen, sondern auch die Spezifität der Reaktion höher liegt.

4.1.2 Optimierung der Primer-Ligation für die *atp9*-Sequenz

Für den weiteren Verlauf der Arbeit wurde für die Primer-Ligation die Variation gewählt, bei der der nicht markierte Upstreamprimer an seinem 5'-Ende über die Editingstelle hinaus verlängert ist (Abb. 4.4, III). Dieser wird im folgenden nach seiner letzten 5'-Base Thymin als T-Detektionsprimer bezeichnet. Da im Verlauf der Arbeit nicht nur die editierte Sequenz, sondern auch die nicht-editierte Sequenz nachgewiesen und quantifiziert werden soll, bedarf es für jede Sequenz eines eigenen Detektionsprimers. Sind diese an ihrem 5'-Ende entsprechend der Editingstelle verlängert, kann der markierte Primer für die Detektion beider Sequenzen unverändert bleiben. Folglich ist in allen parallel durchgeführten Ligationsreaktionen der Einsatz von exakt gleichen Mengen an Primer und Radioaktivität gewährleistet.

Um die Spezifität der Ligationsreaktion weiter zu optimieren, wurden zwei Parameter verändert. Dies waren einerseits die Hybridisierungstemperatur und andererseits die Länge des T-Detektionsprimers. Beide beeinflussen die Stabilität der Duplex-DNA-Struktur, die durch die Hybridisierung der Primer an das DNA-Template vollzogen wird. Wird die Stabilität herabgesetzt, kann die DNA-Ligase besser zwischen gepaartem und ungepaartem Nucleotid an der Verknüpfungsstelle diskriminieren.

4.1.2.1 Optimierung der Primer-Ligation für die *atp9*-Sequenz aus Kartoffel

Zur Optimierung der Primer-Ligation wurden PCR-Produkte eingesetzt, die der genomischen bzw. cDNA-Sequenz des *atp9*-Gens entsprachen. Von diesen Amplifikaten wurde zur Ligation für alle zu testenden Hybridisierungstemperaturen und Primerlängen ein Gemisch aus 95 % nicht-editierter und 5 % editierter Sequenz eingesetzt und im Vergleich dazu eine 100 % nicht-editierte Sequenz.

Für das *atp9*-Template aus Kartoffel wurden drei verschiedene T-Detektionsprimer verwendet. Ihre Länge variierte zwischen 16 und 26 Nucleotiden (Abb. 4.6). Der Downstreamprimer blieb unverändert.

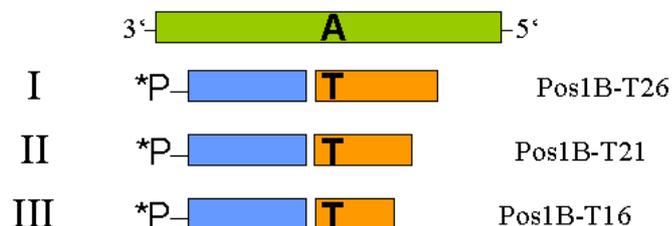


Abb. 4.6: Übersicht der verwendeten T-Detektionsprimer – Dargestellt sind die drei zur Optimierung der Primer-Ligation verwendeten Primerkombinationen zum Nachweis der editierten Sequenz (cDNA-Sequenz, grüner Balken mit Adenosin an der Editingstelle). Sie unterscheiden sich in der Länge des T-Detektionsprimers (Upstreamprimer, orange), die zwischen 16 nt (Primer Pos1B-T16), 21 nt (Pos1B-T21) und 26 nt (Pos1B-T26) variiert. Als Downstreamprimer wurde in allen Optimierungsansätzen der ³²P-markierte Primer Pos1A (25 nt, blauer Balken mit *P) verwendet.

Die experimentelle Untersuchung der T-Detektionsprimer zeigte in allen Ansätzen der Primer-Ligation bei Einsatz einer zu 5 % editierten Sequenz als Template deutliche Ligationsprodukte (Abb. 4.7). Diese nahmen mit Erhöhung der Hybridisierungstemperatur ab. Bei den Ansätzen mit 0 % editiertem Template traten ebenfalls Ligationsprodukte auf. Diese unspezifischen Ligationsprodukte konnten bei Verwendung des 26 nt und 21 nt langen Primers (Pos1B-T26 bzw. Pos1B-T21) auch durch Erhöhung der Temperatur auf 67 °C nicht unterdrückt werden. Der starke Einfluß der Primerlänge auf die Spezifität zeigte sich erst bei Einsatz des 16 nt langen Primers Pos1B-T16. Bei hohen Temperaturen war hier kein unspezifisches Ligationsprodukt mehr zu detektieren. Demzufolge wurde für alle weiteren Ansätze der Primer-Ligation zur Analyse der *atp9*-Sequenz aus Kartoffel der T-Detektionsprimer Pos1B-T16 und eine Hybridisierungstemperatur von 67 °C gewählt.

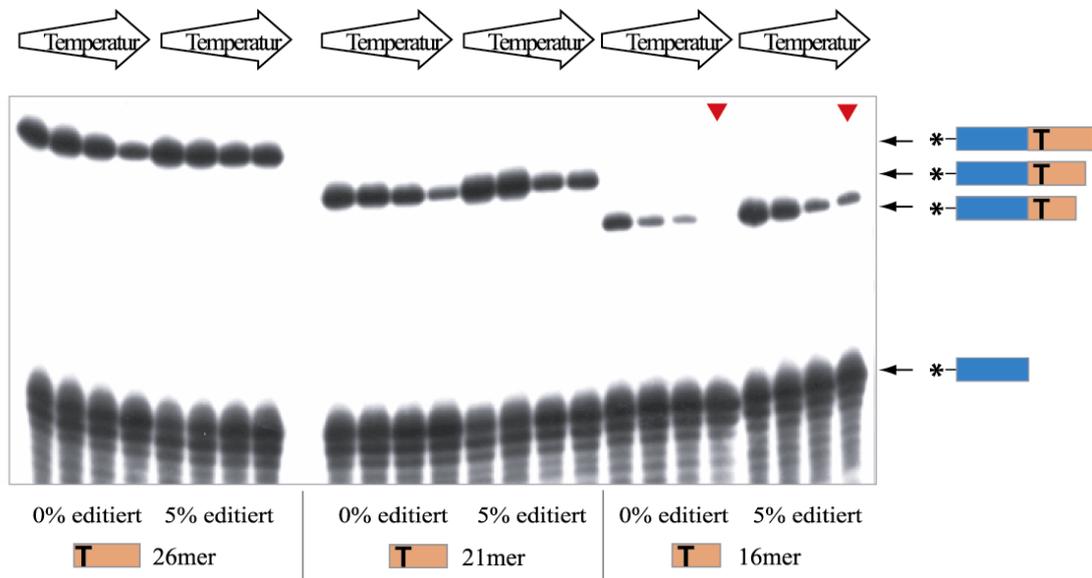


Abb. 4.7: Optimierung der Primer-Ligation für das *atp9*-Template aus Kartoffel – Auftrennung der Primer-Ligationsreaktionen über Gelelektrophorese (Autoradiographie). Als Template dienten PCR-Produkte, die aus den genomischen bzw. cDNA-Klonen mit dem *atp9*-spezifischen Primer Pot-*atp9*-5' und dem vektorspezifischen Primer Oligo2.1 hergestellt wurden. Das Template wurde in den Verhältnissen 0 % und 5 % editierte Sequenz eingesetzt. Als T-Detektionsprimer (orange) wurden Primer unterschiedlicher Länge verwendet: Pos1B-T26 (26mer), Pos1B-T21 (21mer), Pos1B-T16 (16mer). Der Downstreamprimer (blau) war in allen Ansätzen der radioaktiv markierte Primer Pos1A (25mer, orange). Die Hybridisierungstemperatur wurde für jede Kombination aus Template und Primer auf gleiche Weise variiert: von links nach rechts: 64 °C, 65 °C, 66 °C, 67 °C. Rote Pfeilspitzen kennzeichnen die optimale Diskriminierung zwischen editierten und nicht-editierten Sequenzen.

4.1.2.2 Optimierung der Primer-Ligation für die *atp9*-Sequenz aus Erbse

Um im Verlauf der Arbeit auch das *atp9*-RNA-Editing in Erbse untersuchen zu können, mußte für dieses Template die Primer-Ligation ebenfalls optimiert werden. Dazu wurden genomische und cDNA-Sequenzen des *atp9*-Gens aus Erbse eingesetzt, die sich nur an den beiden Editingstellen unterscheiden. Die Sequenzen wurden analog zu denen aus Kartoffel (vgl. Abb. 4.1) hinter den T7-Promotor in den pCR2.1-Vektor kloniert, wie in Abb. 4.8 dargestellt ist.

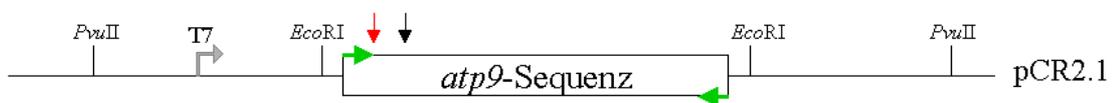


Abb. 4.8: Vektorkarte der in den pCR2.1-Vektor klonierten *atp9*-Sequenz aus Erbse – Gezeigt ist ein Ausschnitt des pCR2.1-Vektors (schwarze Linie) mit den Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *PvuII* und dem T7-Promotor. Die Klonierung der *atp9*-Sequenzen (genomisch und cDNA) wurde über die TA-Überhang-Methode vollzogen. Die grünen Pfeile markieren die zur Klonierung verwendeten Primer (Pea-*atp9*-A und Pea-*atp9*-B). Schwarze Pfeile zeigen die Editingstellen des *atp9*-Gens, die untersuchte Editingstelle 1 ist durch einen roten Pfeil hervorgehoben.

Die aus der Optimierung der Primer-Ligation für die Kartoffel-*atp9*-Sequenz gewonnenen Daten wurden auf das Erbsensystem übertragen. Da für die Analyse der zwischen Erbse und Kartoffel konservierten Editingstelle 1 der verwendete T-Detektionsprimer Pos1B-T16 aus der Kartoffelsequenz abgeleitet wurde, weist er bei der Hybridisierung an der Erbsen-*atp9*-Sequenz zwei Fehlpaarungen (Position 5 und 11) auf. Daher mußte für die Analyse dieses Templates die Temperatur erneut optimiert werden. Es zeigte sich, daß die optimale Hybridisierungstemperatur deutlich unter der für die Kartoffelsequenz lag. Die in Abb. 4.9 dargestellte Optimierung für die Erbsensequenz verwendet einen Temperaturbereich von 55,5 °C bis 60 °C. Bei Anwesenheit von 100 % nicht-editierter Sequenz nahm das Signal des unspezifischen Ligationsproduktes mit steigender Temperatur stark ab. Optimale Spezifität der Ligationsreaktion wurde bei 59 °C und 60 °C beobachtet. Da bei den Ansätzen mit 5 % editierter Sequenz als Template bei diesen Temperaturen die Menge an spezifischem Ligationsprodukt bei 60 °C niedriger war, wurde zur Analyse der *atp9*-Erbsensequenz für alle weiteren Versuche die Hybridisierungstemperatur von 59 °C gewählt.

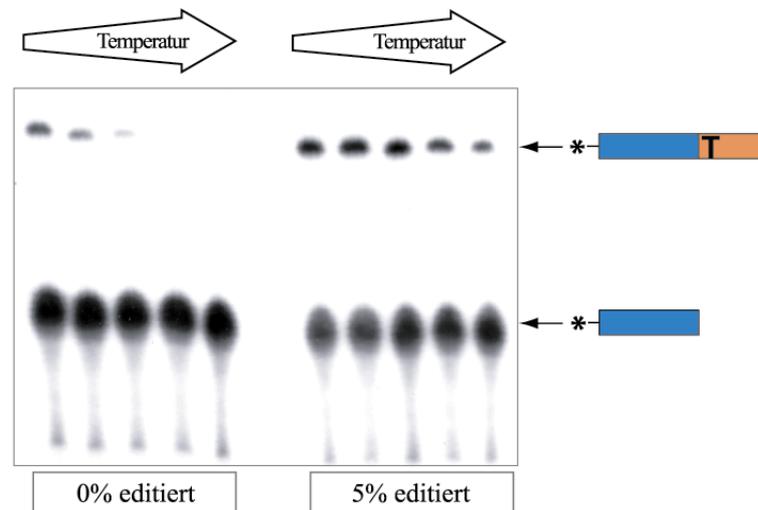


Abb. 4.9: Optimierung der Hybridisierungstemperatur bei Verwendung der *atp9*-Seqenz aus Erbse – Autoradiographie der Primer-Ligationsreaktionen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Als Template dienten PCR-Produkte, die aus den genomischen bzw. cDNA-Klonen mit dem *atp9*-spezifischen Primer Pea-*atp9*-A und dem vektorspezifischen Primer Oligo2.1 hergestellt wurden. Das Template wurde einerseits als nicht-editierte Sequenz (0 % editiert), andererseits als ein Gemisch aus 5 % editierter und 95 % nicht-editierter *atp9*-Seqenz eingesetzt. Der Temperaturgradient hatte fünf Stufen (von links nach rechts): 55,5 °C, 56,5 °C, 58 °C, 59 °C und 60 °C.

4.1.3 Sensitivität der Primer-Ligation

Zur Untersuchung des RNA-Editings ist es wichtig zu wissen, welcher Umsatz des C-zu-U-RNA-Editings durch das verwendete Detektionssystem noch zu messen ist. Zur Bestimmung dieser Detektionsgrenze wurden unter optimalen Reaktionsbedingungen (s. unter 4.1.2.1 und 4.1.2.2) unterschiedliche Verhältnisse von editierter zu uneditierter Sequenz bei gleichbleibender Gesamt-Template-Menge für die Primer-Ligation eingesetzt. In der Primer-Ligation zeigte sich (Abb. 4.10), daß bei der *atp9*-Seqenz aus Kartoffel weniger als 2 % C-zu-U-Umsatz nachweisbar sind. Für die *atp9*-Seqenz aus Erbse wurde eine Detektionsgrenze von unter 1 % ermittelt.

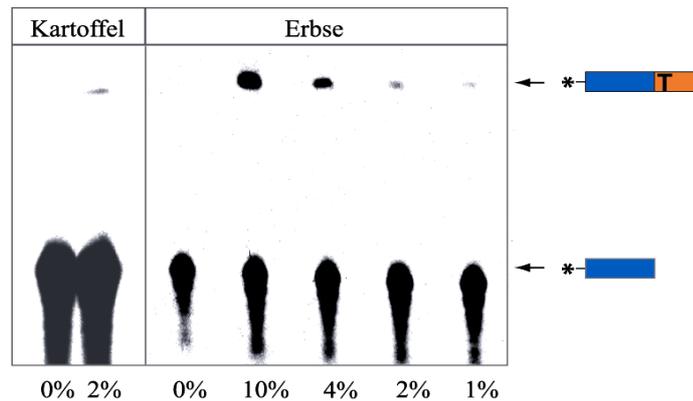


Abb. 4.10: Detektionsgrenze der Primer-Ligation für die *atp9*-Sequenz aus Kartoffel und Erbse – Die Autoradiographie zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Primer-Ligationsreaktionen. Die Prozentzahlen geben den Anteil der editierten Sequenz auf die Gesamt-Template-Menge an.

4.2 Das *in vitro*-RNA-Editingssystem

Während für Chloroplasten wenigstens in Tabak Untersuchungen des RNA-Editings in einem *in vivo*-System (Svab & Maliga, 1993) möglich sind, besteht diese Möglichkeit für Mitochondrien aufgrund des Fehlens eines Transformationsystems bisher nicht. Folglich muß zur Untersuchung des RNA-Editings in Mitochondrien auf ein *in vitro*-System zurückgegriffen werden. Aus diesem Grunde sollten geeignete *in vitro*-Systeme für das RNA-Editing in Kartoffel- und Erbsenmitochondrien etabliert und beide auf ihre RNA-Editingaktivität bezüglich der *atp9*-RNA untersucht und verglichen werden. Die Etablierung der beiden Systeme ermöglicht gleichzeitig Untersuchungen des heterologen RNA-Editings, was über Ähnlichkeiten der Editingapparate beider Pflanzen Auskunft geben kann.

Um für das *in vitro*-System ein geeignetes Editingtemplate zur Verfügung zu haben, wurde die zu untersuchende nicht-editierte *atp9*-Sequenz hinter den T7-Promotor in den pCR2.1-Vektor kloniert (Abb. 4.11). Durch Restriktionsverdau mit dem Enzym *PvuII* konnte auf diese Weise ein definiertes *in vitro*-Transkript generiert werden, welches in das *in vitro*-System als Editingsubstrat eingesetzt wurde. Nach Inkubation mit Mitochondrienlysaten (s. unter 3.19.3) wurde die RNA, die nun (teilweise) editiert vorlag, reisoliert. Da für die nachfolgende Detektion des RNA-Editings in der Primer-Ligation ausschließlich DNA als Template akzeptiert wird, wurde die rückgewonnene RNA zunächst in cDNA umgeschrieben und abschließend mittels PCR amplifiziert. Sowohl für die Reverse Transkription als auch für die PCR kam dabei ein vektorspezifischer Primer zum Einsatz, der ausschließlich die spezifische Amplifikation der zur Inkubation eingesetzten *in vitro*-Transkripte gewährleistet.

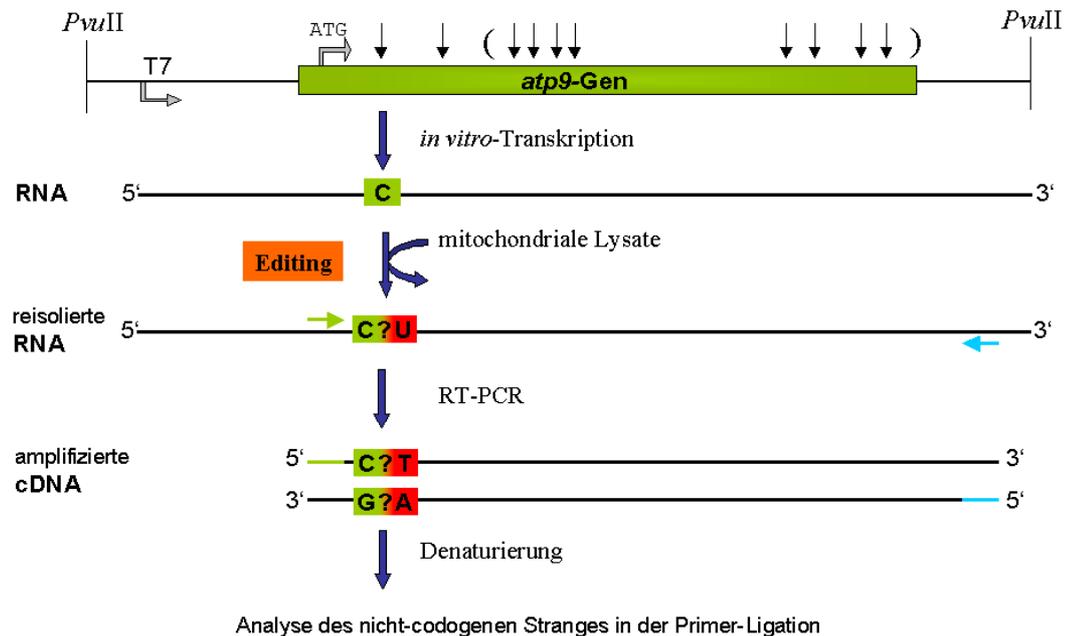


Abb. 4.11: Schematische Übersicht der Arbeitsschritte für die Editinganalyse – Das in den pCR2.1-Vektor klonierte *atp9*-Gen ist als grüner Balken dargestellt. Die schwarzen Pfeile zeigen die Editingstellen bei Erbse, die Pfeile in Klammern stellen die zusätzlichen RNA-Editingstellen bei der Kartoffel dar. Grün hervorgehoben ist das nicht-editierte Nucleotid Cytidin, rot hervorgehoben das editierte Uridin bzw. auf DNA-Ebene Thymidin. Nach PCR-Amplifikation resultieren daraus die Nucleotide Guanosin (nicht-editiert) und Adenosin (editiert) im nicht-codogenen Strang. Graue Pfeile markieren den T7-Promotor in der Vektorsequenz bzw. den Translationsstart im *atp9*-Gen. Der grüne Pfeil zeigt die Lage des *atp9*-sequenzspezifischen 5'-Primers der PCR (Pot-*atp9*-5' für die Kartoffel- bzw. Pea-*atp9*-A für die Erbsen-Sequenz), der blaue Pfeil die des vektorspezifischen Primers (Oligo2.1) für cDNA-Synthese und PCR.

Zur Quantifizierung des C-zu-U-Editingumsatzes sollte neben der editierten auch die nicht-editierte Sequenz in der Primer-Ligation nachgewiesen werden. Um dies zu ermöglichen, mußten zwei verschiedene Detektionsprimer eingesetzt werden. Dabei handelte es sich um den bereits beschriebenen T-Detektionsprimer Pos1B-T16, der komplementär zu der editierten Sequenz ist. Er unterscheidet sich von dem Primer zum Nachweis der nicht-editierten Sequenz in der Base, mit der die Editingstelle bei der Hybridisierung überspannt wird. Letzterer wird wegen seiner ersten 5'-Base Cytosin C-Detektionsprimer genannt. Zur Quantifizierung des C-zu-U-Umsatzes wurde nun die Primer-Ligation, wie in Abb. 4.12 schematisch dargestellt, in zwei verschiedenen Ansätzen durchgeführt. So enthielt ein Ansatz neben dem markiertem Downstreamprimer den T-Detektionsprimer, der andere den C-Detektionsprimer. Die entstehenden Ligationsprodukte weisen als Folge der Optimierung der Detektionsprimer unterschiedliche Größen auf. Der T-Detektionsprimer Pos1B-T16 ist dabei im Vergleich zum verwendeten C-Detektionsprimer Pos1B-C18 an seinem 3'-Ende um zwei Nucleotide kürzer.

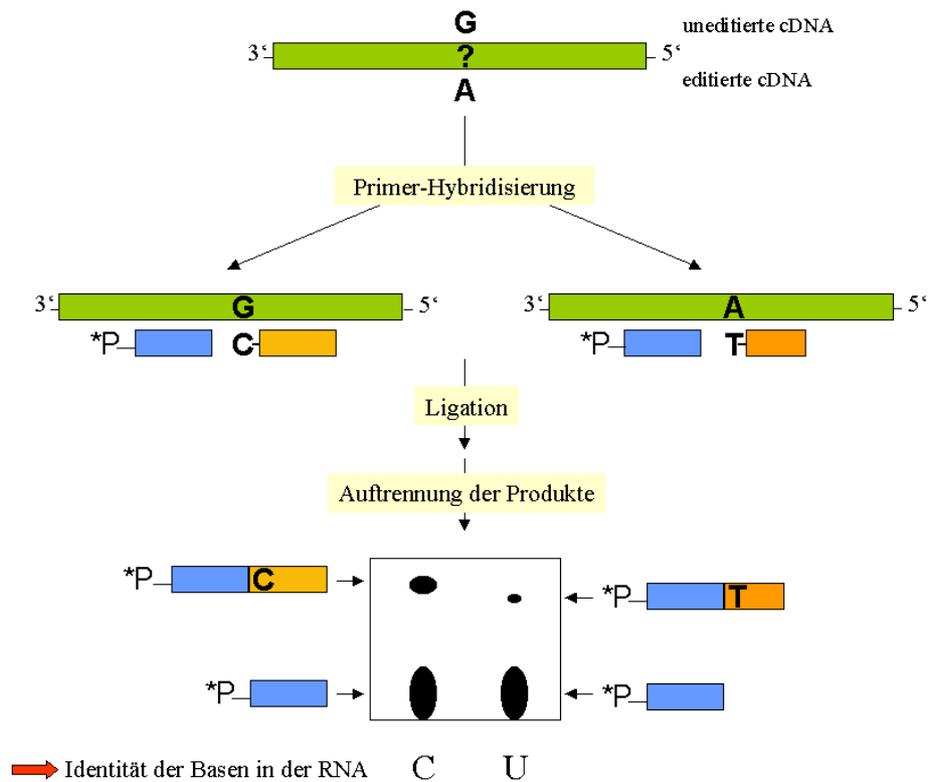


Abb. 4.12: Übersicht des Primer-Ligationstests zur Detektion von editierten und nicht-editierten Sequenzen – In zwei getrennten Ansätzen wurden die editierte und uneditierte Sequenz (cDNA-Sequenz, grün dargestellt mit einem Adenosin bzw. Guanosin an der Editingstelle) nachgewiesen. Dazu werden zwei unterschiedliche Upstreamprimere verwendet. Während der eine aufgrund der Komplementarität zur uneditierten Sequenz für diese spezifisch ist (C-Detektionsprimer, gelb), weist der andere ausschließlich die editierte Sequenz nach (T-Detektionsprimer, orange). Als Downstreamprimer wird in beiden Ansätzen der identische, ^{32}P -markierte Primer Pos1A (blau, *P) verwendet. Nach Hybridisierung der Primer an das zu untersuchende Template kommt es bei einer nicht-editierten Sequenz (links) zur Bildung des Ligationsergebnisses ausschließlich aus C-Detektionsprimer und Downstreamprimer. Bei einer editierten Sequenz hingegen führt die Anwesenheit des T-Detektionsprimers zur Entstehung eines Ligationsergebnisses. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Ligationsergebnisse und anschließender Autoradiographie kann über das Verhältnis der Ligationsergebnisse in den beiden Ansätzen der C-zu-U-Umsatz der untersuchten RNA-Editingstelle ermittelt werden.

4.2.1 Mitochondriales *in vitro*-RNA-Editingsystem der Kartoffel

Zur Analyse der RNA-Editingaktivität des Kartoffel-*in vitro*-Systems wurde als zu editierende RNA das *atp9-in vitro*-Transkript aus Kartoffel mit lysierten Kartoffelmitochondrien (s. unter 3.19.1) versetzt. Die eingesetzte RNA-Menge variierte dabei zwischen 10 ng und 500 ng, die Proteinmenge zwischen 50 μg und 300 μg . Mittels der Primer-Ligation wurde die Editingstelle 1 auf ihren C-zu-U-Umsatz hin untersucht. Es zeigte sich, daß die in der Primer-Ligation entstehenden Ligationsergebnisse bei Einsatz gleicher Mengen an RNA zur Inkubation in ihrer

Signalstärke stark schwankten (Ergebnisse nicht dargestellt). Der Zusatz von tRNA zur Inkubation als RNase-Substrat brachte zwar geringere Abweichungen in der Signalstärke, hob sie jedoch nicht ganz auf. Da eine Quantifizierung der aus der inkubierten RNA hergestellten cDNA aufgrund der zu geringen Mengen nicht möglich war, wurde eine zusätzliche Amplifikation der cDNA, wie in Abb. 4.11 (S. 56) bereits dargestellt, durchgeführt. Diese ermöglichte die densitometrische Quantifizierung gelelektrophoretisch aufgetrennter RT-PCR-Produkte und folglich den Einsatz gleicher Mengen Template-DNA in die Primer-Ligation. Nach dieser Anpassung des *in vitro*-Systems an die Primer-Ligation konnte die Optimierung der Inkubationsbedingungen durchgeführt werden. Erst die Reduktion der eingesetzten RNA-Menge auf 10-50 ng in Kombination mit einer hohen Lysatmenge (200-300 µg) zeigte RNA-Editing der *atp9*-RNA an der Editingstelle 1 (Abb. 4.13). Als Kontrolle diente stets ein Inkubationsansatz, dem das hitzeinaktivierte Mitochondrienlysat zugesetzt war. Während der Kontrollansatz kein RNA-Editing zeigte, konnte im nativen Ansatz ein deutlicher C-zu-U-Umsatz nachgewiesen werden. Die Quantifizierung über Phosphorimaging ergab eine Editingrate von 2 %.

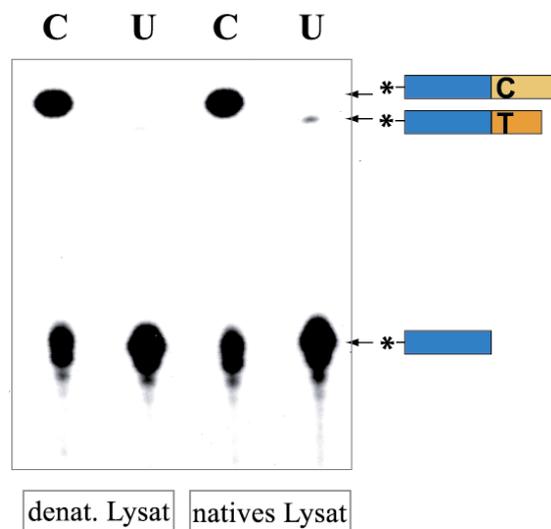


Abb. 4.13: RNA-Editingaktivität im mitochondrialen Kartoffel-*in vitro*-System – Autoradiographie der Primer-Ligationsreaktionen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Bei der Inkubation von mitochondrialem Kartoffellysat mit der *atp9*-Sequenz aus Kartoffel wurden neben den nativen Ansätzen auch Kontrollansätze untersucht. Diese enthielten ein durch Hitzebehandlung inaktiviertes Mitochondrienlysat. Die C-zu-U-Editingreaktion wurde in der Primer-Ligation mit dem C-Detektionsprimer Pos1B-C18 (18mer, gelb) dem T-Detektionsprimer Pos1B-T16 (16mer, orange) nachgewiesen. Die Buchstaben „C“ und „U“ geben die daraus resultierende Identität der Nucleotide Cytidin bzw. Uridin an der RNA-Editingstelle an. Als markierter Downstreamprimer wurde in allen Ansätzen der Primer Pos1A (25 mer, blau) verwendet.

4.2.2 Mitochondriales *in vitro*-RNA-Editingssystem der Erbse

Zur Untersuchung der RNA-Editingaktivität des Erbsen-*in vitro*-Systems wurde den lysierten Erbsenmitochondrien das *atp9-in vitro*-Transkript aus Erbse als Editingsubstrat zugesetzt. Die optimierten Bedingungen des Kartoffelsystems (s. unter 4.2.1) wurden auch für dieses *in vitro*-System angewendet und erneut die RNA-Editingstelle 1 mittels der Primer-Ligation auf ihren C-zu-U-Umsatz hin untersucht.

Wie in Abb. 4.14 gezeigt, konnte auch in diesem System ein deutlicher C-zu-U-Umsatz im nativen Ansatz nachgewiesen werden. Kein RNA-Editing war hingegen bei dem Kontrollansatz mit hitzeinaktiviertem Mitochondrienlysat zu detektieren.

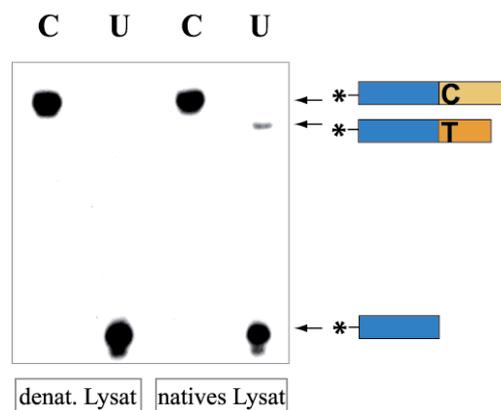


Abb. 4.14: RNA-Editingaktivität im mitochondrialen *in vitro*-System der Erbse – Auftrennung der Primer-Ligationsreaktionen über Gelelektrophorese (Autoradiographie). Bei der Inkubation von mitochondrialem Erbsenlysat mit der *atp9*-Sequenz aus Erbse wurden neben den nativen Ansätzen auch Kontrollansätze verwendet, die durch Hitzebehandlung inaktivierte Mitochondrienlysat enthielten. Die C-zu-U-Editingreaktion wurde in der Primer-Ligation mit dem C-Detektionsprimer Pos1B-C18 (18mer, gelb) und dem T-Detektionsprimer Pos1B-T16 (16mer, orange) verfolgt. Die Buchstaben „C“ und „U“ geben die resultierende Identität der Nucleotide Cytidin bzw. Uridin an der RNA-Editingstelle an. Als markierter Downstreamprimer wurde in allen Ansätzen der Primer Pos1A (25 mer, blau) verwendet.

Die Quantifizierung der Primer-Ligationssignale erfolgte über Phosphorimaging. Für das mitochondriale *in vitro*-System der Erbse konnte demzufolge eine RNA-Editingrate von 4 % nachgewiesen werden. Ein Vergleich der C-zu-U-Umsätze an der Editingstelle 1 des *atp9*-Templates zeigt, daß die Editingraten im mitochondrialen *in vitro*-System der Erbse deutlich höher liegen als im System der Kartoffel. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde daher mit dem Erbsensystem weitergearbeitet.

Zur Absicherung der Identität der Basen in der editierten RNA wurden die zur Primer-Ligation eingesetzten RT-PCR-Produkte kloniert und individuelle Klone sequenziert. Hierbei zeigte einer von 62 Klonen RNA-Editing an der untersuchten Editingstelle 1. Dies entspricht einer Editingrate von 1,6 % und bestätigt im Fehlerbereich des kleinen Stichprobenumfangs die im *in vitro*-System durch die Primer-Ligation gemessenen

Editingaktivitäten von bis zu 4 %. Anhand der Sequenzierung (Abb. 4.15) konnte weiterhin gezeigt werden, daß das *atp9*-Transkript vollständig editiert vorliegt und es sich dabei nicht um die endogene *atp9*-RNA handelt. Veränderungen außerhalb der beiden bekannten Editingstellen wurden nach der *in vitro*-Inkubation nicht detektiert.

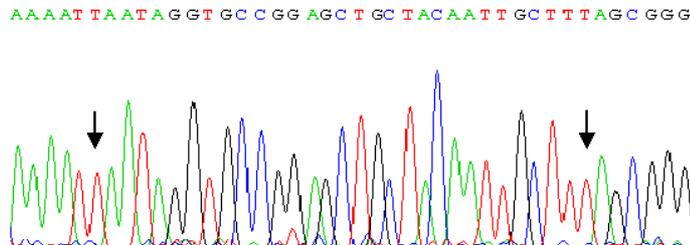


Abb. 4.15: Überprüfung der Identität der RNA-Editingstellen der Erbsen-*atp9*-RNA nach der *in vitro*-Inkubation mit Mitochondrienlysat – Gezeigt ist ein Ausschnitt der Sequenzierung eines individuellen RT-PCR-Klons, der aus der inkubierten *atp9*-RNA aus Erbse generiert wurde. Die Pfeile zeigen die in der Editingreaktion aus Cytidinen entstandenen Uridine an der Editingstelle 1 (links) und der Editingstelle 2 (rechts), die bei der Sequenzierung als Thyminde in der DNA erscheinen.

4.2.3 RNA-Editing im heterologen *in vitro*-System

Da der RNA-Editing-Prozeß im Pflanzenreich hoch konserviert ist, stellt sich die interessante Frage, ob Mitochondrien von Pflanzen verschiedener Spezies in der Lage sind, die gleichen Templates zu editieren. Dieser Frage sollte in einem heterologen *in vitro*-RNA-Editingsystem nachgegangen werden. Dafür wurde ein mitochondriales LySAT aus Erbse hergestellt und mit einer Kartoffel-RNA *in vitro* inkubiert. Hierfür wurde die *atp9*-RNA gewählt, da sie sich sowohl im homologen Erbsensystem als auch im homologen Kartoffelsystem bereits als geeignetes Editingsubstrat erwiesen hatte (vgl. Abb. 4.13 und Abb. 4.14). Parallel dazu wurden Ansätze vorgenommen, denen statt der heterologen Kartoffel-RNA die homologe *atp9*-RNA aus Erbse als Editingtemplate zugesetzt wurde. Diese Ansätze sollten sicherstellen, daß das verwendete LySAT Editingaktivität zeigt. Zur Beurteilung des RNA-Editings mittels der Primer-Ligation wurde wieder die Editingstelle 1 der *atp9*-RNA herangezogen.

Das Ergebnis der Untersuchung des heterologen RNA-Editingsystems ist in Abb. 4.16 gezeigt. Für die Kartoffel-*atp9*-Sequenz konnte ein deutlicher C-zu-U-Umsatz gezeigt werden. Die Quantifizierung der Primer-Ligationssignale über Phosphorimaging ergab eine Editingrate von 2 %. Die Analyse der parallel durchgeführten Inkubation der homologen Erbsen-*atp9*-Sequenz (hier nicht dargestellt) erbrachte nach Daten des Phosphorimaging ebenfalls eine Editingrate von 2 %. Folglich wurden im mitochondrialen Erbsensystem die homologe *atp9*-Sequenz aus Erbse und die heterologe *atp9*-Sequenz aus Kartoffel gleichermaßen editiert.

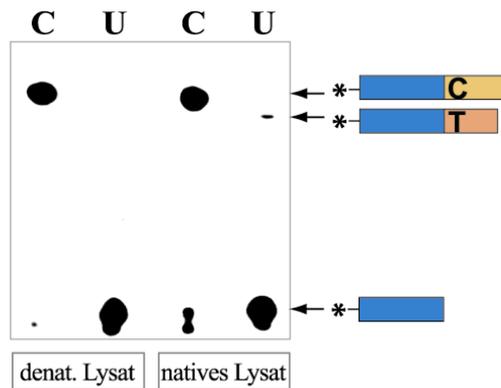


Abb. 4.16: Untersuchung des RNA-Editings im heterologen *in vitro*-System – Gezeigt ist die Autoradiographie der über Gelelektrophorese aufgetrennten Primer-Ligationsreaktionen. Im heterologen System wurden lysierte Erbsenmitochondrien zusammen mit der *atp9*-Sequenz aus Kartoffel inkubiert. Die Kontrollansätze enthielten dabei das hitzedenaturierte Mitochondrienlysat. Die C-zu-U-Editingreaktion wurde in der Primer-Ligation mit dem C-Detektionsprimer Pos1B-C18 (18mer, gelb) und dem T-Detektionsprimer Pos1B-T16 (16mer, orange) nachgewiesen. Die Buchstaben „C“ und „U“ geben die resultierende Identität der Nucleotide Cytidin bzw. Uridin an der RNA-Editingstelle an. Als Downstreamprimer wurde in allen Ansätzen der ³²P-markierte Primer Pos1A (25 mer, blau) verwendet.

4.2.3.1 Vergleich des *atp9*-Gens aus Kartoffel und Erbse

In der Untersuchung des heterologen RNA-Editings konnte gezeigt werden, daß RNA-Editing in Erbse an der Kartoffel-*atp9*-RNA heterolog möglich ist. Dies gibt neben evolutionären Aspekten auch Auskunft über die Anforderungen des RNA-Editings an die Template-RNA. Da alle für das RNA-Editing notwendigen Sequenzelemente für die untersuchte Editingstelle 1 in Kartoffel und Erbse erhalten sein müssen, können diese nur in Bereichen liegen, wo sich die hoch konservierte *atp9*-Sequenz zwischen Erbse und Kartoffel nicht unterscheidet. Ein Sequenzvergleich des *atp9*-Gens beider Pflanzen (Abb. 4.17) zeigt zunächst Unterschiede in der Anzahl der RNA-Editingstellen. Während in der Erbse nur zwei Nucleotidpositionen editiert werden, findet RNA-Editing bei der Kartoffel an 10 Positionen statt. Diese Unterschiede lassen sich jedoch alle durch das Vorhandensein von prä-editierten Cytidinen in Form von Thyminen in der DNA erklären. Demzufolge werden diese Abweichungen alle durch RNA-Editing in der Kartoffel behoben, wie aus dem Aminosäurevergleich (Abb. 4.17, C) hervorgeht. Weitere 23 Sequenzunterschiede treten im translatierten Bereich auf. Von diesen resultieren jedoch nur zwei in einem Aminosäureaustausch (Codon 8 und 22). Bei allen anderen handelt es sich um sogenannte stille Mutationen, die wegen der Degeneriertheit des genetischen Codes keinen Einfluß auf die Aminosäuresequenz haben. Erhebliche Unterschiede zwischen dem Erbsen- und Kartoffel-*atp9*-Gen treten jedoch im 5'- und 3'-untranslatierten Bereich auf. Durch den Nachweis der RNA-Editingaktivität im heterologen *in vitro*-System können diese Sequenzunterschiede keine Relevanz für das RNA-Editing an der Editingstelle 1 haben. Durch die dortige Verwendung eines Kartoffel-*atp9*-*in vitro*-Transkriptes, welches einen im Vergleich zur Erbsensequenz um 24 Nucleotide verkürzten 5'-Bereich trägt, kann ausgeschlossen werden, daß essentielle Elemente weiter entfernt liegen als 35 Nucleotide 5' von der Editingstelle.

4.3 Identifizierung funktioneller Bereiche der *atp9*-RNA

Nachdem durch den Nachweis der RNA-Editingaktivität im heterologen *in vitro*-System ausgeschlossen werden konnte, daß die zwischen Erbsen- und Kartoffel-*atp9*-RNA abweichenden Sequenzen für die Editingreaktion wichtig sind, sollte nun direkt gezeigt werden, welche Bereiche der *atp9*-RNA für das RNA-Editing relevant und essentiell sind. Aufgrund der hohen Editingrate der Erbsen-*atp9*-RNA wurde für diese Untersuchungen das homologe Erbsensystem herangezogen. Dazu wurde einerseits eine in dieser Arbeit neu entwickelte Kompetitionsanalyse, andererseits eine „Linker Scanning“-Mutagenese des Erbsen-*atp9*-Templates verwendet. Während die Mutagenese der Template-RNA durch das Einfügen von 15 bp-Insertionen direkten Einfluß auf die Sequenz der RNA nimmt, verwendet die Kompetitionsanalyse Oligonucleotide, die mit der Template-RNA an ausgewählten Bereichen nahe der Editingstelle hybridisieren. Durch die Ausbildung doppelsträngiger Strukturen wird die Interaktion mit potentiellen Editingfaktoren (Protein und/ oder RNA) an die Template-RNA und die Bildung möglicherweise wichtiger interner Sequenzstrukturen verhindert. Sind davon essentielle Bereiche betroffen, ist als Folge eine Reduktion bzw. der Ausfall der Editingaktivität zu erwarten.

4.3.1 Kompetitionsanalyse zur Identifizierung von *cis*-Elementen

Für die hier durchgeführte Kompetitionsanalyse wurden Desoxyoligonucleotide mit einer Länge von 14 Nucleotiden als Kompetitoren eingesetzt. Diese wurden so gewählt, daß sie mit den für das RNA-Editing potentiell wichtigen Bereichen, dem nahen Upstream- und Downstreambereich (Williams *et al.*, 1998, Kubo & Kadowaki, 1997), der Editingstelle 1 der *atp9*-RNA paaren (Abb. 4.18). Sie werden im weiteren Verlauf der Arbeit als up-1, up-2, up-3, up-4 (upstream paarend), down-1 (downstream paarend) und K-Vec bezeichnet. Das Kompetitionsoligonucleotid K-Vec diente der Kontrolle. Es paart mit der Vektorsequenz des *in vitro*-Transkriptes und dient dem Nachweis, daß der Zusatz eines für die *atp9*-Sequenz unspezifischen Oligonucleotids keinen Einfluß auf die RNA-Editingaktivität zeigt.

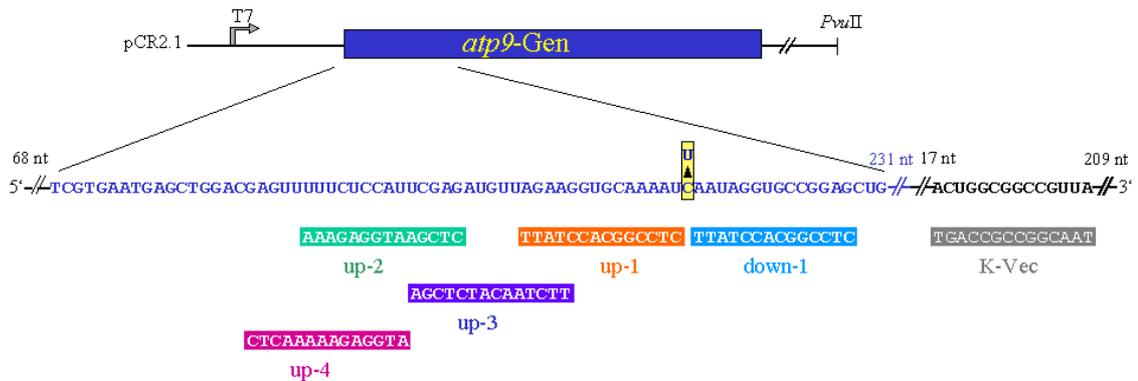


Abb. 4.18: Lage der Kompetitionsoligonucleotide auf der *atp9*-RNA der Erbse – Die Sequenz des *atp9*-*in vitro*-Transkriptes (blaue Schrift) ist als Ausschnitt unterhalb des in den pCR2.1-Vektor klonierten *atp9*-Gens dargestellt. Startpunkt bzw. Ende der *in vitro*-Transkription sind mit „T7“ bzw. der Restriktionsschnittstelle *PvuII* gekennzeichnet. Vektorsequenzbereiche sind schwarz dargestellt. Balken verschiedener Farben geben die Paarungsposition der Kompetitionsoligonucleotide auf der RNA an: in hellblau dargestellt ist das Kompetitionsoligonucleotid down-1, in orange up-1, in dunkelblau up-3, in grün up-2, in lila up-4 und in grau K-Vec.

Für die Kompetitionsanalyse wurde das *atp9*-*in vitro*-Transkript vor der *in vitro*-Inkubation mit dem Mitochondrienlysate mit Oligonucleotiden hybridisiert (s. unter 3.19.3.1). Die Reverse Transkription der rückgewonnenen RNA mußte für die Ansätze der Kompetitionsanalyse jedoch modifiziert werden. Durch die Hybridisierung von Kompetitionsoligonucleotiden an die RNA werden neben dem gewünschten vektorspezifischen Primer als Startpunkt für die Reverse Transkription Alternativen innerhalb der *atp9*-Sequenz geschaffen. Folge sind verkürzte cDNA-Produkte, die in der nachfolgenden PCR nicht amplifiziert werden können. Verbesserte Amplifikationsbedingungen wurden durch das Einfügen eines Denaturierungsschrittes erzielt. Die aus der *in vitro*-Inkubation stammende RNA wurde dazu 10 min bei 70 °C denaturiert, bevor der vektorspezifische Primer Oligo2.1 im 200fachen Überschuß zugegeben wurde. Als Enzym für die cDNA-Synthese wurde eine hitzestabile Reverse Transkriptase (Q-Thermo-Reverse Transkriptase, Q-BIOgene) verwendet, die die cDNA-Synthese in 4 Cyclen mit Denaturierungs- (70 °C, 5 min) und Syntheseschritten (42 °C, 15 min) ermöglichte.

Die Kompetitionsanalyse wurde mit steigenden Mengen an Oligonucleotiden durchgeführt, sodaß molare Verhältnisse von äquimolar bis zu einem 100fachen Überschuß von Oligonucleotid zur Template-RNA vorlagen. Wegen der Fülle der Ansätze wurde in der Primer-Ligation ausschließlich das Produkt des C-zu-U-Editings mit dem T-Detektionsprimer nachgewiesen. Auf die Detektion der uneditierten Sequenz wurde verzichtet. Wie Abb. 4.19 zeigt, wurde durch Zusatz des Kompetitionsoligonucleotids up-2 eine drastische Reduktion der RNA-Editingaktivität erzielt. Schon bei äquimolarem Verhältnis von Template-RNA und Kompetitionsoligonucleotid war

eine deutlich Aktivitätsabnahme zu erkennen. Bei 10fachen und 100fachen Überschuß an up-2 konnte über die Primer-Ligation keine Aktivität mehr detektiert werden. Da die auf das Gel aufgetragenen Mengen an Radioaktivität leicht variierten, wie anhand des markierten Primers ersichtlich ist, ergaben sich somit leichte Schwankungen in den Signalstärken der Ligationsprodukte. Um die Signale der Ligationsprodukte von diesen Schwankungen zu bereinigen, wurden alle Ansätze zusätzlich densitometrisch erfaßt (Lumiimager LAS-1000, Software AIDA) und die Ligationsprodukte ins Verhältnis zu den Auftragsmengen gesetzt. Das Verhältnis der auftragsbereinigten Signale der Ligationsprodukte aus den Wettbewerbsansätzen zu dem nativen Ansatz ohne Zusatz von Oligonucleotid sind in Abb. 4.20 dargestellt. Die im nativen Ansatz erreichte RNA-Editingaktivität wurde gleich 100 % gesetzt. So ergaben sich für das Wettbewerbsoligonucleotid up-2 eine mittlere Reduktion der Editingrate um 95 %. Keine Reduktion der Editingaktivität zeigten hingegen die Ansätze mit den Oligonucleotiden up-1, down-1 und K-Vec. Hier stiegen sogar die mittleren Aktivitäten im Verhältnis zum nativen Ansatz ohne Wettbewerbsoligonucleotid auf das 1,6fache (down-1), 1,3fache (up-1) bzw. 1,9fache (K-Vec).

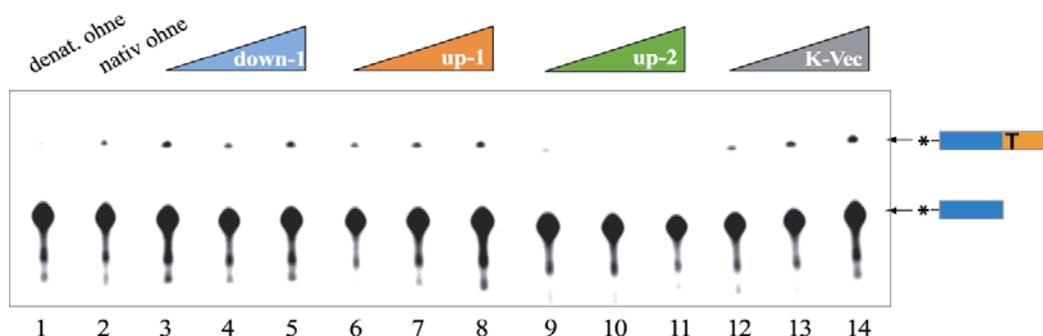


Abb. 4.19: Kompetitionsanalyse für die Editingstelle 1 der *atp9*-RNA im Erbsen-*in vitro*-System – Gezeigt ist die Autoradiographie der gelelektrophoretisch aufgetrennten Primer-Ligationsreaktionen. Die Wettbewerbsoligonucleotide up-1 (orange), up-2 (grün), down-1 (hellblau) und K-Vec (grau) wurden in äquimolarem Verhältnis (Ansätze 3, 6, 9, 12), in 10facher (Ansätze 4, 7, 10, 13) und 100fachen molaren Überschüß (Ansätze 5, 8, 11, 14) zum *atp9-in vitro*-Transkript eingesetzt. Die Ansätze 1 und 2 enthielten kein Wettbewerbsoligonucleotid. Beim Kontrollansatz 1 wurde hitzenaturiertes, beim Ansatz 2 natives Mitochondrienlysate zur Inkubation eingesetzt. Für die Primer-Ligation wurde in allen Ansätzen der T-Detektionsprimer Pos1B-T16 (orange Balken) und der Downstreamprimer Pos1A (blauer Balken) verwendet.

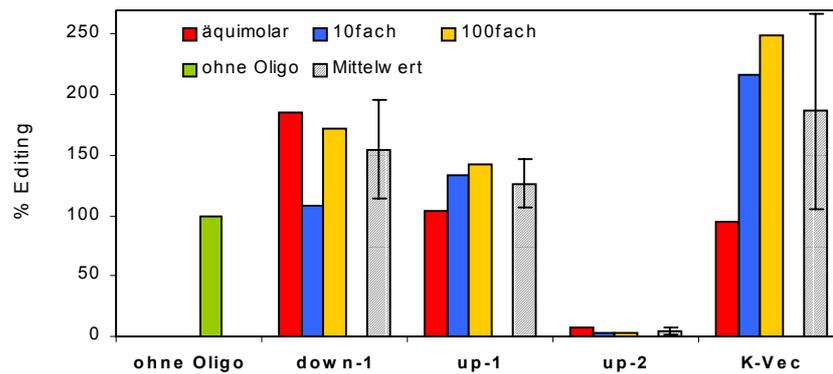


Abb. 4.20: Einfluß der Kompetitionsoligonucleotide up-1, up-2, down-1 und K-Vec auf die RNA-Editingaktivität – Die Quantifizierung der Kompetitionsanalyse erfolgte mittels Densitometrie. Dabei wurde der native Ansatz (grüner Balken) ohne Zusatz von Kompetitionsoligonucleotid gleich 100 % Editing gesetzt. Der Einfluß des äquimolaren Einsatzes (roter Balken), 10fachen (blauer Balken) und 100fachen molaren Überschusses (gelber Balken) der angegebenen Oligonucleotide auf die RNA-Editingaktivität ist dargestellt. Der grau schraffierte Balken zeigt den Mittelwert der Kompetitionsansätze mit den drei unterschiedlichen Mengen eines jeden Oligonucleotids.

Da die Hybridisierung von up-2 an das *atp9-in vitro*-Transkript eine drastische Reduktion der Editingaktivität zur Folge hatte, sollte dieser Bereich bezüglich essentieller *cis*-Elemente durch weitere Kompetitionsanalysen näher charakterisiert werden. Dafür wurden die Oligonucleotide up-3 und up-4 gewählt, die den up-2-Bereich überlappen (vgl. Abb. 4.18, S. 64). Die Auswirkung dieser Oligonucleotide auf die RNA-Editingaktivität ist in Abb. 4.21 dargestellt.

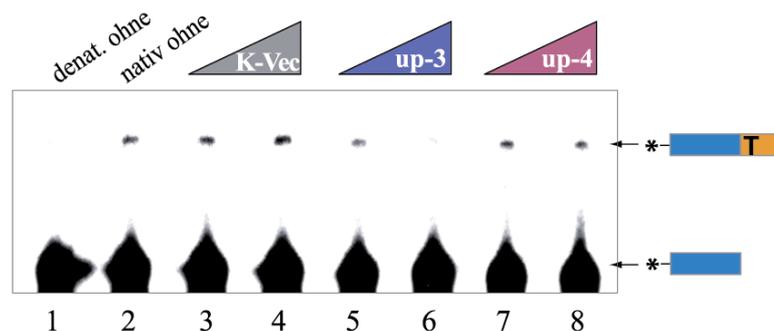


Abb. 4.21: Kompetitionsanalyse zur Lokalisierung von *cis*-Elementen auf der Erbsen-*atp9*-RNA – Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Primer-Ligationsreaktionen (Autoradiographie). Die Kompetitionsoligonucleotide up-3 (blau), up-4 (lila) und K-Vec (grau) wurden in äquimolarem Verhältnis (Ansätze 3, 5, 7) und in 10fachem molarem Überschuß (Ansätze 4, 6, 8) zum *atp9-in vitro*-Transkript eingesetzt. Die Ansätze 1 und 2 enthielten kein Kompetitionsoligonucleotid. Beim Kontrollansatz 1 wurde hitzedenaturiertes, beim Ansatz 2 natives Mitochondrienlysat zur Inkubation eingesetzt. Für die Primer-Ligation wurde in allen Ansätzen der T-Detektionsprimer Pos1B-T16 (oranger Balken) und der ^{32}P -markierte Downstreamprimer Pos1A (blauer Balken) verwendet.

Um auch bei dieser Analyse die Signalstärken der Primer-Ligationsprodukte mit der Auftragsmenge an Radioaktivität abzugleichen, wurde erneut eine densitometrische Bestimmung durchgeführt (Abb. 4.22). Eine RNA-Editingaktivität von 100 % wurde für den nativen Inkubationsansatz ohne Zusatz von Oligonucleotid festgesetzt. Daraus ergab sich für das Kompetitionsoligonucleotid up-3 bei Einsatz eines äquimolaren Verhältnisses zur *atp9*-RNA eine deutliche Reduktion der Aktivität auf unter 60 %. Bei 10fachem Überschuß reduzierte sich die Aktivität sogar auf unter 7 %. Der Zusatz des Kompetitionsoligonucleotids up-4 verringerte die RNA-Editingaktivität ebenfalls. Hier lagen die Aktivitäten jedoch immerhin bei über 60 % bei äquimolarem Verhältnis und bei über 50 % bei 10fachem Überschuß zum RNA-Template. Die Kontrolle mit K-Vec zeigte dagegen keine Reduktion der RNA-Editingaktivität. Die Aktivitäten lagen hier zwischen 93 % (äquimolar) und 107 % (10facher Überschuß).

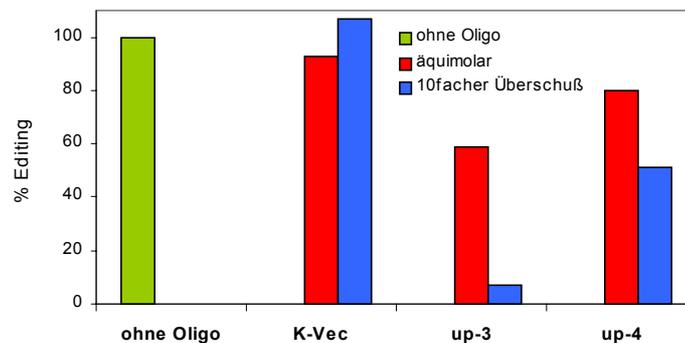


Abb. 4.22: Einfluß der Kompetitionsoligonucleotide up-3, up-4 und K-Vec auf die Editingaktivität – Die Quantifizierung der Kompetitionsanalyse erfolgte densitometrisch, dabei wurde die RNA-Editingaktivität des nativen Ansatzes ohne Zusatz von Kompetitionsoligonucleotid (grüner Balken) auf 100 % festgelegt. Der Einfluß des äquimolaren Einsatzes (roter Balken) und des 10fachen molaren Überschusses (blauer Balken) der angegebenen Oligonucleotide auf die RNA-Editingaktivität ist dargestellt.

4.3.2 Mutagenese des *atp9*-Templates aus Erbse

Um zu bestätigen, daß essentielle Bereiche des Erbsen-*atp9*-Templates upstream von der Editingstelle 1 liegen, wurden Insertionsanalysen durchgeführt. Anhand von 15 Basen-Insertionen 5' von der Editingstelle 1 sollte untersucht werden, inwieweit der Abstand eines *cis*-Elementes zur Editingstelle („Spacing“) beim mitochondrialen RNA-Editing von Bedeutung ist. Erste indirekte Hinweise dafür gibt es bislang nur für das Editing der plastidären *ndhB*-RNA (Hermann & Bock, 1999) und der mitochondrialen *cox2*-RNA (Farré *et al.*, 2001).

Zur Herstellung der Insertionsmutanten wurde das *atp9*-Gen aus Erbse (vgl. Abb. 4.8, S. 53) herangezogen. Bei der „Linker Scanning“-Mutagenese (s. unter 3.16) wurde

zunächst in einer Transpositionsreaktion die Integration eines Transposons (Transprimers) in die Plasmid-DNA vollzogen. Diese in großem Umfang hergestellten Transprimer-Insertionsmutanten wurden mittels PCR auf solche beschränkt, die die Insertion innerhalb der *atp9*-Sequenz tragen. Aus den positiv getesteten Kolonien wurde anschließend die Plasmid-DNA isoliert und diese zur Herstellung der 15 bp-Insertionsmutanten mit *PmeI* verdaut. Dabei wurde der Transprimer herausgeschnitten, die nachfolgende Religation des Vektors führte zur gewünschten 15 bp-Insertion. Diese resultiert aus dem Erhalt einer *PmeI*-Schnittstelle (10 bp) des Transprimers und einer 5 bp-Verdopplung der *atp9*-Sequenz am Insertionsort durch die Transpositionsreaktion. Die individuellen Ligationsreaktionen wurden erneut transformiert, selektiert und zur exakten Lokalisierung der Insertionen sequenziert. Von den weit über 30 *atp9*-Mutanten zeigten drei vielversprechende Insertionsorte (Mutanten 55, 69 und 174). Die relative Lage der Insertionen zur Editingstelle 1 ist in Abb. 4.23 dargestellt. Die Mutanten liegen jeweils etwa zehn Nucleotide voneinander entfernt und überspannen den Upstreambereich über fast 30 Nucleotide. Dabei trägt die proximale Mutante 69 den Insertionsort relativ zur Editingstelle zwischen den Nucleotidpositionen -6 und -7, die Mutante 55 zwischen -16 und -17 und die distale Mutante 174 zwischen -27 und -28.

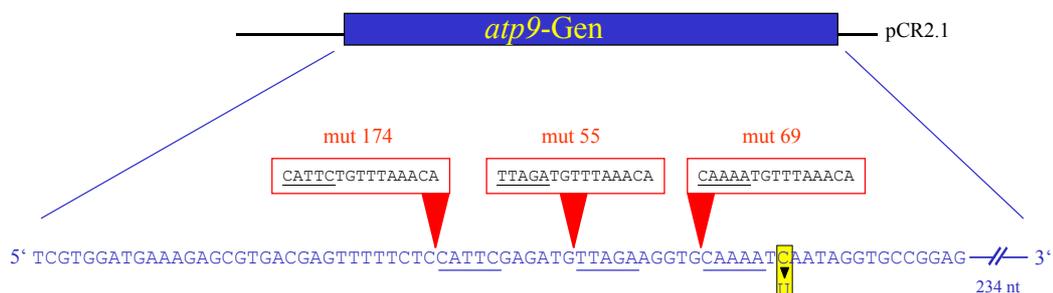


Abb. 4.23: Lage der Insertionen relativ zur Editingstelle 1 der *atp9*-Sequenz – Die *atp9*-Sequenz aus Erbse ist als Ausschnitt in blau dargestellt, Vektorsequenzbereiche als schwarze Linien. Die Lage der Mutanten mut 55, mut 69 und mut 174 ist unter Angabe der insertierten Sequenzen rot hervorgehoben. Unterstrichen sind Sequenzen, die bei der Mutagenese durch die Transpositionsreaktion verdoppelt wurden.

Ob diese Insertionen in das *atp9*-Template einen Einfluß auf das RNA-Editing haben, wurde im folgenden untersucht. Dazu wurden für die *in vitro*-Inkubation mit mitochondrialen Lysaten gleiche Mengen *atp9*-RNA der drei Insertionsmutanten mut 55, mut 69 und mut 174 und des Wildtyps eingesetzt. Die nicht-mutierte Wildtyp-*atp9*-RNA diente dabei als Aktivitätskontrolle des verwendeten Lysats. Die Analyse der RNA-Editingaktivität wurde an der Editingstelle 1 über die Primer-Ligation vorgenommen. Da die Insertionen bei den Mutanten 55 und 69 im Paarungsbereich des in der Primer-Ligation verwendeten Downstreamprimers Pos1A liegen, wurden bei diesen Ansätzen die Primer Pos1A-mu55 bzw. Mut69Pos1A verwendet. Die Primer-

Ligationsreaktionen für die Mutanten 174 und 55 sind in Abb. 4.24 dargestellt. Die Kontrollansätze mit Wildtyp-*atp9*-RNA und die distale Mutante 174 zeigten hier einen deutlichen C-zu-U-Umsatz. Für die Transkripte der Mutante 55 konnte hingegen keine RNA-Editingaktivität nachgewiesen werden.

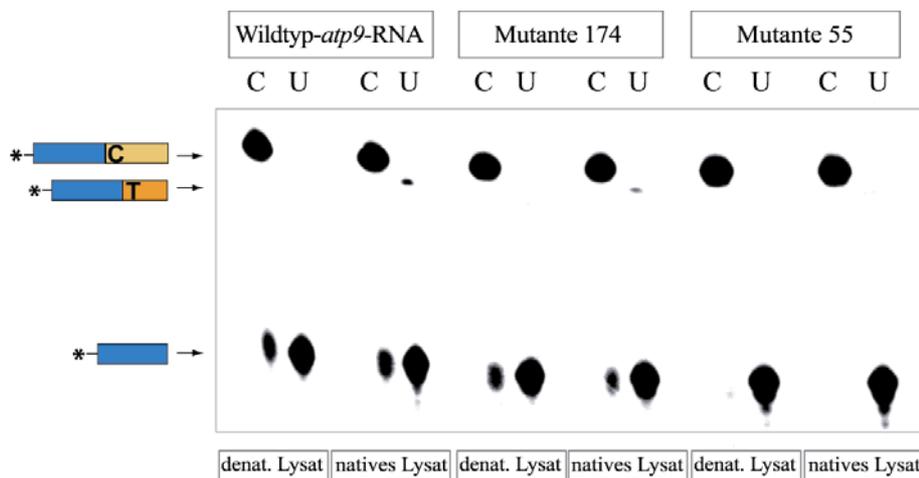


Abb. 4.24: RNA-Editing der Insertionsmutanten 174 und 55 im Vergleich zur Wildtyp-*atp9*-RNA aus Erbse – Gezeigt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Primer-Ligationsreaktionen als Autoradiographie. Zur *in vitro*-Inkubation mit Mitochondrienlysaten aus Erbse wurden einerseits die nicht-mutierte Wildtyp-*atp9*-RNA, andererseits Transkripte der Mutanten 55 und 174 eingesetzt, die die in Abb. 4.23 dargestellten 15 Basen-Insertionen tragen. Als Kontrolle zu jedem Ansatz wurde zur *in vitro*-Inkubation statt des nativen auch das hitzedenaturierte Mitochondrienlysate eingesetzt. Die C-zu-U-Editingreaktion wurde in der Primer-Ligation mit dem C-Detektionsprimer Pos1B-C18 (gelb) und dem T-Detektionsprimer Pos1B-T16 (orange) nachgewiesen. Als Downstreamprimer dienen die ³²P-markierten Primer (blau) Pos1A, Pos1A-mu55 bzw. Mut69Pos1A. Die Buchstaben „C“ und „U“ geben die abgeleitete Identität der Nucleotide Cytidin bzw. Uridin an der RNA-Editingstelle an.

Die Analyse der Editingaktivität für die Mutante 69 ist in Abb. 4.25 dargestellt. Für diese konnte mittels der Primer-Ligation ebenfalls keine RNA-Editingaktivität detektiert werden, während die Wildtyp-*atp9*-RNA einen deutlichen C-zu-U-Umsatz zeigte.

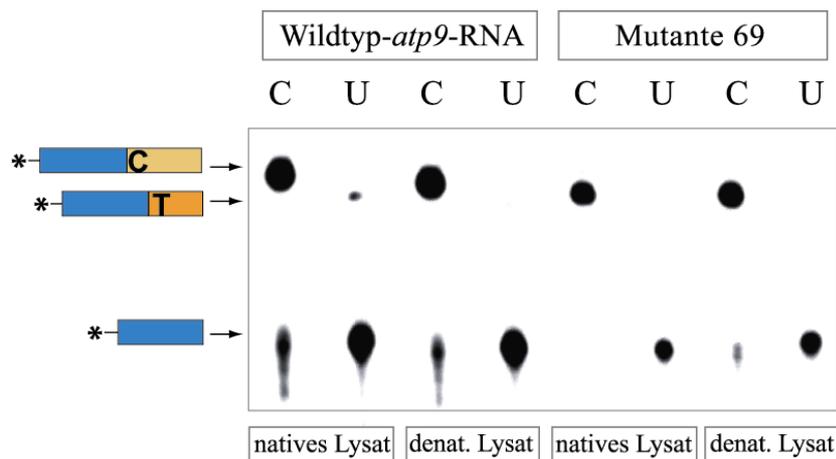


Abb. 4.25: RNA-Editing der Insertionsmutante 69 im Vergleich zur Wildtyp-*atp9*-RNA – Die Autoradiographie zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Primer-Ligationsreaktionen. Zur *in vitro*-Inkubation mit Erbsenmitochondrienlysaten wurden einerseits die unmutierte Wildtyp-*atp9*-RNA aus Erbse, andererseits Transkripte der Mutante 69 eingesetzt, die die in Abb. 4.23 dargestellte 15 Basen-Insertion trägt. Als jeweilige Kontrolle für beide Ansätze wurde das hitzedenaturierte Mitochondrienlysate verwendet. Die C-zu-U-Editingreaktion wurde in der Primer-Ligation mit dem C-Detektionsprimer Pos1B-C18 (gelb) und dem T-Detektionsprimer Pos1B-T16 (orange) nachgewiesen. Als Downstreamprimer wurde der ^{32}P -markierte Primer Pos1A (blau) verwendet. Die Buchstaben „C“ und „U“ geben die abgeleitete Identität der Nucleotide Cytidin bzw. Uridin an der RNA-Editingstelle an.

Über Phosphorimaging wurden die Editingraten der drei Mutanten- und der *atp9*-Wildtyp-Ansätze quantifiziert und in Abb. 4.26 miteinander verglichen. Dabei wurde der C-zu-U-Umsatz der Wildtyp-*atp9*-RNA als maximal mögliche Aktivität gleich 100 % Editing gesetzt. Für die Mutante 174 resultierte daraus eine Aktivität von über 60 %, während für die Mutanten 55 und 69 in der Primer-Ligation keine Editingaktivität nachgewiesen werden konnte.

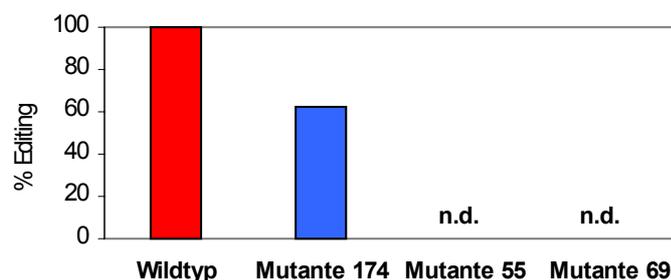


Abb. 4.26: Vergleich der Editingraten zwischen den Insertionsmutanten 174, 55 und 69 und der Wildtyp-*atp9*-RNA – Der C-zu-U-Umsatz der Wildtyp-*atp9*-RNA (rot) wurde gleich 100 % Editing festgelegt. Die Editingaktivitäten der Mutanten 174 (blau), 55 und 69 wurden in Relation zu diesem Wert gesetzt. n.d. = nicht detektierbar.

4.4 Chloroplasten-*in vitro*-RNA-Editingsystem der Erbse

Pflanzliche Chloroplasten und Mitochondrien zeigen beide C-zu-U-RNA-Editing. Da bislang von einem verwandten Editingsystem basierend auf einer Cytidin-Desaminierungsreaktion (Yu & Schuster, 1995, Blanc *et al.*, 1995) ausgegangen wird, ist die Fragestellung interessant, ob Chloroplasten und Mitochondrien aus der gleichen Pflanzenspezies in der Lage sind, RNA-Templates des jeweils anderen Organells zu editieren.

Zur Untersuchung wurde auf das in dieser Arbeit etablierte mitochondriale *in vitro*-System der Erbse zurückgegriffen. Um die organellenheterologen Ansätze vollziehen zu können, mußte zunächst für Erbsenchloroplasten ein *in vitro*-System etabliert werden, das plastidäre RNAs zu editieren vermag. Dafür war es als erstes notwendig, ein geeignetes Testsubstrat für das RNA-Editing in Chloroplasten zu wählen. Dieses sollte *in vivo* vollständig editiert werden, damit im *in vitro*-System, also unter suboptimalen Reaktionsbedingungen, die C-zu-U-Änderung noch nachgewiesen werden kann. Als Kandidat dafür kam die *ndhB*-RNA (codiert für eine Untereinheit der NAD(P)H-Dehydrogenase) in Betracht, die in Tabak gut untersucht ist. Bekannt sind dort sowohl die Editingstellen (Freyer *et al.*, 1995) als auch teilweise die Vollständigkeit der C-zu-U-Umwandlungen. Wie hoch der Editingumsatz jedoch bei der Erbse liegt, wurde über Sequenzierung überprüft. Dazu wurde Gesamt-RNA aus Erbsenblättern isoliert (s. unter 3.1), in cDNA umgeschrieben und mittels PCR (Primerpaar NdhB-1 und NdhB-2) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden von SeqLab in Göttingen sequenziert. Da die PCR-Produkte die Gesamt-RNA-Population widerspiegeln, ließen sich so Rückschlüsse auf den Editingstatus *in vivo* machen. Für das *ndhB*-Gen aus Erbse ergab sich für die Codonposition 44 ein vollständiger Umsatz von Cytidin zu Uridin. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird das Codon 44 in Anlehnung an die Bezeichnung der Editingstellen in Tabak mit Editingstelle II bezeichnet.

Ob an dieser Editingposition auch in einem *in vitro*-System RNA-Editing stattfindet, mußte geprüft werden. Dazu wurde zur Herstellung des nicht-editierten *ndhB*-Testsubstrates zunächst das *ndhB*-Gen hinter den T7-Promotor in den pCR2.1-Vektor kloniert (Abb. 4.27). Da das *ndhB*-Gen ein ca. 700 bp langes Intron zwischen Exon 1 und Exon 2 enthält und die Gesamtgröße sich damit auf über 1,1 kb beläuft, wurde das Intron aus dieser Sequenz entfernt. Dieser Schritt war notwendig, um einerseits eine Transkription mit Produkten ganzer Länge zu gewährleisten, andererseits das Zerschneiden des Transkriptes während der Inkubation durch RNasen zu vermindern.

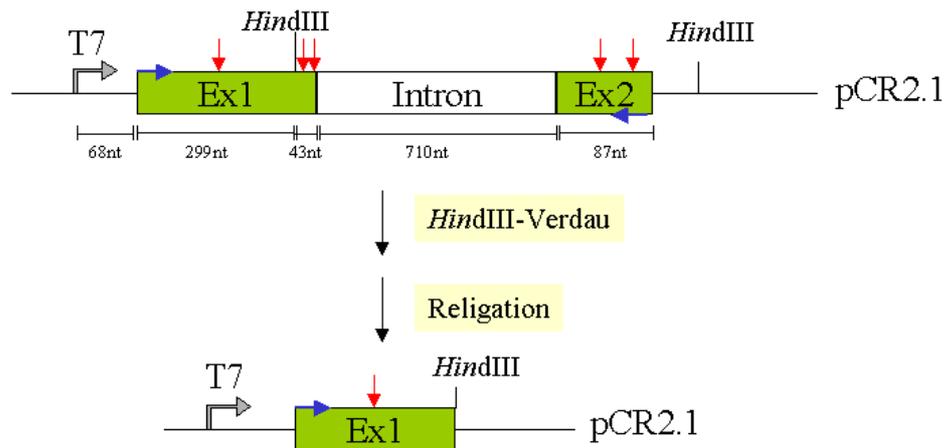


Abb. 4.27: Darstellung der Klonierung des *ndhB*-Gens aus Erbse und Lage der Editingstellen – Das *ndhB*-Gen setzt sich aus zwei Exons (grün, Ex1 und Ex2) und einem Intron zusammen. Die enthaltenen Editingstellen sind durch rote Pfeile markiert. Zur Klonierung wurde das *ndhB*-Gen zunächst amplifiziert (Primerpaar NdhB-1 und NdhB-2, blaue Pfeile) und dann über die TA-Überhang-Methode in den pCR2.1-Vektor hinter den T7-Promotor eingesetzt (oben dargestellt). Zur Entfernung des Introns wurde anschließend mit *HindIII* verdaut und der Vektor religiert. Aus dem Herausschneiden resultiert als späteres Editingsubstrat eine verkürzte RNA, die das Exon 1 ohne die letzten 43 Nucleotide repräsentiert.

Für die *in vitro*-Inkubation von *ndhB*-RNA und plastidären Lysaten wurde zunächst aus dem beschriebenen genomischen Klon ohne Intron über den T7-Promotor des pCR2.1-Vektors ein *in vitro*-Transkript erzeugt (Abb. 4.28). Nach Rückgewinnung der mit dem Chloroplastenlysat inkubierten RNA (s. unter 3.19.3) wurde diese mittels RT-PCR amplifiziert. Dabei wurden für die Reverse Transkription und für die PCR ein vektorspezifischer Primer verwendet, der die Amplifikation der endogenen natürlichen *ndhB*-RNA ausschließt.

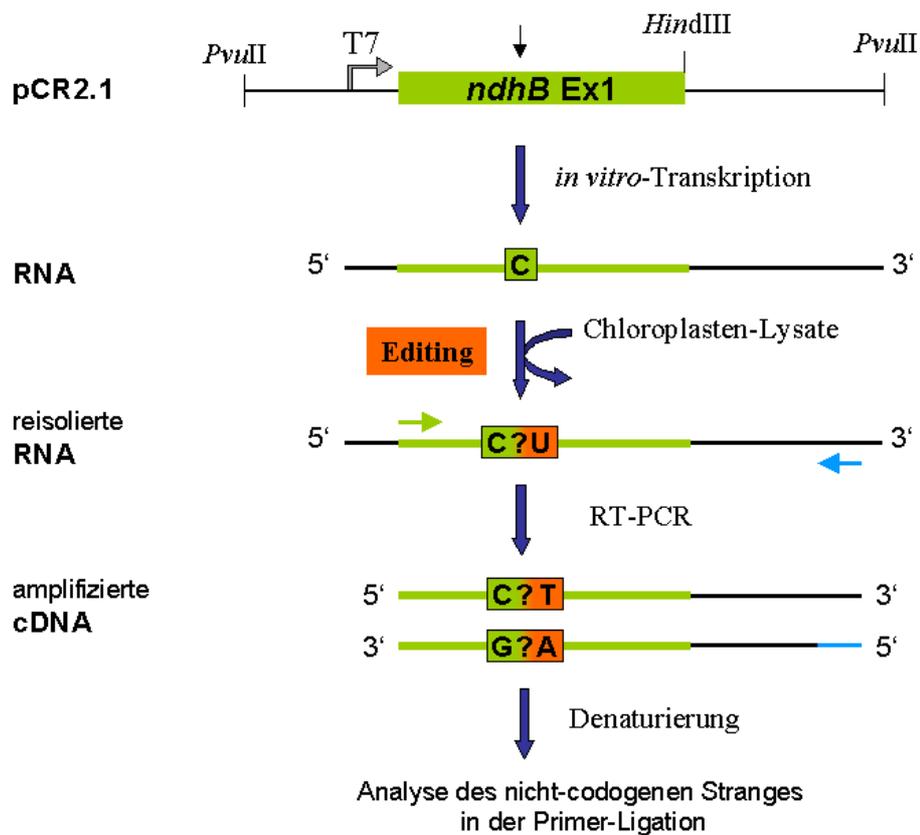


Abb. 4.28: Schematische Übersicht der Arbeitsschritte für die Editinganalyse der *ndhB*-RNA – Das in den pCR2.1-Vektor klonierte Exon 1 des *ndhB*-Gens ist als grüner Balken, die enthaltene Editingstelle II als schwarzer Pfeil dargestellt. Grün hervorgehoben ist das nicht-editierte Nucleotid Cytidin, rot hervorgehoben das editierte Uridin, bzw. auf DNA-Ebene Thymidin. Nach PCR-Amplifikation resultieren daraus die Nucleotide Guanosin (nicht-editiert) und Adenosin (editiert) im nicht-codogenen Strang. Der graue Pfeil markiert den T7-Promotor in der Vektorsequenz. Der grüne Pfeil zeigt die Lage des *ndhB*-sequenzspezifischen Primers NdhB-1 der PCR, der blaue Pfeil markiert den vektorspezifischen Primer Oligo2.1, der für die cDNA-Synthese und PCR verwendet wurde.

Die Editingstelle II des mit dem Chloroplastenlysate inkubierten *ndhB*-Transkripts wurde über die Primer-Ligation auf einen C-zu-U-Umsatz untersucht. Dazu war es zunächst erforderlich, die Primer-Ligation an dieses Template anzupassen. Optimale Spezifität der Reaktion wurde bei einer Hybridisierungstemperatur von 66,4 °C unter Verwendung der Primer NdhB-P1-C16 als C-Detektionsprimer bzw. NdhB-P1-T16 als T-Detektionsprimer und des 5'-radioaktiv markierten Downstreamprimers NdhB-P1-5' erreicht. Die Primer-Ligation zeigte unter diesen Bedingungen einen deutlichen C-zu-U-Umsatz an der Editingstelle II der *ndhB*-RNA (Abb. 4.29). Die Quantifizierung über Phosphorimaging ermittelte eine Editingrate von 2 %. Das plastidäre Erbsensystem ist demzufolge in der Lage, die *ndhB*-RNA *in vitro* nachweisbar zu editieren.

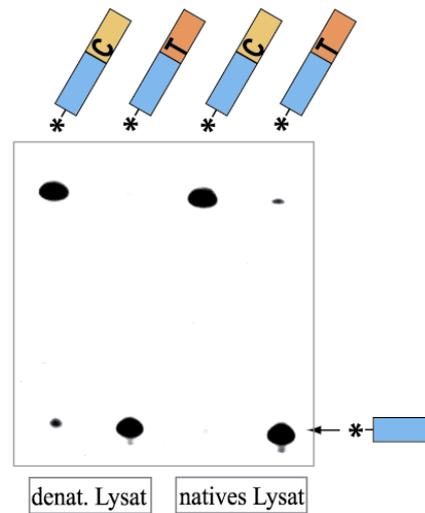


Abb. 4.29: Nachweis des RNA-Editings im plastidären Erbsen-*in vitro*-System an der *ndhB*-RNA
Gezeigt ist die Autoradiographie der gelelektrophoretischen Auftrennung der Primer-Ligationsprodukte. Bei der Inkubation von Lysat und RNA wurden neben den nativen Ansätzen auch Kontrollansätze vorgenommen, die das hitzedenaturierte Chloroplastenlysat enthielten. Die C-zu-U-Editingreaktion wurde in der Primer-Ligation einerseits mit dem C-Detektionsprimer NdhB-P1-C16 (gelb), andererseits mit dem T-Detektionsprimer NdhB-P1-T16 (orange) nachgewiesen. Als Downstreamprimer wurde in allen Ansätzen der ^{32}P -markierte Primer NdhB-P1-5' (blau) verwendet.

4.5 RNA-Editing in organellenheterologen Ansätzen

Nach dem Nachweis der Editingaktivität des Erbsenchloroplasten-*in vitro*-Systems für die plastidäre *ndhB*-RNA war die Grundlage geschaffen, das System auf die RNA-Editingaktivität hinsichtlich eines mitochondrialen Templates zu untersuchen.

Für diesen organellenheterologen RNA-Editingansatz wurden zur *in vitro*-Inkubation Chloroplastenlysate aus Erbse und die mitochondriale *atp9*-RNA aus der gleichen Pflanze eingesetzt. Die *atp9*-RNA wurde zur Analyse gewählt, da sie sich bereits im mitochondrialen *in vitro*-System als geeignetes Editingsubstrat erwiesen hatte. Mittels der Primer-Ligation konnte in diesem organellenheterologen System RNA-Editingaktivität nachgewiesen werden (Abb. 4.30). Die Kontrollinkubation mit hitzeinaktiviertem Lysat zeigte hingegen keinen C-zu-U-Umsatz. Bei der mitochondrialen *atp9*-RNA findet demzufolge an der untersuchten Editingstelle 1 eine C-zu-U-Editingreaktion statt.

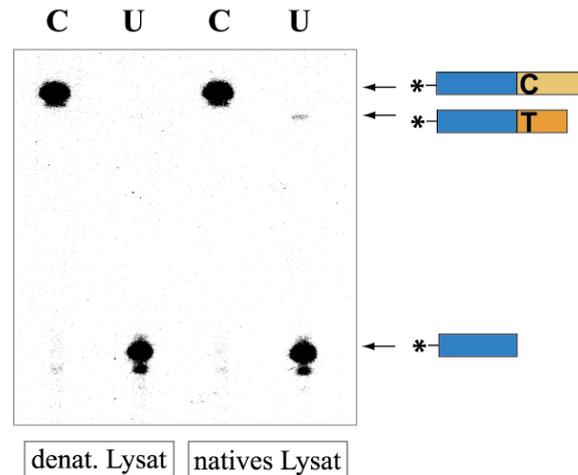


Abb. 4.30: Organellenheterologes RNA-Editing mit mitochondrialer *atp9*-RNA – Bei der Inkubation von Erbsenchloroplastenlysats und RNA wurden neben den nativen Ansätzen auch Kontrollansätze vorgenommen, die das hitzedenaturierte Chloroplastenlysats enthielten. Die Analyse des Editings erfolgte mittels der Primer-Ligation, deren Reaktionsprodukte gelelektrophoretisch aufgetrennt und hier als Autoradiographie dargestellt sind. Zur Primer-Ligation wurde jeweils der Primer Pos1A (blau) mit dem C-Detektionsprimer Pos1B-C18 (gelb) bzw. dem T-Detektionsprimer Pos1B-T16 (orange) eingesetzt. Die Buchstaben „C“ und „U“ geben die abgeleitete Identität der Nucleotide Cytidin bzw. Uridin an der RNA-Editingstelle nach Inkubation an.

Das erfolgreiche RNA-Editing eines mitochondrialen RNA-Templates durch ein Chloroplastenlysats deutet auf einen ähnlichen Mechanismus der beiden C-zu-U-RNA-Editingapparate von Chloroplasten und Mitochondrien hin. Ob auch mitochondriale Lysate in der Lage sind, plastidäre RNAs zu editieren, sollte nun geprüft werden. Da sich die *ndhB*-RNA im homologen Chloroplasten-*in vitro*-System als geeignetes Editingsubstrat erwiesen hatte, wurde sie auch hier zur Untersuchung des organellenheterologen RNA-Editings herangezogen.

Neben der plastidären *ndhB*-RNA wurde für diese Analyse die mitochondriale *atp9*-RNA zur Inkubation eingesetzt. Letztere sollte die RNA-Editingaktivität des verwendeten Mitochondrienlysats sicherstellen. Jeder Inkubationsansatz wurde dabei einmal mit nativem und einmal mit hitzeinaktiviertem Lysat durchgeführt.

Die Analyse des RNA-Editings wurde über die Primer-Ligation vollzogen. Bei der *atp9*-Template-RNA wurde die Editingstelle I, bei der *ndhB*-Template-RNA die Editingstelle II auf C-zu-U-Änderungen untersucht.

Anhand der mitochondrialen *atp9*-RNA konnte gezeigt werden (Abb. 4.31), daß das verwendete Mitochondrienlysats Editingaktivität besitzt. Die plastidäre *ndhB*-RNA zeigte jedoch im mitochondrialen *in vitro*-System kein RNA-Editing.

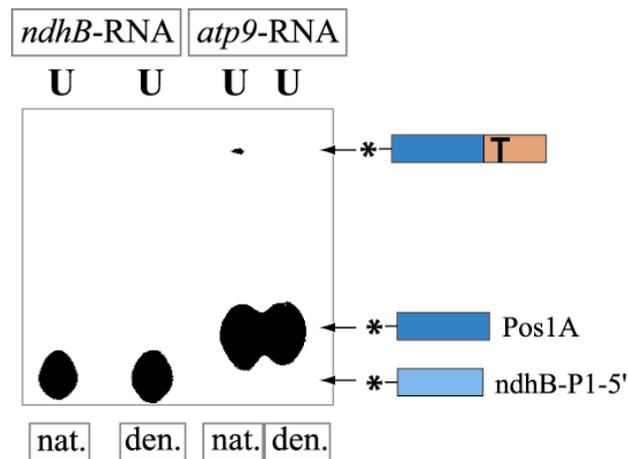


Abb. 4.31: Organellenheterologes RNA-Editing mit plastidärer *ndhB*-RNA als Editingsubstrat – Gezeigt ist die Autoradiographie der Primer-Ligationsreaktionen nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Zur Inkubation mit Erbsenmitochondrienlysate wurde einerseits die plastidäre *ndhB*-RNA aus Erbse (links), andererseits als Aktivitätskontrolle des verwendeten Lysats die mitochondriale *atp9*-RNA aus Erbse (rechts) eingesetzt. Die Inkubation wurde jeweils mit nativem („nat.“) und hitzedenaturiertem („den.“) Lysat durchgeführt. Die C-zu-U-Editingreaktion wurde anhand der Entstehung des editierten Nucleotids Uridin („U“) in der Primer-Ligation mit dem T-Detektionsprimer (orange) nachgewiesen. Für das *ndhB*-Template wurde dazu der Primer NdhB-P1-T16, für das *atp9*-Template der Primer Pos1B-T16 (orange) verwendet. Als markierter Downstreamprimer diente in den *ndhB*-Ansätzen der Primer NdhB-P1-5' (hellblau), in den *atp9*-Ansätzen der Primer Pos1A (dunkelblau). Die Hybridisierungs-/Ligationstemperatur der Primer-Ligationsansätze betragen 59 °C (*atp9*-Ansätze) bzw. 66,4 °C (*ndhB*-Ansätze).

4.6 Das *in organello*-RNA-Editingsystem

In dieser Arbeit konnte bereits anhand eines *in vitro*-RNA-Editingsystems gezeigt werden, daß mitochondriale Lysate einer Pflanze in der Lage sind, RNAs einer anderen Pflanze zu editieren. Da die beiden für Erbse und Kartoffel etablierten mitochondrialen Systeme jedoch unterschiedliche RNA-Editingaktivitäten zeigten (4 % in Erbse, 2 % in Kartoffel), blieben diese heterologen Untersuchungen aufgrund der niedrigeren Aktivität des Kartoffelsystems zunächst auf das Erbsen-*in vitro*-System beschränkt. Um prüfen zu können, ob auch Lysate aus Kartoffelmitochondrien fähig sind, Erbsen-RNAs heterolog zu editieren, wurde ein *in organello*-System für die Kartoffel etabliert. Dieses System nutzt die Elektroporation zum Einbringen eines Plasmids in die Mitochondrien. Wie von Farré und Araya (2001) gezeigt werden konnte, wird eine solche DNA-Sequenz sowohl erfolgreich transkribiert, gespleißt als auch editiert, sofern ein mitochondrialer Promotor und Terminator auf der DNA zugegen ist.

Zur Elektroporation der Kartoffelmitochondrien wurden die in Abb. 4.32 dargestellten Konstrukte verwendet. Die auf RNA-Editing zu analysierenden *atp9*-Sequenzen aus Erbse (Wildtyp-*atp9*-RNA, Insertionsmutanten 55, 69 und 174) wurden zur Herstellung stabiler Transkripte unter die Kontrolle des mitochondrialen 26S *rRNA*-Promotors und

des *atpA*-Terminators (aus *Oenothera*) gestellt. Um möglichst geringe Mengen an nicht-editierten Transkripten in der Editinganalyse zu erfassen, wurde der *atp9*-Sequenz ein Teil des *cox2*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* nachgeschaltet. Da dieses Gen ein Intron beinhaltet, sollte es möglich sein, über RT-PCR nur solche Transkripte zu amplifizieren, die in den Mitochondrien in gespleißter Form mit hohem Editingumsatz vorliegen.

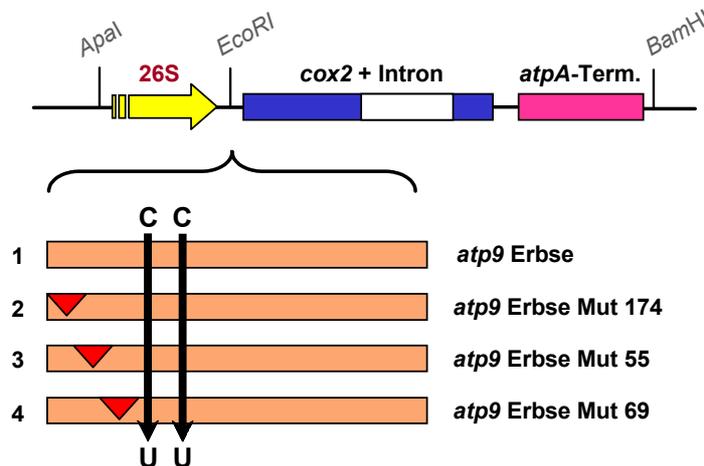


Abb. 4.32: Konstrukte für die Elektroporation von Kartoffelmitochondrien – Der *26S rRNA*-Promotor (gelb) und der *atpA*-Terminator (rosarot) wurden mittels PCR unter Anhängen der zur Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen aus mitochondrialer DNA aus *Oenothera* amplifiziert. Als 5'-Primer für die Promotorsequenz diente Pro3Apa (mit *ApaI*-Schnittstelle), als 3'-Primer Pro4Eco (mit *EcoRI*-Schnittstelle). Die Amplifikation des Terminators erfolgte über das Primerpaar Term1Eco und Term2Bam und resultierte in einer 5'-angehängten *EcoRI*- und 3'-terminalen *BamHI*-Restriktionsschnittstelle. Der amplifizierte Promotor und Terminator wurden über *ApaI/BamHI* in den pCR2.1-Vektor kloniert. Anschließend wurde die *cox2*-Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* (blau) mit Intron (weiß) mit den Primern Cox2-int-1 und TIB-3 (mit *EcoRI*- bzw. *MfeI*-Schnittstelle) amplifiziert und in die entstandene *EcoRI*-Schnittstelle zwischen Promotor und Terminator hineingesetzt. Es folgte das Einfügen der *atp9*-Sequenz aus Erbse in die verbliebene *EcoRI*-Schnittstelle. Die *atp9*-Sequenz entstammte dem in Abb. 4.8 (S. 53) dargestellten TA-klonierten pCR2.1-Konstrukt.

Zur Analyse des C-zu-U-Editings der *in organello* hergestellten Erbsen-*atp9*-Transkripte wurde die RNA aus den Mitochondrien isoliert und die prozessierten *atp9*-Transkripte mittels RT-PCR spezifisch amplifiziert. Die Sequenzierung dieser RT-PCR-Produkte zeigte, daß das Kartoffel-*in organello*-System in der Lage ist, die *atp9*-RNA heterolog an der Editingstelle 1 und 2 zu editieren (Abb. 4.33, oben und Mitte). Das *in organello*-System bestätigt somit das heterologe *atp9*-RNA-Editing, das in dieser Arbeit bereits im *in vitro*-System der Erbse nachgewiesen wurde. Durch die Etablierung des *in organello*-Systems eröffnete sich die Möglichkeit, auch das RNA-Editing der Insertionsmutanten im heterologen System zu untersuchen. Es sollte überprüft werden, ob die Anforderungen an das Editingsubstrat im *in organello*-System die gleichen sind wie im homologen *in vitro*-Erbsensystem.

Die Sequenzanalyse der RT-PCR-Produkte zeigte, daß die Mutante 174 (Abb. 4.33, unten) ebenso wie die Wildtyp-*atp9*-RNA im heterologen *in organello*-System sowohl an der Editingstelle 1 als auch an der Editingstelle 2 vollständig editiert werden. Dieses System belegt somit eindrucksvoll die über die Kompetitionsanalyse vorgenommene Lokalisierung des *cis*-Elementes im Erbsen-*in vitro*-System.

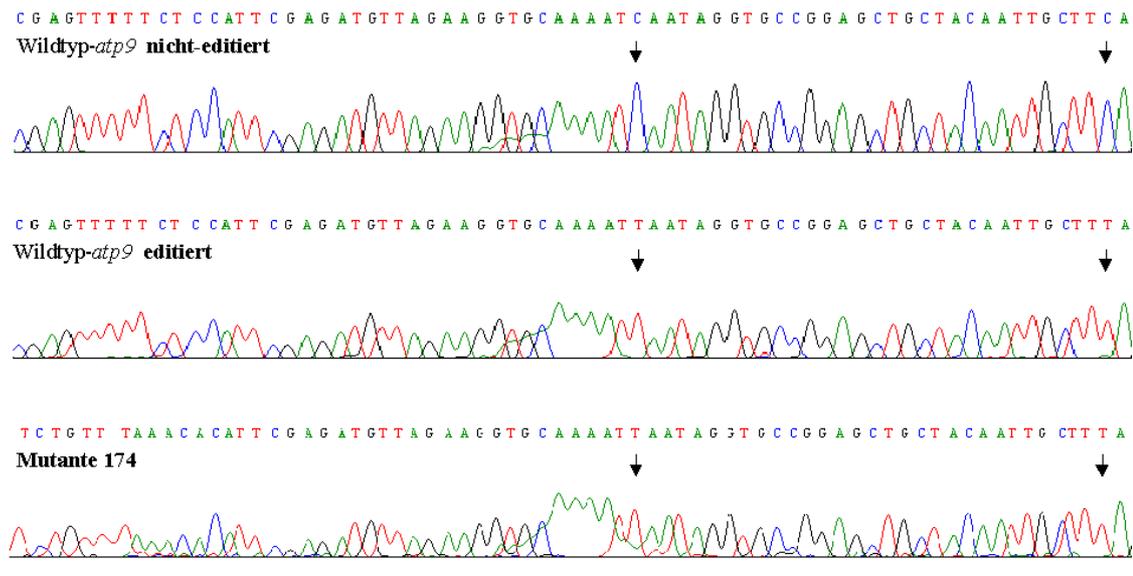


Abb. 4.33: Sequenzierung der *in organello* transkribierten und editierten Erbsen-*atp9*-Transkripte des Wildtyps und der Mutante 174 – Die in den intakten Kartoffelmitochondrien hergestellten Erbsen-*atp9*-Transkripte wurden mit einem Erbsen-*atp9*-spezifischen Primer (Pea-tra-1) und einem *cox2*-spezifischen Primer (Cox2.4) über RT-PCR amplifiziert. Die den gespleißten Varianten entsprechenden RT-PCR-Produkte wurden direkt sequenziert. Als Kontrollsequenz diente die nicht-editierte Wildtyp-*atp9*-Sequenz (oben). Diese wurde durch das zur Elektroporation eingesetzte Ausgangskonstrukt bereitgestellt, das über PCR mit denselben Primern wie die *in organello* hergestellten Sequenzen amplifiziert und sequenziert wurde. Schwarze Pfeile markieren die Editingstelle 1 (links) und die Editingstelle 2 (rechts). Die Insertionssequenz der Mutante 174 ist rot hervorgehoben.

Anhand der Mutanten 55 und 69, die im homologen *in vitro*-System kein Editing zeigten, wurde im *in organello*-System untersucht, ob der Ausfall des RNA-Editings an der Editingstelle 1 Auswirkungen auf den Editingstatus der nur 30 nt entfernten, downstream gelegenen Editingstelle 2 hat. Zu diesem Zweck wurden die aus der *in organello*-Expression hergestellten *atp9*-RT-PCR-Produkte diesmal kloniert und individuelle Klone sequenziert (Abb. 4.34). Als Kontrolle diente die Wildtyp-*atp9*-RNA, die an beiden Editingstellen vollständige C-zu-U-Umwandlungen aufwies. Für beide Mutanten konnte gezeigt werden, daß die C-zu-U-Umwandlung an der Editingstelle 2 vollzogen wird, auch wenn die Editingstelle 1 uneditiert vorliegt. Demzufolge verläuft die Editingreaktion an dieser 2. Stelle unabhängig von der Umwandlung der Editingstelle 1.

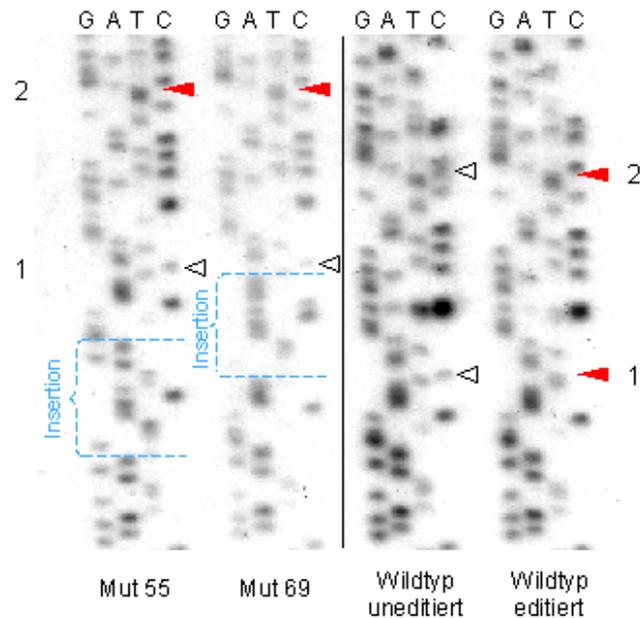


Abb. 4.34: Analyse des RNA-Editingstatus der Transkripte der Insertionsmutanten 55, 69 und der Wildtyp-*atp9*-RNA im heterologen *in organello*-System – Die in den intakten Kartoffelmitochondrien hergestellten Erbsen-*atp9*-Transkripte wurden mit dem Erbsen-*atp9*-spezifischen Primer Pea-tra-1 und dem *cox2*-spezifischen Primer Cox2.4 über RT-PCR amplifiziert. Die den gespleißten Varianten entsprechenden Produkte wurden kloniert und individuelle Klone sequenziert. Als Kontrollsequenzen dienten die editierte und nicht-editierte Wildtyp-*atp9*-Sequenz (rechte Seite). Dabei wurde die uneditierte Sequenz durch das zur Elektroporation eingesetzte Ausgangskonstrukt bereitgestellt, das über PCR mit denselben Primern wie die *in organello* hergestellten Sequenzen amplifiziert und kloniert wurde. Weiße Dreiecke zeigen die nicht-editierten Cytidine, rote Dreiecke die Thymidine der DNA-Sequenz, die aus der C-zu-U-Umwandlung auf RNA-Ebene resultieren. Die beiden Editingstellen sind mit „1“ und „2“ gekennzeichnet. Die insertierten Sequenzen der Mutanten (linke Seite) sind blau hervorgehoben.