

Charakterisierung von Viroid-spezifischen „silencing“-RNAs

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Natalie Yvonne Diermann

aus Düsseldorf

November 2008

Aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: apl. Prof. Dr. G. Steger

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. M. Beye

Korreferent: Prof. Dr. D. Riesner

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Dezember 2008

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 5. November 2008

(Natalie Yvonne Diermann)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerhard Steger für die mir gewährte wissenschaftliche Freiheit und seine Unterstützung, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Desweiteren möchte ich mich für seine Hilfe bei allen bioinformatischen Problemen und Auswertungen bedanken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Detlev Riesner und Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold, dass ich dieser Arbeit im Institut für Physikalische Biologie anfertigen konnte.

Der AG Wagner und insbesondere Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner danke ich für ihre Gastfreundlichkeit und die nette Arbeitsatmosphäre im Ost-Labor während des Umbaus.

Den ehemaligen Mitgliedern der Viroid-Arbeitsgruppe, Dr. Petra Stroeks, Dr. Oliver Bannach und Dr. Axel Schmitz danke ich für das Interesse an meiner Arbeit, die gute Zusammenarbeit und konstruktive Diskussionen.

Bernd Esters gilt ein besonderer Dank für die vielen Antworten zum Thema RNA und seine Hilfe bei allen Laborfragen.

Heidi Gruber danke ich für ihre Hilfe bei allen verwaltungstechnischen Problemen.

Allen ehemaligen und aktuellen nicht namentlich aufgeführten Mitgliedern des Instituts danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Indra Mainz danke ich besonders für ihre Freundschaft, viele nette Gespräche am Teich und ihrer Hilfe mit diversen Rechnern.

Der Rechner-Gruppe, insbesondere Dr. Jan-Hendrik Teune und Konny Linnenbrink danke ich für T_EX-nische Hilfe bei den Rechnern, sowie unvergessliche RNA-Tagungen.

Elke Reinartz und Nina Hofmann danke ich für die vielen morgendlichen Schwimmstunden, sowie die netten Gespräche bei Kaffee und Käsebrötchen.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Freunden Sabine Joos und Ronny Dudeck für ihre moralische Unterstützung, das Korrekturlesen meiner Arbeit und viele schöne gemeinsame Abende.

Vor allem möchte ich mich ganz herzlich für die Liebe und Unterstützung meiner Eltern, Wilfried und Renate Diermann, bedanken, ohne die diese Arbeit nie möglich gewesen wäre.

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vii
1. Einleitung	1
1.1. Viroide	1
1.1.1. Viroid-Replikation	1
1.1.2. Viroid-Klassifizierung	2
1.1.3. Viroid-Struktur	3
1.1.4. PSTVd	4
1.1.5. Pathogenese	4
1.2. RNA-silencing (im Allgemeinen und Speziellen)	6
1.2.1. „Silencing“-Mechanismen	7
1.2.2. miRNAs in Pflanzen	9
1.2.3. „small RNA“-Klassen und ihre Funktion	10
1.2.4. P-bodies	11
1.2.5. RLC und RISC	12
1.2.6. Dicer, Drosha und Pasha	12
1.2.7. Argonauten	14
1.3. RNA-silencing und Viroide	16
1.4. High-Throughput-Sequencing	17
1.4.1. <i>in-silico</i> -Vorarbeiten	17
1.4.2. Sequenziermethoden-Übersicht	17
1.5. Ziel dieser Arbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Puffer und Lösungen	23
2.2. Phenol-Chloroform-Extraktion	25
2.3. Nukleinsäure-Fällungen	25
2.3.1. Ethanol-Fällung	25

2.3.2.	Ammoniumacetat-Ethanol-Fällung	25
2.3.3.	PEG-Fällung	26
2.3.4.	Isopropanol-Fällung	26
2.4.	Zellmaterial	26
2.4.1.	Pflanzenaufschlüsse	27
2.5.	Gelelektrophoresen	28
2.5.1.	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Wattgele)	28
2.5.2.	Silberfärbung	29
2.5.3.	Gelelution von kleinen Nukleinsäuren aus einem PAA-Gel	29
2.6.	Enzymatische Reaktionen	30
2.6.1.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
2.6.2.	RT-PCR	32
2.6.3.	<i>In-vitro</i> -Transkription mit T7-RNA-Polymerase (nach Hecker)	33
2.6.4.	<i>In-vitro</i> -Transkription mit T7-RNA-Polymerase (RiboMAX™ von Promega)	35
2.6.5.	5'-[³² P] pCp-Endmarkierung von RNAs	37
2.7.	Spektralphotometrie	37
2.8.	Northernblot-Analysen	37
2.8.1.	Herstellung der Sonden	37
2.8.2.	Längenstandard mit PSTVd-Sequenz	38
2.8.3.	Elektrotransfer der Nukleinsäure aus einem PAA-Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran	39
2.8.4.	Fixierung der Nukleinsäure auf der Nylonmembran	39
2.8.5.	Hybridisierung	41
2.8.6.	Autoradiographie	42
2.8.7.	Entwicklung der Filme	42
2.9.	Sequenzierung	42
2.9.1.	Elektro-Gelelution	42
2.9.2.	Herstellung von biotinylierten <i>in-vitro</i> -Transkripten mit T7-RNA-Polymerase (nach Hecker)	44
2.9.3.	Dynabead-Aufreinigung	46
2.9.4.	Solexa Sequenzanalyse	49
2.10.	Computeralgorithmen	50

3. Ergebnisse	51
3.1. Herstellung des Zellmaterials	51
3.1.1. Pflanzenzucht	51
3.1.2. Sequenzvergleiche der PSTVd-Varianten	51
3.1.3. RNA-Aufreinigung	53
3.1.4. Versuche zur Trennung von großen und kleinen RNAs	54
3.2. Northernblot-Analyse	57
3.2.1. Sonden-Herstellung	57
3.2.2. Austesten der optimalen Membran	57
3.2.3. Austesten der optimalen Bedingungen	59
3.2.4. Ergebnisse der Northernblots	60
3.3. Aufreinigung der kurzen RNAs und Vorbereitung zur Sequenzierung	61
3.3.1. Auftrennung der Gesamt-RNA mittels PAGE	63
3.3.2. Gelelution der kurzen RNAs	64
3.3.3. Spezifische Aufreinigung der Viroid-spezifischen miRNAs mittels Dynabeads	65
3.4. High-Throughput-Sequenzierung	67
3.4.1. Herstellung von cDNA-Banken	67
3.4.2. Solexa-Sequenzierung	68
3.5. Analyse der Solexa-RNAs	70
3.5.1. Zuordnung der Sequenzen zu den Proben	72
3.5.2. Erstes Zusammenfassen der Sequenzen	73
3.5.3. Entfernen von ribosomalen, tRNA- und Organellen-Sequenzen	73
3.5.4. Zusammenfassen der Sequenzen per cd-hit-est	74
3.5.5. Identifizierung von PSTVd-Sequenzen	74
3.5.6. Vergleich der Datensätze	75
3.5.7. Übersicht über die vorhandenen Sequenzen	76
3.6. Rückschlüsse auf das <i>Solanum lycopersicum</i> -Genom	80
4. Diskussion	83
4.1. Northernblot-Analyse	83
4.2. Vorarbeiten zur Sequenzierung	84
4.2.1. Effizienz der Dynabead-Aufreinigung	85

4.3.	Solexa-Sequenzierung	86
4.4.	Erhaltene Solexa-Sequenzen und ihre mögliche Funktion	86
4.4.1.	miR156	87
4.4.2.	miR157	88
4.4.3.	miR159	88
4.4.4.	miR162	89
4.4.5.	miR319	90
4.4.6.	miR396	90
4.4.7.	miR398b	90
4.5.	Vergleich von verschiedenen miRNA-Suchen	91
4.6.	Schlussfolgerung	92
5.	Zusammenfassung	95
6.	Summary	97
7.	Abkürzungen	99
8.	Literatur	103

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Replikationsmechanismus der <i>Pospiviroidae</i>	2
1.2	Konsensussequenz und -struktur des PSTVd mit fünf Domänen.	3
1.3	Pathogenitätsmodell.	5
1.4	Drei „silencing“-Mechanismen.	8
1.5	Modell für die Biogenese und Wirkung von miRNAs in Pflanzen.	9
1.6	Komplementaritäten von kurzen PSTVd-Segmenten zum <i>Arabidopsis</i> -Genom. . .	17
1.7	Prinzip der Pyrosequencing™-Technologie.	19
1.8	Prinzip der ABI SOLiD-Methode.	20
2.1	Kurze synthetische RNAs.	40
2.2	Semidry Elektrophoretischer Apparat & Blotaufbau.	41
2.3	Schematische Abbildung der richtigen Membranorientierung im Hybridisierungssofen.	42
2.4	Aufbau einer Salzfallung zur Elektro-Gelelektion.	43
3.1	Tomatenpflanzen der Sorte Rutgers, 16 Tage nach Infektion mit PSTVd.	52
3.2	Sequenzvergleich der drei verwendeten PSTVd-Stämme.	53
3.3	Übersicht der Northernblot-Sonden.	58
3.4	Northernblot-Analysen mit VL-Sonden.	59
3.5	5S-RNA-spezifischer Northernblot.	61
3.6	Ergebnisse der Northernblot-Analysen.	62
3.7	Kopräzipitation von kurzen RNAs bei einer PEG-Fällung.	63
3.8	Überprüfung der miRNA-Gelelektionen mittels PAGE und Northernblot-Analyse.	65
3.9	Austestung der Dynabead-Bedingungen.	66
3.10	PAGE-Analyse der cDNA.	69
3.11	Solexa-Sequenzierung.	71
3.12	Häufigkeit von Sequenzen in den Solexa-Datensätzen.	75
3.13	Lage kleiner RNAs mit PSTVd-Sequenz im PSTVd-AS1-Genom.	76

3.14	Komplementaritäten von AS1-miRNA zum <i>Arabidopsis</i> -Genom und Rückschluss auf <i>Solanum lycopersicum</i>	81
4.1	Zusammenfassung aller ermittelten Ergebnisse zum Thema viroidspezifische „silencing“-RNAs.	91

TABELLENVERZEICHNIS

2.1	Primer zur Herstellung von PSTVd-Sonden mit (–)-Orientierung.	31
2.2	Primer zur Herstellung von PSTVd-Sonden mit (+)-Orientierung.	32
2.3	Primer zur Herstellung von Viroid-Volllängen.	33
2.4	PCR-Programme.	34
2.5	Vorgehen bei der RT.	35
2.6	PCR-Programm für RT-PCR.	35
2.7	5× RiboMAX™-Transkriptionspuffer.	36
2.8	Reaktionsansatz für die RiboMAX™- <i>in-vitro</i> -Transkription.	36
2.9	Sequenzen der kurzen synthetischen RNAs.	39
2.10	Beispiel zur Berechnung der nanomolaren Template-Menge.	45
2.11	Sonden zur Dynabead-Aufreinigung.	46
3.1	cDNA-Herstellung.	68
3.2	Adapter-Sequenzen bei der cDNA-Herstellung.	68
3.3	Verteilung der Solexa-Sequenzen auf die drei Tag-Gruppen.	72
3.4	Erstes Zusammenfassen von Sequenzen innerhalb der Sequenzgruppen.	74
3.5	Sequenzen, die in Mock, aber nicht in AS1 auftreten.	77
3.6	Sequenzen, die in Mock, aber nicht in Viroid auftreten.	77
3.7	Sequenzen, die in AS1, aber nicht in Mock auftreten.	78
3.8	Sequenzen, die in AS1, aber nicht in Viroid auftreten.	78
3.9	Sequenzen, die in Viroid, aber nicht in Mock auftreten.	79
3.10	Sequenzen, die in Viroid, aber nicht in AS1 auftreten.	80

1. EINLEITUNG

1.1. Viroide

Viroide sind einzelsträngige, zirkuläre RNA-Moleküle mit einer Länge von 246 bis 399 Nukleotiden, je nach Viroidspezies. Sie sind nicht-kodogene, minimale RNAs, die autonom in der Wirtspflanze replizieren und die biologische Wirkung eines normalen Pflanzenvirus besitzen. Anders als RNA-Viren besitzt die Viroid-RNA kein schützendes Hüllprotein, benutzt keine pathogen-kodierten Replikasen und kodiert keine Proteine. Dadurch sind Viroide bei Replikation, Transport und Prozessierung ausschließlich auf die Wechselwirkungen mit den wirtseigenen Enzymen und Proteinen angewiesen. Die dazugehörigen Signale sind in thermodynamisch stabilen oder metastabilen RNA-Strukturelementen beinhaltet. Das bedeutet, Viroide verwenden ihre Sekundärstruktur, um Strukturmotive auszubilden, die eine Erkennung durch Wirtsproteine und somit eine Nutzung der wirtseigenen Systeme ermöglicht. Durch vorgetäuschte Ähnlichkeiten zu wirtseigenen Nukleinsäuren wird die Viroid-RNA als Template für eine Vielzahl an Reaktionen von der Pflanze akzeptiert, sichert so ihr Überleben in fremden Organismen und kann dadurch als minimaler Parasit des Wirts fungieren. Auf Grund fehlender Proteine ist das Viroid auf Verletzungen der Pflanzenoberfläche angewiesen, damit es in den Wirtsmechanismus gelangen kann, da es keinen Mechanismus zum Eindringen in die Wirtspflanze besitzt.

1.1.1 Viroid-Replikation

Die Viroidreplikation (siehe Abb. 1.1) konnte weitestgehend aufgeklärt werden (Branch & Robertson, 1984). Bei der Transkription wird die zirkuläre, einzelsträngige RNA im ersten Schritt durch einen „rolling-circle“-Mechanismus in einen oligomeren RNA-Strang mit komplementärer Sequenz übersetzt. Dieser lineare (–)-Strang dient wiederum als Matrize für die Übersetzung in die Ausgangssequenz. Die Transkriptionen werden durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II mit Viroid-RNA beider Polaritäten als Template durchgeführt (Spiesmacher *et al.*, 1985); im (+)-Strang sind thermodynamisch stabile und im (–)-Strang metastabile RNA-Strukturelemente kritisch für die Transkription (Qu *et al.*, 1993). Außerdem kann die RNA ihre Prozessierung zum monomeren (+)-Strang selbst ermöglichen, indem sie eine metastabile Struktur ausbildet (Baumstark *et al.*, 1997). Zu keinem Zeitpunkt der Replikation des PSTVd (Potato Spindle Tuber Viroid) sind doppelsträngige Zwischenprodukte beteiligt. Der durch die Transkription entstandene oligomere (+)-Strang wird durch eine RNase in exakte PSTVd-Vollängen geschnitten und durch eine Ligase zu neuen Viroidzirkeln ligiert. Von diesem Punkt aus können die fertigen Viroide durch Transport in der Pflanze verbreitet werden, in ihrer thermodynamisch stabilen Sekundärstruktur im Nukleolus bzw. den Nukleoli gespeichert werden oder auf eine noch nicht erforschte Art und Weise die Pathogenese der Pflanze auslösen.

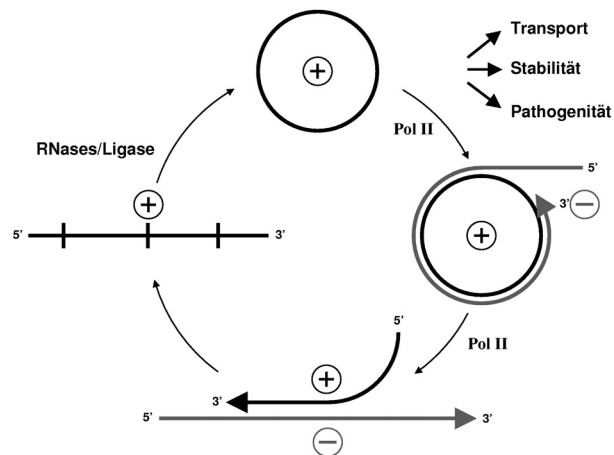


Abbildung 1.1: Replikationsmechanismus der *Pospiviroidae*. Die Replikation der *Pospiviroidae* läuft über einen asymmetrischen „rolling-circle“-Mechanismus ab (Branch & Robertson, 1984) und ist ein Kreislauf funktionaler Strukturen (Riesner *et al.*, 1988). Der zirkuläre (+)-Strang des Viroids wird zu einem oligomeren (–)-Strang transkribiert. Diese lineare (–)-Strang-RNA dient als Template für die Synthese oligomerer PSTVd-(+)-Stränge. Diese werden in exakte Viroid-Volllängen geschnitten und zu neuen Zirkeln ligiert. Die Transkriptionsschritte werden von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II (Pol II) durchgeführt.

1.1.2 Viroid-Klassifizierung

Viroide werden in zwei Familien eingeteilt: Die *Pospiviroidae* und die *Avsunviroidae* (Flores *et al.*, 1998). Zu den *Pospiviroidae* gehören 24 der bekannten 28 Viroide, deren bekanntester Vertreter und Namensgeber das PSTVd ist. Diese Viroid-Familie besitzt eine thermodynamisch stabile, stäbchenförmige Sekundärstruktur und ist durch eine darin enthaltene Zentrale Konservierte Region (CCR) gekennzeichnet (Gross *et al.*, 1978; Keese & Symons, 1985). *Pospiviroidae* sind primär im Nukleolus lokalisiert. Zu den *Avsunviroidae* gehören neben dem Avocado Sun Blotch Viroid (ASBVd), nach dem diese Familie benannt wurde, nur noch das Peach Latent Mosaic Viroid (PLMVd), das Eggplant Latent Viroid (ELVd), sowie das Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid (CChMVd). Viroide dieser Familie sind im Chloroplasten lokalisiert und besitzen eine verzweigte Struktur ohne CCR.

Während ihrer Replikation bilden beide Viroid-Familien oligomere Intermediäre, unterscheiden sich jedoch im Replikationsmechanismus und der Prozessierung der Oligomere. *Pospiviroidae* werden in einem asymmetrischen „rolling-circle“-Mechanismus (siehe 1.1.1) durch die wirtseigene DNA-abhängige RNA-Polymerase II repliziert. Die im Replikationszyklus synthetisierten oligomeren (+)-Stränge werden enzymatisch, d. h. nicht autokatalytisch, zu Zirkeln prozessiert. Bei den *Avsunviroidae* dagegen erfolgt die Replikation in einem symmetrischen „rolling-circle“-Mechanismus. Jeweils ein Hammerhead-Ribozym im (+)- und (–)-Strang übernimmt die Selbstspaltung der oligomeren Replikationsintermediäre zu Monomeren.

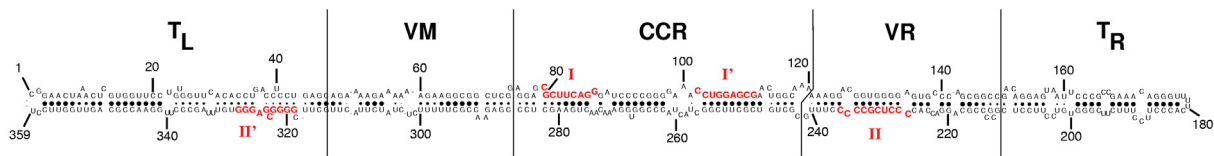


Abbildung 1.2: Konsensussequenz und -struktur des PSTVd mit fünf Domänen. Die native Sekundärstruktur von PSTVd ist stäbchenförmig und ohne Verzweigungen; die gezeigte Struktur entspricht der PSTVd-Variante Di-Intermediate (Gross *et al.*, 1978). Das PSTVd-Stäbchen wird in fünf Domänen unterteilt: T_L: Linke Terminale Region; VM: Virulenzmodulierende Region; CCR: Zentrale Konservierte Region, die in Obere (UCCR) und Untere (LCCR) Zentrale Konservierte Region unterteilt wird; VR: Variable Region und T_R: Rechte Terminale Region (nach Keese & Symons, 1985). Die Stärke der Punkte zwischen den Basen zeigt an, wie wahrscheinlich diese Basenpaarung ist. Die roten Bereiche können die Hairpin-Strukturen I und II in metastabilen Konformationen ausbilden.

1.1.3 Viroid-Struktur

Pospiviroidae besitzen eine hohe Sequenzhomologie und zeigen einheitliche Strukturmerkmale. Durch den hohen Grad an Selbstkomplementarität nimmt die Viroid-RNA im nativen, zirkulären Zustand eine Stäbchenstruktur (Gross *et al.*, 1978; Riesner *et al.*, 1979; Steger *et al.*, 1984) an. Diese charakteristische Sekundärstruktur (siehe Abb. 1.2) entsteht durch intramolekulare Basenpaarungen. Die Stäbchenstruktur besteht aus kurzen Helices und ungepaarten Bereichen, sogenannten Loops. Sowohl die Zirkularität, als auch die hohe Selbstkomplementarität verleihen den Viroiden hohe thermodynamische Stabilität, sowie Resistenz gegen Nukleasen (Domdey *et al.*, 1978; Henco *et al.*, 1979; Sanger *et al.*, 1976; Wild *et al.*, 1980). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Sekundärstruktur weder verzweigt, noch eine übergeordnete Tertiärstruktur ausbildet (zur Übersicht siehe Flores, 2001; Riesner & Gross, 1985).

Wie in Abbildung 1.2 gezeigt ist, ermöglicht ein Sequenzvergleich innerhalb der *Pospiviroidae* eine Einteilung der Stäbchenstruktur in fünf Domänen (Keese & Symons, 1985). Diesen Domänen können auf Grund von Mutationsanalysen unterschiedliche funktionale Bedeutungen zugeordnet werden. Der mittlere Bereich des Stäbchens besitzt die höchste Sequenzkonservierung und wird als Zentrale Konservierte Region (CCR) bezeichnet. Sie wird in die Obere (UCCR) und die Untere Zentrale Konservierte Region (LCCR) unterteilt. In der UCCR liegt die Schnittstelle zur Prozessierung multimerer (+)-Replikations-Zwischenprodukte zu monomeren PSTVd-Molekülen, die dort auch wieder zu Zirkeln ligiert werden (Baumstark *et al.*, 1997). Im rechten Bereich des Stäbchens liegt die Variable Region (VR). Da Mutationen, die die Variable Region stabilisieren, die Replikation verhindern, konnte diesem Bereich eine Funktion in der Viroidreplikation zugeordnet werden (Hu *et al.*, 1996). Auf der linken Seite liegt die Virulenzmodulierende Region (VM-Region), die auch als pathogene Region bezeichnet wird. Die Mehrheit der natürlich auftretenden Mutationen liegt beim PSTVd in dieser Region. Sie zeigt eine direkte Korrelation zwischen hier auftretenden Punktmutationen und der Pathogenität unterschiedlicher PSTVd-Stämme (siehe auch 1.1.5). In der Linken Terminalen Region (T_L) liegt die Startstelle für die Synthese von (–)-Strängen (Kolonko *et al.*, 2006). Mutationen der Rechten Terminalen Region (T_R) dagegen verhindern nicht die Replikation der mutierten Viroide, sondern

die systemische Infektion der Pflanze, also den systemischen Transport. Dem rechten terminalen Loop wird deshalb eine Rolle beim interzellulären Transport des Viroids zugesprochen (Ding *et al.*, 1997; Hammond, 1992, 1994; Owens & Hammond, 1990).

1.1.4 PSTVd

Das Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) ist der Erreger der Kartoffelspindelknollensucht, die schon 1922 von Martin beschrieben wurde. In den 70er Jahren wurde PSTVd erstmals als neue Klasse subviraler Pflanzenpathogene entdeckt (Diener, 1971; Sänger, 1972; Semancik & Weathers, 1972; Singh & Clark, 1971). Jedes Viroid hat ein begrenztes Wirtsspektrum. Bei PSTVd sind es vor allem Nachtschattengewächse, in denen es effektiv vermehrt wird. Nach wenigen Wochen erreicht PSTVd einen endgültigen Titer von ca. 1 ng pro mg Blattmaterial, was etwa 1 ‰ der gesamten Nukleinsäure in einer Pflanze entspricht.

Der durchsequenzierte Organismus *Arabidopsis thaliana* stellt keinen Wirt für PSTVd oder andere Viroide dar, da die enzymatische Maschinerie zwar die Replikation der *Pospiviroidae* unterstützt, die Viroide aber nicht in der Lage sind, sich durch die Pflanze zu verteilen (Dars & Flores, 2004; Matouek *et al.*, 2004). Deshalb muss auf einen schlecht sequenzierten Organismus wie die Tomate zurückgegriffen werden, da sich die Viroide innerhalb dieser Pflanze nicht nur vermehren, sondern auch ausbreiten können (Schmitz & Steger, 2007).

Ist eine Wirtspflanze einmal mit PSTVd infiziert, wird das infektiöse Viroid aktiv vom Zytoplasma in die Kerne transportiert, wobei angenommen wird, dass (+)-PSTVd eine Sequenz oder ein Strukturmotiv beinhalten muss, das es dazu befähigt. Innerhalb weniger Minuten nach der Infektion verbreitet sich das Viroid in die Nachbarzellen über die Plasmodesmata und akkumuliert in den Kernen. Um sich in der ganzen Pflanze zu verbreiten, nutzt das PSTVd den Weg des Photoassimilat-Transports über das Phloem der Pflanze. Hierbei verteilt es sich in der ganzen Pflanze, aber nicht in den Blättern unterhalb der Infektionsstelle (Schmitz & Steger, 2007).

1.1.5 Pathogenese

Viroide infizieren höhere Kulturpflanzen. Mit Ausnahme des Coconut Cadang Cadang Viroids (CCCVd), das die monokotyle Kokospalme als Wirt hat, werden ausschließlich dikotyle Pflanzen wie Tomate, Gurke, Kartoffel, Hopfen, Avocado, Zitrusfrüchte und Chrysanthemen vom Viroid befallen. Das Wirtsspektrum mancher Viroide ist variabel. So ist PSTVd neben der Kartoffel auch in anderen *Solanaceen* wie der Tomate und dem schwarzen Nachtschatten kultivierbar. Die durch das Viroid verursachten Krankheitssymptome reichen von Zwergwuchs, ausgelöst durch Internodienstauchung der Sprossachse, über Blattmissbildungen, Epinastien und Chlorosen bis hin zur Nekrose und zum Absterben der gesamten Pflanze. Die Inkubationszeit nach der Infektion beträgt wenige Wochen bis zu mehreren Jahren (Diener, 1979, 1987; Riesner & Gross, 1985).

Der molekulare pathogene Mechanismus der Viroide ist bis heute unverstanden. Bis vor einigen Jahren war die Hypothese verbreitet, dass mit zunehmender Biegung der VM-Region auch die Pathogenität zunimmt (Owens *et al.*, 1996a; Schmitz & Riesner, 1998). Als Grundlage dazu diente unter anderem der Viroid-Stamm RG1, der in der VM-Region besonders stark gebogen war und, wie zu diesem Zeitpunkt angenommen wurde, auch eine schwere Symptomatik zeigte.

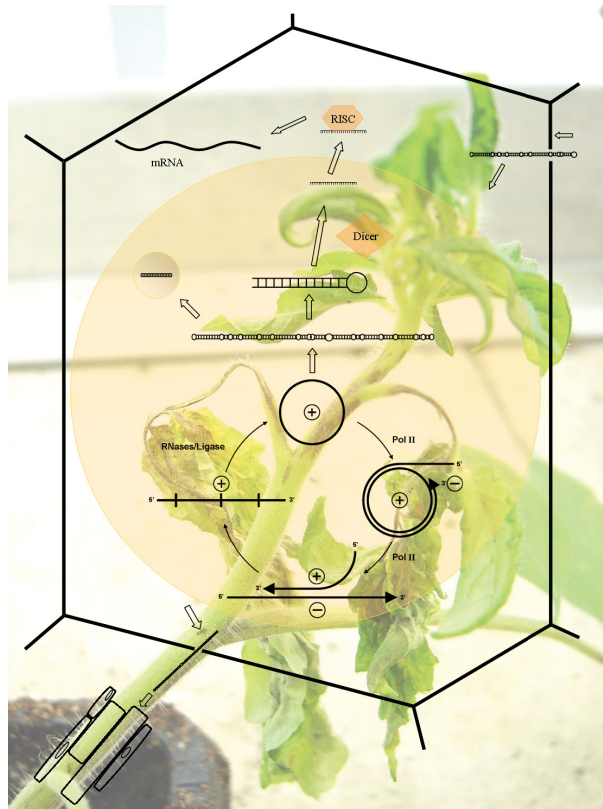


Abbildung 1.3: Pathogenitätsmodell. Diese Abbildung zeigt zwei mögliche Wege des PSTVd nach dem Eindringen in eine Tomatenpflanze. Zum einen ist die Verbreitung durch die Zelle mit Hilfe des sogenannten „cell-to-cell movement“ und dem „long-distance“ Transport gezeigt, zum anderen zeigt es eine mögliche Erklärung der Pathogenität mit Hilfe des RNA-silencing. Im Hintergrund ist eine AS1-infizierte Tomatenpflanze 21 Tage nach Infektion zu sehen. Das Sechseck stellt eine Pflanzenzelle dar. Zur Erklärung siehe Abschnitt 1.1.5.

Außerdem war zum Vergleich noch ein milder Stamm von Bedeutung, der eine gestreckte Konformation besaß. Wie später gezeigt wurde, lag eine andere Sequenz in den Pflanzen vor, die später als AS1 bezeichnet wurde, als die für die Krümmungsstudien verwendete Sequenz. RG1 dagegen zeigt trotz der starken Biegung in der VM-Region nur eine milde Symptomatik. Somit wurde über ein neues Pathogenitätsmodell nachgedacht, das die Ursache der pathogenen Wirkung von Viroid-RNA erklären könnte. Es resultierte ein neues Pathogenitätsmodell mit der Hypothese, dass Viroide „silencing“-RNAs produzieren und über „post-transcriptional gene silencing“ (PTGS) beziehungsweise „RNA-silencing“ in die Genregulation des Wirts eingreifen.

Um eine Übersicht über eine mögliche Verbreitung des PSTVd in der Pflanze zu bekommen und somit eine Vorstellung, wie eine solche Infektion vonstatten gehen könnte, ist in Abbildung 1.3 eine kurze Übersicht gezeigt. Zur systematischen Infektion der Pflanze bewegt sich das PSTVd nach dem Eindringen über die Oberfläche via Plasmodesmata von Zelle zu Zelle. In der Pflanzenzelle wird das PSTVd aktiv vom Zytoplasma in den Zellkern transportiert, wo es überwiegend im Kernplasma lokalisiert ist, in dem auch die PSTVd-Replikation vermutet wird. Ungefähr gleiche Mengen an (+)-PSTVd sind im Kernplasma und den Nukleoli vorhanden, (–)-

PSTVd ist dagegen nur im Nukleoplasma nachweisbar (Qi & Ding, 2003). Nach der Replikation (siehe 1.1.1) können die transkribierten und zirkularisierten (+)-strängigen PSTVd-RNAs zwei Wege gehen. Zur systemischen Infektion muss sich das PSTVd durch die gesamte Pflanze ausbreiten. Das Phänomen des sogenannten „cell-to-cell movement“ (Bewegung von Zelle zu Zelle), so wie das „long-distance movement“ (Bewegung über lange Strecken, durch die gesamte Pflanze) sind gut erforscht. In beiden Fällen muss das PSTVd den Zellkern verlassen. Die Fortbewegung in die benachbarte Zelle erfolgt über Plasmodesmata (Ding *et al.*, 1997). Für die Bewegung über lange Strecken scheint das PSTVd das Phloem zu benutzen (Zhu *et al.*, 2001), das in der Regel für den Transport von pflanzlichen Photoassimilaten benutzt wird. Dabei verbreitet es sich über die Sieb- und Geleitzellen in der Pflanze. Nach dem Eindringen in die nächste Zelle wird das PSTVd aktiv vom Zytoplasma in den Nukleus transportiert (Woo *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2001).

Als zweites wäre ein „RNA-silencing“-Weg möglich (siehe Abschnitt 1.2). Zur Produktion von PSTVd-spezifischen siRNAs, muss das reife PSTVd-Stäbchen oder eines seiner Replikations-Zwischenprodukte beider Polaritäten gespalten werden. Da in PSTVd-infizierten Zellen keine doppelsträngigen RNA-Zwischenprodukte nachweisbar sind, könnte die siRNA-produzierende Maschinerie der Zelle eines der PSTVd-Moleküle als miRNA-Vorläufer (pri- oder pre-microRNA) benutzen und dieses mit Hilfe des Dicer in kleine RNAs spalten. Die stäbchenähnliche Struktur, die das PSTVd annimmt, könnte dafür die Basis sein. Nachdem diese in das Zytoplasma exportiert wurden, könnten die kurzen RNAs an einen RNA-induzierenden silencing-Komplex (RISC) gebunden und zu einer mRNA geführt werden. Abhängig davon, ob die kurze RNA nahezu perfekt oder nur in einigen Bereichen komplementär zur mRNA ist, wird die mRNA gespalten oder ihre Translation gehemmt.

1.2. RNA-silencing (im Allgemeinen und Speziellen)

„RNA interference“ (RNAi) bei Tieren, „quelling“ bei Pilzen und „post-transcriptional gene silencing“ (PTGS) bei Pflanzen sind Beispiele für eine breite Familie von Phänomenen, die alle zusammen als „RNA-silencing“ bezeichnet werden (Hannon, 2002; Klahre *et al.*, 2002; Li & Ding, 2001; Matzke *et al.*, 2001; Plasterk, 2002; Vaucheret *et al.*, 2001; Waterhouse *et al.*, 2001). Die gemeinsamen Merkmale des „RNA-silencing“-Phänomens sind kleine RNAs von 21 bis 26 Nukleotiden Länge, die als spezifische Determinante zur Abschwächung der Genexpression wirken (Djikeng *et al.*, 2001; Hamilton & Baulcombe, 1999; Hammond *et al.*, 2000; Parrish & Fire, 2001; Parrish *et al.*, 2000; Tijsterman *et al.*, 2002; Zamore *et al.*, 2000) und der Bedarf an einem oder mehreren Proteinen der Argonauten-Familie (Fagard *et al.*, 2000; Hammond *et al.*, 2001; Hutvagner & Zamore, 2002; Kennerdell *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2002; Pal-Bhadra *et al.*, 2002; Tabara *et al.*, 1999; Williams & Rubin, 2002).

„RNA-silencing“-Phänomene wurden das erste Mal in Pflanzen entdeckt, aber dennoch nur das RNA-interfering in Tieren zum Gegenstand von biochemischen Analysen gemacht. Tang *et al.* (2003) erweiterten die biochemische Analyse von pflanzlichem „RNA-silencing“. Sie zeigten, dass Weizenkeimextrakt Dicer-ähnliche Enzyme enthält, die doppelsträngige RNA (dsRNA) in zwei Klassen von „small interfering“-RNAs (siRNAs) umwandeln (Tang *et al.*, 2003).

Kleine RNAs werden in zwei Kategorien eingeteilt, wobei sie nicht nach ihrem Weg, sondern nach ihrer Biogenese unterschieden werden. miRNAs stammen von langen, einzelsträngigen RNAs ab, die die Fähigkeit haben, unvollkommene, doppelsträngige RNAs zu bilden, die darauf folgend durch RNase III-Proteine der Droscha/Dicer-Familie prozessiert werden. siRNAs dagegen werden durch Mitglieder der Dicer-Familie aus langen perfekten doppelsträngigen RNAs prozessiert, die aus der Transkription von inverted-repeat-Sequenzen, konvergenten Transkriptionen von sense-antisense Genpaaren oder Synthesen von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen (RdRP) stammen (Ambros, 2004; Bartel, 2004; Du & Zamore, 2005; Kim, 2005; Mallory & Vaucheret, 2006). In Pflanzen ist die Anzahl an bekannten miRNAs und ihren Ziel-RNAs geringer als in Tieren (Jones-Rhoades *et al.*, 2006; Mallory & Vaucheret, 2006).

1.2.1 „Silencing“-Mechanismen

Es sind drei verschiedene „silencing“-Mechanismen bekannt, die in Abbildung 1.4 gezeigt werden. Diese haben gemeinsam, dass aus einer dsRNA mit Hilfe eines sogenannten Dicer-Proteins eine kurze RNA geschnitten wird. Diese kurze RNA wird auf unterschiedliche Arten an eine Ziel-RNA oder -DNA angelagert und führt dadurch zum „silencing“. Zwei Mechanismen haben als Ziel eine RNA (Abb. 1.4 A und B), einer ist DNA-spezifisch (Abb. 1.4 C).

Bei dem siRNA-Mechanismus (1.4 A), der auch als zytoplasmatisches siRNA-„silencing“ (Hamilton & Baulcombe, 1999) beschrieben wurde, wird eine lange doppelsträngige RNA durch einen Dicer in siRNAs gespalten. Diese Reaktion ist ATP-abhängig. Anschließend werden die siRNAs in den „RNA-induced silencing complex“ (RISC) eingebaut und entwunden. Die Aufnahme der siRNA durch den RISC benötigt zwar kein ATP, dafür aber die Entwindung des siRNA-Duplex. Einmal entwunden führt der Einzelstrang den RISC zu einer mRNA mit komplementärer Sequenz. Der siRNA-Einzelstrang lagert sich zusammen mit dem RISC an die mRNA, woraus eine endonucleolytische Spaltung der Ziel-mRNA resultiert (Dykxhoorn *et al.*, 2003). Dieser Weg kann in Virus-infizierten Pflanzen wichtig sein, wo die dsRNA ein Replikations-Intermediat oder ein Sekundärstruktur-Merkmal einzelsträngiger Virus-RNA darstellen könnte (Baulcombe, 2004).

Der zweite RNA-abhängige Mechanismus ist in Abbildung 1.4 B abgebildet und zeigt „silencing“ von endogener messenger RNA (mRNA) durch miRNAs. Obwohl der Dicer aufgrund seiner Fähigkeit gefunden wurde, lange RNAs in kurze RNAs zu prozessieren, zeigte sich, dass er auch in der Lage ist, Hairpin-Precursor, also miRNA-Vorläufer zu spalten, woraus miRNAs resultieren. Im Gegensatz zu siRNAs sind miRNAs einzelsträngig und werden mit einem miRNA-Protein-Komplex (miRNP) gebunden (McManus & Sharp, 2002; Zamore, 2002). Anschließend erfolgt eine miRNA-vermittelte Zielerkennung und die miRNA lagert sich nur teilweise komplementär an die mRNA an. Dadurch wird die Translation gehemmt (Dykxhoorn *et al.*, 2003).

Doppelsträngige RNA induziert und lenkt nicht nur sequenzspezifische RNA-Degradation, sondern ebenfalls sequenzspezifische DNA-Methylierung (Dykxhoorn *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 1998; Mette *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Der einzige DNA-abhängige Mechanismus ist das in Abbildung 1.4 C gezeigte „RNA-silencing“ in Pflanzen, das mit DNA-Methylierung und Unterdrückung der Transkription verbunden ist. Der Dicer schneidet aus einem Hairpin oder einer dsRNA einen Teil des Doppelstrangs heraus, wodurch eine siRNA resultiert. Die siRNA wird entwunden und wahrscheinlich zusammen mit Methylase in den Kern transportiert. Diese Komplexe

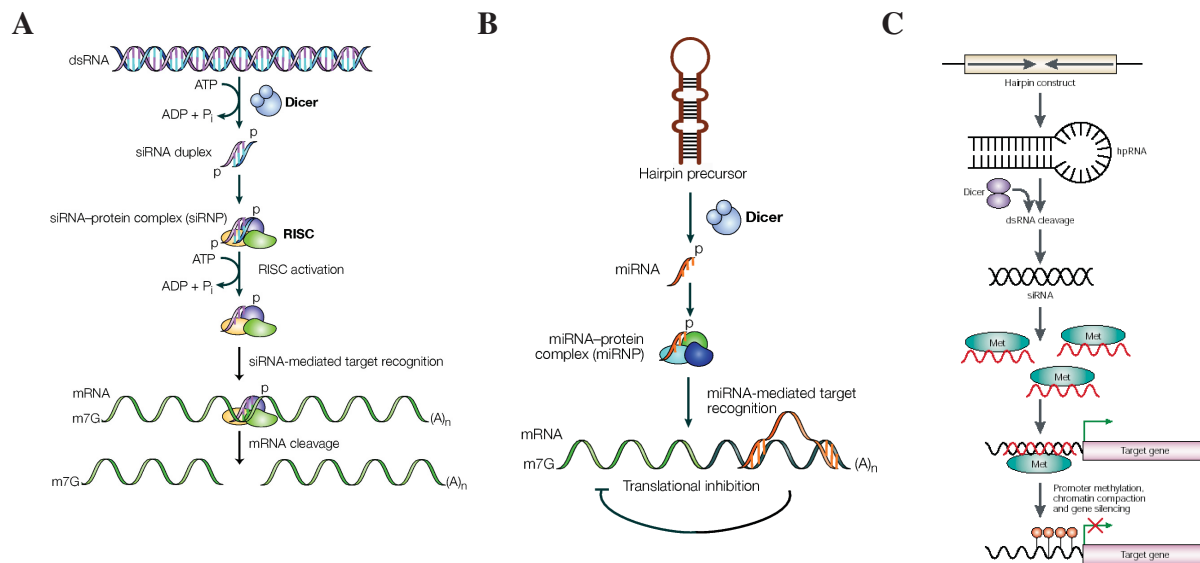


Abbildung 1.4: Drei „silencing“-Mechanismen. Alle drei RNA „silencing“-Mechanismen für „silencing“-spezifische Gene beinhalten die Spaltung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in kurze, 21–26 Nukleotid lange RNAs. Dies geschieht durch ein Dicer-Enzym, das RNaseIII-Domänen besitzt. (A) siRNA-Mechanismus: Dabei wird aus einer langen doppelsträngigen RNA mit Hilfe des Dicer eine siRNA ausgeschnitten und diese vom RISC aufgenommen. Die nun einzelsträngige siRNA lagert sich nahezu komplementär an eine mRNA und spaltet diese. (B) miRNA-Mechanismus: Hierbei wird die einzelsträngige miRNA mit Hilfe des Dicer aus einem Hairpin-Precursor geschnitten und mit dem miRNP verbunden. Sie ist in der Lage teil-komplementär an die Ziel-mRNA zu binden und hemmt dadurch die Translation. (C) DNA-Methylierungs-Mechanismus: Der Dicer schneidet aus der Hairpin-RNA eine dsRNA. Diese siRNA wird entwunden und es entstehen Einzelstränge, die wahrscheinlich zusammen mit Methylase in den Kern transportiert werden. Diese Komplexe lagern sich an die Ziel-DNA, wodurch das Gen nicht mehr abgelesen werden kann und die Transkription gehemmt wird. Abbildung A und B wurden von Dykxhoorn *et al.* (2003) übernommen, Abbildung C stammt aus Waterhouse & Helliwell (2003).

lagern sich an die Ziel-DNA an, was eine gesteigerte Methylierung der Cytosin-Reste (in der Abbildung als rote Kreise dargestellt) zur Folge hat. Durch die Methylierung des Promotors wird eine Änderung der lokalen Chromatin-Konformation, eine Chromatin-Kompensation bewirkt, was durch Verlust der Transkription in „gene silencing“ endet (Waterhouse & Helliwell, 2003). Der erste Beweis für diese Art von „silencing“ war die Entdeckung in Pflanzen, dass Transgene und Virus-RNA DNA-Methylierung (Jones *et al.*, 2001; Mette *et al.*, 2000; Wassenegger *et al.*, 1994) von spezifischen Nukleotidsequenzen steuern. Diese Erkenntnisse wurden durch Beobachtungen ausgedehnt, dass siRNA-gesteuerte DNA-Methylierung in Pflanzen mit Histon-Modifikation (Zilberman *et al.*, 2003) verbunden ist und dass in Spaltheife Hetero-Chromatin-Bildungen an Zentromer-Begrenzungen mit siRNAs assoziiert sind (Volpe *et al.*, 2002). Eine wichtige Rolle des RNA-„silencing“ auf der Chromatin-Ebene ist vermutlich das Genom gegen, durch Transposons verursachte, Beschädigungen zu beschützen (Baulcombe, 2004).

Es ist wahrscheinlich, dass diese drei „RNA-silencing“-Wege einen gemeinsamen evolutionären Ursprung besitzen, da es Beispiele für jeden Typ in Tieren, Pilzen und Pflanzen gibt. Grüne Pflanzen sind allerdings außergewöhnlich dabei. Sie haben die Kapazität für alle drei „silencing“-

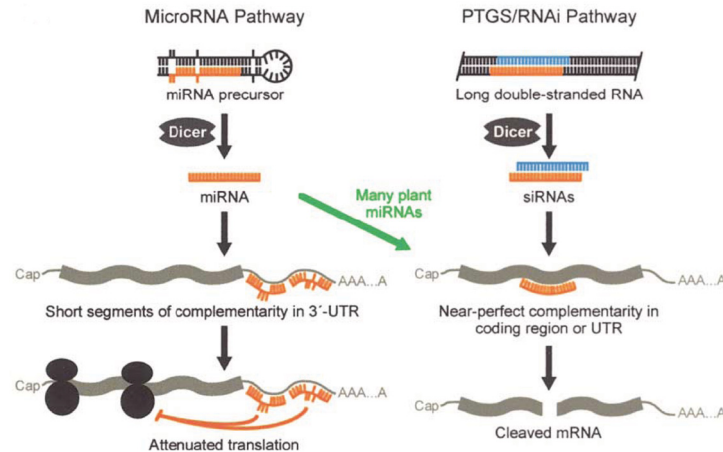


Abbildung 1.5: Modell für die Biogenese und Wirkung von miRNAs in Pflanzen. Obwohl pflanzliche miRNAs allem Anschein nach über den klassischen miRNA-Weg erzeugt werden (Reinhart *et al.*, 2002), wird vermutet, dass viele als klassische siRNAs handeln und mit nahezu perfekter Komplementarität an ihre Ziel-mRNAs binden, um die mRNA-Spaltung zu spezifizieren. (Abbildung übernommen von Rhoades *et al.*, 2002)

Typen bewahrt, wohingegen andere Organismen einen oder mehrere dieser Wege verloren haben (Baulcombe, 2004).

1.2.2 miRNAs in Pflanzen

Der übliche Wirkmechanismus für miRNAs ist die Protein-unterstützte Hybridisierung über partielle Komplementarität im 3'-UTR-Bereich von mRNAs, der zu verminderter Translation führt (Abb. 1.5 - linker Teil). Die Wirkung von siRNAs basiert auf einer nahezu perfekten Komplementarität zu einer RNA, was zu Spaltung und Abbau der RNA führt (Abb. 1.5 - rechter Teil). Obwohl pflanzliche miRNAs auf dem üblichen, genetisch kodierten Weg generiert werden, haben viele von ihnen siRNA-Wirkung (Rhoades *et al.*, 2002).

Durch Dicer-Spaltung werden miRNAs von stem-loop-Vorläufer-RNA-Transkripten (pre-miRNAs) produziert. Die miRNA kann sowohl auf der 5'-, als auch auf der 3'-Seite des doppelsträngigen Stammes angesiedelt sein (Lagos-Quintana *et al.*, 2002; Lau *et al.*, 2001; Lee & Ambros, 2001; Lee *et al.*, 1993; Pasquinelli *et al.*, 2000). Tierische miRNAs sind nur teilweise komplementär zu ihren Ziel-mRNAs (Hutvagner & Zamore, 2002; Ruvkun, 2001). Pflanzliche miRNAs besitzen eine weitaus höhere Komplementarität zur zellulären mRNA und vermitteln die Spaltung der Ziel-RNA über einen RNAi-ähnlichen Mechanismus (Llave *et al.*, 2002b; Rhoades *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2003).

Ein wichtiger Unterschied ist, dass pflanzliche miRNAs perfekter an die Ziel-RNA gepaart sind und die RNA-Spaltung im primären „silencing“-Mechanismus mehr als Translations-Hemmung nutzen (Jones-Rhoades & Bartel, 2004; Llave *et al.*, 2002a; Rhoades *et al.*, 2002). Die tierische miRNA zielt normalerweise auf die 3'-UTR (untranslatierte Region) der mRNA ab, während die pflanzlichen miRNAs auf die kodierende Sequenz oder sogar auf die 5'-UTR abzielen (Baulcombe, 2004; Sunkar & Zhu, 2004).

1.2.3 „small RNA“-Klassen und ihre Funktion

Die folgende Zusammenstellung wurde aus den Veröffentlichungen von Chapman & Carrington (2007)¹, Tolia & Joshua-Tor (2007)², Mattick & Makunin (2006)³ und Hutvágner & Simard (2008)⁴ zusammengestellt.

miRNAs = micro RNAs

miRNAs sind „non-coding RNAs“ mit einer Länge von 21–26 Nukleotiden. Sie werden aus einem endogenen Hairpin-RNA Vorläufer, bestehend aus ~70-Nukleotiden bei Tieren und durchschnittlich 170 Nukleotiden bei Pflanzen, prozessiert. Dies geschieht durch ein Dicer-Enzym der RNase III-Familie. miRNAs sind evolutionär konservierte Moleküle, denen wichtige Funktionen in verschiedenen biologischen Mechanismen zugeschrieben werden⁴.

siRNAs = small interfering RNAs

siRNAs sind kleine RNAs von ~22 Nukleotiden Länge und werden aus langen, doppelsträngigen RNAs während des RNAi prozessiert⁴. Diese kleinen RNAs neigen dazu, perfekt komplementär zu ihrer Ziel-mRNA zu sein und resultieren in mRNA-Abbau².

Sie werden in primäre siRNAs und sekundäre siRNAs (sec siRNAs) unterschieden. Primäre siRNAs werden aus dsRNA oder rückgefalteter RNA durch Mitglieder der Dicer-Familie hergestellt. Ihre primäre Funktion liegt in der komplementären Bindung zur Ziel-RNA. Sekundär führen sie zur Aktivierung der RdRP-abhängigen sekundären siRNA-Synthese. Sekundäre siRNAs besitzen in *C. elegans* eine RdRP-Aktivität bei stillgelegten Loci. In *A. thaliana* werden von RdRP-stammende, lange, doppelsträngige RNAs oder zurückgefaltete RNAs durch Mitglieder der Dicer-Familie prozessiert. Ihre Funktion ist die post-transkriptionelle Regulation von Transkripten, sowie der Ausbildung und Erhaltung des Heterochromatin¹.

natsiRNAs = natural antisense transcript-derived siRNAs

natsi RNAs sind Dicer-prozessierte doppelsträngige RNAs, die sich aus Paaren von sense- und antisense-Transkripten ergeben. Sie fungieren in der post-transkriptionellen Regulation von Genen und sind an der Erreger-Abwehr und den Stressantworten in Pflanzen beteiligt¹.

rasiRNAs = repeat-associated small interfering RNAs

rasiRNAs stammen von hoch repetitiven genomischen Loci. Sie sind am Heterochromatin-silencing in Hefe und Pflanzen beteiligt, sowie sternförmigem „silencing“ in *D. melanogaster*. Metazoen-rasiRNAs haben Ähnlichkeiten zu piRNAs, weil die Prozessierung beider Klassen von kleinen RNAs unabhängig von Dicer und Drosha ist⁴.

tasiRNAs = *Trans*-acting siRNAs

tasi RNAs sind pflanzenspezifische kleine RNAs, deren Reifung miRNAs einschließt. Ein Argonauten-miRNA-Komplex spaltet das einzelsträngige primäre Transkript, das zusätzlich durch RNA-abhängige RNA-Polymerase amplifiziert wird, gefolgt von einer Dicer-vermittelten Prozessierung der *de-novo*-dsRNA-Moleküle. Die erzeugten siRNAs

werden dann in Argonauten-Komplexe eingebunden und regulieren durch die Spaltung der Ziel-RNA die Genexpression⁴. Somit sind sie für die post-transkriptionelle Regulation von Transkripten zuständig¹.

piRNAs = PIWI-interacting RNAs

Kleine, ~31-Nukleotid-lange RNAs, die in einer Dicer- und Drosha-unabhängigen Weise prozessiert werden. Sie schließen sich mit Piwi-Proteinen zusammen und spielen eine Rolle beim Transposon-silencing in Fliegen. In Säugetieren beschränken sie sich meist auf männliche Keimzellen⁴.

snRNAs = small nuclear RNAs

snRNAs sind nicht-kodierende RNAs, die am Splicing beteiligt sind³.

snoRNAs = small nucleolar RNAs

snoRNAs sind nicht-kodierende RNAs, die an der Modifikation von rRNAs beteiligt sind³.

„Short interfering“- bzw. „silencing“-RNAs (siRNAs) werden durch den Dicer aus langen doppelsträngigen RNAs hergestellt, sind selber doppelsträngig und haben eine Länge von ~ 21 Nukleotiden. Sie werden in den RISC eingebaut und dort durch die Aktivierung des RISC entwunden. Die nun einzelsträngige siRNA vermittelt die Zielerkennung und führt den RISC zu einer komplementären mRNA, an die sich die siRNA nahezu komplementär anlagert. Dadurch kommt es zur Spaltung der mRNA.

Die microRNAs (miRNAs) haben als Vorläufer eine Hairpin-Struktur (pre-miRNA), die genomisch kodiert ist. Aus dieser schneiden die Dicer miRNAs, die im Gegensatz zu den siRNAs einzelsträngig vorliegen. Die miRNA wird an einen RISC-ähnlichen Komplex gebunden, dem miRNA-Protein-Komplex (miRNP), und vermittelt ihm die Zielerkennung. Die miRNAs lagern sich nur teilkomplementär an die mRNA an, wodurch es zu einer translationalen Hemmung und nicht zu einer Spaltung der mRNA kommt (Baulcombe, 2004; Dykxhoorn *et al.*, 2003). Pflanzliche miRNAs haben allerdings oft signifikante Komplementaritäten zu mRNAs (Rhoades *et al.*, 2002), sodass sowohl Hemmung als auch Spaltung auftreten können.

Die Genexpression wird von si- und miRNAs auf der posttranskriptionalen Ebene beeinflusst. In Pflanzen sind verschiedene Dicer-ähnliche (Dicer-like = DCL) Enzyme für die Abspaltung dieser kleinen regulatorischen RNAs von unterschiedlichen Vorläufermolekülen verantwortlich (Denti *et al.*, 2004).

1.2.4 P-bodies

„Cytoplasmic processing bodies“ (P-bodies) wurden erst durch Immunfärbung mit GW128-Antikörpern (GW128 = charakteristisches Protein für P-bodies) entdeckt. P-bodies stellen wahrscheinlich Protein-RNA-Aggregate dar, die RNAs durch Deadenylierung und „decapping“ abbauen. Sie bringen außerdem Argonauten-gebundene miRNAs und von miRNA adressierte RNAs unter. Zytoplasmatische Bodies entstehen nicht ohne miRNAs, dennoch hat eine Störung der P-bodies keinen Einfluss auf die miRNA-vermittelte Genregulation (Hutvagner & Simard, 2008).

1.2.5 RLC und RISC

Der „RNA-induced silencing-complex“ (RISC) ist ein RNA-Protein-Komplex, der auf eine mRNA abzielt, die perfekt- oder teil-komplementär ist, um diese zu spalten oder ihre Translation zu hemmen. Bei siRNAs kommt es zu einem siRISC, bei miRNAs zu einem miRISC. Beide können in zwei Typen, spaltend und nicht-spaltend, unterteilt werden. Wissenschaftliche Arbeiten zeigen, dass der Typ des AGO-Proteins, das ein wichtiger RISC-Bestandteil ist, bestimmt, ob ein RISC spaltend oder nicht-spaltend ist. Die auf einem spaltenden RISC lokalisierte Endonuklease wird auch Slicer genannt (Tang, 2005).

Die Bildung des RISC muss zuerst durch den sogenannten „RISC loading complex“ (RLC) ausgelöst werden. Der RLC fixiert einen kleinen RNA-Duplex in exakter Orientierung für den folgenden RISC-Aufbau. Bisher wurden nur siRISC-loading-Komplexe (siRLCs) bei *Drosophila* erforscht und noch keine miRISC-loading-Komplexe (miRLCs), da die Biogenese von miRNAs komplexer ist und noch kein *in-vitro*-System etabliert wurde (Tang, 2005).

Der RISC wird durch kleine RNAs, die mit einem Argonauten-Protein verbunden sind, aktiviert. Er ist eine Effektor-Nuklease und benutzt entwundene siRNA als Wegweiser zur Substratselektion. Der RISC reguliert die Genexpression, die durch die Sequenz-Komplementarität zwischen der kurzen RNA und der Ziel-mRNA vermittelt wird (Hutvágner & Simard, 2008). Er wurde ursprünglich aus *Drosophila*-Extrakt isoliert (Hannon, 2002). In *Drosophila* und Säugetieren bilden siRNAs zusammen mit einem oder mehreren Argonauten-Proteinen den sogenannten RISC, der die Spaltung der Ziel-RNAs bei Sequenzen mit beträchtlicher Komplementarität zur siRNA vermittelt (Elbashir *et al.*, 2001a,b,c; Hammond *et al.*, 2000, 2001; Hutvágner & Zamore, 2002; Martinez *et al.*, 2002; Nykänen *et al.*, 2001a; Zamore *et al.*, 2000).

Es wurden zwei Klassen von kleinen RNA-Molekülen, siRNAs und miRNAs, als sequenzspezifische posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression identifiziert. Sie werden in verwandte RISCs, siRISC und miRISC, eingebaut. Sie scheinen funktionell austauschbar zu sein und, abhängig vom Bereich der Sequenz-Komplementarität zwischen der kleinen RNA und ihrer Ziel-RNA, spezifische mRNAs zu spalten oder deren Translation zu hemmen. Beide RISCs sind selbstständige Komplexe, die die mRNA-Stabilität und -Translation regulieren. Dieser Zusammenbau der RISCs kann von der Biogenese der kleinen RNA-Moleküle und die Verstärkung dieser RNAs durch den RLC, zum Übergang vom RLC in den aktiven RISC verfolgt werden. Die Ziel-Erkennung durch den RISC kann auf sich gegenseitig beeinflussende Weisen stattfinden (Tang, 2005).

1.2.6 Dicer, Drosha und Pasha

Der Dicer ist eine Ribonuklease der RNase III-Familie. Dieses Enzym spaltet „precursor miRNAs“ (pre-miRNA) und doppelsträngige RNA-Moleküle in 21–26 Nukleotid-lange, doppelsträngige RNAs mit einem 2-Nukleotid-3'-Überhang (Dykxhoorn *et al.*, 2003; Hutvágner & Simard, 2008).

Neben dem Dicer gibt es einen weiteren Vertreter, der RNAs mit markanten Doppelstrang-Merkmalen prozessiert: Drosha ist ein RNase III-Enzym, das an der Reifung (Processing) von neu transkribierten primär-miRNAs (pri-miRNAs) im Nukleolus beteiligt ist (Hutvágner &

Simard, 2008). Von Zeng & Cullen (2005) wurde gezeigt, dass keine freien RNA-Enden für die Spaltung durch Drosha erforderlich sind. Drosha spaltet zirkuläre RNA effizient und erzeugt pre-miRNAs, sowie einfache, erwartete Nebenprodukte. Folglich sind für Drosha keine freien Enden zur Herstellung von pri-miRNA-Hairpins *in-vitro* erforderlich. Außerdem bestimmt die Drosha-Spaltung die 5'- und 3'-Enden des Dicer-Substrats (pre-miRNA) (Hutvágner & Simard, 2008).

Drosha wiederum bildet mit einem Partner-Protein einen Komplex, der die Spaltung von langen pri-miRNA-Transkripten katalysiert. Der Partner von Drosha heißt Pasha und besitzt eine Bindedomäne für doppelsträngige RNAs. Drosha und Pasha sind die Schlüsselbestandteile vom Microprozessor und sind in *C. elegans*, *Drosophila* und Menschen, aber nicht in Pflanzen enthalten, was nahe legt, dass die miRNA-Biogenese in verschiedenen Typen von Organismen abweicht.

Pri-miRNAs sind genomisch kodiert und werden von der Polymerase II transkribiert. Sie können mehrfach hintereinander auftreten und mehrere 100 bis mehrere 1000 Nukleotide lang sein. Durch die Spaltung werden ~70 Nukleotid lange Hairpin-RNAs bei Tieren produziert, die als pre-miRNAs bezeichnet werden (Denli *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2003). In pflanzlichen Zellen variiert ihre Länge zwischen 70 und 690 Nukleotiden, wobei die durchschnittliche Länge bei 170 Nukleotiden liegt. Durch den Dicer werden die pre-miRNAs weiter in ~21-Nt lange miRNAs gespalten, die die post-transkriptionelle Genexpression regulieren (Bartel, 2004; Zeng & Cullen, 2005).

In der Pflanze (gezeigt an *Arabidopsis*) scheinen drei Faktoren eine Rolle in der Biogenese von miRNAs zu spielen (Park *et al.*, 2002; Tang, 2005; Vazquez *et al.*, 2004).

DCL1 = „Dicer-like protein 1“; dieses Enzym produziert miRNAs, die auf Regulation endogener mRNAs abzielen. Es ist möglich, dass es mit HYL1 und HEN1 interagiert, um den pflanzlichen miRNA-Weg auszulösen.

HEN1 = ein neues, nicht charakterisiertes Protein, das im Zusammenhang mit der Biogenese der pflanzlichen miRNAs steht.

HYL1 = „hyponastic leaves 1“; Kern-dsRNA-Bindungsprotein, das im Zusammenhang mit der Biogenese der pflanzlichen miRNAs steht.

In diversen Veröffentlichungen wurde schon früher vermutet, dass diese drei Faktoren interagieren, um den pflanzlichen miRNA-Weg auszulösen. Ein Knock-out der Gene, die diese Proteine kodieren, führte z. B. zu einer Reduzierung der reifen miRNAs in *Arabidopsis* und einer Ansammlung ihrer korrespondierenden Ziel-mRNAs (Park *et al.*, 2002; Reinhart *et al.*, 2002; Tang, 2005; Vazquez *et al.*, 2004).

Die Prozessierung von miRNAs ist noch nicht in allen Einzelheiten verstanden, aber die Spaltung der pri-mRNAs zu den reifen miRNAs scheint im Zellkern durch DCL1 und HYL1 ausgeführt zu werden. 2007 zeigten Song *et al.* in *Arabidopsis*, dass die primären miRNA-Transkripte von DCL1 und HYL1 prozessiert werden. DCL1 besitzt eine RNase III-Domäne, kann die doppelsträngigen RNAs erkennen und schneidet die pre-miRNA aus dem pri-miRNA-Transkript heraus.

Die dabei entstehende pre-miRNA besitzt eine „stem-loop“-Struktur und einen 2-Nukleotid-3'-Überhang. HYL1, das zwei RNA-Bindedomänen besitzt, ist ebenfalls an diesem Vorgang beteiligt. Es erkennt ebenfalls spezifisch doppelsträngige RNAs und bindet sie. Bei der darauf folgenden Prozessierung der pre-miRNA zur reifen miRNA sind wiederum DCL1 und HYL1 beteiligt. Dabei wird ein miRNA-Duplex ausgeschnitten, der aus der reifen miRNA und ihrem komplementärem Strang (miRNA/miRNA*) besteht. Durch die Methylase HEN1 wird in Pflanzen eine Methyl-Gruppe an der Ribose des 3'-terminalen Nukleotids der miRNAs synthetisiert. Diese 2'-O-Methylierung des 3'-Endes schützt vor Degradation durch Exonukleasen (Song *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2005).

1.2.7 Argonauten

Um ihre biologische Funktion zu erfüllen, brauchen kleine RNAs eine eigene Klasse von Proteinen: die Argonauten. Dies ist eine, erst in den letzten Jahren entdeckte, Proteinfamilie, die in das „RNA-silencing“ verwickelt ist (Hutvagner & Simard, 2008). Argonauten sind ein wichtiger Bestandteil aller RNAi-Effektor-Komplexe (Tolia & Joshua-Tor, 2007) und sind aus vier einzelnen Domänen zusammengesetzt: der N-terminalen-, PAZ-, Mid- und PIWI-Domäne (Hutvagner & Simard, 2008). Mit ihrer funktionellen Domäne können Argonauten-Proteine kleine nicht-codierende RNAs binden und die Proteinsynthese kontrollieren, Wirkung auf die mRNA-Stabilität haben und sogar an der Herstellung einer neuen Klasse von kleinen RNAs, den „Piwi-interacting RNAs“, mitwirken. Ursprünglich wurden Argonauten-Proteine als wichtig für die Pflanzen-Entwicklung (Bohmert *et al.*, 1998; Moussian *et al.*, 1998), sowie die Stammzell-Teilung der Keimbahn in *Drosophila melanogaster* (Lin & Spradling, 1997) beschrieben (Hutvagner & Simard, 2008).

Argonauten-Proteine werden in drei Klassen unterteilt (Hutvagner & Simard, 2008):

- „Argonaute-like proteins“, die AGO1 in *Arabidopsis thaliana* entsprechen
- „Piwi-like proteins“; sind nahe verwandt mit PIWI (P-element induced wimpy testis) aus *Drosophila melanogaster*
- „group 3 Argonaute“; kürzlich gefundene *Caenorhabditis elegans*-spezifische Gruppe (Yigit *et al.*, 2006)

Argonaute-like und PIWI-like Proteine sind in Bakterien, Archaeen und Eukaryoten vorhanden, was bedeutet, dass beide Proteingruppen einen alten Ursprung haben (Cerutti & Casas-Mollano, 2006). Die Anzahl der Argonautengene, die in unterschiedlichen Spezien vorkommen, variiert. Es gibt 8 Argonauten-Gene im Menschen (4× Argonaute-like, 4× Piwi-like), 5 im *Drosophila melanogaster*-Genom (2× Argonaute-like, 3× Piwi-like), 10 Argonaute-like in *Arabidopsis thaliana*, nur 1 Argonaute-like in *Schizosaccharomyces pombe* und mindestens 26 Argonauten-Gene in *C. elegans* (5× Argonaute-like, 3× Piwi-like und 18× group 3 Argonautes). Pflanzen kodieren z. B. nur die Argonauten-ähnlichen, paralogen Gene, andere dafür nur die Piwi-ähnlichen Argonauten (Hutvagner & Simard, 2008).

Nicht alle bekannten Genregulationen, die durch kurze RNAs vermittelt werden, brauchen die katalytische Aktivität von Argonauten-Proteinen. Im Unterschied zu pflanzlichen miRNAs beinhalten die meisten miRNA-vermittelten Gen-Repressionen in Tieren keine sequenzspezifische

Spaltung (genannt „slicing“-Aktivität), selbst wenn die miRNAs in Argonauten eingebunden sind, die eine katalytische Aktivität enthalten (slicing-kompetente Argonauten). miRNAs sind nur begrenzt komplementär zu ihren Ziel-RNAs, was ungenügend für eine sequenzspezifische Spaltung ist. Argonauten-Proteine sind in verschiedene Schritte der Reifung von kleinen RNAs, sowie der durch kleine RNAs vermittelten Gen-Repression, die wahrscheinlich Interaktionen mit diversen Protein-Komplexen erfordern, beteiligt. Es ist bekannt, dass Argonauten direkt an andere Proteine binden können. Sowohl die Dicer-, als auch die Argonauten-Proteine nehmen an der Auswahl des aktiven Strangs der si- und miRNAs teil. Die Prozessierung und das Beladen von regulatorischen kleinen RNAs auf verschiedene Argonauten-Proteine unterscheidet sich zwischen den Spezies. Bei der Pflanze *A. thaliana* sind z. B. verschiedene Dicer und Argonauten-Proteine für die Prozessierung und Bindung einzelner kleiner RNA-Spezies wie miRNAs, tasiRNAs und rasiRNAs, verantwortlich (Hutvágner & Simard, 2008).

1.2.7.1 Die PAZ-Domäne

Die PAZ-Domäne ist eine konservierte Nukleinsäure-Bindestruktur, die in den Gruppen der Dicer- und Argonauten-Protein-Familien gefunden wurde. Beide Familien spielen eine Schlüsselrolle im RNAi-Mechanismus. Die PAZ-Domäne besteht aus zwei Untereinheiten, eine davon zeigt eine OB-ähnliche Faltung (Oligonukleotid/Oligosaccharid-Bindung), was zeigt, dass das PAZ-Motiv einzelsträngige Nukleinsäuren binden könnte (Lingel *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2003). Kristallographische Studien kombiniert mit biochemischen Betrachtungen zeigten, dass die PAZ-Domäne, mit geringer Affinität in einer Sequenz-unabhängigen Weise, an einzelsträngige RNA bindet. Bemerkenswert ist, dass die PAZ-Domäne das 3'-Ende von ssRNAs erkennen kann. Sowohl miRNAs als auch verschiedene siRNAs werden durch die folgende Wirkung von RNase III-Enzymen (Drosha und Dicer bei Tieren, nur Dicer in Hefe und Pflanzen) in den richtigen Zustand gebracht, die in charakteristischer Weise einen 2-Nukleotid-3'-Überhang an den fertigen Produkten hinterlässt. Durch Bindung an diesen charakteristischen 2-Nukleotid-3'-Überhang kann die PAZ-Domäne am Anfang diese kleinen regulatorischen RNAs von degradierten RNAs unterscheiden, die nicht von verwandten Wegen stammen (Hutvágner & Simard, 2008).

1.2.7.2 Die PIWI-Domäne

Die PIWI-Domäne ist eine konservierte Struktur, die bei Mitgliedern der Argonauten-Protein-Familie gefunden wurde. Sie ist strukturell ähnlich zu Ribonuklease H-Domänen und hat zumindest in einigen Fällen eine Endoribonuklease-Aktivität. Ihre Spaltungsprodukte enthalten ein 3'-OH und ein 5'-Phosphat, was charakteristische Merkmale für RNase H-ähnliche Prozessierungen sind (Hutvágner & Simard, 2008).

Strukturstudien, in denen Argonauten-Proteine in der Gegenwart von einzelsträngiger RNA, sowie siRNA-ähnlichen Molekülen kristallisiert wurden (Ma *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005), bestätigen frühere Arbeiten, die zeigen, dass das 5'-Phosphat der siRNA oder einer miRNA ein Schlüsselement ihrer Funktionalität ist (Nykänen *et al.*, 2001b). Das 5'-Phosphat ist durch ein zweiwertiges Kation an der Schnittstelle zwischen PIWI und der sogenannten Mid-Domäne verankert (Ma *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2005). Die Strukturstudien zeigen, dass das erste Nukleotid des leitenden Strangs der kurzen RNA von der Ziel-RNA getrennt ist. Dies stimmt mit Berichten überein, die besagen, dass das äußerste 5'-Nukleotid

der si- und miRNAs nicht notwendigerweise an der Erkennung der Substrate beteiligt sein muss (Doench & Sharp, 2004; Haley & Zamore, 2004; Lewis *et al.*, 2003). Außerdem erklären diese Strukturanalysen zusammen mit vorangegangenen biochemischen Studien, warum die durch kleine RNAs vermittelte Spaltung von Ziel-RNA sich immer an einem bestimmten Ort ereignet. Das katalytische Motiv der Ribonuklease ist vor dem leicht spaltbaren Phosphat auf der Ziel-RNA positioniert, zwischen dem elften und zwölften Nukleotid des „guiding“-Strangs; gezählt von dem verankerten 5'-Ende (Elbashir *et al.*, 2001b; Haley & Zamore, 2004). Studien mit rekombinanten Proteinen zeigen, dass auch ein minimaler RISC eine spaltfähige Argonauten- oder PIWI-Domäne mit gebundener kleiner RNA besitzt (Miyoshi *et al.*, 2005; Rivas *et al.*, 2005).

Die Endonuklease-Aktivität von Argonauten-ähnlichen und Piwi-ähnlichen Proteinen in Hefen, Pilzen, Pflanzen, Fliegen und Säugetieren sind wesentlich für die Funktion des RISC (Irvine *et al.*, 2006). Argonauten-ähnliche Proteine wirken bei der siRNA-Reifung, durch die Entfernung des nicht-aktiven siRNA-Stranges (Leuschner *et al.*, 2006; Matranga *et al.*, 2005; Miyoshi *et al.*, 2005), und Initiierung der sequenzspezifischen Spaltung der Ziel-RNAs (Hutvagner & Zamore, 2002) mit. Die Gegenwart eines intakten katalytischen Zentrums der PIWI-Domäne erklärt nur teilweise die Spaltungsaktivität von Argonauten-Proteinen (Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004).

1.3. RNA-silencing und Viroide

„Post-transcriptional gene silencing“ (PTGS) ist eine konservierte biologische Antwort auf doppelsträngige RNA, die auch die Expression von Protein-kodierenden Genen reguliert (Hannon, 2002). Es resultiert in der Sequenz-spezifischen Verminderung von einzelsträngigen RNAs (Papaefthimiou *et al.*, 2001). In Viroid-infizierten Pflanzen fanden Tsagris und Tabler (Papaefthimiou *et al.*, 2001) kurze, akkumulierende RNAs mit Viroid-Sequenz beider Polaritäten (Itaya *et al.*, 2001; Markarian *et al.*, 2004).

Papaefthimiou *et al.* untersuchten Fraktionen von PSTVd-infizierten Tomatenpflanzen mit einem niedrigen Molekulargewicht. Diese enthielten einen Bestand von kleinen PSTVd-spezifischen RNAs beider Polaritäten. Der Hauptbestandteil waren RNAs von 22 und 23 Nukleotiden Länge, die verschiedene Bereiche des Viroidgenoms darstellten. Das Vorhandensein solch verschiedener RNA-Spezies weist darauf hin, dass die RNAs, die im Kern repliziert werden, das PTGS bewirken. Die kurzen RNAs waren 30 Tage nach der Infektion in der höchsten Konzentration vorhanden. Zu späteren Zeitpunkten nahm der Viroidtiter wieder ab. Die kurzen RNAs waren in Pflanzen mit milden, schweren und letalen PSTVd-Stämmen vorhanden. Es war keine sichtbare Abhängigkeit zwischen der Menge an kleinen PSTVd-spezifischen RNAs und dem Grad der Virulenz der Viroid-Stämme erkennbar (Papaefthimiou *et al.*, 2001).

Die Fähigkeit von mehreren Viroiden PTGS zu bewirken, wurde schon früher gezeigt. Die Struktur wird durch Dicer-Enzym(e) erkannt, die verantwortlich für die Einleitung dieses Mechanismus sind. Landry & Perreault haben 2005 gezeigt, dass der Hairpin, der bekannterweise in die Replikation des PLMVd verwickelt ist, die Fähigkeit besitzt, das Dicer-Enzym auszulösen. Diese Domäne, die aus einer Folge von mehreren kleinen Helices zusammengesetzt ist, wird durch symmetrische Bulge-Loops getrennt und erinnert an die Vorläufer micro-RNAs (Landry & Perreault, 2005).

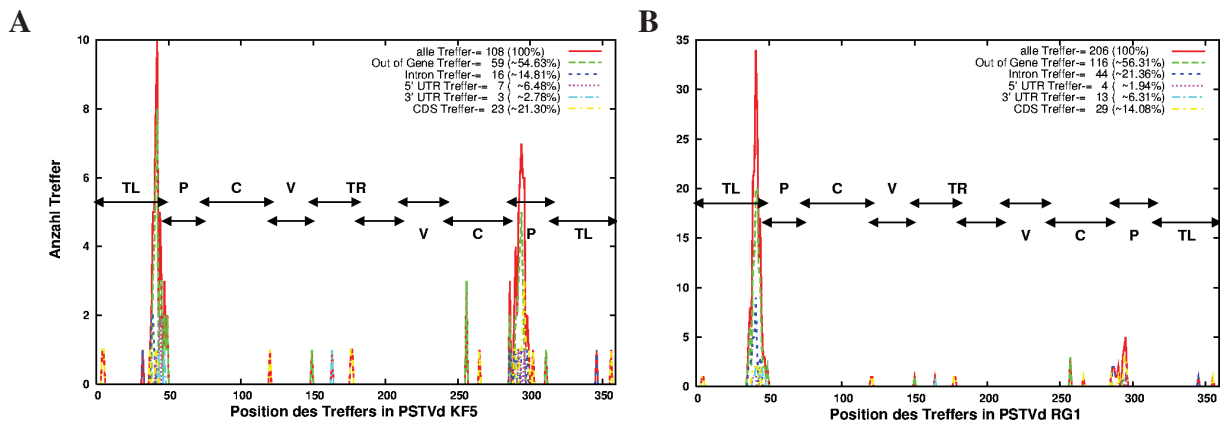


Abbildung 1.6: Komplementaritäten von kurzen PSTVd-Segmenten zum *Arabidopsis*-Genom. Die jeweils 359-Nt lange Sequenz der zwei PSTVd-Varianten KF5 und RG1 wurden in 359 Fragmente von 23-Nukleotiden Länge geteilt. Diese Fragmente wurden im Genom von *A. thaliana* gesucht. Als Treffer wurden komplementäre Fragmente mit einer Fehlpaarung, einer Insertion und /oder einer Deletion zugelassen. Für KF5 wurden 108, für RG1 206 Treffer gefunden. Es muss beachtet werden, dass die Y-Achsen unterschiedlich skaliert sind. Die Treffer liegen zum überwiegenden Teil am 3'-Ende der oberen TL-Region bis in die obere VM-Region (Nukleotid 35–71), sowie in der unteren VM-Region (Nukleotid 285–318). Im *Arabidopsis*-Genom liegen etwa die Hälfte der Treffer in Protein-codierenden Bereichen. TL: Linke Terminale Region; P: Virulenzmodulierende (VM) Region; C: Zentrale Konservierte Region (CCR), V: Variable Region (VR) und TR: Rechte Terminale Region. Abbildungen aus Schmitz & Steger (2007)

1.4. High-Throughput-Sequencing

1.4.1 *in-silico*-Vorarbeiten

Die *in-silico*-Ermittlung potentieller mRNA-Targets für miRNAs in Pflanzen ist möglich, da die bisher bekannten miRNAs eine hohe Komplementarität zu ihrem Target aufweisen (Rhoades *et al.*, 2002). Durch bioinformatische Untersuchungen konnten mögliche siRNAs mit PSTVd-Sequenz in *Arabidopsis* gefunden werden (siehe Abbildung 1.6). Es wurde mit Sequenzen von zwei PSTVd-Stämmen, KF5 (A) und RG1 (B), gesucht. Die 359-Nukleotid langen, zirkulären Sequenzen wurden in 359 23-Nt-RNAs gespalten und die Fragmente im *Arabidopsis*-Genom gesucht. Die PSTVd-Variante KF5 unterscheidet sich primär durch drei Nukleotidaustausche in der oberen und unteren VM-Region. Dieser Unterschied führt zu einer Treffer-Verdopplung für RG1, 206 Treffer, gegenüber KF5, 108 Treffer. Als Treffer wurden alle komplementären Fragmente mit höchstens einer Fehlpaarung, einer Insertion und /oder einer Deletion zugelassen.

1.4.2 Sequenziermethoden-Übersicht

1.4.2.1 Sanger-Methode

Die Sanger-Methode ist die klassische Methode, um die Sequenz einer DNA zu bestimmen und wurde Ende der 70er Jahre von Sanger entwickelt (Nobel Prize - Chemistry - 1980). Diese Methode wird auch Kettenabbruch- oder Didesoxy-Verfahren genannt, da sie auf Kettenabbrüchen

mit Didesoxynukleotiden basiert. Die Sanger-Methode verfolgt das Prinzip Sequenzierung durch enzymatisch katalysierte Synthese. Zuerst wird ausgehend von einer bekannten Sequenz mit Hilfe eines Primers ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Dieser wird in der Regel mit radioaktiv markierten Nukleotiden versehen, damit die Reaktionsprodukte nachweisbar sind. Diese Reaktion wird parallel in vier Ansätzen gestartet, die sich nur in der Zusammensetzung der Nukleotidgemische unterscheiden. Alle beinhalten eine Mischung der vier 2'-Desoxynukleotide A, C, G und T und nur jeweils ein synthetisches 2'-3'-Didesoxynukleotid, den sogenannten Terminator. Während der Strangsynthese kann es nun entweder zum Einbau eines 2'-Desoxynukleotids kommen, wodurch die Synthese immer weiter fortgesetzt werden kann, oder zum Einbau eines Terminators, wodurch die Verlängerung des Strangs nicht mehr möglich ist. Da in jedem Reaktionsgefäß nur ein Terminortyp enthalten ist, entstehen in jedem Gefäß nur Produkte, die auf einen bestimmten Basentyp enden. Nach Ablauf der Reaktion werden die vier Proben parallel elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt. Legt man die dabei entstehenden Bandenmuster übereinander entsteht eine Leiter, anhand der man die Sequenz von unten nach oben Base für Base ablesen kann (Sanger *et al.*, 1977).

1.4.2.2 PyrosequencingTM-Technologie / 454-Sequenzierung

Die 454-Sequenzierung beruht auf der Methode der Pyrosequenzierung und ist eine Echtzeit-Sequenzierung durch Synthese. Die 454-Technik basiert auf klonalen Amplifikationen von Einzelmolekülen auf Beads (runde Mikropartikel). Dabei werden an einzelsträngige DNAs ein 5'- und ein 3'-Adapter ligiert und mit Hilfe eines dieser Adapter die DNA an ein Bead gebunden. Idealerweise soll auf jedem Bead nur eine DNA befestigt sein. Nun folgt eine sogenannte Emulsions-PCR (emPCR), bei der jedes Bead in einem Tropfen der Emulsion mit seiner DNA eingeschlossen sein soll und dort die PCR stattfindet. Dadurch soll gewährleistet werden, dass nur eine Art von DNA pro Bead in mehrfacher Ausführung vorhanden ist. Anschließend werden die Beads auf eine Picotiter-Platte mit 1,4 Millionen Wells gegeben, wobei jedes Bead in ein eigenes Well eingeordnet wird. In diesem Well findet nun die Pyrosequenzierung statt. Durch die Aufteilung in die Wells soll es möglich sein, enorme Mengen an Signalen parallel aufzunehmen.

Bei der Pyrosequenzierung wird ein Primer an das einzelsträngige, PCR-amplifizierte DNA-Template hybridisiert und mit den Enzymen DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase, sowie den Substraten APS (Adenosin-5'-Phosphosulfat) und Luciferin inkubiert. Bei dieser Methode werden die vier Nukleotide immer in Rotation nacheinander zugegeben, bis es keine Signale mehr gibt und das Template vollständig sequenziert wurde.

Das erste dNTP (desoxy-ribonukleotid-Triphosphat; im Falle von dATP wird dATP α S zugegeben, welches kein Substrat für die Luciferase darstellt) wird der Reaktion zugefügt, woraufhin die Polymerase den Einbau des dNTP in den DNA-Strang katalysiert, sofern das dNTP komplementär zum Template-Strang ist. Jeder Einbau eines dNTP ist verbunden mit der Freisetzung von Pyrophosphat (PPi) in äquimolarer Menge zur Anzahl an eingebauten Nukleotiden. Die ATP-Sulfurylase wandelt in Gegenwart von APS, ebenfalls quantitativ, das PPi in ATP um. Das ATP treibt die Luciferase-vermittelte Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin an, welches sichtbares Licht erzeugt. Die Lichtmenge ist wiederum proportional zur Menge des ATP. Das entstehende Licht wird von einer CCD-Kamera aufgenommen und als Peak sichtbar gemacht. Die Höhe dieser Peaks ist proportional zur Anzahl der eingebauten Nukleotide. Während der gesamten Reaktion baut das Nukleotid-degradierende Enzym Apyrase ATP und nicht eingebaute

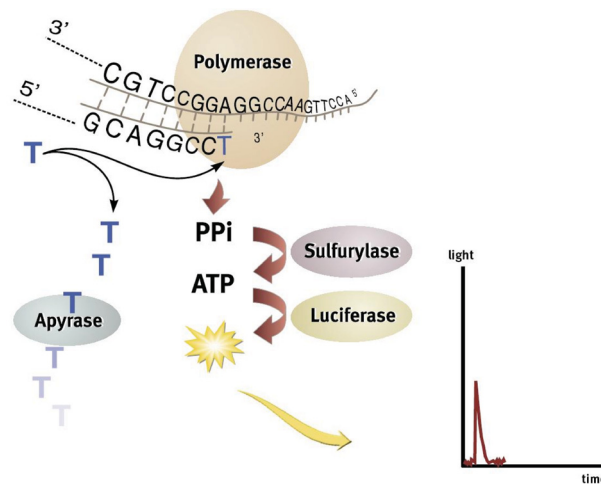


Abbildung 1.7: Prinzip der Pyrosequencing™-Technologie. In dieser Abbildung ist gezeigt, wie eine Pyrosequenzierung abläuft. Diese Abbildung stammt von der Firma Biotage. Weitere Erläuterung siehe 1.4.2.2.

Nukleotide ab. Dadurch wird das Lichtsignal entfernt und die Reaktionslösung für den nächsten Schritt mit neuem Nukleotid regeneriert (Quelle: Firma Biotage¹). Zur anschaulichen Erklärung siehe Abbildung 1.7 oder den Film „Principle of Pyrosequencing Technology“² der Firma Biotage).

Momentan wird das Gerät Genome Sequencer (GS) FLX von der Firma Roche vertrieben. Mit dieser Methode kann eine Leselänge von bis zu 250 Basen erreicht werden. Da die Amplifikation der DNA in Lösung (emPCR) stattfindet, kann keine Quantifizierung stattfinden und es entsteht eine höhere Fehlerrate. Bei Sequenzen, bei denen mehrere identische Nukleotide aufeinander folgen, kommt es außerdem zu einer sogenannten Homopolymer-Problematik. Folgen mehr als 5 oder 6 gleiche Basen aufeinander, kann das Lichtsignal nicht mehr eindeutig gelesen werden. Außerdem ist es ein Problem, dass Signale aus direkt nebeneinander liegenden Wells sich überlagern können (Angaben der Firma GATC).

1.4.2.3 Solexa-Technologie

Der Illumina Genome Analyzer™ ist für die Solexa-Technologie entwickelt worden. Hierbei handelt es sich um eine Sequenzierung durch Basenanlagerung. Die Leseweite beschränkt sich auf maximal 35 Basenpaare, was diese Methode insbesondere für „silencing“-RNAs interessant macht. Dieses Gerät arbeitet mit einer 8-Kanal-Fließzelle, deren Kanäle getrennt beladen und parallel analysiert werden können. Hierbei ist es möglich quantitative Aussagen zu treffen, da zwar ein Amplifikationsschritt in der Methode enthalten ist, dieser aber innerhalb der Fließzelle geschieht, wo die DNA-Stränge auf der Oberfläche befestigt sind. Zur ausführlichen Erklärung der Methoden siehe Abschnitt 3.4.2 und Abbildung 3.11 (Angaben der Firma GATC).

¹ <http://www.pyrosequencing.com/>

² <http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=7454&mn1=1366&mn2=1367>

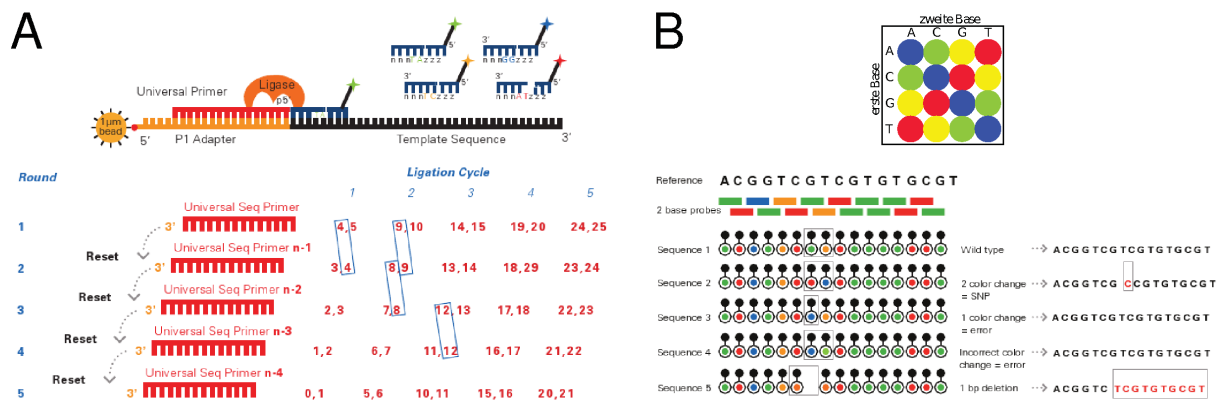


Abbildung 1.8: Prinzip der ABI SOLiD-Methode. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Sequenzierung durch Ligation. (A) Jede einzelne Base wird durch „primer-reset“ doppelt abgefragt. Zu beachten ist, dass die vierte und neunte Base in den Runden 1 und 2 beide abgefragt wurden (blaue Rechtecke). (B) Prinzip der 2-Basen-Kodierung; Schema im oberen Teil der Abbildung. Zufällige und systematische Fehler werden leicht erkannt und durch das Programm herausgefiltert, wodurch man eine höhere Genauigkeit erhält. Weitere Erläuterung siehe 1.4.2.4. Abbildungen nach dem „Application Fact Sheet SOLiD™ System“ der Firma Applied Biosystems.

1.4.2.4 ABI SOLiD™ System

Bei dieser neuesten Generation von Sequenzmethode handelt es sich um eine sogenannte Echtzeit-Sequenzierung durch Ligation, die ebenfalls eine Leseweite bis maximal 35 Basenpaare hat. Diese Methode zeigt durch ihre Ligations-basierte Chemie eine drastisch reduzierte Fehlerrate im Vergleich zu Synthese-Ansätzen, da sie eine 2-Basen-Kodierung verwendet.

Der Anfang ist identisch mit der Vorbereitung zur Pyrosequenzierung (siehe 1.4.2.2). Nach Ligation der Adapter an die Enden der DNA werden diese an Beads hybridisiert, worauf eine klonale Amplifikation über emPCR erfolgt. Über die 5'-Modifikation des DNA-Stranges werden die Beads auf der Glasoberfläche einer Fließzelle kovalent gebunden. Ab diesem Punkt unterscheidet sich die Methode von den anderen.

Der Unterschied zu den anderen Methoden ist die 2-Basen-Sonde. Diese hat eine Länge von acht Basen, wobei nur die Positionen 4 und 5 bekannt sind, sowie einen Fluoreszenz-Farbstoff am 5'-Ende. Die Sonden sind mit vier Farbstoffen fluoreszenzmarkiert, wobei jeder der Farbstoffe für 4 der 16 möglichen Di-Nukleotid-Sequenzen an Position 4 und 5 kodiert (siehe Abb. 1.8 B). Im ersten Schritt wird nach Anlagerung des Primers ein Sondenngemisch zum Template gegeben. Die komplementäre Sonde wird an die Template-Sequenz hybridisiert und an den Primer ligiert. Nachdem die Fluoreszenz gemessen wurde, wird der Farbstoff inklusive der 3 terminalen Nukleotide abgespalten. An der Sonde verbleibt eine freie 5'-Phosphatgruppe hinter dem Di-Nukleotid und ist somit für weitere Reaktionen verfügbar. Dieser Prozess wird sieben mal wiederholt und liefert eine Leselänge von 35 Basenpaaren. Beim anschließenden „primer-reset“ wird der synthetische Strang entfernt und ein neuer Primer, der um eine Base kürzer ist, angelagert, wodurch sich der gelesene Bereich um ein Nukleotid in Richtung des 5'-Endes des Templatestranges verschiebt. Die Ligationszyklen werden wie vorher beschrieben durchgeführt. Das „primer-reset“, wird fünf mal wiederholt, wodurch jede Base zweifach vermessen wird. Durch die verschiedenen Zyklen steigt die Sequenzier-Genauigkeit (siehe Abb. 1.8 A).

Zum Schluss wird immer das erste Di-Nukleotid mit dem zweiten Di-Nukleotid des nächsten „primer-reset“ abgeglichen. Bei Übereinstimmung ist es eine korrekt gelesene Base, bei zwei Farbaustauschen liegt ein Einzel-Nukleotid-Polymorphismus („single nucleotide polymorphism“ = SNP) vor. Bei einem Farbaustausch einer Base oder einem falschen Farbaustausch liegt ein Fehler vor (siehe Abb. 1.8 B).

1.5. Ziel dieser Arbeit

Viroide sind nur in bestimmten Pflanzen kultivierbar. PSTVd wird in *Solanaceen* repliziert, ruft aber nur bei einigen Pflanzen, u. a. der Tomaten-Varietät Rutgers, sichtbare Symptome hervor. Kleinste Sequenzveränderungen in der virulenzmodulierenden Region (VM-Region) führen zu drastischen Änderungen in der Pathogenität des Viroids. Die 1998 von Schmitz & Riesner gezeigte Hypothese (1996b aufgestellt von Owens *et al.*), dass die steigende Pathogenität eine Viroids mit der Krümmungsstärke der VM-Region seiner stäbchenförmigen Sekundärstruktur in Verbindung steht, wurde 2003 von Schmitz selbst widerlegt. Durch die Entdeckung von kurzen RNAs mit Viroid-Sequenz in Viroid-infizierten Pflanzenproben durch PAA-Gel-Analysen und *in-silico*-Sequenzvergleichen der VM-Region mit komplementären mRNAs in *Arabidopsis* wurde eine neue Hypothese aufgestellt: PSTVd-spezifische RNAs könnten als „silencing“-RNAs wirken. Das neue Pathogenitätsmodell stellte die Hypothese auf, dass das Viroid miRNAs bzw. siRNAs produziert und diese über PTGS in die Genregulation der Pflanze eingreifen. Dies warf viele Fragen auf:

1. Welche Sequenz haben die kurzen RNAs?
2. Aus welchem Bereich des PSTVd kommen die kurzen RNAs; stammen sie wirklich nur aus der VM-Region?
3. Welche der kurzen RNAs sind wichtige Bestandteile bei der Pathogenität?
4. Lässt sich mit den kurzen RNAs die unterschiedliche Ausprägung der Symptome erklären?
5. Gibt es kurze RNAs in gesunden Pflanzen, die in infizierten Pflanzen nicht vorkommen oder umgekehrt?
6. Was gibt es für Faktoren in der Pflanze, die zum „silencing“ benötigt werden?
7. Unterscheiden sich die kurzen RNAs der verschiedenen Viroid-Stämme?

Bei den Fragen 1 und 2 geht es um das Problem des Ursprungs der kleinen PSTVd-spezifischen RNAs: Werden sie über einen siRNA-Weg aus doppelsträngiger PSTVd-RNA erzeugt, sollten alle möglichen RNA-Sequenzen aus allen Bereichen des PSTVd auftreten; werden die kleinen RNAs über einen miRNA-Weg erzeugt, sollten nur wenige Sequenz-Positionen dafür in Frage kommen. Die Fragen 2–4 drehen sich um den Zusammenhang zwischen kleinen PSTVd-spezifischen RNAs und der PSTVd-Pathogenität, der nur existieren sollte, wenn die kleinen RNAs aus der VM-Region stammen, da sich die einzelnen Viroid-Stämme in diesem Bereich unterscheiden.

Die Fragen 6 und 7 zielen dagegen mehr auf einen indirekten Zusammenhang, falls die kurzen RNAs nicht aus der VM-Region stammen sollten.

Schon 2001 fanden Tsagris und Tabler kurze, akkumulierende RNAs beider Polaritäten in Viroid-infizierten Pflanzen (Papaefthimiou *et al.*, 2001). Zuerst sollte mit Hilfe von Northernblot-Analysen getestet werden, ob der Herkunftsbereich der kurzen RNAs mit Viroid-Sequenz möglicherweise eingegrenzt werden kann, indem man Viertel des Viroids als Sonde einsetzte. Anschließend sollte eine Aufreinigungsmethode gefunden werden, um alle kurzen RNAs von der Gesamt-RNA der Pflanze zu trennen. Im Anschluss sollten ebenfalls die kurzen RNAs mit Viroid-Sequenz von den kurzen RNAs der Pflanze mittels Dynabead-Aufreinigung getrennt werden. 2007 erschien zwischenzeitlich eine Veröffentlichung von Itaya und Ding, in welcher sie unter anderem kurze RNAs aus zwei Viroid-Varianten zeigten, die isoliert und kloniert wurden. Ihre Ergebnisse stammten von ca. 500 Klonen und zeigten primär (+)-Stränge in der linken terminalen, variablen und rechten terminalen Region, allerdings keine in der erwarteten virulenzmodulierenden Region (Itaya *et al.*, 2007). Abgeleitet von den eigenen Erfahrungen mit Aufreinigungen wurde angenommen, dass die von Itaya *et al.* gewählte PEG-Fällung zur Aufkonzentration der kurzen RNAs zu fehlerbehaftet ist, da schon bei geringen PEG-Konzentrationen kurze RNAs mit ausfallen. Daraufhin wurde zur Aufreinigung eine klassische Auftrennung per PAGE gewählt mit einer anschließenden Gelelution durch eine Salzfalle, da diese Methoden die bestmögliche Rückgewinnung versprochen. Zudem sollten die Sequenzen der „silencing“-RNAs zum Schluss durch eine High-Throughput-Sequenzierung bestimmt und die Fülle an Daten über bioinformatische Methoden ausgewertet werden, um Aussagen über deren mögliche Funktion machen zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Puffer und Lösungen

- **10× TBE**

890 mM Tris
890 mM Borsäure
25 mM EDTA, pH 8.0

- **TE**

10 mM Tris/HCl, pH 8.0
1 mM EDTA, pH 8.0

- **TNE**

100 mM Tris/HCl
100 mM NaCl
10 mM EDTA mit HCl auf pH 7.5 einstellen
vor Gebrauch 2 % β -Mercaptoethanol und 2 % SDS zugeben

- **20× SSC**

3 M NaCl
300 mM Natriumcitrat mit HCl auf pH 7.0 einstellen

- **EDTA**

500 mM EDTA mit NaOH auf pH 8.0 einstellen

- **Formamid-Auftragspuffer**

95 % Formamid
5 mM EDTA
0,02 % Bromphenolblau
0,02 % Xylenxyanol

- **Formamid-Auftragspuffer für Gelelution**

95 % Formamid
5 mM EDTA
0,02 % Xylenxyanol

- **Harnstoff-Auftragspuffer**

8 M Harnstoff
0,5× TBE
0,02 % Bromphenolblau
0,02 % Xylenxyanol

- **„perfekter“ Auftragspuffer**

Der beste Auftragspuffer besteht aus einem 1:1-Gemisch aus Formamid- und Harnstoff-auftragspuffer, da er die positiven Eigenschaften von beiden vereint und die negativen Eigenschaften (Harnstoff-AP fällt bei Kälte schnell aus, Formamid-AP ist sehr salzem-pfindlich) unterdrückt. Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn der Auftragspuffer etwas weniger Salz enthält, als das Gel selbst, da so die Banden am schärfsten werden. Bei einem Gel mit 0,5× TBE sollte man einen Auftragspuffer mit 0,1 – 0,2× TBE verwenden.

- **saures Phenol**

Phenol wird mit deionisiertem Wasser gesättigt und auf 0,1 % Hydroxychinolin eingestellt.

- **äquilibriertes Phenol**

Das Phenol wird zwei mal in 1 M Tris/HCl, pH 8.0 und zwei mal mit 100 mM Tris/HCl, pH 8.0 extrahiert. Zum Schluss wird die Lösung mit 0,1 % Hydroxychinolin versetzt.

- **NaPi**

Um Natriumphosphat-Puffer herzustellen, wird ein gewünschtes Volumen Na_2HPO_4 vorgelegt und mit NaH_2PO_4 auf pH 7.0 eingestellt.

- **MgCl_2 - 1 M**

- **CaCl_2 - 0,1 M**

- **NaOAc - 3 M**

3 M Natriumacetat mit Eisessig auf pH 6.0 einstellen

Natriumacetat (NaOAc) wird in 3 molarer Konzentration als Hochsalzpuffer für die Elektro-Geleleution (2.5.3) mit einer Salzfalle (siehe Abb. 2.4) verwendet. Die beste Färbung der Lösung für die Geleleutionskammer wird durch Zugabe von 20 μl Xylenxylanol auf 15 ml NaOAc erreicht.

- **50 % PEG**

50 % (w/v) PEG_{6000}

- **Acrylamid (AA)**

Acrylamid wird in 2 Prozentigkeiten benötigt, die beide auf die gleiche Weise hergestellt werden. Zuerst werden Acrylamid (Acrylamid 2x, Serva, Heidelberg) und Bisacrylamid (N,N'-Methylene-bisacrylamid 2x, Serva, Heidelberg) zu gewünschten Teilen zusammen in Wasser gelöst und mit einem „gehäuften Teelöffel“ Amberlite® (Mischbettionenaustauscher, Roth, Karlsruhe) für mindestens 1 Stunde gerührt und anschließend abfiltriert. Amberlite® ist ein Ionenaustauscher und dient dazu, die durch Oxidation entstandene Acrylsäure aus der Lösung zu entfernen, damit der pH-Wert neutral ist. Andernfalls ist der pH-Wert zu sauer, was dazu führt, dass das Gel nicht richtig polymerisiert.

40 % (19:1):	190	g	Acrylamid	
	10	g	Bisacrylamid	ad 500 ml H ₂ O _{dest}
30 % (30:1):	145,16	g	Acrylamid	
	4,84	g	Bisacrylamid	ad 500 ml H ₂ O _{dest}

2.2. Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen, wie es bei der Präparation von Gesamt-RNA aus Tomatenblättern (siehe 2.4) oder zur Aufreinigung nach *in-vitro*-Transkription (siehe 2.6.4) notwendig ist. Dabei wird die wässrige Phase zuerst mit 1 Volumen Phenol versetzt, gründlich gemischt und zur Phasentrennung 3 Minuten bei 18 °C und 13.200 rpm zentrifugiert (Eppendorf centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg). Die obere, wässrige Phase, in der sich die Nukleinsäure befindet, wird vorsichtig ohne Teile der Interphase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wird ein halbes Volumen Phenol und ein halbes Volumen Chloroform dazu gegeben, gut gemischt und wie zuvor zentrifugiert. Nochmals wird die wässrige Phase abgenommen und mit einem Volumen Chloroform wie zuvor extrahiert. Dieser letzte Schritt dient zur Entfernung von gelöstem Phenol in der wässrigen Phase. Anschließend wird der wässrige Überstand mit Ethanol gefällt (siehe 2.3.1). Für die Präparation von Gesamt-RNA wird saures Phenol benutzt, für Aufreinigungen äquilibriertes Phenol.

2.3. Nukleinsäure-Fällungen

2.3.1 Ethanol-Fällung

Standardmäßig wird zur Fällung von Nukleinsäuren die Lösung auf 150 mM Natriumchlorid eingestellt, 3 Volumen eiskaltes Ethanol dazu gegeben und gründlich gemischt. Darauf folgt eine 15- bis 30-minütige Fällung auf Eis und eine mindestens 30- bis 45-minütige Zentrifugation (Eppendorf centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg) bei 4 °C und 13.200 rpm zum Sedimentieren. Der Überstand wird anschließend verworfen, das Pellet 1-2 mal mit 70 % -igem Ethanol (v/v) gewaschen und für mindestens 30 Minuten bei 18 °C und 13.200 rpm erneut sedimentiert, um Salzzurückstände zu entfernen. Anschließend wird der Überstand wiederum verworfen, das Pellet an der Luft getrocknet und in einer adäquaten Menge Puffer, z. B. 1× TE oder 5 mM Tris/HCl, pH 8.0, gelöst.

2.3.2 Ammoniumacetat-Ethanol-Fällung

Bei der Fällung von *in-vitro*-Transkripten (2.6.3) und nach 5'-pCp-Endmarkierungen wird die Ethanol-Fällung mit Ammoniumacetat (NH₄OAc) durchgeführt. Dazu wird die wässrige Lösung auf 2,5 M NH₄OAc eingestellt und mit 2,5 Volumen 96 % -igem Ethanol versetzt. Fällung, Zentrifugation und Waschen der Nukleinsäure entspricht der vorher beschriebenen Ethanol-Fällung. Das getrocknete Pellet wird in 15 µl 5 mM Tris/HCl gelöst. Diese Art der Fällung dient der Abtrennung nicht eingebauter Mononukleotide. Vor allem bei radioaktiven Arbeiten wird

dadurch verhindert, dass nicht eingebaute radioaktiv-markierte Nukleotide zusammen mit der Nukleinsäure gefällt werden, wodurch anschließende Radioaktivitätsmessungen nicht verfälscht werden. Aber auch für Konzentrationsbestimmungen per Spektralphotometer entstehen durch freie Nukleotide Verfälschungen, was in diesem Fall noch zusätzlich durch ein Gel überprüft werden kann (2.5.1).

2.3.3 PEG-Fällung

Mit Hilfe einer PEG-Fällung können durch Variieren der PEG-Konzentration unterschiedlich große RNAs gefällt werden (Schmitz & Riesner, 2006). Die Lösung wird auf eine Endkonzentration von 500 mM NaCl eingestellt. Um große RNAs zu fällen benötigt man eine Konzentration von ca. 6 % PEG₆₀₀₀. Die Probe wird 10–30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 13 °C und 13.200 rpm für 30 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 % -igem Ethanol (v/v) wie zuvor gewaschen, getrocknet und in 1× TE gelöst. Sollen anschließend die restlichen RNAs (inklusive der kleinen) gefällt werden, kann man den Überstand nochmals auf 20 % PEG₆₀₀₀ einstellen und, wie zuvor beschrieben, fällen. Verwendet man die PEG-Fällung zum Aufkonzentrieren z. B. nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.2, 2.6.4), wird die Lösung sofort auf 20 % PEG₆₀₀₀ eingestellt, da die komplette RNA gefällt werden soll.

2.3.4 Isopropanol-Fällung

Die Isopropanol-Fällung ist zur Reinigung (Entsalzung) und Aufkonzentrierung einer Probe. Diese Fällung wird bei Raumtemperatur durchgeführt, wodurch eine Kopräzipitation mit Salz minimiert wird. Isopropanol entzieht der Nukleinsäure das Hydratwasser, so dass diese ausfällt, wobei Nukleinsäuren mit weniger als 20 Nukleotiden nicht mehr ausfallen. Hierbei wird ein Volumen Isopropanol zur Probe gegeben, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 18 °C und 13.200 rpm zentrifugiert. Pellets nach Isopropanol-Fällungen sind transparent und daher schwerer zu erkennen als die nicht durchsichtigen, Salz enthaltenden Pellets nach Ethanol-Fällungen. Zum Schluss muss das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen werden, um zum einen zurück gebliebene Salze zu entfernen und zum anderen das Isopropanol durch Ethanol zu ersetzen, da es flüchtiger und somit leichter zu entfernen ist. Nach dem Trocknen kann das Pellets in 5 mM Tris/HCl gelöst werden.

2.4. Zellmaterial

Die RNA wird aus Blattgewebe von (PSTVd-infizierten) Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum*) der Sorte *Rutgers* isoliert.

Die Tomatenpflanzen werden im Gewächshaus gehalten. Sieben Tage nach Aussaat werden die Pflanzen vereinzelt und nach Ausbildung der Primärblätter mit PSTVd infiziert. Dazu wird die Blattoberfläche mit Carborundum (Siliciumcarbid grün Korn 320; ein Schleifmittel) bestreut und je 10 µl NaPi, versetzt mit 0,5 ng PSTVd-RNA des jeweiligen Viroid-Stammes, in das Blatt eingerieben. Es wurde mit drei unterschiedlichen Stämmen infiziert:

- QFA = milde Symptome
- Intermediate = mittlere Symptome
- AS1 = starke/letale Symptome

Zusätzlich werden sogenannte „Mock-treated“ Pflanzen als Negativkontrolle erzeugt. Diese Pflanzen werden der gleichen Behandlung unterzogen, wobei hier dem Inokulum keine Viroid-RNA zugesetzt wird. Für die Northernblot-Analysen (siehe 2.8) wurden in regelmäßigen Abständen Teile der Pflanzen geerntet, gewogen und bei -70 °C eingefroren. Für die Sequenzierung wurden alle Pflanzen im Gewächshaus mit dem PSTVd-Stamm AS1 infiziert, zum gleichen Zeitpunkt, nach 30 Tagen, geerntet und bei -70 °C eingefroren.

2.4.1 Pflanzenaufschlüsse

Damit bei den Northernblots vergleichbare Proben auf die einzelnen Blots aufgetragen werden können, müssen Aufschlüsse in größerem Maßstab gemacht werden, um genügend Gesamt-RNA zu erhalten. Auch für die Sequenzierung ist ein Großaufschluss von Nöten, da man große Mengen Gesamt-RNA aufreinigen muss, um ausreichende Mengen kleiner RNAs nach Gel-elution (2.9.1) zu erhalten. Dazu werden die Pflanzenproben mit Phenol-Chloroform extrahiert (siehe 2.2), bevor die RNA aus den Proben gefällt wird (siehe 2.3.1). Für einen 1-Liter-Aufschluss werden 150 g, bei größeren Aufschlüssen entsprechend mehr, gefrorene Tomatenpflanzen aus der -70 °C Truhe benötigt, die in der Tüte ein wenig zerkleinert werden, bevor sie in den Waring Blender (Laboratory Blender, Waring Laboratory Science, Torrington) gegeben werden. Je nach Größe des Aufschlusses wird ein 1-Liter- (Modell 7009G mit Glas-Aufsatz) oder 4-Liter- (Modell LBC15 mit Stahl-Aufsatz) Standmixer gewählt. Es ist wichtig darauf zu achten, dass die Blätter dabei nicht auftauen. Nach kurzem Zerkleinern der Pflanzen werden mit einer Glaspipette 6 ml β -Mercaptoethanol dazu gegeben, womit ebenfalls die Blätter vom Rand entfernt werden können. Nach kurzem Mixen kommen 6 g SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat) und 300 ml TNE hinzu, woraufhin solange gemixt wird, bis eine möglichst homogene Lösung entsteht. Zum Schluss werden 300 ml saures Phenol dazu gegeben und so lange gemixt, bis eine homogene Lösung entsteht. Der gesamte Ansatz wird auf zwei Zentrifugenbecher (für JA 10 Rotor - Volumen ~450 ml) aufgeteilt, bis auf maximal 1 g Differenz (nur bei diesem Schritt durch Zufügen von deionisiertem Wasser) austariert und bei 4 °C und 5.000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert (Beckman Model J2-21 Centrifuge). Der Überstand wird anschließend in einen neuen Zentrifugenbecher geschüttet und der Rest mit einer Pipette abpipettiert. Die wässrige Phase wird nun mit je einem halben Volumen Phenol und Chloroform durch kräftiges Schütteln vermischt und wie vorher beschrieben austariert und zentrifugiert. Anschließend wird 1 Volumen Chloroform, auf zwei neue Zentrifugenbecher aufgeteilt, vorgelegt, die abgenommene wässrige Phase dazu gegeben und nach kräftigem Schütteln nochmals zentrifugiert. Zum Schluss werden die wässrigen Phasen wieder vereinigt. Da die Lösung durch das TNE schon 100 mM Salz beinhaltet, müssen für die Ethanol-Fällung über Nacht bei -20 °C noch 50 mM NaCl und 3 Volumen technisches Ethanol (wegen der großen Volumina) zugefügt werden. Am nächsten Tag wird die gesamte Lösung nach und nach in 2–3 80 ml-Zentrifugen-Becher (Advanced Oak Ridge-Röhrchen aus PPCO, Herolab, Wiesloch) für 30 Minuten im Rotor FX6100 bei

4 °C und 10.200 rpm zentrifugiert (Allegra® X-15R Centrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, USA). Dadurch werden größere Mengen Sediment pro Becher erhalten, das am Ende in einer kleineren Menge gelöst werden kann und somit in höheren Endkonzentrationen resultiert. Die Pellets werden über Nacht getrocknet und durch ausführliches Schütteln auf einem Schüttler (einige Stunden bei Raumtemperatur und über Nacht im 4 °C-Raum) in 3 ml 1× TE gelöst.

2.5. Gelelektrophoresen

2.5.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Wattgele)

Wattgele sind leistungsgesteuerte Gele, bei denen die Denaturierung der Nukleinsäuren durch die im Gel erzeugte Temperatur erfolgt. Die Leistung (W) ist das Produkt aus Spannung (V) und Stromstärke (A). Alle Watt-gesteuerten Gele werden bei maximaler Spannung und Stromstärke (Spannungsgerät eingestellt auf 3500 V und 400 mA) gefahren. Um eine gleichmäßige Wärmeverteilung über das gesamte Gel zu erhalten, wird eine Aluminiumplatte vor die dem Pufferbad abgewandte Glasplatte geklemmt, auf der Klebe-Thermometer angebracht sind. Um eine Denaturierung der Nukleinsäuren zu gewährleisten, wird das Gel zu Beginn für ungefähr 10–15 Minuten bei 45 W vorgeheizt, damit es zum Zeitpunkt der Probenauftragung eine Temperatur von ca. 50–55 °C hat. Zusätzlich werden die Proben vor der Auftragung denaturiert, indem sie im Auftragspuffer (siehe 2.1) bei 95 °C für 2 Minuten erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt werden. Bei der Elektrophorese läuft das Gel konstant bei ca. 50 °C und 35 W. Die Dauer variiert je nach Prozentigkeit und Größe des Gels. Die Wattgele haben eine Fläche von 20 cm × 20 cm.

Die jeweilige Prozentigkeit des Gels, sowie dessen Vernetzungsgrad wird nach der Länge der zu trennenden Nukleinsäuren gewählt. Alle Gele enthalten 8 M Harnstoff zur zusätzlichen Denaturierung und 0,5× TBE. Bei Gelen für die Northernblot-Analyse wird das Gel auf 1× TBE eingestellt. Zum Schluss wird durch Zugabe von 0,1 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin) und 0,035 % APS-Stammlösung (Ammoniumperoxodisulfat; 10 %) die Polymerisierung des Gels gestartet.

Die Gele für die Northernblot-Analysen sind 1 mm dick und 14 %-ig (30:1). Alle anderen Gele haben eine Stärke von 0,5 mm und werden bei niedriger Prozentigkeit, zur besseren Handhabung, auf eine mit Acrylgruppen beschichtete Gelbondfolie (SERVA) polymerisiert. PCR-Produkte und *in-vitro*-Transkripte, mit einer Länge zwischen 100 und 200 Nukleotiden, werden auf einem 6 %-igem PAA-Gel (30:1) aufgetrennt. Für den Nachweis von kleinen RNAs zwischen 20 und 30 Nukleotiden, sowie bei Gesamt-RNA aus Pflanzenaufschlüssen, wird ein 20 %-iges (19:1) PAA-Gel verwendet.

Art des Gels	Spacer	% -igkeit	Gelbondfolie?	~ Laufzeit
Northernblot-Analyse	1,0 mm	14 % (30:1)	nein	50–60 Minuten
Transkripte	0,5 mm	6 % (30:1)	ja	20–30 Minuten
PCR-Produkte	0,5 mm	6 % (30:1)	ja	20–30 Minuten
Nachweis von kleinen RNAs	0,5 mm	20 % (19:1)	nein	40–50 Minuten

2.5.2 Silberfärbung

Nukleinsäuren werden am effektivsten durch eine Silbernitrat-Färbung sichtbar gemacht. Dabei lagern sich Silber-Ionen (Ag^+) an das negativ geladene Phosphatrückgrat der Nukleinsäure, die durch Reduktion mit Formaldehyd zu metallischem Silber als braune Bande im Gel erscheint. Die Nachweisgrenze der Silberfärbung liegt bei 100 pg bei einer Bande von 10×1 mm. Dabei wird wie folgt verfahren:

Fixieren	Ethanol	10 %	
	Essigsäure	0,5 %	10 min
Färben	AgNO_3	1,9 g/l	20 min
Waschen	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$		3×5 sec
Entwickeln	NaOH	15 g/l	
	NaBH_4	120 mg/l	
	Formaldehyd (36 %)	4,4 ml/l	2–25 min
Stoppen	NaHCO_3	7,5 g/l	10 min

2.5.3 Gelelution von kleinen Nukleinsäuren aus einem PAA-Gel

Für eine Sequenzierung muss das zu sequenzierende Material möglichst in μg -Menge vorliegen. Um eine größeres Volumen Gesamt-RNA auftragen zu können und gleichzeitig eine bessere Abtrennung der kleinen von den restlichen RNAs zu erhalten, wird eine größere Gelkammer (Model S2 Sequencing Gel Electrophoresis Apparatus der Firma Biometra, Goettingen) verwendet. Die dazugehörigen Glasplatten haben eine Fläche von $31 \text{ cm} \times 38,5 \text{ cm}$ und die Spacer eine Dicke von 2 mm. Das Gel besteht aus 20 % PAA (40 % (19:1)), 8 M Harnstoff und $0,5 \times$ TBE. Es werden 300 ml Gellösung zum Gießen eines Gels benötigt, die mit 300 μl TEMED und 1600 μl APS zum Polymerisieren gebracht werden.

Das Gel muss mindestens 6 Stunden vorlaufen, damit sich die Ionen gleichmäßig verteilen. Die gesamte Zeit läuft das Gel Watt-gesteuert und somit bei maximaler Spannung und Stromstärke (Spannungsgerät eingestellt auf 3500 V und 400 mA). Nach einer Stunde bei 100 Watt, damit das Gel auf die gewünscht Temperatur aufgeheizt ist, wird es mindestens 5 Stunden bei 65 Watt ohne Proben laufen gelassen. Anschließend werden die Gesamt-RNA-Proben 1:1 mit Gelelutions-Auftragspuffer vermischt (siehe 2.1), bei 95°C für 5 Minuten erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Da hierbei nicht das parallele Auftrennen von unterschiedlichen Proben im Vordergrund steht, sondern die Abtrennung der kleinen RNAs von den restlichen, gibt es einen Kamm der 3 große Auftragstaschen formt, in die insgesamt ca. 4,5–5 ml Lösung passen. Anschließend läuft das Gel über Nacht für 10.200 Voltstunden (Vh) bei 65 W und anschließend bis zum nächsten Morgen bei 50 V - 400mA - 200W, damit die RNA nicht ungerichtet diffundiert. Nach dem Lauf werden die kleinen RNAs an Hand des Xylenxylanol-Markers großzügig ausgeschnitten, da sie auf dessen Höhe laufen. Anschließend werden die Gelstücke bei -20°C eingefroren. Zum einen können sie bei dieser Temperatur länger gelagert werden, zum anderen ist die Elutionseffizienz höher, wenn die Gelstücke einmal gefroren waren, da dadurch die Gelstruktur poröser wird und die RNAs besser eluiert werden können.

2.6. Enzymatische Reaktionen

Alle *in-vitro*-Transkriptionen wurden mit der DNA-abhängigen T7-RNA-Polymerase durchgeführt.

Die Bezeichnungen (+) und (–) geben an, welche Polarität das entsprechende Oligonukleotid hat. (+)-Sequenzen entsprechen der cPSTVd-Sequenz und können gegen (–)-Sequenzen hybridisieren. (–)-Sequenzen dagegen sind komplementär zum cPSTVd und hybridisieren gegen (+)-Sequenzen.

2.6.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Mittels PCR werden DNA-Transkriptionsmatrizen mit T7-Promotor amplifiziert, die in der Regel als Template für eine *in-vitro*-Transkription dienen. Mit Hilfe der unterschiedlichen Primer können z. B. Viertel-Sonden für Northernblot-Analysen (siehe Tabelle 2.1 und 2.2) oder ganze lineare Viroide (siehe Tabelle 2.3), mit oder ohne T7-Promotor, hergestellt werden. Für die PCR wird die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase der Firma Finnzymes benutzt. Obwohl sie im Gegensatz zu anderen DNA-Polymerasen teurer ist, besitzt sie eine Menge Vorteile: Die Phusion™-Polymerase hat eine Proof-reading-Aktivität, liefert eine höhere Produktausbeute und eine schnellere Polymerisation. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (Mastercycler® ep gradientS, Eppendorf, Hamburg). Alle Programme sind grundlegend gleich aufgebaut: Nach einer längeren Denaturierungsphase zu Beginn, folgen 36 Zyklen mit Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Polymerisationsphase, wobei die letzte Polymerisation besonders lang gewählt wird, damit möglichst viele Stränge zu Vollängen polymerisiert werden.

Zu Beginn wird ein Mastermix für alle Ansätze hergestellt, bestehend aus Wasser, HF-Puffer, dNTPs und Phusion-Polymerase. Die jeweiligen Primer und Templates werden in PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml) oder -Platten (twin.tec PCR plate 96, semi-skirted, max. well volume 250 µl + PCR-Film, Eppendorf, Hamburg) vorgelegt und anschließend mit dem Mastermix vermischt. Zusätzlich wird eine Negativkontrolle ohne DNA mitlaufen gelassen. In der Regel werden Ansätze mit je 50 µl Gesamtvolumen angesetzt. Die PCR-Programme werden abhängig von den Primerpaaren gewählt (siehe Tabelle 2.4), folgen aber alle dem gleichen Prinzip: Zuerst wird die Probe bei 98 °C denaturiert, anschließend bei 62–66 °C die PCR-Primer angelagert und zum Schluss die partiellen Doppelstränge bei 72 °C verlängert.

Nach dem PCR-Lauf, der ca. 1 Stunde dauert, wird 1 µl von jedem Ansatz auf ein denaturierendes PAA-Gel (2.5.1) aufgetragen und analysiert. Wurde das Fragment wie gewünscht amplifiziert, folgt eine Aufreinigung des PCR-Produkts mit dem PCR-Purification-Kit der Firma Qiagen (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden), um überschüssige Primer, Triphosphate und das Enzym zu entfernen. Im Anschluss wird die Konzentration der reinen PCR-Produkte am Spektralphotometer (Spectrophotometer V-650, Jasco, Groß-Umstadt) bestimmt (siehe 2.7).

Tabelle 2.1: Primer zur Herstellung von PSTVd-Sonden mit (–)-Orientierung. Alle Positionsangaben sind in (5' → 3') Orientierung. Die Positionen der Primer beziehen sich auf cPSTVd. Die Primer mit T7-Sequenz besitzen am 5'-Ende einen T7-Promotor (**T7** = TAA TAC GAC TCA CTA TA), dem je nach Sequenz bis zu 2 zusätzliche Gs folgen, da dadurch die Effektivität der T7-IVT erhöht wird. Diese Primer wurden über die Firma MWG-Biotech AG bezogen.

AF6 (+)	
Sequenz (5' → 3') :	CAA GAG CCC TCG AAG TCA ACA AAG G
Position im cPSTVd :	267-291
AF9 (+)	
Sequenz (5' → 3') :	TCA CCC TTC CTT TCT TCG GGT GTC CTT C
Position im cPSTVd :	180-207
AF21 (+)	
Sequenz (5' → 3') :	CGG AAC TAA ACT CGT GGT TC
Position im cPSTVd :	1-20
ND1 (+)	
Sequenz (5' → 3') :	GAA GGC GGC TCG GAG GAG
Position im cPSTVd :	61-78
ND2-T7 (–)	
Sequenz (5' → 3') :	T7 - GGA AGG ACA CCC GAA GAA AGG AAG GGT G
Position komplementär zu cPSTVd :	208-181
ND3-T7 (–)	
Sequenz (5' → 3') :	T7 - GGA ACC ACG AGT TTA GTT CCG
Position komplementär zu cPSTVd :	21-1
RGV1-T7 (–)	
Sequenz (5' → 3') :	T7 - GG - CCT GAA GCG CTC CTC CGA G
Position komplementär zu cPSTVd :	87-69
XC3-T7 (–)	
Sequenz (5' → 3') :	T7 - G - GCG GTT CTC GGG AGC TTC AGT TGT TTC C
Position komplementär zu cPSTVd :	294-267

PCR-Ansatz:	Komponenten	Endkonzentration	pro Reaktion
	5× Phusion HF-Puffer	1×	10 µl
	10 mM dNTPs	200 µM each	1 µl
	Primer A (25 pmol/µl)	0,5 µM	1 µl
	Primer B (25 pmol/µl)	0,5 µM	1 µl
	Template-DNA (1 ng/µl)	1 ng/25 µl	2 µl
	Phusion DNA-Polymerase	0,02 U/µl	0,5 µl
	H ₂ O		34,5 µl

Tabelle 2.2: Primer zur Herstellung von PSTVd-Sonden mit (+)-Orientierung. Alle Positionsangaben sind in (5' → 3') Orientierung. Die Positionen der Primer beziehen sich auf cPSTVd. Die Primer mit T7-Sequenz besitzen am 5'-Ende einen T7-Promotor (**T7** = TAA TAC GAC TCA CTA TA), dem je nach Sequenz bis zu 2 zusätzliche Gs folgen, da dadurch die Effektivität der T7-IVT erhöht wird. Diese Primer wurden freundlicherweise von Dr. Petra Stroeks zur Verfügung gestellt und über die Firma biomers.net bezogen.

PS2 (+) + T7	
Sequenz (5' → 3') :	T7 - GGT TCC TCG GAA CTA AAC TCG
Position im cPSTVd :	353-14
PS3 (+) + T7	
Sequenz (5' → 3') :	T7 - GGC TCG GAG GAG CGC TTC AGG
Position im cPSTVd :	67-87
PS6 (+) + T7	
Sequenz (5' → 3') :	T7 - G - GCT TCG GCT ACT ACC CGG
Position im cPSTVd :	249-266
PS8 (+) + T7	
Sequenz (5' → 3') :	T7 - GGT TTT CAC CCT TCC TTT CTT CG
Position im cPSTVd :	175-197
PS1 (-)	
Sequenz (5' → 3') :	CAG TTC GCT CCA GGT TTC CCC GGG G
Position komplementär zu cPSTVd :	91-115
PS4 (-)	
Sequenz (5' → 3') :	GAA AAC CCT GTT TCG GCG GGA ATT ACT CC
Position komplementär zu cPSTVd :	153-181
PS5 (-)	
Sequenz (5' → 3') :	CGA GGA ACC AAC TGC GGT TCC AGG
Position komplementär zu cPSTVd :	337-2
PS7 (-)	
Sequenz (5' → 3') :	GCG GTT CTC GGG AGC TTC AGT TGT TTC C
Position komplementär zu cPSTVd :	268-295

2.6.2 RT-PCR

Um sicher zu gehen, dass die Pflanzenproben auch mit der gewünschten PSTVd-Variante infiziert sind, bzw. Mock-Pflanzen keine ungewollte Infektion haben, wird mit den Gesamt-RNA-Proben eine RT-PCR durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine reverse Transkription (RT) (2.6.2.1) mit anschließender PCR (siehe 2.6.1). Bei der reversen Transkription wird aus RNA DNA hergestellt, die anschließend durch die PCR vervielfältigt wird. Somit kann schon bei kleinen Mengen RNA verfolgt werden, ob diese auch die gewünschte Sequenz hat bzw. überhaupt vorhanden ist. Das RT-PCR-Produkt wird zur Sequenzierung (Firma StarSEQ®, Mainz) eingeschickt.

Tabelle 2.3: Primer zur Herstellung von Viroid-Volllängen. Alle Positionsangaben sind in (5' → 3') Orientierung. Die Positionen der Primer beziehen sich auf die PSTVd-Variante AS1. Die Primer mit T7-Sequenz besitzen am 5'-Ende einen T7-Promotor (**T7** = TAA TAC GAC TCA CTA TA), dem je nach Sequenz bis zu 2 zusätzliche Gs folgen, da dadurch die Effektivität der T7-IVT erhöht wird. Sie dienen der Herstellung von AS1-Volllängen mit und ohne T7-Promotor. Diese Primer wurden zum Teil von Dr. Axel Schmitz zur Verfügung gestellt und über die Firma biomers.net bezogen.

AS1-T7

Sequenz (5' → 3') : **T7** - GGC CGA CAG GAG TAA TTC C
Position in AS1 : 145-163

AS1 tr

Sequenz (5' → 3') : GGC CGA CAG GAG TAA TTC CC
Position in AS1 : 145-164

AS2-T7

Sequenz (5' → 3') : **T7** - G - GCT GGG CAC TCC CCA C
Position komplementär zu AS1 : 144-129

AS2

Sequenz (5' → 3') : GCT GGG CAC TCC CCA C
Position komplementär zu AS1 : 144-129

AS1 tr	+ AS2	=	exakte Volllänge
AS1-T7	+ AS2	=	Volllänge mit T7-Promotor in (+)-Orientierung
AS2-T7	+ AS1 tr	=	Volllänge mit T7-Promotor in (–)-Orientierung

2.6.2.1 Reverse Transkription (RT)

Für die reverse Transkription (siehe Tab. 2.5) wird zuerst die Gesamt-RNA mit Primer und dNTPs für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und danach schnell auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von First-Strand-Buffer und DTT wird die Probe gemischt und 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Nach der Zugabe der SuperScript™ II RT (SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen, Karlsruhe) wird nochmals für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Reaktion wird die Probe für 15 Minuten bei 70 °C erhitzt. Nach Aussagen der Firma Finnzymes, Hersteller der von uns genutzten Phusion-Polymerase, soll es kein Problem darstellen, bis zu 1/10 Volumen der cDNA in die PCR-Reaktion einzusetzen. Für die PCR (siehe 2.6.1) wird „AS2“ als Reverse- und „AS1 tr“ als Forward-Primer benutzt.

2.6.3 In-vitro-Transkription mit T7-RNA-Polymerase (nach Hecker)

Diese Standard *in-vitro*-Transkription wird zur Herstellung von unterschiedlichsten RNAs benutzt. Dafür werden durch PCR (siehe 2.6.1) DNA-Stränge mit T7-Promotor hergestellt, die bei der anschließenden *in-vitro*-Transkription (Hecker, 1989) als Matrizen dienen.

Tabelle 2.4: PCR-Programme. Die hier angegebenen PCR-Programme gelten für die Benutzung des Thermocyclers Mastercycler® ep gradientS von Eppendorf mit den angegebenen Primerpaaren. Für unterschiedliche Primer-Paare wurden die PCR-Zyklen mit den folgenden optimierten Annealingtemperaturen durchgeführt.

Annealing 62 °C			Annealing 64 °C			Annealing 66 °C		
1×	30 sek	98 °C	1×	30 sek	98 °C	1×	30 sek	98 °C
35×	10 sek	98 °C	35×	10 sek	98 °C	35×	10 sek	98 °C
	13 sek	62 °C		13 sek	64 °C		13 sek	66 °C
	10 sek	72 °C		10 sek	72 °C		10 sek	72 °C
1×	10 sek	98 °C	1×	10 sek	98 °C	1×	10 sek	98 °C
	13 sek	62 °C		13 sek	64 °C		13 sek	66 °C
	5 min	72 °C		5 min	72 °C		5 min	72 °C

Annealing 62 °C

AS1 tr + AS2 = exakte Volllänge

Annealing 64 °C

AS1-T7 + AS2 = Volllänge mit T7-Promotor in (+)-Orientierung

AS2-T7 + AS1 tr = Volllänge mit T7-Promotor in (–)-Orientierung

Annealing 66 °C

PS1 + PS2-T7 = oben.links.(+)

PS4 + PS3-T7 = oben.rechts.(+)

PS7 + PS8-T7 = unten.rechts.(+)

PS5 + PS6-T7 = unten.links.(+)

AF21 + RGV1-T7 = oben.links.(–)

ND1 + ND2-T7 = oben.rechts.(–)

AF9 + XC3-T7 = unten.rechts.(–)

AF6 + ND3-T7 = unten.links.(–)

benötigte Puffer: 5× IVT A 100 mM NaH₂PO₄, pH 7.7

50 mM DTT

5× IVT A 40 mM MgCl₂

20 mM Spermidin-HCl, pH 7.7

Reaktionsansatz: 50 nM Template-DNA

1× IVT A

1× IVT B

1 mM rNTPs

0,5 U/μl Ansatz RNasin® (40 U/μl, Promega)

Die Proben werden für 4 Stunden bei 37 °C inkubiert, wobei nach 2 Stunden erneut 1 μl T7-Polymerase zugegeben wurde. Anschließend wird die Reaktion mit 10 mM EDTA abgestoppt. Um die Transkripte aus dem Reaktionsansatz zu erhalten, wurde eine NH₄OAc-Ethanol-Fällung (wie in 2.3.2 beschrieben) zur Abtrennung der nicht eingebauten Mononukleotide durchgeführt.

Tabelle 2.5: Vorgehen bei der RT. Reverse Transkription für eine RT-PCR aus Gesamt-RNA zum Nachweis von AS1-Volllänge.

1.	20 pmol	Primer (AS2)	1 μ l	→ 1 pmol
	5 μ g	Gesamt-RNA	x	
	10 mM	dNTPs	1 μ l	→ 0,83 mM
			ad 12 μ l H ₂ O _{dest}	
	5 Min - 65 °C - schnell auf Eis abkühlen			
2.	1. + 5×	First-Strand-Buffer	4 μ l	
	+ 0,1 M	DTT	2 μ l	→ mixen
	2 Min - 42 °C - inkubieren			
3.	200 U	SuperScript™ II RT	1 μ l	
			ad 20 μ l H ₂ O _{dest}	→ mixen
	50 Min - 42 °C - inkubieren			
4.	Inaktivieren der Reaktion			
	15 Min - 70 °C			⇒ PCR

Tabelle 2.6: PCR-Programm für RT-PCR. PCR-Programm für eine RT-PCR mit dem RT-Primer „AS2“ und dem Forward-Primer „AS1 tr“.

1×	30 sek	98 °C
35×	10 sek	98 °C
	13 sek	64 °C
	10 sek	72 °C
1×	10 sek	98 °C
	13 sek	64 °C
	5 min	72 °C

Die gefällten Transkripte werden in 1× TE resuspendiert und bei -20 °C aufbewahrt. Ein kleines Aliquot der Proben wird auf ein denaturierendes PAA-Gel aufgetragen, um sie auf eventuelle Strangabbrüche hin zu überprüfen.

2.6.4 *In-vitro*-Transkription mit T7-RNA-Polymerase (RiboMAX™ von Promega)

Bei der *in-vitro*-Transkription nach Anleitung der Firma Promega dient deren „Technical Bulletin“ mit dem Titel „RiboMAX™ Large Scale RNA Production Systems – SP6 and T7“ als Hilfe.

Tabelle 2.7: 5× RiboMAX™ -Transkriptionspuffer. Stamm-Pufferlösung für die RiboMAX™ *-in-vitro*-Transkription mit T7-Polymerase nach Promega. Dieser Puffer kann in größerer Menge hergestellt und in Aliquots bei -20 °C gelagert werden.

400 mM	HEPES-KOH (pH 7.5)
150 mM	MgCl ₂ (für T7-Polymerase)
10 mM	Spermidin
200 mM	DTT
0,05 %	Triton X-100

Tabelle 2.8: Reaktionsansatz für die RiboMAX™ *-in-vitro*-Transkription.

50 nM	Template (z. B. PCR-Produkt)
1×	RiboMAX™ -Transkriptionspuffer
5 mM	rNTPs (each)
1 Volumen- %	RNasin® ($\hat{=}$ 1 μ l / 100 μ l Reaktion)
0,1 U / μ l	Pyrophosphatase
200 U / 100 μ l Ansatz	T7-Polymerase

Darin ist beschrieben, auf was bei dem jeweiligen System geachtet werden sollte und welche Faktoren verändert werden können, um die Bedingungen zu optimieren. Triton X-100 wird verwendet, damit die Proteine in Lösung gehalten werden und somit besser reagieren können. Die Pyrophosphatase katalysiert die Hydrolyse von anorganischem Pyrophosphat zu zwei Orthophosphaten. Dieses Enzym benötigt ein zweiwertiges Metallion, wobei man die höchste Aktivität mit Mg²⁺ erhält. Diese Methode wird verwendet, um Sonden für die Northernblot-Analyse aus PCR-Produkten herzustellen, die einem Viertel des PSTVd entsprechen.

Die RiboMAX™ *-in-vitro*-Transkription dient zur Synthese von großen Mengen RNA - bis hin zu Milligramm. Dafür wird die Reaktion, wie in Tabelle 2.8 beschrieben, zusammenpipettiert, gut gemischt und bei 37 °C inkubiert. Nach 2 Stunden wird nochmals dieselbe Menge an T7-Polymerase zugegeben und für 2 weitere Stunden inkubiert. Im Anschluss muss die Template-DNA verdaut werden. Dazu werden nochmals 10 mM MgCl₂ und 1 mM CaCl₂ hinzu gegeben, sowie 1 U Turbo DNase™ (Ambion, Austin, USA) pro μ g DNA. Anschließend wird nochmal für 1/2 Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 40 mM EDTA wird die Reaktion abgestoppt. Nun folgt noch eine Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe 2.2) und eine PEG-Fällung (siehe 2.3.3), bei der die Lösung auf 20 % PEG₆₀₀₀ eingestellt wird. Anschließend wird das Pellet getrocknet und in 20 μ l 5 mM Tris/HCl pH 8.0 gelöst.

Es ist wichtig zu beachten, dass man den Ansatz bei Raumtemperatur zusammen gibt, da somit die Gefahr minimiert wird, dass die DNA in Gegenwart des Spermidins aus dem Transkriptionspuffer präzipitiert. Außerdem darf die Reaktion nicht vor Vollendung des DNase-Verdaus eingefroren werden.

2.6.5 5'-[³²P] pCp-Endmarkierung von RNAs

Die RNA-Sonden für die Northernblot-Analyse werden mit *in-vitro*-Transkription (siehe 2.6.4) hergestellt und mit 5'-[³²P]-pCp endmarkiert (Bruce & Uhlenbeck, 1978), das eine Halbwertszeit von etwa 14 Tagen hat. Bei dieser Reaktion katalysiert die T4-RNA-Ligase (New England BioLabs, Frankfurt am Main) die Addition des 3',5'-Bisphosphats an das 3'-Ende der RNA. Dadurch entsteht ein RNA-Molekül mit einem 3'-terminalen Phosphat, das ein Nukleotid länger ist. Es ist wichtig, dass das im Reaktionsansatz verwendete DMSO (Dimethylsulfoxid) möglichst frisch ist, da dies die Markierungseffizienz stark erhöht.

Reaktionsansatz:	0,5–1 µg	RNA	
	20 µCi	5'-[³² P]-pCp	
	5 U	T4-RNA-Ligase	
	1×	T4-RNA-Ligase-Puffer	
	10 %	DMSO	ad 20 µl H ₂ O _{dest}

Die Ansätze werden zusammenpipettiert und über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend werden sie mit 2,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen Ethanol (96 %) gefällt (siehe 2.3.2), was der Abtrennung nicht eingebauter Mononukleotide dient. Die Pellets werden nach dem Trocknen in 10 mM Tris/HCl pH 8.0 gelöst und im Szintillationszähler (multi-purpose Scintillation counter, Beckman, Fullerton, USA) vermessen, um die Markierungseffizienz zu bestimmen.

2.7. Spektralphotometrie

Um die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung zu bestimmen, werden UV-Spektren von 220 bis 340 nm in einem Spektralphotometer (Spectrophotometer V-650, Jasco, Groß-Umstadt) aufgenommen. Die Konzentration kann wie folgt berechnet werden:

RNA	1 OD _{260nm}	=	40 ng/µl
DNA	1 OD _{260nm}	=	50 ng/µl
Oligonukleotid	1 OD _{260nm}	=	33 ng/µl

Zur genaueren Berechnung wird der Wert bei 320 nm von der OD bei 260 nm abgezogen, um die Schwankungen zur Nulllinie auszugleichen. Anschließend wird der erhaltene Wert mit der Konzentration bei 1 OD der jeweiligen Nukleinsäure und dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Endkonzentration der Probe zu erhalten.

2.8. Northernblot-Analysen

2.8.1 Herstellung der Sonden

Für die Northernblot-Analyse werden unterschiedliche Hybridisierungs-Sonden benötigt, um sowohl PSTVd in (+)- als auch in (–)-Orientierung nachweisen zu können. Per Definition

entsprechen (+)-Stränge der PSTVd-Sequenz, (–)-Stränge sind ihr komplementär. Die Sonden wurden so gewählt, dass sie jeweils ca. 1/4 des PSTVd-Stäbchens entsprechen und an den Schnittstellen überlappen. Zuerst wird mit Hilfe einer PCR (siehe 2.6.1) ein entsprechendes DNA-Template hergestellt, welches anschließend durch eine *in-vitro*-Transkription (siehe 2.6.4) in RNA umgeschrieben wird. Diese RNA wird 5'-[³²P]-pCp-endmarkiert (siehe 2.6.5) und dient als radioaktiv-markierte RNA-Sonde zum Nachweis von PSTVd. Im folgenden sind die Viertel-Sonden mit ihren jeweiligen Primerpaaren, ihrer genauen Länge und Lage im PSTVd angegeben.

PSTVd-Bereich	(+)-Primer	(–)-Primer	Stamm	synthetisierte Sequenz
oben.links_(–)	AF21	RGV1-T7	QFA AS1	1-88 + T7-Promotor = 106 Nt 1-87 + T7-Promotor = 105 Nt
oben.rechts_(–)	ND1	ND2-T7	QFA AS1	62-209 + T7-Promotor = 165 Nt 61-208 + T7-Promotor = 165 Nt
unten.rechts_(–)	AF9	XC3-T7	QFA AS1	181-296 + T7-Promotor = 134 Nt 180-295 + T7-Promotor = 134 Nt
unten.links_(–)	AF6	ND3-T7	QFA AS1	269-21 + T7-Promotor = 130 Nt 268-21 + T7-Promotor = 131 Nt
oben.links_(+)	PS2-T7	PS1	QFA AS1	353-151 + T7-Promotor = 139 Nt 353-151 + T7-Promotor = 139 Nt
oben.rechts_(+)	PS3-T7	PS4	QFA AS1	67-181 + T7-Promotor = 132 Nt 67-181 + T7-Promotor = 132 Nt
unten.rechts_(+)	PS8-T7	PS7	QFA AS1	175-295 + T7-Promotor = 138 Nt 175-295 + T7-Promotor = 138 Nt
unten.links_(+)	PS6-T7	PS5	QFA AS1	249-2 + T7-Promotor = 131 Nt 249-2 + T7-Promotor = 131 Nt

2.8.2 Längenstandard mit PSTVd-Sequenz

Um einen geeigneten Längenstandard zu erhalten, der einem Auskunft über die Länge der kurzen RNAs gibt, wurden auf Grund des Kosten-Nutzen-Faktors kurze RNAs mit unterschiedlichen Längen bei der Firma CureVac (Tübingen) bestellt. Die Herstellung per Transkription und Gelelution, wie in der Diplomarbeit geschehen (Diermann, 2005), stand mit ihrem enormen Materialverbrauch und Arbeitsaufwand in keinem Verhältnis zu den RNA-Mengen, die am Ende resultierten. Alle Oligonukleotide wurden HPLC-aufgereinigt, aber nicht geleluert, wodurch die Proben durch Nukleotidabbrüche hervorgerufene Leitern aufweisen. Diese werden durch die 1 % -ige Synthese-Fehlerrate hervorgerufen. Es wurden jeweils vier RNA-Oligonukleotide pro Orientierung ausgesucht (siehe Tabelle), die je einem Viertel des PSTVd zugeordnet werden können und nicht in den Bereichen der Mutationen liegen. Somit können sie nicht nur als

Tabelle 2.9: Sequenzen der kurzen synthetischen RNAs. Diese kurzen, synthetisch hergestellten RNAs der Firma CureVac dienen als Längenstandard bei PAGE und Northernblots. Alle Sequenzen sind in (5'→3')-Orientierung angegeben. Per Definition entsprechen (+)-Stränge der PSTVd-Sequenz, (-)-Stränge sind ihr komplementär

Bereich	Sequenz	Länge
oben_links_(+)	UUC CUG UGG UUC ACA CCU GA	20 Nt
oben_rechts_(+)	GAA ACC UGG AGC GAA CUG GCA AAA AA	26 Nt
unten_rechts_(+)	GCG CUG UCG CUU CGG CUA CUA	21 Nt
unten_links_(+)	UGU UUA GCC CUU GGA ACC GCA GU	23 Nt
oben_links_(-)	GUC AGG UGU GAA CCA CAG GAA	21 Nt
oben_rechts_(-)	GAA UUA CUC CUG UCG GCC GCU G	22 Nt
unten_rechts_(-)	AGG AAG GAC ACC CGA AGA AA	20 Nt
unten_links_(-)	AAC UGC GGU UCC AAG GGC UAA ACA	24 Nt

Längenstandard, sondern auch als Positiv- bzw. Negativkontrolle bei der Northernblot-Analyse dienen.

2.8.3 Elektrotransfer der Nukleinsäure aus einem PAA-Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran

Zum spezifischen Nachweis der PSTVd-Nukleinsäure-Sequenz werden Northernblot-Analysen gemacht. Dazu werden die Nukleinsäuren zuerst durch eine denaturierende PAA-Gelelektrophorese (siehe 2.5.1) aufgetrennt und anschließend durch Elektrotransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Hybond™-N+, 0,45 μm, GE Healthcare, Buckinghamshire, England) transferiert. Der Nukleinsäure-Transfer erfolgt in einer „semi dry“-Kammer (The Panther™ Semidry Electrobloater, Model HEP-1, Owl Separation Systems, Thermo Scientific, Portsmouth), in der das Gel mit der Membran, wie in Abb. 2.2 gezeigt, in Whatman-Papier (Chromatography-Paper, 3 mm, Whatman International Ltd., Maidstone, England) eingebettet wird.

Es muss darauf geachtet werden, dass jede einzelne Schicht luftblasenfrei aufgelegt wird, um einen optimalen Transfer zu gewährleisten. Durch das elektrische Feld wird die Nukleinsäure aus dem PAA-Gel auf die Membran transferiert. Dies erfolgt für 30 Minuten bei einer Spannung von 14 V und einer Stromstärke von 400 mA.

2.8.4 Fixierung der Nukleinsäure auf der Nylonmembran

Nach dem Nukleinsäuretransfer wird die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht kovalent auf der Nylonmembran fixiert. Dafür wird eine UV-Crosslink-Apparatur (UV-Stratalinker™ 1800, Firma Stratagene) mit einer Wellenlänge von 254 nm verwendet. Hierbei wird eine kovalente Bindung zwischen der Aminogruppe der Nylonmembran und dem Uracil der RNA ausgebildet. Da es sich

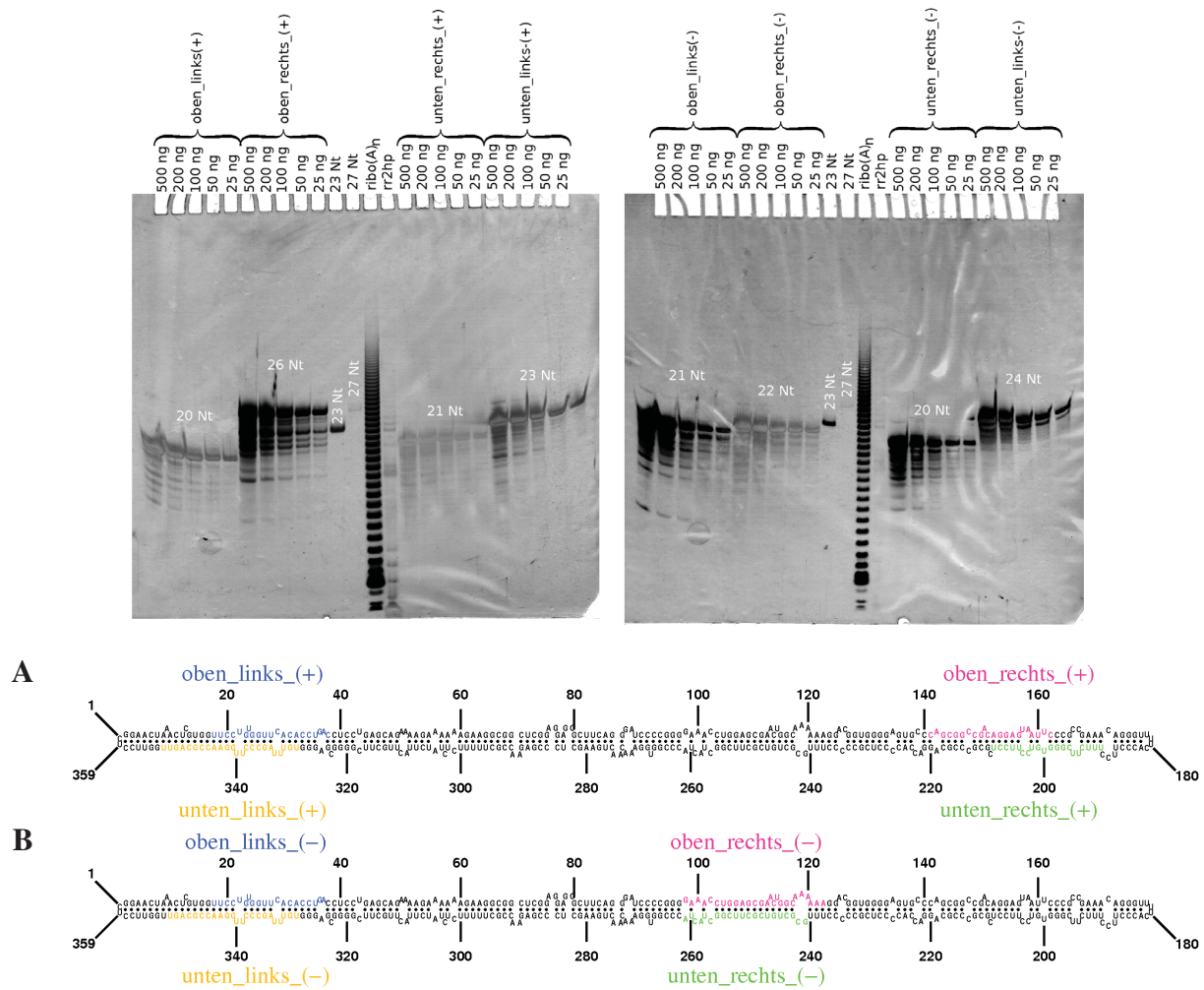


Abbildung 2.1: Kurze synthetische RNAs. Die abgebildeten, denaturierenden 20 %-PAA-Gele, mit einem Vernetzungsgrad von 19:1 (Acrylamid:Bisacrylamid), enthalten 8 M Harnstoff und 0,5× TBE. Die Gele wurden anschließend mit Silbernitrat gefärbt. Zu sehen sind alle 8 synthetisch hergestellten RNAs (Firma CureVac), die als Längenstandard dienen, sowie als spezifische Marker bei der Northernblot-Analyse. Unter den Gelen wird die Lage der synthetischen RNAs mit PSTVd-Sequenz anhand des Viroids dargestellt. (A) zeigt die kurzen, synthetischen (+)-Sequenzen, (B) die Sequenzen in (-)-Orientierung.

beim Crosslinking um eine Reaktion handelt, die zufällig eintritt, ist die Wahrscheinlichkeit bei langen RNAs größer, dass eine oder mehrere Basen kovalent an die Membran gebunden werden, als bei den kurzen RNAs. Dieses Problem wird dadurch minimiert, dass eine positiv geladene Membran (Amersham Hybond™ -N+, 0,45 μm, GE Healthcare, Buckinghamshire, England) verwendet wird. Die Membran wird mit AutoCrosslink bestrahlt, was einer Energie von 120 mJ entspricht. Anschließend wird die Membran sofort in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben und prähybridisiert.

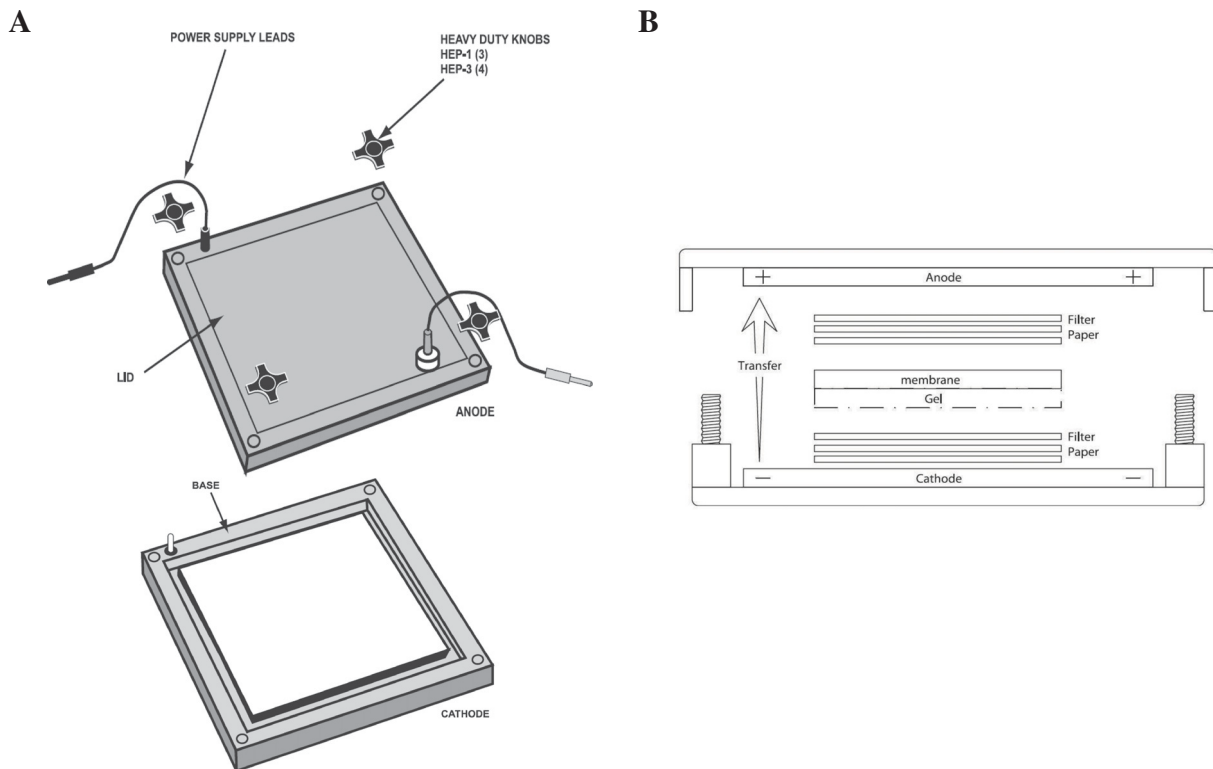


Abbildung 2.2: Semidry Elektrophoretische Apparatur & Blotaufbau. In dieser Abbildung ist der Semidry Electrophoret, „The Panther™“ der Firma Thermo Scientific zu sehen (Abb. aus dem Handbuch übernommen). (A) Blotapparat in ihren Einzelteilen, (B) Aufbau eines Blots.

2.8.5 Hybridisierung

Zum Nachweis der kurzen, kovalent an die Membran fixierten RNAs werden transkribierte, 5'-[³²P]-pCp endmarkierte PSTVd-Sonden (2.8.1, 2.6.4, 2.6.5) verwendet. Hierzu wird die Membran zunächst gerollt in ein ca. 20 cm hohes Hybridisierungsröhrchen gegeben und mit 5 ml Hybridisierungslösung für mindestens 30 Minuten bei 65 °C in einem Hybridisierungssofen (Modell OV 2, Biometra, Göttingen) prähybridisiert. Wichtig bei jedem Schritt im Hybridisierungssofen ist die richtige Orientierung der im Ofen platzierten Röhrchen, um ein Aufrollen der Membran zu verhindern (siehe Abb. 2.3). Im Anschluss werden 10⁶ cpm Sonde pro ml Hybridisierungslösung zugegeben und über Nacht bei 65 °C hybridisiert.

Hybridisierungslösung:	5×	Denhardt's Reagenz
		(100× ≙ 2 % BSA
		2 % Ficoll 400
		2 % Polyvinylpyrrolidon PVP-360)
	5×	SSC
	0,1 %	SDS
	250 µg/ml	Heringssperm-DNA

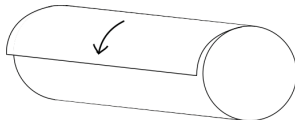


Abbildung 2.3: Schematische Abbildung der richtigen Membranorientierung im Hybridisierungssofen. Um sicher zu gehen, dass die Membran sich im Hybridisierungssofen nicht aufrollt, sondern ausgerollt im Hybridisierungsröhrchen liegt, muss die Membran in der richtigen Orientierung in den Ofen gespannt werden. Der Pfeil zeigt die Rotationsrichtung des Hybridisierungssofen an.

Die Hybridisierungslösung kann mehrfach verwendet und bei -20°C gelagert werden, solange die Sonden noch ausreichend radioaktiv sind ($t_{1/2} = 2$ Wochen). Um ungebundene Sonden zu entfernen und die Spezifität zu erhöhen, werden die Membranen anschließend gewaschen. Zuerst werden sie bei RT kurz abgespült, danach zweimal bei 55°C für 30 Minuten im Hybridisierungssofen gewaschen.

Waschlösung : 2× SSC
 0,1 % SDS

Anschließend werden die Membranen in Frischhaltefolie eingeschlagen und bei -70°C in einen Röntgenfilm (Kodak X-Omat AR) gegen die Membran exponiert.

2.8.6 Autoradiographie

Kodak X-Omat AR-Filme werden gegen alle radioaktiv markierten Northernblot-Membranen in Expositions-kassetten exponiert. Die in Frischhaltefolie eingeschlagenen Membranen werden bei -70°C in der Regel mit Verstärkerfolie/Screen für einige Stunden bis hin zu einer Woche exponiert.

2.8.7 Entwicklung der Filme

Die exponierten Filme werden in einer Entwicklungsmaschine (Agfa Curix 60, Agfa) automatisch entwickelt. Diese Maschine besitzt drei Regenerierflaschen mit Entwicklerlösung (Euromed[®] E1000 - 3-teilig), Fixierlösung (Euromed[®] F1000 - 2-teilig) und Wasser. Die Lösungen können nach Bedarf mit Wasser angesetzt werden.

Bei dieser Maschine sind keine weiteren Einstellungen nötig und die Filme kommen im getrockneten Zustand heraus.

2.9. Sequenzierung

2.9.1 Elektro-Gelelution

Die Elektro-Gelelution wurde mit einer Salzfalle (siehe Abb. 2.4) der Firma Biometra (HSB-Elutor E51, Biometra[®], Göttingen) durchgeführt. Dieses Gerät ist zur membranfreien elektrophoretischen Elution und Konzentration von Makromolekülen, im besonderen von Nukleinsäuren,

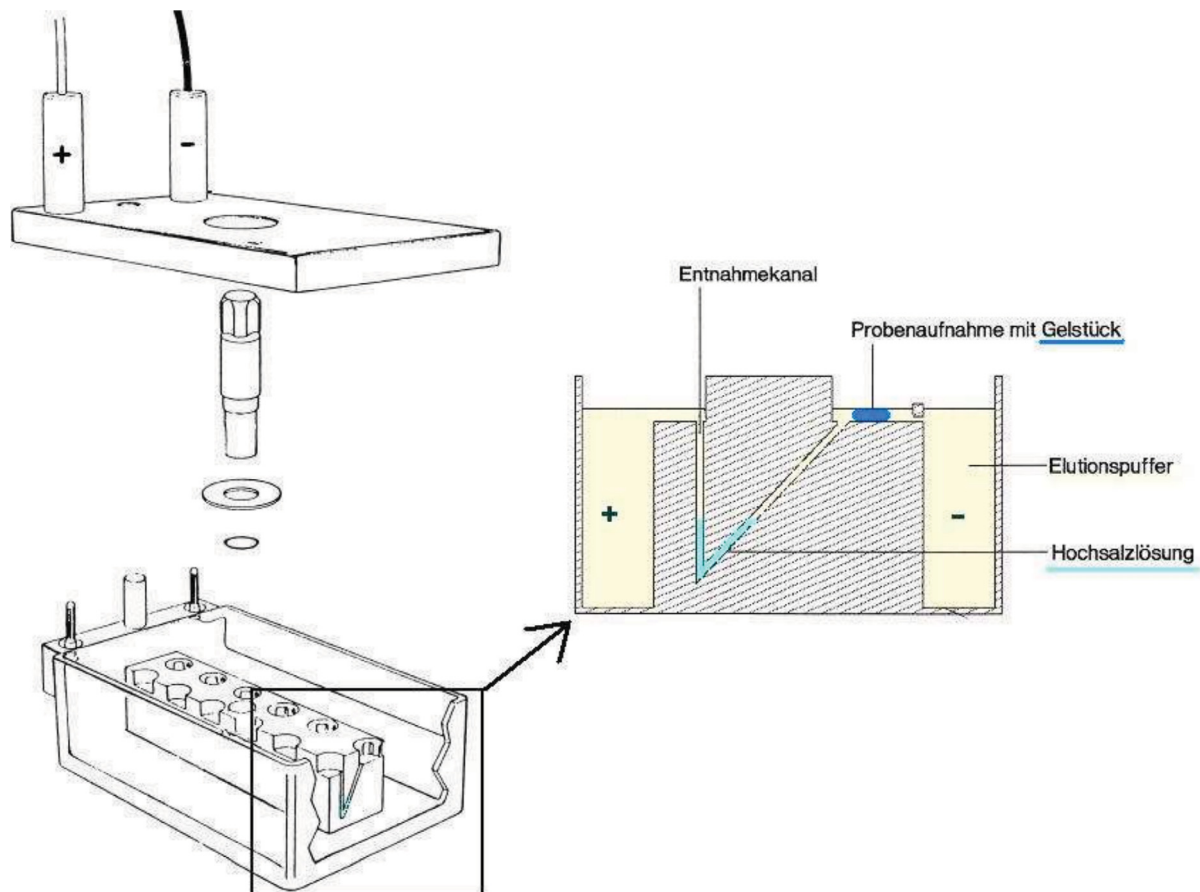


Abbildung 2.4: Aufbau einer Salzfall zur Elektro-Gelelution. Gezeigt wird die Apparatur HSB-Elutor E51 der Firma Biometra® (Abb. abgewandelt aus den dt. & engl. Handbüchern). Auf der linken Seite ist der Aufbau der Gelelutions-Kammer als Übersicht dargestellt. Auf der rechten Seite wird zum besseren Verständnis ein Querschnitt gezeigt.

aber auch Proteinen, aus Agarose- oder Polyacrylamidgelen. Das Prinzip basiert auf der unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilität von Makromolekülen in Abhängigkeit von der Ionenstärke des umgebenden Milieus. Da das elektrische Feld in der Hochsalzlösung geringer ist, wandern die Moleküle dort langsamer. Die zu eluierenden Gelstücke befinden sich in einem Puffer niedrigerer Ionenstärke. Die Elektroelution erfolgt in Richtung eines V-förmigen Kanals, in dem sich eine Hochsalzlösung befindet. Sobald die Makromoleküle die Grenzschicht zur Hochsalzlösung erreichen, verlangsamt sich deren Transportgeschwindigkeit erheblich und es kommt zu einer Aufkonzentrierung der Makromoleküle in der Hochsalzlösung. Die eluierten Makromoleküle können anschließend in einem relativ kleinen Volumen leicht entnommen werden (HSB-Elutor E51 - Handbuch).

Die Kammer wird mit ca. 440 ml 0,5× TBE (entsprechend der Pufferkonzentration, mit der das zu eluierende Gel gelaufen ist) gefüllt, sodass die Probenaufnahmen bedeckt sind. Durch das geöffnete Ventil wird in beiden Puffer-Reservoirs ein gleichmäßiger Flüssigkeitsstand eingestellt. Anschließend werden die V-förmigen Elutionskanäle mit einer Spritze durchgespült, damit sie luftblasenfrei sind. Um besser sehen zu können, ob eine scharfe Phasengrenze zwischen

Hochsalzlösung und Elutionspuffer vorhanden ist, wird die Natriumacetat-Lösung (NaOAc) mit 0,0012 % Xylenxyanol als Farbstoff versetzt. 50 μ l Hochsalzlösung (3 M NaOAc, pH 6.0) werden mit Hilfe einer ausgezogenen Pipettenspitze in die Elutionskanäle luftblasenfrei unterschichtet. Nach dem Unterschichten muss dafür gesorgt werden, dass es zu keinem Zeitpunkt zu Erschütterungen oder Vibrationen der Salzfalle kommt. Dies führt zu einem Verwischen der Grenzschichten, was eine erhebliche Verschlechterung der Konzentration des eluierten Materials bedeutet und somit äußerst schlechte Rückgewinnungsraten. Die 6 Probenaufnahmen können jeweils mit einem Gelvolumen bis zu 0,5 ml gefüllt werden, wobei die Gelstücke in möglichst kleine Stücke geschnitten werden. Durch Anlegen der gewünschten Spannung (100 V - 50 mA - 100 W) werden die Gelstücke für 2 Stunden eluiert. Anschließend wird das eluierte Material durch den geraden Schenkel des Elutionskanals vorsichtig mit einer ausgezogenen Pipettenspitze entnommen. Damit das zu fällende Volumen möglichst gering gehalten wird, sollte nur die Hochsalzlösung abpipettiert werden.

Nach der Gelelution müssen die Proben mit einer Ethanol-Fällung (2.3.1) gefällt werden. Damit möglichst der Probenverlust an RNA durch Wechselwirkung mit der Kunststoffoberfläche des Gefäßes vernachlässigt werden kann, werden hierfür DNA LoBind Tubes (2 ml, Eppendorf, Hamburg) benutzt, die eine Wiedergewinnung von DNA/RNA zu nahezu 100% gewährleisten, insbesondere bei hohen Salzkonzentrationen. Zu den 50 μ l 3 M NaOAc werden 450 μ l H₂O_{auto} und 1250 μ l EtOH (96%) dazu gegeben. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis werden die Reaktionsgefäße für 45 Minuten bei 13.200 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, werden die nächsten 50 μ l NaOAc in das gleiche Reaktionsgefäß gefällt. Das Ganze wird so lange wiederholt, bis die kompletten ausgeschnittenen Gelstücke eine Gels (2.5.3) geeluliert und die erhaltene RNA gefällt wurde. Pro Gel wird in 10 Reaktionsgefäßen gleichzeitig gefällt. Anschließend werden alle Pellets 30 Minuten bei 4 °C mit 70 % Ethanol (v/v) gewaschen und die Pellets an der Luft getrocknet. Zum Schluss werden die Pellets in insgesamt 60 μ l 5 mM Tris/HCl pH 8.0 gelöst und am Spektralphotometer die Konzentration mit einer 1:10 Verdünnung bestimmt (siehe 2.7).

2.9.2 Herstellung von biotinylierten *in-vitro*-Transkripten mit T7-RNA-Polymerase (nach Hecker)

Zur Herstellung von biotinylierten *in-vitro*-Transkripten wird zuerst eine rNTP-Mischung, die Biotin-16-UTP (Biotin-16-uridine-5'-triphosphate, Roche Diagnostics, Mannheim) enthält, benötigt. Da das Bio-UTP in einer Gesamtkonzentration von 10 mM in 25 μ l vorliegt, kann man es am effektivsten nutzen, indem man 70 μ l 10 $\times$ Bio-rNTPs herstellt und diese auf zwei Transkriptionsansätze à 350 μ l verteilt.

10$\times$ Bio-rNTPs:	10	mM	GTP
	10	mM	CTP
	10	mM	ATP
	6,5	mM	UTP
	3,5	mM	Bio-UTP

Tabelle 2.10: Beispiel zur Berechnung der nanomolaren Template-Menge. Rechenweg zur benötigten Menge AS1-VL, um einen Reaktionsansatz mit 50 nM Template zu erhalten.

$$\begin{aligned}
 \text{AS1-VL} + \text{T7-Promotor} &= 359 + 17 = 376 \text{ Nt} \\
 376 \times 660 \text{ g/mol} &= 248.160 \text{ g/mol} \hat{=} 1 \text{ M} = 1 \cdot 10^9 \text{ nM} \\
 \frac{248.160 \text{ g/mol}}{x} &\hat{=} \frac{1 \cdot 10^9 \text{ nM}}{50 \text{ nM}} \\
 x &= \frac{50 \text{ nM} \cdot 248.160 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{10^9 \text{ nM}} = 0,012408 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 12,4 \cdot 10^{-3} \frac{\text{g}}{\text{mol}} \hat{=} 12,4 \cdot 10^{-3} \frac{\text{g}}{\text{l}} = 12,4 \cdot 10^{-9} \frac{\text{g}}{\mu\text{l}} = 12,4 \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \\
 &\Rightarrow 12,4 \text{ ng}/\mu\text{l} \Rightarrow 4340 \text{ ng} / 350 \mu\text{l}
 \end{aligned}$$

Die Biotinylierung von Vollängen-PSTVd (VL-PSTVd) per Hecker-Transkription funktioniert prinzipiell wie in 2.6.3 beschrieben, allerdings mit kleinen Abwandlungen.

Reaktionsansatz:	50 nM	Template-DNA (siehe 2.10)
	1×	IVT A
	1×	IVT B
	1 mM	Bio-rNTPs
	0,4 U/ μl Ansatz	RNasin [®] (40 U/ μl , Promega)
	2,7 U/ μl Ansatz	T7-Polymerase
		ad 350 μl H ₂ O _{auto}

Der Ansatz wird für 2× 2 Stunden bei 37 °C inkubiert, wobei nach 2 Stunden nochmals T7-Polymerase zugegeben wird. Anschließend wird auf Grund der großen DNA-Menge ein DNA-Verdau gemacht. Dazu werden 10 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ und 1 U Turbo DNase[®] (Ambion, USA) pro μg DNA zum Ansatz gegeben und nochmals für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion werden 15 mM EDTA dazu gegeben und im Anschluss eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (siehe 2.2). Da es danach Probleme mit der PEG-Fällung (siehe 2.3.3) gab, wahrscheinlich wegen des Rest-Chloroforms, und bei einer Ethanol-Fällung (siehe 2.3.1) alles ausfällt, wurde eine Isopropanol-Fällung (siehe 2.3.4) durchgeführt. Die Pellets werden anschließend an der Luft getrocknet und in 30 μl 5 mM Tris/HCl gelöst.

Es werden 4 verschiedene Sonden zur Aufreinigung der kleinen RNAs aus Gesamt-RNA benötigt. Da die linearen Vollängen-Sonden eine exakte Volllänge haben, werden zusätzlich noch Sonden benötigt, die die Schnittstelle abdecken, damit man sicher sein kann, dass alle potentiellen kurzen RNAs aufgereinigt werden können. Eine Übersicht dazu gibt Tabelle 2.11.

Tabelle 2.11: Sonden zur Dynabead-Aufreinigung. Um möglichst alle kleinen RNAs mit Viroid-Sequenz aus der Gesamt-RNA aufzureinigen, werden unterschiedliche Sonden sowohl in (+)- als auch in (–)-Orientierung benötigt. (+)-Sequenzen entsprechen der cPSTVd-Sequenz und können gegen (–)-Sequenzen hybridisieren. (–)-Sequenzen dagegen sind komplementär zum cPSTVd und hybridisieren gegen (+)-Polarität. Die Position der (+)-Sequenzen entspricht dem cPSTVd, die (–)-Sequenzen sind komplementär zum cPSTVd.

Bezeichnung	Position	Länge	Primer-Paar
Bio-AS1-VL-(+)	145-144	395 Nt	AS1-T7 / AS2
Bio-AS1-VL-(–)	144-1/359-145	359 Nt	AS2-T7 / AS1 tr
Bio-Int-295-(+)	67-2	295 Nt	PS3-T7 / PS5
Bio-Int-320-(–)	21-1/359-61	320 Nt	ND3-T7 / ND1

2.9.3 Dynabead-Aufreinigung

Dynabeads® M-280 Streptavidin (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen) sind einheitliche superparamagnetische Polystyrol-Kügelchen, auf deren Oberfläche Streptavidin kovalent gebunden ist. Als superparamagnetisch werden Partikel oder Substanzen bezeichnet, die in einem äußeren Magnetfeld selbst schwach magnetische Eigenschaften entwickeln. Streptavidin ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von ~66 kDa und besteht aus 4 identischen Untereinheiten, die jeweils eine hochaffine Bindestelle für Biotin enthalten. Dies bedeutet, dass 1 Mol Streptavidin 4 Mol Biotin binden kann. Die Bindekonstante entspricht mit 10^{15} M^{-1} einer der größten Bindekonstanten, die für nicht kovalente Bindungen bekannt sind. Streptavidin besitzt einen schwach sauren Charakter in physiologischen pH-Bereichen, wodurch es sich besonders gut für die Aufreinigung von Nukleinsäuren eignet, da es nicht an diese bindet. Die Dynabeads® M-280 Streptavidin wurden als Matrix für einfaches und effizientes Trennen von biotinylierten Verbindungen entworfen, wie u. a. Proteine und DNA/RNA. Die Benutzung eines Magneten (MagnaRack™ for microcentrifuge tubes, Invitrogen) erlaubt eine einfache und effiziente Isolierung und anschließende Handhabung der Ziel-Moleküle in einer hochspezifischen Art und Weise.

Das Reaktionsvolumen soll laut Hersteller immer das zweifache Volumen der Dynabeads betragen.

2.9.3.1 benötigte Puffer

- **Lösung A**

0,1 M NaOH
 0,05 % NaCl
 0,1 % DEPC ÜN rühren & anschließend autoklavieren

- **Lösung B**

0,1 M NaCl
 0,1 % DEPC ÜN rühren & anschließend autoklavieren

- **2× B&W-Puffer**

10 mM	Tris/HCl (pH 7.5)	
1 mM	EDTA	
2,0 M	NaCl	autoklavieren

2.9.3.2 Vorbereitung der Dynabeads

Dynabeads® M-280 Streptavidin liegen in einer Konzentration von $6,7 \times 10^8$ Dynabeads pro Milliliter vor, was einer Konzentration von 1 mg Beads pro 100 μl entspricht. Pro Milligramm Beads können 3 μg Biotin-Sonde gebunden werden. Die Dynabeads sind in Phosphat-Puffer, pH 7.4 mit 0,1 % BSA (Bovines serumalbumin) und 0,02 % NaN_3 (Natriumazid) gelöst. Sie müssen vor der Benutzung gewaschen werden, um das NaN_3 zu entfernen.

Zuerst werden die Dynabeads durch langsames Schütteln in der Ampulle resuspendiert, um eine homogene Suspension zu erhalten. Dann wird eine geeignete Menge an Beads in ein Reaktionsgefäß gegeben. Es wird mit einem Volumen von 300 μl gearbeitet, da dies das maximale Volumen ist, was bei Weiterverarbeitung in ein Reaktionsgefäß passt. Anschließend wird, wie unten beschrieben, weiter verfahren. Beim Abpipettieren muss vermieden werden, die dem Magneten zugewandte, innere Seite zu berühren, da sich die Beads dort sammeln. Bei der Zugabe neuer Lösungen werden diese an der Innenseite des Reaktionsgefäßes hinein gegeben, an der die Dynabeads gesammelt sind, und vorsichtig resuspendiert.

Dynabeads-Stammlösung	→ 2 min Magnet	→ abpipettieren
1 Vol Lsg A	- 2 min bei RT inkubieren	→ 2 min Magnet → abpipettieren
1 Vol Lsg A	- 2 min bei RT inkubieren	→ 2 min Magnet → abpipettieren

→ Beads in geeignetem Puffer und Volumen zur Weiterverarbeitung aufnehmen

2.9.3.3 Anti-RNase-Behandlung bei Dynabeads

Da die Dynabeads nicht in RNase-freier Lösung geliefert werden, müssen sie entsprechend behandelt werden, um RNA damit aufzureinigen.

Dynabeads in Lsg	→ 2 min Magnet	→ abpipettieren
1 Vol Lsg A	- 2 min bei RT inkubieren	→ 2 min Magnet → abpipettieren
1 Vol Lsg A	- 2 min bei RT inkubieren	→ 2 min Magnet → abpipettieren
1 Vol Lsg B	- 2 min bei RT inkubieren	→ 2 min Magnet → abpipettieren

→ Beads in 1 Volumen 2× B&W-Puffer zur Weiterverarbeitung aufnehmen

2.9.3.4 Aufreinigung der Biotin-Sonden-Moleküle

Um sicher zu stellen, dass bei der Dynabead-Aufreinigung die Ziel-RNA auch nur mit Sonden hybridisiert gelassen wird, die mindestens 1 eingebautes Biotin enthalten, werden die Biotin-Sonden-Moleküle vorher einmal mit Dynabeads aufgereinigt. Dazu wird ein Reaktionsgefäß mit 3 mg Dynabeads benötigt und auf ein Endvolumen von 1200 μl mit 1× B&W-Puffer gebracht. Dies entspricht einem 4-fachen Anfangsvolumen. 3 mg Dynabeads sind in der Lage 9 μg Biotin-VL-Sonde zu binden. Die Hybridisierung der Sonde an die Beads geschieht mit Hilfe eines

sog. „head-over-tail-rotators“. Dieses Gerät dreht eine Platte, in der man die Reaktionsgefäße befestigen und langsam (ca. 1 Drehung pro Minute) um ihre Horizontalachse drehen lassen kann. Durch diese Rotation wird der Inhalt der Gefäße sanft in Bewegung gehalten, damit sich die Dynabeads nicht absetzen können und die Lösung möglichst homogen bleibt. Dies geschieht 40 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wird das Gefäß 2 Minuten in einen Magneten gestellt und die Hybridisierungslösung abgenommen.

Zum Waschen werden die Partikel zuerst in 1/2 Volumen 0,1× SSC resuspendiert, 3 Minuten bei RT inkubiert und nach 1 Minute im Magneten der Überstand abpipettiert. Dies dient der Abtrennung unspezifisch gebundener Nukleinsäuren. Um stringenter zu waschen, werden die Partikel nochmals in 1/2 Volumen 0,1× SSC resuspendiert, diesmal bei 70 °C für 4 Minuten inkubiert und nach 30 Sekunden im Magneten der Überstand abpipettiert.

Formamid-Lösung (FA-Lsg)

95 % Formamid
10 mM EDTA

Zum Schluss wird die Biotin-Streptavidin-Bindung aufgelöst, damit die gebundene RNA wieder von den Dynabeads freigesetzt wird. Das Eluat enthält somit nur Sondenmoleküle, die mindestens 1 Biotin-Molekül tragen und kann somit weiter für die Aufreinigung verwendet werden (siehe 2.9.3.5). Dazu werden die Beads in 1/2 Volumen FA-Lsg. resuspendiert und für 4 Minuten bei 75 °C inkubiert. Anschließend wird das Reaktionsgefäß für 30 Sekunden in den Magneten gestellt und der Überstand abgenommen. Zum Schluss wird der Überstand EtOH-gefällt (2.3.1), bevor damit weiter gearbeitet werden kann. Das Pellet wird getrocknet, in 20 µl 5 mM Tris/HCl, pH 8.0 gelöst und mit einer 1:50-Verdünnung die Konzentration per Spektralphotometer (2.7) bestimmt. Zwischen 60 und 80 % der hergestellten Sonden enthalten mindestens 1 Biotin.

2.9.3.5 Elution der „silencing“-RNAs mit PSTVd-Sequenz von der Biotin-Sonde

Zur Aufreinigung der kleinen RNAs aus Gesamt-RNA wird zuerst eine Hybridisierung der Biotin-markierten Sonde gegen die Ziel-RNA durchgeführt. Es wurde die Überlegung zu Grunde gelegt, dass PSTVd in der gesamten Pflanze ca. 1 % der gesamten Nukleinsäure ausmacht. Diese Annahme wurde auf die kurzen RNAs übertragen. Um auf der sicheren Seite zu sein und eine Sättigung zu vermeiden, gingen die Berechnungen davon aus, dass 5 % der kurzen RNAs eine Viroid-Sequenz aufweisen, was allerdings sehr hoch gegriffen ist.

In dem entsprechenden Verhältnis wird eine der Sonden mit einer entsprechenden Menge miRNA-Mix (= alle gelelierten kurzen RNAs; keine PSTVd-Varianten-Mischung) in zweifachem Volumen 1× B&W-Puffer hybridisiert. Dies geschieht, indem die Lösung für 1,5 Minuten bei 85 °C in einem Wasserbad erhitzt wird und ÜN im Wasserbad in einer Styroporbox abkühlt wird.

Dem Reaktionsansatz werden Dynabeads in äquimolarer Menge zur Sonde dazu gegeben und das Reaktionsvolumen durch Zugabe von 2× B&W-Puffer und Wasser nochmals verdoppelt. Zum Schluss muss die Lösung wieder eine Konzentration von 1× B&W-Puffer aufweisen. Die Hybridisierung der Sonde an die Beads geschieht wiederum mit Hilfe des „head-over-tail-rotators“ für 40 Minuten bei RT. Anschließend gibt es drei Waschschritte (siehe unten). Im ersten Waschschritt werden bei RT mit 0,1× SSC alle unspezifisch gebundenen RNAs von

der Sonde entfernt. Beim zweiten Waschschrift werden die kurzen RNAs mit einer Lösung aus 8 M Harnstoff und 0,1× SSC bei 55 °C von der Sonde abgelöst, die für die Sequenzierung benötigt werden. Im dritten Schritt wird die Biotin-Streptavidin-Bindung durch FA-Lsg bei 75 °C aufgelöst, damit die gebundene Sonde wieder von den Dynabeads freigesetzt wird, um sie ggf. erneut zu benutzen.

Hyb-Lsg		→ 1 min Magnet	→ abpipettieren
300 µl 0,1× SSC	- 3 min, RT	→ 1 min Magnet	→ abpipettieren
300 µl 8 M Harnstoff / 0,1× SSC	- 2 min, 55 °C	→ 30 sek Magnet	→ abpipettieren
300 µl FA-Lsg	- 4 min, 75 °C	→ 30 sek Magnet	→ abpipettieren

Alle Überstände werden anschließend EtOH-gefällt, wie in 2.3.1 beschrieben. Die Hyb-Lösung enthält ausreichend Salz, bei den anderen Überständen muss noch 150 mM NaCl zugegeben werden. Zum Schluss erhält man 4 Lösungen mit folgender Zusammensetzung:

1. alle nicht gebundenen RNAs aus dem Gelelutions-Ansatz
2. die nicht spezifisch an die Sonde gebundenen RNAs
3. alle kleinen RNAs mit Viroid-Sequenz
4. die Sonde

Die Ansätze 1 und 2 können vereinigt werden. Dies sind die Sequenzen, die noch für weitere Aufreinigungen mit Sonden anderer Sequenzen benötigt werden. Der Ansatz 3 ist derjenige, der für die Sequenzierung benötigt wird und Ansatz 4 wird für mögliche spätere Aufreinigungen eingefroren.

Die gesamten Schritte werden so oft durchgeführt, dass nach Möglichkeit alle gewünschten Sequenzen aus der Gesamt-RNA aufgereinigt wurden.

2.9.4 Solexa Sequenzanalyse

Um die Sequenzen der geleluerten und zum Teil Dynabead-aufgereinigten „silencing“-RNAs zu bestimmen, wurden diese RNAs in die Hände der Firma vertis (vertis Biotechnologie AG, Freising, Deutschland) gegeben, wo zuerst eine cDNA-Synthese durchgeführt wurde. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann zwecks einer Solexa Sequenzierung (Genome Analyzer™/Solexa, Illumina, San Diego, USA) an die Firma GATC (GATC Biotech AG, Konstanz, Deutschland) geschickt. Die dort gelesenen Sequenzen konnten als Datei heruntergeladen werden.

2.10. Computeralgorithmen

T_m -Werte für die Northernblot-Analysen werden durch das Programm POLAND ermittelt (Steger, 1994). Die Sequenzen werden mit dem DotPlot-Algorithmus¹ auf Sequenz-Komplementaritäten hin überprüft. Mit ClustalX² werden die Sequenzen der unterschiedlichen Stämme aligniert, um Sequenzunterschiede deutlich zu machen. Die PSTVd-Sequenzen werden aus einer Datenbank³ übernommen. Für die T_m -Wert-Berechnung der PCR-Primer wird die eigens auf die Phusion™-Polymerase abgestimmte Benutzeroberfläche von Finnzymes⁴ verwendet.

¹ <http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/DOTPLOT/dotplot.html>

² <http://bioinformatics.utmem.edu/>

³ <http://subviral.med.uottawa.ca/cgi-bin/home.cgi>

⁴ https://www.finnzymes.fi/tm_determination.html

3. ERGEBNISSE

Dieser Arbeit lag ein Pathogenitätsmodell zugrunde, wonach Viroide „silencing“-RNAs produzieren und über „post-transcriptional gene silencing“ (PTGS) beziehungsweise „RNA-silencing“ in die Genregulation des Wirts eingreifen. Um diese Hypothese bestätigen zu können, wurden Tomaten-Pflanzen mit unterschiedlichen Viroid-Stämmen infiziert. Nach Extraktion der Gesamt-RNA konnten diese kurzen RNAs mit Northernblot-Analysen zwar in allen infizierten Pflanzen nachgewiesen werden, aber keinem spezifischen Bereich des Viroids zugeordnet werden. Um mehr Informationen über die Sequenzen dieser Viroid-spezifischen kurzen RNAs und somit ihrem Herkunftsort zu bekommen, wurde später eine High-Throughput-Sequenzierung durchgeführt. Diese Sequenzen konnten mit Hilfe bioinformatischer Methoden bearbeitet und anschließend mit Datenbanken verglichen werden, um mögliche Funktionen dieser kurzen RNAs zu finden.

3.1. Herstellung des Zellmaterials

3.1.1 Pflanzenzucht

Das Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, aus welchen Bereichen des PSTVd die in infizierten Pflanzen vorkommenden viroidspezifischen kleinen RNAs stammen und welche Sequenz sie besitzen. Da für sämtliche Versuche aus Tomatenpflanzen aufgereinigte Gesamt-RNA benötigt wurde, mussten große Mengen Tomatenpflanzen im Gewächshaus gezogen werden, die mit unterschiedlichen Viroid-Stämmen (QFA, Intermediate und AS1) oder nur zum Schein (Mock), wie in 2.4 beschrieben, infiziert wurden. Für die Northernblot-Analysen wurden kleinere Mengen an Tomatenpflanzen benötigt, die in allen vier verschiedenen Varianten infiziert und jeweils zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet wurden. Für die Sequenzierung dagegen wurde eine größere Menge an AS1-infizierten und Mock-treated Tomatenpflanzen benötigt, die allesamt 30 Tage nach Infektion geerntet wurden.

3.1.2 Sequenzvergleiche der PSTVd-Varianten

Es wurden Tomatenpflanzen mit drei unterschiedlichen Viroid-Stämmen infiziert, die optisch unterscheidbare Symptome zeigen (siehe Abb. 3.1). Diese führt man auf die geringen Sequenzunterschiede in der VM-Region der Viroide zurück, wie in Abbildung 3.2 dargestellt. Die Sequenzvarianten QFA und Intermediate verursachen schwache Symptome, wie ein geringes Wachstum durch Stauchung der Internodien. Weitere optische Symptome sind nicht zu erkennen. AS1 dagegen verursacht schwere Symptome bis hin zur Nekrose. Es tritt eine sehr starke Internodienstauchung auf und die Blätter sind deutlich kleiner und rollen sich ein. Mit der Zeit treten Nekrosen der Blätter und Stängel auf.

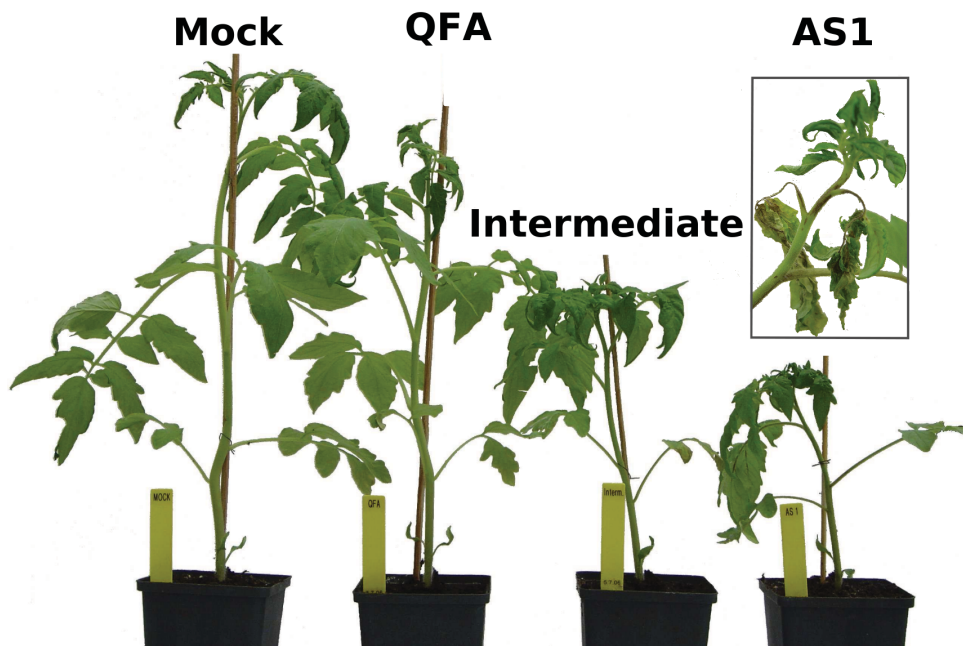


Abbildung 3.1: Tomatenpflanzen der Sorte Rutgers, 16 Tage nach Infektion mit PSTVd. Die „Mock-treated“-Pflanzen werden bis auf das im Inokulum fehlende PSTVd der identischen Behandlung unterzogen, wie mit PSTVd infizierte Pflanzen. Diese Pflanzen zeigen das gleiche Wachstum wie unbehandelte Pflanzen. Die mit der PSTVd-Variante QFA infizierte Pflanze zeigt im Gegensatz zur „Mock-treated“-Pflanze, einen gestauchten Habitus. Des weiteren sind keine Symptome sichtbar. Die mit der PSTVd-Variante Intermediate infizierte Pflanze weist eine starke Internodienstauchung auf, zeigt aber ebenfalls keine weiteren Symptome. Die mit der PSTVd-Variante AS1 infizierte Pflanze ist deutlich kleiner als die anderen und zeigt eindeutige Symptome. Die Blätter sind kleiner und rollen sich ein. Diese PSTVd-Variante löst Symptome bis hin zur Nekrose von Blättern und Stängeln (siehe Ausschnitt) auf. Der eingerahmte Ausschnitt zeigt eine AS1-infizierte Pflanze 21 Tage nach der Infektion. Bei ihr sind die beschriebenen Symptome schon eindeutig erkennbar.

Zum Sequenzvergleich wurde das Programm ClustalX¹ verwendet, welches im Internet zur Verfügung steht. Mit Clustal können die unterschiedlichen PSTVd-Stämme aligniert werden, um Sequenzunterschiede deutlich zu machen. Es gibt drei Kodierungen, um einen Vergleich zu erleichtern. Die vier unterschiedliche Farben dienen zur Markierung der vier Nukleotide: gelb = Guanin, blau = Cytosin, rot = Adenin und grün = Uracil. Die Sternchen oberhalb der Sequenzen zeigen die identischen Nukleotide an. Die Fehlstellen in den schwarzen Balken unterhalb der Sequenzen geben die Nukleotid-Unterschiede an. Die Balken in den Sequenzen entsprechen Lücken, die beim Alignieren der Sequenzen eingesetzt werden, um die größtmögliche Homologie finden zu können.

¹ <http://bioinformatics.utmem.edu/>

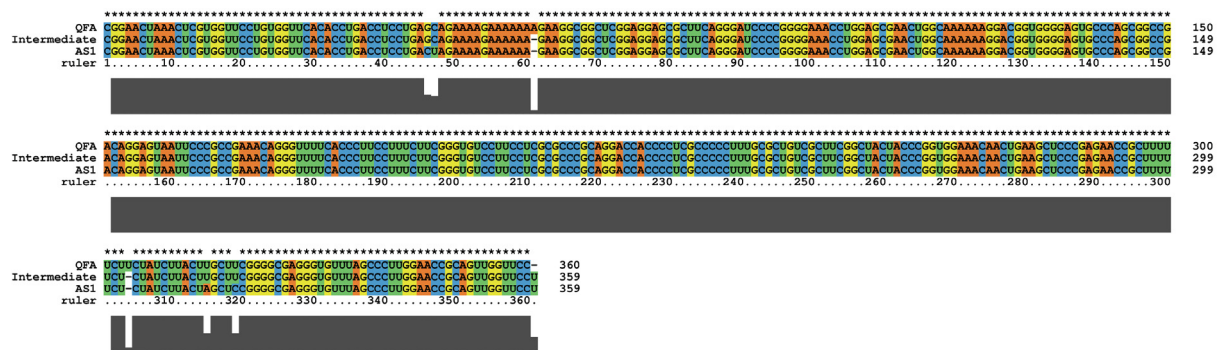


Abbildung 3.2: Sequenzvergleich der drei verwendeten PSTVd-Stämme. Ein mit ClustalX erstelltes multiples Sequenz-Alignment der drei verwendeten PSTVd-Stämme zur Verdeutlichung der Sequenzunterschiede. Bedeutung der verwendeten Codierungen: gelb: Guanin, blau: Cytosin, rot: Adenin, grün: Uracil, *: identische Nukleotide. Nähere Erläuterungen siehe 3.1.2.

3.1.3 RNA-Aufreinigung

Es gab zwei unterschiedliche Vorgehensweisen bei der Herstellung der Gesamt-RNA. Für die Northernblot-Analysen wurden Tomatenpflanzen mit drei Viroid-Stämmen infiziert, die unterschiedlich starke Symptome hervorrufen. Als Negativkontrolle wurden die sogenannten Mock-treated Pflanzen zum Schein infiziert. Teile dieser Pflanzen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (23, 30, 37 und 44 Tage nach Infektion) geerntet und bei -70°C eingefroren. Für die Sequenzierung wurde nur Gesamt-RNA aus AS1-infizierten und Mock-treated Pflanzen benötigt. Da aus diesen Proben die kleinen RNAs geleluert werden sollten und AS1-Pflanzen im Verhältnis zu einer Mock-Pflanze sehr wenig Material liefert, musste eine große Zahl an Pflanzen (~ 600 AS1-Pflanzen) gezüchtet werden. Alle diese Tomatenpflanzen wurden 30 Tage nach Infektion geerntet und bei -70°C eingefroren.

Die RNA wird in beiden Fällen aus den Pflanzen mit Phenol-Chloroform (2.2) extrahiert. Dabei wurden die Proben wie in 2.4.1 beschrieben behandelt. Anschließend wurden die Konzentrationen per Spektralphotometer bestimmt.

Durch die großen, einheitlichen Gesamt-RNA-Ansätze kann sichergestellt werden, dass bei allen Versuchen die gleichen Proben verwendet werden konnten. Bei den Northernblots erhält man dadurch eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse.

Bevor die Gesamt-RNA der Mock-treated Pflanzen hergestellt wurde, musste sichergestellt werden, dass alle Geräte möglichst viroidfrei waren. Minimale Verunreinigungen durch Viroide können durch die PCR-Zyklen bei der Sequenzierung vervielfacht und somit sichtbar gemacht werden, was die Ergebnisse verfälschen könnte. Deshalb wurden sowohl der Aufsatz des Waring Blenders, sowie sämtliche benötigte Zentrifugenbecher, komplett auseinander genommen. Alle Kleinteile, sowie die Zentrifugenbecherdeckel und -dichtungen wurden in einem Becherglas mit 1U Benzonase® endonuclease der Firma Merck pro 1 ml Wasser behandelt. Dieses Glas wurde für 6 Stunden in ein Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurde die Lösung erneuert und alle Kleinteile über Nacht darin stehen gelassen. Zum Schluss wurden diese Teile zusammen mit dem Glas-Blenderaufsatz und den Zentrifugenbechern in einer Spülmaschine gereinigt, die PCR-rein spült. Nach dieser Prozedur konnte man annehmen, dass kein Viroid mehr vorhanden sein sollte.

3.1.4 Versuche zur Trennung von großen und kleinen RNAs

Um die Arbeit bei der Sequenzierung zu erleichtern, wurden viele zusätzliche Aufreinigungen ausgetestet. Das Ziel war, möglichst viele große RNAs aus der Gesamt-RNA-Probe zu entfernen, um die kleinen, gewünschten RNAs anzureichern. Dies hat den Vorteil, dass man bei der Gelelution wesentlich mehr Gesamt-RNA auf das Gel auftragen und somit mehr von der gewünschten kleinen RNA auftrennen kann.

Es wurde versucht, eine modernere und effektivere Methode als die klassische Gelelution zu finden, da diese sehr problembehaftet ist. Zuerst einmal müssen die großen Gele ca. 6 Stunden vorgeheizt und über Nacht laufen gelassen werden, bevor man die RNA in der gewünschten Länge erhält. Diese Gele müssen wiederum eingefroren werden, bevor mit der Gelelution fortgefahren werden kann. Bei der klassischen Gelelution werden die Gelstückchen über Nacht in einer entsprechenden Lösung geschüttelt, bevor die gewünschte RNA aus dieser Lösung gefällt werden kann. Somit ist diese klassische Methode nicht nur enorm zeitaufwendig, da die einzelnen Schritte lange dauern und bei der Elution immer nur geringe Gel-Mengen pro Reaktionsgefäß eingesetzt werden können, sondern zusätzlich sehr verlustreich. In der Regel kann nicht die gesamte RNA aus den Gelstücken gelöst werden, auch nicht wenn dieser Vorgang ein weiteres Mal durchgeführt wird. Bei einer anderen Elutionsmethode werden die Stücke in eine elektrische Kammer gelegt und die RNA durch Anlegen von Strom durch eine Membran in eine andere Kammer bewegt. Hierbei liegt das Problem bei den Membranen, an denen die RNA ebenfalls binden. Die erste Idee einer solchen Aufreinigung stammt aus der Zeitschrift Laborjournal, während deren Testphase sich nach einem Gespräch herausstellte, dass auch Qiagen in Kürze ein neues Rezept auf den Markt bringen würde. Parallel dazu wurden unterschiedliche Ideen entwickelt, die mit vorhandenem Material möglich waren, von den jeweiligen Firmen als perfekte Methode angepriesen wurden oder durch Abwandlung bekannter Methoden entstanden.

Alle diese Versuche, so unterschiedlich sie auch waren, führten nicht zum gewünschten Erfolg (Daten nicht gezeigt). Bei allen Proben war es nicht möglich, lange RNAs ohne Verlust von kurzen RNAs zu fällen. Beim wässrigen 2-Phasen-System schienen sogar die kleinen RNAs in großer Menge verloren zu gehen. Das Resultat war, dass es keine zuverlässigere Methode zu geben scheint, kleine RNAs komplett und ohne Verluste von der Gesamt-RNA zu trennen, als die Auftrennung auf einem PAA-Gel mit anschließender Gelelution. Allerdings wurde eine dritte, vertrauenserweckendere Methode der Gelelution gefunden, bei der die RNA elektrisch aus dem Gelstück in eine Hochsalzlösung gezogen und angereichert wird (nähere Erklärung siehe 2.9.1).

Es wurden folgende Methoden, Lösungen bzw. Hilfsmittel ausgetestet:

1. Anleitung aus Laborjournal.de - Tipp 80

- *Ziel:*

Einfache und effektive Aufreinigung von siRNA

- *Vorgehen:*

Abgewandeltes Rezept mit RNeasy Kit von Qiagen (durch hohe Isopropanol-Konzentrationen sollen auch siRNAs an die Säulenmembran binden)

2. miRNeasy Kit (Appendix A)

- *Ziel:*
Trennung der RNAs < 200 Nt von der Gesamt-RNA
- *Vorgehen:*
Aufreinigung der Gesamt-RNA über Säulen mit Hilfe des miRNeasy Kit und RNeasy MinElute Cleanup Kit der Firma Qiagen.

3. Zentrifugationseinheiten

- *Ziel:*
Abtrennung der kleineren RNAs von der Gesamt-RNA
- *Vorgehen:*
Es werden verschiedene Zentrifugal-Filter-Einheiten mit unterschiedlichen Ausschlussgrenzen (10, 30 und 50 kDa), sowie denaturierenden Agenzien wie Formaldehyd, Formamid und Harnstoff ausgetestet. Benutzt wurden folgende Produkte:
 - ◇ Microcon[®] Centrifugal Filter Units (Millipore, USA)
Cellulose YM-Membran
kompatibel mit 5 % Formaldehyd, 10 % PEG, 1 % Phenol und 8 M Harnstoff
Ausschlussgrenze 10 kDa (YM-10), 30 kDa (YM-30) und 50 kDa (YM-50)
 - ◇ Ultrafree[®]-0.5 Centrifugal Filter Units (Millipore, USA)
Polyethersulfon-Membran (PES)
kompatibel mit 5 % Formaldehyd, 10 % PEG und 8 M Harnstoff
Ausschlussgrenze 10 kDa
 - ◇ Vivaspin-500 (Sartorius, Göttingen)
Polyethersulfon-Membran (PES)
kompatibel mit 5 % Formaldehyd, 10 % PEG und 8 M Harnstoff
Ausschlussgrenze 50 kDa

Die Zentrifugationseinheiten wurden entsprechend der Anleitungen verwendet. Die Gesamt-RNA-Lösungen wurden zum Teil mit den denaturierenden Agenzien versetzt und zum Teil zusätzlich ein snap-cool durchgeführt. Bei einem Snap-cool wird die Probe für zwei Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend sofort in eiskaltem Ethanol abgekühlt.

4. PEG-Fällung + Harnstoff bzw. Formamid

- *Ziel:*
Fällung der sekundären Pflanzenstoffe
- *Vorgehen:*
Bei einer 6 % -igen PEG-Fällung fallen große Nukleinsäuren bei RT aus. Da bei dieser Methode kleine RNAs mitfallen, wurde getestet, ob bei höherer Temperatur, unterschiedlicher PEG-Konzentration und denaturierenden Bedingungen (Harnstoff, Formamid) ein überzeugenderes Ergebnis erreicht werden kann. Die denaturierenden Agenzien dienen auch der T_m-Senkung. Dabei gilt: 2–4 °C pro 1 M Harnstoff und

0,7 °C pro % Formamid. Es wurde auch ausgetestet, ob ein Snap-cool vor der PEG-Fällung einen positiven Effekt zeigt.

5. wässriges 2-Phasen-System

- *Ziel:*

Abtrennung der sekundären Pflanzenstoffe für hochkonzentrierte Gesamt-RNA

- *Vorgehen:*

Auf die Phenol-Chloroform-Extraktion folgt die Aufreinigung mit einem wässrigen 2-Phasen-System. Dabei werden 8,2 % (w/v) Kaliumphosphat (KP) und 52,6 % (v/v) PEG₆₀₀₀ zusammengegeben, mit der RNA-Lösung aus der Phenol-Chloroform-Extraktion auf das Gesamtvolumen aufgefüllt und gut geschüttelt.

Gesamtvolumen	PEG ₆₀₀₀	30 % KP
400 ml	32,8 g	210,4 ml
500 ml	41 g	263 ml
600 ml	49,2 g	315,6 ml
800 ml	65,7 g	420,8 ml

Die KP-Phase (untere Phase mit wesentlich größerem Volumen) wird abgenommen und mit 1 Volumen H₂O (bezogen auf die KP-Phase), sowie 0,1 Volumen (bezogen auf KP + H₂O) der CTAB-Lösung versetzt. Dabei lagert sich das CTAB (N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromide) an das negativ geladene Phosphatrückgrad der RNA und fällt diese aus. Nach dem Mischen wird die Lösung für mindestens 2 Stunden auf Eis gestellt und anschließend für 20 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Pellets werden zum Schluss 2× mit einem Gemisch aus 70 % EtOH + 200 mM NaOAc, pH 7.5 gewaschen, wobei CTAB gegen NaOAc ausgetauscht wird, und 1× mit purem 70 % -igem EtOH, um Salzreste aus dem Pellet zu entfernen.

benötigte Lösungen: - 30 % KP (w/w) 566,04 g KH₂PO₄

93,96 g K₂HPO₄

350 ml H₂O_{auto}

- 3 M NaOAc, pH 7.5 mit Essigsäure einstellen, autoklavieren

- CTAB-Lösung 1 % CTAB

0,1 % NaCl

10 mM EDTA

6. Fällungsvergleich: EtOH / wässriges 2-Phasen-System / CTAB

- *Ziel:*

Überprüfung, ob signifikante Unterschiede bei den Fällungen auftreten.

- *Vorgehen:*

Alle Fällungen werden nach der Inkubation auf Eis für 20 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert. Die Pellets der Fällungen II und III werden, wie in 5. beschrieben, behandelt. Das Pellet der Fällung I wird 2× mit 70 % EtOH gewaschen.

I EtOH-Fällung

Die RNA Lösung enthält nach der Phenol-Chloroform-Extraktion, auf Grund des TNE, 100 mM Salz. Für die Fällung werden noch 50 mM NaCl und 3 Volumen eiskaltes Ethanol (96 %) zugegeben und für mindestens 30 min auf Eis stehen gelassen.

II wässriges 2-Phasen-System

Vorgehen siehe Punkt 5.

III CTAB-Fällung

Die wässrige Phase nach der Phenol-Chloroform-Extraktion wird mit 0,1 Volumen CTAB-Lösung (siehe Punkt 5) versetzt, gemischt und mindestens für 2 Stunden auf Eis inkubiert.

3.2. Northernblot-Analyse

3.2.1 Sonden-Herstellung

Zum Nachweis der kleinen RNAs mit PSTVd-Sequenz wurden Sonden mit komplementärer Sequenz benötigt. Diese wurden durch PCR (siehe 2.6.1) und anschließende *in-vitro*-Transkription (siehe 2.6.1) hergestellt. Diese Sonden wurden für Northernblot-Analysen benötigt, mit denen zuerst überprüft werden sollte, ob die kleinen RNAs mit PSTVd-Sequenz aus dem gesamten PSTVd stammen oder nur aus bestimmten Bereichen. Dazu wurden jeweils vier Sonden in (+)- und (–)-Sequenz hergestellt (siehe 2.8.1), sowie Gesamt-RNA aus einem Pflanzenpool, damit alle Northernblots untereinander vergleichbar sind. Dazu wurden mehrere unterschiedlich infizierte Pflanzen (Mock, QFA, AS1) zu verschiedenen Zeitpunkten (23, 30, 37 und 44 Tage nach der Inokulierung) geerntet und verarbeitet (siehe 2.4.1). Nach einer Konzentrationsbestimmung per Spektralphotometer konnte auf alle Northernblots einheitlich 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen werden. Somit war es nun möglich, alle hergestellten Northernblots quantitativ zu vergleichen. Die Bereiche der jeweiligen Sonden sind in Abb. 3.3 zu sehen.

3.2.2 Austesten der optimalen Membran

Für ein gutes Ergebnis war die Optimierung der Bedingungen und das Austesten verschiedener Membranen nötig. Die ersten Versuche, kleine RNAs auf eine Membran zu blotten, waren während meiner Diplomarbeit (Diermann, 2005) mit großen Mühen verbunden. Es wurde eine neutrale Membran (Biodyne A, Pall, England) verwendet und diese mit 480 mJ gecrosslinkt. Damit ein Signal zu sehen war, mussten 5 ng aufgereinigte kurze RNA aufgetragen werden. Zudem hatte man immer einen starken und fleckigen Hintergrund. Somit wurde eine Versuchsreihe mit verschiedenen positiv geladenen Membranen durchgeführt, um eine geeignetere Membran zu finden. Es wurden folgende Membranen, wie unter 2.8 beschrieben, ausgetestet:

- Whatman Nytran® SuPerCharge (Schleicher&Schuell)
 - stark positiv geladene Nylonmembran

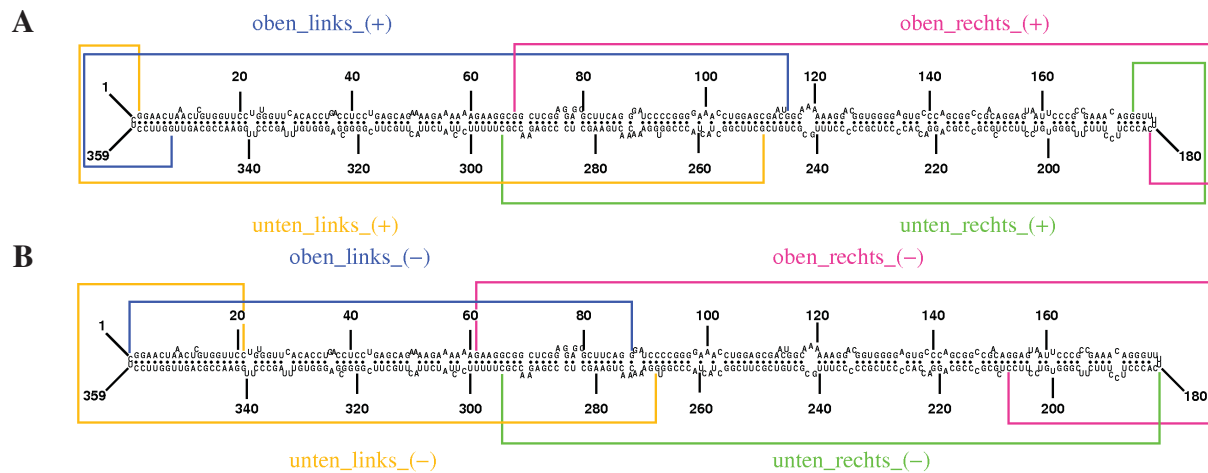


Abbildung 3.3: Übersicht der Northernblot-Sonden. Für die Northernblot-Analyse wurde das Viroid in vier Bereiche eingeteilt und jeweils eine entsprechende Sonde in (+)- und (-)-Orientierung hergestellt. (A) zeigt die Sonden in Plus-Orientierung, in (B) sind die Sonden mit Minus-Sequenz gezeigt.

- 30 μ g Gesamt-RNA aufgetragen
- Whatman Nytran[®]N (Schleicher&Schuell)
 - positiv geladene Nylonmembran
 - 30 μ g Gesamt-RNA aufgetragen
- Biotodyne B (Pall)
 - positiv geladene Nylonmembran
 - 30 μ g Gesamt-RNA aufgetragen
 - Es wurden 2 Hybridisierungen nach Angaben der Anleitung abgeändert. (1) Es wurden 7 % SDS in die Hybridisierungslösung gegeben; (2) es wurde Blocking-Reagenz (Boehringer, Mannheim) anstatt Heringssperm-DNA verwendet.
- Amersham Hybond[™]-N+ (GE Healthcare)
 - positiv geladene Nylonmembran
 - hohe Bindekapazität für radioaktive und chemilumineszente Anwendungen
 - 30, 15 und 10 μ g Gesamt-RNA aufgetragen
- Amersham Hybond[™]-XL (GE Healthcare)
 - positiv geladene Nylonmembran
 - für optimale Signal-zu-Hintergrund-Rate für radioaktiv markierte Sonden
 - 30 und 15 μ g Gesamt-RNA aufgetragen

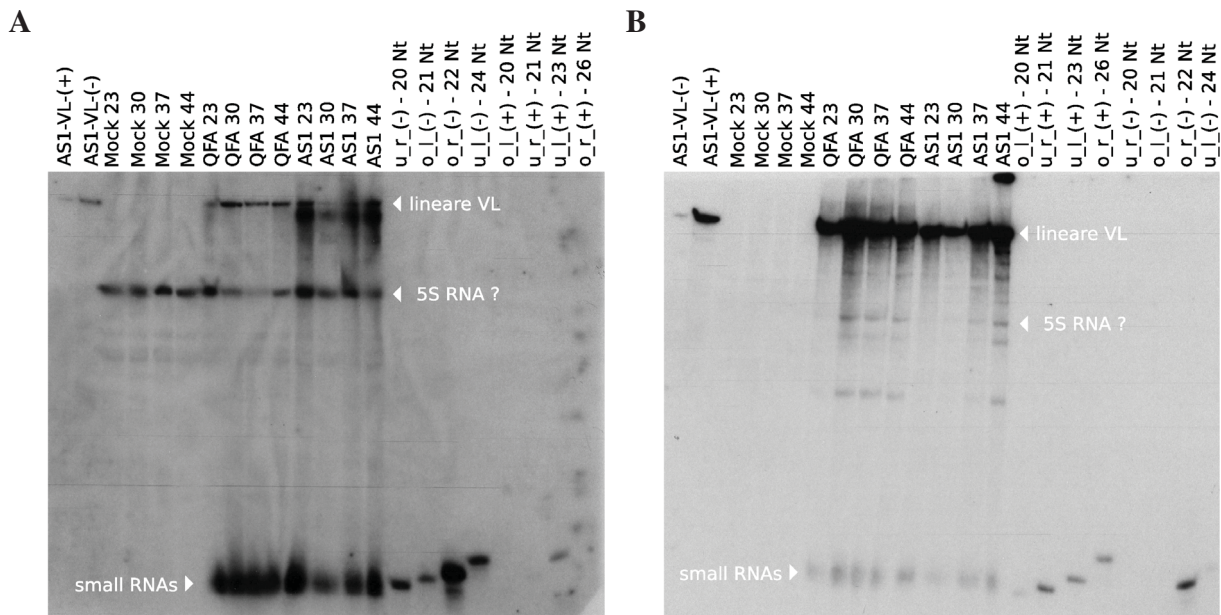


Abbildung 3.4: Northernblot-Analysen mit VL-Sonden. Die Autoradiographien zeigen komplette Northernblots, die mit einer AS1-VL in (A) (+)- und (B) (-)-Orientierung hybridisiert wurden. Aufgetragen wurden in beiden Fällen jeweils 4 mal 10 μ g Gesamt-RNA von Mock-Pflanzen (scheininfiziert), sowie von den PSTVd-Varianten QFA und AS1 infizierte Pflanzen jeweils 23, 30, 37 und 44 Tagen nach Infektion. In den ersten beiden Slots wurden 5 ng exakte AS1-VL in (+)- und (-)-Orientierung aufgetragen, in die letzten 8 Slots 15 ng aller kleinen, synthetischen RNAs als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle (vergl. 2.8.2). Beide Membranen wurden 4 Tage gegen einen Film exponiert. o = oben, u = unten, l = links, r = rechts, VL = Volllänge.

Es war sehr hilfreich, dass die positiv geladenen Membranen von unterschiedlichen Firmen getestet wurden, da große Unterschiede im Ergebnis erkennbar waren. Die Whatman Nytran® SuPerCharge und die Biodyne B mit 7 % SDS im Hybridisierungsansatz zeigten nur wenig Signal, die Membranen Whatman Nytran® N und Biodyne B mit Blocking-Reagenz sogar gar kein Signal. Die Membranen von GE Healthcare dagegen zeigten auch bei 15 μ g Gesamt-RNA noch ein Signal, die Amersham Hybond™-XL weniger Signal und mehr Hintergrund. Somit fiel die Wahl auf die Amersham Hybond™-N+.

3.2.3 Austesten der optimalen Bedingungen

Nachdem die Membran Amersham Hybond™-N+ gute Ergebnisse zeigte, konnten die Hybridisierungs-Bedingungen ausgetestet und überprüft werden, wie sinnvoll eine Verringerung der Gesamt-RNA-Konzentration ist. Es kristallisierte sich heraus, dass die besten Ergebnissen durch eine Hybridisierung bei 65 °C und wenig-stringentes Waschen bei 55 °C erreicht werden konnten. Die Konzentration der Gesamt-RNA konnte auf 10 μ g gesenkt werden, womit man weiterhin ein klares Signal und wenig Hintergrund erzielte. Außerdem zeigte sich, dass ein stringenteres Waschen kein besseres Signal liefert, sondern maximal das Signal der kurzen RNAs verringert.

Diese Vorversuche wurden zuerst mit einer linearen, 5'-[³²P] pCp-endmarkierten AS1-Volllängensonde durchgeführt, um zu sehen, dass diese Methode prinzipiell funktioniert und keine unvorhergesehenen Probleme auftreten. In der Abbildung 3.4 sind zwei Autoradiographien gezeigt, die einmal mit einer Sonde in (+)- und einmal in (–)-Orientierung hybridisiert wurden. Bei beiden sind die gewünschten Banden zu erkennen (lineare VL und small RNAs), wobei ein weiteres Bandensignal zu erkennen ist. Dieses Signal tritt in allen Northernblots in unterschiedlicher Intensität auf. Innerhalb eines Blots ist die Bande in allen Pflanzenproben, auch in denen der Mock-Pflanze, in gleicher Stärke vorhanden. Da nachgewiesen ist, dass 5S RNA an das Viroid binden kann (Stroeks, 2007) und auch zahlreich in der Pflanze vorkommt, war es eine naheliegende Vermutung, dass diese Bande 5S-RNA sein könnte.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurde ein Northernblot mit 5S-RNA-Sonde in (–)-Orientierung durchgeführt. Es wurden, wie in Abbildung 3.5 gezeigt, zwei verschiedene Konzentrationen an PSTVd-VL in beiden Orientierungen aufgetragen, sowie jeweils zwei Gesamt-RNA-Proben der drei unterschiedlich infizierten Pflanzen und vier verschiedene Konzentrationen an 5S-RNA in (+)-Orientierung. Wie in Abb. 3.5 (A) zu sehen ist, weist das Kontrollgel nach dem Blotvorgang noch färbbare Mengen an RNA auf, die nicht aus dem Gel geblottet werden konnten, weil die Bedingungen an kurze RNAs angepasst sind. Da bei aufgetragenen 5 ng PSTVd-VL ein Signal nachweisbar war, wurde dies als minimal aufgetragene Menge eingesetzt. Wie in Abb. 3.5 (B) zu sehen ist, ist die 5S-RNA eindeutig nachweisbar, wobei die PSTVd-Sequenz kein Signal zeigt.

3.2.4 Ergebnisse der Northernblots

Um einen Überblick zu bekommen, aus welchem Bereich des PSTVd die kurzen RNAs stammen, wurden Sonden hergestellt, die jeweils etwa einem Viertel des PSTVd entsprechen (siehe Abb. 3.3). Dazu wurden mittels PCR und *in-vitro*-Transkription Sonden mit PSTVd-Sequenz in (+)- und (–)-Orientierung hergestellt. Für die Bereiche auf der rechten Seite reichte eine AS1-Sonde, da die PSTVd-Stämme sich dort nicht unterscheiden. Für die linke Seite wurden jeweils eine QFA- und eine AS1-Sonde hergestellt, um zu überprüfen, ob dadurch unterschiedliche Ergebnisse erzielt werden.

Wie in Abb. 3.6 zu sehen ist, zeigen alle infizierten Pflanzen ein Signal auf der Höhe von ca. 21 Nukleotiden. In den Bereichen der Mock-treated Pflanzen und der AS1-VL sind keine Signale vorhanden. Bei den kleinen, synthetischen RNAs, die als Positiv-/Negativ-Kontrolle verwendet werden, ist jeweils ein eindeutiges Signal bei der Sequenz vorhanden, die komplementär zur Sondensequenz ist. Nur bei der Sonde unten links (+) ist ein zusätzliches Signal bei der eigenen Sequenz zu sehen. Der Übersicht halber wurden nur die Northernblots mit AS1-Sonden gezeigt. Alle Blots mit QFA-Sonden lieferten identische Ergebnisse. Da diese Versuche bewiesen hatten, dass der Bereich, aus dem die kurzen RNAs mit PSTVd-Sequenz stammen, nicht einzugrenzen ist, wurde eine High-Throughput-Sequenzierung in Erwägung gezogen.

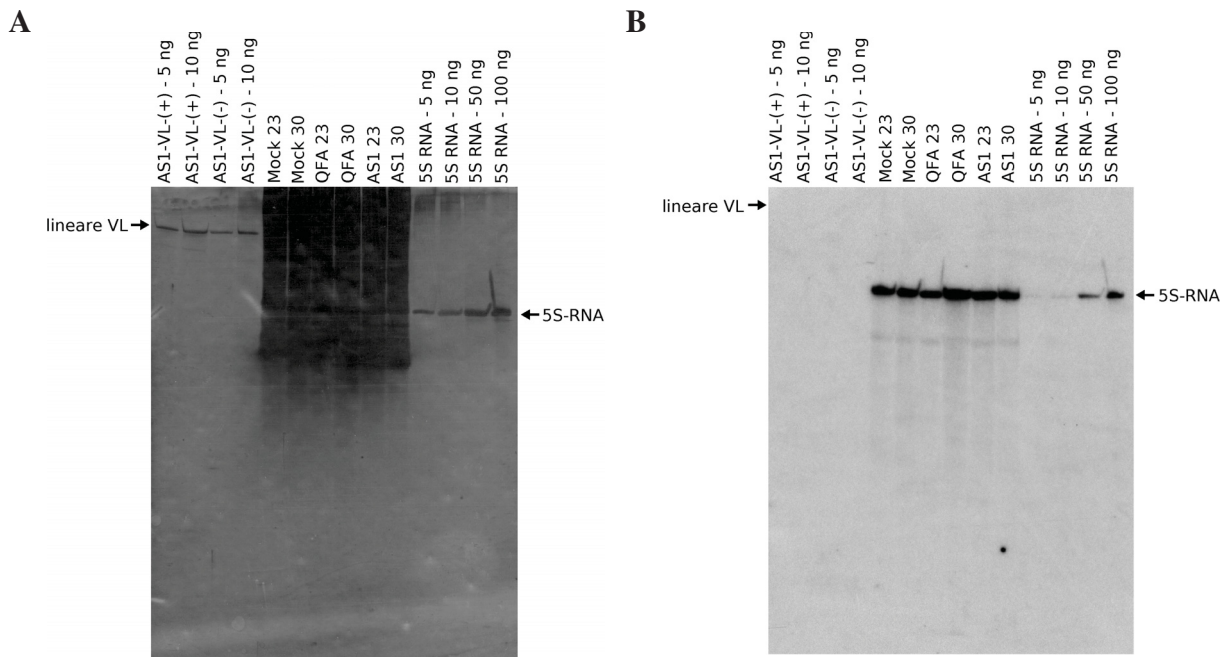


Abbildung 3.5: 5S-RNA-spezifischer Northernblot. (A) Das Kontrollgel, (14 % PAA (30:1)) nach dem Blotten mit Silber angefärbt, und (B) die daraus resultierende Autoradiographie nach 3 Tagen Expositionszeit, zeigen den Beweis, dass 5S-RNA in großen Mengen in der total RNA vorhanden und mit PSTVd nachweisbar ist. (A) Es wurden zwei unterschiedliche Mengen an AS1-VL in (+)- und (-)-Orientierung aufgetragen, sowie jeweils 10 μ g von zwei unterschiedlichen Gesamt-RNA Proben von Mock (scheininfiziert), QFA und AS1 infizierten Tomatenpflanzen (nach 23 und 30 Tagen Infektion). Zusätzlich wurde 5S-RNA in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Links und rechts sind zusätzlich die Laufhöhe der Viroid-VL und der 5S-RNA angegeben.

3.3. Aufreinigung der kurzen RNAs und Vorbereitung zur Sequenzierung

Erste Versuche, kleine RNAs aus der Gesamt-RNA aufzureinigen oder aufzukonzentrieren, führten nicht zu den gewünschten Ergebnissen, wie unter 3.1.4 beschrieben. Schon in der Diplomarbeit (Diermann, 2005) zeigte sich, dass bei einer PEG-Fällung (siehe 2.3.3), die standardmäßig zur getrennten Fällung von großen und kleinen RNAs eingesetzt wurde, schon bei niedriger Prozentigkeit kurze RNAs mit den langen RNAs ausfielen. Ein Anfang 2007 veröffentlichtes Paper von Itaya *et al.* zeigt eine Sequenzierung von PSTVd-miRNAs, der eine PEG-Fällung zur Anreicherung der kleinen RNAs vorausgeht. Um zu sehen, ob das angegebene Rezept andere Ergebnisse zeigt, oder dabei ebenfalls kleine RNAs mitfallen, wurde die Fällung dem Rezept entsprechend durchgeführt und das Ergebnis auf Northernblots betrachtet. In Abbildung 3.7 sind zwei Ausschnitte aus Autoradiographien abgebildet, die zeigen, dass bei der Fällung von langen RNAs auch ein Teil der kurzen RNAs mitfällt.

Es wurden 100 μ g Gesamt-RNA, die etwa 1 g Frischgewicht entsprechen, für jeden Ansatz benötigt. 100 μ g Gesamt-RNA wurden als Vergleich pur auf das Gel aufgetragen (= Gesamt-RNA). Eine zweite Probe wurde mit 5 % PEG und 0,5 M NaCl gefällt. Das Pellet wurde

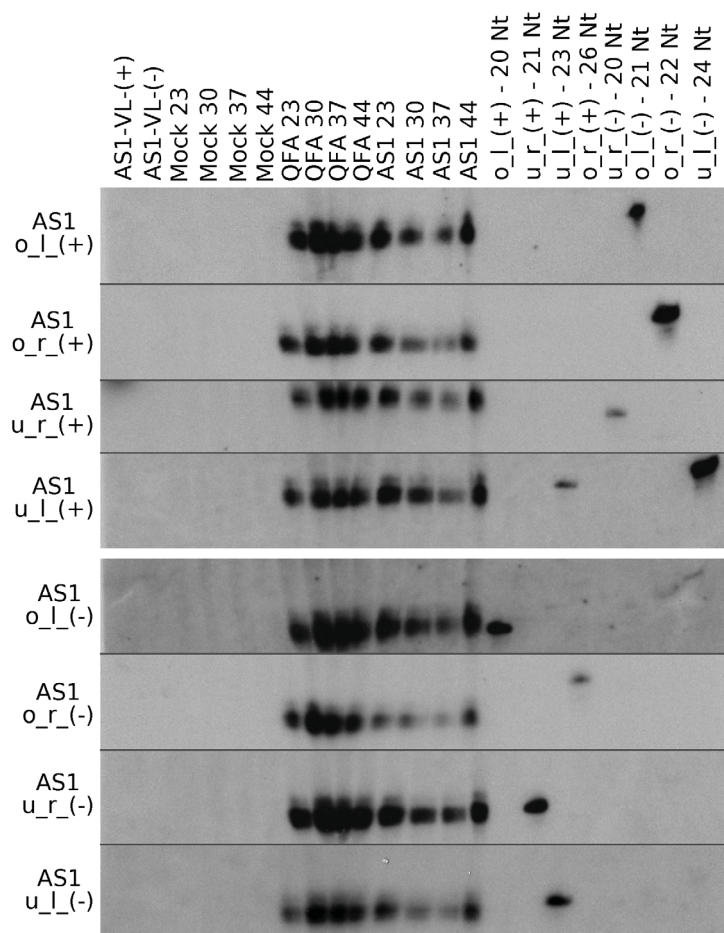


Abbildung 3.6: Ergebnisse der Northernblot-Analysen. Die Autoradiographien zeigen Ausschnitte der Northernblots auf Höhe der kurzen RNAs, die mit unterschiedlichen 1/4-PSTVd-Sonden hybridisiert wurden. Alle geblotteten 14 % (30:1)-PAA-Gele wurden in identischer Weise beladen. Neben 5 ng einer exakten AS1-VL in (+)- und (-)-Orientierung wurden jeweils 4 Proben à 10 µg Gesamt-RNA von unterschiedlich geernteten Tomatenpflanzen (23, 30, 37 und 44 Tagen nach Infektion) aufgetragen. Es wurde Gesamt-RNA scheininfizierter Pflanzen (Mock), sowie mit den PSTVd-Varianten QFA und AS1 infizierter Pflanzen verwendet. In die letzten 8 Slots wurden 15 ng aller synthetischen, kleinen RNAs als Positiv-/Negativ-Kontrolle aufgetragen (vergl. 2.8.2). Die Beschriftungen links neben den einzelnen Blots beschreiben die Orientierung der zur Hybridisierung verwendeten Sonden (vergl. 2.8.1). o = oben, u = unten, l = links, r = rechts, VL = Volllänge. Die Expositionszeiten betragen von oben nach unten 2, 2, 5, 2, 5, 1, 2, und 5 Tag(e).

gewaschen und in AP aufgenommen (= PEG-Pellet) und der Überstand wiederum durch Zugabe von 3 Vol EtOH gefällt. Das daraus resultierende Pellet (= PEG-Überstand) wurde ebenfalls gewaschen, in AP resuspendiert und auf ein Gel aufgetragen. Für den Längenvergleich wurden kurze, synthetische RNAs mit komplementärer Sequenz zur Sonde als Längenstandard und Positivkontrolle aufgetragen. Dieser Versuch wurde für beide Sonden jeweils mit Gesamt-RNA einer QFA- und einer AS1-infizierten Pflanze durchgeführt. Bei den AS1-Proben erkennt man bei beiden Sonden deutliche Signale in allen drei Slots auf der Höhe von etwa 21 Nukleotiden.

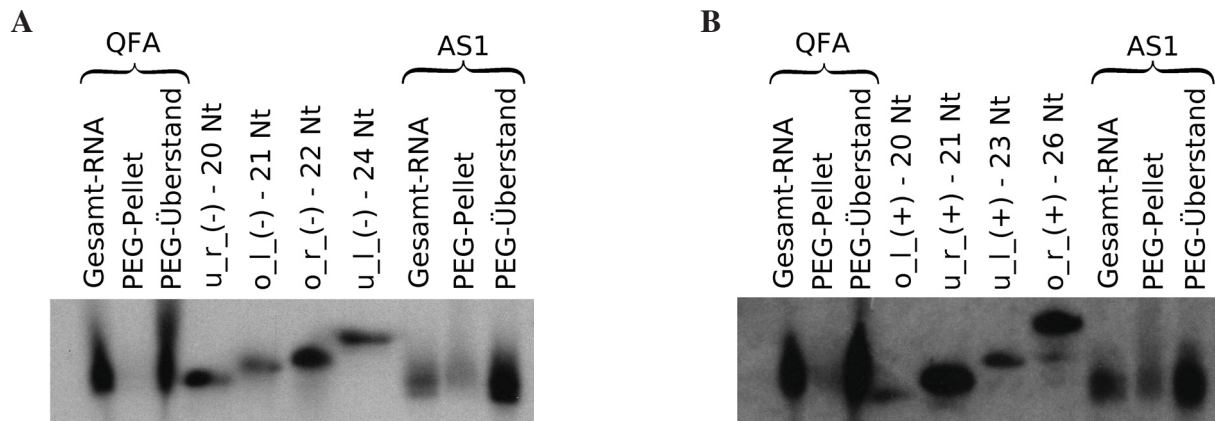


Abbildung 3.7: Kopräzipitation von kurze RNAs bei einer PEG-Fällung. Die Autoradiographien zeigen geblottete Banden aus einem 14 % -igen Gel nach 30 min Blotzeit, Standard-Hybridisierung (2.8.5) und drei Tagen Exposition gegen einen Film. Diese Northernblot-Analysen dienen zum Nachweis, dass eine 6 % PEG-Fällung nicht nur große RNAs, sondern auch kleine RNAs fällt. Auf beide Gele wurden 15 μ g der Stammlösung aufgetragen, sowie das komplette resuspendierte Pellet, welches aus der PEG-Fällung und der Fällung der Überstands erhalten wurde. Die links aufgetragenen Proben wurden aus der Gesamt-RNA einer QFA-infizierten Tomate gewonnen, die rechts aufgetragenen Proben aus der Gesamt-RNA einer AS1-infizierten Pflanze. In der Mitte wurden als Längen-Marker 15ng der 4 synthetischen kurzen RNAs gewählt, die komplementär zur Sonde sind. In (A) wurde mit einer AS1-VL-(+)-Sonde (entspricht der AS1-Sequenz) hybridisiert, in (B) mit einer AS1-VL-(-)-Sonde (komplementär zur AS1-Sequenz), was bedeutet, dass beide Sonden einer exakten Volllänge mit (komplementärer) AS1-Sequenz entsprechen und an Nukleotid 144/145 eine Schnittstelle besitzen. Beide Expositionszeiten liegen bei 3 Tagen.

Bei den den QFA-Proben ist das Signal der mitgefällten kurzen RNAs im PEG-Pellet wesentlich schwächer, aber vorhanden.

Da auf diesen Autoradiographien eindeutig zu sehen ist, dass bei einer 6 % -igen PEG-Fällung ein beträchtlicher Teil der kurzen RNAs beider Orientierungen nach der PEG-Fällung im Pellet wieder zu finden ist und nicht im Überstand, wo sie verbleiben sollten, war dies eine Bestätigung, dass es nicht einfach ist, diese beiden Arten von RNA zu trennen. Zudem wird durch diese Northernblot-Analysen die Vollständigkeit der Ergebnisse von (Itaya *et al.*, 2007) in Frage gestellt. Durch den Verlust eines Teils der Viroid-spezifischen RNAs, könnte genau der Teil verloren gehen, der von Interesse ist, da gerade diese RNAs möglicherweise an z. B. die mRNAs gebunden sind und deshalb mit diesen ausfallen.

3.3.1 Auftrennung der Gesamt-RNA mittels PAGE

Da alle anderen Versuche, die kleinen RNAs aus der Gesamt-RNA zu trennen oder aufzukonzentrieren ohne Erfolg waren, wurde die klassische Methode der Gelelution gewählt. Dafür wurden großen, denaturierende Gele gefahren (siehe 2.5.3), um zum einen eine wesentlich größere Menge an Gesamt-RNA auftragen und zum anderen die kleinen RNAs möglichst gut von dem Rest trennen zu können. Auf Grund des langen Laufweges konnte man sicher stellen, dass keine unerwünschten RNAs wesentlich größerer Länge mit eluiert wurden.

Das eindeutige Ausschneiden der gewünschten Bande stellte wiederum ein Problem dar. Es war weder mit UV-Shadowing noch mit Ethidiumbromid-Färbung möglich eine eindeutige Bande im gewünschten Bereich zu erkennen. Nach einigen Vorversuchen, in denen potentiell richtige Banden ausgeschnitten, geleluert und auf ein PAA-Gel aufgetragen wurden, stellte sich heraus, dass sich der Xylenxanol-Marker sehr gut als Orientierungshilfe eignet. Durch großzügiges Ausschneiden dieser Bande plus ca. 3 cm oberhalb und unterhalb, konnte sicher gestellt werden, dass alle kurzen RNAs darin enthalten waren. Aus diesem Grund wurde dem hierbei verwendeten Formamid-Auftragspuffer nur Xylenxanol als Farbstoff zugesetzt.

3.3.2 Gelelution der kurzen RNAs

Bevor die Gelelution durchgeführt werden konnte, mussten die Gelstücke zuerst ÜN bei -20°C eingefroren werden, da dadurch bei der Elution eine höhere Rückgewinnung möglich ist. Hierbei wurde gegen die Standard-Methode entschieden, durch Schütteln in einem Elutionspuffer die RNA aus dem Gel zu lösen, da man hierbei oft eine große RNA-Menge verliert. Deshalb wurde mit einer Salzfalle eine Elektroelution (siehe 2.9.1) durchgeführt. Durch das Anlegen des Stroms, werden die negativ geladenen RNAs gezwungen, sich aus dem Gel zu lösen und in der Hochsalzlösung zu sammeln. Vorteilhaft bei dieser Methode war auch, dass keine eingebauten Membranen vorhanden sind, wodurch ausgeschlossen werden konnte, dass die RNA unspezifisch bindet. Anschließend konnte die Hochsalzlösung durch Zugabe von Wasser verdünnt und mit EtOH gefällt werden. Da in jeder Form das Risiko minimiert werden sollte, Teile der RNA zu verlieren, wurden alle Fällungen in DNA LoBind Tubes (2 ml, Eppendorf, Hamburg) durchgeführt, die insbesondere bei hohen Salzkonzentrationen eine Wiedergewinnung von DNA/RNA zu nahezu 100 % gewährleisten. Es wurde mehrfach nacheinander in ein Reaktionsgefäß gefällt, damit zum Schluss eine höhere Konzentration an kurzen RNAs vorhanden war.

In Abb. 3.8 (A) wurden alle, für die Sequenzierung zur Verfügung stehenden Gelelutionsproben (Gelelu) auf ein PAA-Gel aufgetragen und mit Silber gefärbt. Als Längenstandard wurden alle kurzen, synthetischen RNAs und ein *HaeIII* Marker verwendet. Gelelu 11–19 stammen aus AS1-infizierten Pflanzen, Gelelu 20 und 21 aus Mock-treated Pflanzen. Wie man sieht, ist bei allen Gelelutionen eine Bande auf Höhe der kurzen RNAs zu sehen, auch bei den nicht infizierten, da mit der Silberfärbung auch die pflanzeigenen kurzen RNAs angefärbt werden. Bei Abb. 3.8 (B) sind zu den bei (A) aufgetragenen Proben noch die Gelelutionen 9.1–10.2 aufgetragen, die auf Grund ihrer geringen Konzentration, bei der Sequenzierung nicht eingesetzt wurden. Hierbei wurde die Membran zuerst mit einer AS1-VL-(–)-Sonde hybridisiert und anschließend, nachdem eine Autoradiographie mit gutem Signal vorhanden war, gestrippt. Dabei wurde die Membran für 2 Minuten in einem Becherglas mit 0,1 % SDS-Lösung gekocht, um die Sonde von der RNA abzuwaschen. Anschließend wurde ein Film über Nacht aufgelegt, um sicher zu gehen, dass kein Signal mehr zu sehen ist. Danach wurde diese Membran nochmals hybridisiert, diesmal mit einer AS1-VL-(+)-Sonde. Wie man auf den Abbildungen sieht, sind nur Signale bei den Gelelutionen der AS1-infizierten Pflanzen zu sehen, nicht bei Gelelu 20–21. Die als Längenstandard und Positiv-/Negativ-Kontrolle aufgetragenen kurzen, synthetischen RNAs zeigen ein deutliches Signal bei der jeweiligen Sonde mit komplementärer Orientierung. Durch die hohe Selbstkomplementarität der Viroid-RNA kommt es aber auch zu schwächeren Signalen bei den RNAs mit gleicher Sequenz.

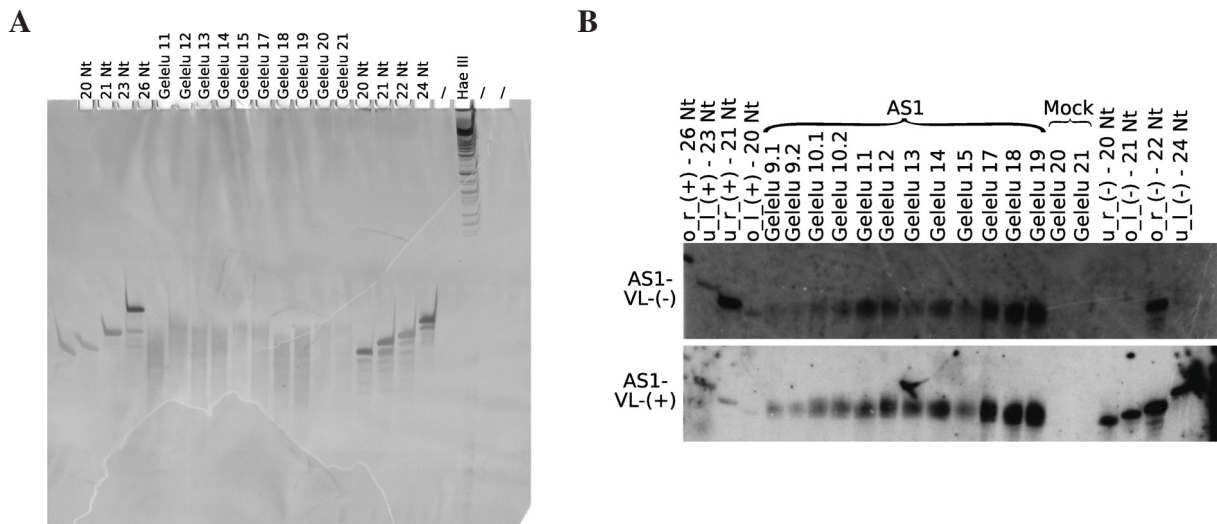


Abbildung 3.8: Überprüfung der miRNA-Gelelutionen mittels PAGE und Northernblot-Analyse. Auf diesen Abbildungen werden auf unterschiedliche Art die Ergebnisse der Gelelution gezeigt. Die Gelelutions-Proben (Gelelu) Gelelu 9–19 resultieren aus der Gesamt-RNA von AS1-infizierten Pflanzen, Gelelu 20–21 stammen aus Mock-Pflanzen. Für den Längenvergleich und als Positiv-/Negativ-Kontrolle (bei (B)) wurden kurze, synthetische RNAs beider Orientierungen aufgetragen. (A) Das abgebildete denaturierende 20 %-ige PAA-Gel, mit einem Vernetzungsgrad von 19:1 (Acrylamid:Bisacrylamid), enthält 8 M Harnstoff und 0,5× TBE. Das Gel wurde anschließend mit Silbernitrat gefärbt. Zu sehen sind alle für die Sequenzierung in Frage kommenden Gelelutions-Proben. Bei dieser Färbung kann nicht zwischen pflanzenspezifischen und viroidspezifischen miRNAs unterschieden werden. *HaeIII* wurde als zusätzlicher Längenstandard aufgetragen. (B) Die Autoradiographien dienen dem radioaktiven Nachweis, dass kurze RNAs mit Viroid-Sequenz in der aufgereinigten und geleluerten Probe enthalten sind. Links neben den Autoradiographien sind die Sonden angegeben, mit denen hybridisiert wurde. Auf beiden Gelen wurden jeweils 15 ng Probe eingesetzt. o = oben, u = unten, l = links, r = rechts, VL = Volllänge.

Die für alle Abbildungen verwendeten Proben stammen aus der Lösung, die zur Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer verwendet wurde, um nicht mehr Lösung als nötig zu verschwenden.

3.3.3 Spezifische Aufreinigung der Viroid-spezifischen miRNAs mittels Dynabeads

Die Dynabead-Aufreinigung der Viroid-spezifischen aus den Gesamt-RNAs wurde gemacht, da man davon ausgehen musste, dass die einzelnen Viroid-Sequenzen in geringen Konzentrationen in den Pflanzen vorhanden sind. Daher sollte mit dem Großteil der geleluerten Proben eine Dynabead-Aufreinigung erfolgen, um eine Chance zu haben, genug Ergebnisse durch die Sequenzierung zu erhalten.

Zu Beginn mussten die Bedingungen ausgetestet werden, bei denen die kurzen RNAs an die Sonde binden bzw. bei denen man die gewünschte Sequenz wieder frei setzen kann.

Das Ziel war die Trennung der kleinen RNAs von der AS1-Volllängen-Sonde. Die Aufgabe bestand in der Suche nach Bedingungen, unter denen die gebundenen kurzen RNAs von der Sonde

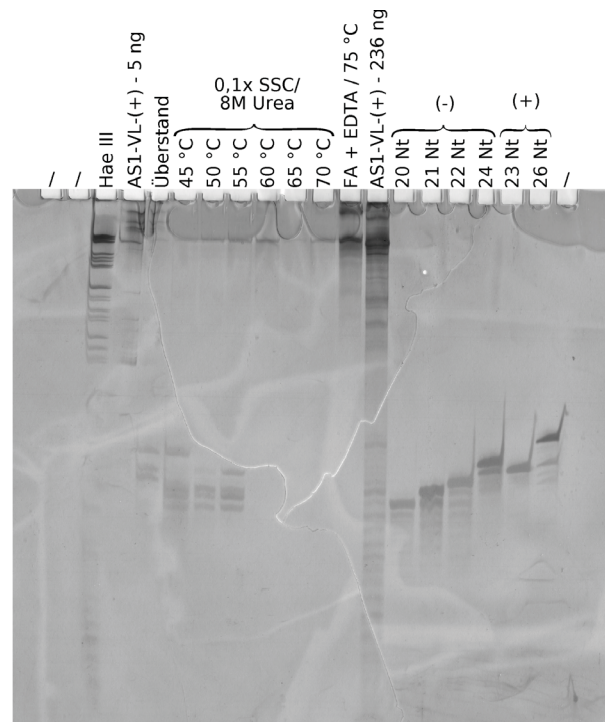


Abbildung 3.9: Austestung der Dynabead-Bedingungen. Um optimale Bedingungen für die Ablösung der kurzen RNAs von den Dynabeads zu erhalten, mussten einige Vorversuche gemacht werden. Die Dynabeads mit hybridisierten kurzen, synthetischen RNAs wurden bei unterschiedlichen Temperaturen in 0,1× SSC/8M Harnstoff erhitzt. Der Überstand wurde jedesmal abgenommen, EtOH-gefällt und das Pellet in Auftragspuffer aufgenommen. Zum Schluss wurden die Beads nochmals bei 75 °C in FA+EDTA erhitzt und wie zuvor verfahren. Nach der Auftrennung auf einem 20 % (19:1)-PAA-Gel mit 8 M Harnstoff und 0,5× TBE ist eine deutliche Grenze zu erkennen. Als Längen-Marker wurden HaeIII, AS1-VL und kurze, synthetische RNAs in unterschiedlicher Länge und Polarität aufgetragen.

getrennt werden können, so dass die Nukleinsäuren in deutlich unterschiedlichen Fraktionen der Aufreinigung zu finden sind. Die Probe, die zuvor nach 2.9.3 durch Hybridisierung der aufgereinigten Sonde an kurze, synthetische RNAs hergestellt wurde, wurde nach und nach mit unterschiedlichen Lösungen und bei unterschiedlichen Temperaturen behandelt. Dabei wurde nach 4 min im Heizblock die Probe 30 Sekunden in den Magneten gestellt, bevor der Überstand abgenommen wurde. In den ersten Schritten wurde als Niedrigsalz-Lösung 0,1× SSC verwendet und die Probe nacheinander bei 67, 70, 73, 77 und 80 °C erhitzt. Im zweiten Schritt wurde pures Wasser, ohne Zugabe von Salz zur Stabilisierung der Basenpaare, als Lösungsmittel verwendet. Die Proben wurden bei 70, 75 und 80 °C eluiert. Im letzten Schritt wurde Formamid-Lösung verwendet und die Elutionstemperatur auf 75 und 80 °C eingestellt. Alle Fraktionen wurden getrennt gesammelt und EtOH-gefällt (siehe 2.3.1). Nach der Auftragung auf ein 20 % (19:1) PAA-Gel konnte man sehen, dass die kurzen RNAs von der Sonde getrennt werden konnten, allerdings ergab sich keine eindeutige Grenze. Bei weiteren Versuchen wurde dem Ansatz Harnstoff zugefügt, da dieser eine denaturierende Wirkung hat und den T_m senkt, wobei gilt: 2–4 °C pro 1 M Harnstoff.

Im nächsten Schritt wurden zwei Ansätze parallel getestet, einmal mit $0,1\times$ SSC/4 M Harnstoff und einmal mit $0,1\times$ SSC/8 M Harnstoff. Als Elutionstemperaturen wurden 45, 50, 55, 60, 65 und 70 °C verwendet. Zum Schluss wurde die Sonde mit Formamid-Lösung bei 75 °C von den Dynabeads getrennt, um zu sehen, ob daran noch kurze RNAs gebunden sind. Die Proben mit 4 M Harnstoff zeigten keine eindeutige Grenze. Die Proben mit 8 M Harnstoff dagegen zeigten, dass die kurzen RNAs in deutlich unterschiedlichen Fraktionen der Aufreinigung zu finden waren.

Wie in Abb. 3.9 zu sehen ist, sind bei 55 °C alle kurzen RNAs von der Sonde abgetrennt worden. Auch bei der FA-Fraktion sind keine kleinen RNAs mehr nachweisbar. Bei diesem Versuch wurden die kurzen, synthetischen RNAs gegen eine AS1-VL-(+)-Sonde hybridisiert. Die Sonde wurde mit einer Konzentration von 100 nM eingesetzt, die kurzen RNAs jeweils in 80 nM Konzentrationen, damit keine Sättigung einsetzt. Im Überstand sind alle nicht gebundenen kurzen RNAs enthalten. Es sind deutlich die Banden der 26 und 23 Nt Probe zu erkennen, deren Sequenzen identisch zur Orientierung der Sonde sind. Eine leichte Bande der 24 Nt RNA ist ebenfalls zu sehen, was darauf schließen lässt, dass die Sequenz schlechter bindet als die Anderen. Die weiteren Sequenzen wurde komplett gebunden, und spätestens bei 55 °C vollständig von der Sonde getrennt. Somit wurde bei den weiteren Versuchen bei 55 °C in einer $0,1\times$ SSC/8 M Harnstoff-Lösung eluiert und die Sonde bei 75 °C in Gegenwart von FA-Lösung von den Dynabeads getrennt.

3.4. High-Throughput-Sequenzierung

3.4.1 Herstellung von cDNA-Banken

Der Firma vertis wurden 3 unterschiedliche Proben zugeschickt, aus denen cDNA synthetisiert werden sollte. Die Proben waren:

- **Mock** = Mock-treated = geleluierte kurze RNAs aus Gesamt-RNA einer nicht infizierten Tomatenpflanze
- **AS1** = geleluierte kurze RNAs aus Gesamt-RNA einer AS1-infizierten Tomatenpflanze
- **Viroid** = geleluierte kurze RNAs aus Gesamt-RNA einer AS1-infizierten Tomatenpflanze; zusätzlich durch Dynabeads aufgereinigt, um nur Viroid-spezifische Sequenzen zu erhalten.

Die folgenden Angaben wurden einer Dokumentation der Firma vertis entnommen, die mit den Ergebnissen der Sequenzierung geliefert wurden.

Zuerst wurden die kleinen RNAs zur Entfernung eines potentiellen 5'-Triphosphats mit TAP (Tobacco Acid Pyrophosphatase) behandelt. Anschließend wurde mit Hilfe der Poly(A)-Polymerase ein Poly(A)-Schwanz an die RNAs angehängt, gefolgt durch eine Ligation eines RNA-Adapters (siehe 3.2) an das 5'-Phosphat der miRNAs. Die Erst-Strang cDNA-Synthese wurde durch Benutzung eines Oligo(dT)-Adapter-Primers (siehe 3.2) und m-MLV-RNase H⁻ Reverser Transkriptase durchgeführt. Die daraus resultierenden cDNAs wurden anschließend durch Benutzung

Tabelle 3.1: cDNA-Herstellung. Probenbeschreibung, benötigte PCR-Zyklen zur cDNA-Amplifikation und an die 5'-Enden der cDNAs angefügte Barcode-Sequenzen.

Nr.	1	2	3
Probe	Mock	AS1	Viroid
5'-Barcode	ACTA	CGGA	GTAA
PCR-Zyklen	17	17	17

Tabelle 3.2: Adapter-Sequenzen bei der cDNA-Herstellung. Die folgenden Adapter-Sequenzen flankieren das cDNA-Insert. Der 5'-Adapter ist ein RNA-Oligonukleotid, gefolgt von einem 4-ziffrigen Barcode am 3'-Ende, hier mit 4× N dargestellt. Der 3'-Adapter ist ein Oligo(dT)-Adapter-Primer und wird bei der Erst-Strang cDNA-Synthese benötigt.

5'-Ende (53 Basen):

5'- AATGATACGGCGACCACCGACAGGTT - CAGAGTTCTACAGTCCGACGATCNNNN -3'

3'-Ende (45 Basen):

5'- CAAGCAGAAGACGGCATACGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3'

einer high fidelity DNA Polymerase durch PCR amplifiziert, bis eine Konzentration von ca. 20 ng/μl vorhanden war.

Die für die PCR-Amplifikation verwendeten Primer wurden für amplicon sequencing gemäß der Anleitung von Illumina/Solexa entworfen.

Die Länge der beiden flankierenden Sequenzen zusammen beträgt 98 Basen. Da die PCR-Produkte Sequenzen von 19-29 Nt enthalten, muss die Gesamtlänge bei 117-127 Basenpaaren liegen. Die PAGE-Analyse in Abb. 3.10 der Proben PCR-amplifizierten cDNAs zeigt, dass die cDNAs in der erwarteten Länge waren.

Die cDNA wurde über das Macherey & Nagel NucleoSpin Extract II Kit aufgereinigt und in ungefähr gleichen Mengen gemischt.

3.4.2 Solexa-Sequenzierung

Nach Herstellung der cDNA (siehe 3.4.1) wurde der cDNA-Pool für die Solexa-Sequenzierung zur Firma GATC Biotech AG, Konstanz geschickt. Von dieser Firma habe ich erhalten:

1. Anzahl der erhaltenen reads: 4.187.048
2. Anzahl der reads, die eindeutig zu den unterschiedlichen tags zuweisbar waren:

ACTA	(Mock)	1.350.771
CGGA	(AS1)	375.502
GTAA	(Viroid)	<u>1.811.097</u>
Summe		<u>3.537.370</u>

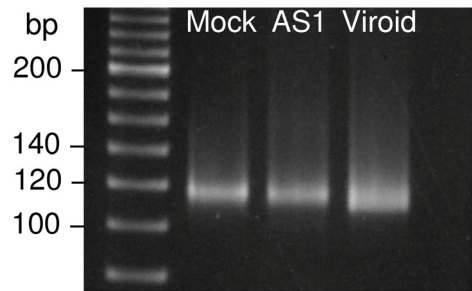


Abbildung 3.10: PAGE-Analyse der cDNA. Auf diesem Gel ist die PAGE-Analyse der Firma vertis gezeigt. Es wurden je ca. 100 ng der PCR-amplifizierten cDNAs auf ein 6 % -iges PAA-Gel aufgetragen. Im ersten Slot ist der Größenstandard aufgetragen, links daneben wurden die entsprechenden Banden mit der jeweiligen Basenpaar (bp)-Anzahl beschriftet. In den Slots 2-4 wurden die drei cDNA-Proben aufgetragen.

Bei der Sequenzierung mit dem Illumina Genome Analyzer™ wird mit einer Fließzelle gearbeitet, auf der bis zu 40 Millionen Einzelmoleküle gebunden werden können. Diese Fließzelle hat 8 Kanäle, die getrennt beladen und gleichzeitig analysiert werden können. Die Amplifikation erfolgt durch eine Brücken-Amplifikation, bei der räumlich definierte Molekül-Cluster gebildet werden. Bei der Sequenzierung selbst wird die sogenannte Methode der „Sequenzierung durch Synthese“ mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden durchgeführt. Die eingebauten Nukleotide besitzen reversibel blockierte 3'-OH-Gruppen, so dass Nukleotid für Nukleotid eingebaut und ausgelesen wird. Dadurch ist es auch möglich, sogenannte Homopolymere korrekt aufzulösen, die bei anderen Methoden oftmals Probleme darstellen. 40 Millionen Reads (= Durchlesen einer Sequenz) mit Leseweiten von bis zu 35 Nukleotiden ergeben bis zu 1 GB an Sequenzierinformationen (aus Laborwelt, Nr.3/2007-Vol.8, BIOCOT AG). Der Verlauf einer Sequenzierung mit Solexa Technologie ist in Abbildung 3.11 schematisch gezeigt und im Folgenden beschrieben:

1. **Herstellung einer DNA-Probe.** An beide Enden der doppelsträngigen DNA muss ein Adapter ligiert werden. In diesem Fall wurde aus miRNA cDNA hergestellt, wobei die Adapter schon während dieses Vorgangs, wie unter 3.4.1 beschrieben, an die Sequenzen ligiert wurden.
2. **Anlagerung der DNA an die Oberfläche.** Die nun einzelsträngigen DNA-Fragmente werden wahllos, in einer nicht zu hohen Konzentration, an die innere Oberfläche des Flusszellen-Kanals gebunden. In diesem Moment ist es nicht von Belang, welcher der Adapter an die Oberfläche bindet. Zusätzlich wird ein dichter Rasen von beiden Adaptern auf die Oberfläche aufgebracht.
3. **Brücken-Amplifikation.** Durch die Zugabe von unmarkierten Nukleotiden und Enzymen wird die Flüssig-Phasen-Brücken-Amplifikation initiiert. Dabei lagert sich der nach oben ragende Adapter durch Biegung des Fragments an einen entsprechenden Adapter, der in seiner nahen Umgebung an der Oberfläche befestigt ist, an und es kommt zu einer Amplifikation dieses Fragments.
4. **Die Fragmente werden doppelsträngig.** Das Enzyme baut Nukleotide ein, um doppelsträngige Brücken auf der Oberfläche zu bilden.

5. **Denaturierung der Doppelstrang-Moleküle.** Durch eine Denaturierung werden die Doppelstränge wieder getrennt. Die einzelsträngigen Templates bleiben auf dem Substrat verankert. Die Brücken-Amplifikation kann nun wieder von neuem beginnen bis Cluster der gleichen Sequenz entstehen.
6. **Vollständige Amplifikation.** Einige Millionen dichter Cluster der DNA werden in jedem der acht Kanäle der Flusszelle erzeugt. Durch einen weiteren Schritt wird dafür gesorgt, dass nur noch einer der Adapter auf der Oberfläche gebunden bleibt, wodurch sichergestellt wird, dass alle Sequenzen eines Clusters die identische Orientierung besitzen.
7. **Bestimmung der ersten Base.** Um den ersten chemischen Sequenzierzyklus zu initiieren, werden alle vier Nukleotide mit einem reversibel-blockierten und markierten 3'-Ende, sowie Primer und DNA-Polymerase in die Flusszelle gegeben. Dabei lagern sich die entsprechenden, komplementären Nukleotide an die DNA an. Die 3'-Enden sind blockiert, damit immer nur ein Nukleotid angelagert werden kann. Alle nicht eingebauten Nukleotide werden abgewaschen.
8. **Abbildung der ersten Base.** Nach der Anregung mit einem Laser, kann die emittierende Fluoreszenz von jedem Cluster auf der Flusszelle eingefangen und abgebildet werden. Anschließend wird das blockierte 3'-Ende und das Fluorophor von jeder angelagerten Base entfernt.
9. **Bestimmung der zweiten Base.** Um den zweiten chemischen Zyklus zu initiieren, werden wieder alle vier markierten Nukleotide, die wiederum ein reversibel-blockiertes 3'-Enden besitzen, sowie das Enzym in die Flusszelle gegeben. Dabei lagert sich jeweils das nächste Nukleotid an die DNA an.
10. **Abbildung des zweiten chemischen Zyklus.** Nach der nächsten Laser-Anregung werden die Abbildungs-Daten wie zuvor gesammelt und die Identität der zweiten Base für jeden Cluster aufgezeichnet. Die Blockierung des angelagerten Nukleotids wird wieder aufgelöst, wodurch auch der Farbstoff entfernt wird.
11. **Lesen der Sequenz über mehrere chemische Zyklen.** Die Sequenzier-Zyklen werden bis zum Ende der Basensequenz des zu sequenzierenden Fragments wiederholt. Dies erfolgt immer mit einer Base nach der anderen.
12. **Alignieren der Daten.** Zum Schluss können die Daten aligniert, mit einer Referenz verglichen und Sequenzunterschiede identifiziert werden. In diesem Fall wurde mit den erhaltenen Sequenzen wie unter 3.5 beschrieben vorgegangen.

3.5. Analyse der Solexa-RNAs

Zur Auswertung der Solexa-Datensätze wurden von G. Steger unter Benutzung von BioPerl eine Reihe von kleinen perl-Programmen geschrieben. Da bei der gewählten Sequenziermethode mehrfach vorhandene Sequenzen auch mehrfach sequenziert wurden, wurden nahezu identische Sequenzen mit frei verfügbaren Programm aus dem cd-hit-Paket zusammengefasst. Die cd-hit-

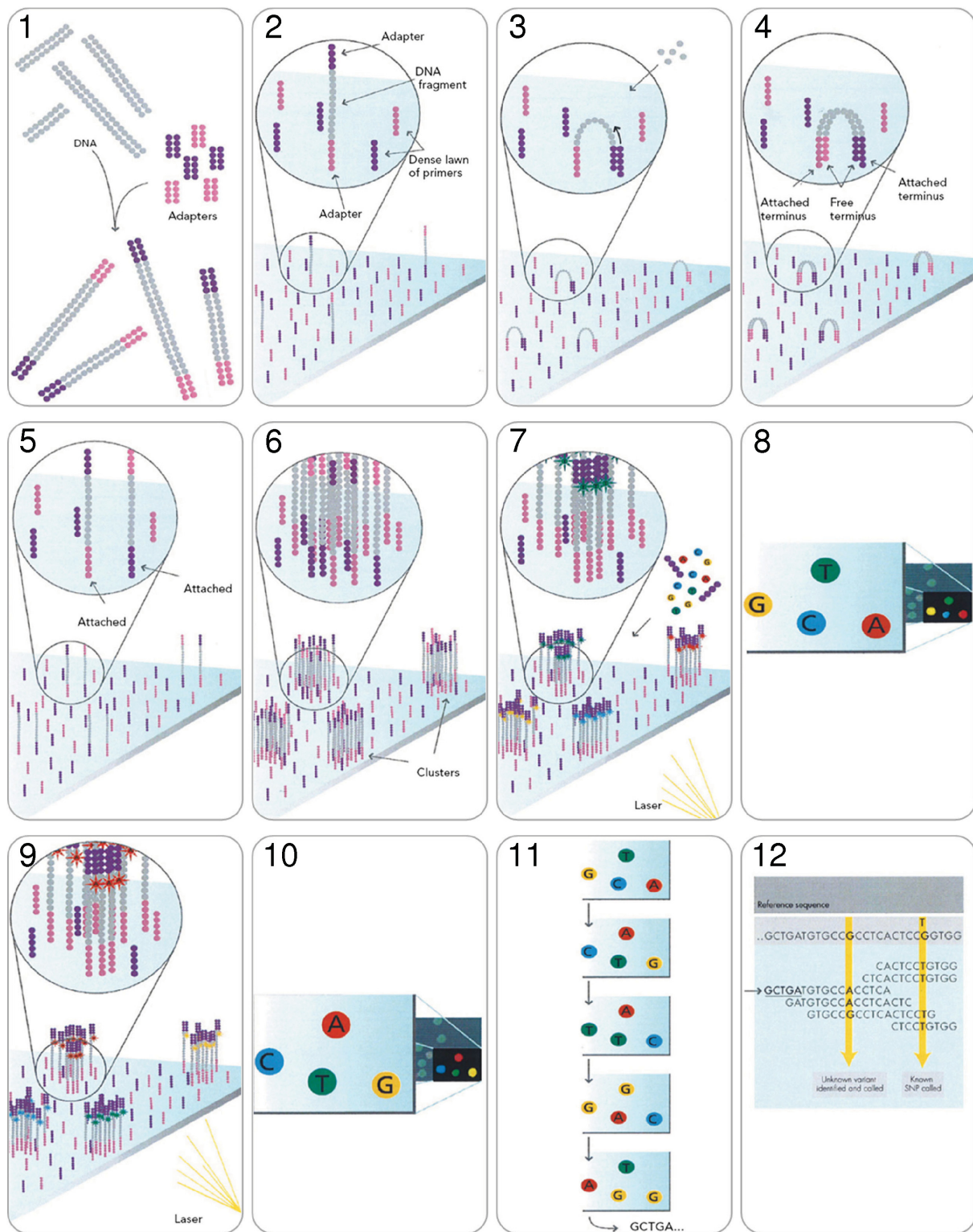


Abbildung 3.11: Solexa-Sequenzierung. Ablauf einer Sequenzierung mit Solexa Technologie der Firma Illumina. Die ausführliche Erklärung zu den Abbildungen ist unter 3.4.2 beschrieben. Die Abbildung wurde aus einer Anleitung der Firma Illumina® (Technology Spotlight, Illumina® Systems & Software, DNA Sequencing with Solexa® Technology, Technology Spotlight, Illumina® Systems & Software) entnommen und abgewandelt.

Tabelle 3.3: Verteilung der Solexa-Sequenzen auf die drei Tag-Gruppen.

Tag	Name	Soll ^a	Gefunden	
ACTA	Mock	1.350.771	1.163.686	27,8 %
CGGA	AS1	375.502	323.878	7,7 %
GTAA	Viroid	1.811.097	1.324.417	31,6 %
Rest ^b		649.678	1.375.067	32,8 %
		4.187.048	4.187.048	99,9 %

^a Von vertis angegeben

^b Bei „Soll“ entspricht der Tag nicht (ACTA|CGGA|GTAA) bzw. bei „Gefunden“ erfüllt die Sequenz auch nicht die in Abschnitt 3.5.1 angegebenen Kriterien.

Programme benötigten z. T. bis zu einer Stunde Rechenzeit auf einem Intel Xeon 5160, 3 GHz mit 4GB RAM; der Zeitaufwand für die perl-Programme lag meist im Minutenbereich. Ergebnisse, die mit diesen Programmen erzielt wurden, sind im Folgenden dargestellt.

3.5.1 Zuordnung der Sequenzen zu den Proben

Die von vertis übermittelte Sequenz-Datei lag im FASTA-Format vor, wobei die eindeutigen Sequenznamen dem Muster „KN-1284_miRNA.7_[0 – 9]{2,2}_[0 – 9]{4,4}_[0 – 9]{4,4}“ entsprachen. Bei der Beschreibung des Sequenznamens handelt es sich um reguläre die wie folgt zu verstehen sind: [0 – 9]{2,2} bedeutet z. B., dass genau zwei Ziffern ({2,2} bedeutet mindestens zwei, höchstens zwei) von 0 bis 9 ([0 – 9]) genommen werden, wobei die Ziffern doppelt vorkommen dürfen. Die Sequenzen waren bereits aufbereitet; d. h., beide Primer-Teile und auch ein Großteil der 3'-oligoA-Reste waren bereits entfernt. Mit Hilfe eines perl-Programms wurden die Sequenzen entsprechend ihres 5'-Tags aus vier Basen in drei neue Dateien ohne ihr 3'-oligoA-Ende und ohne 5'-Tag geschrieben. Dabei mussten die Sequenzen den folgenden Kriterien entsprechen, ansonsten wurden sie verworfen:

- Die Sequenz beginnt mit einem der Proben-spezifischen Tags.
- Die Sequenz enthält mindestens ein 3'A.
- Die Sequenz ist nach Entfernung der 3'As länger als 16 Nukleotide.
- Die Sequenz enthält mindestens 10 % nicht-A-Nukleotide

Aufgrund der letzten drei Kriterien ist die Zahl der zu den Proben zuordnenbaren Sequenzen geringer, als von vertis angegeben (siehe Tab. 3.3).

Der hohe Anteil an nicht-zuordnenbaren Sequenzen („Rest“ in Tab. 3.3) lässt sich nicht auf einen hohen Anteil des vierten Tags TACA, das bei Solexa-Sequenzierung eingesetzt wird, zurückführen, noch sind auffallend hohe Anteile an 1-Fehler-Varianten der drei benutzten Tags

vorhanden. Falls der Anteil an 1-Fehler-Varianten aller Tags auf Sequenzierfehler zurückzuführen ist, dann entspricht dies einem mittleren Sequenzierfehler pro Base von etwa 0,7 % (Daten nicht gezeigt).

3.5.2 Erstes Zusammenfassen der Sequenzen

In jeder Tag-Gruppe wurden identische Sequenzen zu einem Sequenzeintrag zusammengefasst. Der neue Sequenzname entstand dabei aus der Konkatenierung der Anzahl der zusammengefassten Sequenzen und der einzelnen Sequenznamen.

Anschließend wurden mithilfe des WU-BLAST-Programms (Gish, W. (1996–2004), <http://blast.wustl.edu>) „dust“ niedrig-komplexe Basenfolgen durch Ns ersetzt; diese niedrig-komplexe Basenfolgen bestanden bei den vorhandenen Sequenzen fast ausschließlich aus längeren Mononukleotid-Folgen am 5'- oder am 3'-Ende der Sequenzen. Solche 5'- und 3'-terminalen Ns wurden anschließend über ein eigenes perl-Programm gelöscht; falls eine Sequenz dann kürzer als 17 Nukleotide wurde, wurde sie aus dem Datensatz entfernt.

Bei ersten BLAST-Suchen fiel auf, dass viele der Sequenzen, die länger als 27 Nukleotide waren, aus zusammengesetzten Sequenzen zu bestehen schienen; d. h., für solche längeren Sequenzen wurden perfekte Treffer mit etwa 22 Nukleotiden für ihr 5'-Ende gefunden, während der restliche 3'-Teil nicht zugeordnet werden konnte. Daher wurden alle Sequenzen aus den Datensätzen gelöscht, die länger als 27 Nukleotide waren.

In diesen Datensätzen wurde als erster Test nach PSTVd-AS1-Sequenzen mit WU-BLAST gesucht; die Optionen wurden so gewählt, dass alle Treffer keine Insertionen oder Deletionen und maximal ein Nukleotidaustausch enthalten konnten (`-W 18 -M 1 -N -4 -Q 1 -R 1 -gapW=1 -B=9999999`); Ergebnisse sind im unteren Teil der Tab. 3.4 zusammengefasst. Folglich enthält der Datensatz, der aus der nicht-infizierten Pflanze erhalten wurde, einen marginalen Anteil an PSTVd-ähnlichen Sequenzen, während Viroid- und AS1-Datensatz knapp 50fach höhere Anteile und untereinander ähnliche hohe Anteile an PSTVd-ähnlichen Sequenzen besitzen. Da also der Datensatz, der auf der Dynabead-Aufreinigung beruht (Viroid), nicht wesentlich mehr PSTVd-ähnliche Sequenzen enthält, als der Datensatz ohne Dynabead-Aufreinigung (AS1), lässt an der Effizienz und/oder Spezifität der Aufreinigungsmethode zweifeln.

3.5.3 Entfernen von ribosomalen, tRNA- und Organellen-Sequenzen

Aus den drei Solexa-Datensätzen wurden anschließend ribosomale, tRNA- und Organellen-Sequenzen entfernt. Dazu wurden zwei Datensätze mit mehreren 16 S-, 23 S-, 4,5 S-, 5 S-, 5,8 S-, 25 S-rRNA-Sequenzen von Solanaceen aus GenBank und ca. 100 tRNA-Sequenzen aus der tRNA-Datenbank (Sprinzl & Vassilenko, 2005) bzw. Chloroplasten-Genomen von Solanaceen aus GenBank zusammengestellt. Alle Sequenzen, die mit diesen Datensätzen in einer stringenten BLAST-Suche (`-W 18 -M 1 -N -4 -Q 1 -R 1 -gapW=1 -B=9999999`) in den Solexa-Datensätzen gefunden wurden, wurden aus den Solexa-Datensätzen entfernt.

Tabelle 3.4: Erstes Zusammenfassen von Sequenzen innerhalb der Sequenzgruppen. Zusammenfassen identischer Sequenzen (Zeile 2), Entfernen von Sequenzen geringer Komplexität (Zeile 3) und zu langer (> 27 Nukleotide) bzw. zu kurzer (< 17 Nukleotide) Sequenzen (Zeile 5) verkleinerte die Ausgangsdatensätze (Zeile 1) auf die in Zeile 4 bzw. 6 angegebenen Anteile. Danach wurde eine erster Suche per WU-BLAST in diesen Datensätzen durchgeführt (Zeilen 7–11).

	Viroid	AS1	Mock
Total	1.324.417	323.878	1.163.686
Zusammengefasst ^a	1.128.101	295.390	1.073.882
nach dust ^b	1.098.325	291.596	1.065.975
	82,9 %	90,0 %	91,6 %
nach Länge	1.068.920	284.936	1.050.815
	80,7 %	88,0 %	90,3 %
AS1 ^d TN ^c	1.055.458	282.782	1.050.632
FP ^e	8.980	1.165	84
TP ^f	4.482	989	99
TP/Total	0,338 %	0,305 %	0,009 %
TP/(nach Länge)	0,419 %	0,347 %	0,009 %

^a Nach Zusammenfassen identischer Sequenzen

^b Nach Entfernen von Sequenzen mit niedriger Komplexität und Sequenzen mit Längen kürzer als 17 bzw. länger als 27 Nukleotiden.

^c Sequenzen, die eindeutig nicht in PSTVd-AS1 vorkommen

^d BLAST-Suche mit PSTVd-AS1-Sequenz

^e Sequenzen, die bei gegebenen Kriterien (siehe Abschnitt 3.5.2) nicht in PSTVd-AS1 vorkommen

^f Sequenzen, die eindeutig in PSTVd-AS1 vorkommen

3.5.4 Zusammenfassen der Sequenzen per cd-hit-est

Aus den Ergebnissen der ersten BLAST-Suche nach PSTVd-Sequenzen in den drei Solexa-Datensätzen (siehe Tab. 3.4) war offensichtlich, dass die Datensätze noch viele praktisch identische Sequenzen enthielten, die sich meist nur durch geringe Längendifferenzen unterschieden. Daher wurden solche Sequenzen mit dem Cluster-Programm „cd-hit-est“ (Li & Godzik, 2006) zusammengefasst. Die Optionen (`-c 95 -n 8 -r 1 -p 1 -d 40`) wurden so gewählt, dass nur Sequenzen mit mehr als 95 % Identität zusammen gefasst wurden. Vor Verwendung des Programms mussten die Sequenznamen in den Datensätzen auf maximal 40 Zeichen gekürzt werden, da bei längeren Namen das Programm mehrfach nicht terminierte; in der Ausgabedatei wurde wieder die langen Sequenznamen eingesetzt. Die Häufigkeit, mit der Sequenzen vor bzw. nach der Verwendung von cd-hit-est in den Datensätzen auftraten, ist in Abb. 3.12 gezeigt.

3.5.5 Identifizierung von PSTVd-Sequenzen

Nach Zusammenfassen mit cd-hit-est wurde in den Solexa-Datensätzen nach PSTVd-AS1-Sequenzen mit WU-BLAST gesucht; die Optionen wurden so gewählt, dass alle Treffer keine

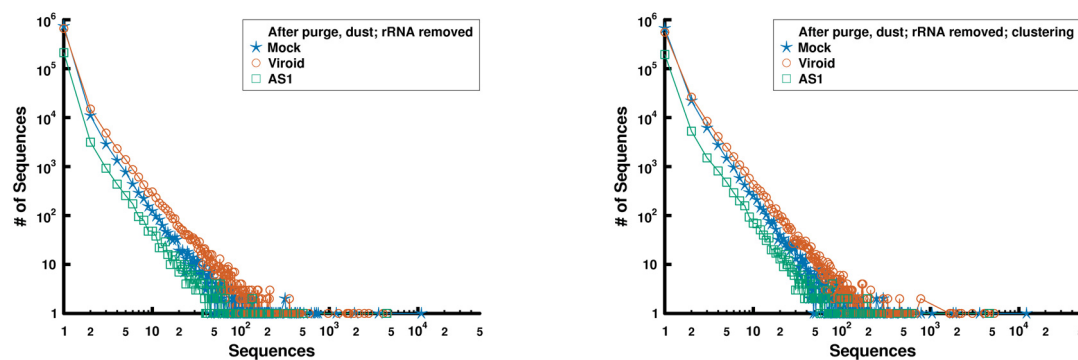


Abbildung 3.12: Häufigkeit von Sequenzen in den Solexa-Datensätzen. Auf der x-Achse ist die Zahl (nahezu) identischer Sequenzen, die zu einer Sequenz zusammengefasst wurden, angegeben; auf der y-Achse die Anzahl dieser Häufigkeitsklassen. Z. B. kommen im Mock-Datensatz (blaue Sterne) nach Zusammenfassen durch das Programm cd-hit-est (rechte Abbildung) singuläre Sequenzen 664.000fach vor (# of Sequences = 1; Sequences = $>10^4$), während nur eine einzige Sequenz 12.200fach auftritt (Sequences = 1; # of Sequences = $<10^6$).

Insertionen oder Deletionen und maximal ein Nukleotidaustausch enthalten konnten (`-W 18 -M 1 -N -4 -Q 1 -R 1 -gapW=1 -B=9999999`). Aus der BLAST-Ausgabe wurde über ein perl-Programm als falsch-positiv definierte Treffer entfernt und korrekte Treffer in eine Grafik-Datei für skencil (Vektor-Zeichenprogramm; www.skencil.org) umgesetzt. Als falsch wurden Treffer definiert, bei denen mehr als zwei Nukleotide der kleinen RNA nicht mit der PSTVd-Sequenz übereinstimmten oder weniger als 18 Nukleotide übereinstimmten oder die Wahrscheinlichkeit P für eine Übereinstimmung größer als $1 \cdot 10^{-3}$ war. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.13 dargestellt.

3.5.6 Vergleich der Datensätze

Im Folgenden wurde versucht, Sequenzen in den Solexa-Datensätzen zu finden, die auf eine mögliche Unter- oder Überexpression von Tomaten-Sequenzen hinweisen könnten. Dazu wurden jeweils zwei Solexa-Datensätzen mithilfe von cd-hit-est-2d unter Berücksichtigung eines 95 %-Identitätskriteriums verglichen; dabei wurden zwei Ausgabedateien erzeugt, die jeweils die Sequenzen enthalten, die nicht im anderen Datensatz auftreten. Die Sequenzen in diesen Ausgabedateien wurden per perl-Programm nach ihrer in den Sequenznamen vermerkten Häufigkeit sortiert. Die jeweils hundert häufigsten Sequenzen wurden zum Teil nochmals per Auge, der Übersicht halber, zusammengefasst und in den Tabellen 3.5 – 3.10 dargestellt. Nicht identische Sequenzteile wurden durch Ns ersetzt, um ähnliche Sequenzen zusammenzufassen. Die Benennung der jeweiligen Solexa-Proben („Mock“, „AS1“, „Viroid“) ist auf die Bezeichnungen aus Abschnitt 3.4.1 bezogen. Die Annotationen wurden per NCBI-BLAST-Webserver in „Nucleotide collection“ eingeschränkt auf Solanaceae (taxid:4070) bestimmt, wobei gemäß der Kürze der Sequenzen meist nur E-Werte zwischen $1E-2$ und <1 auftraten. Zusätzlich wurden die Sequenzen per WU-BLAST mit PSTVd-AS1 und der kompletten miR-Base (Version 12.0; Griffiths-Jones *et al.*, 2008) verglichen

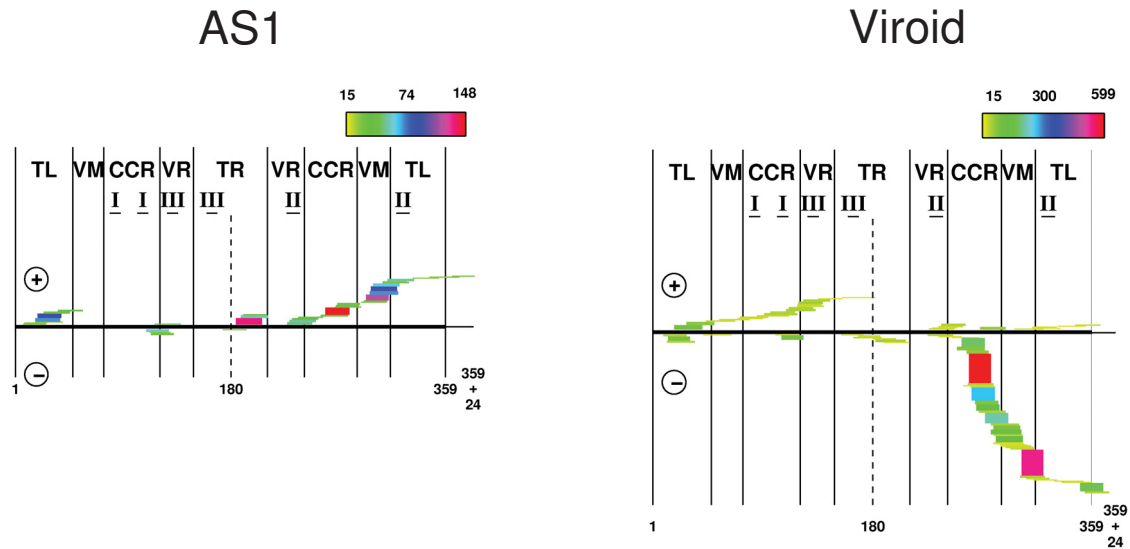


Abbildung 3.13: Lage kleiner RNAs mit PSTVd-Sequenz im PSTVd-AS1-Genom. Die x-Achse stellt das PSTVd-Genom dar; die Sequenzverdopplung am 3'-Ende über 24 Nukleotide berücksichtigt die Zirkularität des Genoms. Die als BLAST-Treffer ermittelten kleinen PSTVd-Sequenzen sind als waagerechte Striche eingezeichnet; die Dicke und die Farbe der Striche ist proportional zur Häufigkeit des Vorkommens der Sequenz im jeweiligen Solexa-Datensatz. Die Farbskala von gelb (minimal) bis rot (maximal) ist rechts oberhalb der Graphen angegeben. Sequenzen, die weniger als 15fach auftraten, wurden nicht berücksichtigt; die häufigste Sequenz trat 148mal (AS1) bzw. 599mal (Viroid) auf. Sequenzen oberhalb der x-Achse besitzen (+)-Strang-Sequenz, die unterhalb der Achse (–)-Strang-Sequenz. Die PSTVd-Domänen (Keese & Symons, 1985) und die Bereiche der stabilen Hairpins (Steger *et al.*, 1984) sind eingezeichnet.

3.5.7 Übersicht über die vorhandenen Sequenzen

Vergleicht man die Tabellen 3.5 und 3.6, so ist zu sehen, dass in der Mock-Pflanze keine AS1-Sequenzen auftreten. In beiden Tabellen sind hohe Trefferzahlen bei Sequenzen, die einer 25S rRNA- bzw. 4.5 rRNA Sequenz aus unterschiedlichen Pflanzen entsprechen, sowie einem Hexokinase 3-Gen. Diese Mengen an rRNA-Sequenzen unterschiedlichster Art sind allerdings in allen Proben zu beobachten.

Es sind fünf verschiedene Gruppen von Sequenzen vorhanden, die als miRNA annotiert werden konnten. Drei davon sind auch als eine miRNA aus *Solanum lycopersicum* beschrieben; miR159, miR162 und miR319. Des weiteren konnten noch die Varianten miR396 und miR398b beobachtet werden, wobei letztere miRNA ausschließlich in der nichtinfizierten Pflanze vorkommt, aber bisher nur für *Oryza sativa* annotiert ist. Alle anderen miRNAs sind auch in den Proben der infizierten Pflanzen zu finden.

Die Solexa-Sequenzen stimmen mit 19 Nukleotiden mit der miR159 von *Solanum lycopersicum* und mit 20 Nukleotiden mit der von *Arabidopsis thaliana* überein. miR162 hat eine Übereinstimmung mit 19 Nukleotiden bei *Solanum lycopersicum* und 21 Nukleotiden bei *Arabidopsis thaliana*. miR319 ist auf 21 (*Arabidopsis thaliana*) bzw. 19 Nukleotide (*Solanum*

Tabelle 3.5: Sequenzen, die in Mock, aber nicht in AS1 auftreten. In dieser Tabelle sind die zum Teil zusammengefassten Top100-Treffer nach ihrer Häufigkeit aufgelistet, die in der Mock-Probe auftraten, nicht aber in AS1. Nicht identische Sequenzteile wurden durch Ns ersetzt, um ähnliche Sequenzen zusammenzufassen. Zusätzlich sind mögliche Funktionen / Herkunftsorte der jeweiligen RNAs für mögliche Rückschlüsse auf deren Funktion angegeben (vergleiche auch 3.5.6).

Trefferzahl	Sequenz	Annotation
7171	NNNNNN-TTGTGCTCCGATTTCG-NNNNN	<i>Solanum tuberosum</i> ; 3'-Ende einer 25S ribosomalen RNA
2104	TTTGGATTGAAGGGAGCTC-NNNN	miR159 (<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> etc.)
2938 +1142	NN-TTACTACTTCATGATCTGG-NNNNNN mit zusätzlichen Nukleotidaustauschen	<i>Solanum lycopersicum</i> Chromosom 2 und Chloroplast - NADH Dehydrogenase ND2 Untereinheit
595	TTAACAGACCGGTAGACTTGGT	<i>Solanum lycopersicum</i> - 4.5S ribosomale RNA
570	CAGACCGGTAGACTTGAACGGC	<i>Nicotiana tabacum</i> - 4.5S ribosomale RNA
324	GCTGCGGAAGGATCATTG	<i>Nicotiana glauca</i> - internal transcribed spacer 1 (ITS1)
321	TATTCATGAGACTGTTTTTGTCC	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, Klon
298	TCTTTTATTTTCTCAACTGTTATG	<i>Nicotiana sylvestris</i> Hexokinase 3 (Hxk3) Gen
294	GAAGTTCCTAATTCATGATCTGGAAC	<i>Solanum tuberosum</i> cultivar Desiree Chloroplast und NADH-plastoquinone Oxidoreductase Untereinheit 2
251	TTCCACAGCTTTCTTGAAC-NNNNNN	miR396 (<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Oryza sativa</i> etc.)
242	ATGGATACTAGGCGCTGTGCGGGC	Chromosom 2 / Chloroplast
421	NN-AACAGACCGGTAGACTTGAAAC-NN	Chromosom 4 bzw.. 8 / Chloroplast
204	CTAGATTCACGCACAAGCTCCATC	<i>Nicotiana attenuata</i> microRNA mir-403-like (?)
186	ATAAGTTTGGATTCTTTTGTATC	<i>Solanum lycopersicum</i> DNA, Chromosome 8
180	TTGGACTGAAGGGAGCTCCCTACAC	miR319 (<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> etc.)

Tabelle 3.6: Sequenzen, die in Mock, aber nicht in Viroid auftreten. In dieser Tabelle sind die zum Teil zusammengefassten Top100-Treffer nach ihrer Häufigkeit aufgelistet, die in der Mock-Probe auftraten, nicht aber in Viroid. Nicht identische Sequenzteile wurden durch Ns ersetzt, um ähnliche Sequenzen zusammenzufassen. Zusätzlich sind mögliche Funktionen / Herkunftsorte der jeweiligen RNAs für mögliche Rückschlüsse auf deren Funktion angegeben (vergleiche auch 3.5.6).

Trefferzahl	Sequenz	Annotation
1815	TTCCACAGCTTTCTTGAACCTGGC	miR396 (<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Oryza sativa</i> etc.)
1165	NNNN-CAGACCGGTAGACTTG-NNNNNN	<i>Nicotiana tabacum</i> - 4.5S ribosomale RNA
800 +1015	AGTTACTAATTCATGATCTGGCA-NNNN mit zusätzlichen Nukleotidaustauschen	<i>Solanum lycopersicum</i> Chromosom 2 und Chloroplast - NADH Dehydrogenase ND2 Untereinheit
787	CTACCTTTGTGCTCCGATTCTGT	<i>Solanum lycopersicum</i> - 25S ribosomale RNA Gen
478	AGTTACTCATTCATGATCTGGAAG	<i>Physcomitrella patens</i> - hypothetisches Protein
446	TATGTTCTCAGGTCGCCCCAAC	miR398b (<i>Oryza sativa</i>)
339	TCGATAAACCTCTGCATCCTAC	miR162 (<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> etc.)
298	TCTTTTATTTTCTCAACTGTTATG	<i>Nicotiana sylvestris</i> Hexokinase 3 (Hxk3) Gen
158	TTTGGATTGAAGGGAGCTCTGGC	miR159 (<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> etc.)

lycopersicum) identisch. miR396 weist bei allen Arten eine 19–21 Nukleotid-Übereinstimmung auf und miR398b ist auf 17 Nukleotide mit der gefundenen miRNA identisch.

Da die Probe „AS1“ im Verhältnis zu den anderen Proben wesentlich weniger Sequenzen lieferte, sind auch weniger Sequenzen bei den Vergleichen (Tabellen 3.7 und 3.8) zu beobachten, wobei auch hier wieder tRNA- und rRNA-Sequenzen auftreten. Neben einigen eindeutig zuzuordnenden Sequenzen aus dem Viroid AS1, die in großer Anzahl vorhanden sind, konnte die miRNA

Tabelle 3.7: Sequenzen, die in AS1, aber nicht in Mock auftreten. In dieser Tabelle sind die zum Teil zusammengefassten Top100-Treffer nach ihrer Häufigkeit aufgelistet, die in der AS1-Probe auftraten, nicht aber in Mock. Nicht identische Sequenzteile wurden durch Ns ersetzt, um ähnliche Sequenzen zusammenzufassen. Zusätzlich sind mögliche Funktionen / Herkunftsorte der jeweiligen RNAs für mögliche Rückschlüsse auf deren Funktion angegeben (vergleiche auch 3.5.6).

Trefferzahl	Sequenz	Annotation
4658	AGTTACTAATTCATGATCTGGCGTC	<i>Solanum lycopersicum</i> - Chromosom 2 und Chloroplast - NADH Dehydrogenase ND2 Untereinheit
261	TATGTTCTCAGGTCGCCCCACC	möglicher internal transcribed spacer (ITS)
210	GCGCCTGTAGCTCAGTGGTTT	<i>Solanum lycopersicum</i> ; aus mit Pathogen behandelten Blättern (LEFL1031BE08) und tRNA-Arg; <i>Arabidopsis thaliana</i>
205	TATAGGAATTCCTGAGCCCTCC	<i>Solanum lycopersicum</i> Chloroplast; mögl. Häm-Bindeprotein
194	GTGAAGTCCTCGTGTGCATCCCT	<i>Solanum polyadenium</i> - 5S ribosomale RNA
171	TCCCAGTCCCGAACCCGTCGGCT	<i>Solanum lycopersicum</i> - 25S ribosomale RNA
149	CCCTTACTCTTATTTCTCCAC	mögl. Transposon bei <i>Arabidopsis thaliana</i>
129	GACCGCATAGCGCAGTGGTAT	<i>Solanum lycopersicum</i> - Chromosome 12
404	CTCTATCTTACTAGCTCCG-NNNNN	AS1 301–319
195	ACTAAACTCGTGGTTCCTGTGTAC	AS1 5–25; 364–383
148	CTACCCGGTGGAAACAAGTCC	AS1 259–278
134	CCTTCCTTCTTCGGGTGTCCTC	AS1 184–205
123	ATCTTACTAGCTCCGGGGCGAAGAC	AS1 305–325
119	CGCTTTTCTCTATCTTACGC	AS1 293–311

Tabelle 3.8: Sequenzen, die in AS1, aber nicht in Viroid auftreten. In dieser Tabelle sind die zum Teil zusammengefassten Top100-Treffer nach ihrer Häufigkeit aufgelistet, die in der AS1-Probe auftraten, nicht aber in Viroid. Nicht identische Sequenzteile wurden durch Ns ersetzt, um ähnliche Sequenzen zusammenzufassen. Zusätzlich sind mögliche Funktionen / Herkunftsorte der jeweiligen RNAs für mögliche Rückschlüsse auf deren Funktion angegeben (vergleiche auch 3.5.6).

Trefferzahl	Sequenz	Annotation
420	TCGATAAACCTCTGCATCCTAT	miR162 (<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> etc.)
209	CTCTATCTTACTAGCTCCGGTGAT	AS1 301–320
195	ACTAAACTCGTGGTTCCTGTGTAC	AS1 5–25; 364–383
123	ATCTTACTAGCTCCGGGGCGAAGAC	AS1 305–325

miR162 zugeordnet werden, die immerhin eine Sequenzidentität von 19 Nukleotiden bei *Solanum lycopersicum* aufweist. Diese miRNA ist in allen drei Proben zu beobachten.

Bei genauer Betrachtung der Tabellen 3.9 und 3.10 der „Viroid“-Probe sieht man zuerst, dass wesentlich mehr AS1-Sequenzen vorhanden sind. Das liegt daran, dass bei der „Viroid“-Probe eine größere Zahl von Sequenzen gelesen wurden. Somit war auch nach Abzug der „Top100“ aus „AS1“ eine ganze Reihe an PSTVd-AS1-Sequenzen vorhanden. Da die „Viroid“-Probe eine erhöhte Menge an (–)-Sequenzen aufwies, ist es ebenfalls verständlich, dass nach Abzug der Sequenzen der „AS1“-Probe die meisten AS1-Sequenzen eine (–)-Orientierung besitzen. Neben einer Vielzahl an Treffern auf unterschiedliche rRNA- und tRNA-Sequenzen wurden auch eine Reihe an miRNAs gefunden, die bei Pflanzen bereits annotiert sind. Neben miR396, die bis jetzt nicht bei *Solanum lycopersicum* gezeigt werden konnte, waren miRNAs vorhanden, die schon

Tabelle 3.9: Sequenzen, die in Viroid, aber nicht in Mock auftreten. In dieser Tabelle sind die zum Teil zusammengefassten Top100-Treffer nach ihrer Häufigkeit aufgelistet, die in der Viroid-Probe auftraten, nicht aber in Mock. Nicht identische Sequenzteile wurden durch Ns ersetzt, um ähnliche Sequenzen zusammenzufassen. Zusätzlich sind mögliche Funktionen / Herkunftsorte der jeweiligen RNAs für mögliche Rückschlüsse auf deren Funktion angegeben (vergleiche auch 3.5.6).

Trefferzahl	Sequenz	Annotation
11.101	NNNNN-TTGTCGCTCCGATTCGT-N	<i>Solanum tuberosum</i> - 25S ribosomale RNA
4581	GGGGATGTAGCTCAGATGGAATT	<i>Solanum tuberosum</i> - tRNA-Ala-Gen
2109	GGCGGATGTAGCCAAGTGGGGC	<i>Solanum nigrum</i> - trnH, tRNA-His
1693	GCGCCTGTAGCTCAGTGGTCC	<i>Solanum lycopersicum</i> cDNA, Klon
1218	CGGTGGACTGCTCGAGCTG-NNNN	<i>Nicotiana tabacum</i> - 26S ribosomale RNA
780	GGGGGTGTAGCTCATATGGTATG	<i>Solanum tuberosum</i> - tRNA-Ala-Gen
780	GGGGATGTAGCTCAGAAAATATG	<i>Solanum lycopersicum</i> Chromosom 4
601	GGGGATGTAGCTCAAATGGTCCC	<i>Solanum tuberosum</i> - tRNA-Ala-Gen
677	GCTTGAAATTGTCTGGGAGGATC	<i>Solanum lycopersicum</i> - 25S ribosomale RNA
553	GGGGATGTAGCTCAGCCAG	<i>Solanum tuberosum</i> - tRNA-Ala-Gen
515	CCCTTGTGCTCGCTCCGATTCGTTC	miR396 (<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Oryza sativa</i> etc.)
218	TCGATAAACCTCTGCATCCGAC	miR162 (<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> etc.)
115	TTGACAGAAGATAGAGAGCACTTC	miR156 (<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> etc.) miR157 (<i>Arabidopsis thaliana</i> etc.)
1371	NNN-GAAAAAGCGTTCTCGG-NNNNNNN	AS1 301–280
928	NN-AGTTGTTTCCACCGGT-NNN	AS1 277–258
892	NNN-TTCCACCGGT AGTAGCCG-NNN	AS1 274–252
534	CCGGAGCTAGTAAGATAGAGTT	AS1 320–301
473	CACGAGTTTAGTCCGAGGGG	AS1 375–357
394	NNNN-TTCAGTTGTTTCCACCG-NNNNNN	AS1 284–260
374	CAACTGCGGTTCCAAGGGC-NNNN	AS1 353–334
373	NNNNNNN-TAGTAGCCGAAGCG-NNNNNNNNNNNN	AS1 266–242
328	NN-TAGTTCCGAGGAACCAACT-NNNNNN	AS1 369–346
290	TTTCGGCGGGAATTACTCCTGTTAC	AS1 171–150
286	AAACCTGGAGCGAACTGGCTAG	AS1 99–117
212	TTCTCGGGAGCTTCAGTTGTTGC	AS1 291–271
124	GAGAAAAGCGGTTCTCGGGAGCT	AS1 299–280
154	GAAGGACACCCGAAGAAAGGCC	AS1 207–188
111	TGACTAGAAAAAGAAAAAGATGG	AS1 43–62
110	TGAAAACCTGTTTCGGCGGGGCC	AS1 182–162
110	AGTTCGAGGAACCAACTGCCAAG	AS1 366–347
100	TTGACACCTGACCTCTGACTAG	AS1 31–49

in den Proben vorher nachgewiesen wurden und allesamt bei *Solanum lycopersicum* gezeigt wurden. Hierbei handelt es sich um die Familien miR162, miR159 und miR319. Des weiteren wurde noch eine Gruppe von zwei miRNA-Familien gefunden, die nur in der „Viroid“-Probe nachweisbar war. Hierbei handelt es sich um die Familien miR156 und miR157, die aufgrund der vermuteten gleichen Funktion meistens zusammen genannt werden. Hierbei gibt es bei *Arabidopsis thaliana* miRNAs in beiden Familien, bei *Solanum lycopersicum* werden sie der miR156-Familien zugeordnet.

Zusätzlich tritt in sämtlichen Proben eine große Anzahl Sequenzen auf, die bei *Solanum lycopersicum* sowohl als Teil des Chromosoms, in der Regel des zweiten, als auch des Chloroplasten, als Teil einer NADH-Dehydrogenase-ND2-Untereinheit, zugeordnet sind. Bei diesen Annotationen ist zu bezweifeln, ob die Sequenzen wirklich in beiden Bereichen zu finden sind, oder bei der Genom-Aufreinigung / Sequenzierung ein Fehler unterlaufen ist.

Tabelle 3.10: Sequenzen, die in Viroid, aber nicht in AS1 auftreten. In dieser Tabelle sind die zum Teil zusammengefassten Top100-Treffer nach ihrer Häufigkeit aufgelistet, die in der Viroid-Probe auftraten, nicht aber in AS1. Nicht identische Sequenzteile wurden durch Ns ersetzt, um ähnliche Sequenzen zusammenzufassen. Zusätzlich sind mögliche Funktionen / Herkunftsorte der jeweiligen RNAs für mögliche Rückschlüsse auf deren Funktion angegeben (vergleiche auch 3.5.6).

Trefferzahl	Sequenz	Annotation
7150	NNNN-CTTTGTCGCTCCGATTCGT	Tomate - 25S ribosomales RNA Gen
6932	NNNN-TTGTCGCTCCGATTCGT-N	<i>Solanum tuberosum</i> ; 3'-Ende der 25S ribosomalen RNA
4581	GGGGATGTAGCTCAGATGGAATT	<i>Solanum tuberosum</i> - Chromosome 4
4870	TTTGGAATTGAAGGGAGCTC-NNNNNNNN	miR159 (<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> etc.) <i>Solanum lycopersicum</i> Chromosomen 5 + 7
2109	GGCGGATGTAGCCAAGTGGGGC	<i>Solanum nigrum</i> tRNA-His (trnH) Komplement
1788	AGTTACTAATTCATGATCTGGTGC	<i>Solanum lycopersicum</i> - Chloroplast ndhB NADH Dehydrogenase ND2 Untereinheit
1693	GCGCCTGTAGCTCAGTGGTCC	<i>Solanum lycopersicum</i> ; aus mit Pathogen behandelten Blättern (LEFL1031BE08) und tRNA-Arg; <i>A. thaliana</i>
490	TTCCACAGCTTTCTTGAACCTACC	miR396 (<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Oryza sativa</i> etc.)
241	TTGACAGAAGATAGAGAGC-NNNNN	miR157 (<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>)
218	TCGATAAACCTCTGCATCCGAC	miR162 (<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>)
163	TTGGAATGAAGGGAGCTCCCTTT	miR319 (<i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>)
1240	NNN-GAAAAAGCGGTTCTCGG -NNNNNNN	AS1 301–281
1193	NNN-AGTTGTTTCCACCGGT-NNN	AS1 280–258
892	NNN-TTCCACCGGGTAGTAGCCG-NNN	AS1 274–252
438	NNN-AGTTCCGAGGAACCAACT-NNNNNN	AS1 369–346
473	CACGAGTTAGTTCCGAGGGG	AS1 375–357
374	CAACTGCGGTTCCAAGGGC-NNNN	AS1 353–331
373	NNNNNNN-TAGTAGCCGAAGCG-NNNNNNNNNNNN	AS1 266–242
290	TTTCGGCGGGAATTACTCCTGTAC	AS1 171–150
286	AAACCTGGAGCGAACTGGCTAG	AS1 99–117
212	TTCTCGGGAGCTTCAGTTGTTGC	AS1 291–271
154	GAAGGACACCCGAAGAAAGGCC	AS1 207–188
131	GAGAAAAAGCGTTCTCGGGAGCTAT	AS1 303–280
129	GAGCTTCAGTTGTTTCCACCGCC	AS1 284–264
124	GAGAAAAGCGTTCTCGGGAGCT	AS1 299–280
111	TGACTAGAAAAGAAAAAGATGG	AS1 43–62
110	TGAAAACCTGTTTCGCGGGGCC	AS1 182–162
100	TTGCACTGACCTCCTGACTAG	AS1 31–49

3.6. Rückschlüsse auf das *Solanum lycopersicum*-Genom

Basierend auf den *in-silico*-Vorarbeiten (siehe 1.4.1) wurden die PSTVd-Variante AS1 in 359 23-Nt-RNAs gespalten und im *Arabidopsis*-Genom gesucht. Hierbei ergaben sich 80 Treffer. Mit diesen Treffern wiederum erfolgte eine Rücksuche auf das Genom von *Solanum lycopersicum*. Eine dieser Sequenzen und die dazu gefundenen Treffer sind als Beispiel im unteren Teil der Abbildung 3.14 zu sehen. Hier wurde ein Treffer (PSTVd-AS1; 62–40) auf *Arabidopsis* gefunden, wobei diese PSTVd-miRNA mit nur 15 aufeinander folgenden Nukleotiden mit *Arabidopsis* übereinstimmt, insgesamt aber nur die erlaubte Maximalzahl an „Fehlern“ auftritt. Vergleicht man diese wiederum bei der Rücksuche mit dem bisher bekannten *Solanum*-Genom, ergibt dies einen hochsignifikanten Treffer mit *Solanum lycopersicum*. Allerdings ist in dem entsprechenden Bereich der PSTVd-Sequenz eine noch geringere Sequenzgleichheit mit der mRNA aus *Solanum lycopersicum* vorhanden, als mit *Arabidopsis*. Diesen Treffer könnte man im Allgemeinen auch durch den ausgeprägten Pyrimidin-Stretch erklären. Dies ist eine Basenfolge, die es häufiger

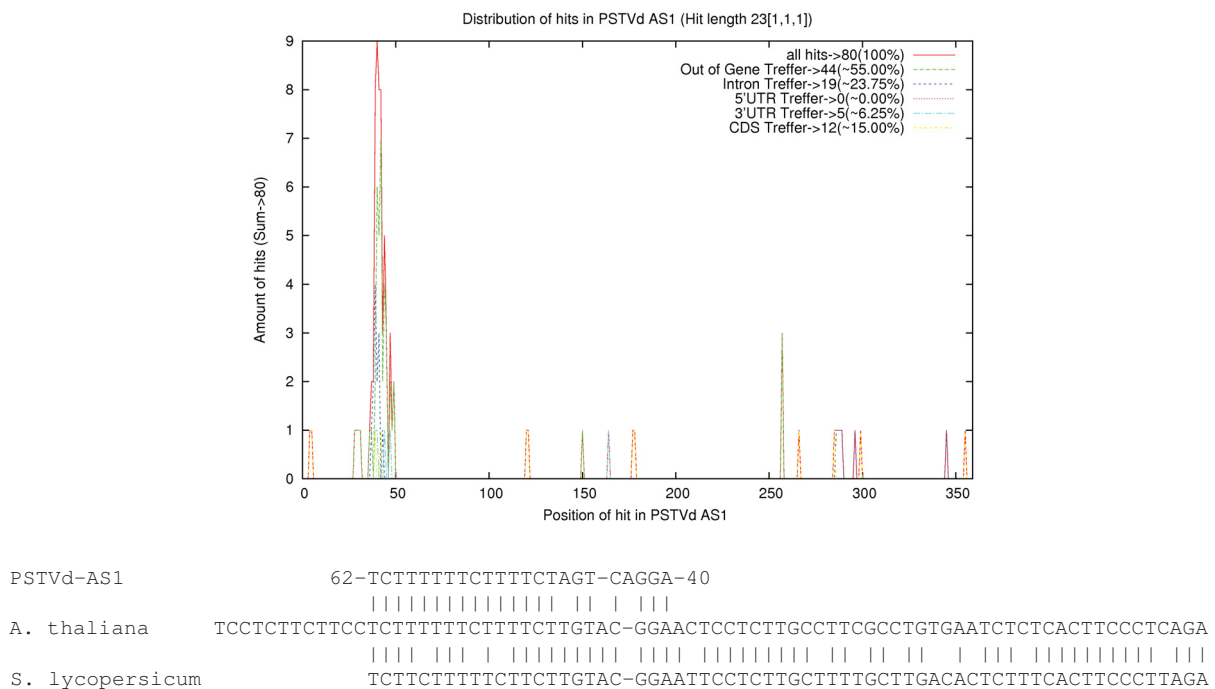


Abbildung 3.14: Komplementaritäten von AS1-miRNA zum *Arabidopsis*-Genom und Rückschluss auf *Solanum lycopersicum*. Die obere Abbildung zeigt Treffer von Fragmenten aus AS1 zum *Arabidopsis*-Genom. Hierbei wurde eine Fehlpaarung, Insertion und/oder Deletion, zugelassen. Es wurden 80 Treffer gefunden (vergleiche 1.4.1). Unter der Abbildung ist einer dieser Treffer gezeigt (PSTVd-AS1; 62–40), sowie die dazu gefundene Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* (AT1678815; 29637018–29637093). Bei der Rücksuche mit der *Arabidopsis*-Sequenz auf das *Solanum*-Genom wurde die unterste Sequenz gefunden (*Solanum lycopersicum* mRNA; BT012903.1; 594–512).

gibt, wodurch man automatisch eher Treffer erhält. Zusätzlich zeigt der Unterschied zwischen der Sequenz von *Arabidopsis thaliana* und *Solanum lycopersicum*, dass es, nur weil man im *Arabidopsis*-Genom nichts Passendes findet, nicht trotzdem Treffer in *Solanum* geben kann. Da aber erst ca. ein Viertel des Tomaten-Genoms sequenziert wurde und es sich dabei auch nicht um die hier verwendete Varietät Rutgers handelt, ist es schwer eine konkrete Aussage zu treffen. Da sich die Symptome, die das Viroid in der Tomate auslöst, schon innerhalb der einzelnen Tomaten-Varietäten stark unterscheiden, wäre es durchaus möglich, dass sich auch ihre Genome in den für das „silencing“ interessanten Bereichen unterscheiden. Während Rutgers sehr anfällig ist, zeigen andere Sorten keine visuell auffälligen Symptome, obwohl das Viroid ebenfalls repliziert und durch die Pflanze transportiert wird.

4. DISKUSSION

Zuerst sollte mit Northernblot-Analysen gezeigt werden, aus welchen Domänen des PSTVd die „silencing“-RNAs mit Viroid-Sequenz stammen. Nachdem die Methode optimiert wurde, stellte sich heraus, dass das Eingrenzen auf diese Weise nicht möglich ist. Um eine detailliertere Auskunft über die Sequenzverteilung zu bekommen, wurde eine High-Throughput-Sequenzierung als geeignete Methode gewählt. Dafür mussten zuerst Aufreinigungsmethoden gefunden werden, um aus der Gesamt-RNA die kurzen RNAs zu isolieren und diese wiederum nach Viroid- und Nicht-Viroid-Sequenzen aufzureinigen. Mit diesen RNAs konnte anschließend, nach Umschreibung in cDNA, eine High-Throughput-Sequenzierung durchgeführt werden. Die hierdurch erhaltenen Daten wurden bioinformatisch ausgewertet, um zum Schluss eine konkrete Aussage über die erhaltenen Sequenzen und mögliche Funktionen machen zu können.

4.1. Northernblot-Analyse

Mit Hilfe der Northernblot-Analysen sollten die Bereiche des PSTVd gezeigt werden, aus denen die „silencing“-RNAs mit Viroid-Sequenz stammen. Dazu wurden Pflanzen mit unterschiedlichen Viroid-Varianten infiziert. Neben den für den Northernblot benutzten Stämmen QFA und AS1 wurden zusätzliche Mock-treated Pflanzen hergestellt, die als Negativ-Kontrolle dienten. Zu vier Zeitpunkten nach der Infektion wurden jeweils Teile der Pflanzen geerntet. Dies geschah 23, 30, 37 und 44 Tage nach Infektion, um mögliche Unterschiede in der Viroid-Menge in Abhängigkeit zur Zeit zu sehen. Um dies besser vergleichen zu können, wurden große Ansätze der jeweiligen Gesamt-RNA hergestellt, damit jeder vergleichbare Slot mit derselben Lösung beladen werden konnte. Ein Problem, was nicht geändert werden konnte, waren die Expositionszeiten. Je nach Art und Markierungsgrad der Sonde werden die Signale früher oder später sichtbar. Wie in Abbildung 3.6 zu sehen ist, differieren die Expositionszeiten zwischen 1 und 5 Tagen mit vergleichbar starken Signalen beim Ergebnis. Da Abbildung 3.6 nur Ausschnitte des interessanten „silencing“-Bereiches zwischen ca. 20–26 Nukleotiden zeigt, sind die Signale der AS1-Volllänge hier nicht zu erkennen. Diese waren immer komplementär zur Orientierung der Sonde. Alle Blots wurden mehrfach durchgeführt und dabei sicher gestellt, dass die Gesamt-RNA aus einer Stammlösung entnommen wurde. Außerdem wurden immer die gleichen Mengen an RNA aufgetragen, damit die erhaltenen Banden vergleichbar wurden. Bei allen Blots, unabhängig von der Expositionszeit, zeigten die Mockpflanzen zu keinem Zeitpunkt ein Signal. Die Proben aus den QFA-, sowie AS1-infizierten Pflanzen zeigten alle, wenn auch unterschiedlich starke, Signale. Vergleicht man die Signale einer einzelnen Probe über die unterschiedlichen Northernblots, so sieht man immer eine vergleichbare Signalintensität im Verhältnis zu den anderen Proben. Ebenfalls ist beim direkten Vergleich aller Northernblots zu erkennen, dass die von den infizierten Pflanzen auftretenden Signale immer die gleichen Intensitätsunterschiede aufweisen. Somit kann ausgeschlossen werden, dass ein Fehler beim Auftragen oder Ansetzen der aufzutragenden Probe zu den unterschiedlichen Signalstärken führt. Außerdem scheinen die unterschiedlichen

Sonden ebenfalls keine Signalunterschiede in den verschiedenen Pflanzen-Stadien hervorzurufen. Die als Positiv- bzw. Negativ-Kontrolle dienenden kurzen, synthetischen RNAs zeigen wie erwartet ein Signal bei den jeweiligen komplementären Sonden. Nur die Sonde im Bereich unten.links_(+) verursacht ebenfalls ein Signal im eigenen Sequenz-Bereich, was bei der hohen Selbstkomplementarität des Viroids kein unerwartetes Ergebnis ist. In erster Linie entsteht dieses Signal nur auf Grund der Sequenz dort, da sie durch spezifischeres Waschen nicht entfernt werden konnte.

Die Proben der QFA-infizierten Pflanzen zeigen nach 23 Tagen ein schwaches Signal, das bei 30 und 37 Tagen intensiver wird, nach 44 Tagen aber wieder abnimmt. Bei der AS1-Probe dagegen ist das Signal 23 Tage nach der Infektion ähnlich schwach wie bei der QFA-Probe, wird aber nach 30 und 37 Tagen immer schwächer, um nach 44 Tagen wieder dem Signal vom Anfang zu entsprechen. Da die Signale mit zunehmender Zeit schwächer wurden, wurden die Proben ein weiteres Mal im Spektralphotometer auf ihre Konzentration hin überprüft, mit unveränderten Ergebnissen. Auch die dabei aufgenommenen Kurven zeigten keine Besonderheiten. Somit kann ausgeschlossen werden, dass eine falsche Konzentrationsbestimmung diese Signalunterschiede hervorruft. Allerdings kann es möglich sein, dass die Konzentration durch sekundäre Pflanzenstoffe oder ähnliches nicht exakt bestimmt werden konnte.

Wie von Hamilton *et al.* (2002) beschrieben, können zwei Gruppen von kurzen RNAs nachgewiesen werden. Zum einen gibt es RNAs mit 24–26 Nukleotiden, die entbehrlich für den sequenzspezifischen mRNA-Abbau sind, aber in Beziehung mit dem systemischen „silencing“ und der Methylierung von homologer DNA stehen. Zum anderen gibt es eine Gruppe von 21–22 Nukleotid langen RNAs, die in Beziehung mit dem mRNA-Abbau, aber nicht der systemischen Übermittlung von Signalen oder der Methylierung stehen. Wie in der Abb. 3.6 zu sehen ist, liegen alle Signale auf der Höhe von 21 Nukleotiden, was für die Möglichkeit spricht, dass diese RNAs am „silencing“ beteiligt sind und in der infizierten Pflanze zu mRNA-Abbau führen können. Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, musste die Sequenzierung abgewartet werden, mit der man sowohl die exakte Länge, als auch die Sequenz dieser kurzen RNAs erfahren konnte. Wenn man von der unterschiedlichen Signalintensität innerhalb einer Viroidvariante absieht, kommt man zu der Feststellung, dass die viroidspezifischen, kleinen RNAs sowohl in (+)- als auch in (–)-Orientierung, in nicht signifikant unterschiedlichen Mengen, in der Pflanze vorkommen. Außerdem ist eindeutig zu sehen, dass die kurzen RNAs mit PSTVd-Sequenz aus allen Bereichen des Viroids stammen.

4.2. Vorarbeiten zur Sequenzierung

Wie unter 3.3 gesehen, wurden viele unterschiedliche Methoden ausgetestet um die klassische, aber sehr zeitaufwendige und verlustreiche Gelelektrophorese zu umgehen. Wie beschrieben, waren diese Versuche erfolglos, da es ein von Anfang an bestehendes Problem war, dass Teile der kurzen RNAs zusammen mit den großen RNAs schon bei niedrig-prozentigen PEG-Fällungen ausfielen. Dies konnte auch nicht durch denaturierendere Bedingungen verhindert werden. Obwohl nur ein kleiner Teil der kurzen RNAs koprizipitierte, sollte eine zuverlässigere Methode gefunden werden. Es wurde vermutet, dass gerade diese kurzen RNAs von Belang sind, gerade weil sie so fest an die langen RNAs gebunden sind. Es wäre z. B. möglich, dass die kurzen RNAs, die in

der Pflanze das „silencing“ durchführen, an mRNAs gebunden sind und somit mit den langen RNAs ausfallen. Um solche Eventualitäten auszuschließen, sollte eine Methode mit Bedingungen gefunden werden, bei der alle langen RNAs ohne Verlust der kurzen RNAs gefällt werden konnten. Zum Schluss wurde doch die Gelelution als beste Methode bewertet, da bei allen anderen, zum Teil von Firmen angepriesenen, Methoden kurze RNAs verloren gingen. Nicht zuletzt erleichterte die Salzfalle (Abb. 2.4) diese Entscheidung, da damit eine sehr zuverlässige Art der Gelelution zur Verfügung stand. Durch die Möglichkeit, die RNA durch Anlegen einer Spannung in einem Hochsalzpuffer aufzukonzentrieren und anschließend zu fällen, wurden sämtliche Probleme der klassischen Varianten aus dem Weg geräumt. Es gab keine Membranen mehr, an denen die RNA bei der Elution haften bleiben konnte und durch die angelegte Spannung konnte man eine höhere Rückgewinnungsrate erzielen, als beim Schütteln der Gelstücke in einem Elutionspuffer.

4.2.1 Effizienz der Dynabead-Aufreinigung

Wie in 3.3.3 beschrieben sollte eine Dynabead-Aufreinigung die PSTVd-spezifischen kurzen RNAs konzentrieren. Im Idealfall sollten die verwendeten PSTVd-Volllängen-Sonden keine weiteren RNAs binden. In den dafür ausgeführten Vorversuchen mit synthetischen RNAs (siehe Abb. 3.9) schienen gute Versuchsbedingungen gefunden zu sein, um sogar spezifisch auf (+)- und (–)-Sequenzen unterscheiden zu können.

Nach dem Erhalt der Solexa-Sequenzierung konnte allerdings eindeutig gezeigt werden, dass diese Methode nicht funktioniert hatte. Auch wenn die Sequenzierung mit der aufgereinigten Probe („Viroid“) eine größere Anzahl an Sequenzen geliefert hat, war das Verhältnis von PSTVd-spezifischen zu unspezifischen Sequenzen nahezu identisch wie in der nicht-aufgereinigten „AS1“-Probe. Somit kann an diesem Punkt gesagt werden, dass in diesem Fall an der Effizienz und Spezifität der Methode gezweifelt werden darf.

Zudem gab es noch ein Phänomen, was nicht erklärt werden kann. Die Gesamt-Probe der infizierten Pflanze („AS1“) zeigt eine erhebliche größere Menge an kurzen RNAs mit (+)-, als mit (–)-Sequenzen. Dies war auch zu erwarten, da in der Pflanze eine erheblich größere Menge an (+)-PSTVd enthalten ist. Bei der aufgereinigten Probe („Viroid“) hingegen wurde eine wesentlich größere Anzahl (–)-Sequenzen gefunden. Womöglich liegt es daran, dass der erste Durchgang der Dynabead-Aufreinigung mit einer (+)-Sonde durchgeführt wurde, die im Überschuss vorhanden war. Es wäre möglich, dass dadurch ein großer Teil der (–)-Sequenzen im ersten Durchgang aus der Lösung gefischt wurden. Die in der Lösung verbliebenen Sequenzen wurden wieder gefällt und ein weiterer Durchgang mit einer neuen Sonde gestartet. Auch an diesem Punkt könnten Probleme auftreten. Durch wiederholte Fällungen der gesamten kurzen RNAs kann es jederzeit zu Verlusten kommen. Außerdem wäre es auch denkbar, dass Substanzen, die bei der Dynabead-Aufreinigung benutzt wurden (Harnstoff, Formamid, Dynabead-Puffer etc.), einen unerwünschten Effekt auf die Fällung der RNA haben können, der in den Vorversuchen, auf Grund von fehlenden Wiederholungen, nicht ausgeschlossen werden konnte. Durch diese Erfahrungen ist der Schluss naheliegend, dass man mehr Information vom Vergleich unterschiedlich infizierter, nicht aufgereinigter Pflanzenproben erhalten hätte, als durch den Ansatz, bestimmte RNAs aufzukonzentrieren.

4.3. Solexa-Sequenzierung

Wie unter 1.4 beschrieben gab es zu Beginn ein Vielzahl neuer Sequenzierungsmethoden, die zur Auswahl standen. Nach eingehender Betrachtung kristallisierte sich die Solexa-Sequenzierung als geeignet heraus. Die 454-Sequenzierung schied aus mehreren Gründen aus. Abgesehen von dem hohen Preis wäre diese Methode eher eine Verschwendung gewesen, da sie Leseweiten bis zu 250 Basenpaaren hat, wir aber maximal 31 Nukleotide benötigten. Dazu kam noch, dass durch die emPCR keine Quantifizierung möglich wäre, sowie die Homopolymer-Problematik, welche eine Detektion von mehr als 5 oder 6 aufeinanderfolgenden gleichen Nukleotide nicht eindeutig erlaubt. Alle Punkte zusammengefasst sprachen gegen diese Methode. Gegen ABI SOLiD™ sprach neben dem Preis, dass diese Methode erst im letzten halben Jahr eingeführt wurde. Somit bekamen die Firmen diese Geräte erst kürzlich geliefert und konnten noch keine Erfahrungswerte präsentieren. Daher war nicht sicherzustellen, dass die Methode überhaupt mit den vorhandenen Proben funktioniert. Bei der Solexa-Technologie dagegen waren die meisten positiven Punkte zu verzeichnen. Neben einem sehr guten Preis war es möglich über die Firma vertis cDNA mit unterschiedlichen Barcodes anfertigen zu lassen. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, bis zu vier Proben parallel in einem Ansatz sequenzieren zu lassen und somit die Sequenzierung von bis zu 5 Millionen reads voll ausschöpfen zu können. Dazu kam noch, dass die Leselänge von bis zu 35 Nukleotiden ausreichend für unsere Bedürfnisse war. Da diese Methode generell für „silencing“-RNAs angeboten wurde, gab es auch ausreichend Erfahrungen mit diesen, so dass man davon ausgehen konnte, dass mit Sicherheit Ergebnisse erzielt werden konnten.

4.4. Erhaltene Solexa-Sequenzen und ihre mögliche Funktion

Bei der Vorbereitung zur Solexa-Sequenzierung wurden die miRNA-Proben in cDNA umgeschrieben (vergleiche 3.4.1). Im Anschluss daran wurden die fertigen Proben auf einem Gel (3.10) aufgetrennt. Wie hier zu sehen ist, waren alle Proben in gleicher Konzentration vorhanden. Auch die Firma vertis, die diese Proben anfertigte, konnte bestätigen, dass die gleiche Konzentration aller Proben in die Reaktion eingesetzt wurde und die Endkonzentration ebenfalls nahezu identisch war. Trotz alledem hat die Sequenzierung der „AS1“-Probe im Vergleich zu den beiden anderen Proben weniger als ein Viertel an Sequenzen geliefert. Somit kann ausgeschlossen werden, dass der Fehler weder bei der Konzentration der Ausgangsprobe noch bei der cDNA-Reaktion liegt. Eine Möglichkeit wäre, dass die Sequenz des ligierten Barcodes ein Problem bei der Sequenzierung darstellt. Diese Möglichkeit wurde von der Firma vertis eingeräumt, da die Sequenzierung mit der Solexa-Methode neu ist und die Sequenz des Barcodes als Fehlerquelle nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Allerdings treten in den Sequenzen, die nicht einem der drei Barcodes zugeordnet werden konnten, Fehlervarianten des problematischen Barcode-Oligonukleotids nicht gehäuft auf (Daten nicht gezeigt); also liegt der Fehler eher in der Ligation dieses Oligonukleotids. An den zu sequenzierenden Sequenzen sollte es nicht gelegen haben, da in der „Viroid“-Probe prinzipiell identische Sequenzen bzw. Sequenzarten wie in der „AS1“-Probe sein müssen.

Bei solchen Datenbanksuchen besteht das Problem, dass das Tomatengenom kaum sequenziert und noch weniger annotiert ist. Somit stammen sämtliche Annotationen in der Regel von

Arabidopsis thaliana oder *Oryza sativa*. Da das Viroid aber diese Organismen nicht systemisch infiziert, ist es nicht möglich von der Tomate, bei der einige Varietäten gut sichtbare Symptome zeigen, auf einen gut oder komplett sequenzierten Organismus zu wechseln. Somit können Treffer z. B. auf das *Arabidopsis*-Genom immer nur ein Hinweis auf eine mögliche Funktion sein, da dieser Organismen dem Viroid gegenüber resistenter ist als z. B. die Tomatenvarietät Rutgers.

Nach der Aufbereitung der erhaltenen Solexa-Datenmengen durch bioinformatische Methoden (siehe 3.5) wurden Tabellen erstellt, die eine Übersicht über die vorhandenen Sequenzen geben und allen Sequenzen, die mindestens 100 mal vorkamen (Top100) eine mögliche Funktion oder Struktur zugewiesen. Innerhalb dieser Tabellen wurden jeweils zwei Solexa-Datensätzen unter Berücksichtigung eines 95 %-Identitätskriteriums verglichen, wobei jeweils die Sequenzen aufgelistet wurden, die in dem einen Datensatz auftreten, im anderen Datensatz aber nicht (siehe 3.5.6).

Zu Beginn wurden die Tabellen verglichen, um einen Überblick zu erhalten, ob gewisse Sequenzen z. B. nur in infizierten oder nicht-infizierten-Pflanzen auftreten. Dabei konnte beobachtet werden, dass tRNA- und rRNA-Sequenzen in verschiedenen Varianten in allen Proben vorhanden waren. Aufgrund der vorhandenen Mengen und eingegrenzten Sequenzvarianten kann geschlossen werden, dass diese Sequenzen keine unbeabsichtigten Abbau-Sequenzen darstellen, sondern in der Pflanze möglicherweise bei internen „silencing“-Mechanismen verwendet werden. Es ist auch nicht verwunderlich, dass diese in der aufgereinigten Probe vorhanden sind, da diese Methode nicht funktioniert zu haben scheint (siehe 4.2.1).

Im ganzen wurden sieben miRNA-Familien gefunden, die bis auf eine allesamt in *Arabidopsis* gezeigt wurden: miR156, miR157, miR159, miR162, miR319, miR396 und miR398b (nur in *Oryza sativa*). Die miRNA-Familien miR156, miR159, miR162 und miR319 wurden auch für *Solanum lycopersicum* annotiert, allerdings beruht dies in der Regel auf Sequenzgleichheit zu *Arabidopsis*-miRNAs, weshalb ihnen noch keine Funktionen zugeordnet werden konnten (siehe miRBase; Griffiths-Jones *et al.*, 2008). Im folgenden wurde versucht, oftmals auf Grundlage von Daten aus *Arabidopsis*-Versuchen, den gefundenen RNAs mögliche Funktionen zuzuordnen. Es sollte erwähnt werden, dass die AS1-infizierten Pflanzen zum Zeitpunkt des Erntens schon deutliche Symptome zeigten.

4.4.1 miR156

Die miR156-Familie wurde nur in der infizierten Probe („Viroid“) gefunden. Die RNAs dieser Familie sind auf unterschiedlichen Chromosomen von *Arabidopsis thaliana* kodiert (Reinhart *et al.*, 2002). Sie werden mit der miR157-Familie zusammengefasst, da anscheinend beide Familien mRNAs zum Ziel haben, die für Proteine kodieren, die die Squamosa-Promotor-Bindeprotein (SBP)-Box enthalten (Rhoades *et al.*, 2002).

Mitglieder der *Arabidopsis*-SBP-Box-Genfamilie von Transkriptionsfaktoren werden mit der Förderung des Blütenübergangs in Abhängigkeit von miR156 in Zusammenhang gebracht. Aus diesem Grund hat eine transgene Überexpression dieser miRNA eine Verzögerung beim Blühen zur Folge. Besonders die Überexpression der *Arabidopsis*-SBP-Box *SPL3* führt zu einer früheren Blüte. Interessanterweise ist die Expression von u. a. *SPL3* posttranskriptionell durch miR156

und vermutlich die sehr nah verwandte miR157-Familie kontrolliert (Schwarz *et al.*, 2008). Außerdem ist der Übergang der Pflanze vom juvenilen zum erwachsenen Stadium begleitet von einer Abnahme des miR156-Niveaus und einer Zunahme der Menge an *SPL3*-mRNA (Wu & Poethig, 2006). Des Weiteren zeigten Studien, dass miR156 eher einen mengenmäßigen, als einen räumlichen Einfluss auf die *SPL*-Expression in Blattprimordien hat und *SPL*-Aktivität nicht autonom die Initiation von neuen Blättern am Sprossapikalmeristem hemmt (Wang *et al.*, 2008).

Diese miRNA wurde nur in geringer Menge und in möglicher Kombination mit miR157 bei der infizierten Probe gefunden. Trotzdem wäre es möglich, dass diese miRNA an der Pathogenese des Viroids beteiligt ist. Da miR156 mit den Blattprimordien und somit mit der Blattbildung in Zusammenhang gebracht wird, wäre es möglich, dass die durch miR156 regulierte *SPL*-Expression für die kleinen Blätter bei AS1-infizierten Tomaten verantwortlich ist.

Ob miR156 etwas an der Blütezeit ändert, konnte leider nicht festgestellt werden, da es aus Sicherheitsgründen nicht erlaubt ist, infizierte Pflanzen in S2-Gewächshäusern blühen zu lassen, ohne jede Blüte einzeln in eine Tüte zu packen. Davon abgesehen, bilden AS1-infizierte Pflanzen bei der Tomatenvarietät Rutgers, auf Grund der Aggressivität des Viroid-Stammes, keine Blüten aus.

4.4.2 miR157

Die miR157-Familie wurde ebenfalls nur in der infizierten Probe („Viroid“) gefunden. In *Solanum lycopersicum* wurden die Sequenz-Familie nach MIR157 in Zhang *et al.* (2008) benannt. miR157 wurde in *Arabidopsis thaliana* auf den Chromosomen 1 und 3 gefunden (Reinhart *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass diese Familie, wie miR156, mRNAs zum Ziel hat, die für Proteine kodieren, die die Squamosa-Promotor-Bindeprotein (SBP)-Box enthalten (Rhoades *et al.*, 2002).

Da sie in den meisten Fällen mit der miR156-Familie in Zusammenhang gebracht wird, kann man annehmen, dass auch diese Gruppe im weitesten Sinn mit der Blattentwicklung in Verbindung stehen könnte (siehe 4.4.1).

4.4.3 miR159

Die Familie miR159 wurde in großen Mengen in der infizierten (~ 4800 Kopien), sowie der nicht infizierten (~ 2000 Kopien) Probe nachgewiesen. miR159-RNAs konnten auf Chromosom 1 von *Arabidopsis thaliana* (Park *et al.*, 2002) gefunden werden. Es wird vermutet, dass diese RNAs für MYB-Proteine kodierende mRNAs zum Ziel haben, die dafür bekannt sind, dass sie an den Promotor des Blütenmeristem-Identitätsgens *LEAFY* binden (Rhoades *et al.*, 2002).

In Untersuchungen wurde gezeigt, dass miR159 als Doppelmutante polyphäne morphologische Defekte aufweist, inklusive veränderter Wachstumsgewohnheiten und gerollten Blättern (Allen *et al.*, 2007). Dass die Veränderung bzw. das Einrollen der Blätter mit der microRNA miR159 in Verbindung steht, wurde auch schon 2003 in der Arbeit von Palatnik *et al.* beschrieben. Hierbei wurde gezeigt, dass miR159 bei Überexpression zu eingerollten Blättern führt. Wird der miRNA-Vorläufer aus dem Vektor entfernt, so bleiben die Blätter glatt. Wird eine Base der miRNA ausgetauscht, so rollen sich die Blätter weniger ein, bei einem doppelten Nukleotidaustausch

sind die Blätter wieder so glatt, wie beim Wildtyp (Palatnik *et al.*, 2003). In einer weiteren Arbeit wird gezeigt, dass Abscisinsäure (ABA) die Akkumulation von miR159 induziert und miR159 eine Spaltung von bestimmten MYB-Transkripten in *Arabidopsis thaliana* herbeiführen kann, wobei die MYB-Transkriptionsfaktoren als positive Regulatoren der ABA-Antworten fungieren. Die Überexpression von miR159 unterdrückt wiederum das MYB-Transkriptions-Level, was in der Keimentwicklung zu einem ABA-induzierten Wachstumsstopp führen kann (Reyes & Chua, 2007).

Die beschriebenen Symptome lassen darauf schließen, dass die miR159-Familie in Verbindung mit den ausgeprägten Symptomen einer Viroid-infizierten Pflanze stehen könnte. Ein Phänotyp, der schon bei milden PSTVd-Stämmen auftritt, ist der gestauchte Habitus der Pflanze. Bei milden Stämmen ist die Pflanze zwar sichtbar kleiner, zeigt aber ansonsten keine auffälligen Symptome. Erst bei letalen Stämmen scheint das Wachstum kurze Zeit nach der Infektion still zu stehen. Da aber zweieinhalb mal mehr miR159 in der gesunden, als in der infizierten Pflanze vorkommt, muss diese microRNA auch in der Pflanze selber eine Rolle spielen. Da die Tomatenpflanze von Natur aus keine glatten Blätter zeigt, ist es möglich, dass dieser Phänotyp durch die Viroid-Infektion verstärkt wird. Bei gerollten Blättern wächst die obere Blattseite schneller als die untere, wodurch es zu einem Einrollen der Blätter kommt. Da die Tomatenpflanze bei guten Bedingungen sehr schnell wächst und somit auch ihre Blätter, könnte es sein, dass es einen festgelegten Titer an miRNAs gibt, der für die reguläre Blattkrümmung zuständig ist. Bei der Infektion durch das Viroid wird die wirtseigene Maschinerie übernommen und das Viroid nutzt diese. Möglicherweise wird diese miRNA weiterhin von der Pflanze synthetisiert, da sie für das natürliche Blattwachstum unerlässlich ist, aber durch das geringere Wachstum der Pflanze und die kleineren Blätter ist der Effekt verstärkt und die Blätter rollen sich mehr ein. Der trotz alledem niedrigere Titer an miR159 in der infizierten Pflanze könnte möglicherweise daran liegen, dass entweder die Pflanze schon so erkrankt ist, dass sie ihre eigene Maschinerie nicht mehr voll nutzen kann und dadurch weniger miRNAs vorhanden sind, oder die Synthese dieser miRNA im Zusammenhang mit dem Wachstum steht und somit bei einem verkürzten Habitus auch weniger dieser RNAs produziert werden. Es lässt sich vermuten, dass mit steigender Aggressivität des Viroid-Stamms die Kontrolle der Pflanze über ihre Mechanismen sinkt.

4.4.4 miR162

Die miR162-Familie wurde ebenfalls in allen Proben gezeigt und ist überall in der gleichen Größenordnung vorhanden (200–400 Sequenzen). miR162 wurde in *Arabidopsis thaliana* auf Chromosom 5 gefunden, allerdings ist sein Ziel bis jetzt nicht bekannt. In *Oryza sativa* wird dagegen vermutet, dass miR162 eine mRNA als Ziel hat, die für DICER-LIKE 1-Proteine kodiert (Hirsch *et al.*, 2006; Jones-Rhoades & Bartel, 2004).

Da das Protein DCL1 in Pflanzen, zusammen mit HYL1 und HEN1, für den miRNA-Weg zuständig ist, wäre eine Störung in diesem Bereich in jedem Fall ein Problem. Durch DCL1 werden die microRNAs in die richtige Größe gebracht, damit sie durch Bindung an eine mRNA verschiedenste Prozesse in Pflanzen regulieren. Wird dieses Protein jedoch falsch oder gar nicht kodiert, kann es in sämtlichen Bereichen zu Störungen und Ausfällen kommen. Mit dieser miRNA könnte man einen Phänotyp wie bei AS1 erklären. Dadurch, dass der Organismus nicht mehr in der Lage ist, die regulatorischen RNAs herzustellen, die er benötigt, können

Blätter andere Gestalten annehmen, das Wachstum unterbrochen oder verlangsamt werden und Symptome von Nekrose bis zum Absterben der Pflanzen auftreten.

4.4.5 miR319

RNAs der miR319-Familie wurden sowohl in der Mock-, als auch in der Viroid-Probe mit unter 200 Kopien nachgewiesen. miR319 ist auch bekannt unter der Bezeichnung miR-JAW, da der jaw-D-Phänotyp in der Überexpression von miR319 begründet liegt. Diese Mutanten zeigen bei *Arabidopsis thaliana* gekräuselte Blätter und Früchte, eine verzögerte Blütezeit und grünliche Blütenblätter. Die miR319 wird aus einem ca. 500 Basenpaar langen Primär-Transkript produziert und in zwei Längen, 20 und 21 Nukleotide, exprimiert. Diese miRNAs unterscheiden sich durch ein U am 3'-Ende (Palatnik *et al.*, 2003).

Nach Ori *et al.* (2007) reguliert die miR319 das Gen LA (LANCEOLATE). Bei einer Mutation dieses Gens werden die großen, verbundenen Blätter der Tomate in kleinere, einfache Blätter umgewandelt. Die miR319 reguliert die zeitliche Abstimmung sowie den Ort der LA-Expressierung, wobei eine steigende Aktivität jeder Komponente innerhalb der anderen Expressions-Territorien die Blattmorphologie, das heißt die Größe und Gestalt der Blätter, ändert (Ori *et al.*, 2007).

4.4.6 miR396

Die miR396-Familie konnte in infizierten und nicht infizierten Pflanzen nachgewiesen werden. Bei miR396a wird vermutet, dass sie an eine Ziel-mRNA bindet, die unter anderem für Transkriptionsfaktoren von GRF (growth regulating factor) kodiert (Jones-Rhoades & Bartel, 2004).

Bei Stress-Versuchen mit miRNAs bei *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass miR396 neben zwei anderen auf alle drei Stressarten, Hochsalz, Trockenheit und Kälte, antwortet. Es wird vermutet, dass diese miRNA eine Rolle bei der Stressantwort spielt (Liu *et al.*, 2008).

Da diese miRNA-Familie sowohl bei der infizierten (~ 500-fach), als auch in sehr hoher Zahl (~ 1800-fach) bei der nicht-infizierten Pflanze vorkommt, könnte es möglich sein, dass das Viroid den Abbau dieser RNAs begünstigt oder ihre Prozessierung unterdrückt, damit es keine Stressantwort der Pflanze auf die Viroid-Infektion gibt. Möglicherweise benutzt das Viroid für sein „silencing“ während der Pathogenese in der Pflanze Substrate, die bei gesunden Pflanzen zur Herstellung von Stressantwort-miRNA benutzt werden.

4.4.7 miR398b

Die RNA miR398b ist die einzige miRNA, von der zum einen nur eine Variante der Familie in den Top100 nachgewiesen werden konnte, sowie die einzige, die nur in der infizierten Pflanze zu finden war. Für diese miR398-Familie wird vorhergesagt, dass sie für Kupfer-Superoxid-Dismutase und Cytochrom-C-Oxidase-Untereinheit V kodiert. Superoxid-Dismutase ist ein in allen Lebewesen vorhandenes Enzym, das Superoxid-Anionen in Wasserstoffperoxid umwandelt. Kupfer-Superoxid-Dismutase ist bei Pflanzen im Chloroplasten enthalten. Cytochrom C dagegen ist ein Enzym, das in den Mitochondrien angesiedelt ist.

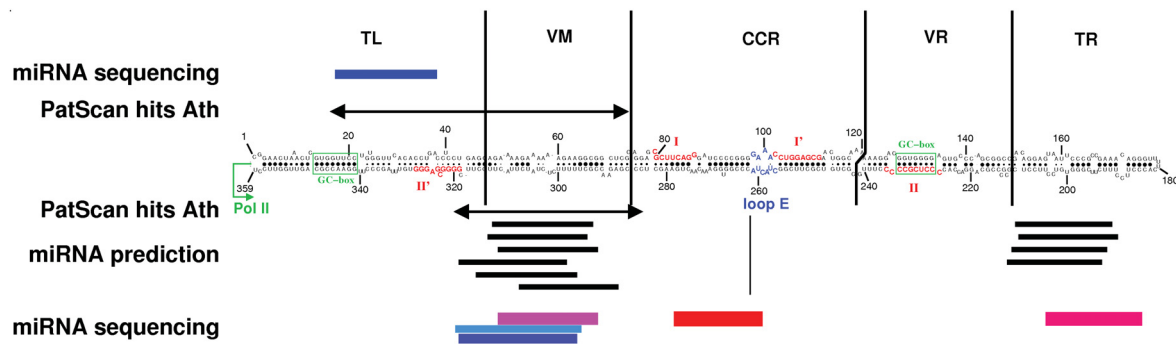


Abbildung 4.1: Zusammenfassung aller ermittelten Ergebnisse zum Thema viroidspezifische „silencing“-RNAs. Diese Abbildung zeigt eine PSTVd-Sekundärstruktur mit ihren fünf Domänen. Die Balken zeigen Bereiche von gefundenen „silencing“-RNAs an. Folgende Ergebnisse wurden zusammengefasst: Die schwarzen Linien mit Pfeilkopf zeigen die gefundenen Bereiche bei der Suche von Komplementaritäten von kurzen PSTVd-Segmenten zum *Arabidopsis*-Genom (siehe auch Abb. 1.6 und Abschnitt 1.4.1). Die schwarzen Balken zeigen die Ergebnisse der miRNA-Vorhersage durch das Programm YAMP, das allerdings nicht zwischen miRNA und miRNA* unterscheiden kann; diese Balken könnten also auf der unteren (wie eingezeichnet), als auch auf der oberen Region des Viroid-Stäbchens liegen. Die farbigen Balken zeigen die signifikanten Bereiche, die durch die Solexa-Sequenzierung herausgefunden werden konnten (siehe auch Abschnitt 3.4).

Obwohl diese miRNA mit Chloroplasten in Zusammenhang gebracht wird, sieht man bei den *Pospiviroidae* keine auffällige Veränderung der Blattfarbe; selbst bei AS1-infizierten Pflanzen bleiben die Blätter grün. Zeitweise sind zwar kleine gelbe Flecken oder braune Stellen zu sehen, diese kommen aber eher von der Sonneneinstrahlung und zu wenig Wasser (ist bei allen Pflanzen zu beobachten) bzw. der Nekrose.

4.5. Vergleich von verschiedenen miRNA-Suchen

Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, ist es gelungen, auf unterschiedliche Weise zu übereinstimmenden Ergebnissen bezüglich der Sequenz bzw. der Entstehungsart von PSTVd-spezifischen miRNAs zu kommen. Diese Abbildung vereint zwei *in-silico*-Analysen, sowie die vorher beschriebene Solexa-Analyse mit *in-vivo*-Proben. Die schwarzen Linien mit Pfeilkopf zeigen die gefundenen Bereiche bei der Suche von Komplementaritäten von kurzen, 23 Nukleotid langen PSTVd-Segmenten zum *Arabidopsis*-Genom. Hierbei gab es überwiegend Treffer in den Bereichen der oberen terminal-linken- und virulenzmodulierenden Region, bzw. der unteren virulenzmodulierenden Region. Bei der miRNA-Vorhersage mit dem Programm YAMP (Teune, 2008; schwarze Balken) war es nicht möglich zwischen miRNA und miRNA* zu unterscheiden. Die Treffer waren signifikant in der virulenzmodulierenden-, sowie terminal rechten Region vorhanden. Diese Aussage konnte mit den Sequenzen der Solexa-Sequenzierung prinzipiell bestätigt werden. Auch hierbei wurden viele Sequenzen in den Bereichen der virulenzmodulierenden-, sowie terminal rechten Region gefunden, die allesamt eine (+)-Orientierung besitzen. Zusätzlich

waren signifikante Mengen an (+)-Sequenzen in der zentral konservierten-, sowie in der terminal linken Region zu beobachten.

Hierbei muss hervorgehoben werden, dass mit allen drei Methoden in der virulenzmodulierenden Region Treffer erzielt wurden. Dies ist der Bereich der Mutationen innerhalb des PSTVd, durch den sich die einzelnen PSTVd-Pathogenitätsvarianten marginal unterscheiden. Daher wurde an dieser Stelle primär mit Treffern gerechnet, um die unterschiedliche Pathogenität der einzelnen Varianten durch „silencing“ erklären zu können.

4.6. Schlussfolgerung

Der vollständige Weg, wie kurze PSTVd-spezifische RNAs aus dem Viroid entstehen und durch eingreifen in den Organismus der Pflanze Pathogenese auslösen, ist weiterhin weitestgehend unverstanden. Es scheint sicher, dass PSTVd durch seine stäbchenförmige Sekundärstruktur als Substrat zur Spaltung in kurze RNAs anerkannt wird. Aufgrund einiger signifikanter Bereiche, aus denen die kurzen RNAs stammen, scheint das Viroid über den miRNA-Weg als Hairpin-Struktur (pre- oder pri-miRNA) erkannt zu werden. In verschiedene Versuchen wurde gezeigt, dass bei Pflanzen das DCL1 in Zusammenarbeit mit HYL1 eine große Rolle bei der Prozessierung von pri-miRNAs in reife miRNAs in Pflanzen spielt. Da das Viroid generell auf die Enzyme seines Wirts angewiesen ist und diese auch z. B. bei der Replikation nutzt, ist es naheliegend, dass das Viroid durch dieses DCL1 gespalten wird. Dafür sprechen auch Versuche von Landry & Perreault (2005), die zeigten, dass PLMVd von Dicer-ähnlichen Enzymen in Weizenkeimextrakt in kurze RNAs geschnitten wird.

Mit Hilfe der Solexa-Sequenzierung konnte die Aussage der Northernblot-Analyse bestätigt werden, dass der Bereich, aus dem die PSTVd-spezifischen kurzen RNAs stammen, nicht eindeutig auf einen bestimmten Bereich des Viroids festgelegt werden kann. Allerdings zeigte die Sequenzierung auch, dass trotzdem signifikant mehr kurze RNAs in bestimmten Teilbereichen auftraten. Da die PSTVd-spezifischen kurzen RNAs nicht in einer Gleichverteilung über das gesamte Viroid auftraten, sollte man einen siRNA-Weg, bei dem das Viroid als doppelsträngige RNA erkannt werden müsste, ausschließen. Somit kann auf Grund der vier signifikanten Viroid-Bereiche, aus denen kurze RNAs mit PSTVd-Sequenz auftreten, auf den miRNA-Weg geschlossen werden. Bei diesen vier Bereichen handelt es sich um die terminal linke Region im oberen Bereich der stäbchenförmigen Sekundärstruktur, sowie die virulenzmodulierende, zentral konservierte und terminal rechte Region jeweils im unteren Bereich des Viroids. In den Proben befanden sie AS1-Sequenzen mit einer Länge zwischen 19 und 21 Nukleotiden.

Durch die signifikanten Treffer von PSTVd-spezifischen kurzen RNAs in der VM-Region von AS1 (Nukleotid 290-320) konnte die aufgestellte Hypothese, dass die Pathogenität des Viroids über einen „silencing“-Mechanismus abläuft, untermauert werden. Da in diesem Bereich die Sequenzunterschiede der einzelnen Viroid-Stämme liegen, wäre es mit der virulenzmodulierende Region am einfachsten erklärbar, warum die kaum veränderten Viroid-Stämme so unterschiedlich pathogen sind.

Durch den Vergleich der unterschiedlichen Suchen nach den Herkunftsbereichen Viroid-spezifischer miRNAs (siehe 4.5) wurde ebenfalls die Hypothese des „silencing“-Mechanismus als

Pathogenitätsmodell untermauert. Hierbei war der einzige Bereich, der in allen Suchen identisch war, die virulenzmodulierende Region im unteren Bereich der PSTVd-Sekundärstruktur.

Der terminal rechten Region (T_R) wird eine Rolle beim interzellulären Transport des Viroids zugesprochen, außerdem wurde von Stroeks (2007) gezeigt, dass dieser Bereich eine Kissing-Loop-Komplex mit der 5S-RNA bildet. Warum gerade in diesem Bereich, wo die 5S-RNA an das Viroid binden kann, eine signifikante Menge an kurzen RNAs auftritt, die ebenfalls durch das Programm YAMP gefunden wurden, ist momentan nicht erklärbar. Möglicherweise kann durch diese kurzen RNAs ebenfalls die Translation von bestimmten mRNAs verhindert werden. Da die 5S-RNA ein Bestandteil der großen Untereinheit und die kleinste RNA-Komponente des Ribosoms ist, wäre es denkbar, dass das Viroid durch Anlagerung seiner miRNAs aus der (T_R)-Region an die 5S-RNA das Ribosom daran hindert sich korrekt zusammenzusetzen bzw. die Stabilität der großen ribosomalen Untereinheit beeinflusst (Holmberg & Nygård, 2000). Da die große Untereinheit offenbar an der Protein-Biosynthese beteiligt ist, könnten dadurch unterschiedlichste Probleme, bis hin zu Wachstumsstopp und Tod des Organismus, auftreten. Da man bei den infizierten Pflanzen oft ein geringeres Wachstum, bei aggressiven Stämmen Symptome bis hin zur Nekrose, beobachten kann, könnten diese RNAs möglicherweise damit in Zusammenhang stehen. Dagegen sprechen die Analysen von Thiel (1999), die keinen Unterschied zwischen infizierten und nicht-infizierten Tomaten bezüglich ihrer Ribosomen feststellen konnte.

In der Linken Terminalen Region (T_L) liegt die Startstelle für die Synthese von (–)-Strängen. Der Zentral Konservierten Region (CCR) wurde im unteren Bereich bisher keine besondere Eigenschaft zugewiesen. Warum in diesem Bereich signifikante Mengen der kurzen RNAs auftreten ist momentan noch nicht erklärbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Solexa-Sequenzierung sehr viele Sequenzen erhalten wurden, denen zum aktuellen Zeitpunkt keine Funktion zugewiesen werden kann. Sogar die Sequenzen, denen meist über den Vergleich mit *Arabidopsis* und der Rücksuche auf *Solanum* eine mögliche Funktion zugeordnet werden konnte, stellen keinen eindeutigen Beweis dar. Wie unter 3.6 beschrieben, gibt es noch viel zu wenig sequenzierte Bereiche aus der Tomatenpflanze, denen eine nachgewiesene Funktion zugeordnet ist. Des weiteren unterscheiden sich die Symptome bei Tomatenpflanzen zwischen den einzelnen Sorten trotz gleicher Infizierung drastisch. Daraus kann geschlossen werden, dass die Tomatenpflanzen innerhalb der Sorten schon soweit variieren, dass man für konkrete Aussagen das sequenzierte Genom der Sorte Rutgers benötigen würde. Aus diesem Grund wäre bei weiteren Versuchen sicherlich ein Vergleich unterschiedlicher Tomaten-Sorten, die mit dem gleichen Viroid infiziert wurden, interessant.

Da die Viroid-spezifischen RNAs, die in signifikanten Mengen gefunden wurden, in der gleichen Größenordnung vorkommen (mehrere Hundert) wie die annotierten miRNAs, ist es durchaus möglich, dass diese „silencing“ auslösen. Auch die gefundenen annotierten miRNAs scheinen auf jeden Fall eine wichtige Rolle bei der Pathogenese im weitesten Sinne zu spielen, da alle mit Wachstum, sowie Blattmorphogenese in Verbindung gebracht werden. Es muss allerdings beachtet werden, dass sämtliche experimentell gezeigten Abhängigkeiten der miRNAs in *Arabidopsis* gezeigt wurden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Viroide sind einzelsträngige, zirkuläre RNA-Moleküle, die autonom in der Wirtspflanze replizieren und die biologische Wirkung eines normalen Pflanzenvirus besitzen. Anders als RNA-Viren besitzt die Viroid-RNA kein Hüllprotein und kodiert keine Proteine, wodurch sie für alle biologischen Aktivitäten auf die Wirtsmaschinerie angewiesen ist. Das in dieser Arbeit verwendete Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) gehört zur Familie der *Pospiviroidae* und verursacht je nach Stamm unterschiedlich starke Krankheitssymptome in der Tomatenvarietät Rutgers. Das aktuelle Pathogenitätsmodell behauptet, dass von Viroiden „silencing“-RNAs produziert werden und diese über einen der „RNA-silencing“-Wege in die Genregulation des Wirts eingreifen.

Bei der Pflanze und somit auch beim Viroid wird angenommen, dass das „RNA-silencing“ über den miRNA-Weg abläuft, aber, wie beim siRNA-Weg, in der Spaltung der mRNA endet. Hierzu wird die pri-miRNA über die pre-miRNA zur reifen miRNA durch die Enzyme DCL1 und HYL1 prozessiert. Nach Einbau der reifen miRNA in einen RISC (RNA-induced silencing complex) wird dieser zur Ziel-mRNA geführt, die nahezu perfekt gebunden wird und dadurch die mRNA gespalten. Bei PSTVd kann entweder die maturierte RNA oder ein Replikationsintermediär als pri-miRNA agieren, was zur Erzeugung von miRNAs aus wenigen, bestimmten Positionen der PSTVd RNA führen würde. Alternativ könnten doppelsträngige Replikationsintermediäre in siRNAs beliebiger Sequenz gespalten werden.

Northernblot-Analysen zum Nachweis PSTVd-spezifischer RNAs haben gezeigt, dass die Bereiche aus denen die RNAs stammen, nicht durch Sonden, die jeweils ein Viertel des PSTVd abdecken, einzugrenzen waren. Allerdings konnten kurze RNAs beider Polarität nachgewiesen werden. Durch Auftrennung mittels Gelelektrophorese und Elektro-Gelelution war es möglich, kurze RNAs in μg -Mengen und ohne Verluste durch eventuelle Voraufreinigungen aus Gesamt-RNA zu erhalten. Diese kurzen PSTVd-spezifischen RNAs sollten anschließend durch eine spezifische Dynabead-Aufreinigung von der Gesamt-RNA getrennt werden. Zur Sequenzierung der PSTVd-spezifischen Sequenzen wurde eine Solexa-Sequenzierung durchgeführt. Bei dieser High-Throughput-Sequenzierung wurden zuerst die eluierten miRNAs in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurden unterschiedliche Barcodes zusätzlich zu den 3'- und 5'-Adaptoren anligiert, damit mehrere Proben parallel sequenziert werden konnten.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Datenbanken, dem Viroid und untereinander verglichen, um ihnen Funktionen zuzuordnen. Hierbei kristallisierten sich sechs annotierte miRNA-Familien, sowie eine einzelnen miRNA heraus, die mit den Blättern (Form, Farbe, Ausbildung) oder dem Wachstum, in der Regel bei *Arabidopsis*, in Verbindung gebracht werden. Da Veränderungen dieser Bereiche bei infizierten Pflanzen auftreten, könnten diese miRNAs in Verbindung mit der Viroid-Pathogenese stehen.

Die Mehrzahl der PSTVd-spezifischen RNAs stammt aus der virulenzmodulierende Region von PSTVd. Da hier die Sequenzunterschiede der unterschiedlich pathogenen Viroid-Stämme liegen, weist dies auf eine miRNA-regulierte PSTVd-Pathogenität hin.

6. SUMMARY

Viroids are single-stranded, circular RNA molecules that replicate autonomously in the host plant and have the same biological effects as an ordinary plant virus. Different to RNA viruses, viroids possess no capsid and do not code for any protein; thus they have to use the host machinery for all biological activities. In this work the potato spindle tuber viroid (PSTVd) is used, which belongs to the family *Pospiviroidae* and leads, depending on the PSTVd strain, to different symptoms in the tomato variety Rutgers.

A recent pathogenicity model states that “silencing” RNAs are produced from the viroid that interfere with gene regulation of the host by an “RNA silencing” pathway.

In plants—and therefore in viroids, too—it is expected that the “RNA silencing” takes place by the miRNA pathway, but ends in mRNA cleavage like in an siRNA pathway. For this, the pri-miRNA is processed by the enzymes DCL1 and HYL1 to a pre-miRNA and finally to mature miRNA. After integrating the mature miRNA into the RISC (RNA-induced silencing complex), the complex is lead to the target mRNA, binds in near-perfect complementarity and cleaves the mRNA. In case of PSTVd either the mature RNA or a replication intermediate might act as pri-miRNA, which would imply the generation of “miRNA” from a single or a few positions of the PSTVd RNA. Alternatively, double-stranded PSTVd replication intermediates might be cleaved to siRNAs of any PSTVd sequence.

Detection of PSTVd-specific RNAs by Northern blot analysis with viroid RNA quarters was not able to define the regions of their origin. Small RNAs of both polarities, however, could be detected. It was possible to obtain μg of small RNAs by separating total RNA via gel electrophoresis and electrophoretic gel elution without loss due to any pre-purification steps. Next, PSTVd-specific small RNAs were purified by Dynabeads from the total RNA. For sequencing of these PSTVd-specific RNAs the high-throughput Solexa technique was used. Eluted miRNAs were transcribed into cDNA; ligation of primers including different bar codes to their 5' and 3' ends allowed for sequencing of different samples in parallel.

The obtained sequences were compared with sequence databases, the viroid sequence, and among each other in order to assign functions to these sequences. In total six annotated miRNA families plus one miRNA were found; all of them are known to be linked—at least in *Arabidopsis*—to form, shape and development of leafs or plant growth. Because infected plants have malformations in these areas, these miRNAs might be associated with viroid pathogenicity.

The majority of PSTVd-specific RNAs was derived clearly from the virulence-modulating region of PSTVd. Because small sequence differences of particular viroid strains in this region lead to drastic symptom changes, this hints towards a pathogenicity mechanism regulated by a miRNA pathway.

7. ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
%	Prozent (1/100)
‰	Promille (1/1000)
A	Adenin, Ampere (= Stromstärke)
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AgNO ₃	Silbernitrat
Ag ⁺	Silber-Ion
AP	Auftragspuffer
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASBVd	Avocado Sun Blotch Viroid
ATP	Adenosintriphosphat
β	beta
Beads	Dynabeads® M-280 Streptavidin
BSA	Bovines serumalbumin = Rinderserumalbumin
C	Cytosin
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCCVd	Coconut Cadang Cadang Viroid
CChMVd	Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid
CCR	Zentrale Konservierte Region
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute / Zerfälle pro Minute
cPSTVd	circuläres PSTVd
Da	Dalton
DCL	Dicer-like / Dicer-ähnlich
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dt.	deutsch
DTT	DL-Dithiothreitol
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
<i>et al.</i>	<i>et alteri (lat.)</i> / und Andere
EtOH	Ethanol

FA	Formamid
G	Guanin
g	Gramm
Gelelu	Gelelution
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _{auto}	autoklaviertes Wasser
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
HP	Hairpin
Hyb	Hybridisierung
<i>in-silico</i>	auf Rechnerbasis
<i>in-situ</i>	am (Ursprungs-) Ort, am Platz
Int	Intermediate
<i>in-vitro</i>	im Reagenzglas; außerhalb des intakten Organismus
<i>in-vivo</i>	am lebenden Objekt; innerhalb des lebenden Organismus
Isopropanol	2-Propanol
k	kilo
kDa	Kilodalton
KP	Kaliumphosphat
l	Liter
LCCR	Untere Zentrale Konservierte Region
Lsg.	Lösung
μ	Mikro (10^{-6})
μ Ci	Mikro-Curie
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
M	Molar (mol/l)
m	Milli (10^{-3})
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium-Ion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
mind.	mindestens
miRNA	micro RNA
miRNP	miRNA-Protein-Komplex
mJ	Millijoule
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter

mmol	Millimol
mögl.	möglich
mRNA	Messenger-RNA
n	Nano (10^{-9})
NaBH_4	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO_3	Natriumhydrogencarbonat
natsiRNAs	natural antisense transcript-derived siRNAs
NaOAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxid
Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaN_3	Natriumazid
ng	Nanogramm
NH_4OAc	Ammoniumacetat
nm	Nanometer, Einheit der Wellenlänge
nM	Nanomolar
Nt	Nukleotid
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
P-bodies	Cytoplasmic processing bodies
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglycol
PEG_{6000}	Polyethylenglycol (Molekulargewicht 6000 g/mol)
p	Piko (10^{-12})
pg	Pikogramm
piRNAs	PIWI-interacting RNAs
PLMVd	Peach Latent Mosaic Viroid
pmol	Pikomol
Pol	Polymerase
PSTVd	Potato Spindle Tuber Viroid
PPCO	Polypropylen Copolymer
pre-miRNA	precursor miRNA (Vorläufer-miRNA)
pri-miRNA	primary miRNA (Primär-miRNA)
PTGS	post-transcriptional gene silencing
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rasiRNAs	repeat-associated small interfering RNAs
RdRP	RNA-dependent RNA-Polymerase (RNA-abhängige RNA-Polymerase)
RISC	RNA-induced silencing complex
RLC	RISC loading complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
rpm	rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sec	Sekunde
sec siRNA	sekundäre siRNA
siRNA	silencing RNA / short interference RNA / small interfering RNA
snRNAs	small nuclear RNAs
snoRNAs	small nucleolar RNAs
sog.	sogenannt/e
Spermidin	1,8-Diamino-4-azaoctane ($\text{NH}_2\text{-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH}_4$)
SSC	Standard saline citrat
ssRNA	einzelsträngige RNA
Std	Stunde(n)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
tasiRNAs	<i>Trans</i> -acting siRNAs
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TGGE	Temperaturgradienten-Gelelektrophorese
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
T_L	Linke Terminale Region
tl	Tetraloop
T_m	Schmelztemperatur
T_R	Rechte Terminale Region
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Uracil, Unit (Einheit der Enzymaktivität)
u. a.	unter anderem
UCCR	Obere Zentrale Konservierte Region
ÜN	über Nacht
Urea	Harnstoff
UTR	Untranslatierte Region (einer mRNA)
UV	Ultraviolett
V	Volt (= Spannung), Volumen
vergl.	vergleiche
Vh	Volt-Stunden
VL	Volllänge
VM-Region	Virulenzmodulierende Region
Vol	Volumen
VR	Variable Region
v/v	volume per volume
W	Watt (= Leistung)
Xx	Xylenxyanol
z. B.	zum Beispiel

8. LITERATUR

- Allen, R.S., Li, J., Stahle, M.I., Dubroué, A., Gubler, F. & Millar, A.A. (2007). Genetic analysis reveals functional redundancy and the major target genes of the Arabidopsis miR159 family. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**(41), 16371–16376.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, **431**(7006), 350–355.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116**(2), 281–297.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, **431**(7006), 356–363.
- Baumstark, T., Schröder, A.R. & Riesner, D. (1997). Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.*, **16**(3), 599–610.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., Bouchez, D., Caboche, M. & Benning, C. (1998). AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J.*, **17**(1), 170–180.
- Branch, A.D. & Robertson, H.D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science*, **223**(4635), 450–455.
- Bruce, A.G. & Uhlenbeck, O.C. (1978). Reactions at the termini of tRNA with T4 RNA ligase. *Nucleic Acids Res.*, **5**(10), 3665–3677.
- Cerutti, H. & Casas-Mollano, J.A. (2006). On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr. Genet.*, **50**(2), 81–99.
- Chapman, E.J. & Carrington, J.C. (2007). Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat. Rev. Genet.*, **8**(11), 884–896.
- Daròs, J.A. & Flores, R. (2004). Arabidopsis thaliana has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**(17), 6792–6797.
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F. & Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, **432**(7014), 231–235.
- Denti, M.A., Boutla, A., Tsagris, M. & Tabler, M. (2004). Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *Plant J.*, **37**(5), 762–769.
- Diener, T.O. (1971). Potato spindle tuber “virus”. IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, **45**(2), 411–428.
- Diener, T.O. (1979). Viroids and viroid diseases. *Wiley-Interscience, New York*.
- Diener, T.O. (1987). The viroids. *Plenum Press, New York*.
- Diermann, N.Y. (2005). „Silencing“-RNAs in Viroid-infizierten Pflanzen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität.
- Ding, B., Kwon, M.O., Hammond, R. & Owens, R. (1997). Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant J.*, **12**(4), 931–936.

- Djikeng, A., Shi, H., Tschudi, C. & Ullu, E. (2001). RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. *RNA*, **7**(11), 1522–1530.
- Doench, J.G. & Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.*, **18**(5), 504–511.
- Domdey, H., Jank, P., Sanger, L. & Gross, H.J. (1978). Studies on the primary and secondary structure of potato spindle tuber viroid: products of digestion with ribonuclease A and ribonuclease T1, and modification with bisulfite. *Nucleic Acids Res.*, **5**(4), 1221–1236.
- Du, T. & Zamore, P.D. (2005). microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development*, **132**(21), 4645–4652.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **4**(6), 457–467.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. & Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**(6836), 494–498.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.*, **15**(2), 188–200.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.*, **20**(23), 6877–6888.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J.B., Bellini, C. & Vaucheret, H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**(21), 11650–11654.
- Flores, R. (2001). A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *C. R. Acad. Sci. III*, **324**(10), 943–952.
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M. & Diener, T.O. (1998). A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Arch. Virol.*, **143**(3), 623–629.
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, **432**(7014), 235–240.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., van Dongen, S. & Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.*, **36**(Database issue), D154–D158.
- Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H. & Sanger, H.L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*, **273**(5659), 203–208.
- Haley, B. & Zamore, P.D. (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**(7), 599–606.
- Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**(5441), 950–952.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L. & Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.*, **21**(17), 4671–4679.

- Hammond, R.W. (1992). Analysis of the virulence modulating region of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by site-directed mutagenesis. *Virology*, **187**(2), 654–662.
- Hammond, R.W. (1994). Agrobacterium-mediated inoculation of PSTVd cDNAs onto tomato reveals the biological effect of apparently lethal mutations. *Virology*, **201**(1), 36–45.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**(6775), 293–296.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R. & Hannon, G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, **293**(5532), 1146–1150.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H. & Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.*, **18**(24), 3016–3027.
- Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature*, **418**(6894), 244–251.
- Hecker, R. (1989). Die Struktur der intermediären Ribonukleinsäuren bei der Replikation von Viroiden. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität.
- Henco, K., Sänger, H.L. & Riesner, D. (1979). Fine structure melting of viroids as studied by kinetic methods. *Nucleic Acids Res.*, **6**(9), 3041–3059.
- Hirsch, J., Lefort, V., Vankersschaver, M., Boualem, A., Lucas, A., Thermes, C., d'Aubenton Carafa, Y. & Crespi, M. (2006). Characterization of 43 non-protein-coding mRNA genes in *Arabidopsis*, including the MIR162a-derived transcripts. *Plant Physiol.*, **140**(4), 1192–1204.
- Holmberg, L. & Nygård, O. (2000). Release of ribosome-bound 5S rRNA upon cleavage of the phosphodiester bond between nucleotides A54 and A55 in 5S rRNA. *Biol. Chem.*, PrintVol381(11), 1041–1046.
- Hu, Y., Feldstein, P.A., Bottino, P.J. & Owens, R.A. (1996). Role of the variable domain in modulating potato spindle tuber viroid replication. *Virology*, **219**(1), 45–56.
- Hutvágner, G. & Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **9**(1), 22–32.
- Hutvágner, G. & Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*, **297**(5589), 2056–2060.
- Irvine, D.V., Zaratiegui, M., Tolia, N.H., Goto, D.B., Chitwood, D.H., Vaughn, M.W., Joshua-Tor, L. & Martienssen, R.A. (2006). Argonaute slicing is required for heterochromatic silencing and spreading. *Science*, **313**(5790), 1134–1137.
- Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R.S. & Ding, B. (2001). Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **14**(11), 1332–1334.
- Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A.R., Molina, C., Nelson, R.S. & Ding, B. (2007). A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *J. Virol.*, **81**(6), 2980–2994.
- Jones, A.L., Thomas, C.L. & Maule, A.J. (1998). De novo methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *EMBO J.*, **17**(21), 6385–6393.

- Jones, L., Ratcliff, F. & Baulcombe, D.C. (2001). RNA-directed transcriptional gene silencing in plants can be inherited independently of the RNA trigger and requires Met1 for maintenance. *Curr. Biol.*, **11**(10), 747–757.
- Jones-Rhoades, M.W. & Bartel, D.P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol. Cell*, **14**(6), 787–799.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. & Bartel, B. (2006). MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 19–53.
- Keese, P. & Symons, R.H. (1985). Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**(14), 4582–4586.
- Kennerdell, J.R., Yamaguchi, S. & Carthew, R.W. (2002). RNAi is activated during *Drosophila* oocyte maturation in a manner dependent on aubergine and spindle-E. *Genes Dev.*, **16**(15), 1884–1889.
- Kim, V.N. (2005). Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol. Cells*, **19**(1), 1–15.
- Klahre, U., Cr  t  , P., Leuenberger, S.A., Iglesias, V.A. & Meins, F. (2002). High molecular weight RNAs and small interfering RNAs induce systemic posttranscriptional gene silencing in plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**(18), 11981–11986.
- Kolonko, N., Bannach, O., Aschermann, K., Hu, K.H., Moors, M., Schmitz, M., Steger, G. & Riesner, D. (2006). Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. *Virology*, **347**(2), 392–404.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. & Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.*, **12**(9), 735–739.
- Landry, P. & Perreault, J.P. (2005). Identification of a peach latent mosaic viroid hairpin able to act as a Dicer-like substrate. *J. Virol.*, **79**(10), 6540–6543.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. & Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**(5543), 858–862.
- Lee, R.C. & Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **294**(5543), 862–864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, **75**(5), 843–854.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Raadmark, O., Kim, S. & Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, **425**(6956), 415–419.
- Leuschner, P.J., Ameres, S.L., Kueng, S. & Martinez, J. (2006). Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep.*, **7**(3), 314–320.
- Lewis, B.P., Shih, I., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. & Burge, C.B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, **115**(7), 787–798.
- Li, W.X. & Ding, S.W. (2001). Viral suppressors of RNA silencing. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**(2), 150–154.
- Li, W. & Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, **22**(13), 1658–1659.

- Lin, H. & Spradling, A.C. (1997). A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, **124**(12), 2463–2476.
- Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E. & Sattler, M. (2003). Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. *Nature*, **426**(6965), 465–469.
- Liu, H.H., Tian, X., Li, Y.J., Wu, C.A. & Zheng, C.C. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA*, **14**(5), 836–843.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L. & Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, **305**(5689), 1437–1441.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A. & Carrington, J.C. (2002). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell*, **14**(7), 1605–1619.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. (2002). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science*, **297**(5589), 2053–2056.
- Ma, J.B., Yuan, Y.R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T. & Patel, D.J. (2005). Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, **434**(7033), 666–670.
- Mallory, A.C. & Vaucheret, H. (2006). Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. *Nat. Genet.*, **38 Suppl**, S31–S36.
- Markarian, N., Li, H.W., Ding, S.W. & Semancik, J.S. (2004). RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch. Virol.*, **149**(2), 397–406.
- Martin, W.H. (1922). Spindle Tuber, a new potato trouble. Hints to potato growers. *N.Y. State Potato Assoc.*, **3**, 4ff.
- Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R. & Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, **110**(5), 563–574.
- Matoušek, J., Orctová, L., Steger, G., Škopek, J., Moors, M., Dědič, P. & Riesner, D. (2004). Analysis of thermal stress-mediated PSTVd variation and biolistic inoculation of progeny of viroid “thermomutants” to tomato and Brassica species. *Virology*, **323**(1), 9–23.
- Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P. & Zamore, P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, **123**(4), 607–620.
- Mattick, J.S. & Makunin, I.V. (2006). Non-coding RNA. *Hum. Mol. Genet.*, **15 Spec No 1**, R17–R29.
- Matzke, M.A., Matzke, A.J., Pruss, G.J. & Vance, V.B. (2001). RNA-based silencing strategies in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**(2), 221–227.
- McManus, M.T. & Sharp, P.A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.*, **3**(10), 737–747.
- Meister, G., M., Landthaler, Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G. & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell*, **15**(2), 185–197.
- Mette, M.F., Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M.A. & Matzke, A.J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.*, **19**(19), 5194–5201.

- Miyoshi, K., Tsukumo, H., Nagami, T., Siomi, H. & Siomi, M.C. (2005). Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev.*, **19**(23), 2837–2848.
- Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jürgens, G. & Laux, T. (1998). Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during Arabidopsis embryogenesis. *EMBO J.*, **17**(6), 1799–1809.
- Nykänen, A., Haley, B. & Zamore, P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, **107**(3), 309–321.
- Nykänen, A., Haley, B. & Zamore, P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, **107**(3), 309–321.
- Ori, N., Cohen, A.R., Etzioni, A., Brand, A., Yanai, O., Shleizer, S., Menda, N., Amsellem, Z., Efroni, I., Pekker, I., Alvarez, J.P., Blum, E., Zamir, D. & Eshed, Y. (2007). Regulation of LANCEOLATE by miR319 is required for compound-leaf development in tomato. *Nat. Genet.*, **39**(6), 787–791.
- Owens, R.A. & Hammond, R.W. (1990). Mutational analysis of viroids. *Sem. Virol.*, **1**, 101–107.
- Owens, R.A., Steger, G., Hu, Y., Fels, A., Hammond, R.W. & Riesner, D. (1996). RNA structural features responsible for potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology*, **222**(1), 144–158.
- Owens, R.A., Steger, G., Hu, Y., Fels, A., Hammond, R.W. & Riesner, D. (1996). RNA structural features responsible for potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology*, **222**(1), 144–158.
- Pal-Bhadra, M., Bhadra, U. & Birchler, J.A. (2002). RNAi related mechanisms affect both transcriptional and posttranscriptional transgene silencing in *Drosophila*. *Mol. Cell*, **9**(2), 315–327.
- Palatnik, J.F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J.C. & Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, **425**(6955), 257–263.
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A., Denti, M., Baulcombe, D., Tsagris, M. & Tabler, M. (2001). Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.*, **29**(11), 2395–2400.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. & Chen, X. (2002). CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.*, **12**(17), 1484–1495.
- Parker, J.S., Roe, S.M. & Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*, **434**(7033), 663–666.
- Parrish, S. & Fire, A. (2001). Distinct roles for RDE-1 and RDE-4 during RNA interference in *Caenorhabditis elegans*. *RNA*, **7**(10), 1397–1402.
- Parrish, S., Fleenor, J., Xu, S., Mello, C. & Fire, A. (2000). Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference. *Mol. Cell*, **6**(5), 1077–1087.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E. & Ruvkun, G. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, **408**(6808), 86–89.
- Plasterk, R.H. (2002). RNA silencing: the genome's immune system. *Science*, **296**(5571), 1263–1265.
- Qi, Y. & Ding, B. (2003). Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell*, **15**(11), 2566–2577.

- Qu, F., Heinrich, C., Loss, P., Steger, G., Tien, P. & Riesner, D. (1993). Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural elements. *EMBO J.*, **12**(5), 2129–2139.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. & Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.*, **16**(13), 1616–1626.
- Reyes, J.L. & Chua, N.H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *Plant J.*, **49**(4), 592–606.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. & Bartel, D.P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, **110**(4), 513–520.
- Riesner, D. & Gross, H.J. (1985). Viroids. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 531–564.
- Riesner, D., Hecker, R. & Steger, G. (1988). Structure of Viroid Intermediates as Studied by Thermodynamics and Temperature-Gradient Gel Electrophoresis. *Structure and Expression; Volume I: From Proteins to Ribosomes*, Adenine Press., S. 261–285.
- Riesner, D., Henco, K., Rokohl, U., Klotz, G., Kleinschmidt, A.K., Domdey, H., Jank, P., Gross, H.J. & Sängner, H.L. (1979). Structure and structure formation of viroids. *J. Mol. Biol.*, **133**(1), 85–115.
- Rivas, F.V., Tolia, N.J.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J. & Joshua-Tor, L. (2005). Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**(4), 340–349.
- Ruvkun, G. (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science*, **294**(5543), 797–799.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**(12), 5463–5467.
- Sängner, H.L. (1972). An infectious and replicating RNA of low-molecular weight: The agent of the exocortis disease of citrus. *Adv. Biosci.*, **8**, 103–116.
- Sängner, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J. & Kleinschmidt, A.K. (1976). Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **73**(11), 3852–3856.
- Schmitz, A. (2003). Untersuchungen zum Pathogenitätsmechanismus von Viroid-RNA. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Schmitz, A. & Riesner, D. (1998). Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different Potato Spindle Tuber Viroid strains. *RNA*, **4**, 1295–1303.
- Schmitz, A. & Riesner, D. (2006). Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Anal. Biochem.*, **354**(2), 311–313.
- Schmitz, M. & Steger, G. (2007). Potato spindle tuber viroid (PSTVd). *Plant viruses*, **1**, 106–115.
- Schwarz, S., Grande, A.V., Bujdoso, N., Saedler, H. & Huijser, P. (2008). The microRNA regulated SBP-box genes SPL9 and SPL15 control shoot maturation in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.*, **67**(1-2), 183–195.
- Semancik, J.S. & Weathers, L.G. (1972). Exocortis disease: evidence for a new species of “infectious” low molecular weight RNA in plants. *Nat. New Biol.*, **237**(77), 242–244.
- Singh, R.P. & Clark, M.C. (1971). Infectious low-molecular weight ribonucleic acid from tomato. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**(5), 1077–1083.

- Song, J.J., Liu, J., Tolia, N.H., Schneiderman, J., Smith, S.K., Martienssen, R.A., Hannon, G.J. & Joshua-Tor, L. (2003). The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat. Struct. Biol.*, **10**(12), 1026–1032.
- Song, L., Han, M.H., Lesicka, J. & Fedoroff, N. (2007). Arabidopsis primary microRNA processing proteins HYL1 and DCL1 define a nuclear body distinct from the Cajal body. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**(13), 5437–5442.
- Spiesmacher, E., Mühlbach, H.P., Tabler, M. & Sängner, H.L. (1985). Synthesis of (+) and (-) RNA molecules of potato spindle tuber viroid (PSTV) in isolated nuclei and its impairment by transcription inhibitors. *Biosci. Rep.*, **5**(3), 251–265.
- Sprinzi, M. & Vassilenko, K.S. (2005). Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res.*, **33**(Database issue), D139–D140.
- Steger, G. (1994). Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, **22**(14), 2760–2768.
- Steger, G., Hofmann, H., Förtsch, J., Gross, H.J., Randles, J.W., Sängner, H.L. & Riesner, D. (1984). Conformational transitions in viroids and virusoids: comparison of results from energy minimization algorithm and from experimental data. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2**(3), 543–571.
- Stroeks, P.D. (2007). Kontaktstellen zwischen dem Viroid PSTVd und der ribosomalen 5S-RNA. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Sunkar, R. & Zhu, J.K. (2004). Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**(8), 2001–2019.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A. & Mello, C.C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*, **99**(2), 123–132.
- Tang, G. (2005). siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci.*, **30**(2), 106–114.
- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P. & Zamore, P.D. (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev.*, **17**(1), 49–63.
- Teune, J.H. (2008). Genomisch kodierte microRNAs und Viroid-induzierte kleine RNAs in Viridiplantae. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Thiel, V. (1999). Wechselwirkung von Viroiden mit zellulärer RNA. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität.
- Tijsterman, M., Ketting, R.F., Okihara, K.L., Sijen, T. & Plasterk, R.H. (2002). RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science*, **295**(5555), 694–697.
- Tolia, N.H. & Joshua-Tor, L. (2007). Slicer and the argonautes. *Nat. Chem. Biol.*, **3**(1), 36–43.
- Vaucheret, H., Beclin, C. & Fagard, M. (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *J. Cell. Sci.*, **114**(Pt 17), 3083–3091.
- Vazquez, F., Gascioli, V., Cr?t?, P. & Vaucheret, H. (2004). The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Curr. Biol.*, **14**(4), 346–351.

- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I. & Martienssen, R.A. (2002). Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science*, **297**(5588), 1833–1837.
- Wang, J.W., Schwab, R., Czech, B., Mica, E. & Weigel, D. (2008). Dual effects of miR156-targeted SPL genes and CYP78A5/KLUH on plastochron length and organ size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **20**(5), 1231–1243.
- Wang, M.B., Wesley, S.V., Finnegan, E.J., Smith, N.A. & Waterhouse, P.M. (2001). Replicating satellite RNA induces sequence-specific DNA methylation and truncated transcripts in plants. *RNA*, **7**(1), 16–28.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L. & Sanger, H.L. (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, **76**(3), 567–576.
- Waterhouse, P.M. & Helliwell, C.A. (2003). Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nat. Rev. Genet.*, **4**(1), 29–38.
- Waterhouse, P.M., Wang, M.B. & Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, **411**(6839), 834–842.
- Wild, U., Ramm, K., Sanger, H.L. & Riesner, D. (1980). Loops in viroids. Accessibility to tRNA anticodon binding. *Eur. J. Biochem.*, **103**(2), 227–235.
- Williams, R.W. & Rubin, G.M. (2002). ARGONAUTE1 is required for efficient RNA interference in *Drosophila* embryos. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**(10), 6889–6894.
- Woo, Y.M., Itaya, A., Owens, R.A., Tang, L., Hammond, R.W., Chou, H.C., Lai, M.M.C. & Ding, B. (1999). Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *Plant J.*, **17**, 627–635.
- Wu, G. & Poethig, R.S. (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development*, **133**(18), 3539–3547.
- Yan, K.S., Yan, S., Farooq, A., Han, A., Zeng, L. & Zhou, M.M. (2003). Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature*, **426**(6965), 468–474.
- Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B. & Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res.*, **34**(2), 667–675.
- Yigit, E., Batista, P.J., Bei, Y., Pang, K.M., Chen, C.C.G., Tolia, N.H., Joshua-Tor, L., Mitani, S., Simard, M.J. & Mello, C.C. (2006). Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell*, **127**(4), 747–757.
- Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R.W., Steward, R. & Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, **307**(5711), 932–935.
- Yuan, Y.R., Pei, Y., Ma, J.B., Kuryavyi, V., Zhadina, M., Meister, G., Chen, H.Y., Dauter, Z., Tuschl, T. & Patel, D.J. (2005). Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol. Cell.*, **19**(3), 405–419.
- Zamore, P.D. (2002). Ancient pathways programmed by small RNAs. *Science*, **296**(5571), 1265–1269.

- Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A. & Bartel, D.P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**(1), 25–33.
- Zeng, Y. & Cullen, B.R. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *J. Biol. Chem.*, **280**(30), 27595–27603.
- Zhang, J., Zeng, R., Chen, J., Liu, X. & Liao, Q. (2008). Identification of conserved microRNAs and their targets from *Solanum lycopersicum* Mill. *Gene*, **423**(1), 1–7.
- Zhao, Y., Owens, R.A. & Hammond, R.W. (2001). Use of a vector based on Potato virus X in a whole plant assay to demonstrate nuclear targeting of Potato spindle tuber viroid. *J. Gen. Virology*, **82**, 1491–1497.
- Zhu, Y., Green, L., Woo, Y.M., Owens, R. & Ding, B. (2001). Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology*, **279**(1), 69–77.
- Zilberman, D., Cao, X. & Jacobsen, S.E. (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science*, **299**(5607), 716–719.