



**Identifikation eines zellulären  
RNA-Wechselwirkungspartners von  
PSTVd *in vitro* und *in vivo***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Monika Katja Aschermann  
aus Bonn

Düsseldorf

2001

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

Referent: Prof. Dr. Riesner

Korreferent: Prof. Dr. Alfermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2001

meiner Familie

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Riesner, unter dessen Leitung und Betreuung diese Arbeit angefertigt wurde. Neben seinem Interesse, seiner Diskussionsbereitschaft und seinen hilfreichen Anregungen möchte ich mich an dieser Stelle vor allem für seine Toleranz und sein Vertrauen bedanken.

Des weiteren danke ich allen Mitgliedern der Viroid-Arbeitsgruppe herzlich für die gute Zusammenarbeit. Dies gilt insbesondere für Herrn Axel Schmitz und seinen Beitrag zur stets unterhaltsamen Atmosphäre in Raum 25. Frau Dr. Viola Thiel danke ich für die Unterstützung bei den ersten Schritten dieser Arbeit. Bei Frau Sandra Klümper möchte ich mich vor allem für die Hilfe an und mit den Zellkulturen bedanken. Frau Nadine Kolonko danke ich für die regelmäßigen Motivationsschübe und Herrn Ole Schrader für die anregenden Diskussionen zum Thema: Der Loop E im Allgemeinen und Besonderen.

Allen Mitgliedern der Rechner-Crew ein herzliches Dankeschön für die vielen direkten und indirekten Hilfestellungen. Namentlich seien hier PD-Dr.-Gerhard-Steger und Dr. Michael Schmitz erwähnt, die mir durch anregende Diskussionen und praktische Hilfen am Rechner eine große Unterstützung waren.

Bei Frau Dr. Petra Klaff bedanke ich mich vor allem für ihre Hilfe zu Beginn dieser Arbeit sowie ihre Bereitschaft, mich von ihrem reichhaltigem Erfahrungsschatz profitieren zu lassen.

Im Rahmen ihrer Praktika führten Frau Silke Koch und Frau Anja Krause einige Experimente für mich durch. Auch hierfür möchte ich mich aufrichtig bedanken.

Frau Elke Reinartz danke ich für die unzähligen kleinen und großen Hilfen nicht nur im Laboralltag.

Ein herzliches Dankeschön auch an Dr. Benedikt Aschermann und Dr. Roswitha Drees für ihre liebevolle und langjährige moralische Unterstützung sowie die vielen Arbeitsstunden, die sie mir ermöglichten.

Für ihr nie nachlassendes Bemühen mich am Ende jedes Labortages in die Realität zurückzuführen, möchte ich mich besonders bei Alexander, Cornelius und Marius Aschermann bedanken. Ihr ungebrochener Optimismus, mich für die wirklich wichtigen Dinge des Lebens begeistern zu können, bleibt unvergessen.

Allen Mitgliedern des Institutes danke ich für ihr Interesse an meiner Arbeit, die vielen Hilfestellungen und das freundliche Arbeitsklima.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Pathogenität . . . . .	2
1.2	Transport . . . . .	3
1.3	Replikation und Prozessierung . . . . .	4
1.4	Wechselwirkungen mit weiteren Wirtsfaktoren . . . . .	6
1.4.1	Wechselwirkungen mit Proteinen . . . . .	6
1.4.2	Wechselwirkung mit zellulärer RNA . . . . .	7
1.5	Aufgabenstellung . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	Allgemeines zu Chemikalien und Puffern . . . . .	13
2.2	Standardpuffer und Lösungen . . . . .	13
2.3	Nukleinsäuren . . . . .	14
2.3.1	Plasmide . . . . .	14
2.3.2	Vorfraktionierter RNA-Extrakt aus <i>Lycopersicon esculentum</i> Blattgewebe und HPLC aufgereinigtes PSTVd . . . . .	14
2.3.3	Genomische DNA . . . . .	15
2.3.4	PSTVd-Minimalkonstrukt . . . . .	15
2.3.5	Oligonukleotide . . . . .	15
2.4	Zellmaterial . . . . .	16
2.4.1	Tomatenpflanzen . . . . .	16
2.4.2	Kartoffelsuspensionszellkulturen . . . . .	17
2.5	Präparative Methoden . . . . .	17
2.5.1	Isolation von Protoplasten aus Suspensionszellkulturen . . . . .	17
2.5.2	Anreicherung von Zellkernen aus Suspensionszellkulturen . . . . .	18
2.5.3	RNA-Präparation . . . . .	18
2.6	Enzymatische Reaktionen . . . . .	19
2.6.1	<i>In vitro</i> -Transkription mit der RNA-Polymerase T7 . . . . .	19
2.6.2	Radioaktive 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden und Primer Extension Reaktion . . . . .	20
2.6.3	Sequenzierung von Plasmid DNA . . . . .	21
2.6.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR) . . . . .	21
2.6.5	Linearisierung von Plasmiden . . . . .	22

2.7	Methoden zur Induktion von Psoralen abhängigen Quervernetzungen . . . . .	23
2.7.1	Quervernetzung mit Psoralen nach <i>in vitro</i> -Komplexeinstellung . . . . .	23
2.7.2	<i>In vivo</i> -Quervernetzung mit Psoralen . . . . .	23
2.8	Reversion der Psoralen-Quervernetzung . . . . .	24
2.9	„Dynabeads“-Aufreinigung . . . . .	24
2.9.1	Maskierung der PSTVd-Moleküle . . . . .	24
2.9.2	Bindung an „Dynabeads“ . . . . .	25
2.10	Gelelektrophoresen . . . . .	26
2.10.1	Leistungsgesteuerte, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	26
2.10.2	Spannungsgesteuerte, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	27
2.10.3	Spannungsgesteuerte, native Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	27
2.10.4	Verzögerungsgele . . . . .	27
2.10.5	Sequenziergele . . . . .	28
2.10.6	Zweidimensionale Gelelektrophorese . . . . .	28
2.10.7	Silberfärbung . . . . .	28
2.11	„Northern“-Analysen . . . . .	29
2.11.1	Transfer der Nukleinsäuren auf Nylonmembranen . . . . .	29
2.11.2	Alkalische Denaturierung und Fixierung der Nukleinsäure auf der Nylonmembran . . . . .	29
2.11.3	Filterhybridisierung . . . . .	30
2.11.4	Chemolumineszenzentwicklung mit dem CDP-Star <sup>TM</sup> -System . . . . .	31
2.11.5	Autoradiographie . . . . .	32
2.12	„dot-blot“-Analysen . . . . .	32
2.13	UV-Absorptionsmessung zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren . . . . .	32
2.14	Gelaufreinigung von Nukleinsäuren . . . . .	32
2.15	Computeralgorithmen . . . . .	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1	Vergleich verschiedener experimenteller Ansätze . . . . .	34
3.1.1	Fraktionierung zellulärer RNA und Test auf eine mögliche Interaktion mit PSTVd . . . . .	34
3.1.2	Aufreinigung des Komplexes und Analyse der Komponenten . . . . .	36
3.2	Etablierung eines Aufreinigungsprotokolls . . . . .	37
3.2.1	Paramagnetische Streptavidin-Partikel . . . . .	39
3.2.2	Maskierung von PSTVd mit einer Biotin-markierten Sonde . . . . .	41
3.2.3	Einsatz paramagnetischer Streptavidin-Partikel in Schritt I der Aufreinigung: Isolation PSTVd enthaltender, <i>in vitro</i> eingestellter RNA-Komplexe aus Kartoffelsuspensionszellkulturen . . . . .	52
3.2.4	Reversion der kovalenten Psoralenvernetzung . . . . .	55
3.2.5	Einsatz paramagnetischer Streptavidin-Partikel in Schritt II . . . . .	59
3.2.6	Detektion von Wirts-RNA in den Fraktionen . . . . .	60
3.3	Isolation und Identifikation der zellulären Komponente von <i>in vitro</i> mit Psoralen verknüpften PSTVd-RNA-Komplexen . . . . .	63

3.3.1	Aufreinigung mit Biotin-markierten PSTVd- <i>in vitro</i> -Transkripten voller Länge aus vorfraktionierten <i>Lycopersicon esculentum</i> RNA-Extrakten . . . . .	63
3.3.2	Aufreinigung mit verkürzten, Biotin-markierten (-)PSTVd- <i>in vitro</i> -Transkripten aus vorfraktionierten <i>Lycopersicon esculentum</i> RNA-Extrakten . . . . .	67
3.3.3	Nachweis von 5S rRNA in den aufgereinigten Komplexen . . . . .	69
3.3.4	Aufreinigung mit Biotin-markierten PSTVd- <i>in vitro</i> -Transkripten voller Länge aus <i>Solanum demissum</i> Gesamt-RNA-Extrakten . . . . .	70
3.3.5	Direkte Wechselwirkung zwischen isoliertem PSTVd und 5S rRNA . . . . .	72
3.4	Aufreinigung von <i>in vivo</i> quervernetzten PSTVd-5S rRNA-Komplexen . . . . .	73
3.4.1	Vergleich verschiedener RNA-Extrakte aus Kartoffelsuspensionszellkulturen . . . . .	74
3.4.2	Definition der zusätzlichen Aufreinigungskriterien . . . . .	76
3.4.3	Nachweis der PSTVd-5S rRNA-Interaktion <i>in vivo</i> . . . . .	80
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>83</b>
4.1	Methodische Aspekte . . . . .	83
4.2	Theoretische Analyse der PSTVd-5S rRNA-Wechselwirkung . . . . .	85
4.2.1	Wechselwirkungen im Bereich der Oberen Zentralen Konservierten Region von PSTVd . . . . .	86
4.2.2	Die Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA <i>in vitro</i> . . . . .	87
4.2.3	Die Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA <i>in vivo</i> . . . . .	91
4.3	5S rRNA in eukaryotischen Zellen . . . . .	94
4.4	Diskussion der funktionellen Bedeutung einer Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA: Entwicklung eines Transportmodells . . . . .	96
4.5	Ausblick . . . . .	97
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> . . . . .	<b>99</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> . . . . .	<b>100</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AMT	4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CCR	Zentrale Konservierte Region
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	Zerfälle pro Minute
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngige Nukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FA	Formamid
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
HP	Hairpin
HPLC	Hochauflösende Flüssigchromatographie
ivT	<i>in vitro</i> -Transkripte
k	kilo
l	Liter
LCCR	Untere Zentrale Konservierte Region
M	molar
mA	Milliampere
min	Minuten
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
$\mu$	mikro
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nt	Nukleotid
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase Kettenreaktion

PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase
PSTVd	Potato spindle tuber viroid (Kartoffel-Spindelknollensucht Viroid)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
snoRNA	kleine nukleoläre RNA
snRNA	kleine nukleäre RNA
SRP	Signal Recognition Particle
ss	einzelsträngige Nukleinsäure
SSC	Standard saline citrat
t	Zeit
T	Thymin
TE	Tris-EDTA Puffer
T <sub>L</sub>	linke Terminale Region
T <sub>m</sub>	Übergangstemperatur
T <sub>R</sub>	rechte Terminale Region
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
u	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
U	Uracil
UCCR	Obere Zentrale Konservierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
VM-Region	Virulenzmodulierende Region
VR-Region	Variable Region
W	Watt

# Kapitel 1

## Einleitung

Viroide sind subvirale Pflanzenpathogene. Obwohl der phänomenologische Effekt einer Viroidinfektion dem einer Virusinfektion entspricht, ist der Mechanismus eines Befalls für beide Erregertypen extrem unterschiedlich. Viroide bestehen aus einer einzelsträngigen, zirkulär geschlossenen RNA von 240–400 Nukleotiden Länge, die nicht von einer Hülle umgeben ist. Es kann als gesichert angenommen werden, dass Viroide keine mRNA-Aktivität aufweisen und daher nicht zur Synthese viroid-spezifischer Proteine führen (Davies *et al.* 1974 und Semancik *et al.* 1977). Lediglich die Akkumulation allgemeiner Stress- und Pathogenabwehrproteine konnte in Pflanzen nachgewiesen werden (Sänger 1987). Demnach bedienen sich Viroide für den gesamten Infektionsvorgang wirtseigener Systeme. Die Spezifität jedes Schrittes wird durch die Wechselwirkung definierter RNA-Struktureinheiten des Viroides mit zellulären Komponenten gewährleistet. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um eine Form „molekularer Mimikry“ handelt, bei der die parasitierende RNA pflanzliche RNA-Motive imitiert, um sich erfolgreich zu verbreiten. Die auszubildenden Wechselwirkungen müssen dabei in definierter Reihenfolge durchlaufen werden. Als möglicher Koordinationsmechanismus kann hier die zeitlich begrenzte Ausprägung metastabiler Viroidkonformationen, zum Beispiel nur während der Replikation, in Betracht kommen.

In den nächsten Abschnitten dieses Kapitels soll detaillierter auf die für eine Viroidinfektion notwendigen Wechselwirkungen mit zellulären Faktoren eingegangen werden. Dabei finden insbesondere die Prozesse der Pathogenese, des systemischen Transportes sowie der Replikation und Prozessierung besondere Beachtung. Da sich die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ausschließlich auf das Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd), den bestuntersuchten und namensgebenden Vertreter der Familie der *Pospiviroidae* (Flores *et al.* 1998), beziehen, werden Eigenschaften der *Avsunviroidea* (Flores *et al.* 1998) nicht weiter diskutiert. Die *Pospiviroidae* umfassen 24 der 27 bekannten Viroidarten und sind nicht nur durch ein hohes Maß an Sequenzhomologie, sondern auch durch ein einheitliches Strukturprinzip gekennzeichnet. Das charakteristische Merkmal ist eine aus kurzen Helices und ungepaarten Abschnitten („loops“) bestehende, stäbchenförmige Sekundärstruktur (Gross *et al.* 1978, Riesner *et al.* 1979 und Steger *et al.* 1984) wie sie beispielhaft für PSTVd in Abbildung 1.1 dargestellt wird. Diese Stäbchenstruktur stellt die thermodynamisch günstigste PSTVd-Konformation dar und schützt das Viroid in der Zelle vor dem Abbau durch Nukleasen.

Sequenzvergleiche innerhalb der *Pospiviroidae* erlauben die Einteilung der Stäbchenstruktur in fünf Domänen (Keese und Symons 1985), denen nach Mutationsanalysen unterschiedliche funktionale Bedeutungen zugeordnet werden konnten. Abbildung 1.1 zeigt in der Mitte einen Bereich besonders hoher Sequenzhomologien. In dieser, als Zentrale Konservierte Region (CCR) bezeichneten Domäne, findet die Prozessierung der multimeren Replikationsintermediate zu monomeren PSTVd-Molekülen statt (Baumstark *et al.* 1997) (siehe auch Abschnitt 1.3). Sie wird in die Obere (UCCR) und Untere (LCCR) Zentrale Konservierte Region gegliedert. Im Gegensatz dazu weist die rechts von der CCR liegende Variable Region (VR-Region) ein ungewöhnlich hohes Maß an Sequenzheterogenitäten auf. Dieser Domäne konnte eine modulierende Funktion während der Viroidreplikation zugeordnet werden, da eine signifikante Stabilisierung durch gezielte Mutationen den Prozess hemmt (Hu *et al.* 1996). Die links von der Mitte liegende Virulenzmodulierende Region (VM-Region) oder auch Pathogene Region, zeigt eine direkte Korrelation zwischen hier auftretenden Punktmutationen und der Pathogenität unterschiedlicher PSTVd-Stämme (vergleiche auch 1.1). Während bestimmte Mutationen der linken Terminalen Region ( $T_L$ ) zu nicht infektiösen PSTVd-Varianten führen, können in der rechten Terminalen Region ( $T_R$ ) mutierte Viroide in der Pflanze noch repliziert, aber nicht mehr systemisch transportiert werden (Hammond 1994) (siehe auch Abschnitt 1.2).

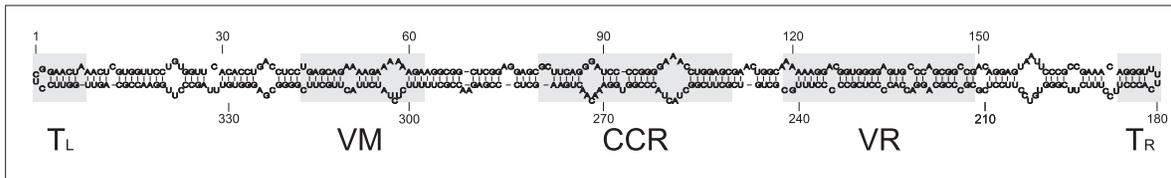


Abbildung 1.1: Primär- und Sekundärstruktur von PSTVd. Das PSTVd-Stäbchen kann in fünf Domänen unterteilt werden:  $T_L$ : linke Terminale Region, VM: Virulenzmodulierende Region, CCR: Zentrale Konservierte Region von PSTVd, sie wird in die Obere (UCCR) und Untere (LCCR) Zentrale Konservierte Region unterteilt, VR: Variable Region,  $T_R$ : rechte Terminale Region. (nach Keese und Symons 1985, geändert)

## 1.1 Pathogenität

Viroide infizieren höhere Kulturpflanzen wie Kartoffeln, Gurken, Avocados, Kokospalmen oder Zitrusfrüchte. Das Wirtsspektrum verschiedener Viroide ist variabel. So ist PSTVd neben Kartoffeln auch in anderen *Solanaceen* wie Tomate oder dem Schwarzen Nachtschatten, aber auch in weiteren Pflanzenfamilien kultivierbar. Die durch einen Befall hervorgerufenen Schäden können ein beträchtliches Ausmaß erreichen (Übersichtsartikel Riesner und Gross (1985) sowie Diener 1987). Als charakteristisches Merkmal einer Infektion ist eine Internodienstauchung der Sprossachse bis hin zum Zwergwuchs zu nennen. Als weitere Schäden treten Verkrümmungen der Blätter und Triebe, Epinastie und Chlorosen, in seltenen Fällen sogar Nekrosen bis hin zum Absterben der ganzen Pflanze auf (Diener 1979 und Sängler 1982). Darüberhinaus ist der PSTVd-Befall einer Kartoffelpflanze an den spindelförmigen Verformungen der Knollen zu erkennen, was der Krankheit auch den Namen gegeben hat.

Die Symptomintensität variiert für eine Pflanzenart mit dem Kultivar. So zeigen Tomaten-

pflanzen der Handelssorte *Rutgers* bei PSTVd Befall deutliche Wachstumsstörungen, Wildtomaten oder Tomaten der Handelssorte *Goldkugel* jedoch nicht oder nur in geringem Umfang (Axel Schmitz, mündliche Mitteilung).

Aber auch einzelne Viroidvarianten selber zeigen differentielle Pathogenitätsmuster. So konnten für PSTVd eine Reihe verschiedener Stämme nachgewiesen werden, deren Infektion zu erheblichen Unterschieden im Krankheitsbild befallener Tomatenpflanzen führt. Dementsprechend werden diese Varianten als „mild“, „intermediate“ oder „letal“ klassifiziert. Sequenzanalysen belegen, dass sich die einzelnen Stämme lediglich durch vereinzelte Mutationen innerhalb der VM-Region unterscheiden.

Obwohl Viroide bereits seit den frühen 70er Jahren bekannt sind (Diener 1971a, 1971b, Singh und Clark 1971, Sänger 1972 und Semancik und Weathers 1972) ist der pathogene Mechanismus einer Viroidinfektion bis heute weitgehend unverstanden. Die für PSTVd aufgestellten Hypothesen leiten sich von den unterschiedlichen biophysikalischen Eigenschaften der bereits angesprochenen PSTVd-Varietäten ab. Allen gemeinsam ist die Überlegung, dass der pathogene Effekt die direkte Folge einer Wechselwirkung zwischen PSTVd und Wirtsfaktoren ist. Das Ausmaß dieser Wechselwirkung bestimmt die Intensität der Symptome und wird durch die Varianz der biophysikalischen Eigenschaften determiniert.

Im Laufe der Jahre wurden eine Reihe verschiedener Pathogenitatsmodelle entwickelt (Dickson 1981, Diener 1981, Schnolzer *et al.* 1985, Jakab *et al.* 1986, Haas *et al.* 1988, Gruner *et al.* 1995), die bei genauerer Betrachtung nicht aufrecht zu erhalten, beziehungsweise experimentell nicht bestätigt werden konnten. Einer zur Zeit diskutierten Hypothese zur Folge, soll die dreidimensionale Struktur der VM-Region einzelner PSTVd-Stämme mit der Pathogenität korreliert vorliegen (Owens *et al.* 1996). Asymmetrische „loops“ bewirken bei pathogeneren Varianten ein stärkeres Abknicken der Stäbchenstruktur (Schmitz und Riesner 1998). Der Vorstellung nach soll die Bindung eines Wirtsfaktors im Bereich der VM-Region durch diese dreidimensionale Geometrie moduliert werden.

Experimentelle Hinweise legen die Vermutung nahe, dass es sich bei dem erwähnten Wirtsfaktor um das pflanzliche Homolog einer ds-RNA abhängigen Proteinkinase (PKR) aus Säugerzellen handelt (Diener *et al.* 1993, Hiddinga *et al.* 1988, Roth und He 1994). Im Säuger-System ist dieses Enzym unter anderem an der Interferon-vermittelten Virusabwehr der Zelle beteiligt.

## 1.2 Transport

Viroidinfektionen verlaufen systemisch. Nach mechanischer Inokulation ist PSTVd zunächst in der Spitze befallener Tomatenpflanzen, dann in den unterhalb der Spitze liegenden Blättern, sowie der Wurzel nachzuweisen. Blätter, die zwischen dem infizierten Bereich und der Wurzel liegen, replizieren PSTVd nicht (Palukaitis 1987). Dieser Transportweg entspricht dem von Photosyntheseprodukten über das Phloem. Daher war es nicht verwunderlich, dass PSTVd-Moleküle mit Hilfe der „tissue print“-Hybridisierung im vaskulären System nachgewiesen werden konnten (Stark-Lorenzen *et al.* 1997).

Neben dem Phloemgewebe ist PSTVd noch in Mesophyllzellen infizierter Tomatenpflanzen nachweisbar. Hier akkumuliert es zu einer Dichte von 50000 Molekülen pro Zelle. Die Replikation erfolgt im Nukleoplasma, die Ablagerung im Nukleolus, wo PSTVd gleichmäßig verteilt

vorliegt (Schumacher *et al.* 1983b, Harders *et al.* 1989). Demzufolge umfasst die systemische Infektion neben dem Langstreckentransfer auch noch den interzellulären, den intrazellulären, sowie den intranukleären Transport.

Es gilt als gesichert, dass der interzelluläre Transport über Plasmodesmata erfolgt (Ding *et al.* 1997). Dabei wird, ebenso wie für den Phloemtransport, eine Wechselwirkung zwischen einem zellulären Faktor und einem auf der PSTVd-RNA liegenden Strukturmotiv diskutiert. Die Identifizierung eines an beiden Vorgängen beteiligten Proteins steht kurz bevor (Owens, pers. Mitteilung).

Untersuchungen an permeabilisierten Tabak-Protoplasten belegen, dass der PSTVd-Import in den Zellkern GTP-unabhängig, mit Hilfe eines absättigbaren, zellulären Rezeptors erfolgt (Woo *et al.* 1999).

Die im Kernplasma neu synthetisierten Viroide werden als multimere Replikationsintermediate (Harders *et al.* 1989) oder als fertig prozessierte Moleküle (Woo *et al.* 1999) in den Nukleolus transportiert, wo die reifen Moleküle akkumulieren. Wie von hier aus die Ausbreitung in die Nachbarzelle erfolgt, ist unverständlich. Entweder werden sie gezielt in das Zytoplasma transportiert, oder sie werden im Pflanzenmeristem während der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben.

Auch wenn eine genaue Zuordnung zu einem der aufgeführten Schritte noch nicht möglich ist, belegen Mutationsanalysen die Beteiligung der rechten Terminalen Region von PSTVd an systemischen Transportprozessen. Derartige Mutanten können nur nach *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Inokulation Tomatenpflanzen befallen. Ihre Replikation im Bereich der Wundgalle sowie der Wurzeln ist weitgehend unbeeinträchtigt. Eine Ausbreitung im Blatt-Gewebe unterbleibt jedoch (Hammond 1994). Die Autorin der zitierten Veröffentlichung spekuliert daher, dass es eine oder mehrere zelluläre Komponenten geben muss, die mit der T<sub>L</sub>-Region von PSTVd wechselwirken und damit den Langstrecken- oder interzellulären Transport von PSTVd ermöglichen.

### 1.3 Replikation und Prozessierung

Die Replikation der *Pospiviroidae* erfolgt im Kernplasma infizierter Zellen über einen asymmetrischen „rolling circle“ Mechanismus (Branch und Robertson 1984, Branch *et al.* 1988). Hierbei dient der monomere, zirkulär geschlossene (+)Strang zunächst als Matrize für einen multimeren, linearen (-)Strang, der seinerseits die Vorlage für die Synthese multimerer, linearer (+)Strang-Moleküle darstellt (siehe auch Abbildung 1.2). In einer Prozessierungsreaktion wird nur dieser zuletzt transkribierte, oligomere (+)Strang in Monomere geschnitten, die zu reifen Zirkeln ligiert werden. Beide Transkriptionsreaktionen werden von der zellulären DNA-abhängigen RNA-Polymerase II durchgeführt (Mühlbach und Sängler 1979, Rackwitz *et al.* 1981, Goodman *et al.* 1984, Schindler und Mühlbach 1992).

Für die Transkription des zirkulären (+)Stranges in multimere, lineare (-)Stränge konnten mit den Nukleotiden A<sub>111</sub> und A<sub>325</sub> zwei Replikationsstartstellen ermittelt werden (Fels 1997). Als Promotorelemente werden in der Nachbarschaft liegende, GC-reiche Sequenzen diskutiert (Heinrich 1991, Fels 1997). Deren helicale Struktur soll den GC-reichen dsDNA Bereichen ähneln, welche der Polymerase II als Promotoren dienen können und für die Re-

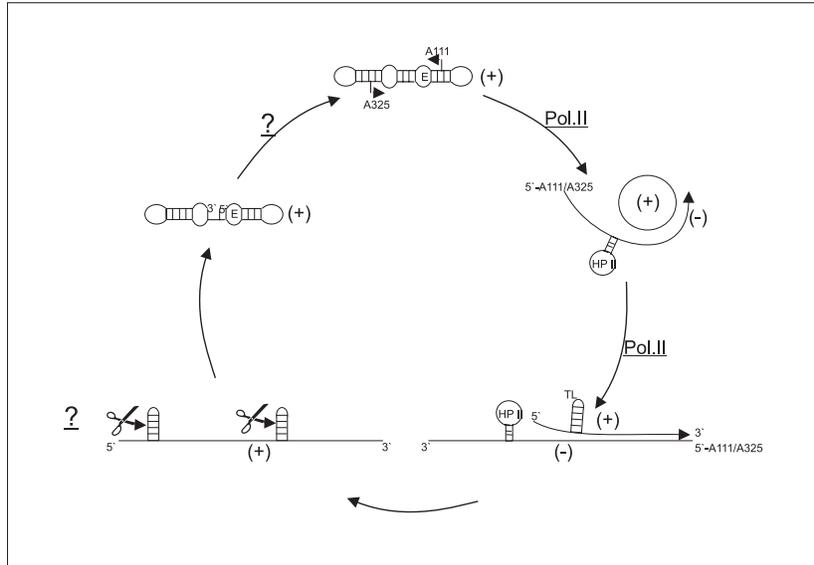


Abbildung 1.2: Replikationszyklus von PSTVd. Schematische Darstellung des „rolling circle“ Mechanismus. Die für die Erkennung durch die Wirtsfaktoren notwendigen PSTVd-Struktur motive werden wiedergegeben. Pol. II: DNA-abhängige RNA-Polymerase II, HP II: Hairpin II, TL: Tetraloop, E: Loop E.

gulation konstitutiv exprimierter „house-keeping“ Gene eukaryotischer Zellen verantwortlich sind (Heinemann *et al.* 1987).

Als Promotorelement für den Transkriptionsschritt von (-) nach (+) wird der sogenannte Hairpin II diskutiert (Loss *et al.* 1991, Qu *et al.* 1993). Dieser entsteht während der Synthese multimerer (-)Transkripte als metastabiles Strukturelement (siehe auch Abbildung 1.3), und seine Existenz konnte *in vivo* nachgewiesen werden (Schröder 1998). Die Sequenz der Hairpin II-Helix weist ebenfalls eine starke Homologie zu den bereits erwähnten Transkriptionsfaktor-Bindestellen konstitutiv exprimierter Gene auf.

Die Prozessierung der multimeren (+)Strang Intermediate erfolgt in zwei Stufen. In jeder ist die Viroid-RNA durch spezifische Struktur motive gekennzeichnet und erlaubt so die notwendigen Wechselwirkungen mit Wirtsfaktoren zum richtigen Zeitpunkt (Baumstark und Riesner 1995, Baumstark *et al.* 1997). Zunächst schneidet eine zelluläre Endonuklease das Transkript im Bereich der Zentralen Konservierten Region von PSTVd, zwischen den Nukleotiden G<sub>95</sub> und G<sub>96</sub> (Abbildung 1.3). Als Erkennungsmotiv für das Enzym wird ein GAAA-Tetraloop mit einem GU Basenpaar diskutiert, der nur als metastabiles Replikationsintermediat gebildet wird. Nach dem Schnitt lagert sich das PSTVd-Molekül so um, dass die neuen Molekülenenden in stabilen Helixbereichen dicht beieinander liegen und direkt durch eine Ligase verbunden werden können. Als charakteristisches RNA-Struktur motiv und Erkennungselement des Wirtsenzymes wird hier der Loop E betrachtet, der auch in der nativen Stäbchenstruktur vorhanden ist.

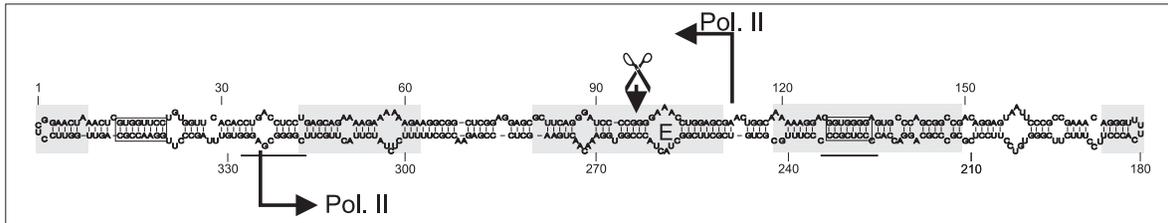


Abbildung 1.3: Replikationsstartstellen, Promotorelemente und Prozessierungsposition von PSTVd. Die Nukleotide A<sub>111</sub> und A<sub>325</sub> sind als Startstellen der Polymerase II abhängigen Replikation gekennzeichnet. Die GC-reichen Sequenzen wurden eingerahmt, die dem Hairpin II entsprechenden Nukleotide der (+)PSTVd-Sequenz unterstrichen. Die Schere symbolisiert die Prozessierungsposition. E: Loop E.

## 1.4 Wechselwirkungen mit weiteren Wirtsfaktoren

Im Laufe der Viroidforschung der letzten 15–20 Jahre wurden eine Reihe weiterer PSTVd-Wechselwirkungspartner nachgewiesen oder postuliert. Entweder blieb ihre funktionale Relevanz für eine Viroidinfektion jedoch ungeklärt, oder die Existenz einer Wechselwirkung konnte noch nicht ausreichend belegt werden.

### 1.4.1 Wechselwirkungen mit Proteinen

In den Nukleoli infizierter Tomatenpflanzen liegt PSTVd an Proteine assoziiert vor (Schumacher *et al.* 1983a, Wolff *et al.* 1985). *In situ* konnten solche Komplexe durch UV-Bestrahlung kovalent verknüpft werden und die *in vitro* Rekonstitution erlaubte die Analyse der an dem Komplex beteiligten Komponenten (Klaff *et al.* 1989). Das dominanteste Protein mit der auffälligsten Viroid-Affinität war ein 43 kDa Glycoprotein mit mannosehaltiger Zuckerkette (Klaff *et al.* 1989, Gruner 1992). Die Sequenzen zweier kurzer Aminosäureketten dieses Proteins zeigen eine starke Homologie zu dem Linkerhiston H1 aus Tomate. Im SDS-Gel weist dieses jedoch ein apparentes Molekulargewicht von 38 kDa auf (Riggs 1994), das nicht mit dem ebenfalls in einem SDS-Gel ermittelten Molekulargewicht des 43 kDa Proteins übereinstimmt. Daher steht eine endgültige Identifizierung des 43 kDa Proteins noch aus.

Bei der Suche nach Viroid-bindenden Proteinen in cDNA-Expressionsbanken aus Tomate wurden eine Reihe von Klonen identifiziert, deren Expressionsprodukte eine signifikante Bindungsaffinität zu PSTVd aufweisen. Aber bis auf das ribosomale Protein L25 konnten sie bisher entweder nicht identifiziert werden, oder eine Wechselwirkung mit PSTVd erscheint biologisch nicht sinnvoll (Werner *et al.* 1993, Werner *et al.* 1995, Sägeser *et al.* 1997).

Neueren Untersuchungen zur Folge konnte eine spezifische Proteinkinase identifiziert werden, deren Transkription nur in mit PSTVd infizierten Pflanzen erfolgt. Die mRNA-Konzentration in der Zelle steigt dabei mit der Pathogenität des infizierenden PSTVd-Stamms an. Dieses als PKV (Protein Kinase Viroid-induziert) bezeichnete Enzym weist ein Molekulargewicht von 55 kDa auf. Da das Protein über keinerlei Bindedomänen für dsRNA verfügt, wird davon ausgegangen, dass seine Aktivierung nicht durch eine direkte Wechselwirkung mit PSTVd reguliert wird (Hammond und Zhao 2000).

## 1.4.2 Wechselwirkung mit zellulärer RNA

PSTVd repliziert und akkumuliert in den Kernen infizierter Zellen. Die Fülle der hier funktional aktiven RNAs legte die Vermutung nahe, dass PSTVd eine Wechselwirkung mit einer dieser RNAs ausbildet. Als besonders vielversprechende Partner wurden dabei sowohl die im Kernplasma lokalisierten snRNAs, als auch nukleoläre rRNAs und snoRNAs betrachtet. Jüngere Erkenntnisse belegen zudem, dass der Nukleolus nicht nur Ort der rRNA-Transkription und Prozessierung, sowie der Assemblierung ribosomaler Untereinheiten ist. Vielmehr durchlaufen eine Reihe anderer, an Ribonukleoprotein-Partikeln beteiligter RNAs, ebenfalls eine Reifungsphase im Nukleolus (Pederson 1998), und kämen somit ebenfalls als Wechselwirkungspartner in Betracht.

### 1.4.2.1 Datenbanksuchen nach Viroid-komplementären RNA-Sequenzen

Datenbanksuchen erlauben die Identifikation zellulärer RNAs mit partiellen Sequenzkomplementaritäten oder Homologien zu PSTVd.

Bereits 1981 wurde eine Sequenzhomologie zwischen der (-)Sequenz von PSTVd und dem 5'-Ende der snRNA U1 beschrieben (Dickson 1981, Diener 1981). Da dieser Bereich der snRNA U1 die Erkennung der 5'-Spleißstelle von prä-mRNAs vermittelt, wurden zwei Hypothesen abgeleitet. Zum Einen wurde vermutet, dass es sich bei Viroiden um ehemalige Intronsequenzen handelt (Diener 1981). Zum Anderen wurde ein Pathogenesemodell aufgestellt, bei dem das zirkuläre PSTVd (+)Strang-Molekül als snRNA U1-Kompetitor das mRNA-Spleißen der Wirtszelle behindert (Dickson 1981). Es sind jedoch bis heute keine experimentellen Daten veröffentlicht worden, die eine solche Wechselwirkung belegen.

Die snoRNA U3 bindet im Nukleolus an präribosomale RNA und ist an ihrer Prozessierung beteiligt. Außerdem weist sie eine Sequenzhomologie zu PSTVd auf (Kiss *et al.* 1983, Schumacher *et al.* 1983a). Eine Hypothese, nach der die Konkurrenz um die präribosomale Bindestelle zwischen PSTVd und snoRNA U3 die Reifung der rRNAs beeinträchtigt (Jakab *et al.* 1986) konnte zwischenzeitlich widerlegt werden. Die rRNA-Prozessierung gesunder und infizierter Tomatenpflanzen weist keinen Unterschied auf (Thiel 1990).

Im Bereich der unteren VM-Region weist PSTVd eine Sequenzkomplementarität zu der 7S RNA aus Signal Recognition Particles (SRP) der Tomatenpflanze auf (Haas *et al.* 1988). Durch eine Bindung an die 7S RNA wäre die Bildung funktionsfähiger SRPs beeinträchtigt und somit die Translokation sekretorischer oder membrangebundener Proteine über das Endoplasmatische Retikulum gestört (Haas *et al.* 1988). Hybridisierungsexperimente und thermodynamische Berechnungen zeigten jedoch, dass eine solche Wechselwirkung *in vitro* nicht möglich ist (Gruner 1992). Dies schließt einen Kontakt *in vivo* unter Mitwirkung enzymatischer Aktivitäten jedoch nicht aus. Diese Möglichkeit erschien lange Zeit unwahrscheinlich, da PSTVd im Nukleolus lokalisiert ist, SRPs aber im Zytoplasma. Erst der Nachweis, dass 7S RNA aus dem Kern in den Nukleolus transportiert (Jacobson und Pederson 1998, Pederson 1999), und hier mit einem Teil der SRP-Proteine assembliert wird (Politz *et al.* 2000), macht diese Hypothese wieder attraktiver.

Der erste experimentelle Nachweis einer Wechselwirkung zwischen PSTVd und zellulärer RNA wurde 1990 erbracht. Filterhybridisierungsexperimente bestätigten dass sowohl (+) als

auch (-)PSTVd-Moleküle an maturierte 18S und 25S rRNA aus Tomate binden können (Thiel 1990). Thermodynamische Berechnungen eines Komplexes zwischen dem linken Ende von PSTVd und einer 25S rRNA Teilsequenz bestätigten, dass ein Hybrid stabiler ist als beide Einzelstrukturen (Gruner 1992). Ein Pathogenesemodell, nach dem die Ribosomenassemblierung durch eine solche Wechselwirkung *in vivo* gestört ist, konnte jedoch widerlegt werden (Thiel 1999). Es zeigte sich, dass weder die Nettosynthese noch die Ribosomenassemblierung oder die Stabilität der Ribosomen durch eine Viroidinfektion signifikant beeinträchtigt wurden.

#### 1.4.2.2 Kovalente Fixierung einer PSTVd-RNA Wechselwirkung mit Psoralen

In einem anderen Ansatz sollten *in vivo* vorliegende Wechselwirkungen zwischen PSTVd und zellulärer RNA fixiert, und damit einem Nachweis zugänglich gemacht werden. Mit Hilfe des Psoralenderivates 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (AMT) wurde RNA in PSTVd infizierten Tomatenzellkernen (Gruner 1992) und Protoplasten aus Kartoffelsuspensionszellkulturen (Thiel 1999) kovalent quervernetzt.

Psoralene sind planare, trizyklische Furocumarine, die nach Absorption von Lichtquanten doppelsträngige Nukleinsäuren chemisch verknüpfen können. Dazu interkaliert das Psoralen in die Doppelhelix. Liegt es direkt neben einer Pyrimidinbase, kann durch Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (320–380 nm) ein Zyklobutanring zwischen dem Nukleotid und dem Psoralen-Molekül ausgebildet werden. Ein solches Monoaddukt kann sowohl an der Furan-, als auch an der Pyronseite des Psoralens entstehen. Aber nur, wenn auch die jeweilig andere Seite des Psoralens einer Pyrimidinbase benachbart ist, können beide Nukleinsäurestränge durch Absorption eines zweiten Photons kovalent quervernetzt werden (Lipson und Hearst 1988) (Abbildung 1.4). Der komplette Vorgang ist dabei stark ionenabhängig (Hyde und Hearst 1978).

Der beschriebene Ablauf ist reversibel. In einer als Photoreversion bezeichneten Reaktion, wird das entstandene Pyrimidin-Psoralen-Pyrimidin-Diaddukt durch Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht von 254 nm Wellenlänge wieder aufgelöst (Abbildung 1.4, Teil A)).

Psoralene diffundieren über Zellmembranen, können durch die Kernporen in Zellkerne eindringen und die meisten biologischen Strukturen durchdringen (Cimino *et al.* 1985). Sie weisen damit optimale Eigenschaften für eine Quervernetzung interagierender Nukleinsäuren *in situ* oder *in vivo* auf. Neben der erfolgreichen Verknüpfung in Zellkernen (Gruner 1992) und Protoplasten (Thiel 1999) konnte Psoralenquervernetzungen auch in Tabak-Blättern durchgeführt werden (Habibi und Kaper 1981). In allen Fällen wird das präparierte Gewebe, bzw. die Zellkerne, in einen Psoralen-haltigen Puffer überführt und für eine angemessene Zeit inkubiert. Im Anschluss an eine UV-abhängige Quervernetzung kann die Nukleinsäure isoliert und analysiert werden.

Die Untersuchungen an PSTVd-infizierten Tomatenpflanzen und Kartoffelsuspensionszellkulturen zeigten in Viroid-spezifischen „Northern“-Analysen eine Psoralen-abhängige Verzögerung der PSTVd-Signale. Diese wurden als Komplexe aus PSTVd und einer zellulären RNA interpretiert. Ersten Abschätzungen zur Folge sollten 15 % der PSTVd-RNA in der Zelle an Wirtsnukleinsäuren komplexiert vorliegen (Gruner 1992). Dies erwies sich jedoch als zu optimistisch. Analysen quervernetzter PSTVd-RNA aus Kartoffelzellen belegten eine starke, nicht reproduzierbare Schwankung im Ausmaß der erfolgreich durchgeführten Verknüpfungen (Thiel

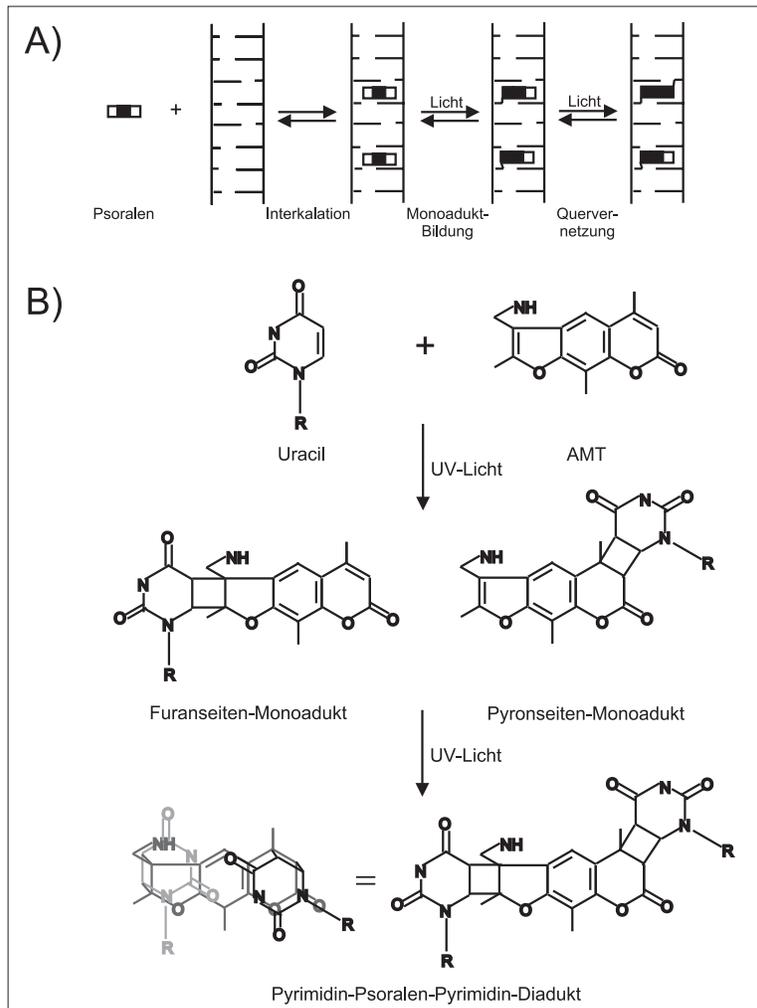


Abbildung 1.4: A) Schematische Darstellung der dreistufigen Reaktion einer durch Psoralen induzierten Quervernetzung doppelsträngiger Nucleinsäuren. B) Reaktionsmechanismus der Quervernetzung von 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (AMT) mit Pyrimidinbasen am Beispiel des Uracil. Unten links ist die sterische Anordnung des Diadduktes im RNA-Molekül dargestellt (nach Lipson und Hearst 1988).

1999). Daher wurde mit der Primer Extension-Analyse ein sensitiveres Nachweisverfahren entwickelt. Bei der Reversen Transkription kommt es an quervernetzten Nucleotiden zu einem vollständigen Abbruch der Reaktion. Neben dem eigentlichen Nachweis einer Quervernetzung, lässt sich auf diese Weise auch die genaue Position der kovalenten Verknüpfung ermitteln.

Bei einem solchen Vorgehen ist es entscheidend, dass man Quervernetzungen von PSTVd mit einer zellulären RNA von anderen Abbruchsignalen unterscheiden kann. Daher war es notwendig die Abbruchmuster mit denen aus Kontrollproben zu vergleichen. Zunächst einmal wurden die Viroid-internen Primer Extension Signale anhand eines entsprechenden RNA-Extraktes ohne Psoralen-Quervernetzung ermittelt. Zusätzlich wurden *in vitro*, d.h. durch thermische Denaturierung und langsame Renaturierung, alle thermodynamisch möglichen Komplexe aus

PSTVd-Molekülen sowie aus Hybriden von (+) und (-)PSTVd-Dimertranskripten eingestellt und mit Psoralen quervernetzt. Multimere Hybride aus PSTVd-Strängen mit (+) und (-)Sequenz entstehen als Intermediate während der PSTVd-Replikation. Signale, die nur in den Psoralen behandelten RNA-Extrakten nachzuweisen waren, wurden als Interaktionspunkte der PSTVd-RNA zu einer zellulären RNA gewertet.

Die Etablierung dieses Nachweissystems war anhand von *in vitro* eingestellten und quervernetzten RNA-Proben aus PSTVd infizierten Kartoffelsuspensionszellkulturen erfolgt. Als Kontaktstellen zu einer Wirts-RNA konnten hierbei die Nukleotide U<sub>43</sub>, U<sub>83</sub> und U<sub>90</sub> ermittelt werden. Primer Extension Abbrüche an den Positionen C<sub>193</sub> und C<sub>203</sub> waren nicht eindeutig als intermolekulare Quervernetzungen interpretierbar. Während U<sub>43</sub> im Bereich der Pathogenen Region lokalisiert ist, liegen U<sub>83</sub> und U<sub>90</sub> in der Oberen Zentralen Konservierten Region von PSTVd. Die Positionen C<sub>193</sub> und C<sub>203</sub> befinden sich am rechten Stäbchenenden (vergl. Abbildung 1.5).

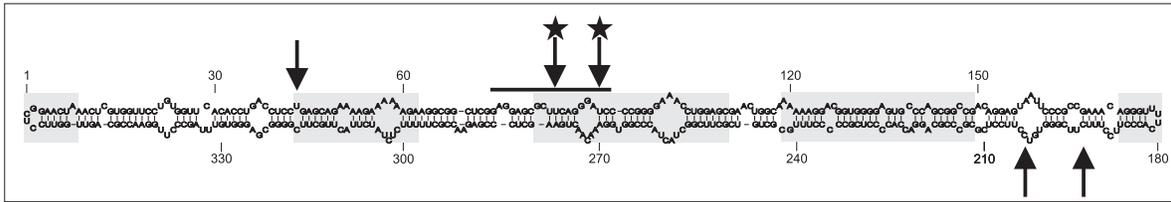


Abbildung 1.5: Quervernetzungspositionen von PSTVd zu zellulärer RNA. Die mit Pfeil gekennzeichneten Positionen konnten nach *in vitro* Komplexeinstellung ermittelt werden. Die zusätzlich mit Stern gekennzeichneten Interaktionspunkte konnten *in vivo* bestätigt werden. Die Sequenz eines zur Charakterisierung der zellulären RNA verwendeten, radioaktiv markierten Oligonukleotides wurde mit der durchgezogenen Linie markiert.

Die Komplexeinstellung *in vitro* erlaubt die Quervernetzung aller thermodynamisch möglicher Nukleinsäurehybride, ohne Berücksichtigung ihrer biologischen Relevanz. Die Quervernetzung *in vivo* dagegen fixiert diejenigen Wechselwirkungen, die zum Zeitpunkt der Behandlung in der Zelle vorliegen. Bei der Analyse *in vivo* quervernetzter RNA aus PSTVd infizierten Kartoffelzellen wurden die Interaktionspositionen U<sub>83</sub> und U<sub>90</sub> als biologisch relevant bestätigt.

Die erste Charakterisierung einer zellulären RNA, die in der UCCR eine Wechselwirkung mit PSTVd ausbilden kann, erfolgte mit Hilfe eines radioaktiv markierten Oligonukleotides. Dessen Sequenz entsprach dem vorhergesagten Kontaktbereich und schloss die Nukleotide U<sub>83</sub> und U<sub>90</sub> mit ein (siehe auch Abbildung 1.5). Nach Hybridisierung an einen RNA-Extrakt aus gesunden Kartoffelzellen zeigte die im Anschluss an die Psoralen-Verknüpfung durchgeführte Gelanalyse zwei besonders markierte Fragmente. Diese weisen eine Länge von 140 und 150 Nukleotiden auf. Ob es sich dabei um zwei verschiedene RNAs handelt, oder um die gleiche RNA, die in zwei unterschiedlichen Konformationen quervernetzt wurde, bleibt ungeklärt. Als gesichert kann jedoch angenommen werden, dass mindestens eine zelluläre RNA mit einer Länge von unter 150 Nukleotiden existiert, die mit Hilfe von Psoralen kovalent an die UCCR von PSTVd komplexiert werden kann.

Da PSTVd im Nukleolus akkumuliert und die Länge der hier lokalisierten snoRNAs mit der ermittelten Größe übereinstimmt, wurde diskutiert, dass es sich bei dem zellulären Wechselwirkungspartner von PSTVd um eine snoRNA handelt. Diese sind sowohl an der Prozessierung

als auch an der Modifizierung ribosomaler RNAs beteiligt. Da die Wechselwirkungsposition im Bereich der Zentralen Konservierten Region lag, und hier ebenfalls die Prozessierung der multimeren (+)Strang-Replikationsintermediate von PSTVd erfolgt, wurde ein funktionaler Zusammenhang zwischen der PSTVd-Prozessierung und der Wechselwirkung mit dieser RNA vermutet. Datenbankrecherchen belegten die Existenz einer snoRNA mit Sequenzkomplementaritäten zum Bereich der UCCR. Dabei handelt es sich um die menschliche snoRNA U71a (Thiel 1999).

## 1.5 Aufgabenstellung

Da Viroide keine Translationsaktivität aufweisen, durchlaufen sie während des Infektionsvorgangs eine Reihe hoch spezifischer Wechselwirkungen mit zellulären Faktoren. Erst die Ausprägung eines solchen Kontakts ermöglicht es dem Viroid sich systemisch in der befallenen Pflanze auszubreiten, zu replizieren, im Nukleolus zu akkumulieren und eine pathogene Reaktion in der Pflanze hervorzurufen. Als Wechselwirkungspartner kommen dabei sowohl Proteine als auch Nukleinsäuren in Betracht. Die Lokalisation von PSTVd im Zellkern bzw. Nukleolus, und die Vielzahl der hier funktional aktiven RNAs, ließen eine PSTVd-zelluläre RNA-Wechselwirkung wahrscheinlich erscheinen. Daher wurde ein System etabliert, das die *in vivo* Verknüpfung im Zellkern vorliegender RNA-Komplexe ermöglicht.

Grundlage der vorliegenden Arbeit war der auf diesem System basierende, experimentelle Nachweis einer Psoralen-abhängigen Quervernetzung der Oberen Zentralen Konservierten Region von PSTVd mit mindestens einer zellulären RNA. Diese wies eine Länge von weniger als 150 Nukleotiden auf.

Das Ziel der durchzuführenden Untersuchungen bestand in der Isolation und Identifizierung dieser RNA.

Dazu war es zunächst notwendig eine geeignete Aufreinigungsstrategie zu etablieren. Da lediglich bekannt war, dass es sich um eine kurze RNA mit einer partiellen Sequenzkomplementarität zu PSTVd handelt, musste sich das zu entwickelnde Protokoll die Fähigkeit dieser RNA zunutze machen, Psoralen-quervernetzbare Komplexe mit PSTVd auszubilden. Zwei experimentelle Ansätze standen dafür zu Verfügung:

1. RNA-Extrakte werden aus PSTVd-Wirtspflanzen isoliert und mit Hilfe gängiger Chromatographietechniken fraktioniert. Die erhaltenen Proben werden auf ihre Interaktionsfähigkeit mit PSTVd hin untersucht. Fraktionen in denen eine RNA nachgewiesen werden konnte, die nach *in vitro*-Komplexeinstellung an PSTVd quervernetzt werden konnte, werden weiteren Aufreinigungsschritten unterworfen. Dies wird so oft wiederholt, bis die Isolation der gesuchten RNA eine Sequenzierung erlaubt. An dem *in vitro*-System gewonnene Erkenntnisse müssten in einem *in vivo*-System auf ihre biologische Relevanz überprüft werden.
2. Zunächst erfolgt eine Aufreinigung quervernetzter Viroidkomplexe über eine PSTVd-Affinitätschromatographie. Nach Reversion der kovalenten Verknüpfung werden die PSTVd-Moleküle in einer zweiten Chromatographie abgetrennt, und die isolierte zelluläre RNA kann der Sequenzierung zugeführt werden. Als geeignetes chromatographi-

sches Aufreinigungsverfahren bot sich eine über Biotin vermittelte Bindung an paramagnetische Streptavidinpartikel an. Die Markierung der quervernetzten Viroidmoleküle mit Biotin erfolgt durch Hybridisierung an eine geeignete, biotinylierte Sonde. Dieses Verfahren kann sowohl für die Isolation *in vitro* als auch *in vivo* quervernetzter PSTVd-Komplexe angewendet werden.

Das für die gestellten Anforderungen geeignetere Aufreinigungsprinzip sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt und für die Aufreinigung der gesuchten RNA optimiert werden. Da die funktionelle Bedeutung dieser Wechselwirkung erst verstanden werden kann, wenn die beteiligte zelluläre RNA bekannt ist, war es das Ziel dieser Optimierungen, die RNA in so reiner Form zu erhalten, dass eine Identifizierung möglich ist.

Die an die Aufreinigung anschließende experimentelle Vorgehensweise würde in starkem Maße von der Menge der aufgereinigten RNA abhängen. Neben einer direkten RNA-Sequenzierung käme hier die Sequenzierung nach Klonierung oder PCR-Amplifikation in Betracht. Eine Datenbanksuche kann dann die eigentliche Identifizierung der RNA ermöglichen und erlaubt es, die Bedeutung der nachgewiesenen Interaktion im Rahmen der Viroid-Biologie zu diskutieren.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

Die in diesem Kapitel aufgeführten Methoden entsprechen in der dargestellten Form den in Kapitel 3 genannten Standardbedingungen. Abweichungen werden im Text extra erwähnt.

### 2.1 Allgemeines zu Chemikalien und Puffern

Alle nicht anders gekennzeichneten Chemikalien wurden von gängigen Herstellern bezogen und mit dem Reinheitsgrad *p. a.* verwendet. Wässrige Lösungen wurden mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Millipore-Waters GmbH) angesetzt und wenn möglich 20 min bei 120°C und 3 bar autoklaviert. Alternativ wurden nicht autoklavierbare Lösungen über einen 1,2 µm Membranfilter gegeben und sterilisiert.

Verwendetes Phenol wurde mit autoklaviertem Wasser gesättigt und auf 0.1% Hydroxichinolin eingestellt (Maniatis *et al.* 1982). Das Psoralenderivat 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (AMT) wurde von der Firma HRI Research, Inc., Concord (CA), USA bezogen. Produkte des Digoxigenin-Systems sowie Biotin-16-uridin-5'-triphosphat lieferte die Firma Roche (Mannheim). Das Chemolumineszenz Substrat CDP-Star<sup>TM</sup> stammte von der Firma Tropix, Inc., Massachusetts, USA. Paramagnetische Streptavidinpartikel, im Folgenden auch „Dynabeads“ genannt, wurden von der Firma Dynal GmbH, Hamburg bezogen.

### 2.2 Standardpuffer und Lösungen

PLS	10 mM	Kaliumphosphat pH 7.2
	20 mM	Natriumchlorid
10× TBE	890 mM	Tris pH 8.0
	890 mM	Borsäure
	25 mM	EDTA

TE	10 mM	Tris-HCl, pH 7.5
	1 mM	EDTA
10× TNE	500 mM	Tris-HCl, pH 8.0
	1M	NaCl
	10 mM	EDTA
20× SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Trinatriumcitrat
		pH 7,0 mit HCl einstellen

## 2.3 Nukleinsäuren

### 2.3.1 Plasmide

Zur Synthese von PSTVd-*in vitro*-Transkripten wurden pRH T7-Transkriptionsplasmide verwendet (Hecker 1989). Hierbei handelt es sich um Derivate des Vektors pBR 322, die im Anschluss an ein T7-Promotorelement PSTVd-Sequenzen verschiedener Länge und Orientierung tragen. Run-off-Transkripte weisen klonierungsbedingt neben der PSTVd-Sequenz noch 9 zusätzliche Nukleotide auf.

Plasmid	Orientierung und Länge	Sequenzbereich (5' → 3')	PSTVd-Stamm
pRH 713	(+)-Monomer	282–359/1–281	intermediate
pRH 714	(-)-Monomer	281–1/359–282	intermediate
pRH 716	(-)-Monomer	146–1/359–147	intermediate
pRH 717	(+)-Dimer	282–359/1–359/1–281	intermediate

Aufgereinigte und linearisierte Plasmide wurden freundlicherweise von Herrn Bernd Esters zur Verfügung gestellt.

### 2.3.2 Vorfraktionierter RNA-Extrakt aus *Lycopersicon esculentum* Blattgewebe und HPLC aufgereinigtes PSTVd

Vorfraktionierte RNA aus PSTVd-infizierten Tomatenpflanzen der Handelssorte *Rutgers* wurden von Herrn Bernd Esters nach der in Riesner *et al.* 1987 beschriebenen Methode präpariert. Im Anschluss an die Isolation der Gesamt-RNA wurden niedermolekulare RNAs durch Einstellen der Lösung auf 2 M LiCl und einstündige Inkubation auf Eis gefällt. Nach einer Zentrifugation bei 5000 rpm für 15 Minuten (Minifuge, Heraeus, Osterode) wurden die resuspendierten Nukleinsäuren mit DNase I behandelt, Phenol-Chloroform extrahiert und anschließend mit PEG präzipitiert. Dazu wurde die Probe auf 10 % PEG 6000 und 0.5 M NaCl eingestellt, 1 Stunde auf Eis inkubiert und zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen, der Überstand durch Zugabe von 3 Volumen Ethanol erneut gefällt, in TE-Puffer gelöst und bei

-20 °C gelagert. Dieser, durch differentielle Präzipitation vorfraktionierte, RNA-Extrakt kam während der Etablierung des „Dynabeads“ -Aufreinigungssystems mehrfach zum Einsatz.

Darüberhinaus konnte aus diesem Material durch HPLC an einem schwachen Anionenaustauscher PSTVd in einer hochreinen Fraktion isoliert werden. Auch solche Proben wurden von Herrn Bernd Esters zur Verfügung gestellt.

### 2.3.3 Genomische DNA

Genomische DNA aus dem Blattgewebe von Tomatenpflanzen der Handelssorte *Rutgers* wurde von Herrn Axel Schmitz nach einer von Schumacher 1984 beschriebenen und anschließend leicht modifizierten Methode präpariert. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit für die Amplifikation von (-)5S rRNA-Transkriptionsmatrizen benötigt.

### 2.3.4 PSTVd-Minimalkonstrukt

Im Laufe dieser Arbeit war es notwendig, zelluläre RNAs mit einer partiellen Sequenzkomplementarität zu (+)PSTVd von Viroiden mit (-)Strang-Sequenz in einem (-)PSTVd-spezifischen Nachweis zu unterscheiden. Zur Etablierung ausreichend stringenter „Northern“-Hybridisierungsbedingungen, wurde das in Schrader 1996 beschriebene PSTVd-Minimalkonstrukt verwendet, das freundlicherweise von Frau Nadine Kolonko zur Verfügung gestellt wurde.

### 2.3.5 Oligonukleotide

Das Oligoribonukleotid In2, das in geleluierter Form von Herrn Axel Schmitz übernommen wurde, diente der Optimierung von „Northern“-Hybridisierungsbedingungen im Rahmen eines PSTVd-spezifischen Nachweises (siehe auch Abschnitt 2.3.4).

#### In2

Beschreibung: Umfasst Nukleotide 298–319 der (+)PSTVd-Sequenz intermediate  
Sequenz: 5' GGCCGGCCUUUCUCAUCUUACUUGCUUCGCGGCGCC 3'  
Besonderheit: GC-Klammer an den Enden

Für Primer Extension-Analysen *in vitro* quervernetzter Komplexe aus dimeren (+)PSTVd-*in vitro*-Transkripten oder nicht voreingestellter Komplexe aus geleluierter PSTVd wurden zwei DNA-Oligonukleotide verwendet. Die gleichen Oligonukleotide wurden in entsprechende Sequenzierungsreaktionen eingesetzt. Dies erlaubte die Zuordnung einzelner Abbruchpositionen zu definierten Nukleotiden der PSTVd-Sequenz. Das Oligonukleotid TB 1 wurde von der Firma Interactiva Biotechnologie GmbH (Ulm) in HPLC-aufgereinigter Form bezogen. Frau Viola Thiel stellte gelaufgereinigtes Oligonukleotid RGV 5 zur Verfügung.

#### RGV 5

Beschreibung: Umfasst Nukleotide 208–178 der (-)PSTVd-Sequenz  
Sequenz: 5' GGAAGGACACCCAAGAAAGGAAGGGTCAAAA 3'

### TB 1

Beschreibung: Umfasst Nukleotide 171–174 der (–)PSTVd-Sequenz  
Sequenz: 5' TTTCGGCGGGAATTACTCCTGTCCG 3'

Durch Polymerase Kettenreaktion amplifizierte DNA-Fragmente dienten als Matrize für *in vitro*-Transkriptionen von Digoxigenin-markierten, 5S rRNA-spezifischen „Northern“-Sonden. Die Amplifikation erfolgte aus genomischer DNA, als Primer kamen die DNA-Oligonukleotide Le5S 2 und Le5St7bglII zum Einsatz.

### Le5S 2

Beschreibung: Umfasst Nukleotide 1–20 der 5S rRNA-Sequenz  
Sequenz: 5' GGATGCGATCATACCAGCAC 3'

### Le5St7bglII

Beschreibung: Umfasst Nukleotide 2–21 der invertierten 5S rRNA-Sequenz  
Sequenz: 5' GCGCCAGATCTTAATACGACTCACTATAGGGATGCAACAG-  
AGGACT 3'  
Besonderheit: Enthält sowohl T7-Promotorelement als auch eine Schnittstelle der Restriktionsendonuklease Bgl II

## 2.4 Zellmaterial

### 2.4.1 Tomatenpflanzen

RNA wurde aus Blattgewebe von PSTVd-infizierten Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum*) der Handelssorte *Rutgers* isoliert. Die Pflanzen wuchsen im Gewächshaus.

Tagestemperatur	26–35 °C	
Nachttemperatur	16–27 °C	
Beleuchtungszeit	14 Stunden	bei Bedarf hinzuschalten von Kunstlicht (Philips SON-T 400, 400 Watt)
rel. Luftfeuchtigkeit	ca. 60 %	

Zwei Wochen nach der Aussaat wurden die Pflanzen pikiert. Die Infektion mit PSTVd erfolgte nach Ausbildung der Primärblätter. Dazu wurde die Blattoberfläche mit Carborundum 320 (Butzbacher Schleifmittelwerke) eingerieben. Auf die Verletzung wurde ein vorfraktionierter RNA-Extrakt aus PSTVd-infizierten Tomatenpflanzen getropft und anschließend eingerieben. Die aufgetragene Nukleinsäuremenge wurde dabei so gewählt, dass die Inokulation mit etwa 1 ng PSTVd durchgeführt wurde. Für die RNA-Präparation wurden die Blätter vier bis sechs Wochen später geerntet.

## 2.4.2 Kartoffelsuspensionszellkulturen

Ausgehend von PSTVd-intermediate infizierten Kalluskulturen der Kartoffel *Solanum demissum* Linie M316 oder nicht infizierten Zellkulturen der Kartoffel *Solanum tuberosum* Linie HH258 wurden Suspensionszellkulturen angezogen. Diese Zellen wurden wahlweise für *in vivo*-Quervernetzungsexperimente oder zur Isolation von Kern-RNA verwendet.

Die Kalluskulturen wurden auf festem Medium in sterilen Polycarbonat-Dosen (Greiner GmbH, Frickenhausen) bei 25 °C im Dunkeln gehalten. Das Medium entsprach dem der Flüssigkulturen, die feste Konsistenz wurde durch Zugabe von 1.2 % Agar (Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) erzeugt. In Abständen von sechs Wochen wurde die Kultur partiell auf frisches Medium umgesetzt. Zur Verarbeitung wurde ein Teil der Kalli in flüssiges Nährmedium überführt und in einem temperierbaren Rundschüttler (New Brunswick Scientific, Edison (NJ), USA) bei 24 °C und 150 rpm weiterkultiviert. Als Kulturmedium wurde das nach Mühlbach und Sängler (1981) veränderte Standardmedium von Murashige und Skoog (1962) verwendet. Dabei wurde das Medium zunächst ohne Kokosnusswasser angesetzt, der pH mit KOH auf 5.8 eingestellt und die Lösung autoklaviert. Vor Gebrauch wurde das Kokosnusswasser (GibcoBRL, Karlsruhe) frisch zugesetzt, nachdem es über einen Filter (0.2 µm; Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert worden war. Unter diesen Bedingungen erfolgte die Zellvermehrung, nach einer Anwuchsphase von zwei bis vier Wochen, mit einem Verdopplungsintervall von einer Woche. Daher wurde wöchentlich die Hälfte der Kultur abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Bei Bedarf wurden die Zellen drei bis vier Tage später verarbeitet.

## 2.5 Präparative Methoden

### 2.5.1 Isolation von Protoplasten aus Suspensionszellkulturen

Protoplasten aus Kartoffelzellen wurden sowohl für *in vivo*-Quervernetzungsexperimente, als auch für die Isolation von Kern-RNA aus PSTVd-infizierten Suspensionszellkulturen (Linie M316) und nicht infizierten Zellkulturen (Linie HH 258) isoliert.

Dazu wurden die Zellen aus 600 ml Kulturmedium abfiltriert und in 200 ml Plasmolytikum überführt. Die Plasmolyse erfolgte für 30 Minuten bei 24 °C. Danach wurden die Zellen mit 400 g (1500 rpm, Minifuge, Heraeus, Osterode) bei 10 °C für 5 Minuten sedimentiert und anschließend in 150 ml Enzymlösung resuspendiert. Nach 1–2 Stunden bei 24 °C im Zellkulturschüttler konnte der Erfolg des Zellwandabbaus lichtmikroskopisch überprüft werden. Die Protoplasten wurden erneut pelletiert (5 Minuten, 10 °C, 400 g) und zwei bis drei mal mit Plasmolytikum gewaschen.

Plasmolytikum:    0.4 M    Mannit  
                      50 mM    Kaliumcitrat

pH 5.8 mit Zitronensäure einstellen  
sterilfiltrieren

Enzymlösung:		Plasmolytikum
	1 %	Cellulase (Onozuka R10, Serva, Heidelberg)
	0.1 %	Pectoylase (Y23, Seishin Pharmaceuticals, Tokio, Japan)

### 2.5.2 Anreicherung von Zellkernen aus Suspensionszellkulturen

Im Anschluss an den Zellwandabbau wurde bei Bedarf eine *in vivo*-Quervernetzung mit Psoralen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.7.2), bevor die Kerne aus den Protoplasten angereichert wurden.

Die gewaschenen Protoplasten aus 600 ml Kartoffelsuspensionszellkulturen wurden in 10–50 ml eiskalten Lysispuffer überführt und in einem Dounce-Homogenisator (S) mit vier Stempelstößen aufgeschlossen. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C (Minifuge, Heraeus) wurden die angereicherten Kerne geerntet und direkt der RNA-Präparation unterworfen.

Lysispuffer:	100 mM	Morpholinoethansulfonsäure(MES), pH 5.8
	0.75 mM	Spermin
	2.5 mM	Spermidin
	50 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
	100 mM	Kaliumacetat

sterilfiltrieren

15 % Ficoll 400

### 2.5.3 RNA-Präparation

Die Präparation von RNA aus angereicherten Zellkernen erfolgte nach der sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Methode. Hierbei werden die Kerne in Guanidiniumthiocyanat-Reagenz aufgenommen und homogenisiert. Mit 2 M Natriumacetat pH 4 wurde die Lösung auf 18 mM Natriumacetat eingestellt. Anschließend erfolgte die Zugabe von einem Volumen Phenol sowie von einem Volumen Chloroform. Nach jedem Schritt wurde die Lösung gründlich durchmischt. Eine 20-minütige Zentrifugation bei 5000 rpm und Raumtemperatur (Minifuge; Heraeus) führte zu einer Phasentrennung. Die wässrige Phase konnte abgenommen und mit einem Volumen Isopropanol für 15 Minuten auf Eis oder über Nacht bei -20 °C präzipitiert werden. Durch 10-minütige Zentrifugation in einer Minifuge (Heraeus) bei 5000 rpm und Raumtemperatur wurde die Nukleinsäure pelletiert. Nach der Resuspension in H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer folgte erneut eine Fällung mit Isopropanol. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in TE-Puffer gelöst. Die Nukleinsäurekonzentration des Extraktes wurde spektralphotometrisch bestimmt, die Qualität anhand einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft.

Guanidiniumthiocyanat-Reagenz:	5 M	Guanidiniumthiocyanat
	25 mM	Tris
	10 mM	EDTA
	2 %	Sarkosyl (optional)
vor Gebrauch frisch zusetzen:	0.1 M	$\beta$ -Mercaptoethanol
	3–4 mg/ml	Diethyldithiocarbamat

## 2.6 Enzymatische Reaktionen

### 2.6.1 *In vitro*-Transkription mit der RNA-Polymerase T7

Alle *in vitro*-Transkriptionsreaktionen wurden mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase T7 durchgeführt. Das verwendete Enzym wurde von Herrn Bernd Esters aus einem rekombinanten *E. coli*-Stamm (Davanloo *et al.* 1984) isoliert und zur Verfügung gestellt. T7-Polymerase erkennt Biotin- und Digoxigenin-markierte Nukleotide als Substrat an. Daher wurden entsprechend modifizierte *in vitro*-Transkripte durch Zugabe von Biotin-16-Uridin-5'-triphosphat (Roche, Mannheim) oder Digoxigenin-11-Uridin-5'-triphosphat (Roche, Mannheim) in den Reaktionsansatz synthetisiert. Für die Transkription von PSTVd-Sequenzen wurden T7-Transkriptionsplasmide der Serie pRH verwendet, die zuvor mit geeigneten Restriktionsendonukleasen linearisiert worden waren. Als Matrizen für die Synthese von Digoxigenin-markierten (-)5S rRNA-Transkripten kamen PCR-Fragmente zum Einsatz. Diese waren mit dem Primerpaar Le5S 2/Le5St7bglII amplifiziert worden. Le5St7bglII weist unter anderem die Sequenz des T7-Promotors auf und ermöglicht so die anschließende *in vitro*-Transkription.

Reaktionsansatz:	2 $\mu$ g	Plasmid
oder:	10 $\mu$ l	subamplifiziertes PCR-Produkt
	5 $\mu$ l	IVT D
	2.5 $\mu$ l	10 mM NTP-Mix
	x $\mu$ l	10 mM modifiziertes UTP (optional)
	0.5 $\mu$ l	RNasin (40 u/ $\mu$ l; Promega, Mannheim)
	1 $\mu$ l	T7-Polymerase (250–300 u/ $\mu$ l)
	ad 20 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O
mit: IVT D:	200 mM	Tris-HCl pH 8.3
	40 mM	MgCl <sub>2</sub>
	25 mM	Dithiothreitol (DTT)
	5 mM	Spermidin
	0.05 %	Triton

Modifizierte Nukleotide wurden dem Reaktionsansatz nur nach Bedarf zugegeben. Zur Synthese von biotinylierten „Dynabeads“-Sonden oder von „Northern“-Sonden mit PSTVd-Vollänge wurden 0.675  $\mu$ l Bio-UTP bzw. Dig-UTP eingesetzt. Das entspricht einem Verhältnis

von 20 % modifiziertes UTP zu gesamt UTP. Bei der Synthese verkürzter „Dynabeads“-Sonden durch Transkription AvaII linearisierter pRH 714 Plasmide wurde 2–2.2  $\mu\text{l}$  Bio-UTP zugegeben, was einen Anteil von 45–47 % des gesamten UTPs ausmacht.

Die Reaktion wurde für 4 Stunden durchgeführt, wobei nach 2 Stunden erneut 1  $\mu\text{l}$  Enzym zugesetzt wurde. Um die freien Nukleotide abzutrennen wurde der Ansatz zweimal mit 1/2 Volumen 7.5 M Ammoniumacetat und 2.5 Volumen eiskaltem Ethanol gefällt. Die Transkripte wurden in einem geeigneten Volumen TE resuspendiert und ihre Qualität anhand einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese überprüft.

### 2.6.2 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden und Primer Extension Reaktion

5'-radioaktiv-markierte DNA-Oligonukleotide wurden für Primer Extension-Analysen benötigt. Die Markierung erfolgte durch Transfer der radioaktiven  $\gamma$ -Phosphatgruppe von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP auf das 5'-OH-Ende des Oligonukleotides. Diese Reaktion wird von dem Enzym Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert.

Markierungsansatz:	10 pmol	Oligonukleotid, RGV 5 oder TB 1
	2 $\mu\text{l}$	10 $\times$ PNK-Reaktionspuffer (Roche, Mannheim)
	1.5 u	Polynukleotidkinase (Roche, Mannheim)
	5 $\mu\text{l}$	$\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (5000 Ci/mmol)
	ad 20 $\mu\text{l}$	H <sub>2</sub> O

Die Inkubation erfolgte über Nacht auf Eis. Anschließend wurden freie Nukleotide durch zweimalige Präzipitation mit 1/2 Volumen 7.5 M NH<sub>4</sub>OAc, 20 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 Volumen eiskaltem Ethanol aus dem Ansatz entfernt. Nach 40 minütiger Zentrifugation bei 12000 rpm in einer Tischzentrifuge (Modell EBA12R, Hettich) wurde das resultierende Pellet in 50  $\mu\text{l}$  TE gelöst und ein Aliquot dieser Lösung zur Ermittlung der Markierungseffizienz abgenommen. Die Gesamtaktivität des markierten Oligonukleotides wurde durch Szintillationszählung des abgenommenen Aliquots in einem Szintillationszähler der Firma Beckman (Modell LS 5000 TD, Beckman Coulter, München) bestimmt.

Für die Primer Extension Reaktion wurden 5 x 10<sup>5</sup> cpm des markierten Oligonukleotides an 50 ng dimeres (+)PSTVd-*in vitro*-Transkript, hybridisiert. Die RNA war vorher nach *in vitro*-Komplexeinstellung quervernetzt worden (siehe Abschnitt 2.7.1). Alternativ wurde die gleiche Menge an radioaktivem Oligonukleotid an HPLC oder gelaufgereinigtes PSTVd nach Quervernetzung ohne *in vitro*-Komplexeinstellung gebunden. Die Hybridisierung erfolgte in 1 $\times$  TNE durch 3 minütige Inkubation bei 90 °C und langsames Abkühlen auf 30 °C im ausgeschalteten Heatblock. Nach einer Präzipitation wurde die Nukleinsäure direkt in dem Primer Extension Reaktionsansatz gelöst:

Primer Extension Reaktion:	Nukleinsäure-Pellet
	1× Erststrangpuffer (Gibco BRL, Karlsruhe)
0.5 mM	dNTP
10 mM	DTT
40 u	RNasin (Promega, Mannheim)
200 u	Superscript II (Gibco BRL, Karlsruhe)
ad 20 $\mu$ l	H <sub>2</sub> O

Die Reaktion erfolgte für 1 Stunde bei 54 °C. Anschließend wurde die Nukleinsäure durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M NaOAc pH 7 und 3 Volumen eiskaltem Ethanol gefällt. Das getrocknete Pellet konnte direkt in denaturierendem Auftragspuffer (siehe auch Punkt 2.10.1) aufgenommen werden. Zur Analyse wurden die Proben auf ein in Abschnitt 2.10.5 beschriebenes Sequenziergel aufgetragen.

### 2.6.3 Sequenzierung von Plasmid DNA

Parallel zu Primer Extension-Analysen wurden Sequenzierungsreaktionen durchgeführt. Diese erlaubten die Zuordnung einzelner Abbruchsignale zu definierten Nukleotiden innerhalb der PSTVd-Sequenz. 5  $\mu$ g Plasmid pRH 713 wurden zunächst für 10 Minuten bei Raumtemperatur in 0.4 M NaOH alkalisch denaturiert. Durch Zugabe von einem Drittel Volumen Natriumacetat, pH 5.2 wurde der Ansatz neutralisiert und die DNA anschließend mit drei Volumen Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in die Sequenzierreaktion eingesetzt. Verwendet wurde der Sequencing Kit der Firma USB (Cleveland, USA), Version 2.0. Die Durchführung erfolgte gemäß der Herstellerangaben.

### 2.6.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion wurden aus genomischer *Lycopersicon esculentum* DNA T7-Transkriptionsmatrizen amplifiziert. Diese erlaubten anschließend die Synthese Digoxigenin-markierter *in vitro*-Transkripte mit invertierter 5S rRNA-Sequenz. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler Varius V (Landgraf, Langenhagen) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 50  $\mu$ l und setzte sich wie folgt zusammen:

1×	10× Reaktionspuffer ohne MgCl <sub>2</sub> (Promega)
1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
100 $\mu$ M	jedes dNTP
20 pmol	Le5S 2
20 pmol	Le5St7bglII
2 u	Taq-Polymerase (Promega)
4.8 ng	„genomische DNA“
60 $\mu$ l	Paraffinöl

Die Programmierung der Temperaturzyklen erfolgte mit:

1×	Denaturierung	94 °C / 180 s
	Hybridisierung	60 °C / 60 s
	Polymerisation	72 °C / 60 s
33×	Denaturierung	94 °C / 90 s
	Hybridisierung	60 °C / 60 s
	Polymerisation	72 °C / 60 s
1×	Denaturierung	94 °C / 90 s
	Hybridisierung	60 °C / 60 s
	Polymerisation	72 °C / 600 s

Ein Aliquot des Reaktionsansatzes wurde direkt auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und analysiert. Es zeigte sich, dass neben dem erwarteten Produkt noch eine Reihe größerer Fragmente amplifiziert worden waren. Die Synthese dieser Produkte konnte im Rahmen der PCR nicht durch eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur vermieden werden. Daher wurde das gesuchte Fragment subamplifiziert. Ein zehntel des PCR-Ansatzes wurde in einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, der entscheidende Bereich ausgeschnitten und die Nukleinsäure über Nacht bei Raumtemperatur in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eluiert. Diese Lösung enthielt nur das DNA-Fragment, dessen Sequenz monomerer 5S rRNA entsprach, und ein hundertstel davon wurde statt der genomischen DNA in den zuvor beschriebenen PCR-Ansatz als Vervielfältigungsmatrize eingebracht. Die Produkte dieser zweiten Polymerase Kettenreaktion konnten nach einer Aufreinigung mit dem Qiagen PCR Quick Spin System (Qiagen GmbH, Hilden) direkt als Matrize in einer nachfolgenden *in vitro*-Transkription verwendet werden.

### 2.6.5 Linearisierung von Plasmiden

Zur Synthese von *in vitro*-Transkripten war es notwendig T7-Transkriptionsplasmide mit geeigneten Restriktionsendonuklease zu linearisieren. Wurden Vollängen-Transkripte benötigt erfolgte dies mit dem Enzym *Eco RI*. In allen anderen Fällen werden die entsprechenden Endonukleasen im Text aufgeführt. Die Reaktionen wurden gemäß der Herstellerangaben durchgeführt.

## 2.7 Methoden zur Induktion von Psoralen abhängigen Quervernetzungen

### 2.7.1 Quervernetzung mit Psoralen nach *in vitro* -Komplexeinstellung

*In vitro* eingestellte RNA-Komplexe entstanden durch thermische Denaturierung und langsame Renaturierung bei hohen Salzkonzentrationen. Dazu wurden RNA-Extrakte auf eine Konzentration von 650  $\mu\text{M}$  Basenpaare RNA in  $1\times$  TNE verdünnt und für 3 Minuten im Heatblock auf 90 °C erhitzt. Der heiße Aluminiumeinsatz wurde aus dem Heatblock herausgenommen und unter einen Styroporkasten auf die Laborbank gestellt. Unter diesen Bedingungen kühlte die Probe innerhalb von 4 Stunden auf 30 °C ab.

Im Anschluss daran erfolgte direkt die kovalente Quervernetzung. Das Psoralenderivat 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (HRI Research, Concord, USA) wurde mit einer Konzentration von 2 mg/ml in TE-Puffer gelöst und in Aliquots, die einzeln in Aluminiumfolie eingewickelt wurden, bei -70 °C gelagert. Für die Quervernetzung hatte es sich als optimal erwiesen, ein molares Konzentrationsverhältnis RNA (in Basenpaaren) : Psoralen von 5 : 1 zu wählen (Thiel 1999). Nach der Psoralenzugabe wurde die Lösung gründlich durchmischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit interkaliert Psoralen in die RNA-Doppelhelices. Durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm kann eine kovalente Verknüpfung zweier diagonal gegenüberstehender Pyrimidinbasen erfolgen (siehe auch Abschnitt 1.4.2.2). Die Bestrahlung wurde für eine Stunde auf Eis durchgeführt. Große Probenvolumen wurden auf offenen Petrischalen, kleinere Volumina (bis zu wenigen 100  $\mu\text{l}$ ) auf offenen Mikrotiterplatten in einem Bestrahlungsgerät der Firma Stratagene (Modell Stratalinker, La Jolla, USA)) beleuchtet. Die Lagerung der quervernetzten RNA erfolgte bei -20 °C.

### 2.7.2 *In vivo*-Quervernetzung mit Psoralen

Für die Analyse *in vivo* quervernetzter RNA-Komplexe wurden aufgereinigte Protoplasten aus Kartoffelsuspensionszellkulturen verwendet (siehe auch Abschnitt 2.5.1). Die Durchführung erfolgte wie in Thiel 1999 beschrieben. Aus dem enzymatischen Zellwandabbau erhaltene Protoplasten wurden in ein möglichst geringes Volumen Psoralen-Puffer überführt, der 2 mg/ml AMT (4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen) enthielt. Während einer Inkubationsphase von 10 Minuten bei Raumtemperatur diffundierte das Psoralen aus dem umgebenden Puffer über die Protoplastenmembran in das Zellinnere hinein. Innerhalb der Zelle kann AMT in die Zellkompartimente eindringen und im Kern in Nukleinsäure-Doppelhelices interkalieren (Wollenzien *et al.* 1983, Cimino *et al.* 1985). Die Quervernetzung erfolgte in einer Bestrahlungsapparatur der Firma Stratagene (Modell Stratalinker, La Jolla, USA). Die Probe wurde in einer offenen Petrischale auf Eis für 15 Minuten bei 365 nm ( $2.3 \text{ mW/cm}^2$ ) bestrahlt. Aus den Protoplasten wurde anschließend RNA präpariert (Abschnitt 2.5.3) und bei -70 °C gelagert.

Psoralen-Puffer:	10 mM	Morpholinoethansulfonsäure (MES), pH 5.8
	100 mM	NaCl
vor Gebrauch frisch zusetzen:	2 mg/ml	Psoralen (AMT)

## 2.8 Reversion der Psoralen-Quervernetzung

Psoralen-vermittelte Quervernetzungen können durch Bestrahlung mit UV-Licht von 254 nm Wellenlänge wieder aufgehoben werden (Cimino *et al.* 1985). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestrahlung in einem Bestrahlungsgerät der Firma Stratagene (Modell Stratalinker 1800) auf Eis, wobei die Proben etwa 16 cm unterhalb der Lampen plaziert wurden. Die Lösungen wurden auf offene Mikrotiterplatten oder Petrischalen pipettiert und für 3–9 Minuten beleuchtet.

## 2.9 „Dynabeads“-Aufreinigung

Die Aufreinigung kovalent verknüpfter Viroidkomplexe konnte im Verlauf der durchgeführten Untersuchungen mittels einer PSTVd-spezifischen Affinitätschromatographie erreicht werden. Dazu wurden Biotin-markierte Sonden spezifisch an PSTVd hybridisiert. Diese Hybride wurden an paramagnetischen Streptavidin-Partikeln immobilisiert. Die Separation in einem Magneten erlaubte die Isolation der gesuchten Nukleinsäuren. Nach einer anschließenden Elution wurden diese durch geeignete gelelektrophoretische Untersuchungen analysiert.

### 2.9.1 Maskierung der PSTVd-Moleküle

Unter dem Begriff der Maskierung von PSTVd-Molekülen soll in dieser Arbeit die Hybridisierung von biotinylierten *in vitro*-Transkripten an PSTVd verstanden werden. Dies erlaubt eine Differenzierung zwischen dem beschriebenen Prozess und der Markierung von Transkripten durch Inkorporation modifizierter Nukleotide während der Synthese. Die spezifische Maskierung der Viroide in einem Reaktionsansatz ermöglicht ihre Bindung an paramagnetische Streptavidin-Partikel („Dynabeads“, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg) und damit die anschließende Aufreinigung aus der Probe. Zwei solcher „Dynabeads“-Sonden konnten etabliert werden. Transkripte Eco RI linearisierter pRH 716 Plasmide wurden mit einem Bio-UTP zu UTP Verhältnis von 1 : 5 synthetisiert. Sie wiesen eine Länge von 368 Nukleotiden auf, wovon 359 Nukleotide der (-)PSTVd-Sequenz entsprachen. Mit Ava II linearisierte pRH 714 Plasmide erlaubten die Transkription verkürzter Sonden, die eine (+)PSTVd-Sequenzkomplementarität über 61 Nukleotide beinhalteten. Um diese in ausreichendem Umfang zu biotinylieren enthielt der Transkriptionsansatz 45–47 % Bio-UTP.

Die Maskierung erfolgte durch Hybridisierung der biotinylierten (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripte an die Viroide in einem RNA-Extrakt. Wurden Vollängen-*in vitro*-Transkripte als Sonden verwendet, reichte eine äquimolare Zugabe aus, um alle PSTVd-Moleküle zu maskieren. Verkürzte *in vitro*-Transkripte wurden in einem 5-fachen molaren Überschuss zugesetzt. Die Lösungen wurden auf  $1\times$  TNE eingestellt und für 3 Minuten bei  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  denaturiert. Wurden die Viroide an Vollängen-Transkripte hybridisiert genügte eine Abkühlphase von 1.5–2 Stunden unter Styropor auf der Laborbank. In dieser Zeit wurde eine Temperatur von  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  erreicht. Die Inkubation wurde auf 3 Stunden verlängert, wenn Viroide mit verkürzten Transkripten maskiert wurden. Die Lösung kühlte so auf eine Temperatur von  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  ab. Mit dem Erreichen der Endtemperatur wurden die Proben auf Eis gestellt und entweder auf Eis, bzw. bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert oder direkt an „Dynabeads“ gebunden.

## 2.9.2 Bindung an „Dynabeads“

Maskierte Viroide und Viroidkomplexe wurden einer PSTVd-spezifischen Affinitätschromatographie unterworfen. Die Immobilisierung erfolgte an paramagnetischen Streptavidin-Partikeln der Firma Dynal („Dynabeads“). Da Streptavidin aus 4 identischen Untereinheiten besteht, von denen jede 1 Biotin-Molekül binden kann, bindet 1 Mol Streptavidin 4 Mol Biotin mit einer Bindekonstanten von  $10^{15}$ . Dies ist eine der größten Bindekonstanten, die für nicht kovalente Bindungen bekannt ist. Streptavidin eignet sich besonders für die Aufreinigung von Nucleinsäuren, da es wegen seines schwach sauren Charakters in physiologischen pH-Bereichen nicht an diese bindet.

„Dynabeads“ werden nicht in RNase freiem Zustand geliefert. Der Hersteller empfiehlt daher die Kügelchen bei Bedarf entsprechend vorzubereiten. Dies geschah durch zweimalige Inkubation der Partikel für 2 Minuten bei Raumtemperatur in Lösung A, sowie einmalige Behandlung unter entsprechenden Bedingungen mit Lösung B. Nach jedem Vorgang wurden die Partikel für 2 Minuten in einem Magneten (Modell Dynal MPC-E, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg) pelletiert und die gebrauchte Lösung entfernt.

Lösung A: 100 mM NaOH  
50 mM NaCl

mit DEPC behandeln

Lösung B: 100 mM NaCl

mit DEPC behandeln

Zur Optimierung der Biotin-Streptavidin Bindungseffizienz erfolgte die Immobilisierung der maskierten Viroide in  $1\times$  B&W Puffer bei Raumtemperatur für 30 Minuten. In dieser Zeit sedimentieren die Partikel auf Grund ihres Eigengewichtes auf den Boden des Reaktionsgefäßes. Daher erfolgte die Bindung bei langsamer Rotation (ca. 1 Umdrehung/8 Minuten).

Die Menge einzusetzender „Dynabeads“ variierte mit Typ und Menge der für eine erfolgreiche Maskierung benötigten biotinylierten Sonden. Die genauen Konzentrationsverhältnisse werden in den entsprechenden Abschnitten angegeben, lagen in der Regel jedoch für Vollängen-*in vitro*-Transkripte zwischen 2 und 3 ng Transkript pro  $1\ \mu\text{g}$  „Dynabeads“ und für verkürzte *in vitro*-Transkripte bei 0.19 ng Sonde pro  $1\ \mu\text{g}$  „Dynabeads“. Gemäß der Herstellerangaben entsprach das Reaktionsvolumen bei der Bindung dem 4-fachen Ausgangsvolumen der „Dynabeads“.

$2\times$  B&W Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7.5  
1 mM EDTA  
2 M NaCl

Nach der Bindung wurden die Proben für 2 Minuten in einen Magneten überführt. Der Überstand wurde abgenommen und die Partikel mehrfach in  $0.1\times$  SSC bei verschiedenen Temperaturen gewaschen. Dazu wurden die Partikel resuspendiert und für 2 Minuten bei der



wurden die Proben nur noch auf Eis aufbewahrt. Die für die Elektrophorese verwendete Apparatur ermöglichte es, die durch den Elektrophoresestrom erzeugte Wärme zu speichern und gleichmäßig über das Gel zu verteilen. Dazu wurde vor die Glasplatten eine 2 mm dicke Aluminiumplatte geklemmt. Auf dieser Platte waren thermo-sensitive Streifen angebracht mittels derer die Temperatur während der Elektrophorese überwacht werden konnte. Nur Temperaturen über 55 °C bei Zugabe von 8 M Harnstoff in die Gelmatrix garantieren ausreichend denaturierende Elektrophoresebedingungen. Um diese bereits zu Beginn der Auftrennung vorzufinden wurde das Gel zunächst in einem Vorlauf von 20 Minuten bei 50 W auf etwa 55 °C erwärmt. Nachdem die Proben aufgetragen worden waren, erfolgte die eigentliche Elektrophorese für 13–30 Minuten ebenfalls bei 50 W. Die Nukleinsäuren wurden schließlich mit Silbernitrat angefärbt (siehe Abschnitt 2.10.7).

### **2.10.2 Spannungsgesteuerte, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Für PSTVd- oder 5S rRNA-spezifische „Northern“-Analysen wurden die Proben zunächst einer spannungsgesteuerten Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen. Die Zusammensetzung der Gel-Matrices und der aufgetragenen Proben entsprach denen der bereits in Abschnitt 2.10.1 beschriebenen, leistungsgesteuerten Elektrophorese. Da ein anschließender Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran die Verwendung einer Trägerfolie ausschloss, wurden 1 mm dicke Gele gegossen. Die Elektrophorese erfolgte in einer Hoefer-Kammer (Hoefer Scientific Instruments), deren Anoden-Pufferbecken ein Volumen von 4 l fasst und durch ein Heizspirale über ein Thermostat auf 55 °C temperiert werden konnte. Die Elektrophorese wurde für 0.5–2 Stunden bei einer angelegten Spannung von 400–500 V, das entspricht einer elektrischen Feldstärke von 23–29 V/cm, durchgeführt.

### **2.10.3 Spannungsgesteuerte, native Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Effizienz, mit der die verschiedenen, biotinylierten *in vitro*-Transkripte die Viroid-Moleküle eines RNA-Extraktes maskieren, wurde durch Ermittlung des Verhältnisses von im Hybrid verzögerter Moleküle zu den freien Komponenten bestimmt. Dazu wurden die Proben in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen aufgetrennt und anschließend mit Silbernitrat angefärbt. Die experimentelle Durchführung entsprach der unter Punkt 2.10.2 beschriebenen. Um die nativen Bedingungen zu gewährleisten, enthielt das Gel jedoch keinen Harnstoff. Das Anodenbecken der Hoefer-Kammer (Hoefer Scientific Instruments) wurde auf 15 °C gekühlt.

### **2.10.4 Verzögerungsgele**

Die Charakterisierung des Biotinylierungsgrades von (–)PSTVd-*in vitro*-Transkripten erfolgte anhand von Streptavidin-Verzögerungsgelen. Zu diesem Zweck wurden 200 ng Transkript mit 1 µg Streptavidin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in PLS-Puffer für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von einem Volumen Auftragspuffer konnten die Proben auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen werden. Die Gel-Matrix enthielt neben 5 % Polyacrylamid (29:1) 1× TBE als Gelpuffer. Verwendet wurden Gelapparaturen der Firma

Hoefler Scientific Instruments, die auf 15 °C temperiert wurden. Die Elektrophorese erfolgte für 1 Stunde und 40 Minuten bei 400 V (23 V/cm). Unter diesen Bedingungen überschritt die Temperatur im Gel niemals einen Maximalwert von 22 °C.

Auftragspuffer:	2×	TBE
	70 %	Glycerin
	0.1 %	Bromphenolblau/Xylencyanol FF

### 2.10.5 Sequenziergele

Zur Analyse von DNA-Produkten aus Primer Extension-Analysen oder Sequenzierungsreaktionen wurden die Fragmente in 0.4 mm dünnen 8 % Polyacrylamidgelen (19:1) (7 M Urea, 1× TBE) aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in einer bei 90 W für 1.5 Stunden vorgeheizten Sequenzierkammer (Modell S2) der Firma GibcoBRL (Karlsruhe) bei einer konstanten Leistung von 90 W und einer Temperatur von 55 °C für 1.5 Stunden durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf einen gebrauchten Röntgenfilm transferiert und auf Kodak X-AR Röntgenfilme bei -20 °C exponiert.

### 2.10.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Der Nachweis einer Reversion der Psoralen induzierten Quervernetzung von Nukleinsäuren durch Bestrahlung in Polyacrylamidgelen erfolgte anhand von zweidimensionalen Gelanalysen. Dazu wurde ein in Schumacher *et al.* 1986 beschriebenes Verfahren in geeigneter Weise modifiziert. Die Nukleinsäure wurde mit einem Volumen Auftragspuffer (siehe Abschnitt 2.10.4) gemischt und in einer ersten, nativen Dimension aufgetrennt (5 % Polyacrylamid (43:1); 1× TBE; 15 °C). Nach einer Elektrophoresedauer von 30 Minuten bei 400 V (23 V/cm) in einer Kammer der Firma Hoefler Scientific Instruments wurden die Spuren von der Geltasche bis etwa 1 cm unterhalb des Xylencyanol-Blaumarkers ausgeschnitten und nach Bedarf für 7 Minuten auf Eis mit UV-Licht von 254 nm bestrahlt (siehe auch Abschnitt 2.8). Anschließend wurden die Gelstücke um 90° versetzt in das denaturierende Gel der zweiten Dimension einpolymerisiert (8 % Polyacrylamid (29:1); 1× TBE; 8 M Urea). Die Elektrophorese wurde für 65 Minuten bei 475 V (27 V/cm) und 55 °C in einer Hoefler-Kammer durchgeführt. Der Nukleinsäurenachweis erfolgte mittels Silberfärbung.

### 2.10.7 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde zum Sequenz-unabhängigen Nachweis von Nukleinsäuren in Polyacrylamidgelen eingesetzt. Das ursprünglich für Proteingele entwickelte (Sammons *et al.* 1981) und später für Nukleinsäuregele modifizierte (Schumacher *et al.* 1986) Verfahren beruht auf einer Reduzierung der an die Phosphodiester-Gruppen der Nukleinsäuren gebundenen Ag<sup>+</sup>-Ionen durch Formaldehyd zu metallischem Silber.

Die Nachweisgrenze für dieses Färbeverfahren liegt unterhalb von 1 ng Nukleinsäure pro Bande (0.8 mm breit). Es wurde wie folgt verfahren:

Fixieren	in	10 % (v/v) Ethanol 0.5 % (v/v) Essigsäure	für	15 min
Färben	in	0.19 % AgNO <sub>3</sub>	für	30 min
Waschen	in	H <sub>2</sub> O	für	2 × 15 s
Entwickeln	in	15 g/l NaOH 90 mg/l NaBH <sub>4</sub> 3.75 ml/l Formaldehyd (37%)	für	20 min
Neutralisieren	in	0.75 % NaHCO <sub>3</sub>	für	15 min

Alle genannten Schritte wurden unter ständigem Schwenken durchgeführt. Die Gele wurden anschließend fotografiert und zur Lagerung in Polyethylenfolie eingeschweißt.

## 2.11 „Northern“-Analysen

### 2.11.1 Transfer der Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Bevor Nukleinsäuren, die einem PSTVd- oder 5S rRNA-spezifischen Nachweis unterzogen werden sollten, mit Digoxigenin-markierten *in vitro*-Transkripten hybridisiert werden konnten, mussten sie auf eine Nylonmembran (Biodyne A, Pall Europe Ltd., Portsmouth, England) transferiert werden. Der Transfer erfolgte in einer „semi dry“-Kammer, Modell TransBlot SD, der Firma BioRad (München). Auf die, in dieser Apparatur waagrecht liegenden Elektroden, wurden jeweils 4 Lagen, 1 × TBE getränktes Whatman 3MM Papier (Whatman International Ltd., Maidstone, England) gelegt. Das Gel und die Nylonmembran wurden luftblasenfrei dazwischen gebettet. Der Transfer erfolgte für 45 Minuten mit 400 mA jedoch maximal 15 V.

### 2.11.2 Alkalische Denaturierung und Fixierung der Nukleinsäure auf der Nylonmembran

Der Elektrotransfer von RNA auf eine Nylonmembran erfolgt nicht unter denaturierenden Bedingungen. Vorversuche hatten gezeigt, dass die Nachweisempfindlichkeit von „Northern“-Analysen durch Denaturierung der RNA vor der Fixierung auf der Nylonmembran deutlich verbessert werden konnte. Diese Denaturierung wurde durch 15-minütiges Schwenken der Membran in 50 mM NaOH bei Raumtemperatur erreicht. Anschließend erfolgte eine Neutralisierung durch Schwenken des Filters in 20 × SSC bei Raumtemperatur.

Die für eine Hybridisierung notwendige kovalente Fixierung der RNA auf der Nylonmembran wurde in einer UV-Crosslink-Apparatur, Modell Stratalinker der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Funktion "AutoCrosslink ") durchgeführt.

### 2.11.3 Filterhybridisierung

Kovalent an Nylonmembranen fixierte Ribonukleinsäuren wurden durch Filterhybridisierungen mit Digoxigenin-markierten *in vitro*-Transkripten und anschließender Chemolumineszenzreaktion nachgewiesen. Dazu wurden die Membranen zusammengerollt in Hybridisierungsflaschen überführt und zunächst mit 15 ml Prähybridisierungslösung bei 55 °C für mindesten 2 Stunden in einem Hybridisierungssofen (Modell OV 2, Biometra, Göttingen) rotiert. Die gebrauchte Lösung wurde anschließend entfernt und durch 15 ml frische Hybridisierungslösung ersetzt. Für PSTVd-spezifische Nachweisreaktionen erfolgte die Inkubation bei 65 °C, für 5S rRNA-spezifische bei 60 °C, jeweils über Nacht.

Prähybridisierungslösung:	5 %	Blocking-Reagenz (Roche, Mannheim)
	5×	SSC
	0.1 %	N-Laurylsarcosin, Na-Salz
	0.02 %	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	50 %	Formamid

die Lösung wurde mehrfach verwendet und bei -20 °C gelagert

Hybridisierungslösung:	5 %	Blocking-Reagenz (Roche, Mannheim)
	5×	SSC
	0.1 %	N-Laurylsarcosin, Na-Salz
	0.02 %	Natriumdodecylsulfat (SDS)
	50 %	Formamid
	1.6 µg	Digoxigenin-markierte <i>in vitro</i> Transkripte, die zuvor mit einem Volumen Formamid bei 70 °C für 10 Minuten denaturiert worden waren und anschließend auf Ethanol-Eis gelagert wurden

die Lösung wurde mehrfach verwendet und bei -20 °C gelagert

Um ungebundene Sondenmoleküle zu entfernen, wurden die Membranen mit Waschlösung abgespült und 2× für 30 Minuten bei 75 °C (*in vitro*-Transkripte mit PSTVd-Sequenz) oder 60 °C (*in vitro*-Transkripte mit invertierter 5S rRNA-Sequenz) gewaschen. Derart vorbereitete Membranen konnten in die Chemolumineszenzentwicklung mit dem CDP-Star<sup>TM</sup>-System eingebracht werden.

#### 2.11.4 Chemolumineszenzentwicklung mit dem CDP-Star<sup>TM</sup>-System

Der Nachweis Digoxigenin-markierter *in vitro*-Transkripte, die zuvor an filtergebundene Ribonukleinsäuren hybridisiert worden waren, erfolgte durch Chemolumineszenzentwicklung mit dem CDP-Star<sup>TM</sup>-System. Nach dem gleichen Prinzip wurden während der, für die Optimierung des Sonden-PSTVd Konzentrationsverhältnisses durchgeführten Titrationsanalysen, biotinylierte *in vitro*-Transkripte nach Membrantransfer detektiert. Grundlage der Vorgehensweise ist die spezifische Erkennung der Modifikationen durch Anti-DIG-F<sub>ab</sub>-Alkalische-Phosphatase Antikörper (Roche, Mannheim) oder Streptavidin-Alkalische-Phosphatase Konjugate (Roche, Mannheim). CDP-Star<sup>TM</sup> (Tropix, Inc., Bedford, Massachusetts, USA) wird als Chemolumineszenzsubstrat von der Alkalischen-Phosphatase erkannt. Die maximale Lichtemission des dephosphorylierten Moleküls liegt bei 466 nm. Dabei kann die Reaktion sowohl erfolgen, wenn das Enzym frei in Lösung vorliegt, als auch wenn die Alkalische-Phosphatase an eine Nylonmembran gekoppelt ist.

Für die Durchführung wurde ein von S. Kanka 1998 modifiziertes Protokoll des Herstellers (Roche, Mannheim) übernommen. Alle im Folgenden genannten Schritte erfolgten bei Raumtemperatur. Die Nylonmembran wurde mit den angegebenen Lösungen überdeckt und für die entsprechende Zeit darin geschwenkt:

1 Minute	Puffer I
1 Stunde	Puffer II
30 Minuten	Antikörperinkubation mit 1:5000 in Puffer II verdünntem Anti-DIG-F <sub>ab</sub> oder Streptavidin- Alkalische-Phosphatase Konjugat
1 Minute	Puffer I
2× 20 Minuten	Puffer I
5 Minuten	Puffer III
5 Minuten	1:1250 in Puffer III verdünntem CDP-Star <sup>TM</sup>

mit:

Puffer I: 100 mM Maleinsäure, pH 7.5  
150 mM NaCl

Puffer II: 100 mM Maleinsäure, pH 7.5  
150 mM NaCl  
1 % Blocking-Reagenz (Roche, Mannheim)

Puffer III: 100 mM Diethanolamin (ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim)  
1 mM MgCl<sub>2</sub>

Puffer II mit und ohne Anti-DIG-F<sub>ab</sub>-Alkalische-Phosphatase Antikörper bzw. Streptavidin-Alkalische-Phosphatase Konjugat wurde mehrfach verwendet und bei 4 °C gelagert.

### 2.11.5 Autoradiographie

Die in Polyethylenfolie eingeschweißten Filter wurden nach der Chemolumineszenzentwicklung in einer Expositionskassette auf Kodak X-Omat AR-Röntgenfilme bei Raumtemperatur für 1 Sekunde bis zu 36 Stunden exponiert.

## 2.12 „dot-blot“-Analysen

Die Etablierung von „Northern“-Hybridisierungsbedingungen wurde mit Hilfe von „dot-blot“-Analysen durchgeführt. Ein Tropfen Nukleinsäurelösung wurde dazu auf eine Nylonmembran (Biodyne A, Pall Europe Ltd., Portsmouth, England) pipettiert, die Lösung bei Raumtemperatur eingetrocknet und die Nukleinsäure alkalisch denaturiert bevor sie auf dem Filter fixiert wurde (siehe Abschnitt 2.11.2). Die Hybridisierung erfolgte mit Digoxigenin-markierten *in vitro*-Transkripten wie auf Seite 30 beschrieben.

## 2.13 UV-Absorptionsmessung zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrades von Nukleinsäuren in Lösung wurden UV-Spektren von 210–340 nm in einem Spektralphotometer (Modell DU 640, Beckman Coulter, München) aufgenommen. Bei Verwendung von Quarzglasküvetten mit einer optischen Länge von 1 cm gilt nach Sambrook *et al.* 1989 folgende Beziehung zwischen Absorption und Nukleinsäurekonzentration:

$$\text{RNA} \quad 1 A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{DNA} \quad 1 A_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Oligonukleotide} \quad 1 A_{260} = 33 \mu\text{g/ml}$$

## 2.14 Gelaufreinigung von Nukleinsäuren

Der Nachweis einer direkten Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA erfolgte durch einen Vergleich der Retardierungsmuster *in vitro* eingestellter 5S rRNA-Komplexe mit und ohne PSTVd. Um beide Moleküle in sehr reiner Form in die Untersuchung einsetzen zu können wurden sie zuvor aus einem Gel aufgereinigt.

Ausgangsmaterial waren vorfraktionierte RNA-Extrakte aus *Lycopersicon esculentum* Blattgewebe (siehe auch Punkt 2.3.2). Es wurden jeweils maximal 2  $\mu\text{g}$  der zu eluierenden RNA pro Spur in einer leistungsgesteuerten Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Referenzspuren, in denen weniger Nukleinsäure aufgetragen wurde, wurden ausgeschnitten und mit Silbernitrat angefärbt. Da die Gele auf einer Trägerfolie polymerisierte worden waren, veränderte sich ihre Größe während des Färbevorgangs nicht. Durch Anlegen der Referenzspuren an das restliche Gel konnten die Bereiche der zu eluierenden Nukleinsäure präzise herausgeschnitten

werden. Die Gelstücke wurden mit einem sterilen Skalpell sehr fein zerkleinert und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die weitere Gelelution erfolgte nach Krupp 1988. Die Gelstücke wurden mit 400  $\mu$ l Elutionspuffer ohne Magnesium versetzt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Am nächsten Tag erlaubte eine kurze Zentrifugation die Abnahme des Überstandes. Die im Reaktionsgefäß verbleibenden Gelreste wurden erneut für 4 Stunden mit 200  $\mu$ l Elutionspuffer ohne Magnesium inkubiert. Beide Überstände wurden vereinigt und auf eine mit autoklavierter Glaswolle gefüllte 1 ml Spritze gegeben. Die Spritzen wurden in 12 ml Greinerröhrchen (Greiner GmbH, Frickenhausen) gehängt und für 30 Sekunden bei 1500 rpm in einer Minifuge (Modell GPKR, Beckman Coulter, München) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Diese, über das von Krupp beschriebene Verfahren hinausgehende, zusätzliche Filtration erlaubt die Abtrennung restlicher Gelstücke und erhöht die Elutionsausbeute signifikant (Hu, mündliche Mitteilung). Durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 7.0 und 2.5 Volumen eiskaltem Ethanol wurde die Nukleinsäure aus dem Elutionspuffer gefällt. Das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und für 30 Minuten an der Luft getrocknet. Nach der Resuspendierung in TE wurde die Konzentration der RNA sowohl spektralphotometrisch als auch mittels Gelelektrophoresen bestimmt. Letztere erlaubten zusätzlich die Qualitätskontrolle der durchgeführten Aufreinigung.

Elutionspuffer nach Krupp (ohne  $MgCl_2$ ):

500 mM	Tris-HCl pH 7.0
0.1 mM	EDTA
0.1 %	SDS

## 2.15 Computeralgorithmen

$T_m$ -Werte wurden mit Hilfe des POLAND-Programmes (Steger 1994) ermittelt. Sequenzkomplementaritäten zwischen PSTVd und 5S rRNA konnten mit dem DotPlot-Algorithmus ([www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/DotPlotform.html](http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/DotPlotform.html)) identifiziert werden.

# Kapitel 3

## Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Aufreinigungssystems, das die Charakterisierung wirtseigener RNAs ermöglichen sollte, die eine stabile Wechselwirkung mit Viroid-RNA eingehen. Die experimentellen Grundlagen waren in früheren Arbeiten geschaffen worden, in denen es gelungen war, mindestens eine zelluläre RNA aus Kartoffelsuspensionszellkulturen durch Behandlung mit Psoralen kovalent an die Obere Zentrale Konservierte Region von PSTVd zu binden. Diese RNA weist eine Größe von unter 150 nt auf (Thiel 1999). Es muss jedoch bedacht werden, dass es darüber hinaus noch weitere Nukleinsäuren geben kann, die direkt oder indirekt mit PSTVd interagieren können.

Das zu etablierende Isolationsverfahren sollte sich die Fähigkeit dieser Wirts-RNAs zu Nutze machen, durch Psoralen quervernetzbare Komplexe mit PSTVd auszubilden. Voraussetzung hierfür ist eine Wechselwirkung auf der Basis von Basenpaarungen. Nur unter diesen Bedingungen kann Psoralen in eine Doppelhelix interkalieren und nach Absorption von langwelligem UV-Licht (320–380 nm) ein Pyrimidin-Psoralen-Pyrimidin Diadukt ausbilden, welches die Helixstränge kovalent verknüpft (Cimino *et al.* 1985). Die Stabilität nicht durch Psoralen fixierbarer Interaktionen wäre während einer Isolation nicht zu gewährleisten.

Im Folgenden werden zwei Strategien betrachtet, die es erlauben sollten, die gesuchte RNA aufzureinigen, um eine anschließende Identifikation, z.B. durch Sequenzierung, durchzuführen.

### 3.1 Vergleich verschiedener experimenteller Ansätze

#### 3.1.1 Fraktionierung zellulärer RNA und Test auf eine mögliche Interaktion mit PSTVd

Differentielle Präzipitationen, Chromatographietechniken etc. erlauben die Anreicherung einzelner Nukleinsäuren, die in *in vitro*-Quervernetzungsexperimenten (siehe Abschnitt 2.7.1) auf ihre Hybridisierungsfähigkeit mit PSTVd untersucht werden können. Die so gewonnenen Fraktionen werden erneut Aufreinigungsprozeduren unterworfen, bis die gesuchte RNA sequenzierbar ist.

Dieser Ansatz setzt jedoch einen eindeutigen Nachweis der Verknüpfung zwischen zellulärer RNA und Viroidmolekülen voraus.

Viroidspezifische „Northern“-Analysen zeigten in vorangegangenen Arbeiten (Gruner 1992 und Thiel 1999) nach *in vitro*-Komplexeinstellung eine von dem Psoralenderivat AMT abhängige Verzögerung der PSTVd-RNA in denaturierenden Polyacrylamidgelen. Dies erlaubt aber keine Differenzierung zwischen intermolekularen, reinen Viroidkomplexen und solchen, die eine Wirts-RNA enthalten. Abbildung 3.1, Spur 2 belegt die Existenz solcher Vernetzungen von mehreren PSTVd-Molekülen miteinander. Der Vergleich zu Spur 4, in der sowohl homomolekulare als auch heteromolekulare Viroidkomplexe vorliegen sollten, zeigt, dass kein qualitativer Unterschied erkennbar und eine Differenzierung damit unmöglich ist. Solche Verzögerungen konnten in *in vivo*-Quervernetzungsexperimenten an Protoplasten aus Kartoffelsuspensionszellkulturen nicht zuverlässig detektiert werden.

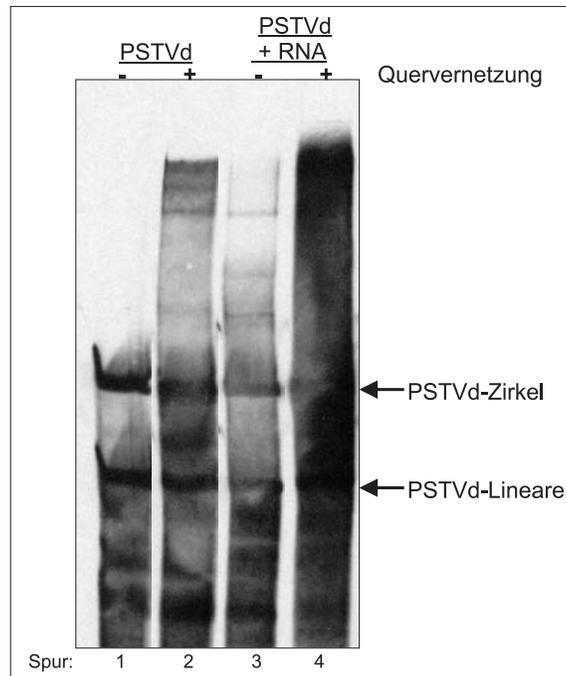


Abbildung 3.1: Vergleich verschiedener RNA-Extrakte vor und nach der *in vitro*-Quervernetzung mit Psoralen (siehe auch Abschnitt 2.7.1). Die RNA wurde in einem denaturierenden 5% PAA-Gel (43:1) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer Digoxigenin-markierten (+)PSTVd spezifischen Sonde hybridisiert. Spuren 1 und 2 zeigen 182 ng HPLC aufgereinigtes Viroid, Spur 3 und 4 je 2.9 µg differenziell präzipitierte RNA aus Tomaten (siehe Abschnitt 2.3.2).

*In vivo* durchgeführte Verknüpfungen wurden daher mit der Methode der Primer Extension an PSTVd analysiert. Dazu wurden die Abbruchmuster *in vivo* quervernetzter Viroide mit entsprechenden ohne Psoralenbehandlung verglichen. Als weitere Kontrollen wurden *in vitro*-komplexierte und quervernetzte zirkuläre Viroide sowie (+)/(-)Hybride aus dimeren PSTVd-*in vitro*-Transkripten analysiert. Signale, die nur in den mit AMT behandelten RNA-Extrakten auftraten, wurden als Wechselwirkungspunkte mit einer pflanzlichen RNA gewertet. Die Nukleotide U<sub>83</sub> und U<sub>90</sub> konnten demnach als Interaktionsstellen diskutiert werden (Thiel 1999).

Bei genauerer Betrachtung war diese Interpretation jedoch nicht weiter tragbar. Sinnvoll war

es, die zuvor beschriebenen Primer Extension-Signale mit denen von multimeren (+)Strang-*in vitro*-Transkripten nach *in vitro*-Quervernetzung (Abschnitt 2.7.1) abzugleichen. Dies war notwendig, da im asymmetrischen „rolling circle“ Replikationszyklus von *Pospiviroidae* multimere (+)Strang-Intermediate auftreten, die eine Reihe metastabiler Sekundärstrukturen durchlaufen. Betrachtet man Strukturverteilungen von (+)Strang-*in vitro*-Transkripten mit einer Verdoppelung der UCCR, so bilden diese im duplizierten Bereich eine Helix aus (Baumstark und Riesner 1995, Baumstark *et al.* 1997). In dieser Helix stehen sich zwei U<sub>90</sub> Nukleotide in einer durch Psoralen quervernetzbaaren Situation diagonal gegenüber. Werden zusätzliche Kontrollen mit dimeren (+)Strang-Hybriden nach *in vitro*-Quervernetzung in einer Primer Extension-Analyse untersucht, so weisen diese ein deutliches Abbruchsignal an Position U<sub>90</sub> auf (Daten nicht gezeigt). Damit kann dieses Nukleotid nicht mehr eindeutig als Interaktionsstelle mit einer Wirts-RNA interpretiert werden.

Die PSTVd-Primärstruktur im Bereich des Nukleotides U<sub>83</sub> erlaubt keinen durch Psoralen kovalent fixierbaren Kontakt zu einer anderen RNA. In dem interessierenden Bereich hat PSTVd folgende Sequenz: 5'-CUU<sub>83</sub>C-3'. Eine RNA, die hier gemeinsam mit der UCCR eine Doppelhelix ausbilden könnte, müsste demnach die Sequenz 3'-G(A/G)(A/G)G-5' aufweisen. Dabei ist bereits berücksichtigt, dass RNA-Moleküle sowohl G-A als auch G-U Basenpaare ausbilden können. In keinem der möglichen Fälle wird jedoch eine Doppelhelix mit diagonal gegenüberstehenden Pyrimidinbasen entstehen. Ein Primer Extension-Abbruchsignal an dieser Position ist demnach nicht durch eine lokale Quervernetzung erklärbar, sondern muss auf einen sekundären Effekt zurückzuführen sein. Das gleiche Muster erhält man, wenn HPLC-aufgeklärte Viroide ohne Denaturierung und Renaturierung direkt vernetzt werden. Es korreliert mit dem Auftreten einer Sekundärstruktur, die einer aus dimeren (+)Strang-*in vitro*-Transkripten gebildeten Trihelix entspricht (Steger *et al.* 1986).

Damit erlaubt die Methode der Primer Extension ebensowenig wie die viroidspezifische „Northern“-Analyse den eindeutigen Nachweis einer Wechselwirkung zwischen PSTVd und pflanzlichen Ribonukleinsäuren.

In der Literatur wird beschrieben, dass mit Psoralen vernetzte Nukleinsäuren anhand von zweidimensionalen Gelsystemen analysiert werden (Hausner *et al.* 1990). In dem aufgeführten Fall waren alle Wechselwirkungspartner bekannt, und ihr Verhalten vor und nach Reversion der Quervernetzung konnte gezielt überprüft werden. Da bereits eindimensionale Gelanalysen (s. Abbildung 3.1) zeigen, wie groß der Hintergrund an homomolekularen PSTVd-Komplexen und an Degradationsprodukten in den Proben ist, erscheint es unwahrscheinlich, davor einen Komplex zu einer zellulären RNA unbekannter Sequenz bzw. die zelluläre RNA selber ausfindig machen zu können.

Da das hier beschriebene Aufreinigungsprinzip außerdem nur die Isolation von *in vitro* wechselwirkenden Partnern erlaubt, und diese Ergebnisse nicht unbedingt auf die Situation in der Zelle übertragbar sind, wurde der vorgestellte Ansatz zu Gunsten des im Folgenden beschriebenen nicht weiter verfolgt.

### 3.1.2 Aufreinigung des Komplexes und Analyse der Komponenten

Über Psoralen geschlossene, kovalente Quervernetzungen von RNAs können durch Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht der Wellenlänge 254 nm aufgelöst werden (Lipson und Hearst

1988). Trennt man PSTVd enthaltende Komplexe über eine viroidspezifische Affinitätschromatographie von dem Rest an pflanzlichen RNAs ab, revertiert die Quervernetzung und separiert die gesuchte RNA von den Viroidmolekülen, so ist es möglich, Aussagen über Anzahl und Größe der gesuchten RNAs zu treffen. Anschließend erfolgt eine weitere Aufreinigung bis zur Sequenzierbarkeit. Am *in vitro*-System etablierte Verfahrensweisen sind direkt auf das *in vivo*-System an Protoplasten aus Kartoffelsuspensionszellkulturen übertragbar.

Da diese Strategie das experimentelle Konzept der vorliegenden Arbeit beinhaltet, folgt eine detaillierte Beschreibung der Vorgehensweise in den nächsten Abschnitten dieses Kapitels.

## 3.2 Etablierung eines Aufreinigungsprotokolls

Grundlage der in Abschnitt 3.1.2 skizzierten Aufreinigungsstrategie ist die spezifische Anreicherung von PSTVd-Komplexen aus RNA-Extrakten. Als affinitätschromatographisches Verfahren bot sich das Biotin-Streptavidin System an. 1 Mol Streptavidin bindet dabei 4 Mol Biotin mit einer Bindekonstanten von  $10^{15}$ . Dies ist eine der größten Bindekonstanten, die für nicht kovalente Bindungen bekannt ist. Wird das Streptavidin an paramagnetischen Partikeln („Dynabeads“) immobilisiert, erlaubt dies eine Isolierung der zuvor mit Biotin markierten Nukleinsäuren mit einem Magneten. Die Anwendungen hierfür sind vielfältig und werden in der Literatur beschrieben (z.B.: Dieguez-Lucena 1993, van Doorn *et al.* 1994a, Espelund *et al.* 1990, Gilgen *et al.* 1995, Green *et al.* 1990, Lankiewicz *et al.* 1997, Muir *et al.* 1993, Reyes-Engel und Tagle *et al.* 1993). Allen Verfahren ist gemeinsam, dass der Einsatz von Streptavidin-Partikeln zu einem beträchtlichen Zeitgewinn führt. In den beschriebenen Fällen war die jeweilige Zielsequenz jedoch bekannt und konnte demzufolge alleine isoliert und spezifisch nachgewiesen werden. Keine Arbeit wies eine der hier gegebenen Situation vergleichbare Problematik auf. Die experimentellen Methoden waren daher nur auf einzelne Teilschritte der vorliegenden Arbeit übertragbar.

Um Viroide und kovalent gebundene Wechselwirkungspartner aus mit Psoralen quervernetzten Nukleinsäure-Extrakten zu isolieren, mussten PSTVd-spezifische, mit Biotin markierte Sonden zugegeben und an die Zielmoleküle hybridisiert werden. Dieser Prozess wird im Folgenden als Maskierung bezeichnet. Die Auswahl geeigneter Sonden stellt einen Kernschritt des zu etablierenden Verfahrens dar, da diese die Spezifität und Effektivität der Aufreinigung entscheidend beeinflussen. Durch Inkubation mit Streptavidin-haltigen, paramagnetischen Partikeln („Dynabeads“) lassen sich die PSTVd-Sonden-Hybride mit einem Magneten von der restlichen Nukleinsäure separieren. Die Stringenz dieser Reaktion trägt ebenfalls erheblich zum Gelingen der Isolation bei.

Für eine Analyse der zellulären Komplexkomponente war es im folgenden notwendig, diese aus dem Verbund mit PSTVd freizusetzen. Verschiedene Verfahren stehen zur Verfügung, um Psoralen-abhängige Quervernetzungen wieder aufzulösen. Um abschließend die gesuchte zelluläre RNA in möglichst großer Menge nachweisen zu können, musste dieser Arbeitsschritt möglichst quantitativ erfolgen. Das geeignetste Verfahren war daher zu ermitteln.

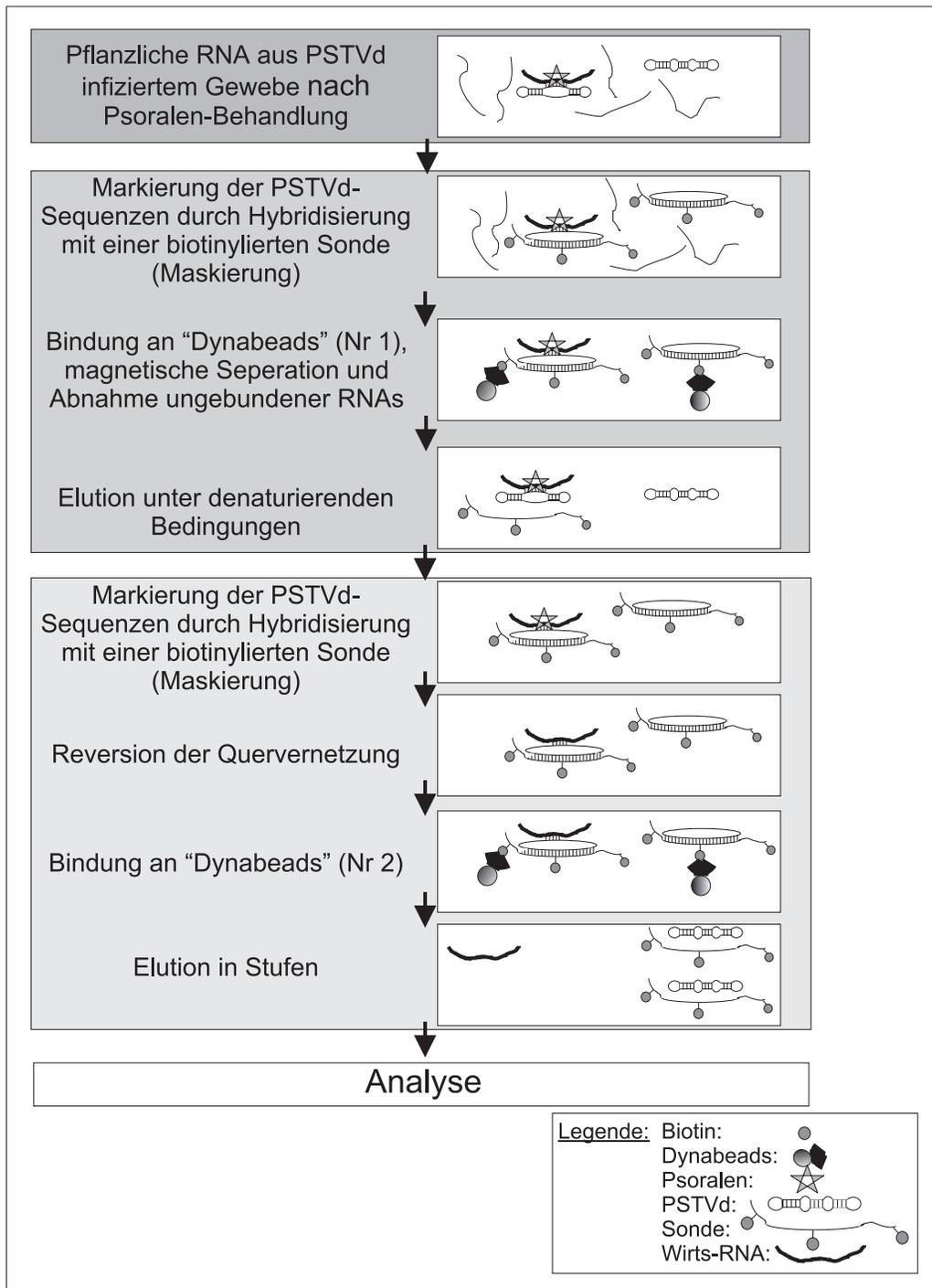


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des experimentellen Konzeptes

Mit einem zweiten Reinigungsschritt sollte zum Einen die Qualität der gesamten Isolation verbessert und zum Anderen die zelluläre RNA von den Viroidmolekülen getrennt werden. Aufgereinigte Viroide sowie zugegebene Sonden lagen im Vergleich zu der gesuchten RNA in einem großen Überschuss vor. Vor dem Hintergrund von homomolekularen Viroidkomplexen und Degradationsprodukten war es nicht möglich, eine unbekannte RNA nachzuweisen. Daher mussten die Elutionsbedingungen im Anschluss an eine zweite Biotin-Streptavidin-Affinitätschromatographie so gewählt werden, dass eine RNA, die eine Wechselwirkung mit PSTVd über wenige Nukleotide ausbildet, bereits eluiert, PSTVd aus Hybriden der biotinylierten Sonde oder die Sonde selber aber nicht.

Auf diese Weise erhaltene Fraktionen waren auf ihren Gehalt an Wirts-RNA zu analysieren. Der Nachweis pflanzlicher RNA-Fragmente musste dabei eindeutig und Sequenz-unabhängig erfolgen. Darüberhinaus war zu gewährleisten, dass nachgewiesene Fragmente zuvor über Psoralen an PSTVd verknüpft vorlagen.

Abbildung 3.2 fasst das vorgestellte, experimentelle Konzept noch einmal zusammen. Details über Motivation, Reihenfolge und Durchführung der einzelnen Punkte werden in den folgenden Abschnitten bis Seite 63 ausführlicher diskutiert.

### 3.2.1 Paramagnetische Streptavidin-Partikel

Aufgrund ihrer besonderen Bedeutung für das hier etablierte Isolationsverfahren soll zunächst ausführlich auf die Anwendung der paramagnetischen Streptavidin-Partikel („Dynabeads“) eingegangen werden.

Es werden zwei experimentelle Konzepte zur Fixierung von Nukleinsäure-Liganden an Streptavidin-Partikel unterschieden:

Während in einem direkten Ansatz zunächst die Bindung der biotinylierten Sonde an die „Dynabeads“ erfolgt und erst nachträglich die Hybridisierung an die Ziel-Nukleinsäure zeigt der indirekte Ansatz eine reziproke Reihenfolge. Primär werden die Sonden-Moleküle an die aufzureinigenden Nukleinsäuren gebunden, um anschließend an den Partikeln immobilisiert zu werden. Für komplexe Hybridisierungsreaktionen und für die Isolation niedrig konzentrierter Nukleinsäuren ist laut Hersteller der indirekte Weg zu bevorzugen. Abbildung 3.3 zeigt die standardmäßig durchgeführten „Dynabeads“-Anwendungen. Die Ausgangssituation entspricht dem indirekten Verfahren, die Ziel-Nukleinsäure, also PSTVd, liegt bereits an die Sonde hybridisiert vor.

Durch Zugabe der „Dynabeads“ beginnt die eigentliche Aufreinigung. Die quantitative Bindung der biotinylierten Hybride bedingt dabei eine minimal einzusetzende Menge an paramagnetischen Partikeln. Diese sollte aus ökonomischen Gesichtspunkten auch nicht überschritten werden. Die genauen Konzentrationsverhältnisse werden im Folgenden für jeden Einzelfall angegeben, lagen in der Regel jedoch bei ca.  $1 \mu\text{g}$  „Dynabeads“ pro 2–3 ng Sonde. Im Gegensatz zu einer Biotin-Streptavidin-Bindung in Lösung erfolgt die Biotin-Bindung an paramagnetische Streptavidin-Partikel nur bei 1 M NaCl optimal. Abweichungen von diesem Wert führten zu einer deutlich reduzierten Affinität (Daten nicht gezeigt).

Zu kurz gewählte Inkubationszeiten zeigen eine ähnlich suboptimale Wirkung. Mit zunehmender Größe der aufzureinigenden Fragmente sollten laut Herstellerangaben auch zunehmend längere Reaktionszeiten gewählt werden. In der Literatur werden Zeiträume bis 30 Minuten

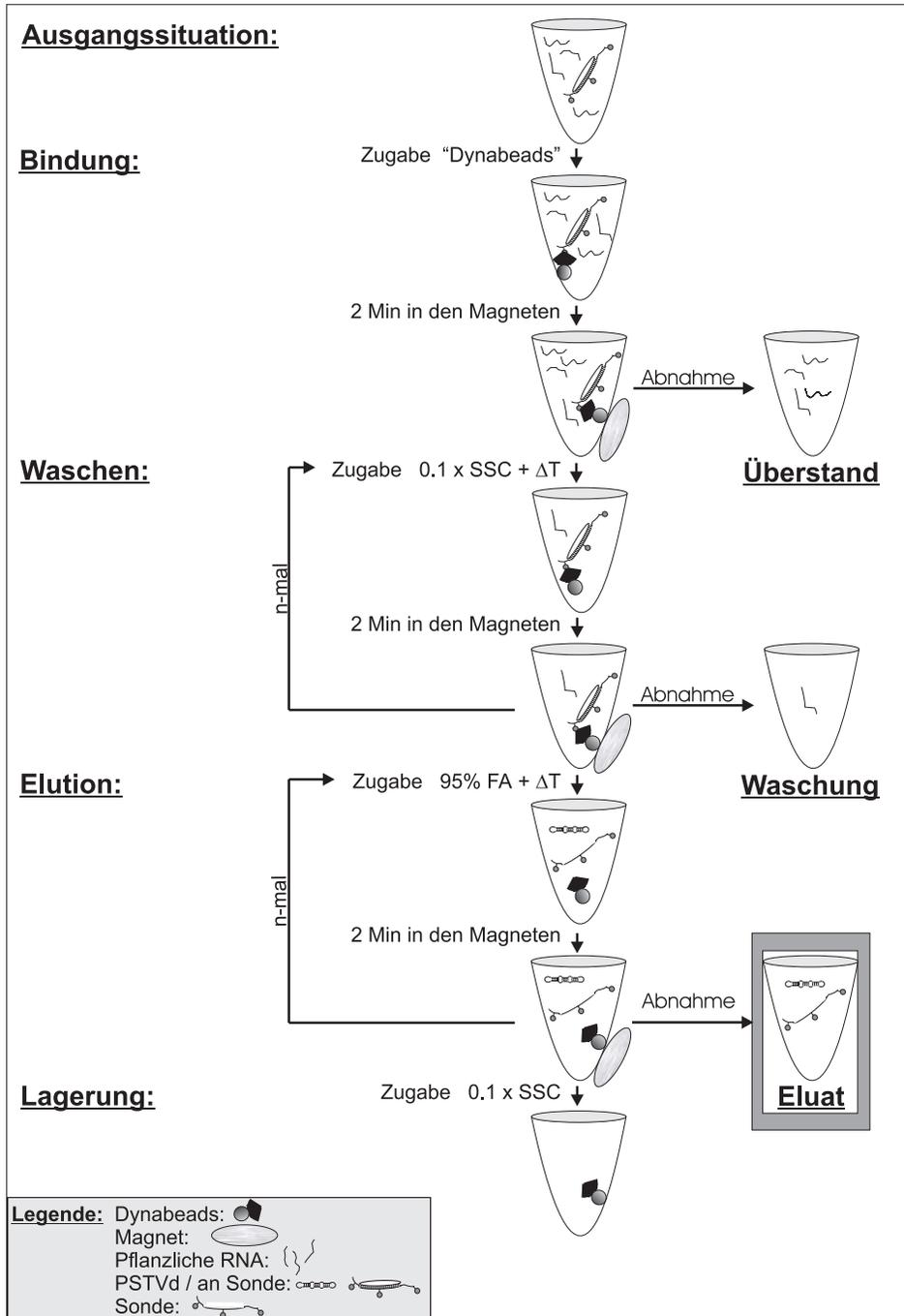


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des experimentellen Konzeptes einer Aufreinigung an „Dynabeads“. 95% FA: Elutionslösung mit 95% Formamid und 10 mM EDTA pH 8.2; ΔT: Temperaturerhöhung; 0.1 x SSC, entspricht 15 mM NaCl

angegeben. Da die Größe des hier gesuchten RNA-Komplexes nicht bekannt war und eine verlängerte Inkubationszeit keine nachteiligen Effekte mit sich bringen sollte, wurde die Vorgabe von 30 Minuten übernommen. Innerhalb dieser Zeit sedimentieren die Partikel jedoch aufgrund ihres Eigengewichtes auf den Boden des Reaktionsgefäßes. Um dem entgegenzuwirken erfolgte die Inkubation bei langsamer Rotation (ca. 1 Umdrehung/8 min).

Danach wurde die Probe für zwei Minuten in einen Magneten überführt. Die paramagnetischen Partikel wurden hier an der Wand pelletiert und der Großteil an pflanzlicher RNA konnte mit dem Überstand abgenommen werden.

Für die Qualität einer Aufreinigung ist die Stringenz der nachfolgenden Waschschriffe mitbestimmend. Es gelten die gleichen Konditionen wie für eine Filterhybridisierung. Erhöhung der Temperatur bei niedrigen Salzkonzentrationen in möglichst großem Volumen führt zu der Elution nicht spezifisch gebundener Nukleinsäuren. Die Temperatur sollte hier zwar möglichst hoch, nicht jedoch höher als 5–10 °C unterhalb des  $T_m$ -Wertes des Hybrides liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde wahlweise mit  $0.1\times$  SSC (15 mM NaCl) oder  $H_2O$  bei wechselnden Temperaturen gearbeitet. Dabei wurden mehrere Waschzyklen hintereinander durchgeführt. Nach jeder Waschung wiederholte sich die Separation mit dem Magneten und die gebrauchte Waschlösung konnte abgenommen werden.

Die Elution der über Biotin an Streptavidin verankerten Nukleinsäuren erfolgte gemäß der Herstellerangaben mit 95 % Formamid, 10 mM EDTA pH 8.2 (im Folgenden FA-Lösung genannt) bei 70 °C. Durch die Auflösung der Proteinkonformation wurde das Biotin trotz einer Dissoziationskonstanten von  $10^{-15}$  aus der Bindung an Streptavidin freigesetzt. Durch mehrfache Ausführung der Elution konnte die Ausbeute an aufgereinigter RNA optimiert werden. Die Partikel waren danach nicht wieder zu verwenden (Daten nicht gezeigt).

Alternativ erfolgte die Elution nicht quervernetzter Nukleinsäuren in dem zweiten Reinigungsschritt unter minder stringenten Bedingungen. Die Inkubation in  $0.1\times$  SSC oder  $H_2O$  bei erhöhter Temperatur erlaubte die Anreicherung von RNAs, die nur über wenige Nukleotide an PSTVd gebunden vorlagen (nicht in Abb. 3.3 dargestellt). Die nach der magnetischen Separation abgenommenen Fraktionen wurden direkt in einer Gelelektrophorese analysiert oder nach einer Präzipitation weiterbearbeitet.

### 3.2.2 Maskierung von PSTVd mit einer Biotin-markierten Sonde

Die Erkennung von Biotin durch Streptavidin erfolgt effektiv und hoch-spezifisch. Unbiotinylierte Nukleinsäuren werden nicht an den paramagnetischen Partikeln immobilisiert. Demzufolge werden Selektivität und Effektivität der Aufreinigung durch die Wahl der richtigen Biotin-markierten Sonde entscheidend mitbestimmt. Um optimale Ergebnisse erzielen zu können, sind folgende Kriterien zu berücksichtigen:

1. Nur Zielsequenzen (PSTVd) dürfen erkannt werden, um eine spezifische Isolation zu gewährleisten.
2. Alle Sondenmoleküle sollten mindestens eine Biotin-Modifizierung tragen, um an die „Dynabeads“ binden zu können.

3. Die Sonden müssen die im Reaktionsansatz vorliegenden Viroide quantitativ maskieren. Dabei ist zu beachten, dass die Assoziationsreaktionen biotinylierter Nukleinsäuren ab einem Verhältnis von Biotin-UTP zu UTP von über 5 % (bei statistischem Gesamt-UTP Anteil) verlangsamt ablaufen. Absolut gesehen entspricht dies einem Anteil von 1.25% markierter Nukleotide auf die Gesamtlänge (Langer *et al.* 1981, Gebeyehu *et al.* 1987).
4. Um Punkt 3. zu erfüllen, kann es notwendig sein, im Vergleich zu Viroid-RNA überproportional viel Sonde in den Maskierungsansatz zu geben. Dieser Überschuss sollte möglichst weitgehend entfernt werden, um die Kosten für die Aufreinigung, insbesondere für „Dynabeads“, zu minimieren.
5. Die maskierten Viroide und Viroidkomplexe müssen effizient an die Streptavidin-Partikel binden. Der Einsatz von Sonden mit niedrigem Biotin-Anteil führt erfahrungsgemäß während der Bindung an die Partikel zu einer Diskriminierung von großen Nukleinsäuren (Korn *et al.* 1994). Unter Berücksichtigung von Punkt 3. hat sich hier ein Biotinylierungsgrad von 2 % auf 1.5 kbp als zufriedenstellend erwiesen. Die gleichzeitige Verwendung von verschiedenen, geringer markierten Sonden ist ineffizient, da sich im Kontakt zu den paramagnetischen Kügelchen sterische Hinderungen ergeben können (van Doorn *et al.* 1994b).
6. Eine anschließende Analyse erfordert die möglichst vollständig Elution der Komplexe von den Partikeln.

In den folgenden zwei Abschnitten werden die Sonden vorgestellt, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert werden konnten.

### 3.2.2.1 Monomere PSTVd-*in vitro*-Transkripte mit (-)Strang-Sequenz als Sonde

Erste Experimente mit Oligonukleotiden hatten gezeigt, dass eine vollständige Maskierung aller Viroidmoleküle (Punkt 3. Seite 41) nicht nur wegen der zu wählenden Biotinkonzentration sondern auch aufgrund der Selbstkomplementarität von PSTVd ein Problem darstellt. Eine Komplementarität über 20 bis 25 Nukleotide reichte nicht aus, um Viroidmoleküle in einer Reaktion zweiter Ordnung zu maskieren und damit die Ausbildung der thermodynamisch optimalen Stäbchenstruktur zu verhindern. Um dies zu umgehen, war es sinnvoll, längere Ribonukleinsäuren als Sonden einzusetzen. Bereits in einer früheren Arbeit (Zimmat 1987) war es gelungen, PSTVd-Moleküle nach äquimolarer Zugabe von monomeren (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripten unter geeigneten Hybridisierungsbedingungen in einer anschließenden nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese vollständig zu verzögern. Mit einer Biotin-Modifikation versehen wären solche *in vitro*-Transkripte also aussichtsreiche Kandidaten für die gesuchte Sonde.

Die spezifische Biotinylierung von Nukleinsäuren ist sowohl photochemisch (Forster *et al.* 1985) als auch enzymatisch durch Nick Translationsreaktionen (Gebeyehu *et al.* 1987) oder *in vitro*-Transkription mit dem T7-System (Langer *et al.* 1981) möglich. Bakteriophagen-Polymerase T7 erkennt Biotin-UTP (Bio-UTP) als Substrat an, welches im Vergleich zu nicht

modifizierten Nukleotiden um einen Diskriminierungsfaktor  $k$  schlechter in das Transkript inkorporiert wird. Eine Reihe von Bio-UTP-Derivaten sind kommerziell erhältlich. Allen gemeinsam sind die Komponenten UTP und Biotin, die über verschieden lange Brücken miteinander verbunden werden. Art und Länge der Querverbindung haben einen Einfluss auf die Diskriminierungsrate  $k$  und werden in der Bezeichnung der einzelnen Derivate durch eine Zahl gekennzeichnet. Abbildung 3.4 stellt beispielhaft ein Biotin-16-UTP Molekül schematisch dar.

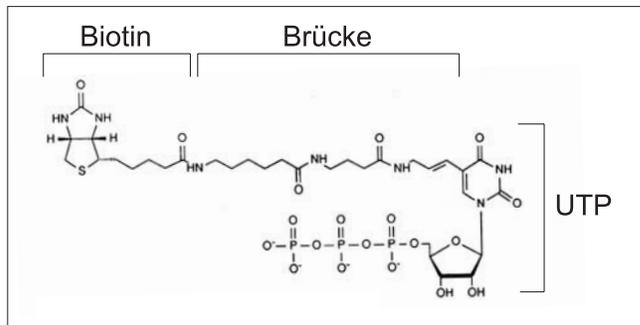


Abbildung 3.4: *Biotin-16-uridin-5-triphosphat (Roche Mannheim)*

Der Biotinylierungsgrad von T7-*in vitro*-Transkripten kann sowohl durch die Wahl des Bio-UTP-Derivates als auch durch das Konzentrationsverhältnis von Bio-UTP zu UTP im Transkriptionsansatz bestimmt werden. Es musste nun untersucht werden, ob es möglich ist, einen Pool von (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripten zu synthetisieren, in dem jedes Molekül mindestens eine Biotin-Modifikation (Punkt 2. Seite 41) aber höchstens 7 Bio-UTPs (Punkte 3. und 5.) enthält. Dies entspricht 2 % der 359 Nukleotide der PSTVd-Primärstruktur. Systematische Analysen der Inkorporationsrate von Bio-4-UTP und Bio-11-UTP in (+)PSTVd-*in vitro*-Transkripten hatten bereits gezeigt, dass beide Derivate einen Diskriminierungsfaktor von 3 bis 4 aufweisen. Bei einem Anteil von 20 % Bio-UTP zu Gesamt-UTP im Transkriptionsansatz lagen nahezu alle Transkripte markiert vor, wobei keine Fragmente mit mehr als 8 biotinylierten Nukleotiden nachgewiesen werden konnten. Die meisten Moleküle enthielten 3 bis 6 Modifikationen (Theissen *et al.* 1989 und Theissen 1987).

Keines dieser Derivate konnte jedoch für die gegebene Fragestellung verwendet werden. Die Brücke zwischen Biotin und UTP besteht in Bio-4-UTP aus 4 Kohlenstoffatomen. Für eine erfolgreiche Bindung an die Streptavidin-Partikel empfiehlt der Hersteller aber eine Länge von mindestens 6 Atomen. Bio-11-UTP ist zwar käuflich zu erwerben, der Preis liegt aber um ein Vielfaches über dem anderer Bio-UTP-Derivate. Daher wurde untersucht, ob sich die genannten Ergebnisse auf mit Bio-16-UTP markierte Transkripte übertragen lassen. Deren Synthese erfolgte mit 20 % Bio-16-UTP im Reaktionsansatz.

Ein Verfahren zur Bestimmung des Biotinylierungsgrades von Nukleinsäuren war bereits bekannt (Theissen 1987). Diesem Ansatz liegt das Prinzip zugrunde, dass biotinylierte Nukleinsäuren durch Biotin-bindende Proteine wie Streptavidin in einer Gelelektrophorese retardiert werden. Das Ausmaß der Mobilitätsverringerung steht dabei mit dem Grad der Biotinylierung in einem direkten Verhältnis. Abbildung 3.5 zeigt das Ergebnis einer solchen Gelverzögerung.

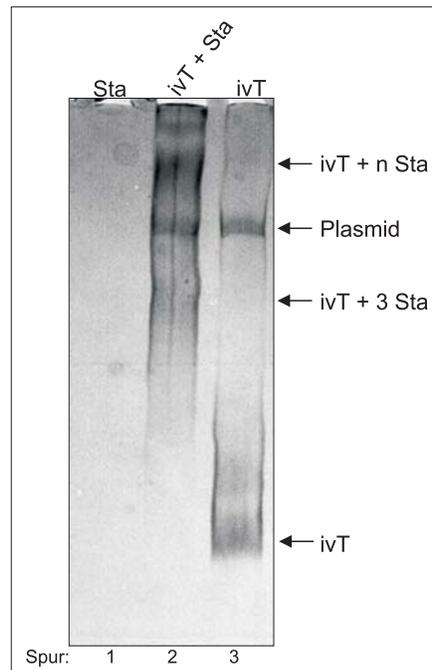


Abbildung 3.5: Streptavidin-Verzögerungsgel biotinylierter *in vitro*-Transkripte. Dargestellt ist ein 5 % Polyacrylamidgel (29:1);  $1\times$  TBE;  $15^\circ\text{C}$  nach der Silberfärbung. Erste Spur:  $1\ \mu\text{g}$  Streptavidin (Sta); zweite Spur:  $200\ \text{ng}$  Biotin-markiertes (-)PSTVd-*in vitro*-Transkript (ivT) plus  $1\ \mu\text{g}$  Streptavidin; dritte Spur:  $200\ \text{ng}$  Biotin-markiertes (-)PSTVd-*in vitro*-Transkript. ivT + n Sta: Biotin-markierte Transkripte mit unbekannt vielen Streptavidin-Molekülen komplexiert; ivT + 3 Sta: Komplexe aus *in vitro*-Transkripten mit 3 Streptavidin-Molekülen

Die erste Spur der Abbildung bestätigt, dass Streptavidin in einer Silberfärbung nicht nachgewiesen wird. In der dritten Spur sind nicht verzögerte *in vitro*-Transkripte sowie ein Rest an Plasmid-DNA zu erkennen. Der Vergleich mit der mittleren Spur zeigt eine deutliche Retardation durch Inkubation mit Streptavidin. Ungebundenes Transkript kann hier nicht mehr nachgewiesen werden. Demzufolge waren alle Fragmente mindestens einmal mit Biotin modifiziert. Bei genauerer Betrachtung erkennt man Banden geringer Mobilität. Diese werden als Komplexe unterschiedlich biotinylierter *in vitro*-Transkripte interpretiert, an die dementsprechend 1 bis  $n$  Streptavidinmoleküle gebunden haben. Aus der Verteilung dieses Bandenssembles konnte im Vergleich mit den veröffentlichten Daten (Theissen *et al.* 1989) geschlossen werden, dass der Biotinylierungsgrad nach Zugabe von Bio-16-UTP dem nach Zugabe von Bio-11-UTP entspricht. Das bedeutete, dass die meisten Transkripte 3 bis 6 mal modifiziert wurden und keine Transkripte mehr als 8 Bio-16-UTP-Moleküle enthielten. Dies entspricht einem maximalen Biotinylierungsgrad von 2.2 %.

Damit erfüllen Biotin-markierte (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripte voller Länge Punkt 2 der Kriterienliste zur Auswahl einer geeigneten Sonde von Seite 41.

Kriterium Nr. 3 fordert eine vollständige Maskierung aller Viroide durch die Sonde. Für nicht modifizierte Transkripte konnte dies bereits gezeigt werden (Zimmat 1987). Durch thermische Denaturierung und langsame Renaturierung wurden Komplexe der PSTVd-Moleküle

alleine, der biotinylierten *in vitro*-Transkripte alleine sowie der PSTVd-Moleküle mit den modifizierten *in vitro*-Transkripten zusammen eingestellt. Wie Abbildung 3.6 zeigt, migrieren die Transkript-Komplexe (Spur 1) in einem nativen Polyacrylamidgel im Vergleich zu unbehandelten Transkripten (Spur 4) in einer deutlich verzögerten Bande. HPLC-aufgecleanigte Viroide bilden unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine einheitliche Sekundärstruktur bzw. Komplexe aus. Man erkennt einen Nukleinsäure-Schmier über weite Bereiche von Spur 3. Nach Inkubation beider, in äquimolarer Konzentration zugegeben Komponenten treten hochmolekulare Aggregate auf, deren Retardation von der Geltasche bis zu den Plasmid-DNA Fragmenten reicht (Spur 2). Diese konnten in keiner der Kontrollspuren nachgewiesen werden und sind daher auf PSTVd-Transkript-Hybride zurückzuführen. Da keine Transkripte außerhalb dieses Bereiches detektiert werden können, liegen sie vollständig an PSTVd gebunden vor. Aufgrund der Intensität der erhaltenen Signale kann geschlossen werden, dass ebenfalls alle PSTVd-Moleküle an die Sonde gebunden wurden. Die Biotinylierung beeinflusst demzufolge eine Hybridisierung an PSTVd nicht.

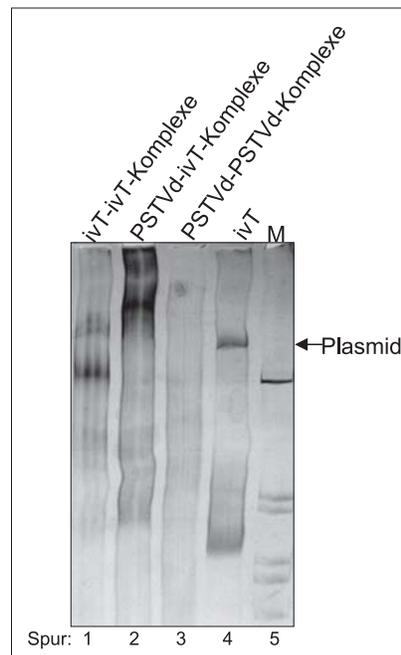


Abbildung 3.6: Analyse von PSTVd, Biotin-markierten *in vitro*-Transkripten (*ivT*) und PSTVd-*ivT*-Komplexen. Die Elektrophorese erfolgte über ein 5 % Polyacrylamidgel (29:1);  $1\times$  TBE bei  $15^\circ\text{C}$ . Komplexe wurden durch thermische Denaturierung und langsame Renaturierung eingestellt. Aufgetragen wurden 100 ng *ivT* nach Komplexeinstellung durch Hybridisierung (Spur 1); 200 ng PSTVd-*ivT* Komplex (Spur 2); 100 ng PSTVd nach selbst-Hybridisierung (Spur 3) sowie 100 ng Biotin-markierte (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripte (*ivT*) (Spur 4). Spur M: Längenstandard, pBR322<sub>Hinf</sub>I, Fragmentlängen: 1631, 517, 506, 396, 344 bp

Biotin-markierte *in vitro*-Transkripte erfüllen somit Kriterium Nr. 3, und erlauben eine vollständige Maskierung aller Viroide. Da die Zugabe äquimolar erfolgt, entfällt Punkt Nr. 4. Es entsteht kein Sonden-Überschuss, der entfernt werden müsste.

Es stellte sich nun die Frage, ob so große Sondenmoleküle mit einem Biotinylierungsgrad von

ca. 1–2 % effizient an die Streptavidin-Kügelchen binden, und ob sie von diesen wieder eluiert werden können. Dazu wurden die *in vitro*-Transkripte mit vorbereiteten „Dynabeads“ inkubiert (siehe auch Abschnitt 2.9.2), der Überstand abgenommen und die Partikel gewaschen. In Abbildung 3.7 Spur 1 ist zu erkennen, dass lediglich Plasmid-Reste in dem Überstand verblieben. Trotz Inkubation bei 70 °C in 15 mM NaCl konnte in den Waschschritten (Spuren 2–4) kein nennenswerter Anteil an Transkript nachgewiesen werden. Dagegen enthält das Eluat die durch Denaturierung des Streptavidins freigesetzten *in vitro*-Transkripte (Spur 6).

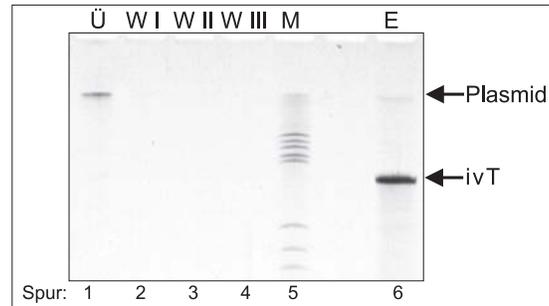


Abbildung 3.7: Verhalten Biotin-markierter (–)PSTVd-*in vitro*-Transkripte bei Zugabe von paramagnetischen Streptavidin-Partikeln und anschließender Elution. Dargestellt ist ein denaturierendes 5 % Polyacrylamidgel (29:1); 8 M Harnstoff; 1× TBE; 55 °C; Silberfärbung. 500 ng Transkript (*ivT*) wurden 30 Minuten in 1 M NaCl mit 190 µg „Dynabeads“ inkubiert. Der abgenommene Überstand wurde nach einer Ethanol-Präzipitation vollständig auf Spur 1 aufgetragen. Die Partikel wurden dreimal bei 70 °C in 15 mM NaCl gespült und 1/4 des jeweiligen Waschschrittes WI, WII und WIII ist in den Spuren 2–4 dargestellt. Spur M: 25 ng Längenstandard, pBR322Hae III mit den Fragmentlängen 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213 bp; Spur 6 zeigt die Fraktion nach Inkubation in FA-Lösung bei 70 °C. Es wurde 1/4 des Gesamteluates aufgetragen, das entspricht 125 ng eingebrachter Nukleinsäure.

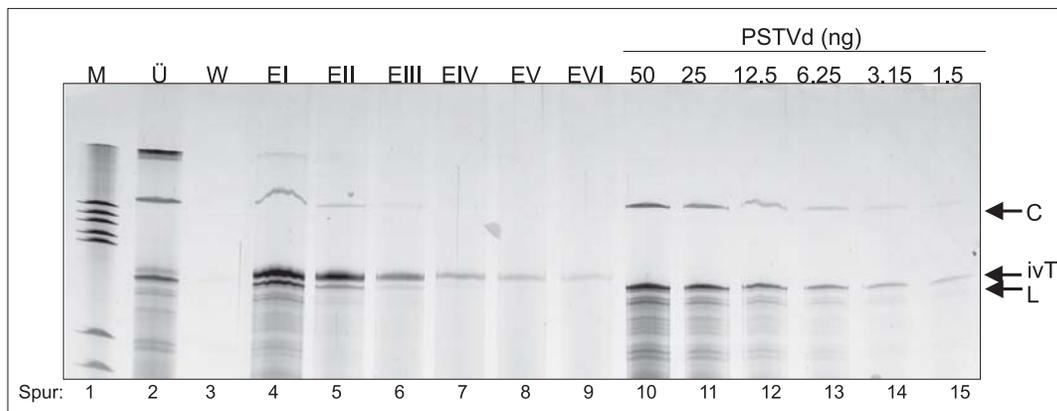


Abbildung 3.8: Bindung von PSTVd an „Dynabeads“ über Biotin-markierte (–)PSTVd-*in vitro*-Transkripte. Dargestellt ist ein denaturierendes 5 % Polyacrylamidgel (29:1); 8 M Harnstoff; 1× TBE; 55 °C; Silberfärbung. Nach Hybridisierung von 225 ng PSTVd an 225 ng Transkript (*ivT*) erfolgte die Inkubation mit 120 µg „Dynabeads“. Spur 1: Längenstandard, pBR322Hae III mit den Fragmentlängen 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234 bp; Spur 2: Überstand; Spur 3: 1/2 Waschschritt, der für 10 min in 15 mM NaCl bei RT durchgeführt wurde; Spuren 4–9: jeweils 1/4 von 6 Elutionen (EI–EVI), die bei 70 °C in 95 % Formamid durchgeführt wurden; Spuren 10–15: PSTVd Mengenstandard mit 50 ng, 25 ng, 12.5 ng, 6.25 ng, 3.15 ng und 1.5 ng; C: zirkuläres PSTVd; *ivT*: Biotin-markierte (–)PSTVd-*in vitro*-Transkripte; L: lineares PSTVd

Nachdem sichergestellt war, dass mit Biotin markierte *in vitro*-Transkripte effizient an die „Dynabeads“ binden können, musste untersucht werden, ob dies auch für daran hybridisierte Viroide zutrifft. Parallel zu Kriterium Nr. 5 wurde noch die PSTVd-Elutionsrate von den Partikeln gemessen (Kriterium Nr. 6). PSTVd-Transkript-Hybride wurden an „Dynabeads“ gebunden, nach Entfernung des Überstandes gewaschen und die RNA durch Erhitzen in FA-Lösung in 6 Fraktionen zurückgewonnen. Jeweils ein Aliquot der erhaltenen Fraktionen wurde elektrophoretisch analysiert. In Abbildung 3.8 erlaubt ein Vergleich mit den PSTVd-Konzentrationsstandards eine quantitative Abschätzung der Reaktionsausbeute. Ca. 10 % der Viroide konnten nicht an die „Dynabeads“ gebunden werden. Im Überstand sind sowohl zirkuläre als auch lineare PSTVd-Fragmente und Degradationsprodukte erkennbar. Dies ist auf eine falsche Abschätzung der relativen Konzentrationen zurückzuführen, da deutlich weniger Sonden-Moleküle in der entsprechenden Spur zu erkennen sind. Mit den ersten 3 Elutionsschritten konnten ca 90 % der gebundenen Viroide zurückgewonnen werden. In den anschließenden Fraktionen eluierten nur noch *in vitro*-Transkripte, so dass im weiteren Verlauf dieser Arbeit maximal 4 Elutionen hintereinander durchgeführt wurden.

Biotin-markierte monomere PSTVd-*in vitro*-Transkripte mit (-)Strang Sequenz erfüllen somit sowohl Kriterium 5 als auch 6. Bevor sie jedoch als Sonde in einer Aufreinigung eingesetzt werden konnten, sollte sichergestellt werden, dass sie ausschließlich Viroide maskieren und so eine spezifische Selektion der Zielmoleküle erlauben (Kriterium Nr. 1 Seite 41).

Ausgangsmaterial war ein RNA-Extrakt aus PSTVd-intermediate infiziertem *Lycopersicon esculentum* Blattgewebe nach Vorfraktionierung durch differentielle Präzipitationen (2.3.2). Abbildung 3.9 zeigt in den Spuren 10–12 einen solchen Extrakt in verschiedenen Konzentrationen. Viroide stellen etwa 2 % der gesamten RNA dar, wobei zirkuläre und lineare PSTVd-Moleküle in etwa äquimolar vorlagen.

Die Aufreinigung an den „Dynabeads“ erfolgte gemäß der bereits etablierten und beschriebenen Bedingungen. Abbildung 3.9 fasst die dabei erzielten Ergebnisse zusammen. Weniger als 4 % der Viroidmoleküle konnte nicht an die „Dynabeads“ gebunden werden und wurden im Überstand nachgewiesen. Während in der ersten Waschung noch zelluläre RNAs, insbesondere 5S rRNA und tRNA, von den Partikeln abgespült wurden, nahm der Hintergrund an unspezifisch gebundenen Nukleinsäuren mit jeder folgenden Fraktion ab. Der letzte Waschschritt erfolgte bei 70 °C und 15 mM NaCl (0.1× SSC). Unter diesen Bedingungen wurden bereits suboptimal gebundene PSTVd-Moleküle und *in vitro*-Transkripte wieder freigesetzt. In den Elutionsfraktionen konnten keine abundanten, pflanzlichen RNAs wie 5S rRNA oder tRNA detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden hier über 90 % der gebundenen Viroide zurückgewonnen.

Damit war gezeigt, dass die Spezifität der Aufreinigung bei Verwendung der vorgestellten biotinylierten Transkripte zufriedenstellend war. Wie in Kriterium Nr. 1 gefordert, wurden im Rahmen der Nachweisempfindlichkeit ausschließlich Viroide als Zielsequenzen erkannt und an die „Dynabeads“ gebunden.

Monomere PSTVd-*in vitro*-Transkripte mit (-)Strang-Sequenz erfüllen somit alle für eine Sonde notwendigen Anforderungen und wurden im weiteren Verlauf der Untersuchungen eingesetzt.

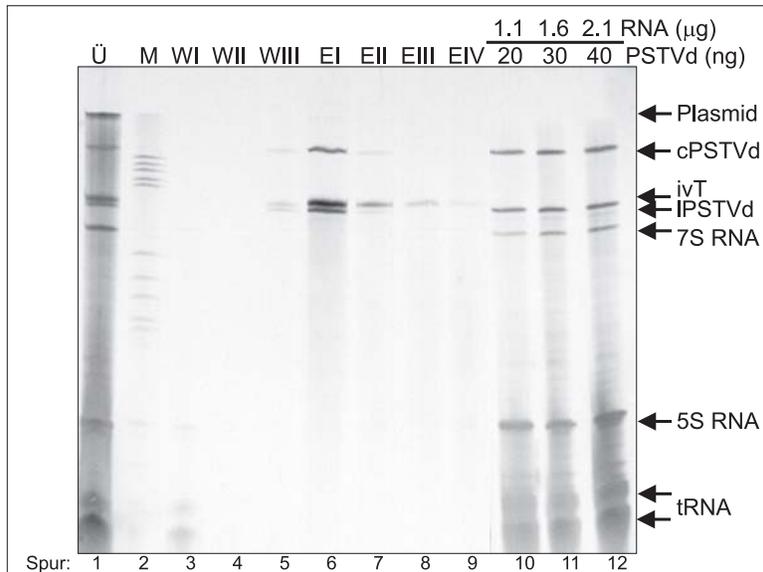


Abbildung 3.9: „Dynabeads“-Aufreinigung von PSTVd mit biotinylierten Einheitslängen-(-)PSTVd-*in vitro*-Transkripten aus differentiell präzipitierten RNA-Extrakten. Dargestellt ist ein denaturierendes 5 % Polyacrylamidgel (29:1); 8 M Harnstoff; 1× TBE; 55 °C ; Silberfärbung. Es wurden 12.1 µg Nukleinsäure mit 230 ng Viroid-RNA in die Aufreinigung eingebracht. PSTVd wurde nach der Hybridisierung an biotinylierte (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripte an 240 µg „Dynabeads“ gebunden. Der Überstand wurde durch Präzipitation eingengt und vollständig in der Elektrophorese aufgetrennt. Von allen folgenden Fraktionen wurden jeweils nur 12.5 % aufgetragen, was einem Anteil von ursprünglich in die Aufreinigung eingebrachten 29 ng PSTVd entspricht. Spur 1 (Ü): Überstand; Spur 2 (M): Längenstandard pBR322<sub>Hae III</sub> mit den Fragmentlängen 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124/123 bp; Spuren 3-5 (WI-WIII): Waschungen, WI und WII in 0.1× SSC bei Raumtemperatur, WIII in 0.1× SSC bei 70 °C . Spuren 6-9 (EI-EIV): Eluate nach Inkubation der „Dynabeads“ mit FA-Lösung bei 70 °C. Spuren 10-12: In die Aufreinigung eingebrachter RNA-Extrakt. Spur 10 mit 1.1 µg RNA; Spur 11 mit 1.6 µg RNA; Spur 12 mit 2.1 µg RNA; cPSTVd: zirkuläres PSTVd; IPSTVd: lineares PSTVd; ivT: (-)PSTVd *in vitro*-Transkripte

### 3.2.2.2 Verkürzte PSTVd-*in vitro*-Transkripte mit (-)Strang-Sequenz als Sonde

Die Verwendung von *in vitro*-Transkripten voller Länge erlaubte zwar eine zufriedenstellende Aufreinigung der PSTVd-Komplexe, führte jedoch zu Problemen bei der Analyse der gewonnenen Nukleinsäuren. PSTVd und *in vitro*-Transkripte stellten die Hauptmenge der aus der Aufreinigung erhaltenen RNAs dar. In den abschließenden Elektrophoresen bildeten sie einen Hintergrund, der die Identifizierung der gesuchten zellulären RNAs erschwerte. Daher erschien es sinnvoll auch noch kürzere (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripte als Sonden zu etablieren. Diese sollten neben den bereits diskutierten Anforderungen durch eine Länge von unter 100 Nukleotiden charakterisiert sein. Damit wären sie kleiner als die prognostizierte Größe der aufzureinigenden RNA von 100 bis 150 Nukleotiden (Thiel 1999).

Als verkürzte Sonde wurde ein (-)PSTVd-Transkript mit 61 Nukleotiden Länge ausgewählt (Plasmid pRH 714 geschnitten mit *Ava II*). Die Hybridisierung erfolgte dabei im Bereich der LCCR (Nukleotide 221-282), also an jenen Viroidnukleotiden, die in dem postulierten PSTVd-RNA Komplex ungepaart vorliegen sollten.

Analog zu der Etablierung monomerer (-)PSTVd-Transkripte als Sonden wurden die auf Seite 41 aufgestellten Anforderungen auf die verkürzten Sonden übertragen und im Weiteren

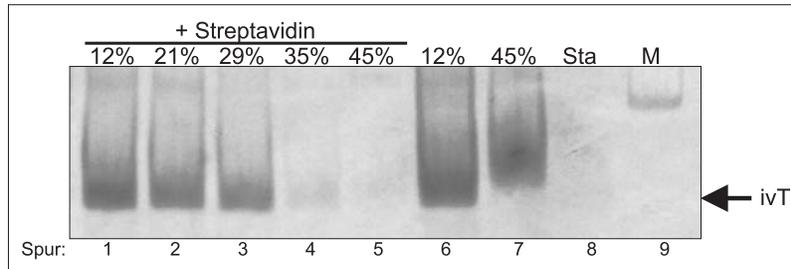


Abbildung 3.10: Streptavidin-Verzögerungsgel biotinylierter 61 nt-(-)PSTVd-*in vitro*-Transkripte. Verwendet wurde ein 8 % Polyacrylamidgel (29:1);  $1\times$  TBE; nativ bei  $15^\circ\text{C}$  mit anschließender Silberfärbung. Aufgetragen wurden jeweils 200 ng *in vitro*-Transkript (*ivT*). Die Spuren 1-5 zeigen unterschiedlich stark biotinylierte *in vitro*-Transkripte nach Inkubation mit  $1\ \mu\text{g}$  Streptavidin. Angegeben sind jeweils die prozentualen Anteile Bio-16-UTP zu Gesamt-UTP im Transkriptionsansatz. Spuren 6 und 7 zeigen die entsprechenden Transkripte ohne Streptavidin-Zugabe. Die Verzögerung in Spur 7 ergibt sich durch die höhere Biotinylierungsrate. Spur 8:  $1\ \mu\text{g}$  Streptavidin. Spur 9 (M): Längenstandard pBR322<sub>Hinf I</sub> mit der Fragmentlänge: 75 bp

überprüft:

Im Unterschied zu Vollängen-Transkripten zeigten Retardationsanalysen in Polyacrylamidgelen nach Vorinkubation mit Streptavidin erst ab einem Biotin-16-UTP zu Gesamt-UTP Verhältnis von 1:1.2 eine Verzögerung aller Transkripte (Abbildung 3.10). Um eine vollständige Biotinylierung der Sonden zu erreichen, mussten demnach 45–47 % modifizierte Nukleotide in den Transkriptionsansatz gegeben werden.

Bei solchen Relationen war davon auszugehen, dass ein Großteil der Transkripte über 2 % biotinylierte Nukleotide enthielt. Es mussten nun Bedingungen etabliert werden, unter denen so stark modifizierte kurze Sonden alle Viroide in einem Ansatz maskieren konnten. Äquimolare Zugabe führte dabei nicht zu den gewünschten Ergebnissen. Auch nach Zugabe eines 5-fachen molaren Überschusses der 61nt-Transkripte zu PSTVd-Proben wurden alle Sonden komplexiert (Daten nicht gezeigt). Da sich dieses Verhältnis im weiteren Verlauf der Untersuchungen als zufriedenstellend erwies, wurde es standardmäßig eingesetzt. Unter diesen Umständen blieben keine Transkripte ungebunden. Es war also nicht notwendig überschüssige Sonden-Moleküle aus dem Ansatz zu entfernen.

Abbildung 3.11 zeigt, dass verkürzte, biotinylierte *in vitro*-Transkripte ebenso spezifisch an PSTVd binden wie Sonden mit voller Länge. Dazu wurde PSTVd aus einem pflanzlichen RNA-Extrakt aufgereinigt. Dieser war aus infiziertem Tomaten-Blattgewebe präpariert und anschließend vorfraktioniert worden. Die Spuren 10 bis 12 zeigen das in die Aufreinigung eingebrachte Ausgangsmaterial. Nach Hybridisierung der Sonden an die Zielmoleküle erfolgte die Bindung an die „Dynabeads“ für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 1 M NaCl. Zur Ermittlung der optimalen Menge an „Dynabeads“ wurden diese in zwei Konzentrationen zugegeben. Im Versuchsteil (a) lag das Mengenverhältnis bei 0.52 ng *in vitro*-Transkript pro  $\mu\text{g}$  „Dynabeads“, im Versuchsteil (b) bei 0.26 ng pro  $\mu\text{g}$ . In beiden Fällen wurden nur Viroidsequenzen eluiert (Spuren 6–9), abundante pflanzliche RNAs wie z.B. tRNA oder 5S RNA konnten nicht nachgewiesen werden. Die Spezifität der Aufreinigung mit verkürzten *in vitro*-Transkripten war demnach genauso zufriedenstellend wie bei Verwendung von Vollängen-Transkripten als Sonden.

Allerdings wurden selbst unter Einsatz noch größerer Mengen an „Dynabeads“ (0.19 ng

ivT pro  $\mu\text{g}$  „Dynabeads“ ) die PSTVd-Moleküle nicht quantitativ isoliert. Im Gegensatz dazu wurden pro 2 ng Vollängen-Transkript 1  $\mu\text{g}$  „Dynabeads“ eingesetzt. Die absoluten Längen der Sonden ergeben sich aus der zu PSTVd komplementären Sequenz plus zusätzliche Vektorsequenzen mit 368 bzw. 63 Nukleotiden. Berücksichtigt man dies, so braucht man für eine Aufreinigung mit den verkürzten Biotin-Transkripten, bei einem 5-fachen molaren Sonden-Überschuss, 9-mal mehr „Dynabeads“ als bei einer Aufreinigung mit monomeren Vollängen-*in vitro*-Transkripten. Biotinylierte 61nt(-)PSTVd-*in vitro*-Transkripte stellen trotzdem funktionsfähige Sonden für eine Aufreinigung von Viroidkomplexe an paramagnetischen Streptavidin-Partikeln dar. Sie erfüllen alle ab Seite 41 geforderten Kriterien und sollten einen abschließenden gelelektrophoretischen Nachweis der gesuchten RNA nicht behindern. Aufgrund des hohen materiellen Aufwandes und der geringeren Effizienz kamen sie jedoch nicht standardmäßig zum Einsatz.

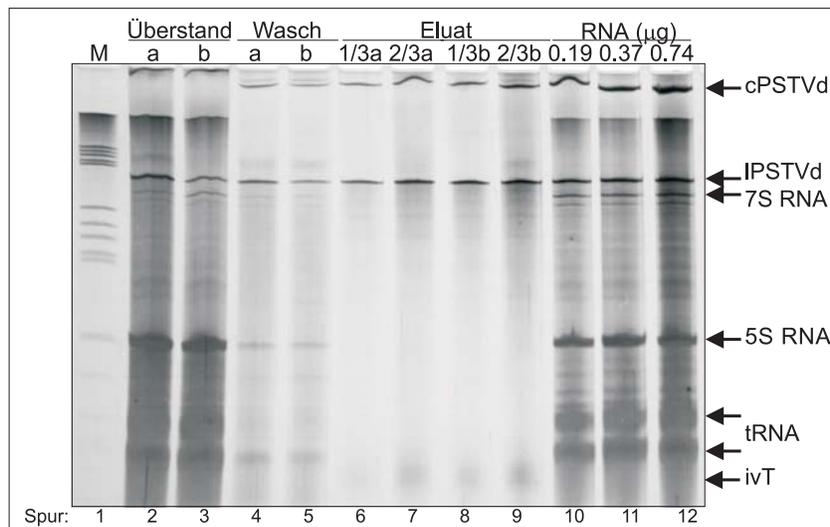


Abbildung 3.11: „Dynabeads“-Aufreinigung von PSTVd mit 61nt(-)PSTVd-*in vitro*-Transkripten (45 %) aus differentiell präzipitierten RNA-Extrakten. Die Auftrennung erfolgte in einem denaturierenden 9 % Polyacrylamidgel (29:1); 8 M Harnstoff; 1× TBE mit anschließender Silberfärbung. Es wurden 1.1  $\mu\text{g}$  Nukleinsäure mit etwa 100 ng Viroid-RNA in die Aufreinigung eingebracht. PSTVd wurde nach Hybridisierung an 89 ng biotinylierte 61nt(-)PSTVd-*in vitro*-Transkripte (45 %) an 171  $\mu\text{g}$  „Dynabeads“ (Proben a) bzw. an 342  $\mu\text{g}$  „Dynabeads“ (Proben b) gebunden. Der Überstand wurde durch Präzipitation eingeengt und vollständig in der Elektrophorese aufgetrennt. Waschungen bei RT, 50 °C und 70 °C in 0.1xSSC wurden vereinigt und ebenfalls vollständig aufgetragen. Die Elution erfolgte 3-mal bei 70 °C in FA-Lösung. Alle Fraktionen wurden vereinigt und in Aliquots auf das Gel gegeben. Spur 1 (M): Längenstandard, pBR322Hae III, mit den Fragmentlängen: 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 123/124, 104, 89... Nukleotiden; Spuren 2 und 3: Überstände; Spuren 4 und 5: Waschung; Spuren 6-9: Eluate, angegeben ist jeweils der aufgetragene Anteil der vereinigten Elutionen; Spuren 10-12: in die Aufreinigung eingebrachter RNA-Extrakt; cPSTVd: zirkuläres PSTVd; lPSTVd: lineares PSTVd; ivT: 61 nt(-)PSTVd *in vitro*-Transkripte (45 %)

### 3.2.2.3 Optimierung des Konzentrationsverhältnisses Sonde/PSTVd in Gesamt-RNA-Extrakten

Neben den Sonden selbst bestimmt das Sonden/PSTVd Konzentrationsverhältnis die Qualität einer Aufreinigung. Es zeigte sich, dass durch Zugabe von zuviel Transkript nicht nur der ma-

terielle Aufwand einer Aufreinigung überproportional anstieg, sondern auch die Spezifität litt. Während der Maskierung bildeten „freie“ Transkripte unspezifische Komplexe mit zellulären RNAs aus, die sich auch in den nachfolgenden Waschungen nicht vollständig entfernen ließen (siehe auch Abbildung 3.27 auf Seite 78).

Um die optimale Konzentration der Sonden abschätzen zu können, genügt es theoretisch den Gesamtgehalt an PSTVd-RNA für einen Extrakt zu bestimmen. In vorfraktionierten RNA-Extrakten konnte nach denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophoresen durch Auswertung von Konzentrationsreihen der relative Viroidanteil ermittelt werden. In Gesamt-RNA-Extrakten war dies nicht möglich. Vor dem Hintergrund an pflanzlichen Nukleinsäuren können PSTVd-Moleküle nicht nachgewiesen werden. Bidirektionale oder 2-dimensionale Gel-Analysen (Schumacher *et al.* 1983b und Schumacher *et al.* 1986) erlauben zwar Nachweis und Mengenbestimmung der zirkulären PSTVd-RNA, geben aber keinerlei Auskunft über den Anteil linearer Moleküle bzw. von Degradationsprodukten. Diese binden jedoch auch an die Sonden und sind daher bei der Ermittlung des geeigneten Konzentrationsverhältnisses zu berücksichtigen.

Ein Verfahren, das alle Anforderungen erfüllte, waren Titrationsanalysen. Dabei wurde von der Beobachtung ausgegangen, dass PSTVd-Transkript-Hybride im Vergleich zu inter- bzw. intramolekularen Transkriptkomplexen eine verringerte gelelektrophoretische Mobilität aufweisen (siehe Abbildung 3.6 auf Seite 45, Spuren 1 und 2). Mit zunehmender Transkript-Konzentration sollten diese Komplexe ebenfalls zunehmen, bis ein Sättigungswert erreicht ist. Dieser Wert entspricht der Konzentration, bei der alle Viroide im Extrakt an Transkripte hybridisiert wurden und umgekehrt.

Voraussetzung für dieses Konzept ist ein Analysesystem, das zwischen Transkript-RNA und zellulärer RNA differenziert. Dies ist erforderlich, da der Hintergrund an pflanzlichen Nukleinsäuren nach der Gelelektrophorese zu einer Anfärbung der ganzen Spur führt. Ausgenutzt wurde hier, dass die Transkripte biotinyliert vorlagen. Derartig modifizierte Nukleinsäuren lassen sich nach Transfer auf Membranen durch Streptavidin-Alkalische-Phosphatase-Bindung über eine Chemolumineszenz-Reaktion mit dem CDP-Star<sup>TM</sup>-System nachweisen.

Beispielhaft fasst Abbildung 3.12 die Ergebnisse einer solchen Titration zusammen. Es wurden 10–80 ng biotinylierter Vollängen-(–)PSTVd-*in vitro*-Transkripte mit je 5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA-Extrakt aus Kernen von Kartoffelsuspensionszellkulturen in 100 mM NaCl thermisch denaturiert und langsam renaturiert. Als Standard wurde mit 10 ng desselben Transkriptes, ohne RNA-Zugabe, entsprechend verfahren. In den ersten 8 Spuren sind deutlich verzögerte PSTVd-Transkript-Hybride zu erkennen, die entweder erst gar nicht in das Gel einlaufen, oder in einer Bande retardiert werden. Ab einem Verhältnis von 50 ng ivT zu 5  $\mu\text{g}$  RNA beginnt sich eine dritte Front auszubilden, deren Migrationsverhalten dem von Transkripten ohne RNA-Zugabe (Spur 9) entspricht. Bis zu Spur 7 nimmt mit zunehmender Menge an *in vitro*-Transkript auch die Menge an Komplex zu. Eine weitere Erhöhung der Transkriptkonzentration im Reaktionsansatz über 70 ng ivT/5  $\mu\text{g}$  RNA hinaus führte zu keiner weiteren Zunahme.

Als Konsequenz wurden in diesem Fall 70 ng Vollängen-Transkript pro 5  $\mu\text{g}$  RNA (das entspricht 14 ng/1  $\mu\text{g}$ ) in einer Aufreinigung verwendet. Aufgrund des höheren  $T_m$ -Wertes der PSTVd-Transkript-Hybride konnte davon ausgegangen werden, dass bei dieser Sondenkonzentration keine zellulären RNAs unspezifisch an die Transkripte binden und mitaufgereinigt

werden.

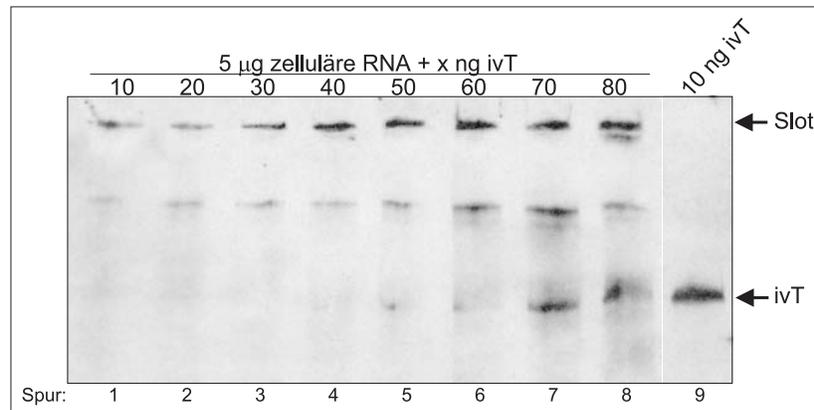


Abbildung 3.12: Titration biotinylierter, monomerer (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripte gegen zelluläre RNA. Der RNA-Extrakt wurde aus Kartoffelsuspensionszellkulturen nach Anreicherung der Kerne isoliert. Es wurden 10, 20, ... 70, 80 ng *in vitro*-Transkript zu 5 µg RNA-Extrakt gegeben und auf 100 mM NaCl eingestellt. Die Denaturierung erfolgte für 3 Minuten bei 90 °C, anschließend wurden die Reaktionen in ca. 3 Stunden auf 40 °C abgekühlt. Als Kontrolle wurde mit 10 ng *in vitro*-Transkript ohne weitere RNA-Zugabe analog verfahren. Alle Ansätze wurden ohne vorherige Denaturierung vollständig auf ein 5 % Polyacrylamidgel, 1× TBE, 8 M Harnstoff aufgetragen und bei 55 °C elektrophoretisiert. Hybride aus PSTVd und (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripten blieben unter diesen Bedingungen erhalten, intramolekulare Sekundärstrukturen wurden aufgehoben. Anschließend wurden die Nukleinsäuren elektrisch auf eine Nylonmembran transferiert, fixiert und die Transkripte mit dem Streptavidin-Alkalische Phosphatase-CDP-Star<sup>TM</sup>-System nachgewiesen. Spuren 1-8: Zugabe von 10-80 ng *in vitro*-Transkript (*ivT*) in den Hybridisierungsansatz; Spur 9: 10 ng *in vitro*-Transkript als Kontrolle

### 3.2.3 Einsatz paramagnetischer Streptavidin-Partikel in Schritt I der Aufreinigung: Isolation PSTVd enthaltender, *in vitro* eingestellter RNA-Komplexe aus Kartoffelsuspensionszellkulturen

Nachdem es bereits gelungen war Viroid-Moleküle aus vorfraktionierten Proben aufzureinigen, sollte dieses Ergebnis auf Gesamt-RNA-Extrakte aus Kartoffelsuspensionszellkulturen übertragen werden. Gleichzeitig wurde untersucht, ob Viroidkomplexe in diesem ersten Schritt der Aufreinigung diskriminiert werden. Eine solche Diskriminierung kann durch sterische Hindernisse bei der Bindung an die „Dynabeads“ oder bei der Hybridisierung der Komplexe an die Sonden hervorgerufen werden.

Als Testsystem kamen *in vivo* quervernetzte RNA-Proben nicht in Betracht, da der quantitative Nachweis von Viroidkomplexen hier nicht möglich war (siehe Abschnitt 3.1.1). Im Gegensatz dazu konnten in Viroid-spezifischen „Northern“-Analysen nach *in vitro*-Komplexeinstellung und anschließender Psoralen-Verknüpfung Signale verringerter gelelektrophoretischer Mobilität detektiert werden, die auf eine Quervernetzung der PSTVd-Moleküle zurückzuführen waren (siehe Abbildung 3.1 und Thiel 1999). Derart behandelte Extrakte stellten somit geeignete Proben dar.

Ausgangsmaterial waren PSTVd-infizierte Kartoffelsuspensionszellkulturen. Aus diesen wurden die Kerne angereichert und RNA extrahiert. Durch thermische Denaturierung und langsames Wiederabkühlen in Anwesenheit von 100 mM NaCl wurden alle thermodynamisch möglichen PSTVd-Komplexe eingestellt und mit Psoralen quervernetzt. Derart behandelte

Proben wurden in die „Dynabeads“-Aufreinigung eingebracht. Alle Aufreinigungsfractionen wurden gelelektrophoretisch untersucht. Anhand eines denaturierenden Polyacrylamidgels mit anschließender Silberfärbung konnte die Qualität der Aufreinigung überprüft werden. Zusätzlich wurden die Proben in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, elektrisch auf eine Nylonmembran transferiert und durch (+)PSTVd-spezifische „Northern“-Hybridisierung analysiert. Auf diese Weise konnten Aussagen über das Verhalten der Viroidkomplexe während des Experimentes getroffen werden. Abbildung 3.13 fasst die Vorgehensweise schematisch zusammen, Abbildungen 3.14 und 3.15 stellen die experimentellen Ergebnisse dar.

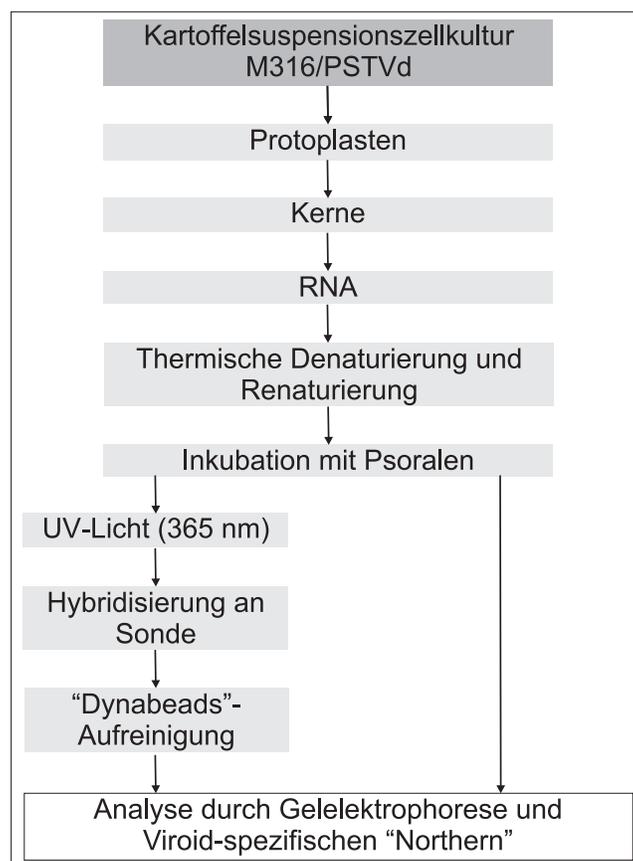


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung einer *in vitro*-Quervernetzung mit anschließender „Dynabeads“-Aufreinigung

Abbildung 3.14 bestätigt, dass die Aufreinigung aus Gesamt-RNA-Extrakten ebenso gut funktioniert wie die in Abschnitt 3.2.2.1 beschriebene aus vorfraktionierten Proben. Spur 2 zeigt den präparierten RNA-Extrakt aus Kartoffelsuspensionszellkulturen. Durch Quervernetzung mit Psoralen entstanden hochmolekulare Komplexe, die aufgrund des kovalenten Charakters der Verknüpfung auch unter denaturierenden Bedingungen erhalten blieben. Diese in Spur 3 aufgetragene Probe stellte das Ausgangsmaterial der Aufreinigung dar. Nach der Bindung an die „Dynabeads“ konnten die zellulären Nukleinsäuren nahezu vollständig abgenommen werden (Spur 4). In den Elutionsspuren 8 und 9 sind keine zellulären RNAs, sondern

lediglich lineare und zirkuläre Viroide sowie Transkripte detektierbar.

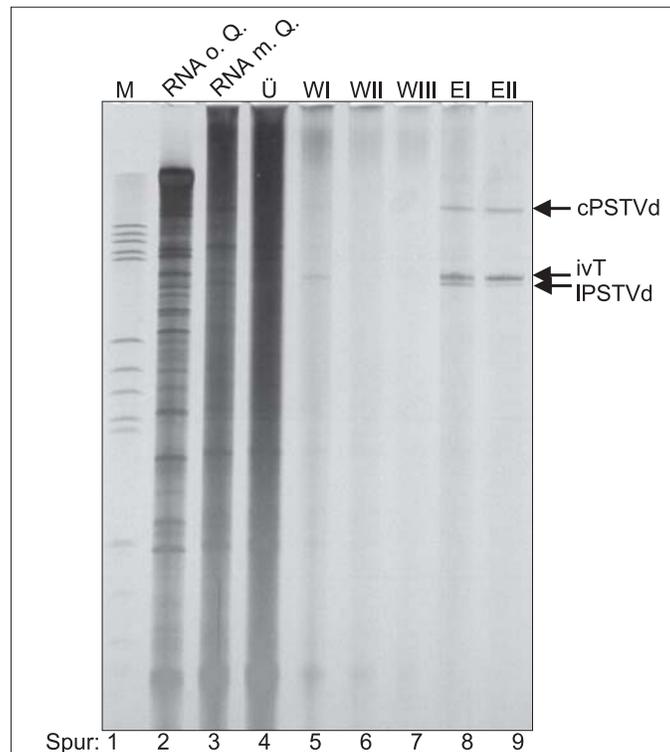


Abbildung 3.14: Gelanalyse *in vitro* eingestellter RNA-Komplexe nach „Dynabeads“-Aufreinigung. 56.7  $\mu$ g Nukleinsäure aus Kartoffelsuspensionszellkulturen wurden an 952 ng biotinylierte Vollängen-*in vitro*-Transkripte hybridisiert und an 370  $\mu$ g „Dynabeads“ gebunden. Der Überstand wurde präzipitiert, alle anderen Fraktionen wurden direkt auf ein denaturierendes 5 % Polyacrylamidgel (29:1) aufgetragen (1 $\times$  TBE; 8 M Harnstoff; 55 °C; Silberfärbung). Spur 1: Längenstandard, pBR322Hae III mit den Fragmentlängen: 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184 124/123, 89 und 80 nt; Spur 2: 1.5  $\mu$ g RNA, ohne Quervernetzung; Spur 3: 1.5  $\mu$ g RNA mit Quervernetzung, Ausgangsmaterial der Aufreinigung; Spur 4: Überstand der „Dynabeads“-Aufreinigung, 12.5 % des Gesamtvolumens; Spuren 5 bis 7: 12.5 % der ersten bis dritten Waschung (0.1 $\times$  SSC; RT); Spuren 8 und 9: 12.5 % der Elutionsfraktionen (FA-Lösung; 70 °C)

Zum jetzigen Zeitpunkt konnten jedoch keine Aussagen über den Verbleib der PSTVd-Komplexe getroffen werden, da diese in dem zuvor beschriebenen Experiment nicht nachweisbar waren. Dazu war es notwendig, dieselben Proben in einer PSTVd-spezifischen „Northern“-Analyse nachzuweisen. Abbildung 3.15 gibt Auskunft über das Migrations- und Elutionsverhalten der Komplexe. Während vor der Quervernetzung (Spur 1) keine Signale oberhalb der zirkulären Viroidmoleküle erkennbar sind, zeigt derselbe Extrakt nach Behandlung mit Psoralen (Spur 2) PSTVd-Komplexe, die von der Geltasche bis zu den linearen Viroiden migrieren. Abbildung 3.14 zeigte in Spur 4, dass nach Bindung an die „Dynabeads“ zelluläre RNAs fast vollständig im Überstand verblieben. Der Vergleich zu Spur 3 von Abbildung 3.15 bestätigt, dass der Anteil an Viroid-RNA in diesem Überstand gering ist. Es lassen sich vor allem zirkuläre und lineare Viroide nachweisen, sowie eine deutlich langsamer migrierende Spezies. Diese wurde als +/- PSTVd-Hybride interpretiert, die in der Pflanzenzelle während des asymmetrischen „rolling-circle“ Replikationsmechanismus der *Pospiviroidae* entstehen. Nach einer

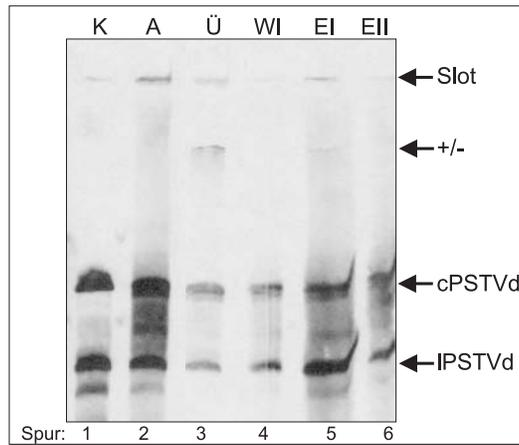


Abbildung 3.15: (+)PSTVd spezifische „Northern“-Analyse *in vitro* eingestellter Komplexe nach einer „Dynabeads“-Aufreinigung. 56.7  $\mu\text{g}$  Nukleinsäure aus Kartoffelsuspensionszellkulturen wurden wie im Text beschrieben aufgereinigt und auf ein denaturierendes 5 % Polyacrylamidgel (43:1) aufgetragen ( $1\times$  TBE; 8 M Harnstoff;  $55^\circ\text{C}$ ). Nach einem Elektro-Transfer auf eine Nylonmembran (Biodyne A) erfolgte der (+)PSTVd-spezifische Nachweis durch Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Transkripten. Spur 1(K): 18.9  $\mu\text{g}$  RNA-Extrakt ohne Quervernetzung; Spur 2(A): 18.9  $\mu\text{g}$  RNA-Extrakt mit Quervernetzung, Ausgangsmaterial der Aufreinigung; Spur 3(Ü): Überstand der „Dynabeads“-Aufreinigung, 87.5 % des Gesamtvolumens; Spur 4(WI): 87.5 % der ersten Waschung ( $0.1\times$  SSC; RT); Spur 5(EI) und 6(EII): 87.5 % der jeweiligen Elutionsschritte ( $70^\circ\text{C}$ ; FA-Lösung)

Quervernetzung muss davon ausgegangen werden, dass diese eine deutlich reduzierte Affinität gegenüber (–)PSTVd-*in vitro*-Transkripten aufweisen und daher mit geringerer Effizienz an die „Dynabeads“ gebunden werden. Darüber hinaus sind jedoch keine verzögerten Signale unterhalb der Geltasche erkennbar. Diese treten erst in der ersten Elutionsfraktion wieder auf (Spur 5). Eine Diskriminierung der PSTVd-Komplexe während der Aufreinigung fand somit nicht statt.

Damit ist gezeigt, dass es mit dem etablierten Verfahren möglich ist, Viroide und kovalent daran gebundene Wechselwirkungspartner aus einem pflanzlichen RNA-Extrakt zu isolieren.

### 3.2.4 Reversion der kovalenten Psoralenvernetzung

Durch Psoralen vermittelte, kovalente Verknüpfungen weisen gegenüber anderen Quervernetzungsstrategien den Vorteil auf reversibel zu sein. Die Aufhebung des PSTVd-RNA-Komplexes und die anschließende Analyse der in diesem Verbund mit aufgereinigten zellulären Komponenten stellen Kernpunkte des in Abbildung 3.2 aufgeführten zweiten Aufreinigungsschrittes dar. Erst durch die Freisetzung der gesuchten RNA kann diese unabhängig von der zuvor daran gebundenen Viroid-RNA nachgewiesen und identifiziert werden.

Verschiedene experimentelle Ansätze stehen zur Verfügung. Die gängigste Methode ist die Photoreversion. Hierbei werden Pyrimidin-Psoralen-Pyrimidin Diadukte durch Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht von 254 nm aufgebrochen. Es entstehen in erster Linie Furan-Seiten Monoadukte und nur in geringem Umfang Pyron-Seiten Monoadukte (Shi *et al.* 1987).

Die Photoreversion kann sowohl in Lösung (z.B. Calvet und Myers 1987, Lipson *et al.* 1987, Rabin und Crothers 1979) als auch im Gel (z.B. Hausner *et al.* 1990) durchgeführt werden.

Dabei fällt die UV-Schädigung der Nukleinsäuren im Polyacrylamidgel geringer aus (Wulfert mündliche Mitteilung). Es war allerdings nicht bekannt, ob dies letztendlich zu verbesserten Reversionsergebnissen führt. In Anbetracht der zugrunde liegenden Fragestellung sollten Viroide und ihre Komplexe vergleichend, sowohl in Lösung als auch im Gel, UV-Bestrahlung ausgesetzt und die aus den Komplexen freigesetzten Komponenten untersucht werden.

Bei der Photoreversion in Lösung wurden quervernetzte Proben direkt mit UV-Licht bestrahlt. Die Bestrahlung erfolgte in einem Bestrahlungsgerät der Firma Stratagene (Stratalinker 1800) auf Eis, wobei der Abstand zu den Lampen ca. 16 cm betrug. Die Lampen weisen ein Emissionsmaximum bei 254 nm auf. Die erfolgreiche Reversion der kovalenten Verknüpfungen konnte in Polyacrylamid-Gelelektrophoresen nachgewiesen werden.

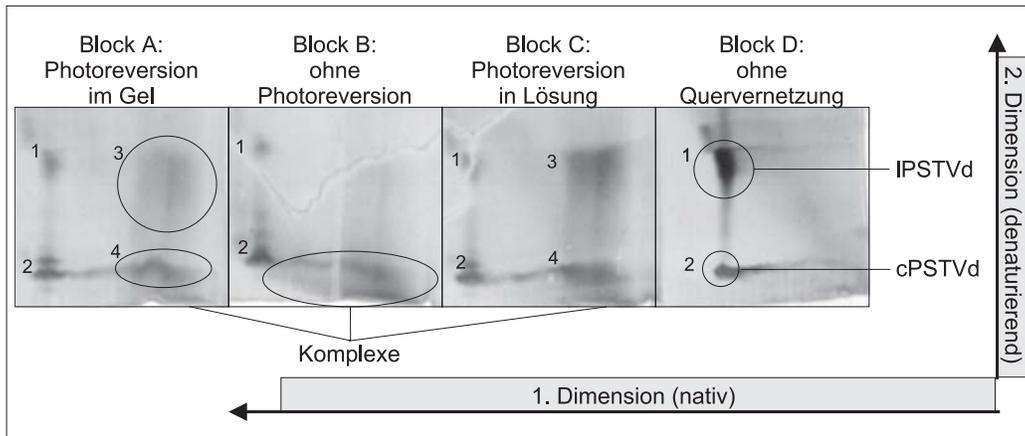
Die Durchführung und der Nachweis einer Reversion der Quervernetzung im Gel war aufwendiger als bei einer Reversion in Lösung. Bereits vor der Bestrahlung wurde eine erste Elektrophorese durchgeführt. Nicht komplexierte Nukleinsäuren migrierten entsprechend ihres Molekulargewichtes und ihrer strukturellen Eigenschaften, im Komplex gebundene wurden retardiert. Dadurch ergab sich eine Nukleinsäureverteilung über weite Bereiche der Spur. Durch die Photoreversion freigesetzte RNAs wären vor dem beschriebenen Hintergrund nicht nachweisbar. Für eine Analyse musste ihre gelelektrophoretische Separation in einer zweiten Dimension erfolgen. Dazu wurde das entsprechende Gelstück ausgeschnitten, auf eine Glasplatte überführt und auf Eis in ca. 16 cm Abstand von den UV-Lampen mit Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt, bevor es in das Polyacrylamidgel der zweiten Dimension einpolymerisiert wurde. RNAs mit hohem Molekulargewicht, die in der ersten Dimension mit den Komplexen eine Front ausbildeten, wurden durch die UV-Bestrahlung entweder nicht beeinflusst, oder aufgrund UV-induzierter Quervernetzungen retardiert. Das gleiche galt für nicht erfolgreich revertierte Psoralen-Komplexe. Durch Photoreversion freigesetzte Fragmente wurden jedoch in einer denaturierenden Gelelektrophorese gemäß ihres niedrigeren Molekulargewichtes stärker beschleunigt, und ließen sich als Flecken außerhalb des Nukleinsäure-Hintergrundes erkennen.

Ergebnisse solcher Untersuchungen sind in Abbildung 3.16 zusammengefasst. Anhand des Vergleiches von Block D mit Block B lässt sich der Effekt der Psoralen-induzierten *in vitro*-Quervernetzung in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese nachvollziehen. Im Falle von Block D wurde das Ausgangsmaterial, ein differentiell präzipitierter RNA-Extrakt aus PSTVd-infizierten Tomaten-Blättern, ohne Quervernetzung aufgetragen. Zirkuläre (2) und lineare (1) Viroide sind als deutliche Signale zu erkennen. Durch die Quervernetzung nimmt der Anteil an monomeren Molekülen drastisch ab (Block B). Statt dessen zeigen sich kovalent komplexierte Nukleinsäuren in einem Bereich, der sich vom Rand des einpolymerisierten Gelstückes bis zu den verbliebenen zirkulären Viroiden (2) zieht.

Blöcke A und C zeigen die Proben nach der Photoreversion. In beiden Fällen erfolgte die UV-Bestrahlung für 7 Minuten. Dies hatte sich in Vorversuchen für eine Reversion im Gel als optimal erwiesen. Block A zeigt die Probe nach Bestrahlung im Gel. Gegenüber Block B nahm der Anteil an komplexierten Nukleinsäuren ab und der Anteil an monomeren Viroiden (3 und 4) zu. Mehr PSTVd-RNA wurde aber nach Reversion in Lösung freigesetzt (Block C). Der Nachweis erfolgte hier wie bei einer Reversion im Gel. Nach der Bestrahlung wurde die Probe in einer ersten Dimension aufgetrennt, die Spur ausgeschnitten und direkt um 90 ° versetzt in das Gel der zweiten Dimension eingebracht.

Eine Photoreversion im Polyacrylamidgel kam Aufgrund der schlechteren Effizienz für die

weiteren Untersuchungen nicht in Betracht. Statt dessen wurden die Reaktionsparameter für ein Reversion in Lösung optimiert. Als zu optimierender Parameter verblieb die Bestrahlungsdauer.



**Abbildung 3.16:** Zwei-dimensionale Gelanalyse der Reversion Psoralen-induzierter Quervernetzungen in Lösung und im Polyacrylamidgel. Die Gelelektrophorese der ersten Dimension erfolgte unter nativen Bedingungen (5% Polyacrylamid (43:1); 1× TBE; 15 °C; 400 V; 30 Minuten), die der zweiten Dimension unter denaturierenden Bedingungen (8 % Polyacrylamid (29:1); 1× TBE; 8 M Harnstoff; 55 °C; 475 V; 65 Minuten). Aufgetragen wurden jeweils 2.3 µg vorfraktionierte RNA aus PSTVd-infizierten Tomaten-Blättern. Block A: Photoreversion nach der ersten Dimension im Gel; Block B: RNA mit Quervernetzung ohne Reversion; Block C: Photoreversion in Lösung; Block D: ohne Quervernetzung und Reversion. Die Reversion erfolgte jeweils für 7 Minuten auf Eis. Nach der ersten Dimension wurden die Spuren bis auf Höhe des stäbchenförmigen Viroides ausgeschnitten und um 90 ° versetzt in das zweite, denaturierende Gel einpolymerisiert. 1: lineares PSTVd ohne Quervernetzung; 2: zirkuläres PSTVd ohne Quervernetzung; 3: durch Photoreversion aus Komplexen freigesetztes lineares PSTVd; 4: durch Photoreversion aus Komplexen freigesetztes zirkuläres PSTVd; lPSTVd: lineares PSTVd; cPSTVd: zirkuläres PSTVd

In dem folgenden Experiment wurde *in vitro* quervernetztes RNA-Material aus PSTVd-infizierten Kartoffelsuspensionszellkulturen in Lösung für 0 bis 60 Minuten mit UV-Licht von 254 nm bestrahlt. Die Photoreversion der Viroidkomplexe wurde anhand einer (+)PSTVd-spezifischen „Northern“-Analyse verfolgt. Spur 1 in Abbildung 3.17 zeigt die *in vitro* quervernetzte RNA. Lineare und zirkuläre PSTVd-Moleküle sind als separate Signale erkennbar. Die Viroidkomplexe zeigen dagegen ein heterogenes Migrationsverhalten. Ihre Retardation reicht von der Geltasche bis zu den monomeren Molekülen. Durch 7.5 minütige UV-Bestrahlung werden sowohl lineare als auch zirkuläre Viroide aus den Komplexen freigesetzt (Spur 2). Entsprechend nimmt der Anteil retardierter Signale ab, bleibt aber deutlich erkennbar. Die Verlängerung der Bestrahlungsdauer auf 15 Minuten oder darüber hinaus führte nicht zu der gewünschten Optimierung. Parallel zu der Reversion der Komplexe zeigen die Spuren 3 bis 5 eine Abnahme der Intensität aller Viroidsignale. Dies war auf UV-Schäden zurückzuführen, welche eine Degradation der RNA bedingten. Eine als optimal ermittelte Bestrahlungsdauer stellte unter Berücksichtigung dieser beiden Effekte somit immer einen Kompromiss dar und sollte zwischen 5 und 10 Minuten liegen. Durch Vergleich einer Reihe von Reversionsexperimenten konnten unter diesen Bedingungen Reversionsausbeuten von 40 bis 70 % ermittelt werden.

Für die Reversion Psoralen-induzierter DNA-Komplexe findet man in der Literatur eine

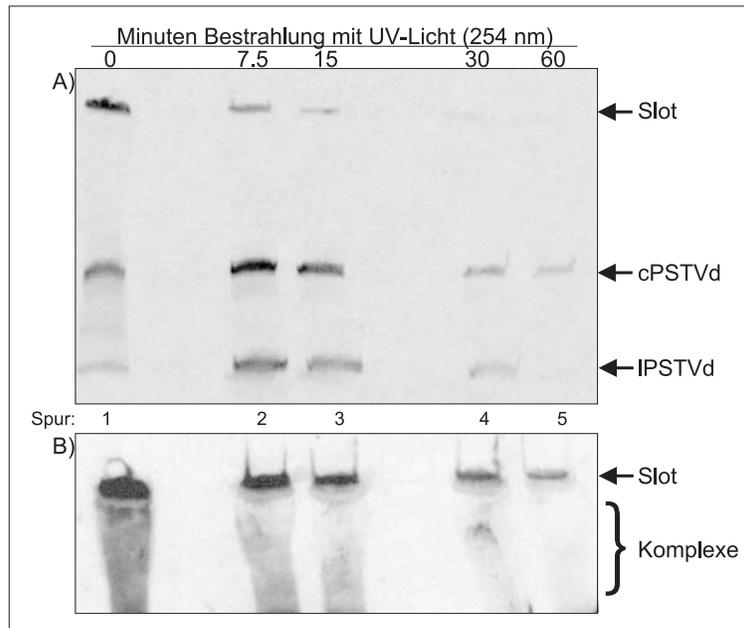


Abbildung 3.17: Photoreversion *in vitro* quervernetzter Viroide. Nach *in vitro*-Quervernetzung wurden je 21  $\mu\text{g}$  RNA aus PSTVd-infizierten Kartoffelsuspensionszellkulturen in Lösung für 0; 7.5; 15 und 60 Minuten auf Eis mit UV-Licht von 254 nm bestrahlt. Die Proben wurden in einem 5 % Polyacrylamidgel (29:1);  $1\times$  TBE; 8 M Harnstoff bei  $55^\circ\text{C}$  und 470 V für 50 Minuten elektrophoretisiert, elektrisch auf eine Nylonmembran transferiert, alkalisch denaturiert, fixiert und mit Digoxigenin-markierten (+)PSTVd-spezifischen *in vitro*-Transkripten über Chemolumineszenzentwicklung nachgewiesen. A): Exposition für 15 Sekunden, B): Exposition für 5 Minuten; Spur 1: Quervernetztes PSTVd ohne Photoreversion; Spur 2: Bestrahlung für 7.5 Minuten; Spur 3: Bestrahlung für 15 Minuten; Spur 4: Bestrahlung für 30 Minuten und Spur 5: Bestrahlung für 60 Minuten; cPSTVd: zirkuläres Viroid; lPSTVd: lineares Viroid

weitere Strategie mit besseren Ausbeuten beschrieben (Shi *et al.* 1988, Yeung *et al.* 1988 und Sastry *et al.* 1997). Die Aufhebung der kovalenten Verknüpfung erfolgt hier durch alkalische Hydrolyse des Psoralen-Pyron-Ringes und führt fast ausschließlich zu Pyron-Seiten Monoaddukten. Bei pH-Werten oberhalb von 10, erhöhter Temperatur und Anwesenheit von 3 M Harnstoff werden bei dieser als BCR („Base-Catalyzed Reversal“) bezeichneten Verfahrensweise die meisten-DNA Moleküle freigesetzt. Das beschriebene Vorgehen ist jedoch nicht direkt auf Ribonukleinsäuren übertragbar, da diese unter solchen Bedingungen hydrolysieren. Es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, dass eine schonendere Behandlung in Kombination mit der Photoreversion die gesamte Reversionsausbeute verbessern würde. Dies war insbesondere deshalb interessant, da eine alkalische Denaturierung der RNA-Proben vor einer „Northern“-Analyse die Nachweisgrenzen deutlich verbesserte (Abschnitt 2.11.2). Es zeigte sich aber, dass bereits eine der alkalischen Denaturierung entsprechende Behandlung der Proben vor der Photoreversion, d.h. Inkubation bei 50 mM NaOH (pH 13) und Raumtemperatur für 15 Minuten, zu schlechteren Ergebnissen führte. Eine zusätzliche alkalische Hydrolyse der Psoralen-Bindung erschien daher nicht sinnvoll.

Gleiches galt für die Photoreversion bei Anwesenheit der „Dynabeads“. Am Ende der ersten Aufreinigung lagen die Viroide und Viroidkomplexe an die „Dynabeads“ gebunden vor, der Hintergrund pflanzlicher RNAs war bereits abgetrennt worden. Die erfolgreiche Trennung

der kovalenten Verknüpfungen zu diesem Zeitpunkt würde den experimentellen und materiellen Aufwand der gesamten Aufreinigung deutlich reduzieren. Weder eine zweite Hybridisierung der PSTVd-Moleküle an die Sonden noch eine weitere Bindung an die paramagnetischen Streptavidin-Partikel wären notwendig. Mit den im Ansatz verbliebenen Partikeln gelang es jedoch nicht, durch Photoreversion ausreichende Mengen an Fragmenten aus den Komplexen freizusetzen. In der Lösung waren die Partikel bereits optisch, aufgrund einer bräunlich trüben Verfärbung, zu erkennen. Die schlechte Reversionseffizienz wurde daher als Schatteneffekt interpretiert. Der Vorstellung nach würden die Partikel ein gleichmäßiges Durchdringen der Probe mit UV-Licht verhindern. Auch mehrmaliges Durchmischen der Lösung während der Bestrahlung führte nicht zu Verbesserungen. Es war daher unvermeidlich die Nukleinsäuren vor der Photoreversion von den „Dynabeads“ zu eluieren.

Im Folgenden wurde die erste Aufreinigung mit der Elution der Nukleinsäure von den „Dynabeads“ abgeschlossen. Da alle Optimierungsmöglichkeiten ausgeschöpft waren, erfolgte die Photoreversion standardmäßig für 5 bis 10 Minuten in Lösung. Die maximale Reversionseffizienz belief sich dabei auf 70 %.

### 3.2.5 Einsatz paramagnetischer Streptavidin-Partikel in Schritt II

Mit einem zweiten Aufreinigungsschritt sollte die Qualität der gesamten Aufreinigung verbessert werden. Außerdem sollte versucht werden, die gesuchte, wechselwirkende RNA soweit von Viroiden und *in vitro*-Transkripten zu isolieren, dass sie nachgewiesen und identifiziert werden konnte. Nachdem im vorangegangenen Abschnitt festgestellt worden war, dass die Reversion der Psoralen-Quervernetzung nicht an den „Dynabeads“ erfolgen konnte, ergab sich für diese Phase des Prozesses das bereits auf Seite 38 in Abbildung 3.2 angedeutete Bild:

Mit Ende des ersten Aufreinigungsschrittes lagen die Nukleinsäuren denaturiert in FA-Lösung vor. Für weitere Manipulationen war es unvermeidlich, diese daraus zu präzipitieren und in einem Standardpuffer (z.B. TE) zu resuspendieren. In der Probe befanden sich zu diesem Zeitpunkt neben Viroiden und quervernetzten PSTVd-RNA-Komplexen noch Sonden-Moleküle sowie eventuell ein kleiner Rest pflanzlicher Nukleinsäuren.

Letztere verblieben bei einer zweiten Aufreinigung während der Bindung an die „Dynabeads“ im Überstand. Viroide sowie kovalent daran gebundene Ribonukleinsäuren sollten im Gegensatz dazu an den Partikeln immobilisiert werden. Hierfür war es notwendig, diese durch eine erneute Hybridisierung mit biotinylierten (–)PSTVd-*in vitro*-Transkripten zu maskieren. Wie bereits in Abschnitt 3.2.2.3 beschrieben, war ein ausgewogenes Sonden/PSTVd-Konzentrationsverhältnis für die Spezifität der ersten Aufreinigung von entscheidender Bedeutung. Dies traf ebenfalls auf die zweite Aufreinigung zu. Zwar war das Risiko einer unspezifischen Wechselwirkung zwischen Transkripten und pflanzlichen RNAs geringer, aber mitgeführte RNAs würden in der folgenden Auswertung fälschlicher Weise zunächst als gesuchter PSTVd-Wechselwirkungspartner interpretiert werden. Bezogen auf die Sondenmenge befanden sich am Ende des ersten Aufreinigungsschrittes mehr PSTVd-Moleküle in der Probe als zu Beginn. Dies war auf die unterschiedlichen Elutionseigenschaften beider RNAs zurückzuführen. Bereits Abbildung 3.8 zeigte, dass Transkripte noch in Elutionsfraktionen nachgewiesen werden konnten, in denen keine PSTVd-Moleküle mehr erkennbar waren. Diese waren bereits in den vorangegangenen Fraktionen nahezu vollständig zurückgewonnen worden. Da das genaue

Sonde/PSTVd-Konzentrationsverhältnis schwierig zu ermitteln war und da sichergestellt werden sollte, dass keine unspezifischen Wechselwirkungen während der Hybridisierung stattfanden, wurde auf eine weitere Sondenzugabe verzichtet. An dieser Stelle wurde eine quantitativ suboptimale Aufreinigung zugunsten einer optimalen Qualität in Kauf genommen. Die experimentelle Durchführung erfolgte analog zu Schritt I durch thermische Denaturierung und langsames Wiederabkühlen auf ca. 50 °C in Anwesenheit von 100 mM NaCl.

Im Anschluss an die Maskierung der Viroide bzw. der Viroidkomplexe wurde die Photoreversion auf die im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Weise durchgeführt. Die Reaktion erfolgte auf Eis unter nicht denaturierenden Bedingungen. Das heißt, dass die Komplexe zwar noch einen Verbund ausbildeten, aber nicht mehr kovalent verknüpft waren. Die Maskierung durch biotinylierte (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripte blieb erhalten. Daher konnte die Bindung an die „Dynabeads“ direkt erfolgen. Anders als in der ersten Aufreinigung fand in der zweiten Aufreinigung ein fließender Übergang zwischen Waschungen und Elution der gesuchten RNA statt. Obwohl der genaue  $T_m$ -Wert des PSTVd-RNA-Hybrides unbekannt war, konnte davon ausgegangen werden, dass er unterhalb von 70 °C in 95 % Formamid lag. Unter diesen Bedingungen eluierten PSTVd und *in vitro*-Transkripte von den „Dynabeads“. Daher wurden die Elutionen stufenweise durchgeführt. Jede Stufe musste dabei eine signifikante Zunahme der Stringenz beinhalten, um zu gewährleisten, dass die gesuchte, wechselwirkende RNA in möglichst wenigen Fraktionen akkumulierte. Es wurde wie folgt verfahren:

Die Waschungen wurden in  $0.1 \times$  SSC bei Raumtemperatur durchgeführt. Durch Temperaturerhöhungen begannen die Elutionen. Diese erfolgten wahlweise in  $0.1 \times$  SSC oder in autoklaviertem Wasser. Dabei wurden Temperaturen zwischen 50 und 70 °C gewählt. In einzelnen Experimenten erfolgte die Elution mit zunehmenden Formamidkonzentrationen bei 70 °C. Dies erwies sich jedoch als nicht notwendig und wurde daher nicht standardmäßig durchgeführt. Abschließend wurde für eine vollständige Dokumentation der Hauptanteil der Viroid-RNA sowie der *in vitro*-Transkripte durch Inkubation in FA-Lösung bei 70 °C zurückgewonnen.

Die erhaltenen Fraktionen mussten nun noch auf ihren Gehalt an pflanzlichen Ribonukleinsäuren untersucht werden.

### 3.2.6 Detektion von Wirts-RNA in den Fraktionen

Im Anschluss an die Aufreinigung erfolgte die Analyse der selektiv durch Temperaturerhöhung eluierten Nukleinsäuren.

Zunächst wurden die aus der zweiten „Dynabeads“-Aufreinigung erhaltenen Elutionsfraktionen einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und anschließend mit Silbernitrat angefärbt. Es zeigte sich jedoch, dass nach Aufreinigung größerer Nukleinsäuremengen selbst unter minder stringenter Elutionsbedingungen eine Reihe von Fragmenten zurückgewonnen wurde, die später als PSTVd- bzw. Sonden-Degradationsprodukte identifiziert werden konnten. In der Gelelektrophorese führten diese zu einem Hintergrund, der es nicht erlaubte, einzelne Signale pflanzlicher Nukleinsäuren zuzuordnen.

Ein direkter, spezifischer Nachweis der gesuchten Nukleinsäuren war ebenfalls nicht möglich. Bekannt war lediglich, dass eine 100–150 Nukleotide lange RNA existierte, die eine partielle Sequenzkomplementarität zu der Oberen Zentralen Konservierten Region (UCCR) von PSTVd aufwies. Gleiches galt jedoch für (-)PSTVd-Replikationsintermediate sowie für PSTVd sel-

ber. Aufgrund der Selbstkomplementarität der Viroide beinhaltet eine partielle Komplementarität zu der UCCR immer auch eine Homologie zu der unteren Zentralen Konservierten Region (LCCR) von PSTVd. Ein Nachweis, der die Sequenzkomplementarität der zellulären RNA zu der Konservierten Region von PSTVd ausnutzt, würde immer auch (-)PSTVd-Replikationsintermediate und je nach  $T_m$ -Wert des PSTVd-RNA-Hybrides auch PSTVd-Moleküle selber erkennen.

Ein anzuwendendes Analyseverfahren konnte daher nur indirekt durchgeführt werden. Voraussetzung für diesen Ansatz war eine qualitativ hochwertige Aufreinigung. Das indirekte Verfahren nutzte nun die Tatsache aus, dass die Sequenz der PSTVd-RNA ebenso bekannt war wie die der Sonden. Ein gegen diese Moleküle gerichteter, spezifischer Nachweis sollte also diejenigen Fragmente identifizieren können, die eindeutig nicht die gesuchte RNA darstellten. Alle anderen Fragmente waren pflanzlichen Ursprungs.

Nach einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proben daher mit zwei Färbeverfahren analysiert.

Zunächst erfolgte der unspezifische Nachweis aller Nucleinsäuren über eine Silberfärbung.

Als nächstes wurden die gleichen Proben auf ihren Gehalt an PSTVd-RNA und biotinylierten (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripten untersucht. Dabei wurden anhand einer (+)PSTVd-spezifischen „Northern“-Hybridisierung Viroide sowie ihre Degradationsprodukte nachgewiesen, anhand einer (-)PSTVd-spezifischen „Northern“-Hybridisierung multimere (-)PSTVd-Replikationsintermediate, biotinylierte *in vitro*-Transkripte sowie deren Degradationsprodukte.

Durch Vergleich aller Datensätze konnten, wie in Schema 3.18 dargestellt, die Fragmente ermittelt werden, die nur nach dem unspezifischen Nachweis aller Nucleinsäuren zu erkennen waren und demnach aus pflanzlichem Gewebe stammten. Fraglich blieb, ob es sich dabei um die mit PSTVd wechselwirkenden Ribonucleinsäuren handelte. Reste abundanter pflanzlicher Nucleinsäuren, die zu keiner Zeit an PSTVd kovalent verknüpft vorlagen, konnten auch am Ende der Aufreinigungen noch in einigen Proben nachgewiesen werden. Mit PSTVd wechselwirkende RNAs sollten aber Teil der als pflanzliche RNAs identifizierten Fragmentmenge sein. Die Elemente dieser Menge lieferten somit eine erste Einschränkung der Anzahl und der Größe der gesuchten RNAs.

### 3.2.6.1 Nachweis von Fragmenten mit (+) oder (-)PSTVd-Sequenz

Um mit PSTVd eine stabile, durch Psoralen quervernetzbare Wechselwirkung ausbilden zu können, mussten zelluläre RNAs eine partielle Sequenzkomplementarität zu (+)PSTVd-Molekülen aufweisen. Als Konsequenz daraus ergibt sich eine Homologie zu dem entsprechenden Bereich des (-)Stranges. Eine solche homologe Region durfte jedoch nicht von einer (-)PSTVd-spezifischen „Northern“-Sonde nachgewiesen werden. Andererseits enthielten die zu analysierenden Proben auch kurze Fragmente mit (-)PSTVd-Sequenz, die durch Degradation von (-)PSTVd-Replikationsintermediaten oder biotinylierten *in vitro*-Transkripten entstanden waren. Da die zelluläre RNA mit einer Sequenzkomplementarität zu der UCCR von PSTVd eine Länge von 100–150 Nucleotiden aufweist, mussten diese zumindest bis zu einem entsprechenden Größenbereich noch zuverlässig identifiziert werden können. Es sollte also ein (-)PSTVd-spezifisches Nachweisverfahren etabliert werden, das Degradationsprodukte einer Größe von

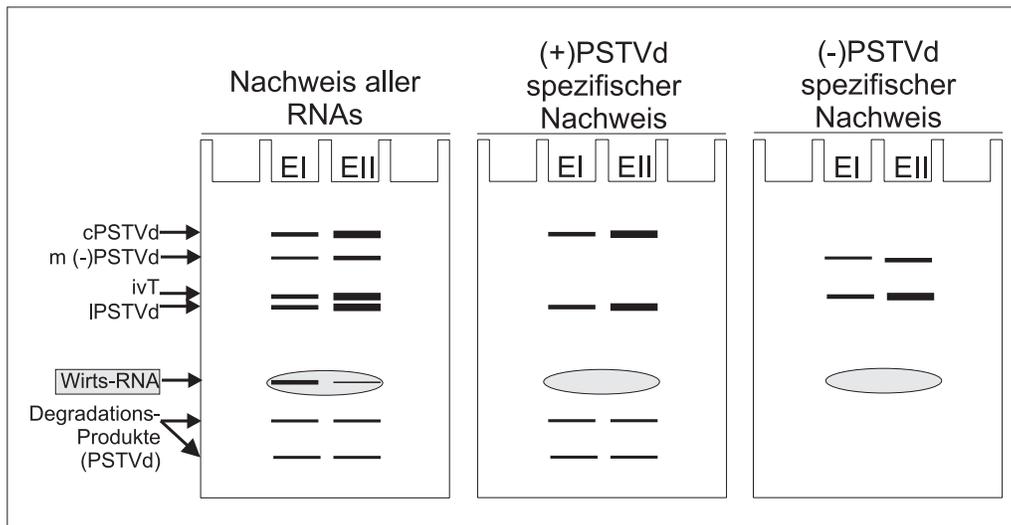


Abbildung 3.18: Schematische Darstellung des indirekten Nachweises. EI: unter nicht stringenten Bedingungen gewonnenes Eluat der zweiten Aufreinigung; EII: im Anschluss an EI unter stringenteren Bedingungen gewonnenes Eluat; cPSTVd: zirkuläres PSTVd; m (-)PSTVd: multimere (-)Strang-PSTVd-Moleküle, diese entstehen als Zwischenprodukt im „rolling-circle“ Replikationszyklus von PSTVd; ivT: biotinylierte (-)PSTVd Vollängen-*in vitro* Transkripte; iPSTVd: lineares PSTVd

ca. 100 Nukleotiden noch eindeutig nachwies, Fragmente mit einer Übereinstimmung von ca. 20 Nukleotiden jedoch nicht. Dabei wurde von der Annahme ausgegangen, dass eine Wechselwirkung zwischen PSTVd und einer zellulären RNA nicht über mehr als 20 Basenpaarungen stattfindet. Dieser Wert gilt als realistisch für intermolekulare RNA-Wechselwirkungen (Bachelierie und Cavailé 1997, Tollervey und Kiss 1997 und Staley und Guthrie 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden für PSTVd-spezifische Nachweise Digoxigenin-markierte *in vitro*-Transkripte voller Länge als „Northern“-Sonden verwendet. Für die Ermittlung geeigneter Hybridisierungsbedingungen wurde die mit PSTVd wechselwirkende, pflanzliche RNA durch ein RNA-Oligonukleotid mit PSTVd-Sequenz (In2) simuliert. Die maximale Hybridisierungstemperatur, die den Nachweis einer Nukleinsäure noch erlaubt, hängt direkt von dem  $T_m$ -Wert des Nukleinsäure-„Northern“-Sonden Hybrides ab. Aus Berechnungen mit dem Poland-Programm (Steger 1994) ergab sich ein  $T_m$ -Wert von 85 °C für ein Hybrid aus In2 und (-)PSTVd-RNA. Dabei wurde der Parametersatz für Oligonukleotide in 1 M NaCl bei einer Nukleinsäurekonzentration von 1  $\mu$ M eingestellt. Im Gegensatz dazu ergaben Berechnungen mit identischen Parametern einen  $T_m$ -Wert von 105 °C, wenn ein 20 Nukleotide langes Polyribonukleotid aus der UCCR (Nukleotide 79–98) zugrunde gelegt wurde. Im ungünstigsten Fall könnte also eine zelluläre RNA mit einer 20 Nukleotide langen Sequenzkomplementarität zur UCCR mit einer (-)PSTVd-spezifischen „Northern“-Sonde ein Hybrid ausbilden, das einen  $T_m$ -Wert von 105 °C in 1 M NaCl aufweist.

Mit Hilfe von „dot-blot“-Analysen wurde ermittelt, dass erst bei einer Temperatur von 45 °C in 50 % Formamid und 5 $\times$  SSC (0.75 M NaCl) das RNA-Oligonukleotid In2 mindestens um einen Faktor 100 schlechter nachgewiesen wurde als ein 148 nt langes PSTVd-Minimalkonstrukt (Daten nicht gezeigt). Aus der Differenz der errechneten  $T_m$ -Werte ergab sich somit

eine Hybridisierungstemperatur von 65 °C um zu gewährleisten, dass eine zelluläre RNA in einem PSTVd-spezifischen Nachweis entsprechend diskriminiert wird.

Bevor Hybridisierungen bei 65 °C routinemäßig durchgeführt wurden, musste noch sichergestellt werden, dass unter diesen Bedingungen PSTVd-Degradationsprodukte sowie degradierte Sonden-Fragmente einer Länge von 100 Nukleotiden noch erkannt werden. Insbesondere musste dabei berücksichtigt werden, dass die *in vitro*-Transkripte biotinyliert vorlagen, und damit möglicher Weise einen niedrigeren  $T_m$ -Wert aufweisen. Die Experimente wurden daher mit 104 nt langen (+)PSTVd-*in vitro*-Transkripten wiederholt. Diese waren durch T7-*in vitro*-Transkription mit 20 % Bio-UTP aus dem Plasmid pRH713 nach Inkubation mit der Restriktionsendonuklease *Dde I* (Nukleotide 43-146) synthetisiert worden. Bei einer Hybridisierungstemperatur von 65 °C in 50 % Formamid wurden diese Transkripte mit der gleichen Empfindlichkeit nachgewiesen wie entsprechende unmodifizierte Transkripte oder PSTVd-Minimalkonstrukte (Daten nicht gezeigt). Auch die absolute Nachweisgrenze blieb durch die Temperaturerhöhung unbeeinträchtigt.

Im Folgenden wurde daher bei allen Analysen sowohl der (-) als auch der (+)PSTVd-spezifische Nachweis standardmäßig bei einer Hybridisierungstemperatur von 65 °C in 50 % Formamid durchgeführt.

### **3.3 Isolation und Identifikation der zellulären Komponente von *in vitro* mit Psoralen verknüpften PSTVd-RNA-Komplexen**

Zunächst sollten Aufreinigungen aus *in vitro* quervernetzten RNA-Extrakten erfolgen. Damit waren folgende Vorteile verbunden:

Wie in Thiel 1999 dargestellt, erfolgt die Quervernetzung in Protoplasten aus Kartoffel-suspensionszellkulturen mit stark unterschiedlicher Effizienz. Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse *in vitro* quervernetzter Proben reproduzierbare Ergebnisse. Außerdem erlaubte die *in vitro*-Quervernetzung eine flexiblere Auswahl des in die Aufreinigung eingebrachten Ausgangsmaterials. Während die *in vivo*-Verknüpfung nur an Protoplasten aus PSTVd-intermediate infizierten Zellkulturen der Kartoffel etabliert worden war, ließen sich *in vitro* induzierte Quervernetzungen an jedem PSTVd-haltigen RNA-Extrakt durchführen.

Experimentell wurde wie in Schema 3.2 beschrieben verfahren. Ausgangsmaterial war durch thermische Denaturierung und langsames Wiederabkühlen in 100 mM NaCl komplexierte und anschließend quervernetzte RNA aus PSTVd-infiziertem Tomaten-Blattgewebe oder aus Kartoffelsuspensionszellkulturen.

#### **3.3.1 Aufreinigung mit Biotin-markierten PSTVd-*in vitro*-Transkripten voller Länge aus vorfraktionierten *Lycopersicon esculentum* RNA-Extrakten**

Die erste Aufreinigung erfolgte aus einem vorfraktionierten RNA-Extrakt unter Verwendung von biotinylierten PSTVd-*in vitro*-Transkripten voller Länge. Dieser Extrakt war aus Blättern von PSTVd (Stamm RG1) infizierten Tomaten isoliert und wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben durch LiCl- und PEG-Präzipitationen aufbereitet worden (siehe Abbildung 3.19 Spur 1). Das Verhältnis von Viroid-RNA zu Wirts-RNA entsprach nicht den natürlichen Verhältnissen,

da durch die Extraktionsprozedur kurze Nukleinsäuren angereichert werden. Es wurde aber erwartet, dass die weiter oben beschriebene 100–150 Nukleotide lange RNA, die über die UCCR eine Wechselwirkung mit PSTVd ausbildet, in dem Extrakt enthalten und mit aufkonzentriert worden war. Da die PSTVd-Konzentration ebenfalls erhöht war, erschien es wahrscheinlich, dass überproportional viele PSTVd-RNA-Komplexe durch Psoralen kovalent verknüpft und anschließend aufgereinigt werden konnten. Zusammen mit der Tatsache, dass vorfraktionierte RNA-Extrakte in der Aufreinigung zu einem deutlich reduzierten Hintergrund an pflanzlichen Nukleinsäuren führten, ergaben sich somit ideale Voraussetzungen für eine erste Aufreinigung.

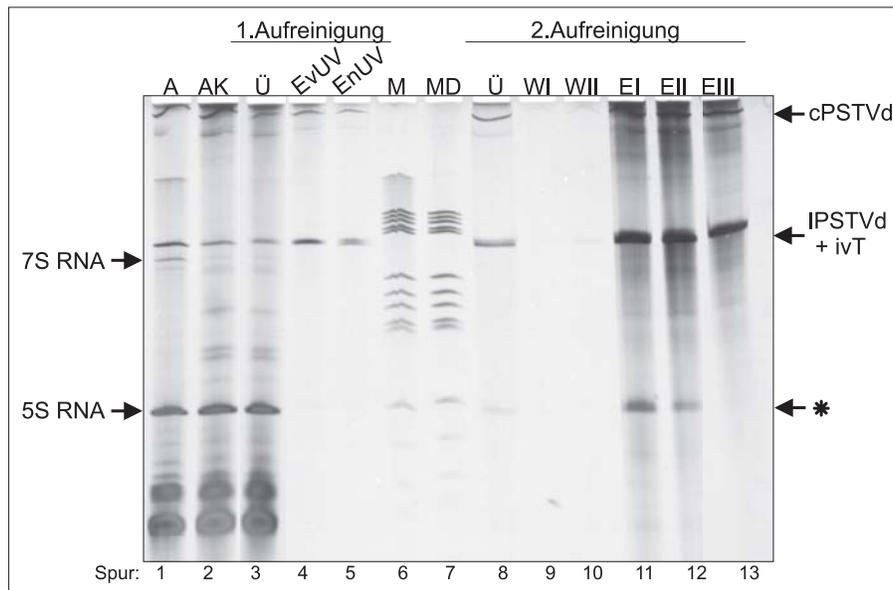


Abbildung 3.19: Aufreinigung von *in vitro* an PSTVd quervernetzter zellulärer RNA unter Verwendung von biotinylierten (-)PSTVd-Vollängen-*in vitro*-Transkripten. Dargestellt ist ein denaturierendes 9 % Polyacrylamidgel (29:1); 8 M Harnstoff; 0.5× TBE; mit anschließender Silberfärbung. 1. Aufreinigung: Es wurden 112 µg RNA aus vorfraktionierten Tomaten-Extrakten in die Aufreinigung eingebracht, an 16 µg biotinyliertes (-)PSTVd-Vollängen-*in vitro*-Transkript hybridisiert und an 1 µg „Dynabeads“ pro 2.7 ng Sonde gebunden. Nach Abnahme des Überstandes erfolgten die Waschungen in 0.1× SSC zweimal bei Raumtemperatur und einmal bei 52 °C. Die Elution wurde in FA-Lösung bei 71 °C durchgeführt. 2. Aufreinigung: Nach der erneuten Hybridisierung folgte die Photoreversion für 9 Minuten. Analog der 1. Aufreinigung wurde die Probe an die „Dynabeads“ gebunden und in 0.1× SSC bei Raumtemperatur gewaschen. Die Elution erfolgte stufenweise wie angegeben. Spur 1: 230 ng Ausgangsextrakt (Nr 11); Spur 2: 230 ng Ausgangsextrakt nach Quervernetzung. Die im Folgenden aufgeführten Angaben beziehen sich auf die dem aufgetragenen Aliquot entsprechenden Mengen in die Aufreinigung eingebrachter Nukleinsäure. Spuren 3–5: 1. Aufreinigung; Spur 3: Überstand (230 ng); Spur 4: Eluat vor der Photoreversion (230 ng); Spur 5: Eluat nach der Photoreversion (230 ng); Spur 6: 50 ng Längenstandard pBR322<sub>Hae III</sub> mit den Fragmentlängen: 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 123/124, 104, 89 nt; Spur 7: 50 ng Digoxigenin-markierter Längenstandard pBR322<sub>Hae III</sub> mit den entsprechenden Fragmentlängen; Spuren 8–13: 2. Aufreinigung; Spur 8: Überstand (47 µg); Spur 9: Waschung I, 0.1× SSC bei RT (47 µg); Spur 10: Waschung II, 0.1× SSC bei RT (47 µg); Spur 11: Eluat I; 0.1× SSC bei 68 °C (47 µg); Spur 12: Eluat II, H<sub>2</sub>O bei 70 °C (47 µg) und Spur 13: Eluat III, FA-Lösung bei 70 °C (5.7 µg)

Abbildung 3.19 fasst die Ergebnisse einer solchen Isolation zusammen. Mit dem ersten Aufreinigungsschritt konnte die Hauptmenge pflanzlicher Nukleinsäure abgetrennt werden. Das Eluat in Spur 4 enthält lineare und zirkuläre Viroide, Komplexe und *in vitro*-Transkripte. Nach der Photoreversion nimmt die gesamte Nukleinsäurekonzentration in der Probe ab (Spur 5).

Diese Degradation wurde durch UV-Schädigungen hervorgerufen. Ein Vergleich mit Spur 4 zeigt keine nach der Reversion der Quervernetzung auftretende zusätzliche Bande. Also konnte keine zelluläre RNA detektiert werden, die aus einem Komplex mit PSTVd freigesetzt wurde.

Die Proben des zweiten Aufreinigungsschrittes wurden  $200\times$  konzentrierter aufgetragen als die der ersten Aufreinigung. Trotzdem ließen sich im Überstand (Spur 8) nur geringe Mengen an PSTVd und einer RNA, die auf einer Höhe mit 5S RNA migriert, nachweisen. Nach den Waschungen (Spuren 9 und 10) erfolgte die Elution in drei Stufen. Zunächst wurden die Partikel in  $0.1\times$  SSC (15 mM NaCl) bei  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Spur 11 lässt erkennen, dass unter diesen Bedingungen bereits ein deutlicher Anteil der Viroid-RNA eluierte und nach der Silberfärbung die intensivsten Signale in dieser Probe zeigte. Daneben erscheint eine weitere dominante Bande, die in der Abbildung mit einem Stern gekennzeichnet ist. Diese RNA weist eine Länge von 120 Nukleotiden auf und ist in dieser Fraktion am konzentriertesten. Nach Elution in  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Spur 12) ist ein ähnliches Bild zu erkennen. Die Relation der Signalintensitäten ändert sich jedoch. Während die Menge an Viroid-RNA zunimmt, nimmt die mit Stern markierte Nukleinsäure im Vergleich zu der vorherigen Elution ab. Dieser Trend verstärkt sich in der letzten Elutionsfraktion (Spur 13). Hier ist an der entsprechenden Position kein Fragment erkennbar, wohingegen die Viroidkonzentration in etwa der ersten Elution in Spur 11 entspricht. Da nach Inkubation in FA-Lösung bei  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  Viroide und *in vitro*-Transkripte fast vollständig zurückgewonnen werden konnten, wurde in Spur 13 weniger als ein Achtel der Menge aufgetragen, die in den bisher vorgestellten Proben in das Gel eingebracht wurden. Erst unter diesen letzten, stringenten Elutionsbedingungen wurden die biotinylierten *in vitro*-Transkripte und stabil daran gebundene Viroide von den Partikeln abgewaschen. Das bereits in den vorangegangenen Spuren PSTVd und Sonden-Moleküle nachgewiesen werden konnten, wurde als Konsequenz einer indirekten Aufreinigung interpretiert. Die Idee beruht auf der Annahme, dass während der Maskierung der Viroide nicht nur dimere PSTVd(-Komplexe)-Sonden Hybride entstehen, sondern multimere Konstrukte mit variablen PSTVd/Sonden-Verhältnissen. Dies wird durch die Selbstkomplementarität der Viroidsequenz ermöglicht, welche die Ausbildung homomolekularer Hybride mit (+) oder (-)Sequenz erlaubt. Eine resultierende Wechselwirkung ist jedoch energetisch ungünstiger als die eines (+)/(-)PSTVd-Hybrides und derart gebundene Moleküle eluieren bereits unter minder stringenten Reaktionsbedingungen.

Es entsprach daher den Erwartungen, dass die Konzentration der PSTVd-Moleküle und der biotinylierten *in vitro*-Transkripte mit Fortschreiten des Elutionsprozesses zunahm. Anders sollte sich eine mit PSTVd wechselwirkende RNA verhalten. Bereits in Abschnitt 3.2.1 wurde diskutiert, dass eine solche pflanzliche Ribonukleinsäure, die nur über wenige Nukleotide eine Wechselwirkung mit PSTVd ausbildet, bereits unter milderer Bedingungen vollständig eluiert. Die Tatsache, dass die mit Stern gekennzeichnete RNA ihr Elutionsmaximum bereits bei  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$  in  $0.1\times$  SSC erreicht und die Elutionsintensität in den folgenden Fraktionen stetig abnimmt, ist ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei dieser um eine pflanzliche Nukleinsäure handelt. Aber erst der PSTVd-spezifische Nachweis erlaubt eine eindeutige Aussage. Um die direkte Vergleichbarkeit der in Abbildung 3.20 dargestellten „Northern“-Analysen mit dem in Abbildung 3.19 gezeigten Gel zu gewährleisten, wurde in letzterem ein Digoxigenin-markierter Längenstandard in Spur 7 mit aufgetragen. Wie der Vergleich zu einem unmodifizierten Längenstandard mit gleichen Fragmentlängen (Spur 6) erkennen läßt

führt die 3'-Endmarkierung mit Digoxigenin zu einer leichten Retardation im Gel. Der gleiche Längenstandard wurde bei dem nachfolgenden Viroid-spezifischen Nachweis verwendet.

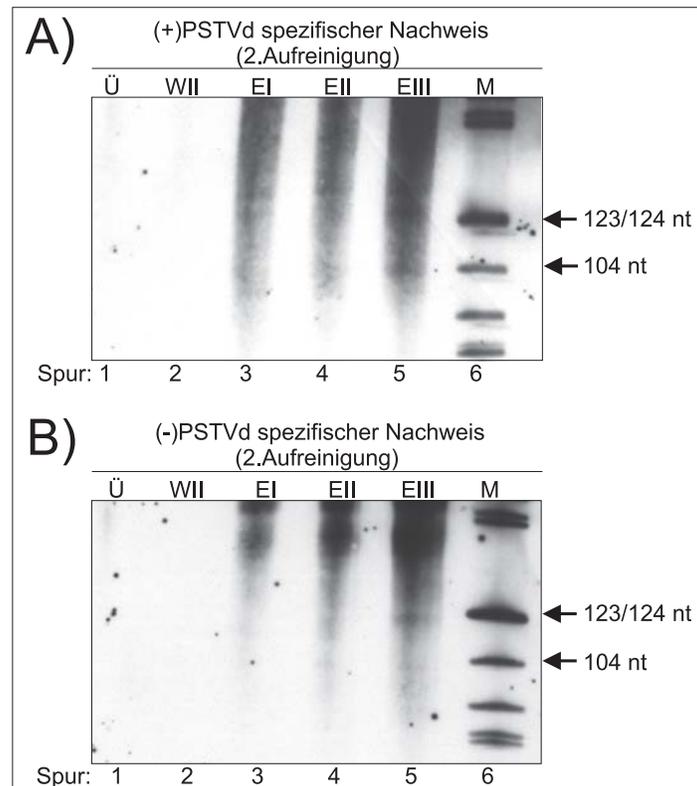


Abbildung 3.20: Aufreinigung von *in vitro* an PSTVd quervernetzter zellulärer RNA unter Verwendung von biotinylierten (-)PSTVd-Vollängen-*in vitro*-Transkripten. Teil A): (+)PSTVd-spezifischer Nachweis; Teil B): (-)PSTVd-spezifischer Nachweis. Die bereits in Abbildung 3.19 dargestellten und beschriebenen Proben der 2. Aufreinigung wurden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (8 % PAA (29:1); 1× TBE; 8 M Harnstoff; 55 °C), elektrisch auf eine Nylonmembran transferiert, und mit Digoxigenin-markierten „Northern“-Sonden nachgewiesen. Die Hybridisierung erfolgte bei 65 °C in 50 % Formamid. Spur 1: Überstand, 4.7 µg; Spur 2: Waschung II, 4.7 µg; Spuren 3–5: Eluate I–III, je 4.7 µg; Spur 6: Digoxigenin-markierter DNA-Längenstandard V, Roche Mannheim mit den Fragmentlängen 192, 184, 124/123, 104, 89, 80... nt

Abbildung 3.20 zeigt die bereits in Abbildung 3.19 dargestellten Proben sowohl nach einer (+)PSTVd-spezifischen (A)), als auch nach einer (-)PSTVd-spezifischen (B)) „Northern“-Analyse. In beiden Teilen ist der Hintergrund an Viroid-RNA in den Elutionsfraktionen deutlich zu erkennen. Auch in dem Bereich, in dem Fragmente einer Größe zwischen 104 und 123/124 Nukleotiden migrieren, sind Viroide nachweisbar. Kein Signal weist jedoch eine dem in der vorherigen Abbildung mir Stern gekennzeichneten ähnliche Charakteristik auf, da die Intensitäten im Verlauf der Elutionen stetig zunehmen. Es kann kein Degradationsprodukt mit (+) oder (-)PSTVd-Sequenz erkannt werden, das ein Elutionsmaximum bei 68 °C in 0.1× SSC aufweist. Damit war gezeigt, dass es sich bei dem aufgereinigten, in Abbildung 3.19 mit Stern gekennzeichneten Fragment um eine 120 Nukleotide lange RNA pflanzlichen Ursprungs handelte. Andere zelluläre RNAs konnten nicht nachgewiesen werden.

### 3.3.2 Aufreinigung mit verkürzten, Biotin-markierten (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripten aus vorfraktionierten *Lycopersicon esculentum* RNA-Extrakten

Die Isolation einer pflanzlichen RNA bedeutete nicht zwangsläufig, dass diese zuvor mit PSTVd eine durch Psoralen quervernetzte Wechselwirkung ausgebildet hatte. Um dies zu zeigen war es notwendig, die Freisetzung der zellulären Komponente aus dem Komplex nachzuweisen. Konkret bedeutete dies, dass die Probe nach der ersten Aufreinigung vergleichend vor und nach der Photoreversion gelelektrophoretisch untersucht werden musste. Zu diesem Zeitpunkt hatte in der Aufreinigung jedoch noch keine Differenzierung zwischen zellulärer RNA und PSTVd-RNA sowie Sonden-Molekülen stattgefunden. Alle Fragmente befanden sich in einer Fraktion. Abbildung 3.20 zeigt in Teil B) Spur 5 ein (-)PSTVd-Degradationsprodukt, das ein der zellulären RNA entsprechendes Migrationsverhalten aufwies. Die Konzentration dieses Fragments variierte in unabhängigen Aufreinigungen und konnte so hoch sein, dass der Nachweis im Silbergel möglich war. Der eindeutige Beweis einer Zunahme der zellulären RNA durch Aufhebung der kovalenten Verknüpfungen konnte vor einem solchen Hintergrund nicht erfolgen. Da gezeigt werden konnte, dass die 120 Nukleotide langen (-)PSTVd-Moleküle auf eine Degradation der in die Aufreinigung eingebrachten (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripte voller Länge zurückzuführen waren, erschien es sinnvoll für die folgende Untersuchung 61 nt-PSTVd-*in vitro*-Transkripte mit (-)Strang-Sequenz als Sonde einzusetzen.

Experimentell wurde wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben verfahren. Ein vorfraktionierter RNA-Extrakt aus PSTVd (Stamm RG1)-infizierten Tomaten-Blättern wurde nach *in vitro* Komplexeinstellung und Quervernetzung im Bereich der Nukleotide 221-282 (LCCR) an biotinylierte 61 nt-(-)PSTVd *in vitro*-Transkripte hybridisiert. Dabei wurden sowohl für die Hybridisierung als auch für die nachfolgende Bindung an die „Dynabeads“ die Konzentrationsverhältnisse den in Abschnitt 3.2.2.2 etablierten Parametern angepasst.

Auch hier zeigte die erste Aufreinigung ein qualitativ gutes Ergebnis. Spur 1 in Abbildung 3.21 stellt 1 % des nach der Bindung an die „Dynabeads“ abgenommenen Überstandes dar. Nach Waschungen in  $0.1 \times$  SSC bei Raumtemperatur und  $50^\circ\text{C}$  konnten in 1 % der Elutionsfraktion (Spur 4) keine abundanten pflanzlichen Nukleinsäuren mehr nachgewiesen werden. Als diskrete Banden zu erkennen sind vor allem zirkuläre und lineare Viroide, Degradationsprodukte sowie die 61-nt-PSTVd-*in vitro*-Transkripte. In den Spuren 3–5 wurden verschiedene Konzentrationen der Elutionsfraktion aufgetragen, um sie mit ähnlichen Konzentrationen der Probe nach 9-minütiger Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm zu vergleichen. Dies sollte die Identifikation von Nukleinsäuren erlauben, die aus den Komplexen entlassen worden waren und in der Gelelektrophorese als zusätzliches Signal in Erscheinung traten. Voraussetzung hierfür war, dass von den Proben nach der Photoreversion nicht mehr RNA in das Gel eingebracht wurde als von den Referenzproben vor der Bestrahlung. Ein zu beobachtender Effekt wäre sonst auch als Konsequenz einer erhöhten Nukleinsäurekonzentration interpretierbar. Es wurde daher von den entsprechenden Proben etwas weniger Nukleinsäure eingesetzt. Zusätzlich konnten die 61 nt-PSTVd-*in vitro*-Transkripte als interner Mengenstandard angesehen werden. Da sie nicht in die kovalent verknüpften Komplexe integriert worden waren, sollte ihre Konzentration durch die Photoreversion nicht zunehmen. Wie aus Abbildung 3.21 ersichtlich, wurden in den zwei Konzentrationsreihen (Spuren 3-5 vor der Reversion und Spu-

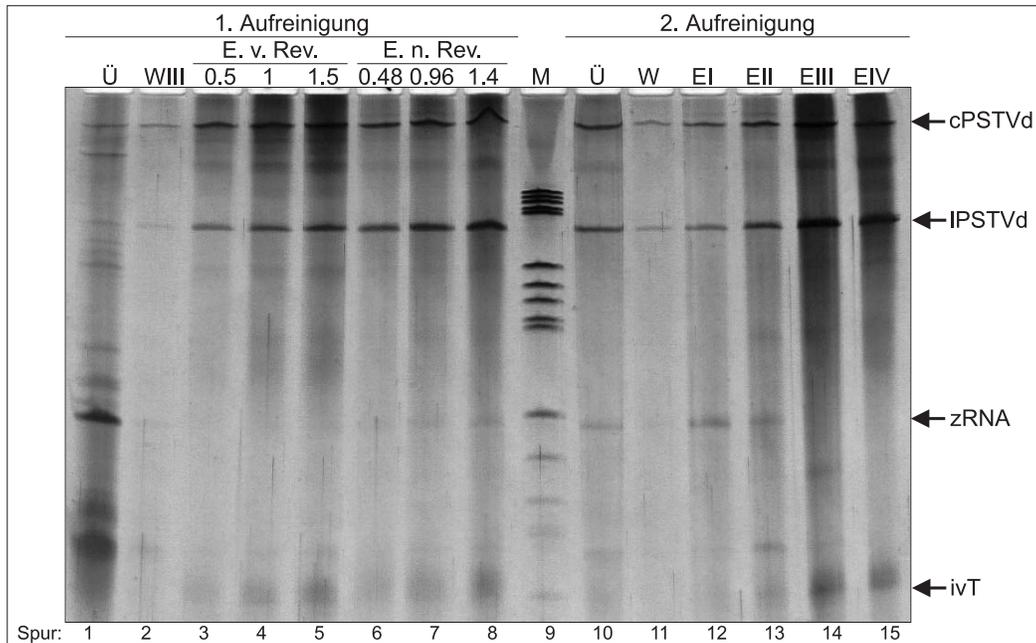


Abbildung 3.21: Aufreinigung von *in vitro* an PSTVd quervernetzter zellulärer RNA unter Verwendung von verkürzten, biotinylierten (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripten. Dargestellt ist ein denaturierendes 8 % Polyacrylamidgel (29:1); 8 M Harnstoff; 1× TBE; mit anschließender Silberfärbung. 1. Aufreinigung (Spuren 1–8): Es wurden 24,8 µg RNA aus vorfraktionierten Tomaten-Extrakten in die Aufreinigung eingebracht, an 2,55 µg 61 nt-(-)PSTVd-*in vitro*-Transkripte hybridisiert und an 1 µg „Dynabeads“ pro 0,19 ng Sonde gebunden. Nach Abnahme des Überstandes erfolgten die Waschungen in 0,1× SSC einmal bei RT und zweimal bei 50 °C. Die Elution wurde in FA-Lösung bei 70 °C durchgeführt. 2. Aufreinigung (Spuren 10–15): Nach erneuter Hybridisierung und Photoreversion für 9 Minuten wurden 90 % des Eluates der 1. Aufreinigung in die 2. Aufreinigung eingebracht. Analog der 1. Aufreinigung wurde die Probe an die „Dynabeads“ gebunden und bei RT mit 0,1× SSC gewaschen. Im Folgenden angegeben sind die prozentualen Anteile des aufgetragenen Aliquots zu der gesamten Fraktion. Spur 1: 1 % des Überstandes; Spur 2: 10 % der dritten Waschung; Spuren 3–5: 0,5; 1 und 1,5 % des Eluates vor der Photoreversion; Spuren 6–8: 0,48; 0,96; 1,4 % des Eluates nach der Photoreversion; Spur 9: Digoxigenin-markierter DNA-Längenstandard V, Roche Mannheim, mit den Fragmentlängen 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124/123, 104, 89, 80, 64 nt; Spur 10: 50 % des Überstandes; Spur 11: 50 % der Waschung; Spur 12: 50 % der ersten Elution in 0,1× SSC bei 50 °C; Spur 13: 50 % der zweiten Elution in 0,1× SSC bei 70 °C; Spur 14: 50 % der dritten Elution in H<sub>2</sub>O bei 70 °C; Spur 15: 10 % der vierten Elution in FA-Lösung bei 70 °C; cPSTVd: zirkuläres PSTVd; lPSTVd: lineares PSTVd; zRNA: zelluläre RNA; ivT: *in vitro*-Transkripte

ren 6-8 nach der Reversion) vergleichbare RNA-Mengen aufgetragen. Fragmente, die nur nach und nicht vor der Reversion detektierbar waren, mussten daher RNAs sein, die zuvor über Psoralen kovalent an PSTVd gebunden vorlagen.

Eine solche 120 Nukleotide lange Ribonukleinsäure konnte in den Spuren 7 und 8 eindeutig nachgewiesen werden. In der zweiten Aufreinigung verhielt sich dieses Fragment identisch wie die in Abschnitt 3.3.1 beschriebene und in der Abbildung 3.19 mit Stern gekennzeichnete pflanzliche RNA. Weder der (+) noch der (-)PSTVd-spezifische Nachweis ließ Signale innerhalb des entscheidenden Bereiches erkennen (Daten nicht abgebildet). Dies bestätigte, dass es sich nicht um PSTVd- oder Sonden-Degradationsprodukte handelte. Es konnte daher geschlossen werden, dass in beiden Versuchen die gleiche zelluläre RNA aufgereinigt worden war. Während zuvor die erste Elution der zweiten Aufreinigung bei 68 °C durchgeführt wurde

(siehe Abbildung 3.19) konnte nun gezeigt werden, dass das Elutionsmaximum dieser RNA bereits durch Inkubation bei 50 °C in 0.1× SSC induziert werden konnte. Weitere Nucleinsäuren pflanzlichen Ursprungs konnten auch unter Verwendung verkürzter Sonden nicht detektiert werden.

Somit war einer 120 Nucleotide lange, zelluläre RNA aufgereinigt worden, die sich nach *in vitro*-Komplexeinstellung in vorfraktionierten RNA-Extrakten aus Tomaten-Blättern über Psoralen kovalent an PSTVd (Stamm RG1) binden lies.

### 3.3.3 Nachweis von 5S rRNA in den aufgereinigten Komplexen

Aufgrund der Tatsache, dass die isolierte Nucleinsäure eine Länge von 120 Nucleotiden aufwies, wurde vermutet, dass es sich um 5S rRNA handeln könnte. Diese ist ein Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit und gehört zu den häufigsten zellulären Nucleinsäuren. Durch die Vorfraktionierung des eingesetzten RNA-Extraktes wurde sie weiter angereichert und stellte hinter tRNA die konzentrierteste Nucleinsäure in dem Ausgangsmaterial dar (siehe Abbildung 3.19, Spuren 1–3).

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde ein 5S rRNA-spezifisches Nachweisverfahren etabliert. Dabei wurden Digoxigenin-markierte *in vitro*-Transkripte mit invertierter 5S rRNA-Sequenz als „Northern“-Sonden verwendet (siehe Abschnitt 2.6.4).

Aliquots der bereits in Abbildung 3.21 dargestellten Proben wurden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert, alkalisch denaturiert und mittels UV-Strahlung fixiert. Die Hybridisierung mit den Sonden erfolgte über Nacht bei 60 °C in 50 % Formamid. Dies erwies sich als ausreichend stringent. Nach einer Inkubation mit Anti-DIG-F<sub>ab</sub>-Alkalische-Phosphatase Antikörper erfolgte die eigentliche Nachweisreaktion mit dem CDP-Star<sup>TM</sup>-System. Abbildung 3.22 gibt die Ergebnisse wieder.

Die über die „Dynabeads“ mit aufgereinigte 5S rRNA wies die gleichen Eigenschaften wie die zuvor in Abbildung 3.21 dargestellte zelluläre RNA auf. In Abbildung 3.22 konnte monomere 5S rRNA sowohl in dem Überstand (Spur 2) sowie in den beiden ersten Elutionsfraktionen EI und EII (Spuren 4 und 5) nachgewiesen werden. Das Elutionsmaximum wurde dabei in 0.1× SSC bei 50 °C erreicht (Spur 4). 5S rRNA enthaltende Komplexe zeigten ein reziprokes Verhalten. Ihr Elutionsprofil entsprach dem von PSTVd. Erst durch Inkubation bei 70 °C konnten sie zurückgewonnen werden (Spuren 6 und 7). Unter Berücksichtigung des Umstandes, dass diese Komplexe in dem Überstand nicht vorhanden waren und demzufolge vollständig an die „Dynabeads“ gebunden wurden, konnte geschlossen werden, dass es sich hierbei um *in vitro* eingestellte und durch Psoralen quervernetzte PSTVd-5S rRNA-Komplexe handelte. Diese waren zuvor nicht identifiziert worden, da sie weder in einem Sequenz-unspezifischen, noch in einem PSTVd-spezifischen Nachweis von reinen PSTVd-Komplexen zu unterscheiden waren.

Damit war gezeigt worden, dass es sich bei der 120 Nucleotide langen, zellulären RNA, die aus vorfraktionierten Tomaten-RNA-Extrakten aufgereinigt werden konnte, um 5S rRNA handelte. Darüber hinaus konnten *in vitro* eingestellte und mit Psoralen quervernetzte Komplexe zwischen PSTVd und 5S rRNA nachgewiesen werden.

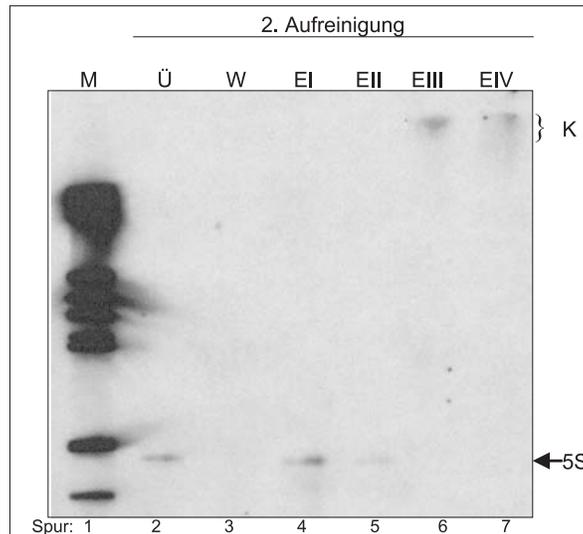


Abbildung 3.22: 5S rRNA-spezifische Analyse der Aufreinigungsfractionen von *in vitro* an PSTVd quervernetzter zellulärer RNA unter Verwendung von verkürzten, biotinylierten (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripten. Es wurden Aliquots der bereits in Abbildung 3.21 dargestellten Proben der zweiten Aufreinigung in einem denaturierenden 8 % Polyacrylamidgel (29:1) ( $1\times$  TBE; 8 M Harnstoff;  $55^\circ\text{C}$ ) aufgetrennt, elektrisch auf eine Nylonmembran transferiert, alkalisch denaturiert und fixiert. Der Nachweis erfolgte mit dem CDP-Star<sup>TM</sup>-System. Im Folgenden angegeben sind die prozentualen Anteile des aufgetragenen Aliquots von der gesamten Fraktion. Spur 1: Digoxigenin-markierter DNA-Längenstandard V, Roche Mannheim, mit den Fragmentlängen 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124/123, 104 nt; Spur 2: 10 % des Überstandes; Spur 3: 10 % der Waschung; Spur 4: 10 % der ersten Elution in  $0.1\times$  SSC bei  $50^\circ\text{C}$ ; Spur 5: 10 % der zweiten Elution in  $0.1\times$  SSC bei  $70^\circ\text{C}$ ; Spur 6: 10 % der dritten Elution in  $\text{H}_2\text{O}$  bei  $70^\circ\text{C}$ ; Spur 7: 10 % der vierten Elution in FA-Lösung bei  $70^\circ\text{C}$ ; K: Komplexe aus 5S rRNA und PSTVd; 5S: 5S rRNA

### 3.3.4 Aufreinigung mit Biotin-markierten PSTVd-*in vitro*-Transkripten voller Länge aus *Solanum demissum* Gesamt-RNA-Extrakten

In dem zuvor verwendeten RNA-Extrakt entsprachen die Konzentrationsrelationen zwischen PSTVd und 5S rRNA nicht den in der Zelle vorliegenden Verhältnissen. Beide waren über differentielle Präzipitationen angereichert worden. Es musste nun überprüft werden, inwieweit die gewonnenen Erkenntnisse auf RNA-Extrakte mit natürlichen PSTVd/5S rRNA Konzentrationsrelationen übertragbar waren. Des Weiteren konnte nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Vorfraktionierung potentielle PSTVd-Wechselwirkungspartner aus den Extrakten entfernt worden waren. Daher war es notwendig, die vorgestellten Experimente an Gesamt-RNA aus Zellkernen zu wiederholen.

Die Isolation der Nukleinsäuren erfolgte aus PSTVd (Stamm intermediate)-infizierten Zellkulturen der Kartoffel *Solanum demissum* (Linie M316) wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben. Nach der *in vitro*-Komplexeinstellung und der anschließenden Quervernetzung wurde die Aufreinigung der PSTVd-Komplexe mit (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripten voller Länge durchgeführt. Die Menge einzusetzender Transkripte war zuvor anhand von Titrationsanalysen ermittelt worden (s.S. 50 und folgende). Im Anschluss an den ersten Aufreinigungsschritt wurde ein Aliquot des Eluates mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt und gemeinsam mit einem unbehandelten Aliquot gelelektrophoretisch analysiert. Der größte Teil des Eluates wurde aber direkt

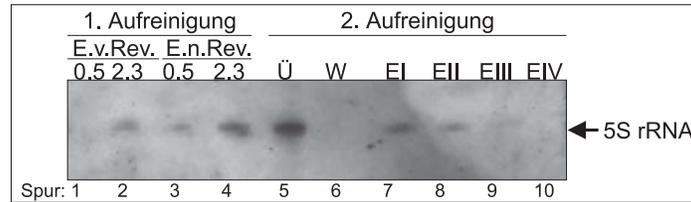


Abbildung 3.23: 5S rRNA-spezifische Analyse der Aufreinigungsfractionen von *in vitro* quervernetzter, zellulärer Kern-RNA unter Verwendung von biotinylierten Vollängen-(-)PSTVd-*in vitro*-Transkripten. Die Proben wurden in einem denaturierenden 8 % Polyacrylamidgel (29:1) (1× TBE; 8 M Harnstoff; 55 °C) aufgetrennt, elektrisch auf eine Nylonmembran transferiert, alkalisch denaturiert und fixiert. Der Nachweis erfolgte mit dem CDP-Star<sup>TM</sup>-System. 180 µg RNA wurden in die Aufreinigung eingebracht. Im Folgenden angegeben sind die prozentualen Anteile des aufgetragenen Aliquots von der gesamten Fraktion. 1. Aufreinigung: Spur 1: 0.5 % des Eluates der ersten Aufreinigung vor der Photoreversion; Spur 2: wie Spur 1 aber 2.3 %; Spur 3: 0.5 % des Eluates der ersten Aufreinigung nach der Photoreversion; Spur 4: wie Spur 3 aber 2.3 %. 2. Aufreinigung (Es wurden jeweils 40 % des gesamten Ansatzes aufgetragen): Spur 5: Überstand; Spur 6: Waschung in 0.1× SSC bei Raumtemperatur; Spur 7: erste Elution in 0.1× SSC bei 50 °C; Spur 8: zweite Elution in 0.1× SSC bei 70 °C; Spur 9: dritte Elution in H<sub>2</sub>O bei 70 °C; Spur 10: vierte Elution in FA-Lösung bei 70 °C

in den zweiten Aufreinigungsschritt eingebracht. Waschungen und Elutionen wurden analog zu Abschnitt 3.3.2 durchgeführt. Auch die Photoreversion erfolgte entsprechend. Erzielte Ergebnisse waren damit direkt vergleichbar.

Erste Gelanalysen bestätigten die Qualität der Aufreinigungen und zeigten, dass auch in Kernextrakten aus Kartoffeln eine zelluläre RNA mit einer Länge von 120 Nukleotiden isoliert werden konnte. Erwartungsgemäß war ihre Konzentration jedoch geringer als nach einer Aufreinigung aus vorfraktionierten Extrakten. Abbildung 3.23 zeigt die gewonnenen Proben nach einem 5S rRNA-spezifischen Nachweis. Das erhaltene Bild entspricht dem der Abbildung 3.21. Am Ende der ersten Aufreinigung können 5S rRNA-Moleküle durch 9-minütige Bestrahlung mit UV-Licht aus Komplexen freigesetzt werden. Der Vergleich der Spuren 1 und 2 mit den Spuren 3 und 4 zeigte eine deutliche Zunahme des 5S rRNA-Signals durch die Photoreversion. Auch in der zweiten Aufreinigung stimmen die Ergebnisse überein. Über PSTVd an die „Dynabeads“ gebundene 5S rRNA eluiert im wesentlichen bei 50 °C in 0.1× SSC (Spur 7). In den nachfolgenden Elutionen können nur noch geringe Mengen nachgewiesen werden.

Da das vorgestellte Experiment analog der Aufreinigung von PSTVd-5S rRNA-Komplexen aus vorfraktionierten Tomaten-Extrakten mit verkürzten Sonden durchgeführt wurde und die in den Gelanalysen erhaltenen 5S rRNA-Verteilungsmuster identisch sind, konnten die gleichen Schlussfolgerungen gezogen werden. Auch in RNA-Extrakten aus Kartoffelsuspensionszellkulturen mit einem der Situation im Zellkern entsprechenden Konzentrationsverhältnis von PSTVd zu 5S rRNA konnte PSTVd durch thermische Denaturierung und langsame Renaturierung Psoralen-verknüpfbare Komplexe mit 5S rRNA ausbilden. Diese Komplexe konnten mit dem zuvor etablierten Verfahren aufgereinigt werden. Die Komponenten PSTVd und 5S rRNA wurden durch Photoreversion freigesetzt und anschließend nachgewiesen.

Weitere Fragmente konnten jedoch auch nach Komplexbildung mit Kern-RNA nicht detektiert werden. An dieser Stelle muss berücksichtigt werden, das möglicherweise vorhandene, größere Wechselwirkungspartner, deren Migrationsverhalten in denaturierenden Gelelektrophoresen dem von PSTVd oder PSTVd-Komplexen entspricht, mit der angewendeten Strategie nicht identifiziert werden könnten. Vor dem Hintergrund an Viroid-RNA wären solche

Fragmente nicht nachzuweisen. Gleiches gilt für kleine pflanzliche Nukleinsäuren, die zwar einen Komplex mit PSTVd ausbilden können, aber nur in so geringer Konzentration, dass ein Nachweis mit der gewählten Methodik nicht möglich wäre.

### 3.3.5 Direkte Wechselwirkung zwischen isoliertem PSTVd und 5S rRNA

Nachdem gezeigt worden war, dass *in vitro* ein durch Psoralen kovalent quervernetzbarer Komplex eingestellt werden konnte, der sowohl PSTVd als auch 5S rRNA enthielt, sollte nun sichergestellt werden, dass beide Moleküle eine Wechselwirkung miteinander ausbilden können. Darüber hinaus musste untersucht werden, in wie weit PSTVd-Degradationsprodukte für eine erfolgreich Komplexierung notwendig waren. Bereits 1988 war eine Wechselwirkung zwischen PSTVd und 7S RNA postuliert worden (Haas *et al.* 1988). Dies erwies sich jedoch als biologisch nicht relevant, da die Bindung beider Moleküle nur erfolgreich induziert werden konnte, wenn die PSTVd-Sequenz auf geeignete Fragmentgröße verkürzt wurde.

Um die gegebene Fragestellung zu untersuchen, wurde ein Vergleich der Retardierungsmuster *in vitro* eingestellter 5S rRNA-Komplexe mit und ohne PSTVd durchgeführt. Zirkuläres PSTVd und 5S rRNA wurden mittels Gelelektion aus Tomaten-RNA-Extrakten isoliert. Zwei Proben wurden parallel bearbeitet. Zum Einen wurde 5S rRNA alleine und zum Anderen mit PSTVd gemeinsam thermisch denaturiert, renaturiert und mit Psoralen inkubiert. Die 5S rRNA wurde dabei in einem 2.6 fachen molaren Überschuss in die Reaktion eingebracht. Dies spiegelte in etwa die Konzentrationsverhältnisse in vorfraktionierten RNA-Extrakten wieder.

Anhand des Verteilungsmusters retardierter Signale wurde entschieden, ob die zugrundeliegenden Komplexe PSTVd enthielten oder nicht. Signale, die in beiden Ansätzen nachweisbar waren enthielten nur 5S rRNA. Die Signale, die jedoch nur bei PSTVd-Zugabe zu erkennen waren, mussten auf Komplexe aus PSTVd und 5S rRNA zurückzuführen sein. Ein solches Signal ist in Abbildung 3.24 Spur 2 zu sehen. Diese Komplexe wurden in der Gelelektrophorese stärker retardiert als alle Signale der Kontrollprobe in Spur 3. Die Kontrolle enthielt kein PSTVd. Daher konnten retardierte Signale hier als 5S rRNA-Multimere oder als abweichende 5S rRNA-Konformationen interpretiert werden. Beides wird in der Literatur beschrieben (Gruner 1992, Ogata *et al.* 1991a). Oberhalb der monomeren 5S rRNA sind in Spur 3 zwei solcher Signale zu erkennen. Diese sind auch bei Anwesenheit von PSTVd im Reaktionsansatz nachweisbar (Spur 2). Die Konzentration der zusätzlichen Signale nahm jedoch zugunsten der PSTVd-5S rRNA Komplexe ab. Es kann zum jetzigen Zeitpunkt nur darüber spekuliert werden, ob die Komplexbildung der 5S rRNA mit PSTVd in Konkurrenz zu einer 5S rRNA-Multimerisierung steht oder ob nur suboptimale 5S rRNA-Konformationen eine Wechselwirkung mit PSTVd erlauben. Da nach der Gelelektion in den Proben keine weiteren zellulären Nukleinsäuren vorhanden waren, kann jedoch als gesichert angenommen werden, dass die PSTVd-5S rRNA-Komplexe aus einer direkten Wechselwirkung beider Komponenten miteinander entstanden sind. Ca. 90 % der eingesetzten Viroide lagen zirkulär, der Rest linear vor. Nach der Gelelektion konnten keine Degradationsfragmente nachgewiesen werden. Somit war bewiesen, dass monomere PSTVd-Moleküle *in vitro* eine direkte Wechselwirkung mit 5S rRNA ausbilden können.

Mit diesem Ergebnis waren die Untersuchungen an *in vitro* verknüpften PSTVd-RNA-Komplexen im Rahmen der vorliegenden Arbeit abgeschlossen.

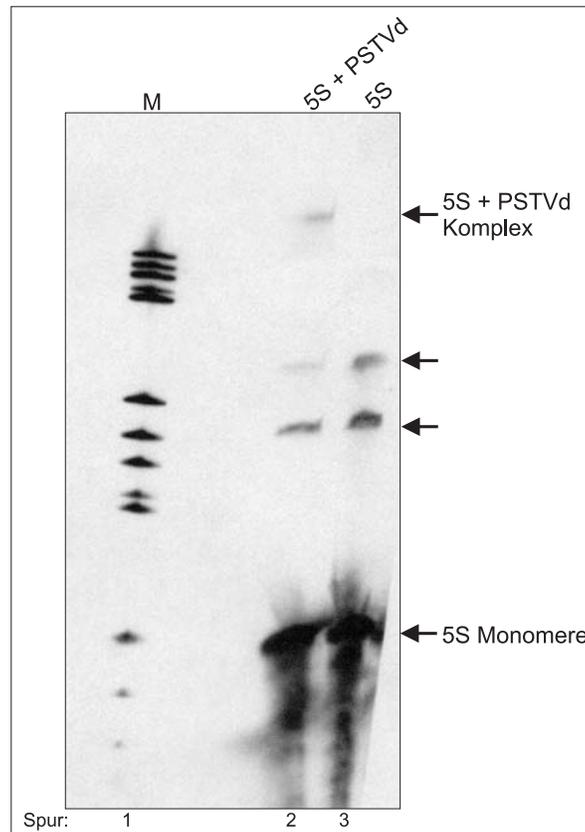


Abbildung 3.24: 5S rRNA-spezifische Analyse von *in vitro* eingestellten PSTVd-5S rRNA-Komplexen. *In vitro* eingestellte Komplexe aus 5S rRNA alleine oder aus 5S rRNA mit PSTVd wurden quervernetzt und auf einem denaturierenden 5 % Polyacrylamidgel (29:1) ( $1\times$  TBE; 8 M Harnstoff;  $55^\circ\text{C}$ ) aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurden die Proben vor der Fixierung alkalisch denaturiert. Die Hybridisierung erfolgte mit Digoxigenin-markierten (-)5S rRNA-*in vitro*-Transkripten. Spur 1: Digoxigenin-markierter DNA-Längenstandard V, Roche Mannheim, mit den Fragmentlängen 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124/123, 104, 89 nt; Spur 2: PSTVd und 5S rRNA sowie die Komplexe; Spur 3: 5S rRNA und 5S rRNA-Komplexe; K: Komplexe aus 5S rRNA und PSTVd; 5S: 5S rRNA

### 3.4 Aufreinigung von *in vivo* quervernetzten PSTVd-5S rRNA-Komplexen

Aus dem Nachweis einer Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA *in vitro* folgt nicht zwangsläufig die Existenz eines solchen Kontakts *in vivo*. Die theoretischen Voraussetzungen sind jedoch günstig. In den Zellkompartimenten weist die Lokalisation beider Moleküle Gemeinsamkeiten auf. Unter Verwendung unterschiedlicher enzymatischer Systeme werden beide Moleküle im Kernplasma transkribiert. Sowohl PSTVd als auch 5S rRNA werden anschließend in den Nukleolus transportiert. Darüber hinaus befallen Viroide in erster Linie neu synthetisierte Gewebe. In diesen erfolgt die Synthese ribosomaler Komponenten mit besonders hoher Aktivität.

Eine Methode zur Induktion Psoralen-vermittelter Quervernetzungen an Protoplasten aus Kartoffelsuspensionszellkulturen war bereits in einer früheren Arbeit (Thiel 1999) etabliert

worden. Während in den *in vitro*-Systemen durch thermische Denaturierung und langsame Renaturierung alle thermodynamisch möglichen Komplexe eingestellt wurden, werden hier nur die in der Zelle tatsächlich vorliegenden Aggregate durch die Psoralen-Behandlung fixiert.

In diesem Verfahren wurden nach einem enzymatischen Zellwandabbau Protoplasten aus *Solanum demissum* Zellen der Linie M316 für 10 Minuten in Psoralen-Puffer inkubiert und für 15–20 Minuten auf Eis mit UV-Licht der Wellenlänge 365 nm bestrahlt. Das mechanische Aufbrechen der Protoplasten erlaubte eine Anreicherung der Zellkerne, aus denen RNA nach der sauren Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Methode extrahiert wurde. Diese RNA konnte direkt in das am *in vitro*-System entwickelte Aufreinigungsverfahren eingebracht werden. Da gezielt eine Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA nachgewiesen werden sollte, erfolgte die Analyse der separierten Nukleinsäuren durch einen 5S rRNA-spezifischen Nachweis. Die Güte einer Aufreinigung wurde durch Anfärbung aller Nukleinsäuren mit Silbernitrat überprüft.

### 3.4.1 Vergleich verschiedener RNA-Extrakte aus Kartoffelsuspensionszellkulturen

Erste Untersuchungen ergaben, dass RNA-Extrakte nach einer Quervernetzung *in vivo* hochmolekulare Komponenten mit 5S rRNA-Sequenz enthielten. Daraus leitete sich die Frage ab, ob es sich hierbei um PSTVd-Komplexe handelte. Wäre dies der Fall, so dürften die entsprechenden Signale nur in Proben aus infizierten Zellen nach Quervernetzung zu erkennen sein.

Abbildung 3.25 stellt daher RNA-Extrakte aus infizierten und gesunden Kartoffelsuspensionszellkulturen mit und ohne Quervernetzung gegenüber. Nachgewiesen wurden nur Fragmente mit 5S rRNA-Sequenz. In allen Proben geht die intensivste Färbung von der Bande monomerer 5S rRNA aus. Ebenfalls deutlich zu erkennen sind eine Reihe von Degradationsfragmenten. Auffällig daran ist, dass diese über alle Spuren hinweg ein einheitliches Bild ergeben. Eine Ausnahme stellt lediglich das Degradationsprodukt dar, das etwa bei 104 Nukleotiden, also kurz unterhalb der 5S rRNA selber, migriert. Hier sind Schwärzungen nur in Extrakten aus PSTVd-infizierten Zellen nachweisbar (Spuren 1–6). Ob dies eine Konsequenz der PSTVd-Infektion ist bleibt aber fraglich. Die Zellen der infizierten und gesunden Kulturen entstammen verschiedenen Zelllinien. Abweichende RNA-Mustern können daher auch immer durch den unterschiedlichen Ursprung begründet sein. Zukünftige Untersuchungen an RNA aus Tomaten-Zellkernen sollten hier Klarheit bringen.

Hochmolekulare Strukturen wurden sowohl in RNA aus PSTVd infizierten Zellen (Linie M316) als auch in Proben aus gesunden Zellen (Linie HH258) nachgewiesen (Abbildung 3.25, Stern). Deren Existenz in nicht-quervernetzten Proben (Spuren 4–6 und 9, 10) legte die Schlussfolgerung nahe, dass es sich hierbei um nicht-prozessierte 5S rRNA-Primärtranskripte handelt. Vor allem in Proben aus gesunden Zellen nahm die Intensität der Signale nach Quervernetzung zu (Spuren 7 und 8). In diesen neu entstandenen Komplexen konnte kein PSTVd integriert sein. Sie wiesen ein Migrationsverhalten auf, das denen der Primärtranskripte entsprach. Zusätzlich waren noch stärker verzögerte Komplexe entstanden, die im Verlauf der Elektrophorese nur oberflächlich in das Gel eindringen.

Ein vergleichbarer Effekt war in den Extrakten aus PSTVd-infizierten Kartoffelsuspensionszellkulturen zu erkennen. Hier wurden quervernetzte (Spuren 1–3) und nicht-quervernetzte

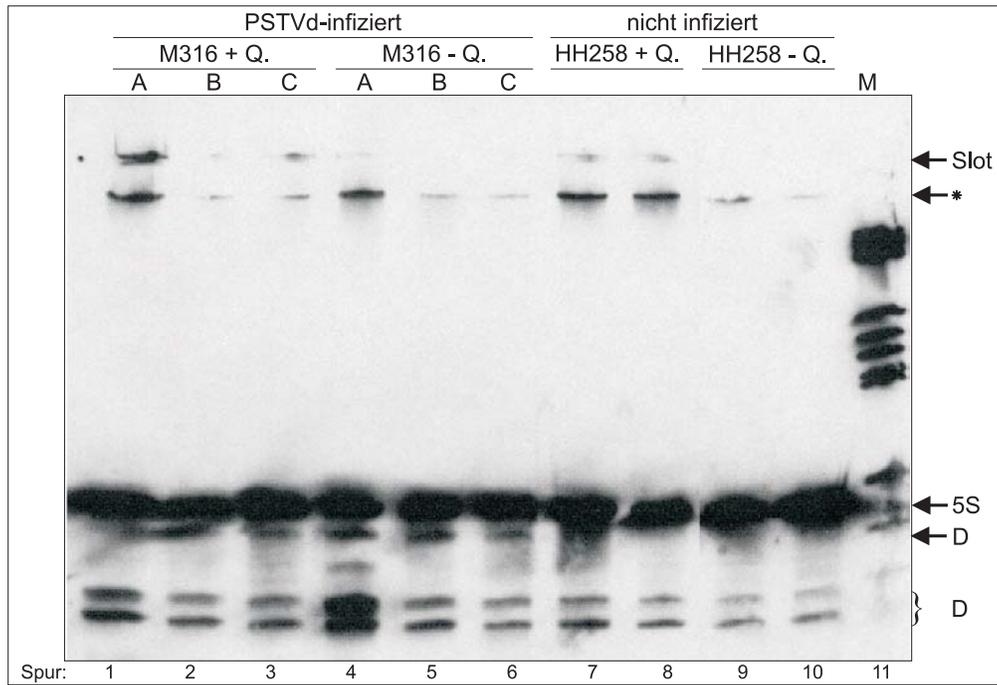


Abbildung 3.25: Vergleich der 5S rRNA-Verteilung von RNA-Extrakten aus PSTVd-infizierten und gesunden Kartoffelsuspensionszellkulturen mit und ohne Quervernetzung. Es wurden jeweils 3 µg der RNA-Extrakte in einem 8 % Polyacrylamidgel (29:1) (1× TBE; 8 M Harnstoff; 55 °C) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran überführt, alkalisch denaturiert, fixiert und bei 60 °C in 50 % Formamid mit Digoxigenin-markierten 5S rRNA-spezifischen *in vitro*-Transkripten hybridisiert. M316+Q.: RNA aus PSTVd infizierten Kartoffelzellen (Linie M316) nach *in vivo* Quervernetzung; M316-Q.: RNA aus PSTVd-infizierten Zellen (Linie M316) ohne Quervernetzung; HH258+Q.: RNA aus gesunden Kartoffelsuspensionszellkulturen (Linie HH258) nach *in vivo* Quervernetzung; HH258-Q.: RNA aus gesunden Zellen (Linie HH258) ohne Quervernetzung. A, B und C bezeichnen jeweils eine Aufreinigung, bei der ein Teil der Protoplasten mit Psoralen behandelt wurde und ein Teil als Kontrolle nicht. M: Digoxigenin-markierter DNA-Längenstandard V, Roche Mannheim, mit den Fragmentlängen 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124/123, 104, 89, 80 nt; 5S: 5S rRNA; D: 5S rRNA Degradationsprodukte

Proben (Spuren 4–6) gemeinsam präpariert und in der Abbildung mit einem einheitlichen Buchstaben gekennzeichnet. Betrachtet man jede Präparation für sich, so fällt die Zunahme hochmolekularer Signale durch die Behandlung mit Psoralen deutlich geringer aus als in den Proben aus gesunden Zellkulturen. Auch hier kann nur darüber spekuliert werden, ob es sich um einen PSTVd-spezifischen Effekt oder um einen durch die verschiedenen Zelllinien hervorgerufenen Artefakt handelt. Es wurde keine Zunahme retardierter Komplexe durch eine kovalente Verknüpfung von PSTVd an 5S rRNA festgestellt. Dies schließt die Existenz solcher Quervernetzungen jedoch nicht aus.

Es musste im Folgenden davon ausgegangen werden, dass die beschriebenen Signale in einem 5S rRNA-spezifischen Nachweis mit denen von PSTVd-5S rRNA-Komplexen interferieren. Eine Differenzierung war nicht durch einen viroidspezifischen Nachweis zu erreichen. Die Existenz homomolekularer PSTVd-Komplexe konnte auch nach *in vivo*-Quervernetzung nicht ausgeschlossen werden.

### 3.4.2 Definition der zusätzlichen Aufreinigungskriterien

Um sicherzustellen, dass aufgereinigte Komplexe neben 5S rRNA auch PSTVd enthalten, wurden folgende zusätzliche Aufreinigungskriterien definiert:

1. Die Qualität einzelner Aufreinigungen kann variieren. Daher wurden nur diejenigen Aufreinigungen in der Auswertung berücksichtigt, in deren Verlauf die Konzentration an PSTVd-freien Fragmenten abnahm, die an PSTVd enthaltenden Aggregaten jedoch zunahm. Dies konnte am Beispiel monomerer 5S rRNA und PSTVd-5S rRNA-Komplexen nachvollzogen werden. Nur wenn sich deren Konzentrationsverhältnis invertiert, wurde dieses Kriterium der spezifischen Anreicherung erfüllt.
2. Eine Aufreinigung ist nur dann spezifisch, wenn sie reproduzierbar ist. Isolierte PSTVd-5S rRNA-Komplexe werden in einer identischen zweiten Aufreinigung erneut vollständig an die paramagnetischen Partikel gebunden. Die Anwendung dieses Kriteriums bedingt allerdings eine Modifikation der Aufreinigungsprozedur, da auf eine Reversion der Quervernetzung zunächst verzichtet werden muss.
3. Es musste sichergestellt werden, dass durch die Quervernetzung entstandene Komplexe nicht mechanisch an den „Dynabeads“ zurückgehalten werden.
4. Es war zu gewährleisten, dass die biotinylierte Sonde zur Maskierung der Viroide nicht an die PSTVd-freien 5S rRNA-Komplexe bindet.

#### **Zu Punkt 3:**

Theoretisch wäre es möglich, dass netzartige Komplexe an der „Dynabeads“ Oberfläche verhaken. Geschieht dies, so könnten die Komplexe eventuell erst nach Denaturierung der auf der Partikeloberfläche verankerten Streptavidin-Moleküle abdissoziieren und würden in den Elutionsfraktionen der Aufreinigung zurückgewonnen. 5S rRNA-Komplexe, die kein Viroid enthalten, würden daraufhin fälschlicherweise als Aggregate aus PSTVd und 5S rRNA interpretiert. Um einzuschätzen, inwieweit eine solche Vorstellung realistisch ist, wurde *in vivo* quervernetzte RNA aus nicht infizierten Kartoffelzellen (Abbildung 3.25 Spur 8) mit „Dynabeads“ inkubiert. Das Konzentrationsverhältnis von RNA zu „Dynabeads“ entsprach dem der nachfolgenden Aufreinigungen von *in vivo* quervernetzter PSTVd-RNA aus infiziertem Gewebe. Anschließend wurden die Partikel gewaschen und gebundene Nukleinsäure in FA-Lösung eluiert. Abbildung 3.26 fasst die erzielten Ergebnisse nach einem 5S rRNA-spezifischen Nachweis zusammen. Der RNA-Extrakt vor Zugabe der „Dynabeads“ zeigt neben monomerer 5S rRNA auch 5S rRNA-Komplexe (Spur 2). Letztere sind in dem von den Partikeln abgenommenen Überstand nicht mehr zu erkennen, da das aufgetragene Aliquot zu wenig RNA enthielt. Nach einem ersten Abspülen der „Dynabeads“ sind in Spur 4 wieder alle Signale sichtbar, allerdings weniger intensiv als in dem Ausgangsmaterial. Mit jeder weiteren Waschung nimmt die Konzentration sowohl der monomeren 5S rRNA als auch die der Komplexe weiter ab. Bereits in der zweiten Waschung (Spur 5) können nur noch 5S rRNA Moleküle nachgewiesen werden. Verzögerte Signale sind auch nach längeren Expositionszeiten nicht vorhanden. Nach

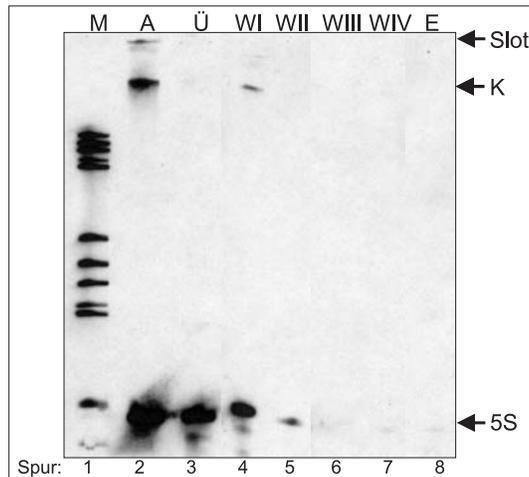


Abbildung 3.26: Verteilung von 5S rRNA nach Inkubation *in vivo* quervernetzter RNA aus nicht-PSTVd-infizierten Kartoffelsuspensionszellkulturen mit „Dynabeads“. 500 µg RNA wurden mit 2.19 mg „Dynabeads“ inkubiert und „aufgereinigt“. Anschließend wurden die Proben in einem 5 % Polyacrylamidgel (29:1) (1× TBE; 8 M Harnstoff; 55 °C) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert, alkalisch denaturiert, fixiert und mit Digoxigenin-markierten 5S rRNA-spezifischen „Northern“-Sonden nachgewiesen. Spur 1: Digoxigenin-markierter DNA-Längenstandard V, Roche Mannheim, mit den Fragmentlängen 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124/123, 104 nt; Spur 2: 5 µg RNA; Spur 3: weniger als 1 % des abgenommenen Überstandes; Spur 4: 20 % der ersten Waschung in 0.1× SSC bei Raumtemperatur; Spuren 5–7: 50 % der zweiten bis vierten Waschung in 0.1× SSC bei 55 °C; Spur 8: 50 % der Elution in FA-Lösung bei 70 °C

Inkubation in FA-Lösung bei 70 °C ändert sich das Bild nicht (Spur 8). 5S rRNA-Komplexe sind unter diesen Voraussetzungen nicht nachweisbar.

Die in das Experiment eingesetzte und in der Gelanalyse aufgetrennte RNA-Menge lag um einen Faktor 4–6 über dem von PSTVd-Aufreinigungen nach *in vivo*-Quervernetzung. Da keinerlei verzögerte Elutionssignale auftreten, kann geschlossen werden, dass der eingangs beschriebene Störeffekt irrelevant ist.

#### **Zu Punkt 4:**

Wie bereits in Abschnitt 3.2.2.3 diskutiert, binden biotinylierte (–)PSTVd-*in vitro*-Transkripte während der Maskierung auch zelluläre Nukleinsäuren. Um dieses Problem zu umgehen wurde in den „Dynabeads“-Aufreinigungen die Konzentration der Sonden immer so gering wie möglich gewählt. Selbst unter diesen Bedingungen konnte jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass ein geringer Teil der Transkripte eine Wechselwirkung zu PSTVd-freien 5S rRNA-Komplexen ausbildet. Je nach Stabilität des entstandenen Hybrides wären diese Komplexe am Ende der Aufreinigung in den Elutionsfraktionen nachweisbar.

Kontrollexperimente belegten jedoch, dass dies nicht zutraf. Das dabei zugrundeliegende experimentelle Konzept beruhte darauf, dass der beschriebene Fehler sowohl bei der Aufreinigung von PSTVd-Komplexen als auch bei einer fingierten Aufreinigung aus PSTVd-freien RNA-Extrakten auftreten müsste. Während bei einer tatsächlichen Aufreinigung nicht zwischen PSTVd-enthaltenden und PSTVd-freien Komplexen unterschieden werden konnte, durften die aus einer fingierten Aufreinigung stammenden Komplexe kein PSTVd enthalten. Die Reaktionsparameter wurden dabei so gewählt, dass die Nachweisempfindlichkeit einer fingier-

ten Isolation signifikant höher war als die nachfolgender Aufreinigungen *in vivo* quervernetzter PSTVd-Komplexe.

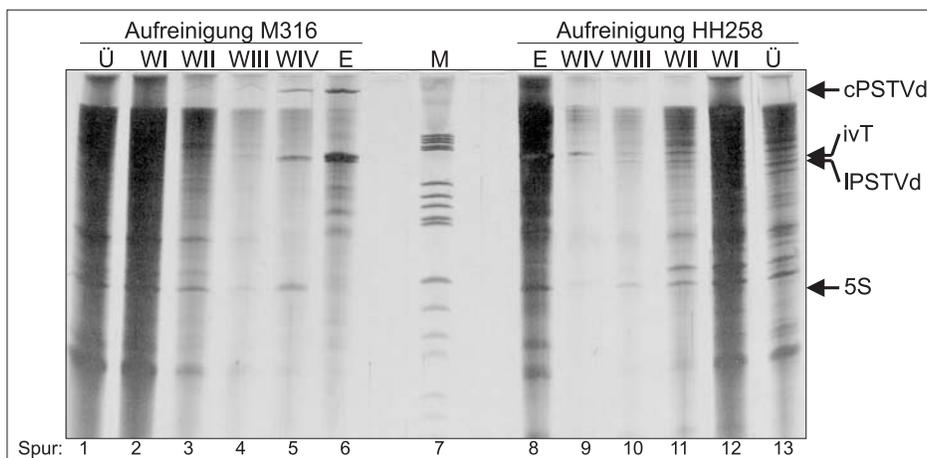


Abbildung 3.27: „Dynabeads“-Aufreinigungen *in vivo* quervernetzter RNA aus PSTVd-infizierten und gesunden Kartoffelsuspensionszellkulturen. Dargestellt ist ein denaturierendes 8 % Polyacrylamidgel (29:1); 8 M Harnstoff; 1× TBE; 55 °C; Silberfärbung. Die Spuren 1–6 zeigen eine Aufreinigung aus 612 µg *in vivo* quervernetzter RNA aus PSTVd-infizierten Kartoffelzellen. Die experimentelle Durchführung erfolgte analog der Kontrollaufreinigung aus nicht infiziertem Gewebe. Spur 1: 0.5 % des Überstandes; Spur 2: 20 % der ersten Waschung in 0.1× SSC bei RT; Spuren 3 und 4: 20 % der zweiten und dritten Waschung in 0.1× SSC bei 55 °C; Spur 5: 20 % der vierten Waschung in 0.1× SSC bei 70 °C; Spur 6: 5 % des Eluates; Spur 7: Digoxigeninmarkierter DNA-Längenstandard V, Roche Mannheim, mit den Fragmentlängen 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124/123, 104, 89, 80, 64, 57 nt; Spuren 8–13: Aufreinigung aus 1 mg *in vivo* quervernetzter RNA aus gesunden Kartoffelzellen; Spur 8: 20 % des Eluates; Spur 9–11: 20 % der vierten, dritten und zweiten Waschung in 0.1× SSC bei 55 °C; Spur 12: 20 % der ersten Waschung in 0.1× SSC bei RT; Spur 13: 0.3 % des Überstandes

Wie Abbildung 3.25 auf Seite 75 in den Spuren 7 und 8 zeigt, ist der Anteil an retardierten 5S rRNA-Signalen in quervernetzten RNA-Extrakten aus nicht infizierten Zellen größer als bei den Proben aus infiziertem Gewebe in den Spuren 2 und 3. Diese Präparationen B und C kamen in späteren Untersuchungen zum Einsatz, nicht jedoch Präparation A, da der Anteil an 5S rRNA-Primärtranskripten überproportional hoch war (siehe Spur 4). Die Konzentration an PSTVd-freien 5S rRNA-Komplexen war demnach in den Extrakten aus gesunden Zellen höher als in denen aus infizierten. Wenn es sich um einen systematischen Fehler handelt, sollte eine höhere Ausgangskonzentration auch immer zu größeren Mengen dieser Komplexe in dem Eluat der Aufreinigung aus nicht infiziertem Gewebe führen.

Analog der Aufreinigung von PSTVd-Komplexen aus infiziertem Gewebe erfolgte nun die Behandlung von 1 mg RNA des in Abbildung 3.25 Spur 8 dargestellten *in vivo* quervernetzten RNA-Extraktes aus gesunden Kartoffelzellen. Entsprechend einer Viroid-Maskierung wurde die Probe einer Hybridisierung mit biotinylierten (–)PSTVd-*in vitro*-Transkripten voller Länge unterworfen. Das mit 97 µg RNA pro 1 µg Sonde gewählte Konzentrationsverhältnis war typisch für tatsächliche Aufreinigungen. Bei einer PSTVd-Maskierung binden die Sonden fast ausschließlich an Viroide. Nur ein kleiner Anteil steht für unspezifische Wechselwirkungen zur Verfügung. RNA-Extrakte aus nicht infiziertem Gewebe enthalten jedoch kein PSTVd. Die zugeführten *in vitro*-Transkripte können daher vollständig mit zellulärer RNA interagie-

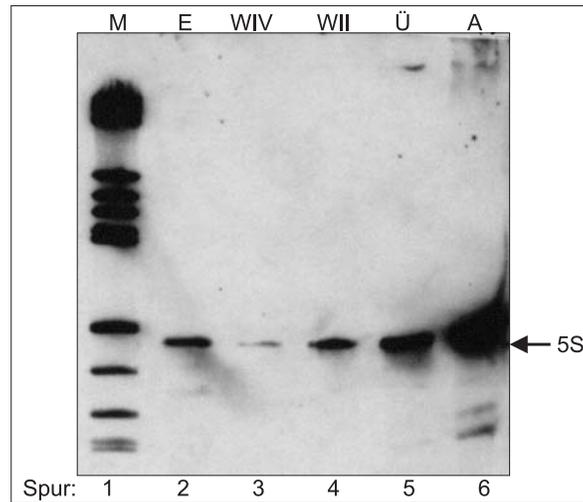


Abbildung 3.28: 5S rRNA-Verteilung nach einer „Dynabeads“-Aufreinigung *in vivo* quervernetzter RNA aus nicht infizierten Kartoffelzellen. Die bereits in Abbildung 3.27, Spuren 8, 9, 11 und 13 dargestellten Proben wurden in einem denaturierenden Gel aufgetrennt (8 % Polyacrylamid (29:1); 1× TBE; 8 M Harnstoff; 55 °C), elektrisch auf eine Nylonmembran transferiert, alkalisch denaturiert, fixiert und mit Digoxigenin-markierten 5S rRNA-spezifischen „Northern“-Sonden nachgewiesen. Spur 1: Digoxigenin-markierter DNA-Längenstandard V, Roche Mannheim, mit den Fragmentlängen 587, 540, 504, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 124/123, 104, 89, 80 nt; Spur 2: 10 % des Eluates; Spur 3 und 4: jeweils 10 % der vierten und zweiten Waschung; Spur 5: 1 % des Überstandes; Spur 6: RNA-Extrakt

ren. Ein auftretender Fehler sollte hier deutlich ausgeprägter sein als in einer tatsächlichen Aufreinigung. Nach der Bindung an die „Dynabeads“ unter Standardbedingungen wurden die Waschungen maximal bis zu einer Temperatur von 55 °C durchgeführt. Das Eluat wurde durch dreimalige Inkubation in FA-Lösung bei 70 °C erhalten. Die gewonnenen Fraktionen sind in Abbildung 3.27 in den Spuren 8–13 zu sehen. In den Spuren 1–6 ist eine analog durchgeführte Aufreinigung aus PSTVd-infizierten Zellen dokumentiert. Während hier eine eindeutige Selektion einzelner Fragmente erreicht wurde, finden sich in dem Eluat der fingierten Aufreinigung fast alle abundanten pflanzlichen Nucleinsäuren wieder (Spur 8).

Ein 5S rRNA-spezifischer Nachweis bestätigte jedoch, dass keine hochmolekularen 5S rRNA-Komplexe angereichert wurden. Obwohl in Abbildung 3.28 die 2 bis 3 fache Menge dessen aufgetragen wurde, was für die Aufreinigungen von *in vivo* quervernetzten PSTVd-Komplexen typisch war, konnten in der Elutionsfraktion auch nach längeren Expositionszeiten keine verzögerten Signale detektiert werden. Monomere 5S rRNA blieb jedoch nachweisbar. Eine wie unter Punkt 1 geforderte Inversion des Konzentrationsverhältnisses monomerer 5S rRNA zu 5S rRNA-Komplexen fand somit nicht statt.

Das Ausgangsmaterial der Aufreinigung enthielt mehr hochmolekulare 5S rRNA-Sequenzen als Extrakte aus infiziertem Gewebe. Alle in die Aufreinigung eingebrachten *in vitro*-Transkripte standen für unspezifische Wechselwirkungen mit pflanzlichen Nucleinsäuren zu Verfügung. Des Weiteren wurde mehr Probe in den abschließenden Gelelektrophoresen untersucht als nach einer Aufreinigung von PSTVd-Komplexen. Dass trotzdem keine Anreicherung von PSTVd-freien 5S rRNA-Komplexen nachgewiesen werden konnte, belegte, dass eine Interaktion zwischen diesen und biotinylierten (–)PSTVd-Vollängen-*in vitro*-Transkripten nicht berücksich-

tigt werden musste.

### 3.4.3 Nachweis der PSTVd-5S rRNA-Interaktion *in vivo*

In den vorangegangenen Abschnitten waren die Voraussetzungen für einen Nachweis *in vivo* verknüpfter PSTVd-5S rRNA-Komplexe geschaffen worden. Nun sollte ihre Existenz bewiesen werden. Dabei fanden nur jene Aufreinigungen Berücksichtigung, die zu einer Inversion des Konzentrationsverhältnisses monomerer 5S rRNA zu 5S rRNA-Komplexen geführt hatten. Die Eluate dieser ersten Aufreinigungen wurden ohne Photoreversion der Quervernetzung in eine zweite Aufreinigung eingebracht und die resultierenden Fraktionen auf ihren Gehalt an 5S rRNA untersucht. Komplexe wurden als PSTVd-enthaltend interpretiert, wenn alle in der ersten Aufreinigung isolierten Aggregate in der zweiten Aufreinigung erneut an die „Dynabeads“ banden und nur unter Formamid-Einfluss bei erhöhter Temperatur eluiert werden konnten.

Mit Konzentrationsverhältnissen von 97  $\mu\text{g}$  RNA pro 1  $\mu\text{g}$  biotinyliertes (-)PSTVd-*in vitro*-Transkript voller Länge und 2.7 ng Transkript pro 1  $\mu\text{g}$  „Dynabeads“ wurde die erste Aufreinigung den Standardbedingungen entsprechend durchgeführt. Nach vier Waschungen in  $0.1\times$  SSC bei Raumtemperatur und  $55^\circ\text{C}$  wurden PSTVd-Moleküle und -Komplexe in FA-Lösung bei  $70^\circ\text{C}$  zurückgewonnen. Die Qualität dieser ersten Aufreinigung wurde zunächst in einer denaturierenden Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung überprüft. Da in dem Eluat keine pflanzlichen Nukleinsäuren mehr nachgewiesen werden konnten, wurde eine identische zweite Aufreinigung angeschlossen. Ein Teil der hierbei eluierten Komplexe wurde direkt analysiert, ein Teil durch UV-Bestrahlung (254 nm) in Komponenten zerlegt.

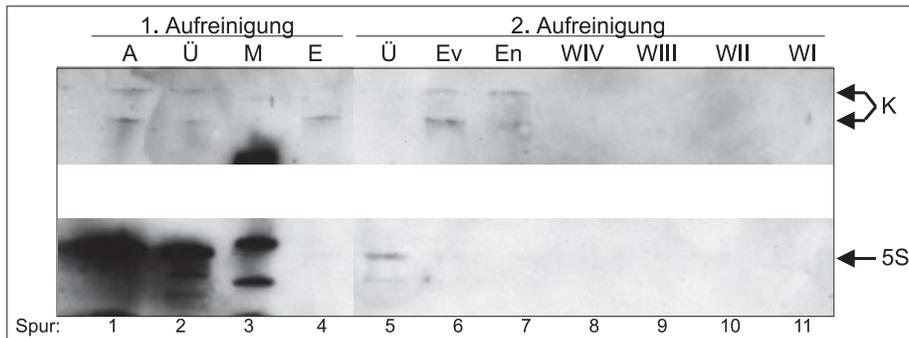


Abbildung 3.29: Verteilung der 5S rRNA nach „Dynabeads“-Aufreinigung von PSTVd-5S rRNA-Komplexen aus einem *in vivo* quervernetzten RNA-Extrakt. 1.55 mg *in vivo* quervernetztes RNA aus PSTVd-infizierten Kartoffelsuspensionszellkulturen wurden standardmäßig aufgereinigt. Im Anschluss daran wurden 82 % des Eluates einer identischen zweiten Aufreinigung ohne vorherige Reversion der Quervernetzung unterzogen. Nach der Aufreinigung wurden die Proben in einem 8 % Polyacrylamidgel aufgetrennt (29:1) ( $1\times$  TBE; 8 M Harnstoff;  $56^\circ\text{C}$ ), elektrisch auf eine Nylonmembran transferiert, alkalisch denaturiert, fixiert und mit Digoxigenin-markierten 5S rRNA-spezifischen „Northern“-Sonden nachgewiesen. Spuren 1-4: 1. Aufreinigung; Spur 1: 1.55  $\mu\text{g}$  RNA-Extrakt; Spur 2: 0.01 % des Überstandes; Spur 3: Digoxigenin-markierter DNA-Längenstandard V, Roche Mannheim; Spur 4: 2.25 % des Eluates. Zuvor waren die Partikel einmal bei Raumtemperatur und dreimal bei  $55^\circ\text{C}$  in  $0.1\times$  SSC gewaschen worden. Spuren 5-11: 2. Aufreinigung; Spur 5: 31 % des Überstandes; Spur 6: 31 % des Eluates vor der Photoreversion; Spur 7: 31 % des Eluates nach der Photoreversion für 9 Minuten; Spuren 8-10: 31 % der vierten, dritten und zweiten Waschung in  $0.1\times$  SSC bei  $55^\circ\text{C}$ ; Spur 11: 31 % der ersten Waschung in  $0.1\times$  SSC bei Raumtemperatur

Abbildung 3.29 zeigt Proben aus beiden Aufreinigungsschritten nach einem 5S rRNA-spezifischen Nachweis. Der in den ersten Aufreinigungsschritt eingebrachte RNA-Extrakt in Spur 1 entspricht dem bereits bekannten Bild. Dieses ist auf den ersten Überstand (Spur 2) übertragbar. Monomere 5S rRNA und Degradationsprodukte in der Probe führen zu einer intensiven Schwärzung. Aber auch verzögerte 5S rRNA-Signale können in den Spuren 1 und 2 nachgewiesen werden. Die Waschungen wurden nicht untersucht. In dem Eluat (Spur 4) sind nur noch geringe Anteile monomerer 5S rRNA zu sehen. Verzögerte Signale mit 5S rRNA-Sequenz sind dagegen deutlich erkennbar. Damit wurde das Konzentrationsverhältnis im Verlauf der bisherigen Aufreinigung invertiert.

Die Proben des zweiten Aufreinigungsschrittes wurden etwa 11× konzentrierter aufgetragen als die des ersten Schrittes. Daher sind die im Überstand (Spur 5) verbliebenen monomeren 5S rRNA-Moleküle deutlich zu sehen. Da in keiner der weiteren Fraktionen 5S rRNA nachweisbar war, entsprach ihr Verhalten dem von unspezifisch mitgeführten Nukleinsäuren.

Im Gegensatz dazu wiesen in dem ersten Aufreinigungsschritt isolierte 5S rRNA-Komplexe eine für PSTVd-Moleküle typische Charakteristik auf und konnten daher zweifelsfrei als PSTVd-5S rRNA-Komplexe identifiziert werden. In dem in Spur 5 dargestellten Überstand der zweiten Aufreinigung waren sie nicht nachzuweisen. Gleiches gilt für die in den Spuren 8–11 dargestellten, nachfolgenden Waschungen. Erst durch Behandlung der „Dynabeads“ mit FA-Lösung bei 70 °C wurden die Komplexe von den Partikeln eluiert (Spur 6).

Da im Kernplasma sowohl maturierte 5S rRNA als auch 5S rRNA-Primärtranskripte nachzuweisen sind, blieb jedoch zu klären, ob es sich bei den identifizierten Komplexen um Aggregate aus PSTVd und maturierter 5S rRNA oder aus PSTVd und 5S rRNA-Primärtranskripten handelte.

Spur 7 zeigt das Eluat der zweiten Aufreinigung nach 9-minütiger UV-Bestrahlung (254 nm). Obwohl eine leichte Abnahme der Komplexkonzentration zu erkennen ist, konnten keine zusätzlichen Signale freigesetzter 5S rRNA oder 5S rRNA-Primärtranskripte nachgewiesen werden. Dies gelang in einer Reihe weiterer Versuche ebenfalls nicht. Zwar nahm die Konzentration der PSTVd-5S rRNA-Komplexe immer mehr oder weniger signifikant ab, eine Zunahme anderer Signale konnte jedoch nicht beobachtet werden. Es wurde daher spekuliert, dass die Menge freigesetzter Nukleinsäuren die durch UV-Strahlung beschädigter nicht übersteigt. Unter diesem Aspekt erschien es sinnvoll die Bestrahlungsdauer der Photoreversion zu variieren.

Die für eine Photoreversion angewendete Bestrahlungsdauer wurde daher auf 3 bzw. 6 Minuten verkürzt. Abbildung 3.30 zeigt in Spur 1 das Eluat einer „Dynabeads“-Aufreinigung *in vivo* quervernetzter RNA aus PSTVd-infizierten Kartoffelsuspensionszellkulturen. Monomere 5S rRNA ist nicht nachweisbar, die zu erkennenden Komplexe wurden daher spezifisch aufgereinigt und enthalten sowohl PSTVd als auch 5S rRNA. Die Bestrahlung dieser Probe für 9 Minuten hatte zu keinem Ergebnis geführt. Spuren 2 und 3 bestätigen jedoch, dass kürzere Bestrahlungszeiten zu der Freisetzung monomerer 5S rRNA aus den Komplexen führt. Zusätzliche Signale konnten nicht detektiert werden.

Die *in vitro* erzielten Ergebnisse konnten somit vollständig auf das *in vivo*-System übertragen werden. Eine im Anschluss an eine Protoplastierung von Kartoffelzellen durchgeführte kovalente Quervernetzung mit Psoralen fixierte in der Zelle vorliegende PSTVd-Komplexe. Diese wurden über eine Biotin-Streptavidin-Affinitätschromatographie isoliert. Nach Entlas-

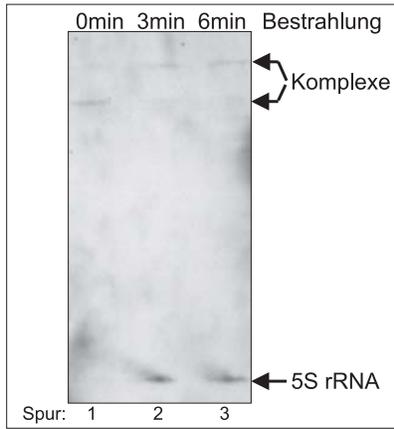


Abbildung 3.30: Verteilung der 5S rRNA nach Photoreversion von PSTVd-5S rRNA-Komplexen. PSTVd-5S rRNA-Komplexe wurden aus *in vivo* quervernetzter RNA aufgereinigt und für verschiedene Zeiträume UV-Licht (254 nm) ausgesetzt. Die Aufreinigung erfolgte unter Standardbedingungen, die Waschungen wurden in 0.1× SSC bei Raumtemperatur, 55 °C (2x) und 70 °C durchgeführt. Die Proben wurden in einem denaturierenden 8 % Polyacrylamidgel (29:1) (1× TBE; 8 M Harnstoff; 55 °C) aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert, alkalisch denaturiert, fixiert und mit Digoxigenin-markierten 5S rRNA-spezifischen Sonden nachgewiesen. Spur 1: PSTVd-5S rRNA-Komplexe in dem Eluat der „Dynabeads“-Aufreinigung; Spur 2: wie Spur 1 aber nach Bestrahlung mit UV-Licht für 3 Minuten; Spur 3: wie Spur 2, aber die Bestrahlung erfolgte für 6 Minuten

sung der Komplexkomponenten aus der kovalenten Verknüpfung konnte gezeigt werden, dass die Komplexe neben PSTVd auch 5S rRNA enthielten. Die Fähigkeit beider Moleküle eine direkte Wechselwirkung miteinander auszubilden, war in *in vitro* Untersuchungen belegt worden. Demnach konnte geschlossen werden, dass PSTVd in infizierten Kartoffelzellen eine Wechselwirkung mit monomerer 5S rRNA ausbildet. Damit gelang zum ersten Mal die Identifikation einer zellulären RNA, welche *in vivo* Komplexe mit PSTVd ausbildet.

# Kapitel 4

## Diskussion

Das experimentelle Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Aufreinigung und Identifizierung eines zellulären RNA-Wechselwirkungspartners von PSTVd.

Vorausgegangene Arbeiten hatten die Existenz mindestens einer Wirts-RNA belegt, die mittels Psoralen kovalent an die Obere Zentrale Konservierte Region von PSTVd gebunden werden konnte (Gruner 1992 und Thiel 1999). Eine Wechselwirkung *in vivo* wurde hierbei aufgrund von Primer Extension-Analysen postuliert und die Nukleotide U<sub>83</sub> und U<sub>90</sub> als Wechselwirkungspositionen auf dem PSTVd-Molekül angegeben. Die Hybridisierung und anschließende Quervernetzung eines radioaktiv markierten Oligoribonukleotids, welches der RNA-Binderegion von PSTVd entsprach, erlaubte eine erste Längenabschätzung der zellulären RNA. Unter diesen Bedingungen konnten Komplexe einer Größe von 140 und 150 Nukleotiden nachgewiesen werden.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Aufreinigungssystem entwickelt, welches die Isolation durch Psoralen kovalent an PSTVd verknüpfter Nukleinsäuren ermöglichte. Eine zelluläre RNA mit der in Thiel 1999 vorhergesagten Größe konnte sowohl nach *in vitro* als auch nach *in vivo* Quervernetzung aufgereinigt und identifiziert werden.

Im Folgenden soll zunächst auf methodische Aspekte der Aufreinigungsprozedur eingegangen werden. Danach folgt eine Analyse der PSTVd-RNA-Wechselwirkung, bevor ihre mögliche Funktion diskutiert wird.

### 4.1 Methodische Aspekte

Die im Verlauf dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen basierten auf zwei experimentellen Strategien. Grundlage beider Vorgehensweisen war die Quervernetzungsfähigkeit der gesuchten zellulären RNA mit PSTVd.

Zunächst wurde ein Verfahren gewählt, bei dem zelluläre RNAs mittels gängiger Chromatographie- und Präzipitationstechniken selektiv aufgereinigt werden sollten. Es zeigte sich jedoch, dass ein anschließend durchzuführender Nachweis der Quervernetzungsfähigkeit aufkonzentrierter Nukleinsäuren nicht möglich ist. Dieses Verfahren wurde daher nicht weiter verfolgt.

Als erfolgreicher erwies sich eine Strategie, bei der die Aufreinigung der gesuchten Wirts-RNA durch eine Biotin-Streptavidin vermittelte PSTVd-Affinitätschromatographie gelang. Hierbei wurde PSTVd zunächst mit einer geeigneten biotinylierten Sonde maskiert, um anschließend nach Zugabe von paramagnetischen Streptavidin-Partikeln mit einem Magneten separiert zu werden. Das gesamte Verfahren bestand aus zwei hintereinander durchgeführten Isolationsschritten dieser Art. In einer ersten Phase wurden Viroide und kovalent daran gebundene zelluläre RNAs von der restlichen RNA separiert. Nach der Reversion der Psoralen-Quervernetzung folgte in einem zweiten Schritt die Trennung der Wirts-RNA von den Viroid-Molekülen. Dies erlaubte den eindeutigen Nachweis und die Identifikation der zuvor an PSTVd gebundenen zellulären RNA. Für die erfolgreiche Etablierung und Optimierung der Aufreinigungsprozedur waren folgenden Punkte besonders zu berücksichtigen:

1. Es mussten biotinylierte Sonden entwickelt werden, die eine spezifische und quantitative Maskierung möglichst aller Viroidmoleküle einer Probe mit Biotin gewährleisten.
2. Nur eine effiziente Reversion der Quervernetzung ermöglicht den anschließenden Nachweis der zellulären RNA.
3. Ein Sequenz-unabhängiges Analyseverfahren war zu etablieren, welches zwischen einer zellulären RNA mit einer kurzen Sequenzkomplementarität zu PSTVd und Degradationsfragmenten von (-)PSTVd-*in vitro*-Transkripten sowie von (-)PSTVd-Replikationsintermediaten differenziert.

Die Entwicklung der experimentellen Vorgehensweise wurde ausführlich im vorherigen Kapitel auf den Seiten 39 bis 63 dargestellt. Im Anschluss an die Optimierung konnte gezeigt werden, dass dieses Aufreinigungsverfahren effizient und spezifisch ist. Unter den aufgeführten Bedingungen wurde nur eine einzige zelluläre RNA isoliert. Keine weiteren Fragmente pflanzlichen Ursprungs konnten in den Aufreinigungsfraktionen nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass 7S RNA nicht nachgewiesen wurde, obwohl sie eine signifikante Sequenzkomplementarität zu PSTVd aufweist (Haas *et al.* 1988). Dieses Ergebnis deckt sich mit früheren Ergebnissen, nach denen PSTVd und 7S RNA in ihrer vollen Länge *in vitro* keine Wechselwirkung miteinander ausbilden (Gruner 1992). Durch vergleichende Gel-Analysen vor und nach der Reversion der Quervernetzung konnte eindeutig gezeigt werden, dass die selektionierte RNA während der Aufreinigungsprozedur über Psoralen an PSTVd gebunden vorlag. Somit waren keine Wirts-RNAs unspezifisch, d.h. ohne mit PSTVd quervernetzbar zu sein, isoliert worden.

Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere pflanzliche RNAs existieren, die eine Wechselwirkung mit PSTVd eingehen. Folgende Umstände würden einen Nachweis solcher RNAs mit dem hier entwickelten Verfahren verhindern:

1. Nicht jede Wechselwirkung ist durch Psoralen quervernetzbar. Nicht kovalent verknüpfte Komplexe würden während der Viroid-Maskierung mit biotinylierten Sonden auseinanderdissoziieren.

2. Das abschließende Analyseverfahren basiert auf einem unspezifischen Nachweis aller aufgereinigter Nukleinsäuren durch Anfärbung mit Silbernitrat. Liegt die Konzentration einer mit PSTVd interagierenden Nukleinsäure am Ende der Aufreinigung unterhalb der für dieses Verfahren gegebenen Nachweisgrenze, so wäre sie nicht detektierbar.
3. Gering konzentrierte zelluläre RNAs, die auf einer Höhe mit PSTVd-Fragmenten oder außerhalb des Trennbereiches der verwendeten Polyacrylamidgele migrieren, wären ebenfalls nicht nachweisbar. Eine Differenzierung zwischen solchen Wirts-RNAs und Viroidsequenzen bzw. Viroidkomplexen, die keine zelluläre RNA enthalten, wäre nicht mehr möglich.

Diese Einschränkungen sind prinzipieller Natur und sprechen keinesfalls gegen die Leistungsfähigkeit des entwickelten Aufreinigungsverfahrens. Das Verfahren ist gleichermaßen für die Isolation *in vitro* und *in vivo* quervernetzter Nukleinsäuren anwendbar und kann allgemein auf vergleichbare Fragestellungen übertragen werden. Bei der Suche nach bisher unbekanntem RNA-Wechselwirkungspartnern muss lediglich gewährleistet sein, dass beide Nukleinsäuren einen durch Psoralen quervernetzbareren Komplex ausbilden. Dann kann nach dem beschriebenen Muster eine auf die Ziel-Nukleinsäure zugeschnittene Sonde entwickelt werden. Alle anderen Verfahrensschritte sind direkt übertragbar.

## 4.2 Theoretische Analyse der PSTVd-5S rRNA-Wechselwirkung

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal der Nachweis einer Wechselwirkung zwischen PSTVd und einer bekannten zellulären RNA *in vitro* und *in vivo* erbracht werden. Die für den Nachweis notwendige Quervernetzung von 5S rRNA an PSTVd kann nur erfolgen, wenn in beiden Molekülen Pyrimidinbasen an diagonal gegenüberstehenden, benachbarten Positionen vorliegen. Die Bindekonstante von Psoralen für Uracil ist dabei deutlich höher als für Cytosin, einzelsträngige Nukleinsäuren werden kaum erkannt (Cimino *et al.* 1985). Für die theoretische Analyse der Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA bedeutet dies, dass die nachgewiesene Interaktion auf der Existenz einer intermolekularen Doppelhelix beruht, deren Sequenz eine Quervernetzung mit Psoralen erlaubt. Über die Funktion darüber hinausgehender Wechselwirkungen kann nur spekuliert werden. Auch wenn in den letzten Jahren eine Fülle neuer Erkenntnisse die fundamentale Bedeutung von nicht-kanonischen Wechselwirkungen für RNA-RNA Kontakte belegt, finden sie daher in den nachfolgenden Betrachtungen keine Berücksichtigung. Gleiches gilt für die Ausbildung intermolekularer Doppelhelices, deren Sequenz keine durch Psoralen verknüpfbaren Elemente enthalten. Sie werden nur im Zusammenhang mit Psoralen-sensitiven Helices betrachtet.

Die theoretische Analyse der Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA erfolgte mit Hilfe des DotPlot-Algorithmus ([www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/DotplotForm.html](http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/DotplotForm.html)). Ausgegeben wurde hierbei eine zweidimensionale Matrix, deren waagerechte Koordinaten der PSTVd-Sequenz entsprechen, die senkrechten der 5S rRNA. Mögliche Basenpaarungen werden in der Matrix gekennzeichnet. In Abbildung 4.1 ist eine solche DotPlot-Analyse, bei der eine Helixlänge von mindestens 5 Basenpaaren vorgegeben wurde, dargestellt. Die Abbildung

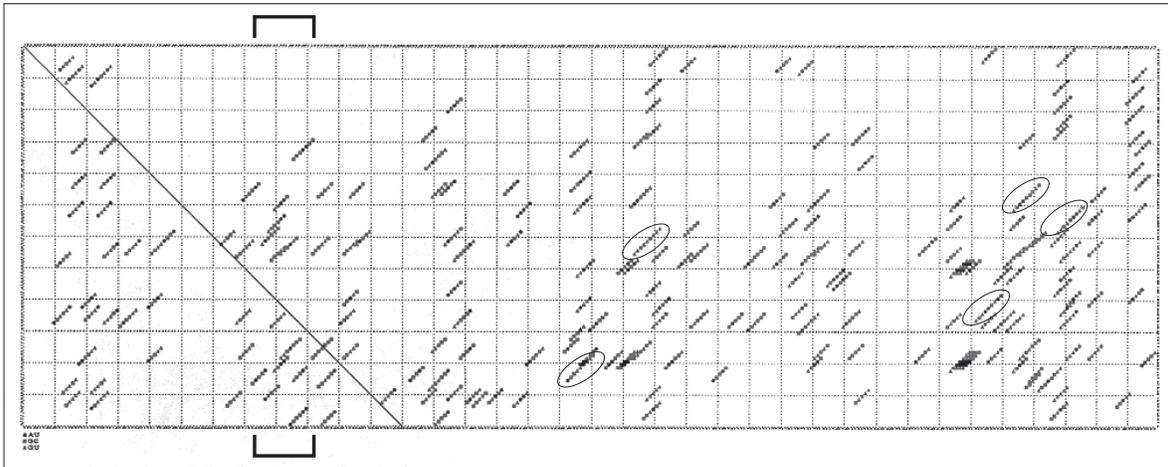


Abbildung 4.1: DotPlot-Analyse einer Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA. Horizontal ist die PSTVd-Sequenz aufgetragen, senkrecht die der 5S rRNA. Eingezeichnet wurden nur Helices einer Länge von 5 Basenpaaren oder mehr. Mit Klammern wurden die Nukleotide der PSTVd-Sequenz markiert, die dem RNA-Oligonukleotid entsprechen, das an eine zelluläre RNA quervernetzt werden konnte (Thiel 1999). Eingekreist wurden 9 Basenpaare lange Helices.

zeigt eine Vielzahl möglicher Interaktionspositionen. Diejenigen mit einer Mindestlänge von 7 bp sind zur Übersicht in Abbildung 4.2 zusammengefasst. Während die Wechselwirkungspositionen gleichmäßig über die ganze 5S rRNA verteilt liegen (nicht gezeigt) konzentrieren sie sich im wesentlichen auf wenige Bereiche der Viroidsequenz. Dabei handelt es sich vor allen um die erweiterte Pathogene-Region, die Zentrale Konservierte Region, die GC-reiche Sequenz innerhalb der Variablen Region und den rechten Terminus. Die Funktionale Bedeutung dieser Regionen wurde bereits in Kapitel 1 erläutert.

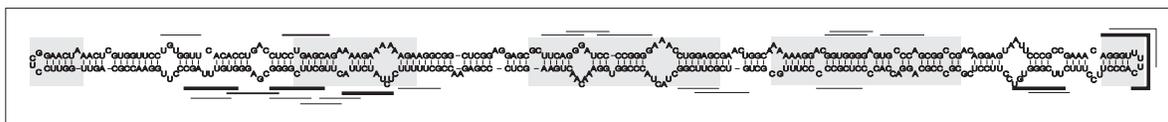


Abbildung 4.2: Wechselwirkungspositionen zwischen PSTVd und 5S rRNA. Dicke Balken: Helices über neun Basenpaare, mittlere Balken: Helices über acht Basenpaare, dünne Balken: Helices über sieben Basenpaare.

#### 4.2.1 Wechselwirkungen im Bereich der Oberen Zentralen Konservierten Region von PSTVd

Grundlage der vorliegenden Arbeit waren frühere Untersuchungen, in denen die Existenz mindestens einer zellulären RNA belegt wurde, die mit der Oberen Zentralen Konservierten Region von PSTVd eine Wechselwirkung ausbildet. Hierbei wurde ein radioaktiv markiertes RNA-Oligonukleotid (Nukleotide 73-92 der PSTVd-Sequenz) durch thermische Denaturierung und langsames Wiederabkühlen an zelluläre Gesamt-RNA komplexiert und mit Psoralen querver-

netzt. In einer anschließenden Gelanalyse konnten zwei markierte Komplexe nachgewiesen werden, deren Größe mit 150 und 140 Nukleotiden abgeschätzt wurde (Thiel 1999).

Da die 5S rRNA eine Länge von 120 Nukleotiden aufweist, stimmt ihre Größe gut mit den zuvor beschriebenen Ergebnissen überein. Bevor jedoch geschlossen werden konnte, dass es sich bei der zellulären RNA um 5S rRNA handelt, musste zunächst überprüft werden, ob eine durch Psoralen quervernetzbare Wechselwirkung mit den Nukleotiden 73-92 der PSTVd-Sequenz ausgebildet werden kann. In Abbildung 4.1 wurden die entsprechenden Nukleotide mit einer Klammer markiert. Wie zu erkennen ist, sind in diesem Bereich eine Reihe verschiedener Wechselwirkungen möglich. Eine davon wird beispielhaft in Abbildung 4.3 wiedergegeben. Die durch Psoralen quervernetzbare Position wurde grau unterlegt.

Da 5S rRNA gelelektrophoretisch in zwei Konformationen nachgewiesen werden kann (Ogata *et al.* 1991a), können beide der in Thiel 1999 beschriebenen Komplexe einer Größe von 150 und 140 Nukleotiden, schlüssig durch eine Wechselwirkung der UCCR von PSTVd mit 5S rRNA erklärt werden.

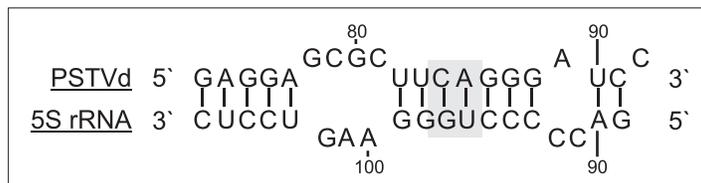


Abbildung 4.3: Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA im Bereich der Oberen Zentralen Konservierten Region von PSTVd. Dargestellt sind die Nukleotide 73-92 der PSTVd-Sequenz, sowie 89-107 der 5S rRNA-Sequenz. Eine durch Psoralen quervernetzbare Position wurde grau unterlegt.

Die Sequenz, der von Frau Thiel verwendeten und radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonde, ergab sich ursprünglich aus den in Thiel 1999 beschriebenen Primer-Extension-Abbruchsignalen an den Positionen U<sub>83</sub> und U<sub>90</sub>. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen hatten jedoch keine Hinweise auf eine Wechselwirkung im Bereich dieser Nukleotide ergeben. Die Sequenz an Nukleotid U<sub>83</sub> erlaubt keine Psoralen-abhängige Quervernetzung. Primer Extension-Abbruchsignale konnten an Position U<sub>90</sub> auch an *in vitro*-komplexierten und anschließend quervernetzten dimeren (+)PSTVd-*in vitro*-Transkripten nachgewiesen werden. Somit war nicht mehr auszuschließen, dass hier oligomere (+)PSTVd-Replikationsintermediate (Baumstark und Riesner 1995, Baumstark *et al.* 1997) verknüpft wurden.

Auch wenn eine Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA im Bereich der PSTVd Nukleotide 73-92 grundsätzlich möglich ist, gibt es demzufolge keine Anhaltspunkte mehr dafür, dass sie tatsächlich in diesem Bereich ausgebildet wird. Vielmehr erscheint es sinnvoll weitere Wechselwirkungspositionen zu betrachten.

#### 4.2.2 Die Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA *in vitro*

Bei der Analyse der PSTVd-5S rRNA-Wechselwirkungspositionen muss zwischen der Ausbildung eines Komplexes *in vitro* und *in vivo* unterschieden werden. Während eine Interaktion *in vitro* auf das thermodynamisch günstigste Aggregat zurückzuführen ist, können *in vivo*

weitere Effekte, wie z.B. die kotranskriptionelle Faltung lokaler Strukturelemente oder der katalytische Einfluss weiterer Wirtsfaktoren, die Ausprägung anderer Komplexe ermöglichen. Es erscheint jedoch plausibel, dass thermodynamisch günstigere Wechselwirkungen auch *in vivo* bevorzugt erfolgen. Daher soll zunächst eine Analyse möglicher Wechselwirkungspositionen *in vitro* erfolgen. Als Referenz zeigt Abbildung 4.4 die Sekundärstruktur der 5S rRNA aus *Lycopersicon esculentum*. Die komplette Sekundärstruktur von PSTVd wurde bereits auf Seite 2 in Abbildung 1.1 vorgestellt.

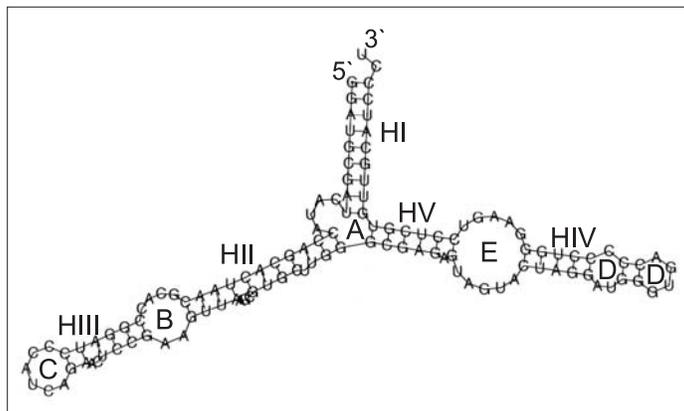


Abbildung 4.4: Sekundärstruktur der 5S rRNA aus *Lycopersicon esculentum*.

Neben der bereits in Abbildung 4.3 dargestellten Sequenzkomplementarität existieren alternative Wechselwirkungspositionen im Bereich der Oberen Zentralen Konservierten Region von PSTVd. In einigen Fällen erlauben die aus der intramolekularen Bindung entlassenen Gegenstränge erneut eine intermolekulare Wechselwirkung. In dem in Abbildung 4.5 aufgeführten Beispiel kann sowohl die UCCR als auch der untere Loop E-Bereich der Viroidsequenz eine Wechselwirkung mit 5S rRNA eingehen. Nach einem ersten Kontakt lägen beide Moleküle in einer Orientierung vor, die auch die Ausbildung der zweiten Wechselwirkung begünstigt. Da es sich bei dem Loop E um ein bekanntes RNA-Strukturmotiv handelt, und seine Bedeutung für RNA-RNA-Interaktionen bekannt ist, wird die hier vorgestellte Wechselwirkungsposition später noch eingehender diskutiert.

Signifikante Sequenzkomplementaritäten zwischen PSTVd und 5S rRNA lassen sich ebenfalls im Bereich der Virulenzmodulierenden Region nachweisen (Abbildung 4.6). Ein Zusammenhang zwischen der Pathogenität einzelner PSTVd-Stämme und ihrer Fähigkeit einen Komplex mit 5S rRNA auszubilden kann jedoch nicht erkannt werden.

Eine mögliche Wechselwirkung über die Variable Region von PSTVd wird in Abbildung 4.7 vorgestellt.

Auch der rechte Terminus der Viroidstruktur erlaubt eine Aggregation mit 5S rRNA. Abbildung 4.8 zeigt, dass sich das Stäbchenende über den zentralen Bereich der 5S rRNA lagern kann. Auf diese Weise können zwei lange, intermolekulare Helices entstehen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen einer postulierten Wechselwirkung in dieser Region und dem Transport der Viroide in der Pflanze wird ausführlich in den Abschnitten 4.2.3 und 4.4 erörtert.

Weder die genaue Berechnung der Energiebilanz des in Abbildung 4.3 dargestellten Hy-

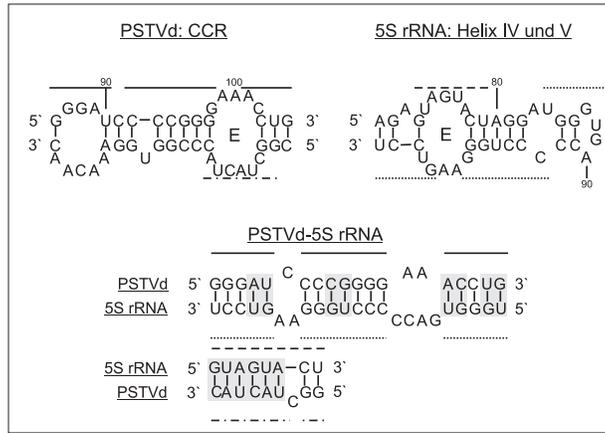


Abbildung 4.5: Sequenzhomologie zwischen PSTVd und 5S rRNA im Bereich der Zentralen Konservierten Region von PSTVd und dem Bereich des Loop E-Helix IV-Loop D der 5S rRNA. Grau hinterlegt sind die Positionen, an denen eine Quervernetzung mit Psoralen erfolgen kann.

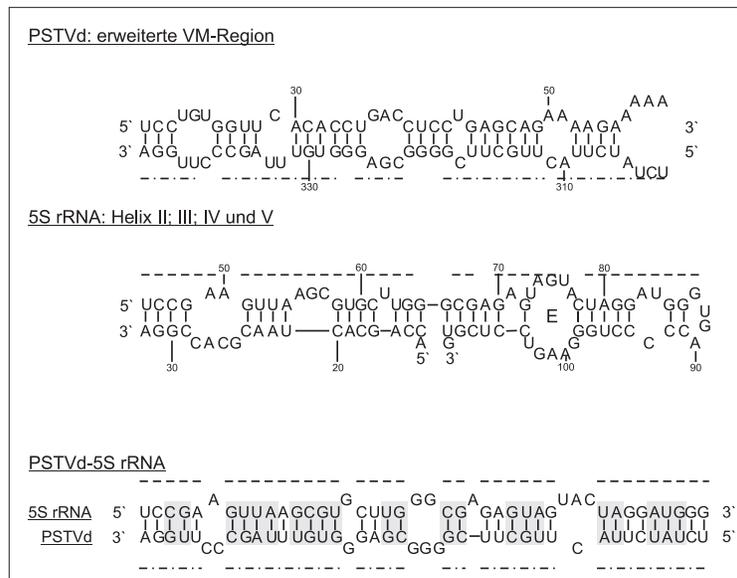


Abbildung 4.6: Sequenzhomologie zwischen PSTVd und 5S rRNA im Bereich der erweiterten Virulenzmodulierenden Region von PSTVd und dem Bereich Helix III-Loop B-Helix II-Loop A-Helix V-Loop E-Helix IV der 5S rRNA. Grau hinterlegt sind die Positionen, an denen eine Quervernetzung mit Psoralen erfolgen kann.

brides, noch die der in den Abbildungen 4.5 bis 4.8 dargestellten komplexeren Aggregate ist derzeit möglich. Es stehen keine Parameter zu Verfügung, welche es erlauben, den Energiebeitrag derjenigen Sequenzen zu kalkulieren, die aus den intramolekularen Strukturen entlassen wurden, in dem neugebildeten Hybrid jedoch einzelsträngig vorliegen. In einer Abschätzung wurde angenommen, dass diese einzelsträngigen Bereiche wie Loops zu berechnen sind. Unter Verwendung der in Steger 1984 veröffentlichten thermodynamischen Parameter ergab sich das keines der in den Abbildungen dargestellten Hybride thermodynamisch günstiger ist als die

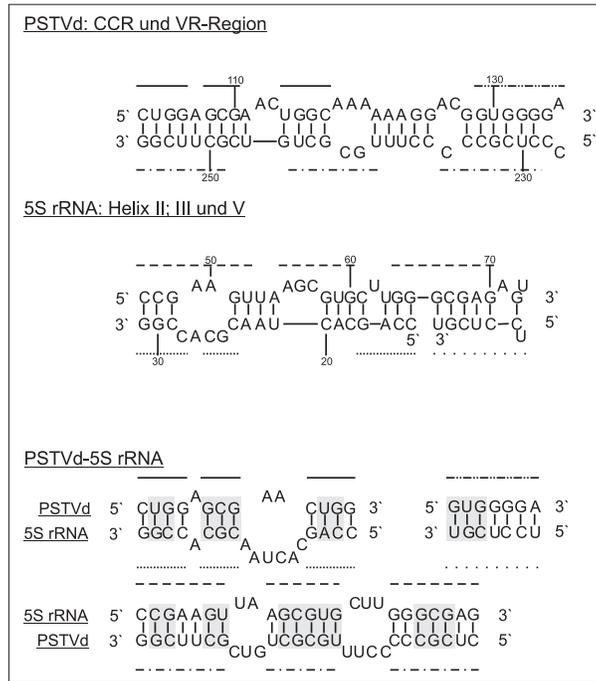


Abbildung 4.7: Sequenzhomologie zwischen PSTVd und 5S rRNA im Bereich der Zentralen Konservierten Region und der Variablen Region von PSTVd und dem Bereich Helix III-Loop B-Helix II-Loop A-Helix V der 5S rRNA. Grau hinterlegt sind die Positionen, an denen eine Quervernetzung mit Psoralen erfolgen kann.

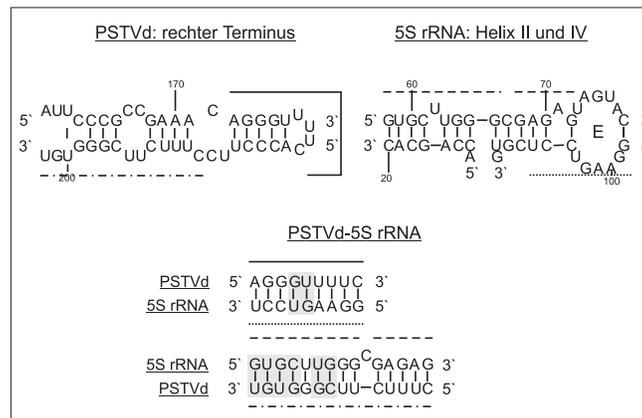


Abbildung 4.8: Sequenzhomologie zwischen PSTVd und 5S rRNA im Bereich der rechten Terminalen Region von PSTVd und dem Bereich Helix II-Loop A-Helix IV-Loop E der 5S rRNA. Grau hinterlegt sind die Positionen, an denen eine Quervernetzung mit Psoralen erfolgen kann.

nativen Moleküle. Demnach wird ein intermolekularer Komplex *in vitro* nicht alleine über eines dieser Aggregate ausgebildet.

Thermodynamisch günstiger sind kürzere Kontakte, bei denen zumindest ein Teil der Nucleotide innerhalb der Ausgangsstrukturen einzelsträngig vorlagen. Die Abbildungen 4.5 und 4.8 auf den Seiten 89 und 90 zeigen unter anderem solche Elemente. Abbildung 4.5 stellt eine

Wechselwirkung der Loop E-Motive von PSTVd und 5S rRNA vor. Reduziert man die abgebildete Helix auf die tatsächlichen Loop E-Nukleotide, so muss keine Energie aufgebracht werden, um den Komplex auszubilden. Dies ist in der Loop E-Struktur begründet, bei der diejenigen Protonen-Donoren und -Akzeptoren nach außen ragen, die normalerweise an der Ausbildung kanonischer Basenpaare beteiligt sind (Abbildung 4.9 und Wimberly 1994). Die aus der Komplexierung resultierende freie Energie ergibt sich dadurch mit -27.6 kJ/mol (berechnet nach Steger 1984).

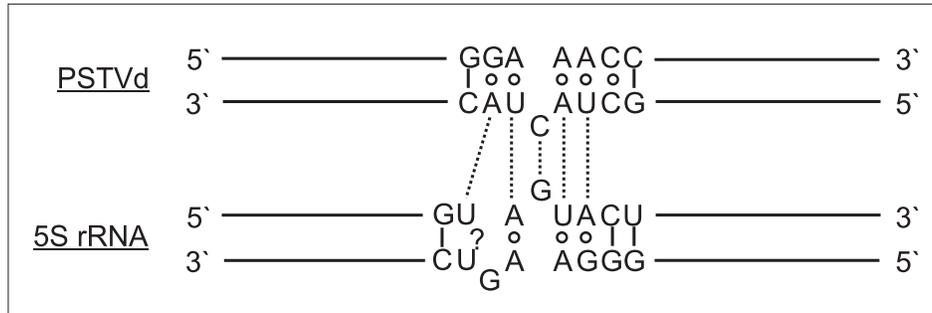


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung einer Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA über die Loop E-Motive. Die Loop E-Strukturen sind aus NMR-Daten und Quervernetzungsstudien bekannt (nach Leontis und Westhof 1998). |: kanonisches Basenpaar; o: nicht-kanonisches Basenpaar (AoG: sheared A/G; UoA: U/A trans Hoogsteen; AoA: A/A parallel); ?: die Struktur der pflanzlichen 5S rRNA ist in diesem Bereich nicht bekannt; gepunktete Linie: postulierte Basenpaarungen zwischen PSTVd und 5S rRNA

Auch die in Abbildung 4.8 dargestellte Wechselwirkung zwischen den PSTVd-Nukleotiden 173–181 (durchgezogene schwarze Linie) des rechten Terminus und den im Bereich des Loop E liegenden Nukleotiden 98–106 (eng gepunktete Linie) der 5S rRNA-Sequenz lässt unter Verwendung der gleichen Parameter eine günstige Energiebilanz erwarten. Da aber weder die genauen Energiebeiträge der durch das Hybrid entstandenen einzelsträngigen Bereiche, noch die des aufzulösenden Loop E-Motives bekannt sind, kann an dieser Stelle keine konkrete freie Energie angegeben werden. Bleibt die Wechselwirkung auf die Nukleotide beschränkt, die innerhalb des Loop E-Motives für einen intermolekularen Kontakt zu Verfügung stehen, so ergibt sich für die Komplexierung eine freie Energiedifferenz von -12.3 kJ/mol. Dabei wurden die in dem entstandenen Hybrid einzelsträngigen Nukleotide des PSTVd-Moleküls als „bulge“-Loop in die Rechnung einbezogen.

Die Ausbildung dieser zuletzt vorgestellten kurzen Hybride ist mit einem Energiegewinn verbunden. Da sie durch Psoralen quervernetzbar sind, ist es wahrscheinlich, dass sie die Grundlage für eine Wechselwirkung *in vitro* darstellen.

#### 4.2.3 Die Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA *in vivo*

Molekülabschnitte, die *in vivo* miteinander interagieren, werden gängiger Weise durch Mutationsanalysen, bzw. durch Vergleiche natürlich auftretender Sequenzabweichungen untersucht. Unter Einbeziehung solcher, älterer Daten, erscheint es wahrscheinlich, dass eine Wechselwirkung *in vivo* unter Ausbildung der gleichen Komplexe erfolgt, wie sie am Ende von Abschnitt 4.2.2 für eine Interaktion *in vitro* diskutiert wurden (siehe auch Abbildungen 4.9 und

4.8, Mitte). *In vivo* erlauben solche kürzeren Antisense-Wechselwirkungen hoch-spezifische Regulationsmechanismen. Beispiele in eukaryotischen Zellsystemen sind unter anderem die snU6–snU4 und snU6–snU2 Wechselwirkung in Spliceosomen (Staley und Guthrie 1998) oder die über Antisense sno RNAs vermittelte Methylierung ribosomaler RNAs (Bachelierie und Cavallé 1997 und Tollervy und Kiss 1997). Im Folgenden werden die Argumente vorgebracht, die für eine *in vivo*-Wechselwirkung in der Loop E-Region und dem rechten Terminus von PSTVd mit 5S rRNA sprechen.

Die in Abbildung 4.5 dargestellte Wechselwirkung zwischen der Zentralen Konservierten Region von PSTVd und 5S rRNA beinhaltet einen intermolekularen Kontakt der Loop E-Motive beider Moleküle. Dabei handelt es sich um ein verbreitetes RNA-Strukturmotiv, das neben 5S rRNA und PSTVd auch in 16S, 23S, 28S rRNA sowie im Hairpin Ribozym nachgewiesen wurde (Wimberly 1994). Der hochkonservierte Teil des Loop E besteht aus drei nicht kanonischen Basenpaaren (GoA; AoU; AoA) mit einem ungepaarten Nukleotid zwischen dem AoU und dem AoA Basenpaar. Es folgen zwei weniger konservierte, ebenfalls nicht kanonische Basenpaare. Das ungepaarte Nukleotid ist in allen ribosomalen RNAs ein Guanosin, im Hairpin Ribozym ein Uracil und bei PSTVd ein Cytosin (vergleiche Abbildung 4.9). Innerhalb der *Pospiviroidae* ist dieses Cytosin vollständig konserviert, konnte jedoch bisher in keiner anderen RNA nachgewiesen werden. Die Ursache für diese Abweichung der konservierten Loop E-Sequenz ribosomaler RNAs ist noch unverstanden. Gerade dieses ungepaarte Guanosin stabilisiert die Loop-Struktur und ist wesentlich an der Erkennung durch zelluläre Wechselwirkungspartner beteiligt.

Eine in diesem Bereich postulierte Interaktion zwischen PSTVd und 5S rRNA liefert eine schlüssige Erklärung für das beschriebene Phänomen. Wie Abbildung 4.5 zeigt, liegt dieses ungepaarte Cytosin in der Mitte der PSTVd-Region, die eine durchgängige Helix mit dem Loop E der 5S rRNA ausbilden kann. Das Cytosin bildet hier ein Watson-Crick-Basenpaar mit dem ungepaarten, konservierten Guanosin der 5S rRNA. Ein Guanosin an dieser Position der PSTVd Sequenz würde die Ausbildung des zentralen Basenpaares, und damit der Wechselwirkung in diesem Bereich verhindern.

Die Mutation dieses Cytosin zu Uracil erlaubt die PSTVd-Infektion von *Nicotiana tabacum*, einer ansonsten nicht für PSTVd sensitiven Wirtspflanze (Wassenegger *et al.* 1996). Die an dem Komplex beteiligte Sequenz der 5S rRNA in Tabak entspricht der aus Tomate. Die Mutation des Cytosin in ein Uracil beeinträchtigt demzufolge den beschriebenen Kontakt kaum. Statt eines G-C Basenpaares liegt nun ein G-U Basenpaar in der Mitte der Helix. Die Überwindung der Speziesbarriere kann auf diese Weise jedoch nicht erklärt werden und zeigt, dass noch weitere Wirtsfaktoren mit diesem PSTVd Strukturmotiv interagieren. Dies deckt sich mit neueren Erkenntnissen des Prozessierungsvorganges von PSTVd (Schrader, mündliche Mitteilung).

Untersuchungen der rechten Haarnadelstruktur von PSTVd belegten die Eigenschaft von gewissen Mutanten (Abbildung 4.10 Mu), dass sie nur nach *Agrobacterium* vermittelter Inokulation infektiös waren (Hammond 1994). Dabei waren die infizierten Pflanzen in zwei Kategorien einzuteilen. In allen analysierten Tomaten konnten Viroide in dem Gallbereich sowie in den Wurzeln nachgewiesen werden. Aber lediglich 10 % der Pflanzen waren auch im Blattbe-

reich befallen. Sequenzanalysen der aus einzelnen Geweben isolierten Viroide zeigten, dass die inokulierte Mutante in den Zellen nicht amplifiziert worden war. Neben einer Rückmutation zur ursprünglichen PSTVd Sequenz (Abbildung 4.10) konnten drei weitere Varianten identifiziert werden, die alle in Gall- und Wurzelgewebe nachgewiesen werden konnten. Von den beschriebenen Varianten V1–V3 wurde jedoch nur V1 in grünen Blättern detektiert. Wurde eine weitere Generation von Tomatenpflanzen mechanisch mit RNA-Extrakten aus den ursprünglich über *Agrobacterium* infizierten Pflanzen inokuliert, so zeigte sich, dass in diesen Pflanzen Variante 3 nachgewiesen wurde. Die Infektiosität der Mutante lag jedoch um einen Faktor 10–100 unter der des Wildtyps.

Die Autorin leitet aus ihren Ergebnissen die Hypothese ab, dass die hoch konservierte, terminale rechte Haarnadelstruktur von PSTVd an dem Langstrecken- bzw interzellulären-Transport beteiligt ist oder alternativ die Gewebespezifität der Replikation determiniert.



Abbildung 4.10: Mutanten der rechten Haarnadelstruktur von PSTVd und ihre mögliche Wechselwirkung mit 5S rRNA. WT: PSTVd Sequenz; Mu: Mutante; V1 Variante 1; V2: Variante 2; V3 Variante 3. Unterstrichen wurden die Nukleotide, die in der Mutante von dem Wildtyp und in den Varianten von der Mutante abweichen. Grau unterlegt wurde die Wechselwirkung, die ohne Auflösung der Loop E-Struktur der 5S rRNA ausgebildet werden kann. Die Nukleotide des rechten terminalen Loops von PSTVd wurden in den Hybriden umrahmt. Zusätzlich wurde jeweils die freie Energie des Hybrides angegeben (berechnet nach Steger 1984).

Abbildung 4.10 stellt in ihrem mittleren Teil die Sequenzkomplementaritäten der verschiedenen PSTVd-Varianten zu den Nukleotiden 98–106 der 5S rRNA dar (siehe auch Abbildung 4.8). Sowohl die PSTVd-Wildtyp-Sequenz, als auch Variante 1 erlauben die Ausbildung einer über 9 Nukleotide reichenden, durchgängigen Helix, die bereits in Abbildung 4.8 dargestellt wurde. Variante 1 trägt die Mutationsreversion, die eine Infektion des Blattgewebes ermöglicht. Weder die eigentliche Mutante, noch Variante 2 erlauben den dargestellten, intermolekularen Kontakt in irgendeiner Form. Keine von ihnen gelangte in die Mesophyllzellen. Variante 3 hingegen erlaubt wieder eine Wechselwirkung. Diese ist energetisch jedoch deutlich ungünstiger, da ein ungepaartes Dinukleotid im Zentrum der Helix liegt. Reduziert man die

Wechselwirkung auf den Bereich der für intermolekulare Kontakte zur Verfügung stehenden Loop E-Nukleotide (grau unterlegt), so ergibt sich unter Anwendung der bereits genannten thermodynamischen Parameter eine freie Energiedifferenz von 0.5 kJ/mol. Wird dieses Hybrid noch weiter auf die terminalen Loop-Nukleotide der PSTVd-Sequenz (umrahmt) beschränkt, so erhält man durch verschieben einer der Sequenzen um ein Nukleotid eine Wechselwirkung über drei Basenpaare. Diese ist nicht mit dem Verlust eines Strukturelementes der Ausgangsmoleküle verbunden und führt daher zu einem Energiegewinn. Eine vergleichbare Wechselwirkung kann allerdings nicht Grundlage der vorliegenden experimentellen Ergebnisse sein, da sie innerhalb der nicht mutierten PSTVd-Sequenz nicht durch Psoralen quervernetzbar wäre. Es zeigt jedoch, dass Variante 3 in dieser Region zumindest eine eingeschränkte Wechselwirkung mit 5S rRNA ausbilden kann. Diese Variante war nach mechanischer Inokulation infektiös.

Bevor die *in vivo* relevant erscheinenden Wechselwirkungspositionen im Zusammenhang mit einer möglichen funktionellen Bedeutung in Abschnitt 4.4 diskutiert werden, ist es zunächst notwendig einen Überblick über Lokalisation und Funktion der 5S rRNA in eukaryotischen Zellen zu geben.

### 4.3 5S rRNA in eukaryotischen Zellen

In allen lebenden Organismen wird die mRNA-abhängige Proteinsynthese durch Ribosomen katalysiert. Die ribosomale 5S RNA ist Bestandteil der großen Untereinheit aller Ribosomen, mit Ausnahme der Mitochondrien einiger Pilze und höherer Tiere (Barciszewska *et al.* 2000). Die Funktion der 5S rRNA in eukaryotischen Zellen bleibt aber nicht auf die Translation beschränkt. Vielmehr ist die 5S rRNA an einer Reihe von Ribonukleoproteinpartikeln beteiligt, deren Funktion zum Teil noch ungeklärt ist. Abbildung 4.11 gibt einen Überblick über solche Partikel und ihrer Lokalisation in der Zelle.

Die Transkription der 5S rRNA erfolgt im Kernplasma durch die RNA Polymerase III unter Verwendung des genspezifischen Transkriptionsfaktors IIIA (Campbell *et al.* 1992, Paule und White 2000). Als einziger bekannter Transkriptionsfaktor bindet TFIIIA nicht nur an das Gen selber, sondern auch an das Genprodukt (Pieler *et al.* 1986 und Searles *et al.* 2000). Solche Komplexe aus 5S rRNA und TFIIIA werden als 7S Partikel bezeichnet und können entwicklungspezifisch in das Zytoplasma der Zelle transportiert werden (siehe Abbildung 4.11). Nachgewiesen wurden 7S Partikel im Zytoplasma von *Xenopus*-Oozyten (Tafari und Wolffe 1993), in Mais-Embryonen (Rincón-Guzmán *et al.* 1998) sowie in Tulpen-Stempeln (Wyszko und Barciszewska 1997). In *Xenopus*-Oozyten konnte gezeigt werden, dass der Gen-TFIIIA-Präinitiationskomplex deutlich instabiler ist als in somatischen Zellen, in denen andere 5S rRNA-Gene transkribiert werden. Dies führt zu der verstärkten Ausbildung von 7S Partikeln, die als Vorrats-Form der beteiligten Komponenten während der Ruhephase verstanden werden. In der Embryogenese wird die Translationsaktivität in den Oozyten dramatisch erhöht. Die Synthese des ribosomalen Proteins L5 nimmt zu. L5 bindet ebenfalls spezifisch 5S rRNA. TFIIIA wird dadurch aus der Bindung an 5S rRNA verdrängt, und der entstandene 5S Ribonukleoproteinpartikel (5S RNP) wird zurück in den Zellkern transportiert (siehe Abbildung 4.11) (Tafari und Wolffe 1993). Darüberhinaus wurden in *Xenopus*-Oozyten weitere Partikel mit Vorratsfunktion nachgewiesen. Diese als 42S Partikel bezeichneten Komplexe enthalten neben der

5S rRNA ein Protein mit einem Molekulargewicht von 43000, zweimal ein identisches Protein mit 50 kDa und drei beliebige, aber größtenteils aminoacetylierte tRNAs.

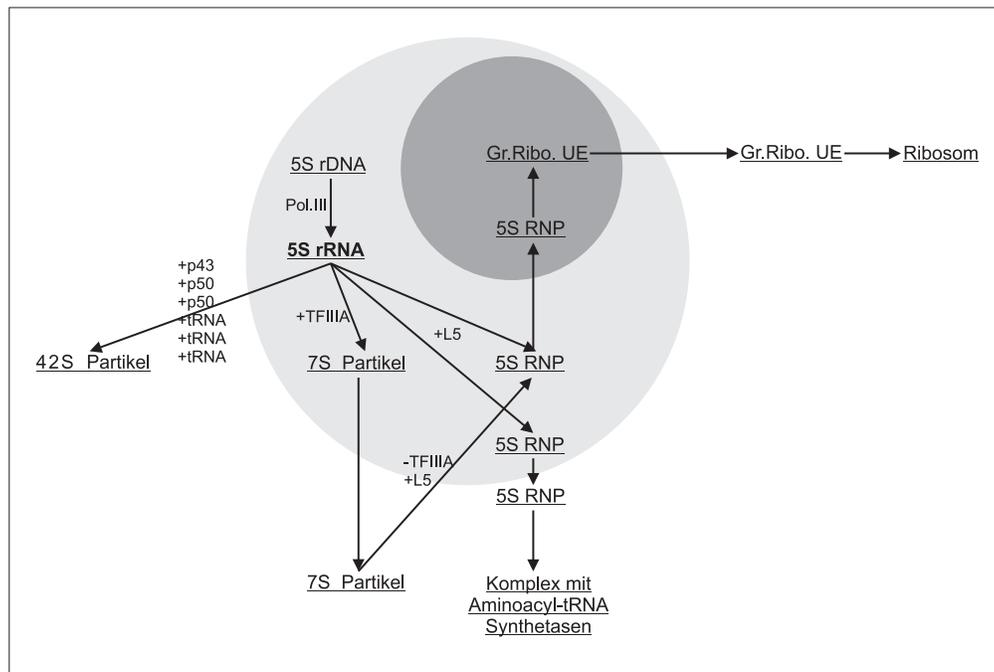


Abbildung 4.11: Schematische Darstellung der Lokalisation und Funktion von 5S rRNA in eukaryotischen Zellen. Dunkelgrau wurde der Nukleolus, hellgrau der Zellkern dargestellt.

Das an den 5S RNPs beteiligte, ribosomale Protein L5 ist wesentlich für den intrazellulären Transport der 5S rRNA verantwortlich. In somatischen Zellen bindet L5 im Kernplasma an die neu synthetisierte 5S rRNA und erlaubt so die Lokalisation im Nukleolus (Michael und Dreyfuss 1996). Dort erfolgt die Assemblierung der ribosomalen Untereinheiten. Als letzter Bestandteil wird der 5S RNP in die große Untereinheit eingebaut, bevor diese ins Zytoplasma transportiert wird (Bogdanov *et al.* 1995). Dabei übersteigt die Anzahl der 5S RNPs im Nukleolus den ribosomalen Bedarf um ein Vielfaches (Michael und Dreyfuss 1996). Aus Untersuchungen zur Lage der 5S rRNA in den Ribosomen konnte auf eine mögliche Funktion geschlossen werden. Es wird derzeit davon ausgegangen, dass die 5S rRNA in die Signalübertragung zwischen dem Peptidyltransferasezentrum und dem Translokationszentrum involviert ist (Bogdanov *et al.* 1995, Holmberg *et al.* 1992, Nýgard und Nilsson 1987, Sergiev *et al.* 2000). Außerdem zeigten Analysen mit kompetitiven Oligonukleotiden, dass vermutlich eine direkte Wechselwirkung über 10 Nukleotide zwischen 5S rRNA und 18S rRNA an der reversiblen Assemblierung der ribosomalen Untereinheiten beteiligt ist (Azad *et al.* 1998).

In Abbildung 4.11 sind weitere zytosolische Komplexe dargestellt, die 5S rRNA enthalten. Bei Säugetieren liegen die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen als Multienzymkomplexe vor. In Rattenleberzellen sind an einigen dieser Komplexe 5S RNPs beteiligt und aktivieren selektiv Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (Ogata *et al.* 1991a, Ogata *et al.* 1991b, Ogata *et al.* 1994, Ogata *et al.* 1995 und Ogata *et al.* 1996). Allgemein stehen die zytosolischen 5S RNPs in

Rattenleberzellen mit der nukleolären Fraktion in keinem Zusammenhang. Vielmehr werden diese Partikel direkt nach der Synthese aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert (Ogata *et al.* 1993).

Die Vielzahl der zytosolischen Komplexe die 5S rRNA enthalten, macht es wahrscheinlich, dass ein 5S rRNA-spezifischer Exportmechanismus aus dem Zellkern heraus existiert. Dieser Mechanismus wird von dem HIV-1 Protein *Rev* für den nukleozytoplasmatischen Transport unvollständig gereifter viraler mRNAs genutzt (Schatz *et al.* 1998). Dabei kann *Rev* sowohl indirekt, über den eukaryotischen Elongationsfaktor 5A, mit dem L5-Protein, als auch direkt mit der 5S rRNA wechselwirken (Lam *et al.* 1998). In wie weit TFIIA an diesem Prozess beteiligt ist, bleibt ungeklärt.

#### 4.4 Diskussion der funktionellen Bedeutung einer Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA: Entwicklung eines Transportmodells

Zusammengefasst erlauben die vorgestellten Daten die Aufstellung eines auf der Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA basierenden intrazellulären Transportmodells. In eukaryotischen Zellen existiert ein komplexes 5S rRNA-spezifisches Transportsystem, welches die Translokation der 5S rRNA aus dem Kernplasma in den Nukleolus oder das Zytoplasma, aus dem Nukleolus in das Zytoplasma und aus dem Zytoplasma in den Zellkern ermöglicht und reguliert (siehe Abbildung 4.11). Für das humane Pathogen HIV-1 konnte bereits gezeigt werden, dass der über das *Rev*-Protein vermittelte Export nicht maturierter viraler mRNAs aus dem Zellkern den 5S rRNA-Exportweg nutzt (Schatz *et al.* 1998 und Lam *et al.* 1998).

Von PSTVd ist bekannt, dass es innerhalb der Wirtszellen aus dem Zytoplasma in den Zellkern, aus dem Kernplasma in den Nukleolus und aller Wahrscheinlichkeit nach aus dem Zellkern wieder in das Zytoplasma transportiert wird (siehe Abschnitt 1.2). Dem Modell nach würde mindestens einer dieser Schritte durch die Wechselwirkung mit 5S rRNA ermöglicht. Eine Reihe von Betrachtungen unterstützen diese Vorstellung:

1994 konnte R. Hammond durch Mutationsanalysen einen Zusammenhang zwischen der Sequenz des rechten Terminus von PSTVd und Transportprozessen in Tomaten nachweisen (Hammond 1994). In Abbildung 4.10 wurde gezeigt, dass eben diese mutierten Nukleotide an der Ausbildung einer thermodynamisch günstigen intermolekularen Helix mit 5S rRNA beteiligt sind. Nur die Varianten werden aus dem Wurzelgewebe in die Blätter transportiert und hier erfolgreich vermehrt, die in der Lage sind diese Wechselwirkung auszubilden. Zwar diskutiert die Autorin in ihrer Veröffentlichung lediglich Wechselwirkungen zu einem den Langstrecken- oder den interzellulären Transport vermittelnden Faktor als Ursache für die mangelnde Verbreitung der mutierten Viroide in den Pflanzen. Dies begründete sich jedoch aus dem Befund, dass PSTVd in allen untersuchten Pflanzen im Gallbereich, sowie in den Wurzeln nachzuweisen war. Hier wurde es erfolgreich repliziert, und war demzufolge in den Zellkern eingedrungen. Außer Acht gelassen wurde bei dieser Interpretation, dass die Infektion mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens* durchgeführt worden war. Das transgene Ti-Plasmid enthält Sequenzen, welche den Transport der inserierten DNA und ihre Integration in das Wirtsgenom ermöglichen. Auf diese Weise gelangte PSTVd-cDNA in die Zellkerne der durch das *Agrobacterium*

befallenen Zellen, also eben jener Gewebeanteile, die in allen untersuchten Pflanzen PSTVd replizierten. Somit kann nicht unterschieden werden, welcher der notwendigen Transportschritte durch die Mutationen beeinträchtigt wurde.

Darüberhinaus zeigt eine neuere Veröffentlichung (Zhu *et al.* 2001), dass eine eindeutige Trennung des Langstrecken- von dem intrazellulären Transport nicht möglich ist. Danach ist der Phloemtransport von der Replikation der Viroide in den Geleitzellen der Siebröhren abhängig. Die für Angiospermen charakteristischen plasmareichen Geleitzellen sind durch zahlreiche Plasmodesmata mit den Siebröhrengliedern verbunden. Im Anschluss an die Synthese werden die neu entstandenen Moleküle hieraus in die Siebröhren entlassen. Nur auf diese Weise soll die Viroidkonzentration während des Transportes aufrecht erhalten werden können.

Unter der Annahme, dass die Wechselwirkung mit 5S rRNA über die Nukleotide des rechten Terminus ausgebildet wird, und dies einen der notwendigen intrazellulären Transportschritte von PSTVd ermöglicht, liefert diese Beobachtung auch eine Erklärung dafür, dass Variante 3 (Abbildung 4.10) nicht in der Lage war eine systemische Infektion aus der Wurzel, wohl aber aus den Kotyledonen heraus zu induzieren. Die ungepaarten Nukleotide in der Mitte der intermolekularen Helix reduzieren die Wechselwirkungsrate und somit die Effizienz des intrazellulären Transportes. Dadurch sinkt die Anzahl der in den Geleitzellen synthetisierten PSTVd-Moleküle ab. Somit ist es nicht mehr möglich die notwendige Viroidkonzentration über längere Distanzen im Phloem aufrecht zu erhalten. Der Weg von der Wurzel zu den wachsenden Blättern ist deutlich länger als der von den Kotyledonen. Während ersterer aufgrund des Dosiseffektes nicht mehr zu bewältigen wäre, könnte letzterer noch erfolgreich beschritten werden. Da PSTVd nur in den Blättern nachzuweisen ist, die nach der Infektion neu gebildet wurden (Palukaitis 1987), kann der weitere Transport auf zwei Weisen erfolgen. Zum Einen werden die bisher diskutierten Mechanismen genutzt. Zum Anderen wird PSTVd während der Zellteilung an die neuentstandenen Blätter weitergegeben. Dieser Weg würde auch einer intrazellulären Transportmutante zu Verfügung stehen. Für einen Phloemtransport ist er jedoch undenkbar, da dieses Gewebe zum Zeitpunkt der Infektion schon ausdifferenziert war.

Zu diskutieren bliebe, welcher der intrazellulären Transportprozesse durch eine Wechselwirkung mit 5S rRNA ermöglicht wird. Hierfür käme jeder der genannten Schritte in Betracht. Da es nach den in diesem Kapitel formulierten Überlegungen Hinweise auf zwei Interaktionspositionen *in vivo* gibt, die nicht gleichzeitig ausgebildet werden können, erscheint es durchaus möglich, dass PSTVd zwei oder mehr unterschiedliche Komplexe unterschiedlicher Funktion mit 5S rRNA ausbildet. Mit dem jetzigen Kenntnisstand ist es jedoch unmöglich eine weitere Differenzierung vorzunehmen.

## 4.5 Ausblick

Mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ist es zum ersten Mal gelungen einen Wirtsfaktor aufzureinigen und zu identifizieren, der *in vitro* und *in vivo* eine Wechselwirkung mit PSTVd ausbildet. Zwar konnte ein Modell für die funktionelle Bedeutung dieser Wechselwirkung entwickelt und diskutiert werden, doch fehlt noch eine experimentelle Bestätigung. Weiterführende Untersuchungen müssen sich daher eine endgültige Aufklärung der Funktion dieser Interaktion zum Ziel setzen. Zwei experimentelle Strategien können dabei verfolgt werden. So

ist es notwendig, zunächst die genauen Interaktionspositionen zu bestimmen. Darüberhinaus können *in vitro*-Analysen mit bekannten 5S rRNA-Wechselwirkungspartnern in der Zelle zeigen, ob ein Kontakt zwischen diesen und PSTVd durch 5S rRNA vermittelt wird.

### **Ermittlung der genauen Interaktionspositionen**

Die Ermittlung der Interaktionspositionen *in vitro* sollte durch vergleichende Primer Extension-Analysen der einzelnen Partner PSTVd und 5S rRNA, sowie des quervernetzten Komplexes erfolgen. Methodisch wäre hierbei wie in Thiel 1999 beschrieben vorzugehen. Alternativ kann untersucht werden welche der PSTVd-Sequenz entsprechenden Oligonukleotide in einer Hybridisierungsreaktion die Ausbildung des intermolekularen PSTVd-5S rRNA-Aggregates behindern. Ihre Sequenz entspricht dann der 5S rRNA-Binderegion von PSTVd. Hat man die Position der Wechselwirkung eingegrenzt, so sind ausgedehnte phylogenetische Sequenzvergleiche der entsprechenden Regionen unumgänglich, um auf eine Interaktionsposition und Funktion *in vivo* zurückschließen zu können. Nur wenn diese Wechselwirkung innerhalb der *Pospiviroidae* konserviert ist, kann auf eine allgemeingültige Funktion geschlossen werden. Experimentell sollte dies nachträglich durch Mutationsanalysen *in vivo* bestätigt werden. Dazu ist es zunächst notwendig, die in der vorliegenden Arbeit an Kartoffelsuspensionszellkulturen erzielten Ergebnisse auf ein flexibleres System, wie zum Beispiel Tomatenpflanzen zu übertragen. Hieran könnte die Infektiosität gezielt im Bereich der Wechselwirkung zu 5S rRNA mutierter Viroide überprüft werden.

### **Untersuchungen mit zellulären Faktoren, die eine Wechselwirkung mit 5S rRNA ausbilden**

Untersuchungen zur Aggregation von PSTVd mit 5S rRNA und 5S rRNA bindenden Wirtsfaktoren würden weitere Aufschlüsse über die Funktion der nachgewiesenen Wechselwirkung liefern. Eine Reihe von zellulären Faktoren sind bekannt, die mit 5S rRNA assoziiert vorliegen. In einigen Fällen konnte die physiologische Bedeutung dieser Interaktionen bestimmt werden. Der Nachweis einer Wechselwirkung zwischen einem dieser Wirtsfaktoren und dem PSTVd-5S rRNA-Komplex würde Rückschlüsse auf die Folgen und damit die Bedeutung der PSTVd-5S rRNA-Wechselwirkung ermöglichen. Beispielhaft wären hier die Komponenten des 5S rRNA-Translokationssystemes zu nennen. RNAs werden normalerweise als Ribonukleoproteinkomplexe transportiert (Izaurrealde und Adam 1998). Der 5S rRNA-Import aus dem Zytoplasma in den Zellkern und aus dem Zellkern in den Nukleolus erfolgt durch Aggregation der 5S rRNA mit dem ribosomalen Protein L5. Der Export aus dem Nukleolus findet vorwiegend im Ribosom statt. Aber auch der Transkriptionsinitiationsfaktor TFIIIA bindet unter bestimmten Umständen 5S rRNA und erlaubt so den Export aus dem Nukleus in das Zytoplasma. Die entsprechenden Komponenten können isoliert oder bezogen werden und anschließend auf ihre Interaktionsfähigkeit mit PSTVd, 5S rRNA und dem aus beiden bestehenden Komplex untersucht werden. Die erhaltenen Ergebnisse sollten es erlauben, das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte intrazelluläre Transportmodell zu bestätigen oder ein alternatives Modell, zu entwickeln.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Viroide sind kleine, einzelsträngige und pathogene RNAs, die ausschließlich Pflanzen infizieren. Obwohl sie nicht für eigene Proteine kodieren, replizieren Viroide in den Zellkernen autonom und werden systemisch durch die Wirtspflanzen transportiert. Demnach muss die Viroid-RNA eine Folge spezifischer Wechselwirkungen mit Wirts-Faktoren eingehen. Über solche zellulären Partner war bisher wenig bekannt. Die Lokalisation der Viroide im Zellkern bzw. Nukleolus lässt Wechselwirkungen zu zellulären RNAs jedoch wahrscheinlich erscheinen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren etabliert, welches die Isolation zuvor mit Psoralen kovalent an PSTVd gebundener zellulärer RNAs ermöglichte. Das Prinzip bestand aus zwei hintereinander durchzuführenden Biotin-Streptavidin vermittelten PSTVd-Affinitätschromatographien. Das Streptavidin war dabei an paramagnetischen Partikeln verankert. Die Viroide wurden, unabhängig von daran fixierten zellulären RNAs, mit geeigneten Biotinmarkierten Sonden hybridisiert, um anschließend mit einem Magneten separiert zu werden. In einem ersten Aufreinigungsschritt erfolgte die Isolation der Viroide und kovalent daran gebundener Wechselwirkungspartner. Nach der Reversion der kovalenten Quervernetzung konnte in einem zweiten Schritt die Trennung der zellulären RNA von den Viroiden und Sonden-Molekülen durchgeführt werden.

Die Anwendung dieses Verfahrens ermöglichte die Isolation einer zellulären RNA, die nach *in vitro* Komplexeinstellung kovalent über Psoralen an PSTVd gebunden wurde. Hybridisierungsanalysen bewiesen, dass es sich hierbei um 5S rRNA handelt. Die Komplexierung konnte mit geleluerten Komponenten reproduziert werden.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde gezielt nach einer Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S rRNA *in vivo* gesucht. Ein System zur Induktion von Psoralen-Quervernetzungen an PSTVd-infizierten Protoplasten aus Kartoffelsuspensionszellkulturen stand zu Verfügung. Nach entsprechender Modifikation des Aufreinigungsverfahrens konnten *in vivo* quervernetzte PSTVd-5S rRNA-Komplexe isoliert und 5S rRNA daraus freigesetzt werden. Damit war es zum ersten Mal gelungen, einen zellulären RNA-Wechselwirkungspartner von PSTVd zu identifizieren.

Vergleichende Sequenzanalysen belegten eine Vielzahl möglicher PSTVd-5S rRNA-Interaktionspositionen. Berechnungen ergaben, dass ein Komplex nur dann thermodynamisch stabil ist, wenn er über wenige Nukleotide ausgebildet wird, welche in den Ausgangsstrukturen zumindest teilweise einzelsträngig vorlagen. Es wurden Hinweise darauf gefunden, dass zwei solcher Hybride sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ausgebildet werden. Dabei handelt es sich um ein Hybrid der Loop E-Motive beider Moleküle und um ein Hybrid des rechten PSTVd-Terminus mit dem Loop E-Motiv der 5S rRNA.

Zusammen mit neueren Erkenntnissen der Lokalisation und Funktion von 5S rRNA in eukaryotischen Zellen wurde daraus ein Modell abgeleitet, wonach der intrazelluläre Transport von PSTVd durch die Wechselwirkung mit 5S rRNA ermöglicht wird.

# Kapitel 6

## Literaturverzeichnis

ASCHERMANN (1997) Charakterisierung des Gens eines viroidbindenden Proteins mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*

AZAD, A.A.; FAILLA, P. und HANNA, P.J. (1998) Inhibition of Ribosomal Subunit Association and Protein Synthesis by Oligonucleotides Corresponding to Defined Regions of 18S rRNA and 5S rRNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **248**, 51–56

BACHELLERIE, J.-P. und CAVAILLÉ, J. (1997) Guiding ribose methylation of rRNA. *TIBS* **22**, 257–261

BARCISZEWSKA, M.Z.; SZYMAŃSKI, M.; ERDMANN, V.A. und BARCISZEWSKI, J. (2000) 5S Ribosomal RNA. *Biomacromolecules* **1**, 297–302

BAUMSTARK, T. und RIESNER, D. (1995) Only one of four possible secondary structures of the central conserved region of potato spindle tuber viroid is a substrate for processing in nuclear extract. *Nucl. Acids Res.* **20**, 819–824

BAUMSTARK, T.; SCHRÖDER, A.R.W. und RIESNER, D. (1997) Viroid processing: Switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *The EMBO J.* **16**, 599–610

BAUMSTARK, T. (1997) Alternative RNA-Strukturen in der Prozessierung von Viroiden. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*

BOGDANOV, A.A.; DONTSOVA, O.A.; DOKUDOVSKAYA, S.S. und LAVRIK, I.N. (1995) Structure and function of 5S rRNA in the ribosome. *Biochem. Cell Biol.* **73**, 869–876

BRANCH, A.D. und ROBERTSON, H.D. (1984) A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* **223**, 450–455

- BRANCH, A.D.; BENENFELD, B.J. und ROBERTSON, H.D. (1988) Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9128–9132
- CALVET, J.P. und MYERS, J.A. (1987) *In-vivo* Secondary Structure Analysis of the Small Nuclear RNA U1 Using Psoralen Cross-linking. *J. Mol. Biol.* **197**, 543–553
- CAMPELL, B.R.; SONG, Y.; POSCH, T.E. und TOWN, C.D. (1992) Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **112**, 225–228
- CIMINO, D.; GAMPER, H.B.; ISAACS, S.T. und HEARST, J.E. (1985) Psoralens as photoreactive probes of nucleic acid structure and function: Organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1151–1193
- DAVANLOO, P.; PROSENBERG, A.H.; DUNN, J.J. und STUDIER, F.W. (1984) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2035–2039
- DAVIES, J.W., KAESBERG, P. und DIENER, T.O. (1974) Potato Spindle Tuber Viroid. XII. An investigation of viroid RNA as a messenger for protein synthesis. *Virology* **61**, 281–286
- DIAMOND, W.J. (1981) Practical experiment designs for engineers and scientists. *Van Nostrand Reinhold Company, New York*
- DICKSON, E. (1981) A model for the involvement of viroids in splicing. *Virology* **115**, 216–221
- DIENER, T.O. (1971a) Potato spindle tuber virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. Subcellular location of PSTV-RNA and the question of whether virions exist in extracts or *in situ*. *Virology* **43**, 75–89
- DIENER, T.O. (1971b) Potato spindle tuber „virus“: A replicating low molecular weight RNA. *Virology* **45**, 411–428
- DIENER, T.O. (1979) Viroids and viroid diseases. *Wiley and sons, New York*
- DIENER, T.O. (1981) Are viroids escaped introns? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 5014–5015
- DIENER, T.O. (1987) „*The Viroids*“ (T.O. Diener, ed.), 117–166, *Plenum Publishing Corporation, New York 1987*
- DIENER, T.O.; HAMMOND, R.W.; BLACK, T. und KATZE, M.G. (1993) Mechanism of viroid pathogenesis: Differential activation of the interferon-induced, double-stranded RNA-activated, M<sub>r</sub> 68000 protein kinase by viroid strains of varying pathogenicity. *Biochemie* **75**, 533–538
- DING, B.; KWON, M.-O.; HAMMOND, R. und OWENS, R. (1997) Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *The Plant Journal* **12**, 931–936

- van DOORN, L.J.; SHYAMALA, V.; HAN, J:H: und KLETER, G.E.M. (1994a) HCV RNA detection in heparinized blood by direct genomic RNA capture onto paramagnetic particles. *Journal of Virological Methods* **48**, 339–341
- van DOORN, L.J.; KLETER, B.; VOERMANS, J.; MAERTENS, G.; BROUWER, H.; HEIJTINK, R. und QUINT, W. (1994b) Rapid detection of Hepatitis C Virus RNA by Direct Capture from Blood. *Journal of Medical Virology* **42**, 22–28
- ESPELUND, M.; PERENTICE STACY, R.A. und JAKOBSEN, K.S. (1990) A simple method for generating single-stranded DNA probes labeled to high activities. *Nucleic Acids Research* **18**, 6157–6158
- FELS, A. (1997) Startstellen der Viroid-Replikation im Kernextrakt. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- FLORES, R.; RANGLES, J.W.; BAR-JOSEPH, M. und DIENER, T.O. (1998) A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Arch. Virol.* **143**, 623–629
- FORSTER, A.C.; McINNES, J.L. SKINGLE, D.C. und SYMONS, R.H. (1985) Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin. *Nucleic Acids Research* **13**, 745–761
- GEBEYEHU, G.; RAO, P.Y.; SOOCHAN, P.; SIMMS, D.A. und KLEVAN, L. (1987) Novel biotinylated nucleotide - analogs for labeling and colorimetric detection of DNA. *Nucleic Acids Research* **15**, 4513–4534
- GILGEN, M.; WEGMÜLLER, B.; BURKHALTER, P.; BÜHLER, H.-P.; MÜLLER, U.; LÜTHY, J. und CANDRIAN, U. (1995) Reverse Transcription PCR To Detect Enteroviruses in Surface Water. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 1226–1231
- GIMPEL, B. Lehrgang Industrielle Versuchsmethodik
- GOODMAN, T.C.; NAGEL, L.; RAPPOLD, W.; KLOTZ, G. und RIESNER, D. (1984) Viroid replication: Equilibrium association constant and comparative measurements for the viroid-polymerase interaction. *Nucl. Acids Res.* **12**, 6231–6246
- GREEN, A.; ROOPRA, A. und VAUDIN, M. (1990) Direct single stranded sequencing from agarose of polymerase chain reaction products. *Nucleic Acids Research* **18**, 6163–6164
- GROSS, H.J.; DOMDEY, H.; LOSSOW, C.; JANK, P.; RABA, M.; ALBERTY, H. und SÄNGER, H.L. (1978) Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Naturwiss.* **273**, 203–208
- GRUNER, R. (1992) Wechselwirkungen des Viroids der Kartoffel-Spindelknollensucht (PSTVd) mit Wirtsfaktoren in Zellkernen der Tomate. (*Lyopersicon esculentum*) *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*

- GRUNER, R.; FELS, A.; FENG QU; ZIMMAT, R.; STEGER, G. und RIESNER, D. (1995) Interdependence of pathogenicity and replicability with potato spindle tuber viroid. *Virology* **209**, 60–69
- HAAS, B.; KLANNER, A.; RAMM, K. und SÄNGER, H.L. (1988) The 7S RNA from tomato leaf tissue resembles a signal recognition particle RNA and exhibits a remarkable sequence complementarity to viroids. *EMBO J.* **7**, 4063–4073
- HABILI, N. und KAPER, J.M. (1981) Cucumber Mosaic Virus-Associated RNA 5. *Virology* **112**, 250–261
- HAMMOND, R.W. (1994) *Agrobacterium*-Mediated Inoculation of PSTVd cDNAs onto Tomato Reveals the Biological Effect of Apparently Lethal Mutations. *Virology* **201**, 36–45
- HAMMOND, R.W. und ZHAO, Y. (2000) Characterization of a Tomato Protein Kinase Gene Induced by Infection by *Potato spindle tuber viroid*. *Molecular Plant-Microbe interactions* **13**, 903–910
- HARDERS, J.; LUKACS, N.; ROBERT-NICOUD, M.; JOVIN, T.M. und RIESNER, D. (1989) Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridisation and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.* **8**, 3941–3949
- HAUSNER, T.-P.; GIGLO, L.M. und WEINER, A.M. (1990) Evidence for base-pairing between mammalian U2 and U6 small nuclear ribonucleoprotein particles. *Genes and Development* **4**, 2146–2156
- HECKER, R. (1989) Die Struktur der intermediären Ribonukleinsäuren bei der Replikation von Viroiden. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- HEINEMANN, U.; LAUBLE, H.; FRANK, R. und BLÖCKER, H. (1987) Crystal structure analysis of an A-DNA fragment at 1.8 Å resolution: d(GCCCGGGC). *Nucleic Acids Res.* **15**, 9531–9550
- HEINRICH, C. (1991) Basenpaaraustausche mit gerichteter Mutagenese in der konservierten Region der Haarnadelstruktur II des Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd). *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- HIDDINGA, H.J.; JESSEN CRUM, C.; JIE HU und ROTH, D.A. (1988) Viroid-induced phosphorylation of a host protein related to a dsRNA-dependent protein kinase. *Science* **241**, 451–453
- HOLMBER, L.; MELANDER, Y. und NÝGARD, O. (1992) Ribosome-bound eukaryotic elongation factor 2 protects 5S rRNA from modification. *J. Biol. Chem.* **267**, 21906–21910
- HU, Y.; FELDSTEIN, P.A.; BOTTINO, P.J. und OWENS, R.A. (1996) Role of the variable domain in modulating potato spindle tuber viroid replication. *Virology* **219**, 45–56

- HYDE, J.E. und HEARST, J.E. (1978) Binding of Psoralen Derivates to DNA and Chromatin: Influence of the Ionic Environment on Dark Binding and Photoreactivity. *Biochemistry* **17**, 1251–1257
- IZAURALDE, E. und ADAM, S. (1998) Transport of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *RNA* **4**, 351–364
- JACOBSON, M.R. und PEDERSON, T. (1998) Localization of signal recognition particle RNA in the nucleolus of mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7981–7986
- JAKAB, G.; KISS, T. und SOLYMOSY, F. (1986) Viroid pathogenicity and pre-rRNA processing: a model emanable to experimental testing. *Biochim. Biophys. Acta* **868**, 190–197
- KANKA, S. (1998) Charakterisierung des Genes für die Ribulosebisphosphat-Carboxylase als Beispiel schadenassoziiierter Gene bei Fichte (*Picea abies* L., Karst). *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- KEESE, P. und SYMONS, R.H. (1985) Domains in viroids: Evidence of intermolekular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4582–4586
- KISS, T.; POSFAI, J. und SOLYMOSY, F. (1983) Sequence homology between potato spindle tuber viroid and U3b snRNA. *FEBS Lett.* **163**, 217–220
- KLAFF, P.; GRUNER, R.; HECKER, R.; SÄTTLER, A.; THEISSEN, G. und RIESNER, D. (1989) Reconstituted and cellular viroid-protein complexes. *J. Gen. Virol.* **70**, 2257–2270
- KORN, B.; SEDLACEK, Z. und POUSTKA, A. (1994) Isolation of Transcribed and Conserved Sequences from Large Genomic Regions by Magnetic Capture. *Advances in biomagnetic separation; Eton publishing Co.; Natick MA; USA; 79–89*
- KRUPP, G. (1988) RNA synthesis: Strategies for the use of Bacteriophage RNA polymerase. *Gene* **72**, 75–89
- LAM, W.-C.; SEIFERT, J.M.; AMBERGER, F.; GRAF, C.; AUER, M. und MILLAR, D.P. (1998) Structural Dynamics of HIV-1 Rev and Its Complexes with RRE and 5S rRNA. *Biochemistry* **37**, 1800–1809
- LANGER, P.R.; WALDROP, A.A. und WARD, D.C. (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6633–6637
- LANKIEWICZ, S.; GISSELMANN, G. and HATT, H. (1997) Enhanced RACE method using specific enrichment by biotinylated oligonucleotides bound to streptavidin coated magnetic particles. *Nucleic Acids Research* **25**, 2037–2038

- LEONTIS, N.B. und WESTHOF, E. (1998) A Common Motif Organizes the Structure of Multi-helix Loops in 16 S and 23 S Ribosomal RNAs. *J. Mol. Biol.* **283**, 571–583
- LIPSON, S.E.; CIMINO, G.D. und HEARST, J.E. (1987) Structure of M1 RNA As Determined by Psoralen Cross-Linking. *Biochemistry* **27**, 570–575
- LIPSON, S.E. und HEARST, J.E. (1988) Psoralen cross-linking of ribosomal RNA. *Methods Enzymol.* **164**, 330–341
- LOSS, P.; SCMITZ, M.; STEGER, G. und RIESNER, D. (1991) Formation of a thermodynamically metastable structure containing hairpin II is critical for infectivity of potato spindle tuber viroid RNA. *EMBO J.* **10**, 719–727
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. und SAMBROOK, J. (1982) Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*
- MICHAEL, W.M. und DREYFUSS, G. (1996) Distinct Domains in Ribosomal Protein L5 Mediate 5 S rRNA Binding and Nucleolar Localization. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 11571–11574
- MÜHLBACH, H.P. und SÄNGER, H.L. (1979) Viroid replication is inhibited by  $\alpha$ -Amanitin. *Nature* **278**, 185–188
- MÜHLBACH, H.-P. und SÄNGER, H.L. (1981) Continuous replication of potato spindle tuber viroid (PSTVd) in permanent cell cultures of potato and tomato. *Biosci. Rep.* **1**, 79–87
- MUIR, P.; NICHOLSON, F.; JHETAM, M.; NEOGI, S. und BANATVALA, J.E. (1993) Rapid Diagnosis of Enterovirus Infection by Magnetic Bead Extraction and Polymerase Chain Reaction Detection of Enterovirus RNA in Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **31**, 31–38
- MURASHIGE, T. und SKOOG, F. (1962) Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* **15**, 473–497
- NÝGARD, O. und NILSSON, L. (1987) The ribosome binding site for eukaryotic elongation factor EF-2 contains 5S ribosomal RNA. *Biochim. Biophys. Acta* **908**, 46–53
- OGATA, K.; KURAHASHI, A.; TANAKA, S.; OHSUE, H. und KAZUHIRO (1991a) Occurrence of 5SrRNA in High Molecular Weight Complexes of Aminoacyl-tRNA Synthetases in Rat Liver Supernatant. *J. Biochem.* **110**, 1030–1036
- OGATA, K.; KURAHASHI, A.; KENMOCHI, N. und TERAOKA, K. (1991b) Role of 5S rRNA as a Positive Effector of some Aminoacyl-tRNA Synthetases in Macromolecular Complexes with Specific reference to Methionyl-tRNA Synthetase. *J. Biochem.* **110**, 1037–1044

- OGATA, K.; KURAHASHI, A.; NISHIYAMA, C. und TERAOKA, K. (1993) Metabolic characteristics of rat liver cytosolic 5SRNA. *Eur. J. Biochem.* **213**, 1277–1282
- OGATA, K.; KURAHASHI, A.; NISHIYAMA, C. und TERAOKA, K. (1994) Presence and role of the 5SrRNA-L5 protein complex (5SRNP) in the threonyl- and histidyl-tRNA synthetase complex in rat liver cytosol. *Biochimica et Biophysica Acta* **1218**, 388–400
- OGATA, K.; KURAHASHI, A.; OHNO, R.; TAKAHASHI, K. und TERAOKA, K. (1995) Interaction of 5S rRNA-L5 protein complex, methionyl-tRNA, and methionyl-tRNA synthetase in the macromolecular ARS complex. *J. Biochem.* **117**, 750–757
- OGATA, K.; OHNO, R.; MORIOKA, S. und TERAOKA, K. (1996) Further Study on Association of 5S rRNA-L5 Protein Complex and Methionyl-tRNA to Methionyl-tRNA Synthetase in the Macromolecular Aminoacyl-tRNA Synthetase Complex. *J. Biochem.* **120**, 869–880
- OWENS, R.A.; STEGER, G.; YI HU; FELS, A.; HAMMOND, R.W. und RIESNER, D. (1996) RNA Structural features responsible for tomato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology* **222**, 144–158
- PALUKAITIS, P. (1987) Potato Spindle Tuber Viroid: Investigation of the Long-Distance, Intra-plant Transport Route. *Virology* **158**, 239–241
- PAULE, M. R. und WHITE, R.J. (2000) Transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Research* **28**, 1283–1298
- PEDERSON, T. (1998) The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Research* **26**, 3871–3876
- PEDERSON, T. (1999) Movement and localization of RNA in the cell nucleus. *The FASEB Journal* **13**, 238–242
- PIELER, T.; GUDDAT, U.; OEI, S.L. und ERDMANN, V.A. (1986) Analysis of the RNA structural elements involved in the binding of the transcription factor III A from *Xenopus laevis*. *Nucleic Acids Research* **14**, 6313–6326
- POLITZ, J.C.; YAROVOI, S.; KILROY, S.M.; GOWDA, K.; ZWIEB, C. und PEDERSON, T. (2000) Signal recognition particle components in the nucleolus. *PNAS* **97**, 55–60
- QU, F.; HEINRICH, C.; LOSS, P.; STEGER, G.; TIEN, P. und RIESNER, D. (1993) Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural elements. *EMBO J.* **12**, 2129–2139
- RABIN, D; und CROTHERS, D.M. (1979) Analysis of RNA secondary structure by photochemical reversal of psoralen crosslinks. *Nucleic Acids Research* **7**, 689–703
- RACKWITZ, H.R.; ROHDE, W. und SÄNGER, H.L. (1981) DNA-dependent RNA-polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full length copies. *Nature* **291**, 297–301

- REPSILBER, D.; WIESE, S.; RACHEN, M.; SCHRÖDER, A.W.; RIESNER, D. und STEGER, G. (1999) Formation of metastable RNA structures by sequential folding during transcription: Time-resolved structural analysis of potato spindle tuber viroid (-)-stranded RNA by temperature-gradient gel electrophoresis. *RNA* **5**, 574–584
- REYES-ENGEL, A. and DIEGUEZ-LUCEN, J.L. (1993) Direct quantification of specific mRNA using a selected biotinylated oligonucleotide by free solution capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Research* **21**, 759–760
- RIESNER, D.; HENCO, K.; ROKOHL, U.; KLOTZ, G.; KLEINSCHMIDT, A.K.; DOMDEY, H.; JANK, P., GROSS, H.J. und SÄNGER, H.L. (1979) Structure and structure formation of viroids. *J. Mol. Biol.* **133**, 85–115
- RIESNER, D. und GROSS, H. (1985) Viroids *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 531–564
- RIESNER, D.; KLAFF, P.; STEGER, G. und HECKER, R. (1987) Viroids: Subcellular location and structure of replicative intermediates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **503**, 212–237
- RIGGS, C.D. (1994) Molecular cloning of cDNAs encoding variants of meiotin-1. *Chromosoma* **103**, 251–261
- RINCÓN-GUZMÁN, A.; BELTRÁN-PEÑA, E.; ORTÍS-LÓPEZ, A. und SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ, E. (1998) Ribonucleoprotein particles of quiescent maize embryonic axes. *Plant Molecular Biology* **38**, 357–364
- ROTH, D.A. und HE, X. (1994) Viral-dependent phosphorylation of a dsRNA-dependent kinase. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* **14**, 28–46
- SÄGESSER, R.; MARTINEZ, E.; TSAGRIS, M. und TABLER, M. (1997) Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of a cDNA expression library. *Nucleic Acids Research* **25**, 3816–3822
- SÄNGER, H.L. (1982) Biology, structure, functions and possible origin of viroids. (Parthier, B. und Boulder, D. eds.) „*Encyclopedia of Plant Physiology*“ New Series. Springer Verlag, New York **14B**, 368–454
- SÄNGER, H.L. (1987) Viroid replication. In *The Viroids* (T.O. Diener, ed.), Plenum Press, New York, 117–166
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. und MANIATIS, T. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual. *Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York*
- SAMMONS, D.W.; ADAMS, L.D. und NISHIZAWA, E.E. (1981) Ultrasensitive silverbased color staining of polypeptides in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **2**, 135–141

- SASTRY, S.S.; ROSS, B.M. und P'ARRAGA, A. (1997) Cross-linking of DNA-binding Proteins to DNA with Psoralen and Psoralen Furan-side Monoadducts. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 3715–3723
- SCHATZ, O.; OFT, M.; DASCHER, C.; SCHEBESTA, M.; ROSORIUS, O.; JAKSCHE, H.; DOBROVNIK, M.; BEVEC, D. und HAUBER, J. (1998) Interaction of the HIV-1 Rev cofactor eukaryotic initiation factor 5A with ribosomal protein L5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1607–1612
- SCHINDLER, I.M. und MÜHLBACH, H.P. (1992) Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.* **84**, 221–229
- SCHMITZ, A. und RIESNER, D. (1998) Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different potato spindle tuber viroid strains. *RNA* **4**, 1295–1303
- SEARLES, M.A.; LU, D. und KLUG, A. (2000) The role of the Central Zinc Fingers of Transcription factor IIIA in Binding to 5 S RNA. *J. Mol. Biol.* **301**, 47–60
- SCHNÖLZER, M.; HAAS, B.; RAMM, K.; HOFMANN, H. und SÄNGER, H.L. (1985) Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid. *EMBO J.* **4**, 2181–2190
- SCHRADER, O. (1996) Untersuchung prozessierungsrelevanter Strukturelemente des PSTVd. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- SCHRÖDER, A.R.W. (1998) Konformationsspezifische Antisense-RNAs für metastabile Viroid-Strukturen. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- SCHUMACHER, J.; SÄNGER, H.L. und RIESNER, D. (1983a) Subcellular localization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue. *EMBO J.* **2**, 1549–1555
- SCHUMACHER, J.; RANGLES, J.W. und RIESNER, D. (1983b) A two-dimensional electrophoretic technique of the detection of circular viroids and virusoids. *Analytical Biochemistry* **135**, 288–295
- SCHUMACHER, J. (1984) Subzelluläre Verteilung von Viroiden in Blattgewebe von Tomatenpflanzen. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- SCHUMACHER, J.; MEYER, N.; RIESNER, D. und WEIDEMANN, H.L. (1986) Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNA by „return“-gel electrophoresis. *J. Phytopathol.* **115**, 332–343
- SEMANCIK, J.S. und WEATHERS, L.G. (1972) Exocortis disease: Evidence for a new species of „infectious“ low molecular weight RNA in plants. *Nature* **237**, 242–244

- SEMANCIK, J.S.; CONEJERO, V. und GERHART, J. (1977) Citrus exocortis viroid: Survey of protein synthesis in *Xenopus laevis* oocytes following addition of viroid RNA. *Virology* **80**, 218–221
- SERGIEV, P.V.; BOGDANOV, A.A.; DAHLBERG, A.E. und DONTSOVA, O. (2000) Mutations at Position A960 of *E.coli* 23S Ribosomal RNA Influence the Structure of 5S Ribosomal RNA and the Peptidyltransferase Region of 23S Ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* **299**, 379–389
- SHI, Y.; SPIELMANN, P. und HEARST, J.E. (1987) Base-Catalyzed Reversal of a Psoralen-DNA Cross-Link. *Biochemistry* **27**, 5174–5178
- SINGH, R.P. und CLARK, M.C. (1971) Infectious low-molecular-weight ribonucleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 1077 ff
- STALEY; J.P. und GUTHRIE, C. (1998) Mechanical Devices of the Spliceosome: Motors, Clocks, Springs and Things. *Cell* **92**, 315–326
- STARK-LORENZEN, P.; GUITTON, M.-C.; WERNER, R. und MÜHLBACH, H.-P. (1997) Detection and tissue distribution of potato spindle tuber viroid in infected tomato plants by tissue print hybridization. *Arch. Virol.* **142**, 1289–1296
- STEGER, G.; HOFMANN, H.; FÖRTSCH, J.; GROSS, H.J.; RANGLES, J.W.; SÄNGER, H.L. und RIESNER, D. (1984) Conformational transitions in viroids and virusoids: Comparison of results from energy minimization algorithm and from experimental data. *Biomol. Struct. Dyn.* **2**, 543–571
- STEGER, G.; TABLER, M.; BRÜGGEMANN, W.; COLPAN, M.; KLOTZ, G.; SÄNGER, H.L. und RIESNER, D. (1986) Structure of viroid replicative intermediates: Physico-chemical studies on SP6 transcripts of cloned oligomeric potato spindle tuber viroid. *Nucl. Acids Res.* **14**, 9613–9630
- STEGER, G. (1994) Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* **22**, 2760–2768
- TAFURI, S.R. und WOLFFE, A.P. (1993) Dual roles for transcription and translation factors in the RNA storage particles of *Xenopus* oocytes. *Trends in Cell Biology* **3**, 94–98
- TAGLE, D.A.; SWAROOP, M.; LOVETT, M. und COLLINS, F.S. (1993) Magnetic bead capture of expressed sequences encoded within large genomic segments. *Nature* **361**, 751–753
- THEISSEN, G. (1987) Entwicklung eines affinitätschromatographischen Verfahrens zur Isolation Viroid-bindender Proteine. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- THEISSEN, G.; RICHTER, A. und LUKACS, N. (1989) Degree of Biotinylation in Nucleic Acids Estimated by a Gel Retardation Assay. *Analytical Biochemistry* **179**, 98–105

- THIEL, V. (1990) Untersuchungen zum Einfluss der Viroidinfektion auf die Prozessierung von ribosomaler RNA in Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum*). *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- THIEL, V. (1999) Wechselwirkung von Viroiden mit zellulärer RNA. *Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- TOLLERVEY, D. und KISS, T. (1997) Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Current Opinion in Cell Biology* **9**, 337–342
- WASSENEGGER, M.; SPIEKER, R.L.; THALMEIR, S.; GAST, F.U.; RIEDEL, L. und SÄNGER, H.L. (1996) A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *nicotiana tabacum*. *Virologie* **226**, 191–197
- WERNER, R.; GUITTON, M.-C. und MÜHLBACH, H.-P. (1993) Nucleotide Sequence of a Cathepsin D Inhibitor Protein from Tomato. *Plant Physiol.* **103**, 1473
- WERNER, R.; MÜHLBACH, H.-P. und GUITTON, M.-C. (1995) Isolation of viroid-RNA-binding proteins from an expression library with nonradioactive-labeled RNA probes. *Biotechniques* **189**, 218–222
- WIMBERLEY, B. (1994) A common RNA loop motif as a docking module and its function in the hammerhead ribozyme. *Structural Biology* **1**, 820–827
- WOLFF, P.; GILZ, R.; SCHUMACHER, J. und RIESNER, D. (1985) Complexes of viroids with histones and other proteins. *Nucl. Acids Res.* **13**, 355–367
- WOLLENZIEN, P.L.; CANTOR, C.R.; GRANT, D.M. und LAMBOWITZ, A.M. (1983) RNA splicing in *Neurospora* mitochondria: Structure of the unspliced 35S precursor ribosomal RNA detected by psoralen cross-linking. *Cell* **32**, 397–407
- WOO, Y.-M.; ITAYA, A.; OWENS, R.A.; TANG, L.; HAMMOND, R.W.; CHOU, H.-H.; LAI, M.M. und DING, B. (1999) Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *The Plant Journal* **17**, 627–635
- WYSZKO, E. und BARCISZEOSKA, M. (1997) Purification and characterization of factor IIIa from higher plants. *Eur. J. Biochem.* **249**, 107–112
- YEUNG, A.T.; DINEHART, W.J. und JONES, B.K. (1988) Alkali Reversal of Psoralen Cross-Link for the Targeted Delivery of Psoralen Monoadduct Lesion. *Biochemistry* **27**, 6332–6338
- ZIMMAT, R. (1987) Untersuchung von Viroidstämmen mit der Methode der molekularen Hybridisierung und der Temperatur-Gradienten-Gelelektrophorese. *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf*
- ZHU, Y.; GREEN, L.; WOO, Y.-M.; OWENS, R. und DING, B. (2001) Cellular Basis of Potato Spindle Tuber Viroid Systemic Movement. *Virology* **279**, 69–77

## Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wuppertal, Mai 2001