

**Prozessierung des
Kartoffel-Spindelknollensucht-Viroids (PSTVd):
Charakterisierung der beteiligten Enzyme der
Wirtspflanze**

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

vorgelegt von
Sandra Nicole Klümper
aus Wuppertal

Düsseldorf 2002

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

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Riesner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. A.-W. Alfermann
Tag der mündlichen Prüfung:	26.Juni 2002

Meiner Familie

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Detlev Riesner für die wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft während dieser Zeit.

Allen Institutsangehörigen sage ich „Danke“ für die gute Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft, die mir in guter Erinnerung bleiben wird. In vielen Diskussionen mit Anregungen und Tips zeigte sich ihr Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt:

- Frau Dr. Noemi Lukacs für die Herstellung von Antikörpern und ihr Interesse.
- Herrn Bernd Esters für die Unterstützung bei arbeitsintensiven Proteinpräparationen.
- Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Bioinformatikgruppe, insbesondere Herrn Dr. Gerhard Steger, Herrn Dr. Michael Schmitz, Herrn Jochen Riks und Herrn Stefan Gräf, die alle viel Zeit und Engagement in meine Fragen am Computer investiert haben.
- Frau Dr. Annette Hillebrand für die gute und reibungslose Zusammenarbeit im Strahlenschutz.
- Herrn Bernd Esters, Frau Elke Reinhardts, Frau Beckmann, Frau Greschkovitz und Frau Gruber die mit ihren „Dienstleistungen“ immer für ein gutes Funktionieren des Instituts gesorgt haben.
- Herrn Baum und Herrn Müller für die schnelle Instandsetzung von dringend benötigten elektronischen Geräten.
- Herrn Dr. Michael Etscheid, Frau Nadine Kolonko, Frau Thyra Parthen und Herrn Dr. Jens Schell für das Korrekturlesen.
- Herrn Dr. Andreas Fels, Frau Dr. Susanne Kanka, Frau Dr. Birgit Kather und Herrn Dr. Michael Etscheid für die freundliche Aufnahme und Integration ins Institut
- Allen, die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben.

Für die Freundschaft und die Diskussionen über Wissenschaftliches und Persönliches möchte ich mich besonders bei Frau Nadine Kolonko und Herrn Jens Schell, aber auch bei Herrn Bernd Esters, Frau Dr. Annette Hillebrand, Frau Thyra Parthen, Frau Elke Reinardts, Frau Katja Jansen und vielen anderen der „Riesner“- und „Wagner“-Gruppe bedanken. Der ganzen Rechnercrew gilt mein Dank für die abwechslungsreichen Gespräche beim Mittagessen - wenn sie im Bereich Informatik für mich auch manchmal nicht nachvollziehbar waren.

Abkürzungsverzeichnis

aaRS	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASBVd	Avocado Sunblotch Viroid
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
CCCVd	Coconut Cadang Cadang Viroid
CChMVd	Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid
CCR	zentrale konservierte Region
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEVd	Citrus Exocortis Viroid
cpm	Zerfälle pro Minute („counts per minute“)
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DMS	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ExL	Extended-Left
ExM	Extended-Middle
ExM ^E	Extended-Middle-Loop E
ExM ^{TL}	Extended-Middle-Tetraloop
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPLC	Hochauflösende Flüssigchromatography („high performance liquid chromatographie“)
HSVd	Hop Stunt Viroid
Kap.	Kapitel
kDA	Kilodalton
LCCR	untere zentrale konservierte Region
mA	Milliampere
min	Minuten
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NS	Nukleinsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PKR	dsRNA-abhängige Proteinkinase
PLMVd	Peach Latent Mosaic Viroid
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PolII	DNA-abhängige RNA-Polymerase II

PSTVd	Potato Spindle Tuber Viroid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	kleine nukleäre Ribonukleinsäure
snoRNA	kleine nukleoläre Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TL	Tetraloop
T _L	linke terminale Region
T _R	rechte terminale Region
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminoethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UCCR	obere zentrale konservierte Region
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
Var	variable Region
vgl.	vergleiche
VM	virulenz-modulierende Region
W	Watt
wt	Wildtyp
z.Ü.	zur Übersicht

1 Einleitung

1.1 Viroide

Versuche in den sechziger Jahren, den Erreger für die schon 1922 (Martin, 1922) beschriebene Kartoffelspindelknollensucht („potato spindle tuber disease“) zu isolieren, führten zur Entdeckung einer bis dahin unbekannt, neuartigen Klasse subviraler Pflanzenpathogene: Den Viroiden (Diener, 1971; Singh & Clark, 1971; Sänger, 1972; Semancik & Weathers, 1972). Sie bewirken in ihren Wirtspflanzen ähnliche Krankheitssymptome wie Pflanzenviren, sind jedoch viel kleiner und unterscheiden sich von ihnen in ihrem molekularen Aufbau. Sie bestehen aus einer einzelsträngigen, zirkulär geschlossenen RNA, die eine hochstrukturierte Sekundärstruktur ausbildet. Sie haben, je nach Spezies und Variante, eine Länge von 246-399 Nukleotiden. Viroide zeichnen sich durch das Fehlen einer Proteinhülle aus und weder ihre (+)- noch die komplementäre (-)-Strang RNA wird in viroidspezifische Polypeptide translatiert. Einige Viroide besitzen Ribozymdomanen, sind jedoch funktionell nicht, wie die ebenfalls Ribozymdomanen enthaltenen Satelliten RNAs, auf ein Helfervirus angewiesen (Flores *et al.*, 1999).

Die Replikation von Viroiden, der Transport von Zelle zu Zelle, die systemische Verteilung in der Pflanze, sowie die pathogene Wirkung erfolgen ausschließlich durch Wechselwirkungen mit wirtseigenen Systemen. Die Viroid-RNA präsentiert für diese Interaktionen funktionelle Signale in Form von Sequenz- und Sekundarstrukturmerkmalen, die von Wirtsfaktoren erkannt werden. Sie imitiert pflanzliche RNA-Motive um deren Wirkungssysteme in der Pflanze für ihre eigene Infektion zu nutzen. Alle enzymatischen Funktionen müssen potentiell auch im nicht infizierten Wirt vorhanden sein.

1.2 Klassifizierung von Viroiden

Begründet in einer Serie konservierter Sequenz- und Struktur motive und den Ergebnissen phylogenetischer Analysen werden die bisher bekannten 27 Viroide in zwei Familien eingeteilt: Die *Pospiviroidae* und die *Avsunviroidae*, deren jeweilige typische Vertreter das Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) und das Avocado Sunblotch Viroid (ASBVd) sind (Flores *et al.*, 1998).

Die meisten Viroide gehören zur ersten Familie und sind durch eine zentrale konservierte Region („central conserved region“: CCR) in ihrer stäbchenförmigen Sekundärstruktur gekennzeichnet (Gross *et al.*, 1978; Keese & Symons, 1985). Mitglieder der zweiten Familie, die neben dem ASBVd nur aus dem Peach Latent Mosaic Viroid (PLMVd) und dem Chrysanthemum Chlorotic Mottle Viroid (CChMVd) besteht, haben keine zentrale konservierte Region und bilden im Gegensatz zu den *Pospiviroidae* verzweigte Sekundärstrukturen aus. Beide Viroidfamilien bilden während ihrer Replikation oligomere RNA-Intermediate. Sie unterscheiden sich jedoch im Mechanismus der Replikation und Prozessierung dieser Oligomeren. *Avsunviroidae* zeichnen sich im Gegensatz zu *Pospiviroidae* durch Hammerhead-Strukturen aus, die das Selbstschneiden der oligomeren Replikationsintermediate bewirken. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Viroidfamilien liegt darin, daß ASBVd und vermutlich auch PLMVd und CChMVd im Chloroplasten und *Pospiviroidae* im Zellkern replizieren und akkumulieren (z. .: Diener (1999); Flores *et al.* (1999)).

1.3 Native Viroid-RNA-Struktur

Die *Pospiviroidae* sind neben einer großen Sequenzhomologie auch durch einheitliche Strukturmerkmale gekennzeichnet. Die hohe Selbstkomplementarität ihrer RNA führt im nativen, zirkulären Zustand durch intramolekulare Basenpaarungen zu einer stäbchenförmigen Sekundärstruktur. Sie beinhaltet kurze Helices mit bis zu neun Basenpaaren, sowie ungepaarte Bereiche. Enzymatische, hydrodynamische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten im Zusammenhang mit theoretischen Strukturberechnungen, daß die alternierend gepaarten und ungepaarten Bereiche weder verzweigen, noch eine übergeordnete Tertiärstruktur ausbilden (z.Ü.: Riesner & Gross (1985); Keese & Symmons (1987)). Das in Abb. 1 schematisch dargestellte PSTVd ist Gegenstand dieser Arbeit und wurde als erstes in seiner Primärsequenz und Sekundärstruktur aufgeklärt (Gross *et al.*, 1978). Kernmagnetische Untersuchungen der linken terminalen Region bestätigten für das PSTVd eine unverzweigte Struktur der RNA und eine Haarnadelschleife (Loop) aus vier Basen am linken Ende (Dingley und Gresziek, persönliche Mitteilung). Die Stäbchenform ist eine Struktur mit hoher thermodynamischer Stabilität und schützt das Viroid vor dem Abbau durch zelluläre Nukleasen.

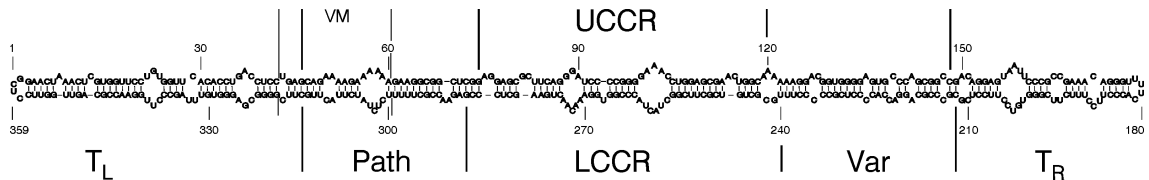


Abbildung 1: Primär- und Sekundärstruktur des PSTVd in seiner nativen Stäbchenstruktur. Die Einteilung in fünf Sequenzbereiche erfolgt in Anlehnung an Keese & Symmons (1985): CCR: zentrale konservierte Region, UCCR: obere zentrale konservierte Region, LCCR: untere zentrale konservierte Region, Var: variable Region, Path: pathogenitätsmodulierende Region, T_L : linke terminale Region und T_R : rechte terminale Region. Die von Schnölzer *et al.* (1985) eingeführte virulenz-modulierende Region (VM) ist angegeben. Die dargestellte Sekundärstruktur wird vom Computerprogramm LinAll für 25 °C und 1 M NaCl berechnet (Schmitz & Steger, 1992).

Durch Sequenzvergleiche verschiedener Viroide wurden Bereiche hoher Sequenzkonservierung, aber auch besonders variable Abschnitte bestimmt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Stäbchenstruktur in fünf Domänen eingeteilt (vgl. Abb. 1), denen unterschiedliche funktionelle Bedeutungen zugeordnet werden konnten (Keese & Symmons, 1985).

Der Bereich mit der höchsten Sequenzkonservierung ist die sogenannte zentrale konservierte Region (CCR) in der Mitte der Stäbchenstruktur. In ihr wird zwischen einer oberen (UCCR) und einer unteren (LCCR) zentralen konservierten Region unterschieden. Im Bereich der UCCR liegt die Schnittstelle der Prozessierung multimerer (+)-Replikationsintermediate zu Monomeren PSTVd-Molekülen, die an dieser Stelle auch wieder zu Zirkeln ligiert werden (Baumstark *et al.*, 1997), (vgl. Kap. 1.7). Die variable Region (Var) weist mit weniger als 50% Homologie zwischen je zwei Viroiden die meisten Sequenzvariationen auf. Da Mutationen, die die variable Region stabilisieren, die Replikation verhindern, konnte ihr eine Funktion in der Viroidreplikation zugeordnet werden (Hu *et al.*, 1996). Die Mehrheit der natürlich auftretenden Mutationen beim PSTVd liegen in der pathogenitäts- (Path) oder virulenz-modulierenden Region (VM) Schnölzer *et al.* (1985). Sie zeigt eine

direkte Korrelation zwischen hier auftretenden Punktmutationen und der Pathogenität unterschiedlicher PSTVd-Stämme. Mutationen der linken terminalen Region (T_L) führen zu nicht-infektiösen PSTVd-Varianten. Mutationen der rechten terminalen Region (T_R) verhindern dagegen nicht die Replikation, sondern die systemische Infektion der Pflanze. Dem rechten terminalen Loop wird deshalb eine Rolle beim interzellulären Transport des Viroids zugeordnet (Owens & Hammond, 1990; Hammond, 1992, 1994; Ding *et al.*, 1997).

1.4 Pathogenese

Viroide treten bevorzugt in tropischen oder subtropischen Klimazonen auf, wo sie durch ihren Befall von höheren Kulturpflanzen beträchtliche ökonomische Schäden in der Landwirtschaft verursachen. Sie infizieren mit Ausnahme des Coconut Cadang Cadang Viroids (CCCVd), dessen Wirt die monokotyledone Kokospalme ist, nur dikotyledone Pflanzen wie Tomate, Kartoffel, Hopfen, Avocado, Chrysantheme, Gurke und Zitrusfrüchte. Manche Viroide kommen nur in einer Pflanzenart vor, wogegen das Wirtsspektrum bei anderen variabel ist. So ist das PSTVd neben der Kartoffel auch in anderen Solanaceen wie in der Tomate und dem schwarzen Nachtschatten kultivierbar. Die generellen, durch Viroide hervorgerufenen Krankheitssymptome reichen von Zwergenwuchs durch Internodienstauung, Blattmißbildungen, Epinastien und Chlorosen bis hin zu Nekrosen. Kokospalmen, z.B., zeigen solch einen nekrotischen Krankheitsverlauf, bei dem der Wirt sogar abstirbt. Die Inkubationszeiten nach der Infektion betragen wenige Wochen bis zu mehreren Jahren (z. Ü.: Diener (1979); Riesner & Gross (1985); Diener (1987); Semancik (1987); Symons (1990)).

Das Fehlen einer mRNA-Aktivität der Viroid-RNA impliziert, daß alle Effekte der Wirtspflanze das Resultat einer direkten, spezifischen Interaktion des zirkulären Viroids oder seiner Replikationsintermediate mit bis heute nicht bekannten Wirtsfaktoren sind. Es konnten bisher lediglich sekundäre Effekte der Viroidinfektion, wie abnormale Zellwand- und Chloroplastenstrukturen, Ausbildung von Plasmalemmasomen, Expression von allgemeinen Streßproteinen und Störungen im Metabolismus von Wachstumshormonen festgestellt werden (z. Ü.: Diener (1987)). Der molekulare pathogene Mechanismus der Viroide ist jedoch bis heute unverstanden, wenn auch verschiedene Modelle aufgestellt wurden, die auf Wechselwirkungen des Viroids mit zellulären Proteinen oder Nukleinsäuren basieren (Dickson, 1981; Diener, 1981; Schnölzer *et al.*, 1985; Jakab *et al.*, 1986; Haas *et al.*, 1988; Diener *et al.*, 1993; Gruner *et al.*, 1995; Schmitz & Riesner, 1998).

Obwohl auf Wirtsebene die zellulären Wechselwirkungspartner von Viroiden, die den pathogenen Effekt einer Infektion bewirken, nicht bekannt sind, wurden jedoch auf der Viroid-RNA-Seite Sekundärstrukturveränderungen gezeigt, die mit der unterschiedlichen Ausprägung von Symptomen korrelieren. Kleine Sequenzvariationen in der nur 40 Nukleotide umfassenden virulenz-modulierenden Region des PSTVd, unterscheiden Stämme mit unterschiedlich starken Ausprägungen ihres pathogenen Effekts auf die Wirtspflanze. Nach diesen phänotypischen Schäden werden PSTVd-Stämme von „mild“ über „severe“ bis zu „lethal“ klassifiziert.

Die Sequenzunterschiede in der VM-Region resultieren in unterschiedlichen Biegungen des RNA-Moleküls in diesem Bereich. Verschiedene Größe und Anordnung der asymmetrischen Loop-Strukturen bewirken Abweichungen von der eher linear verlaufenden Achse des Wildtyp-PSTVd. Dies führt zu Biegungen von unterschiedlicher Stärke und Richtung. Es konnte eine Korrelation zwischen der Stärke und Richtung einer solchen Biegung und der Pathogenität von PSTVd-Stämmen gezeigt werden. Durch die unterschiedlichen drei-

dimensionalen Strukturen der VM-Regionen soll die Bindung eines Wirtsfaktors moduliert werden (Schmitz & Riesner, 1998).

Als solch ein mögliches Wirtspoltein wird zur Zeit ein pflanzliches Homolog einer Interferon-induzierten, dsRNA-abhängigen Proteinkinase (PKR) aus Säugern diskutiert. Bei Bindung an doppelsträngige RNA wird dieses Protein durch Autophosphorylierung aktiviert, phosphoryliert den eukaryotischen Initiationsfaktor eIF2 α und inhibiert so die Translation in der Zelle (Jagus *et al.*, 1981; Hovanessian, 1989). Ihm wird eine Funktion in der Virusabwehr zugeordnet, weil es so die Virensynthese regulieren könnte (Samuel, 1991; Katze, 1992).

In vitro wurde gezeigt, daß die Säuger-PKR durch Zugabe verschiedener PSTVd-Stämme differentiell phosphorylierbar ist (Diener *et al.*, 1993). Ein Protein mit der gleichen Größe, daß als pflanzliches Homolog zur Säuger-PKR diskutiert wird (pPKR), liegt in PSTVd-infizierten Pflanzen stärker phosphoryliert vor als in nicht-infizierten (Hiddinga *et al.*, 1988). Daß es in Pflanzen tatsächlich ein der Säuger-PKR homologes Protein gibt, konnte später immunologisch und funktionell gezeigt werden (Langland *et al.*, 1995, 1996). Auch konnte nachgewiesen werden, daß eine pPKR aus Tomate spezifisch an die linke Hälfte von PSTVd-Transkripten bindet, die die pathogenitäts-modulierende Region enthalten (Diener, 1999). Die pPKR wird seither als Wechselwirkungspartner für die VM-Region von PSTVd diskutiert, die in Abhängigkeit von der geometrischen RNA-Struktur besser oder schlechter an diese bindet und so die unterschiedliche Pathogenität bewirkt.

1.5 Transport

Die systemische Verteilung der im Zellkern replizierenden Viroide in ihrer Wirtspflanze besteht aus mehreren unterschiedlichen Transportschritten. Es findet ein Import durch die Kernporen in den Zellkern und nach der Replikation ein Export aus dem Kern statt. Im weiteren wird zwischen einem intrazellulären Transport, einem interzellulären Transport von Zelle zu Zelle und einem Langstreckentransport durch die ganze Pflanze unterschieden.

Der Import von PSTVd in den Zellkern ist ein spezifischer und durch Trägermoleküle vermittelter Prozess, für den das Viroid Sequenz- und Struktur motive besitzt, die eine Wechselwirkung mit zellulären Trägermolekülen bewirken. Es ist ein vom Zytoskelett unabhängiger Transportmechanismus, der durch einen spezifischen und absättigbaren Rezeptor erfolgt. Der Import ist nicht an den RanGTPase Zyklus gekoppelt, der den Transport vieler Proteine und Nukleinsäuren vermittelt (Woo *et al.*, 1999).

Die Replikation der Viroide erfolgt im Nukleoplasma. Innerhalb des Zellkerns sind die Viroide und ihre Replikationsintermediate hauptsächlich im Nukleolus lokalisiert, wo sie homogen verteilt vorliegen und bis zu einer Kopienzahl von 50000-100000 akkumulieren (Schumacher *et al.*, 1983; Harders *et al.*, 1989).

Der Transport von Zelle zu Zelle erfolgt durch Plasmodesmata und wird wie der Import in den Zellkern auch durch zelluläre Trägermoleküle vermittelt (Ding *et al.*, 1997). Wie Viroide sich vom Nukleolus durch den Zellkern und das Cytoplasma in die Nachbarzellen verbreiten ist unbekannt. Anstelle von, oder zusätzlich zu Transportmechanismen kann auch eine Verbreitung durch Zellteilung und Weitergabe an Tochterzellen nicht ausgeschlossen werden.

Basierend auf den Beobachtungen, daß sich das PSTVd bei einer Infektion mit dem gleichen Muster über die ganze Pflanze verteilt wie Photoassimilate durch die Pflanze transportiert werden, wird ein Langstreckentransport über das Phloem angenommen (Palukaitis, 1987). In Übereinstimmung damit zeigten *in situ*-Hybridisierungen die Lokali-

sation von PSTVd, CCCVd und Citrus Exocortis Viroid (CEVd) in vaskulärem Gewebe (Hammond, 1994; Bonfiglioli *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2001). Es konnte zudem nachgewiesen werden, daß auch der Langstreckentransport des PSTVd im Phloem durch Trägermoleküle vermittelt wird und daß das PSTVd im Phloem aktiv repliziert (Zhu *et al.*, 2001). Als Transportprotein wird das Phloem Protein 2 diskutiert, ein 49 kDa dimeres Lectin, für das *in vitro* Komplexe mit Hop Stunt Viroid-RNA (HSVd) gezeigt wurden (Gòmez & Pallàs, 2001; Owens *et al.*, 2001). Auch wenn die Trägerproteine noch nicht *in vivo* untersucht wurden und die genaue Wechselwirkung von Viroid und Trägerprotein noch nicht bekannt ist, belegen Mutationsanalysen eine Beteiligung der rechten terminalen Region von PSTVd an systemischen Transportprozessen (Owens & Hammond, 1990; Hammond, 1994), (vgl. Kap. 1.3).

1.6 Replikation

Die Replikation der *Pospiviroidae* erfolgt im Zellkern der Wirtszelle durch einen asymmetrischen „rolling circle“-Mechanismus (Branch & Robertson, 1984; Branch *et al.*, 1988) (vgl. Abb. 2). Der per Definition (+)-strängige Viroidzirkel dient als Template für die Synthese eines komplementären, linearen (-)-Stranges von bis zu siebenfacher Einheitslänge. Dieser dient wiederum als Matrize für die Synthese eines linearen, bis zur dreifachen Einheitslänge langen (+)-Stranges, der zu Monomeren mit exakter Einheitslänge geschnitten und zu neuen Viroidzirkeln ligiert wird.

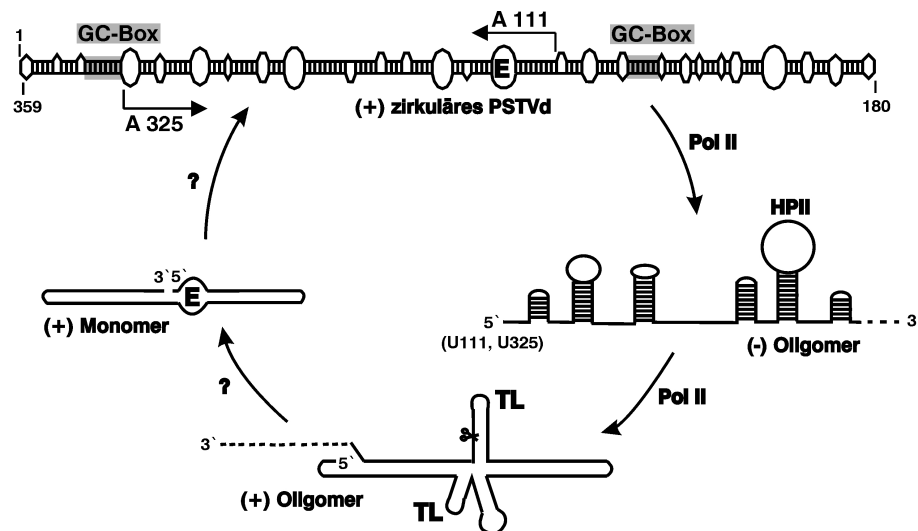


Abbildung 2: Replikation der *Pospiviroidae*. Asymmetrischer „rolling circle“-Replikationsmechanismus nach am Beispiel des PSTVd. Das zirkuläre, (+)-strängige Viroid mit den Transkriptionsstartstellen A111 und A325 dient als Template für die Synthese eines komplementären, linearen, oligomeren (-)-Stranges. Ausgehend von diesem wird ein linearer, oligomerer (+)-Strang transkribiert, der durch Prozessierungsreaktionen zu Monomeren mit Einheitslänge geschnitten und zu neuen Viroidzirkeln ligiert wird. Beide Transkriptionsschritte werden durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II vermittelt (Pol II). Die für die Replikation durch Wirtsfaktoren notwendigen Viroid-RNA Struktur motive GC-Box, Hairpin II (HPII), Tetraloop-Motiv (TL) und Loop E (E) sind dargestellt.

Da beide Transkriptionsschritte zur Synthese oligomerer Replikationsintermediate durch α -Amanitin gehemmt werden, wurde auf eine Transkription durch die wirtseige-

ne DNA-abhängige RNA-Polymerase II (Polymerase II) geschlossen (Mühlbach & Sängler, 1979; Rackwitz *et al.*, 1981; Spiesmacher *et al.*, 1985; Schindler & Mühlbach, 1992). Elektronenmikroskopische Untersuchungen wiesen eine Bindung von aufgereinigter Weizenkeimpolymerase II an beide terminale Domänen nach (Goodman *et al.*, 1984). Auch konnte *in vivo* die Assoziation zwischen der CEVd-RNA und der großen Untereinheit ihrer Wirtspolymerase II in Tomate gezeigt werden (Warrilow & Symons, 1999).

Die PSTVd-RNA besitzt kein der eukaryotischen TATA-Box ähnliches Promotorelement für die Transkription durch die Polymerase II. Sie weist aber GC-reiche Helixmotive auf, welche homolog zu einer GC-Box sind, die bei tierischen und viralen Systemen als Transkriptionsfaktorbindestelle konstitutiv exprimierter Gene notwendig ist. In Pflanzen sind ebenfalls GC-reiche Sequenzen als Transkriptionsfaktorbindestellen bekannt, bei denen jedoch kein Zusammenhang mit konstitutiv exprimierten Genen hergestellt werden konnte. Für die Erkennung der (+)-zirkulären und der linearen (-)-oligomeren PSTVd-RNA als Template der DNA-abhängigen RNA Polymerase II werden solche helikalen Regionen mit einem hohen GC-Gehalt als Promotorelemente diskutiert (Qu *et al.*, 1993; Fels, 1997; Fels *et al.*, 2001). Die GC-reichen, doppelsträngigen DNA-Sequenzen pflanzlicher Promotoren ähneln nicht nur in ihrer Sequenz, sondern auch in ihrer Sekundärstruktur der für doppelsträngige RNA typischen A-Helix (Heinemann *et al.*, 1987). Im Fall des Zirkels existieren zwei GC-reiche Helices (GC-Box) als Teil der thermodynamisch optimalen Sekundärstruktur (Qu *et al.*, 1993). Sie liegen 16, bzw. 15 Nukleotide strangabwärts von den beiden Startstellen der Viroidtranskription an den Positionen A111 und A325 (Fels, 1997; Fels *et al.*, 2001).

Im Fall des (-)-Strang-Oligomers ist ein, sogenannter Hairpin II essentiell für die Infektiösität des PSTVd (Loss *et al.*, 1991; Qu *et al.*, 1993). Er setzt sich aus einer Helix von neun G:C und einem A:U Basenpaar zusammen und konnte *in vivo* nachgewiesen werden (Schröder, 1998). Er ist im Gegensatz zu den GC-Boxen des (+)-Zirkels jedoch nicht Teil einer thermodynamisch stabilen Sekundärstruktur, sondern bildet sich neben anderen Hairpin-Strukturen, während der Synthese des (-)-strängigen Oligomers durch sequentielle Faltung als metastabiles Strukturelement. Hairpin II-enthaltende Strukturen existieren nicht unter thermodynamisch kontrollierten Bedingungen (Repsilber *et al.*, 1999).

Auch die Prozessierung oligomerer (+)-strängiger Replikationsintermediate zu Monomeren und ligierten Zirkeln wird durch metastabile Strukturen vermittelt. Das (+)-Oligomer formt verzweigte, metastabile Strukturen mit zwei extrastabilen Tetraloop-Hairpins im Bereich der zentralen konservierten Region. Dieser Bereich wird durch bisher unbekannte Wirtsenzyme erkannt, die die Replikationsintermediate zu Monomeren schneiden und zu reifen Zirkeln ligieren (Tsagris *et al.*, 1987; Baumstark & Riesner, 1995). Dabei kommt es nach dem Schnitt zu einer Konformationsänderung in die thermodynamisch günstige Stäbchenstruktur, die durch ein Loop E-Element stabilisiert wird (Baumstark *et al.*, 1997), (vgl. Kap. 1.7). Der Replikationszyklus stellt auch einen Strukturzyklus dar, in dem zu jedem Schritt das oder die optimierten Struktursignale für die Interaktion mit den entsprechenden Wirtsfaktoren angeboten werden.

Im Gegensatz zu der hier vorgestellten, enzymatischen Prozessierung oligomerer (+)-strängiger Replikationsintermediate zu Monomeren wurde auch eine autokatalytische Schnittreaktion für *Pospiviroidae* mehrfach diskutiert (Robertson *et al.*, 1985; Symons, 1997). Sie konnte jedoch bisher experimentell nicht belegt werden. Als Erklärung für die effiziente *in vivo*-Autoprocessing, die jedoch *in vitro* nicht reproduziert werden konnte, wird diskutiert, daß die RNA-Polymerase II während der Viroidsynthese die richtige

Faltungsumgebung für die autokatalytisch aktive Struktur der RNA anbietet (Symons, 1997).

1.7 Prozessierung oligomerer (+)-Replikationsintermediate

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Prozessierung des PSTVd, weshalb diese im folgenden schwerpunktmäßig behandelt wird. Für *Pospiviroidae* konnte bis auf eine Ausnahme (s. oben), kein proteinfreies *in vitro*-Prozessierungssystem etabliert werden (Robertson *et al.*, 1985; Tsagris *et al.*, 1987). Sie enthalten im Gegensatz zu den *Avsunviroidae* keine Ribozymdomänen, weshalb davon auszugehen ist, daß sie durch Wirtsfaktoren von oligomeren (+)-Replikationsintermediaten zu Monomeren der Einheitslänge prozessiert werden. Tatsächlich konnte ein homologes, zellfreies *in vitro*-Prozessierungssystem aus Kernproteinextrakt von nicht Viroid-infizierten Kartoffelsuspensionszellen entwickelt werden. Verschiedene (+)-lineare, mehr-als-Einheitslängen PSTVd-RNA-Transkripte werden als Substrat durch Wirtsenzyme des Kernextrakts geschnitten und zu korrekten Viroidzirkeln ligiert. Sie können als Modell-RNAs für natürliche (+)-Replikationsintermediate betrachtet werden (Baumstark & Riesner, 1995; Baumstark, 1997).

1.7.1 Metastabile Sekundärstruktur als prozessierungsaktive Substratkonformation

Alle im folgenden beschriebenen strukturellen Erkenntnisse wurden anhand des mehr-als-Einheitslängen PSTVd-Transkripts TB110 erhalten, das auch als Substrat in der Prozessierungsreaktion untersucht wurde. Es ist 381 Nukleotide lang und besteht aus 359 Nukleotiden der Einheitslänge des PSTVd-Monomers, 17 Nukleotiden Sequenzduplikation der UCCR und fünf Nukleotiden Vektorsequenz. Beginnend mit einem vektorspezifischen G am 5'-Ende folgen 376 PSTVd-spezifische Nukleotide von G₈₀ über 1/359 bis G₉₆, sowie nochmals vier Vektornukleotide. TB110 enthält so eine nur minimal nötige Anzahl an nicht-PSTVd spezifischen Nukleotiden (vgl. Abb. 3). Es wird durch Enzyme des Kernextrakts an beiden Enden geschnitten und zu Zirkeln der Einheitslänge ligiert. Auch ein mehr-als-Dimeren-Transkript TB210, das eine weitere PSTVd-Einheit von 359 Nukleotiden zwischen Nukleotid 359 und Nukleotid 1 enthält, wird zu Zirkeln der korrekten Einheitslänge prozessiert (Baumstark & Riesner, 1995; Baumstark, 1997).

Sekundärstrukturberechnungen mit dem Programm LinAll (Schmitz & Steger, 1992) ergaben für das Transkript TB110 vier prinzipiell verschiedene, optimale und suboptimale Strukturen und eine Variation. Sie unterscheiden sich durch unterschiedliche Verzweigungen im Bereich der zentralen konservierten Region von der unverzweigten, stäbchenförmigen Sekundärstruktur der Einheitslänge und sind in Baumstark & Riesner (1995) beschrieben. Temperaturgradienten-Gelelektrophoretische Untersuchungen und optische Denaturierungskurven bestätigten die möglichen koexistierenden Strukturen des Transkripts TB110. Es wurden Protokolle entwickelt, mit denen die einzelnen Strukturen durch unterschiedliche Inkubationsschritte in Hoch- oder Niedersalz in Kombination mit schneller oder langsamer Renaturierung gezielt eingestellt werden können. Diese Behandlungen basieren auf kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften der unterschiedlichen Strukturen und ihrer Übergänge untereinander (Baumstark & Riesner, 1995).

In der Prozessierungsreaktion im Kernextrakt wird jedoch nur eine dieser Sekundärstrukturen, die sogenannte Extended-Middle (ExM), zu korrekten Zirkeln prozessiert. Sie ist unter den Salz- und Temperaturbedingungen der Prozessierungsreaktion metastabil und lagert sich in die inaktive Struktur Extended-Left (ExL) um, wobei die Proteine des

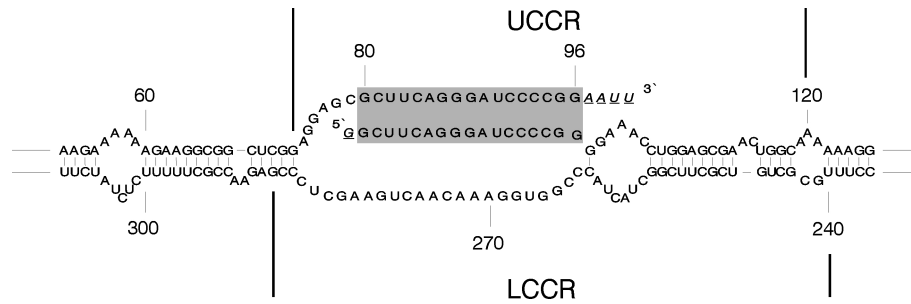


Abbildung 3: Zentrale Bereich des Substrattranskripts TB110. Ausschnitt der Sequenz des Transkripts TB110 mit einer Duplikation (grau unterlegt) im Bereich der oberen zentralen konservierten Region (UCCR) von Nukleotid 80 bis 96 am 5'-Ende von TB110. Vektornukleotide sind kursiv und unterstrichen dargestellt. Für die Zuordnung des Ausschnitts aus der Gesamtsequenz vgl. Abb. 1. LCCR: untere zentrale konservierte Region.

Extrakts die ExM-Struktur gegen diese Umlagerung stabilisieren (Baumstark & Riesner, 1995). Die ExM-Struktur kann in zwei alternativen Konformationen Extended-Middle-Loop E (ExM^E) und Extended-Middle-Tetraloop (ExM^{TL}) vorliegen, wobei jedoch nur die ExM^{TL}-Konformation prozessierungsaktiv ist (Baumstark *et al.*, 1997), (vgl. Abb. 4).

Die ExM^E-Struktur enthält einen von G:C-Stapeln eingefassten Loop, der eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie zum Loop E der ribosomalen 5S rRNA in Eukaryoten aufweist. Die Basen dieses Loops liegen nicht einzelsträngig vor, sondern sind in ein komplexes Muster von Watson-Crick- und nicht-kanonischen Basenpaaren eingebunden (Wimberly *et al.*, 1993). Die spezielle Anordnung der Basen führt zu einer charakteristischen kovalenten Verknüpfung zweier Basen des Loop E bei UV-Bestrahlung. Dieser UV-Crosslink wurde bei zirkulärem PSTVd zwischen den Basen G₉₈ und U₂₆₀ nachgewiesen (Branch *et al.*, 1985) und ist bei dem Transkript TB110 nur möglich, wenn es in der ExL- oder der ExM^E-Struktur vorliegt. Er ist jedoch nicht möglich, wenn das Transkript eine zur ExM^E-Struktur alternative, thermodynamisch suboptimale Struktur einnimmt. Bei dieser ExM^{TL}-Konformation faltet der obere Strang im Bereich der CCR in einen G:C-reichen Stamm, der durch einen GAAA-Tetraloop abgeschlossen wird. Der untere Strang bildet einen kleinen Hairpin-Loop ohne Tetraloop- und einen zweiten Hairpin mit GAAA-Tetraloop-Motiv (Baumstark *et al.*, 1997).

Diese Tetraloop-Strukturen entsprechen der sogenannten GNRA-Tetraloop-Konsensussequenz, wobei das N für ein beliebiges Nukleotid und das R für ein Purin steht. Dieses und die zwei weiteren Konsensus-Tetraloop-Motive U₂NCG und CUUG zeigen eine ungewöhnlich hohe Stabilität, die sie von anderen Hairpin-Loops mit vier Nukleotiden unterscheidet. Der Grund für diese Stabilität liegt in einer speziellen Konformation der vier Basen, von denen drei Stapelwechselwirkungen miteinander ausbilden (zur Übersicht: Shen *et al.* (1995); Varani (1995)).

Die zuvor beschriebenen, durch Sekundärstrukturberechnungen und Loop E-spezifische Crosslinks postulierten Konformationen konnten durch chemische Modifikationen von ungepaarten Basen mit Dimethylsulfat (DMS) bestätigt werden. Insbesondere wurde bewiesen, daß die Base C₂₆₂, die in der vorhergesagten ExL-Struktur im Bereich des Loop E an einem stabilen G:C Basenpaar beteiligt ist, bei dieser Konformation in einer Basenpaarung vorliegt. In der ExM^{TL} Struktur dagegen liegt diese Base in einem regulären Hairpin-Loop und konnte als nicht basengepaart nachgewiesen werden. Auch konnte ge-

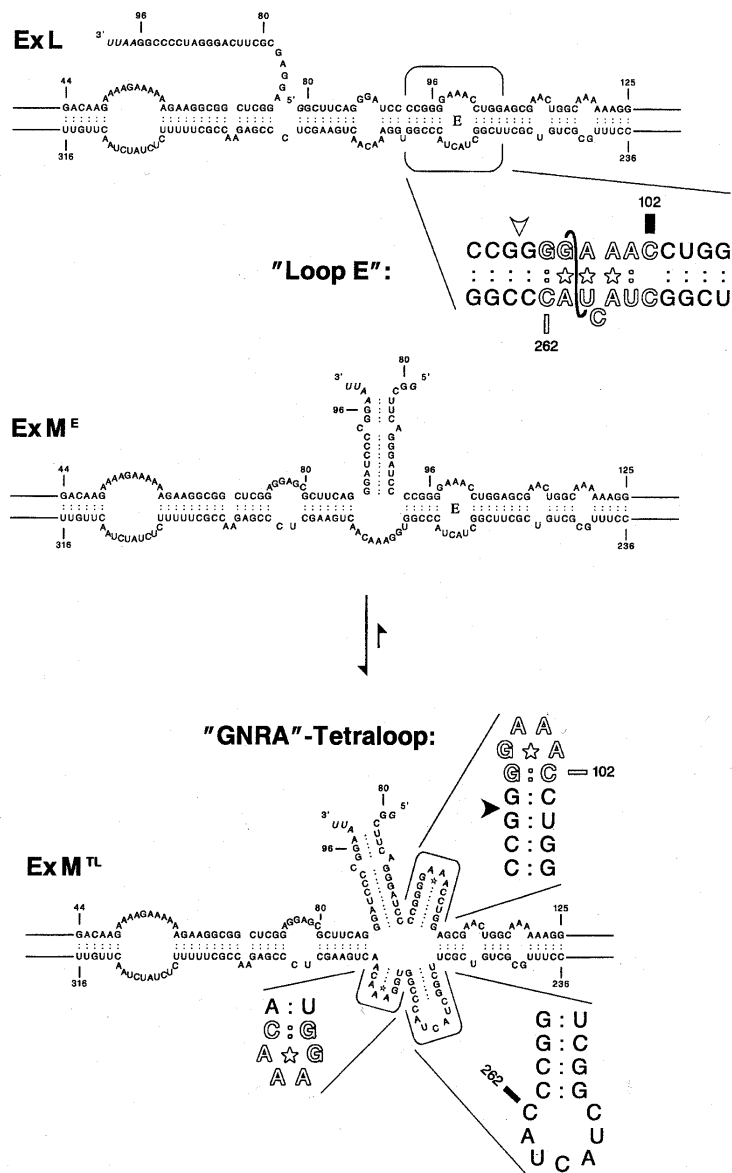


Abbildung 4: Sekundärstrukturen ExL und Alternativen der ExM. Das Substrattranskript TB110 in der Konformation Extended-Left (ExL), Extended-Middle mit dem Strukturelement Loop E (ExM^E) und der alternativen, in der CCR verzweigten, Extended-Middle-Struktur mit Tetraloop-Motiv (ExM^{TL}). Die ExM^{TL} enthält zwei Tetraloops und einen regulären Hairpin-Loop. Die Basen, die charakteristisch für die Tetraloop- und Loop E-Motive sind, werden in umrandeten weißen Buchstaben dargestellt. Sterne markieren nicht-kanonische Basenpaare und die Verbindungslinie zwischen G₉₈ und U₂₆₀ in der Loop E Darstellung weist den Loop E-spezifischen Crosslink aus. Die Stelle, an der der 5'-Schnitt stattfindet, wenn das Substrat in der ExM^{TL}-, nicht jedoch in der ExM^E-Struktur vorliegt, ist durch einen schwarzen Pfeil in der Tetraloop-Struktur und durch einen Weißen in der Loop E-Struktur gekennzeichnet. Die durch chemisches Mapping als einzelsträngig gezeigten Basen sind durch schwarze Balken, basengepaarte Nukleotide mit weißen Balken markiert. Die Abbildung wurde Baumstark *et al.* (1997) entnommen.

zeigt werden, daß die Base C₁₀₂ in der Struktur ExL einzelsträngig und in der ExM^{TL} Struktur baasengepaart ist. Diese Ergebnisse bestätigen das Tetraloop-Motiv im oberen Strang der prozessierungsaktiven, metastabilen ExM^{TL}-Struktur.

Die Existenz eines Hairpin-Stamms mit einem GAAA-Tetraloop des GNRA-Typs im oberen Strang wird auch durch phylogenetische Argumente unterstützt. Die Sequenz des Tetraloops und des Stamms, der die Schnittstelle enthält, ist bei den *Pospiviroiden* absolut konserviert (Baumstark *et al.*, 1997).

1.7.2 Schnitt- und Ligationsstelle der Prozessierung und Sekundärstrukturen der Prozessierungsprodukte

Das mehr-als-Einheitslängen Transkript TB110 (lineares L₀) wird bei Inkubation im Kartoffelkernextrakt zu linearen L₁- und etwas kürzeren L₂-Produkten, sowie zu korrekten Zirkeln prozessiert. Wird geeluiertes L₁ oder L₂ als Substrat in der Prozessierungsreaktion eingesetzt, werden sie ebenso wie L₀ zu Zirkeln prozessiert, was sie als Zwischenprodukte ausweist. Kontrollexperimente zeigten aber auch, daß geeluiertes L₂ ohne Proteine des Kernextrakts zu Zirkeln ligiert. Diese Autoligation findet jedoch mit einer etwa zehnfach geringeren Effizienz als die enzymatische Ligation statt (Baumstark *et al.*, 1997).

S1-Nuklease-Schutzexperimente der 3'-Enden dieser Prozessierungsprodukte zeigten, daß beide Lineare, L₁ und L₂, mit G₉₅ enden. Primer-Extension-Experimente ergaben, daß das erste 5'-Nukleotid von L₂ das G₉₆ ist, wohingegen das erste 5'-Nukleotid von L₁ ein G₉₅ ist, das dem ungeschnittenen Ausgangstranskript L₀ entspricht. L₂ ist also ein lineares Zwischenprodukt mit exakter momomerer Einheitslänge, welches zwischen Nukleotid G₉₅ und G₉₆ geschnitten ist. Aus ihm entsteht der korrekte, 359 Nukleotide große Zirkel. Die Linearen L₁ sind nur am 3'-Ende geschnitten und stellen somit ein Nebenprodukt der Prozessierung dar. Die Schnitt- und Ligationsstelle in der Substrat-RNA liegt also zwischen G₉₅ und G₉₆ in der Nähe des Loop E-Elements, bzw. im basengepaarten Stamm unterhalb des Tetraloop-Hairpins in der prozessierungsaktiven ExM^{TL}-Struktur.

Für die Prozessierungsprodukte L₁ und L₂ konnte der Loop E-spezifische Crosslink nachgewiesen werden, was auf eine Konformationsänderung der RNA während der Prozessierung schließen läßt, da das prozessierungsaktive Substrat in der Tetraloop-Struktur vorliegt, die keinen Loop E enthält (Baumstark *et al.*, 1997).

1.7.3 Tetraloop-Element als Erkennungsmotiv für die Prozessierung

Die verschiedenen Extended-Strukturen enthalten mit dem Loop E und dem Tetraloop unterschiedliche Struktur motive, die von den gleichen Sequenzbereichen gebildet werden. Sie schließen sich gegenseitig aus, weil der betroffene Abschnitt jeweils nur zur Bildung eines der beiden Struktur motive führen kann. Der Sequenzbereich, der den Tetraloop und den Loop E bildet, ist innerhalb der *Pospiviroiden* hoch konserviert und die beschriebenen Strukturen können von all diesen Viroiden gebildet werden, da sie ausschließlich die zentrale konservierte Region betreffen. Der GAAA-Tetraloop befindet sich in direkter Nachbarschaft zur Schnittstelle zwischen G₉₅ und G₉₆ und ist ein spezielles Strukturelement, daß die prozessierungsaktive ExM^{TL}- von der inaktiven ExM^E-Konformation unterscheidet, weshalb er als mögliches Erkennungsmotiv für das oder die Enzyme der Prozessierung diskutiert wird. Minimal-PSTVd-Konstrukte, die nur noch aus der CCR bestehen und die gleiche Duplikation wie das TB110-Transkript besitzen, enthalten die gleichen Struktur motive wie die Vollänge und sind ein aktives Substrat für die Prozessierung, was den Tetraloop als mögliches Erkennungsmotiv unterstützt (Schrader, 1996).

Es steht auch zur Diskussion, daß die Tetraloop-Struktur nicht nur durch Sekundärstrukturwechselwirkungen, sondern auch durch Beiträge von Tertiärstrukturen stabilisiert wird. In diesem Zusammenhang könnten die anderen Tetraloops in der CCR, auch wenn sie in ihrer Sequenz und Position nicht so konserviert sind, eine wichtige Rolle als Strukturelemente in einer komplexen dreidimensionalen Konformation spielen (Baumstark, 1997).

In vitro ist die Struktur ExM^{TL} mit dem Tetraloop- im Vergleich zur ExL ohne Tetraloop-Motiv durch niedrige Salzkonzentrationen und schnelles Abkühlen der denaturierten Transkripte favorisiert. Die unabhängige Bildung von drei Hairpins, zwei mit und einer ohne Tetraloop, ist schneller als die serielle Ausbildung unterschiedlicher Segmente in der stäbchenförmigen ExL. Weil in einem Tetraloop drei Basen Stapelwechselwirkungen ausbilden, ist die Bildung der korrespondierenden Stamm-Loop-Strukturen ähnlich schnell oder schneller als die Bildung anderer kleiner Hairpins. Der kinetische Vorteil ist nicht auf *in vitro*-Strukturbildung durch schnelle Renaturierung beschränkt, sondern kann während der Viroidreplikation *in vivo* vergleichbar relevant sein, wenn der oligomere (+)-Strang während seiner Synthese metastabile Strukturelemente durch sequentielle Faltung ausbildet (Baumstark *et al.*, 1997).

1.7.4 Mechanistisches Modell der Viroidprozessierung

Aus der Kenntnis der prozessierungsaktiven Sekundärstruktur des (+)-PSTVd mehrals-Einheitenlängen-Transkripts TB110 und der linearen Prozessierungsprodukte, sowie der Schnitt- und Ligationsstelle wurde ein mechanistisches Modell der Viroidprozessierung entwickelt (vgl. Abb. 5). In einem ersten Schritt wird das Tetraloop-Element in der Struktur ExM^{TL} durch eine oder mehrere Wirtsnukleasen erkannt und im Stamm des Tetraloop-Hairpins zwischen den Nukleotiden G₉₅ und G₉₆ geschnitten. Wenn das 5'-Fragment entfernt ist, faltet die übrige CCR in die Stäbchenstruktur mit dem Loop E-Element, wobei das duplizierte 3'-Ende ungepaart bleibt. Die Konformationsänderung von der Tetraloop- zur Loop E-Struktur ist durch die Dissoziation des 5'-Endes nahezu irreversibel und treibt die Prozessierung vom Erst- zum Zweitschnitt.

Das verkürzte 5'-Ende liegt vermutlich bis zum terminalen G₉₆ basengepaart vor, weil das Loop E-Element rechts von der Schnittstelle die Eigenschaft besitzt, eine stabile helikale Konformation einzunehmen. Dadurch wird das entsprechende G₉₆ am 3'-Ende aus dem G:C-Basenpaar mit dem unteren Strang verdrängt und die duplizierte 3'-Sequenz zweigt einzelsträngig aus der Helix ab. In dieser Konformation erfolgt dann der zweite Schnitt, bei dem die terminale 3'-Sequenz nach dem Nukleotid G₉₅ abgespalten wird. Dieser Schnitt kann ohne spezifisches Erkennungsmotiv erfolgen, da das 3'-Fragment der einzige einzelsträngige Bereich ist, der aus der helikalen, basengepaarten Region heraussteht.

Nach dem 3'- und dem 5'-Schnitt entstehen Moleküle der exakten monomeren Einheitslänge, in denen das 3'-G₉₅ und das 5'-G₉₆ in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft liegen. Sie werden durch Basenpaarungen mit dem unteren Strang und durch Stapelwechselwirkungen stabilisiert. Die Enden können nun, wahrscheinlich durch eine Ligase des Wirtes oder aber auch durch Autoligation, auf einfache Weise ligiert werden und es entsteht das reife, zirkuläre Viroidmolekül (Baumstark *et al.*, 1997).

1.8 Zelluläre Wechselwirkungspartner der Viroid-RNA

Da Viroide keine mRNA-Aktivität besitzen, müssen sie für ihren gesamten Infektionsweg spezifische Wechselwirkungen mit Wirtsfaktoren nutzen. Diese sind nicht an die

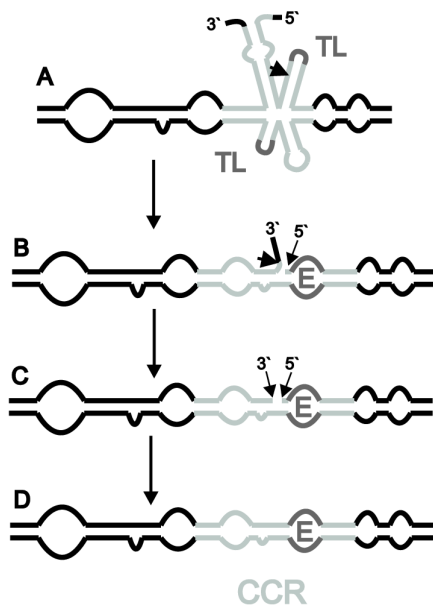


Abbildung 5: Mechanistisches Modell der Viroidprozessierung.

Die schematisch dargestellten Strukturen stellen den gleichen Ausschnitt des Transkripts TB110 dar wie in Abb. 4. Der Sequenzbereich der CCR ist hellgrau dargestellt. Das mehr-als-Einheitslängen PSTVd-Transkript wird in seiner metastabilen Extended Middle-Struktur mit Tetrarings-Motiv zwischen G₉₅ und G₉₆ geschnitten (A). Nach Dissoziation des 5'-Fragments faltet die CCR mit dem neuen 5'-Ende zur Stäbchenstruktur, die durch die Ausbildung der Loop E-Struktur stabilisiert wird, während das 3'-Ende bis zum Nukleotid G₉₅ mit dem unteren Stang basenpaart. Die einzelsträngig verbleibenden Nukleotide am 3'-Ende werden dann in einer zweiten Reaktion nach dem G₉₅ geschnitten (B). Die resultierenden 3'- (G₉₅) und 5'-Enden (G₉₆) befinden sich direkt nebeneinander und werden durch Basenpaarungen und Stapelwechselwirkungen stabilisiert (C). Die Ligation dieser Enden führt zu korrekten zirkulären Produkten der Einheitslänge (D). Abbildung verändert nach Baumstark *et al.* (1997).

Anforderungen der Pathogenreplikation angepaßt, was besonders für die Erkennung der Viroid-RNA als Template durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II deutlich wird. Dies wird in analoger Weise auch für die noch unbekannt, in die anderen Schritte von Prozessierung und Transport der Viroide involvierten Wirtsfaktoren gelten. Als solche Wechselwirkungsfaktoren kommen sowohl Proteine als auch zelleigene RNAs in Betracht. RNA-RNA-Wechselwirkungen werden für wahrscheinlich gehalten, da Viroide im Zellkern replizieren und akkumulieren, wo auch eine Vielzahl funktionell aktiver RNAs lokalisiert sind. Vergleiche von Viroidsequenzen mit denen zellulärer Ribonukleinsäuren zeigen mehrere Sequenzhomologien. Sie führten zu Modellen, in denen intermolekulare Basenpaarungen die biologische Funktion zellulärer RNAs im Wirtsstoffwechsel beeinträchtigen sollten, die sich jedoch in keinem Fall experimentell bestätigen ließen (z.Ü. (Diener, 1999)).

In den Nukleoli infizierter Tomatenpflanzen liegt PSTVd an Proteine assoziiert vor (Schumacher *et al.*, 1983). Es wurden verschiedene Komplexe von PSTVd mit Kernproteinen aus infizierten Tomatenblättern isoliert und charakterisiert, die auf elektrostatischen Wechselwirkungen zu beruhen scheinen. Mit *in vitro*-Rekonstitutionsexperimenten, wurden PSTVd-Protein-Komplexe identifiziert, die auch *in vivo* bestätigt werden konnten. Als Viroid-bindende Proteine wurden dabei Histone, ein 41 kDa, ein 39 kDa und ein 31 kDa Protein identifiziert (Wolff *et al.*, 1985). Andere Arbeiten mit ähnlichen Experimenten wiesen ein anderes Set von Proteinen als Viroid-bindend nach (Hadidi, 1988). Die kovalente Verknüpfung von Viroiden mit Proteinen durch *in situ* UV-Bestrahlung des Zellkerns, sowie *in vitro* an rekonstituierten Viroid-Proteinkomplexen zeigten verschiedene viroid-bindende Proteine. Die auffälligste Viroidaffinität besaß ein stark basisches Protein mit einem Molekulargewicht von 43 kDa (Klaff *et al.*, 1989). Eine Sequenzanalyse von zwei

kurzen Fragmenten des gereinigten Proteins nach Chymotrypsinspaltung wiesen eine Homologie zum Histon H1 aus Tomate nach, das jedoch im SDS-Gel ein anderes apparentes Molekulargewicht besitzt (Gruner, 1992). Eine weitere Homologie zu den Sequenzfragmenten weist auch das Meiotin-1 aus Lilie auf, ein stark basisches Protein von 43 kDa, dessen N-terminaler Bereich seinerseits homolog zu einem stark konservierten Abschnitt des Histons H1 ist (Aschermann, 1997). Eine eindeutige Identifikation dieses Proteins steht jedoch noch aus. Ein weiteres Viroid-bindendes Protein ist das schon in Kap. 1.5 beschriebene Phloem Protein 2 für das *in vitro* eine Komplexbildung mit HSVd-RNA gezeigt wurde.

Andere Ansätze verfolgen die Strategie, mit viroidspezifischer Sonde aus cDNA-Expressionsbanken der Wirtspflanze viroidbindende Proteine zu isolieren (Werner *et al.*, 1993, 1995) oder aus differentiellen cDNA-Banken solche Proteine zu charakterisieren, die in infizierten Pflanzen höher exprimiert werden als im gesunden Wirt (Gadea *et al.*, 1996). Es wurden dabei jedoch allgemeine Nukleinsäure-bindende Proteine identifiziert oder solche, die generell unter Streßbedingungen, wie durch Wundverletzungen oder Pilz- und Virusbefall, induziert werden (Rodrigo *et al.*, 1991; Werner *et al.*, 1993; Tornero *et al.*, 1994). Bei keinem dieser Proteine kann die Wechselwirkung mit Viroiden einer Funktion bei der Replikation, der Pathogenese oder dem Transport zugeordnet werden.

Eine Ausnahme ist eine 55 kDa Viroid-induzierte Proteinkinase (PKV), deren Transkription nur in PSTVd-infizierten Pflanzen erfolgt. Die mRNA Konzentration in der Zelle steigt dabei mit der Pathogenität des infizierenden PSTVd-Stamms an. Da das Protein keine Bindestellen für dsRNA besitzt, wird seine Aktivierung nicht durch eine direkte Interaktion mit PSTVd reguliert (Hammond & Zhao, 2000). Ein weiteres Protein, für das eine Funktion in der Pathogenese diskutiert wird, ist die schon in Kap. 1.4 vorgestellte pflanzliche Proteinkinase pPKR, für die bisher auch keine direkte Wechselwirkung mit Viroiden gezeigt wurde. Auch der Nachweis, daß das Phloem Protein 2 *in vivo* eine Rolle im Langstreckentransport von Viroiden spielt, steht noch aus. Außer der schon lange bekannten dsDNA-abhängigen RNA-Polymerase II (vgl. Kap. 1.6), die eine direkte Wechselwirkung mit der Viroid-RNA bei der Transkription eingeht, ist kein funktioneller Wechselwirkungspartner von Viroiden sicher bekannt.

1.9 Endoribonuklease MRP als Wechselwirkunsfaktor des Viroids

Die Arbeiten zur Prozessierung oligomerer (+)-Replikationsintermediate führten zur Hypothese, daß die Endoribonuklease MRP (von „mitochondrial RNA processing“) der Wirtszelle die Schnittreaktion vermitteln könnte (Baumstark, 1997). Die RNase MRP ist ein Ribonukleoprotein (RNP), dessen RNA- und Protein-Komponente für seine Aktivität notwendig sind. Die 259-340 Nukleotide lange RNA-Komponente ist durch ein „single copy“-Gen im Zellkern kodiert. Das RNP wurde bisher nur bei Eukaryoten gefunden und hat in Mitochondrien und Zellkernen verschiedene Funktionen. In Mitochondrien ist es für das endonukleolytische Schneiden von Primer-RNA während der DNA-Replikation verantwortlich. Hauptsächlich lokalisiert ist die MRP-RNA jedoch im Zellkern, wo das RNP generell an der Prozessierung verschiedener nukleolärer RNAs, einschließlich der tRNAs, beteiligt ist, die mit der Assemblierung und der Funktion von Ribosomen zusammenhängen. In Hefe vermittelt es die Prozessierung der 5.8S rRNA, und die RNA-Untereinheit ist essentiell für das Überleben der Zellen (z.Ü. Clayton (1994); Morrissey & Tollervey (1995); Tollervey & Kiss (1997)). Untersuchungen an temperatursensitiven Mutanten der RNase MRP-RNA in Hefe zeigten eine Akkumulation unprozessierter prä-

tRNA^{Ser}, morphologische Veränderungen, sowie Wachstums- und Zellteilungsstörungen. Es wird diskutiert, daß die RNase MRP durch ihre multifunktionelle Rolle Zellteilung und Wachstum reguliert, indem sie die nukleolären Signale für diesen Prozess anbietet. Die Regulation wird zum Einen durch die Prozessierung von für die Ribosomenassemblierung und -funktion wichtigen, niedrigmolekularen RNAs erreicht. Zum Anderen spielt die Regulation der Mitochondrienbiogenese durch die Replikation der mtDNA eine Rolle (Paluh & Clayton, 1996).

Die RNase MRP ist strukturell und funktionell eng verwandt mit der RNase P, einem ubiquitären Ribonukleoprotein, das die 5'-Enden von Vorläufer-tRNAs prozessiert. Die RNA-Komponenten der RNase P und der RNase MRP haben Sequenzähnlichkeiten in einigen kurzen Bereichen und es wird diskutiert, daß beide RNAs unter Ausbildung eines Pseudoknotens in die gleiche, konservierte Käfigstruktur falten können, die bei eubakterieller RNase P-RNA beschrieben ist. Das Pseudoknoten-Motiv gilt als das Strukturelement aller RNase P- und RNase MRP-Enzyme, welches für den grundsätzlichen Katalysemechanismus verantwortlich ist. Jedoch besitzt nur die bakterielle RNase P-RNA eine selbstständige katalytische Aktivität (z.Ü. Altman (1990); Pace & Smith (1990); Schön (1999)).

In Pflanzen ist bisher nur ein MRP-RNA-ähnliches Gen aus *Arabidopsis* und Tabak beschrieben. Die MRP-RNA ist auch hier im Nukleolus angereichert, ist jedoch in Mitochondrien nicht nachweisbar. Auch für Pflanzen wird eine Beteiligung der RNase MRP an der Ribosomenbiogenese und eine Funktion bei der prä-rRNA Prozessierung im Zellkern diskutiert (Kiss *et al.*, 1992).

Sequenzvergleiche zwischen PSTVd- und der pflanzlichen MRP-RNAs aus *Arabidopsis* und Tabak ergaben, daß im Bereich der Prozessierungsschnittstelle in der zentralen konservierten Region des Viroids eine Basenpaarung mit einem Sequenzabschnitt der MRP-RNA möglich ist, der zwischen den verschiedenen beschriebenen RNA-Spezies der RNase MRP, als auch der phylogenetisch verwandten RNase P konserviert ist. Dieser Bereich ist an der Bildung der konservierten Käfigstruktur beteiligt (Baumstark, 1997). Auch konnten im Bereich der CCR, in der die Prozessierungsstelle liegt, zwei Nukleotide identifiziert werden, die an einer Wechselwirkung mit zellulärer RNA beteiligt sind (Thiel, 1999).

Ein erster experimenteller Hinweis darauf, daß die RNase MRP an der Viroidprozessierung beteiligt sein könnte, ergab sich aus der Hemmung der *in vitro*-Prozessierung des mehr-als-Einheitslängen-Transkripts TB110 (vgl. Kap. 1.7) durch das Antibiotikum Puromycin (Baumstark, persönliche Mitteilung). Puromycin ist ein tRNA-Analogon, daß die Translation inhibiert. Es ist auch als ein spezifischer Inhibitor der RNase MRP und RNase P beschrieben (Potuschak *et al.*, 1993).

Aufgrund der Vermutung, daß Viroide die nukleäre RNase MRP für ihre Prozessierung nutzen könnten, wurde bei Untersuchungen zur Charakterisierung PSTVd-bindender zellulärer RNAs versucht, anhand quervernetzter Viroid-RNA-Komplexe eine mögliche Wechselwirkung zwischen PSTVd und der MRP-RNA zu zeigen. Die MRP-RNA konnte jedoch mit Primer-Extension-Experimenten nicht als Komplexpartner nachgewiesen werden. Bei diesen Arbeiten stellte sich heraus, daß die MRP-RNA in den Zellen einer Viroid-infizierten Kartoffelsuspensionskultur in erheblich geringeren Mengen vorliegt als in einer gesunden Vergleichskultur. Dies konnte durch Northern-Hybridisierungsexperimente an Gesamt-RNA aus Viroid-infizierten- und gesunden Kartoffelsuspensionszellen bestätigt werden (Thiel, 1999).

Mutationen in der MRP-RNA führen in Hefe, wie zuvor beschrieben, zu einem Phänotyp der den Symptomen einer Viroidinfektion gleicht. Eine Konkurrenz um die RNase MRP

zwischen ihrem eigentlichen Substrat und dem Viroid oder eine infektionsbedingte Reduktion der RNase MRP-RNA wären deshalb als molekulare Ursache der Pathogenität von Viroiden denkbar.

1.10 Aufgabenstellung

Bei der Reduktion der RNase MRP-RNA-Konzentration durch Viroidinfektion in Kartoffelsuspensionskulturen muß berücksichtigt werden, daß die infizierte und die gesunde Kultur unterschiedliche Zelllinien darstellen. Weil die RNase MRP in der Ribosomensynthese und der Zellproliferation eine zentrale Rolle spielt, wurde angenommen, daß ein Unterschied in der MRP-RNA-Expression verschiedener Zellen derselben Gattung unwahrscheinlich ist (Thiel, 1999). Auf Grund der Unsicherheit, daß der Effekt auch auf einer unterschiedlichen Expression dieser RNA in den beiden Kartoffelarten beruhen könnte, sollte zunächst bewiesen werden, ob es sich um einen viroidspezifischen Effekt handelt. Dazu sollten Northern-Hybridisierungen an Gesamt-RNA aus gesunden und PSTVd-infizierten Tomaten mit MRP-RNA spezifischen Sonden durchgeführt werden.

Die beiden Zellkulturlinien von nicht-infizierten *Solanum tuberosum*- und infizierten *Solanum demissum*-Zellen werden schon über viele Jahre kultiviert, wobei sie immer aus sich selbst heraus weiter vermehrt werden. Eventuelle genetische Unterschiede der beiden Arten oder Veränderungen zur ursprünglichen Kartoffelpflanze aus der sie angelegt wurden, können sich im Stoffwechsel und damit auch auf die MRP-RNA Menge in den beiden Kulturen verschieden ausprägen. Auch sind unterschiedliche Sequenzen der MRP-RNA möglich, sodaß die verwendete Hybridisierungssonde nicht gleich homolog ist. Dies könnte zu unterschiedlichen Signalintensitäten bei Northern-Hybridisierungsexperimenten führen. Tomatenpflanzen werden dagegen aus Samen jeweils neu gezogen, ein Teil von ihnen wird mit PSTVd infiziert und ein anderer Teil dient als gesunde Kontrollpflanzen. Genetisch gleiche Pflanzen werden so unter identischen Bedingungen kultiviert und eine Probenahme von jungen Blättern in der gleichen Wachstumsphase der Pflanzen ist möglich. Die Mengen an MRP-RNA in gesunden und PSTVd-infizierten Tomaten sind damit wirklich vergleichbar. Unterschiede wären ein signifikantes Ergebnis und ein Hinweis auf einen pathogenen Wirkungsmechanismus von Viroiden.

Ein Ansatzpunkt, den Einfluß der RNase MRP auf die Viroidprozessierung näher zu untersuchen, sollte in der Überprüfung der Hemmbarkeit der *in vitro*-Prozessierung des mehr-als-Einheitslängen-Transkripts TB110 durch Puromycin liegen. TB110 gilt als Modell für oligomere (+)-Replikationsintermediate, weshalb eine Bestätigung der RNase MRP eine wichtige Rolle in der Viroidprozessierung einräumen würde und weitere Hinweise auf deren Beteiligung könnten gezeigt werden.

Da in dieser Arbeit jedoch keine viroidspezifische Reduktion der RNase MRP-RNA-Konzentration und kein Hinweis auf die Beteiligung der RNase MRP an der Prozessierung gezeigt werden konnte, stellte die Charakterisierung der an der Viroidprozessierung beteiligten Enzymaktivitäten den Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob unabhängige Enzyme oder ein multifunktionelles Enzym mit einer oder mehreren Untereinheiten an den Schnitt- und Ligationsschritten der Viroidprozessierung beteiligt sind. Dazu war als methodischer Ansatz eine Anreicherung der Enzymaktivitäten mittels chromatographischer Proteintrennverfahren durchzuführen.

Der im mechanistischen Modell der Viroidprozessierung vorgeschlagene 5'-Schnitt leitet die Prozessierung ein und mögliche strukturellen Erkennungsmotive der PSTVd-RNA für die Wirtsnuklease(en) sind gut untersucht (vgl. Kap. 1.7). Deshalb sollte das 5'-Schnei-

deenzym mittels chromatographischer Proteintrennverfahren so weit wie möglich angereichert werden, um es möglicherweise zu identifizieren.

Um die Anreicherung der prozessierungsspezifischen Spaltungs- und Ligationsaktivität(en) zu verfolgen, standen das mehr-als-Einheitslängen PSTVd-Transkript TB110, das mehr-als-Dimeren- oder auch ein mehr-als-Trimeren PSTVd Transkript zur Diskussion (vgl. Kap. 1.7). Das für die notwendigen Aktivitätstests am besten geeignete Transkript sollte ermittelt werden.

Das in Kap. 1.7 beschriebene *in vitro*-Prozessierungssystem basiert auf nicht-infizierten Kartoffelsuspensionskulturen von *Solanum tuberosum*. Damit stand ein aktiver Proteinextrakt zur Verfügung, von dem ausgehend Proteine fraktioniert, auf Aktivität getestet und angereichert werden konnten. Eine Übertragung des Systems auf PSTVd-infizierte Kulturen von *Solanum demissum* sollte etabliert werden, sodaß für die Anreicherung von Enzymaktivitäten auch ein Kernextrakt aus Zellen, in denen Viroide konstitutiv repliziert werden, vorhanden sein sollte.

2 Ergebnisse

2.1 Präparation eines prozessierungsaktiven Kernextrakts aus PSTVd-infizierten *S. demissum*-Suspensionskulturen

Im Institut standen zwei verschiedene Kartoffelsuspensionskulturen zur Verfügung, eine PSTVd-infizierte *Solanum demissum*- (M316PSTVd) und eine nicht-infizierte *Solanum tuberosum*-Kultur (HH258). Alle bisherigen Untersuchungen zur PSTVd-*in vitro*-Transkription und -Prozessierung waren mit der HH258-Kultur durchgeführt worden (Baumstark, 1997; Fels, 1998; Hu, 2000). Unterschiedliche Kernextraktpräparationen aus nicht-infizierten *S. tuberosum*-Kulturen zeigten im Verlauf dieser Arbeit starke Schwankungen ihrer Prozessierungsaktivität. In *S. demissum*-Kulturen wird PSTVd konstitutiv repliziert, sodaß die relevanten Enzymaktivitäten für die Replikation und damit auch für die zu untersuchende Prozessierung bei verschiedenen Präparationen gleichmäßig vorhanden sein sollten. Die Überprüfung einer konstanten Viroidvermehrung könnte gegebenenfalls als interner Standard für das Vorhandensein aller notwendigen Prozessierungsenzyme verwendet werden.

Die Isolation der Zellkerne und die anschließende Proteinextraktion aus den Kernen konnten nach den für *S. tuberosum* entwickelten Protokollen erfolgen (Baumstark & Riesner, 1995; Baumstark, 1997). Da die infizierte Kultur etwas langsamer wuchs als die nicht-infizierte, wurden für eine Kernpräparation 600 ml anstelle von 400 ml Suspensionskultur eingesetzt. Das entsprach etwa 40 g Frischgewicht der nassen Zellen, woraus $0,8-1 \times 10^8$ Kerne isoliert werden konnten. Diese Kernzahl entsprach der von Präparationen aus *S. tuberosum*-Kulturen. Die infizierten Zellen enthielten mehr Stärke als die nicht-Infizierten. Während der Präparation sedimentierte diese in den Zentrifugationsschritten als gut sichtbarer weißer Niederschlag. Auch die Kernpräparation unterschied sich unter dem Mikroskop durch viele sichtbare Stärkeeinschlüsse von der aus der nicht-infizierten Kultur. Während der 154000 g Zentrifugation in der sich anschließenden Kernextraktion pelletierten die Stärkeeinschlüsse und waren im Proteinüberstand mikroskopisch nicht mehr sichtbar. Aus der zuvor angegebenen Kernzahl konnte so 8-10 mg Protein in 1 ml Lagerpuffer präpariert werden.

Der so erhaltene Kernextrakt aus *S. demissum* Kulturen wurde mit dem mehr-als-Einheitslängen-Transkript TB110 als Substrat auf *in vitro*-Prozessierungsaktivität getestet (Abb. 6). Hier war, ebenso wie bei dem früher beschriebenen System aus *S. tuberosum*-Kulturen (Baumstark & Riesner, 1995; Baumstark, 1997), mit zunehmender Inkubationszeit eine Abnahme des eingesetzten Transkripts (L_0 , 381 Nt) zu beobachten. Im Verlauf der Prozessierungsreaktion entstand zunächst lineares L_1 (376 Nt). Mit zunehmender Inkubationszeit akkumulierte dann lineares L_2 (359 Nt), während anfangs gebildetes L_1 wieder abnahm. Gleichzeitig akkumulierten zirkuläre Produkte, deren Bildung mit viel geringerer Effizienz verlief, als die der linearen Schnittprodukte. Das in Spaltungsschritten gebildete Produkt L_1 ist nur am 3'-Ende geschnitten. Das Zwischenprodukt L_2 ist am 3'- und 5'-Ende geschnitten und besitzt die monomere PSTVd-Einheitslänge. Aus ihnen entstehen die 359 Nt großen, monomeren Zirkel (vgl. Kap 1.7).

Neben der Akkumulation von spezifischen Prozessierungsprodukten mit fortschreitender Inkubationszeit wurde die RNA auch durch unspezifische RNasen zunehmend abgebaut. Bei gleichen Mengen eingesetztem Protein war das Verhältnis von spezifischer zu unspezifischer RNase-Aktivität von Präparation zu Präparation unterschiedlich. Die einzusetzenden Proteinmengen, bei der die spezifischen Reaktionen vor dem Hintergrund an

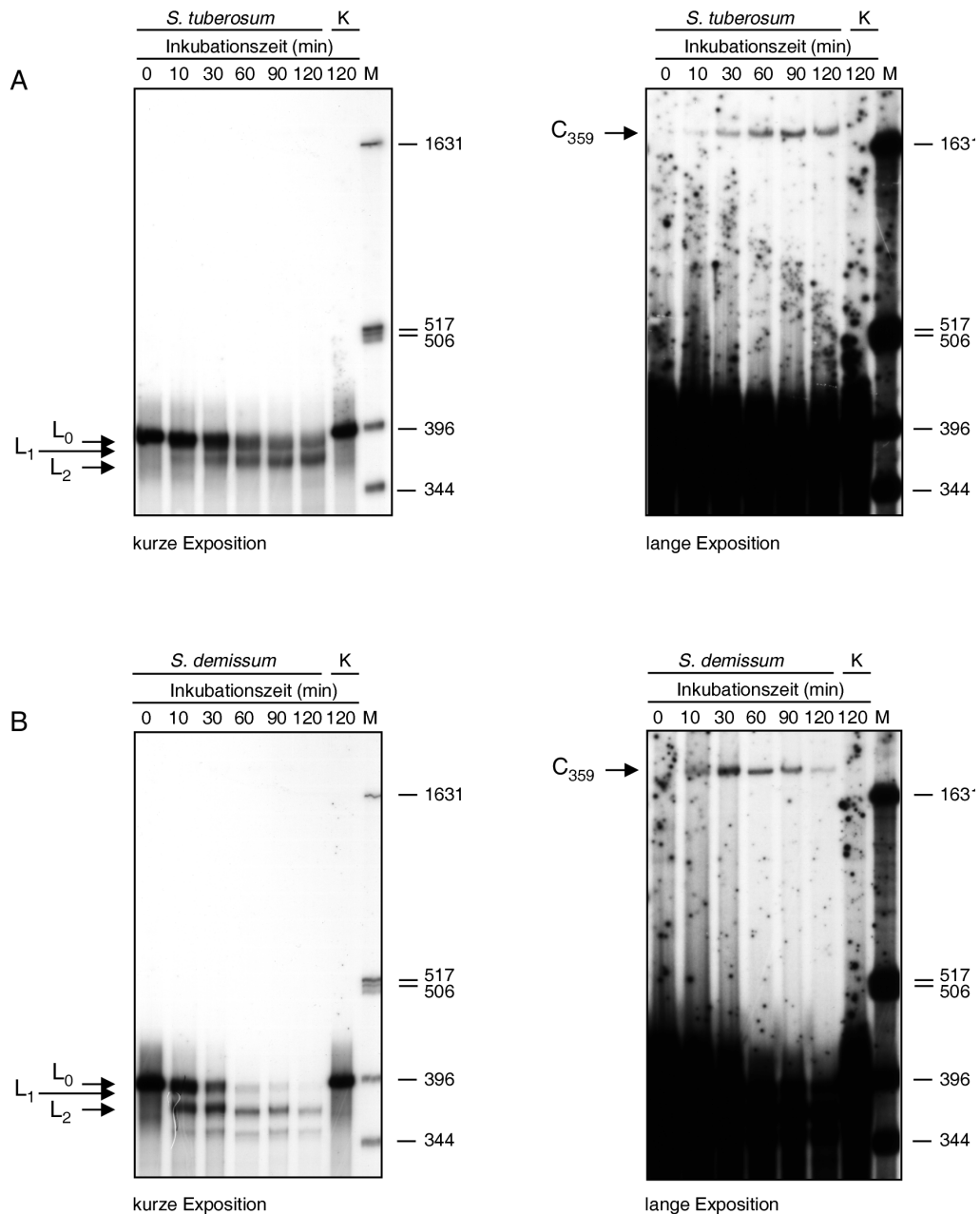


Abbildung 6: Zeitabhängigkeit der Prozessierung im Kernextrakt nicht-infizierter *S. tuberosum*- und PSTVd-infizierter *S. demissum*-Kulturen. Radioaktiv markiertes, auf ExM^{TL}-Struktur eingestelltes Transkript TB110 wurde bei 30 °C für die angegebenen Zeiten im Kernextrakt aus nicht-infizierten *S. tuberosum* (A) und PSTVd-infizierten *S. demissum*-Kulturen (B) inkubiert. Je Reaktionsansatz wurden 80 µg Protein und 2 × 10⁵ cpm Transkript eingesetzt. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt und durch Exposition gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. In jeder Spur wurden 4,6 × 10⁴ cpm Prozessierungsprodukte aufgetragen. Kurze Expositionen: 18 h ohne Verstärkerfolie. Lange Expositionen: 11 d mit Verstärkerfolie. Als Kontrolle (K) wurde Transkript-RNA aufgetragen, die mit Puffer inkubiert wurde. Das eingesetzte Transkript TB110 voller Länge (L₀), 3'-geschnittene Lineare (L₁), monomere Lineare (L₂) und zirkuläres Produkt monomerer Länge (C₃₅₉) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *Hinf*I-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben.

unspezifischer Degradation gut sichtbar waren, variierten. Bei zu hohen Proteinkonzentrationen stieg die unspezifische RNase-Aktivität überproportional an. Wurde zu wenig Protein eingesetzt, erfolgte eine zu geringe spezifische Umsetzung des Substrats. Konzentrationsabhängige Prozessierungsreaktionen zeigten, daß im Bereich von 20 bis 100 μg Protein der Nachweis von Linearen L_1 , Linearen L_2 und Zirkel möglich war, wenn etwa 1×10^5 cpm Transkript als Substrat eingesetzt wurden. Die bei der Prozessierung im Kernextrakt aus *S. tuberosum* mit sehr geringer Ausbeute aus L_1 entstehenden aberranten Zirkel (Baumstark & Riesner, 1995), wurden auch bei Kernextrakt aus *S. demissum* gebildet (Abb. 7).

Mit den für nicht-infizierte *S. tuberosum*-Kulturen etablierten Protokollen zur Kernpräparation und Kernextraktion konnte auch aus PSTVd-infizierten *S. demissum*-Kulturen ein prozessierungsaktiver Kernextrakt präpariert werden. Zeit- und Konzentrationsabhängige Prozessierungsreaktionen zeigten, daß sich die Prozessierungsaktivität von Kernextrakt aus *S. demissum*-Kulturen prinzipiell gleich zu der aus *S. tuberosum* verhält. Das mehr-als-Einheitslängen-Transkript TB110 wird zu kürzeren, linearen L_1 - und L_2 - und zu zirkulären, monomeren C_{359} - und aberranten C_a -Produkten prozessiert. Verschiedene Präparationen aus *S. demissum*-Kulturen zeigten dabei im Verlauf dieser Arbeit im Gegensatz zu denen aus *S. tuberosum* nur leichte Aktivitätsschwankungen. Damit stand für weitere Untersuchungen ein Proteinextrakt aus Zellen zur Verfügung, bei dem die an der Prozessierung beteiligten Enzymaktivitäten bei jeder Präparation mit ähnlicher Ausbeute vorhanden waren.

2.2 Vergleich der RNase MRP-RNA Menge in gesunden und infizierten Tomaten

In einer Northernanalyse von Gesamt-RNA aus gesunden und PSTVd-infizierten Kartoffelzellkulturen mit einer nicht-homologen MRP-RNA-spezifischen Sonde konnte eine deutlich reduzierte MRP-RNA Menge in den infizierten Zellen gezeigt werden. Die 25 Nukleotide lange Sonde wurde anhand eines weitgehend übereinstimmenden Sequenzabschnitts der MRP-RNA aus *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabaccum* (Kiss *et al.*, 1992) hergestellt. Mit ihr war in den beiden Kartoffelzellkulturen jeweils eine einzelne Bande detektierbar. In infizierten und nicht-infizierten Tomatenblättern konnte mit dieser Sonde jedoch keine MRP-RNA nachgewiesen werden (Thiel, 1999). Daher wurde für Northernanalysen der Tomaten-MRP-RNA anhand der *Arabidopsis*-Sequenz eine längere Sonde von 51 Nukleotiden (MRP51) hergestellt, die gegen die Tomaten-MRP-RNA möglichst spezifisch sein sollte. Es wurde ein Sequenzbereich gewählt, der zwischen den weit entfernten Organismen *Arabidopsis* und Mensch mit 67% die höchste Homologie besitzt. Die Sequenz dieser Region ist an der Ausbildung des Pseudoknotens in der Käfigstruktur beteiligt (Kiss *et al.*, 1992) und ist zwischen Hefe, Vertebraten und Pflanzen konserviert (Sbisà *et al.*, 1996) (vgl. Kap. 1.9). Zudem waren mit einer Oligonukleotidsonde aus diesem Sequenzabschnitt übereinstimmende Hybridisierungssignale gegen die homologe *A. thaliana*-, gegen Tabak- und auch gegen Ratten-MRP-RNA gezeigt worden (Kiss *et al.*, 1992). Außer der *Arabidopsis*-MRP-RNA existierten keine anderen pflanzlichen Sequenzdaten dieser Region, sodaß nur die *Arabidopsis*-MRP-RNA als pflanzliche Sequenz für die Auswahl der Sonde herangezogen werden konnte. Der gewählte Bereich beinhaltet zudem den Sequenzabschnitt, für den durch Komplementaritätsvergleich eine mögliche Basenpaarung der *Arabidopsis*-MRP-RNA mit dem Bereich der Prozessierungsschnittstelle in der CCR des PSTVd diskutiert wurde (Baumstark, 1997).

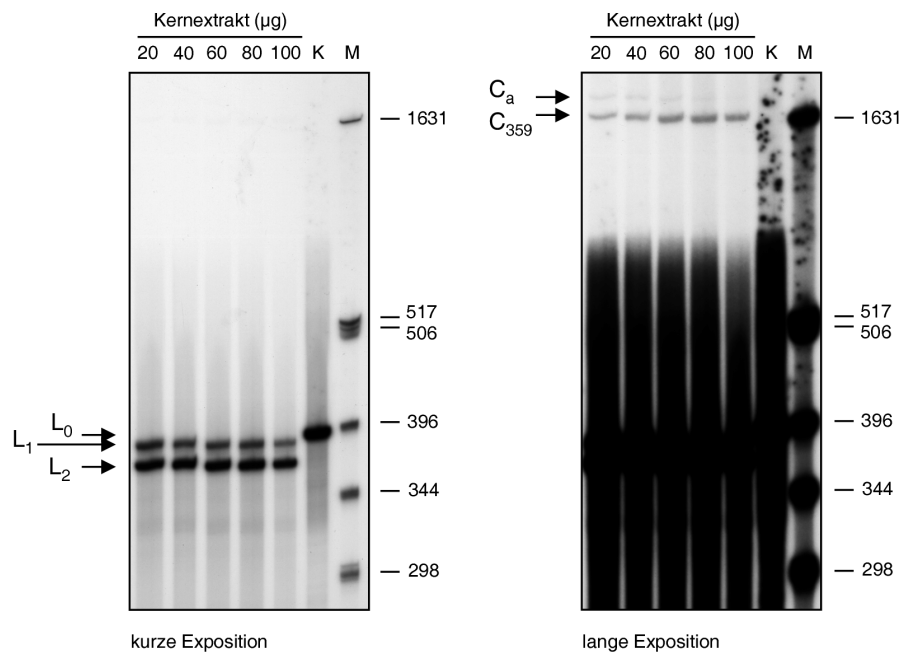


Abbildung 7: Proteinkonzentrationsabhängigkeit der Prozessierung. Radioaktiv markiertes, auf ExM^{TL}-Struktur eingestelltes Transkript TB110 wurde bei 30 °C für 60 min mit den angegebenen Kernextraktkonzentrationen aus PSTVd-infizierten *S. demissum*-Kulturen inkubiert. Je Reaktionsansatz wurde $1,1 \times 10^5$ cpm Transkript eingesetzt. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt und durch Exposition gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. In jeder Spur wurden $3,0 \times 10^4$ cpm Prozessierungsprodukte aufgetragen. Kurze Expositionen: 27 h ohne Verstärkerfolie. Lange Expositionen: 3 d mit zwei Verstärkerfolien. Als Kontrolle (K) wurde Transkript-RNA aufgetragen, die mit Puffer inkubiert wurde. Das eingesetzte Transkript TB110 voller Länge (L₀), 3'-geschnittene Lineare (L₁), monomere Lineare (L₂) und zirkuläres Produkt monomerer (C₃₅₉) und aberranter Länge (C_a) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *Hinf*I-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben.

In der Northernanalyse wurden identische Konzentrationen Gesamt-RNA infizierter und nicht-infizierter Kartoffelzellkulturen und Tomatenblätter eingesetzt. Mit der MRP51-Sonde konnten nur bei Kartoffel, nicht jedoch bei Tomatenpflanzen deutliche MRP-RNA spezifische Signale nachgewiesen werden (Abb. 8). Auch mit dieser Sonde konnte im Vergleich zur nicht-infizierten *S. tuberosum*-Kultur eine Reduktion der MRP-RNA in PSTVd-infizierten *S. demissum*-Zellen gezeigt werden. Im entsprechenden Längenbereich waren bei Tomate (*Solanum lycopersicum*, Handelssorte Rutgers) jedoch nur sehr schwache Signale in Form von Doppelbanden nachweisbar. Auch bei Hybridisierungen unter weniger stringenten Bedingungen konnte kein deutlicheres Ergebnis erzielt werden. Ein Vergleich der stärksten Signale in den Spuren mit 20 µg Gesamt-RNA aus gesunden und infizierten Tomaten zeigte keine signifikanten Intensitätsunterschiede, die auf eine viroidspezifische Reduktion der RNase MRP-RNA-Menge in den Zellen hinweisen würden. Dieses Ergebnis legte die Vermutung nahe, daß auch die Signalunterschiede bei Kartoffel nicht in der PSTVd-Infektion begründet sind, sondern eher auf einem prinzipiellen Unterschied der MRP-RNA-Mengen in den beiden Kulturen beruhte.

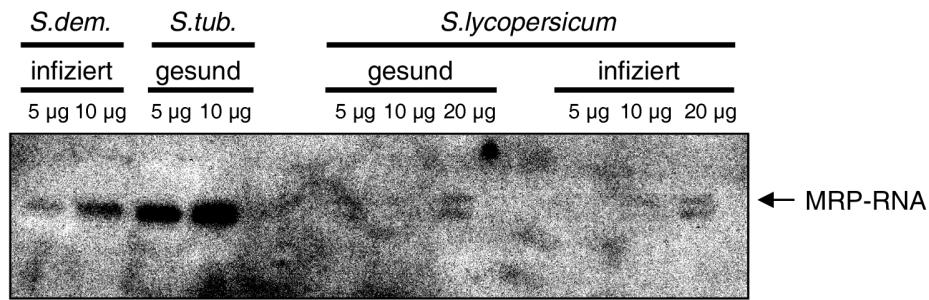


Abbildung 8: RNase MRP-RNA in gesunden und PSTVd-infizierten Pflanzen. Für die MRP-RNA spezifische Northernanalyse wurden die jeweils angegebenen Konzentrationen Gesamt-RNA aus nicht-infizierten *S. tuberosum*- und PSTVd-infizierten (RG1) *S. demissum*-Suspensionskulturen oder Tomatenblättern (*S. lycopersicum*) in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt und auf Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierungen erfolgten mit radioaktiv markierter MRP51-Sonde und die Signale wurden durch Exposition für 7d gegen Kodak-Xomat-AR Röntgenfilm sichtbar gemacht. Für eine besserer Darstellung der schwachen Signale bei Tomate, wurde dieser Röntgenfilm mit einem hohen Kontrast eingelesen und abgebildet.

2.3 Untersuchungen zur Beteiligung der RNase MRP an der Prozessierung

Puromycin ist ein Analogon des tRNA-CCA-Endes, das die Proteinbiosynthese hemmt und die Endoribonukleasen RNase P und RNase MRP inhibiert. Es konkurriert mit der tRNA um die Bindestelle der RNase P. Der Inhibitionsmechanismus der RNase MRP ist jedoch unklar. Da die RNA-Komponenten dieser beiden Ribonukleasen in ähnliche Strukturen falten und sie beide durch Puromycin hemmbar sind, wird ein ähnlicher Substraterkennungsmechanismus angenommen (Potuschak *et al.*, 1993). Eine Beteiligung der RNase MRP an der PSTVd-Prozessierung wurde diskutiert (vgl. Kap. 1.9) und ein erster experimenteller Hinweis ergab sich aus der Hemmung der *in vitro*-Prozessierung des mehr-als-Einheitslängen-Transkripts TB110 in Kernextrakten aus *S. tuberosum* durch Puromycin (Baumstark, persönliche Mitteilung). Um den Einfluß der Hemmung der RNase MRP auf die Viroidprozessierung näher zu untersuchen, wurden Prozessierungsreaktionen bei verschiedenen Puromycinkonzentrationen mit Kernextrakt aus PSTVd-infizierten *S. demissum*-Zellkulturen durchgeführt. In der Prozessierung mit dem Transkript TB110 als Substrat zeigte sich bei zunehmenden Puromycinkonzentrationen eine Abnahme an linearem L₂ und Zirkeln (Abb. 9). Eine deutliche Reduktion von L₂ zeigte sich ab 10 mM und eine Abnahme der Zirkel im Bereich von 2 bis 6 mM Puromycin.

Für die gelelektrophoretische Analyse der Prozessierungsprodukte wurden von jedem Reaktionsansatz gleiche Mengen Radioaktivität eingesetzt. Bei einer Hemmung der Prozessierung wäre bei geringen Puromycinkonzentrationen wenig L₀ und viel L₂ zu erwarten. Bei höheren Konzentrationen sollte sich das Verhältnis zu mehr L₀ und weniger L₂ verschieben. Entgegen diesen Überlegungen fand jedoch mit steigenden Puromycinkonzentrationen eine Abnahme der Intensitäten von L₂ und C₃₅₉ statt und die Intensität von L₀ blieb etwa konstant (Abb. 9). Die pro Spur eingesetzte gleiche Radioaktivitätsmenge verteilte sich nicht nur auf L₀, L₂ und C₃₅₉, sondern auch auf unspezifische Abbauprodukte. L₁ wurden bei den dargestellten Prozessierungsreaktionen nicht in einer nachweisbaren Menge gebildet. Die zunehmende Reduktion der Produkte L₂ und C₃₅₉ mit steigenden

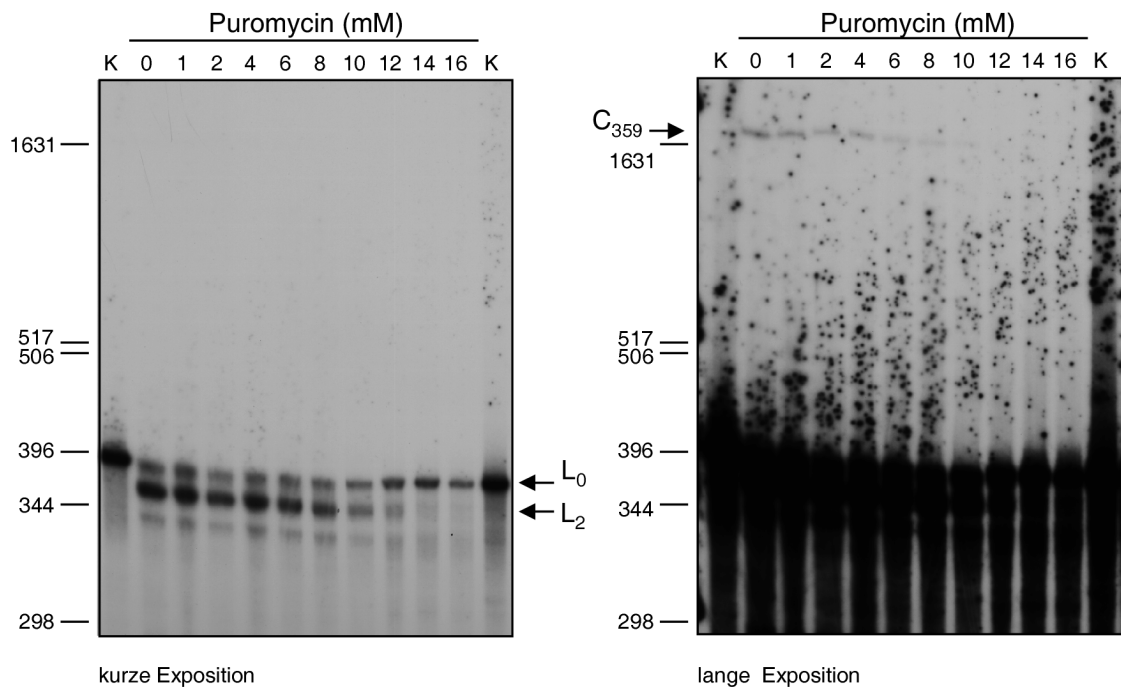


Abbildung 9: Puromycinkonzentrationsabhängigkeit der Prozessierung. Radioaktiv markiertes, auf ExM^{TL}-Struktur eingestelltes Transkript TB110 wurde bei 30 °C für 60 min im Kernextrakt aus *S. demissum*-Suspensionskulturen mit zunehmender Puromycinkonzentration inkubiert. Je Reaktionsansatz wurden 50 µg Protein und 1,5 × 10⁵ cpm Transkript verwendet. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt und durch Exposition gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. In jeder Spur wurden 3,5 × 10⁴ cpm Prozessierungsprodukte aufgetragen. Kurze Exposition: 24 h, ohne Verstärkerfolie. Lange Exposition: 6 d mit Verstärkerfolie. Als Kontrolle (K) wurde Transkript-RNA aufgetragen, die mit Puffer inkubiert wurde. Das eingesetzte Transkript TB110 voller Länge (L₀), monomere Lineare (L₂) und zirkuläres Produkt monomerer Länge (C₃₅₉) sind gekennzeichnet. Die Positionen der *Hinf*I Restriktionsfragmente von pBR322 sind in Basen angegeben.

Puromycinkonzentrationen könnten aufgrund dieser Beobachtung alleine durch unspezifische Hydrolyse des Ausgangstranskripts und seiner Produkte bedingt sein und weniger auf einer Hemmung der Prozessierung durch Puromycin beruhen.

Zur Kontrolle der Vermutung einer unspezifischen Hydrolyse durch die Zugabe von Puromycin wurde Transkript TB110 ohne Kernextrakt unter Prozessierungsbedingungen mit steigenden Puromycinkonzentrationen inkubiert. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Transkriptmengen mit steigenden Puromycinkonzentrationen (Abb. 10), sodaß die als Hemmung der Prozessierung gedeutete Abnahme von Prozessierungsprodukten eher auf eine unspezifische Hydrolyse von RNA durch zugegebenes Puromycin zurückzuführen ist. Diese experimentell beobachtete Hydrolyse durch die Zugabe von Puromycin kann jedoch zur Zeit nicht erklärt werden. Es konnte keine spezifische Hemmung der *in vitro*-Prozessierung des Transkripts TB110 durch Puromycin gezeigt werden und die Hinweise auf eine Beteiligung der RNase MRP an der Prozessierung konnten nicht bestätigt werden.

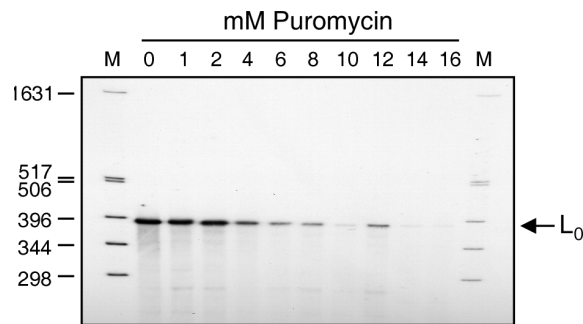


Abbildung 10: Hydrolyse von Transkript-RNA durch Puromycin. Radioaktiv markiertes, auf ExM^{TL}-Struktur eingestelltes Transkript TB110 wurde bei 30 °C für 60 min in Prozessierungspuffer mit den angegebenen Puromycinkonzentrationen inkubiert. Die Produkte der Reaktionen wurden in einer denaturierenden 5 % PAGE getrennt und durch 24 h Exposition gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. Das eingesetzte Transkript TB110 voller Länge (L₀) ist gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *Hinf*I-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben.

2.4 Charakterisierung der Prozessierungsaktivität

Die Etablierung eines prozessierungsaktiven Kernextrakts aus PSTVd-infizierten *S. demissum*-Kulturen und die Experimente zur Hemmung der Prozessierung durch Puromycin erfolgten im Anschluß und im Vergleich zu vorausgegangenen Arbeiten mit dem mehr-als-Einheitslängen Transkript TB110. Für die folgende Charakterisierung der Prozessierungsaktivität war zunächst zu überlegen, ob TB110 auch hier als geeignetes Modellsubstrat verwendet werden sollte oder ob andere Transkripte besser geeignet waren (vgl. Kap. 2.4.1).

Für die Charakterisierung des oder der prozessierungsaktiven Enzyme wurde Kernprotein aus PSTVd infizierten *S. demissum*-Suspensionskulturen verwendet, bei dem sich die Unterschiede der Prozessierungsaktivität von Präparation zu Präparation als gering erwiesen hatten (vgl. Kap. 2.1). Für chromatographische Trennverfahren wurde Proteinextrakt ähnlich zu den für Prozessierungsreaktionen bisher verwendeten Kernextrakten präpariert. Die abschließende Aufkonzentrierung der Proteine durch eine Ammoniumsulfatfällung mit anschließender Dialyse wurde hierfür nicht durchgeführt und die Kernextraktpräparation endete mit einem klaren Proteinüberstand nach der 154000 g Zentrifugation. Dieser hatte eine Proteinkonzentration von 1,0-1,2 mg/ml. Eine für chromatographische Trennverfahren verwendete Extraktpräparation aus 0,8-1 x 10⁸ Kernen enthielt 25-30 mg Protein, 1,7-2 mg Nukleinsäure und lag im Okita Extraktionspuffer mit 600 mM Kaliumchlorid (KCl) und einem pH-Wert von 7,9 vor.

Von diesem Extrakt ausgehend, wurden Proteine mittels chromatographischer Trennverfahren fraktioniert, auf Prozessierungsaktivität getestet und die zu untersuchende Aktivität angereichert. Für Chromatographien eingesetzte Puffer waren an den Kernextraktionspuffer OE angelehnt, der bei der Präparation von prozessierungsaktiven Kernextrakt verwendet wurde. Sie bestanden aus 60 mM HEPES (pH7,9), 0,12 mM EDTA, 0,84 mM Magnesiumacetat (MgOAc) und mindestens 40 mM KCl. Zur Stabilisierung der Proteine während der Reinigungsschritte war diesen Puffern 10 % Glycerin zugesetzt.

Die in der Kernpräparation und -extraktion verwendeten Puffer enthielten neben MgOAc Salze in Form von KCl oder Kaliumacetat (KOAc). Insbesondere erfolgte die

Proteinextraktion aus den Kernen im Extraktionspuffer unter Hochsalzbedingungen von 600 mM KCl. Dieses Salz erschien deshalb geeignet, um in der Chromatographie verwendet zu werden. Die eingesetzten KCl-Konzentrationen wurden an die jeweilige Anwendung angepaßt. Die im folgenden verwendeten Bezeichnungen der Chromatographiepuffer beinhalten die jeweilige KCl-Konzentration und zur Abgrenzung vom eigentlichen Extraktionspuffer die Prozentigkeit an Glycerin. Zum Beispiel hatte der Chromatographiepuffer OE150/10 eine KCl-Konzentration von 150 mM und enthielt 10 % Glycerin.

Diese Pufferbedingungen erwiesen sich als geeignet, um die zu untersuchende Prozessierungsaktivität während chromatographischer Reinigungsverfahren ausreichend stabil zu halten, sodaß ein Nachweis von Aktivität möglich war. Standardprozessierungsreaktionen werden zudem auch in HEPES-Puffer bei pH 7,9 durchgeführt. Für Aktivitätstests mußten dem Reaktionsansatz bis zu 40 Volumenprozent Proteinlösung zugegeben werden und bei den verwendeten OE-Chromatographiepuffern konnten Aliquots von Proteinlösungen nach Reinigungsschritten direkt im Prozessierungsaktivitätstest eingesetzt werden ohne daß ein Pufferwechsel notwendig wurde.

Alle präparativen Schritte zur Herstellung des Gesamtkernextrakts wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Chromatographien erfolgten dagegen bei Raumtemperatur mit einer HPLC-Anlage ohne Druck oder bei Niedrigdruck. Die bei Gradientenelutionen angegebenen KCl-Konzentrationen sind aus den eingestellten Mischverhältnissen des verwendeten Hoch- und Niedrigsalzpuffers und dem Totvolumen der jeweils verwendeten Chromatographiesäule abgeschätzt. Die Wahl des analytischen Ansatzes für den Aktivitätstest, die verwendeten Proteintrennverfahren und deren Ergebnisse sind im folgenden beschrieben.

2.4.1 TB110 als Substrat für Prozessierungsaktivitätstests

Als Substrat für Prozessierungsaktivitätstests kam zum Einen das mehr-als-Einheitslängen-Transkript TB110 in Frage. Seine strukturellen Voraussetzung, um als Substrat erkannt zu werden und die Einstellung dieser Strukturen *in vitro* sind gut untersucht (vgl. Kap. 1.7). Zum Anderen war auch die Nutzung eines mehr-als-Dimeren-(TB210) oder -Trimeren-Transkripts (TB310) zu überlegen. Diese Transkripte enthalten neben den Duplikationen im Bereich der UCCR, anstelle von einer PSTVd-Einheit bei TB110, zwei (TB210) oder drei (TB310) Einheiten von 359 Nukleotiden. Insbesondere TB310 repräsentiert die während der Transkription *in vivo* gebildeten oligomeren (+)-Replikationsintermediate besser als TB110, daß nur am 5'-Ende eine Duplikation besitzt. Auch diese längeren Transkripte werden nach *in vitro*-Struktureinstellung durch Denaturierung und schnelle Renaturierung im Kernextrakt zu Monomeren prozessiert (Baumstark (1997), TB310: Abb. 11). Sie entstehen jedoch mit geringer Ausbeute. Daneben werden, insbesondere bei TB310, auch verschiedenste lineare Nebenprodukte unterschiedlicher Längen gebildet, die die eindeutige Zuordnung der Schnittprodukte zu möglichen Schnittreaktionen nicht zulassen. Bei der Prozessierung von TB210 können in der denaturierenden PAGE monomere Zirkel nachgewiesen werden. Bei TB310 jedoch nicht, da sie in den Bereich des unprozessierten Vollängen-Transkripts verzögert werden und von diesem in der Exposition überstrahlt werden.

Nach dem in Kap. 1.7.4 beschriebenen Modell wird die *in vitro*-Prozessierung des mehr-als-Einheitslängen-Transkripts TB110 zu Monomeren und Zirkel durch einen spezifischen 5'-Schnitt eingeleitet. Bei Oligomeren ist dieser 5'-Schnitt auch gleichzeitig ein 3'-Schnitt der nächsten monomeren Einheit und die Prozessierung von TB110 gilt als Modell für die *in vivo*-Prozessierung von oligomeren Replikationsintermediaten (Baumstark *et al.*, 1997).

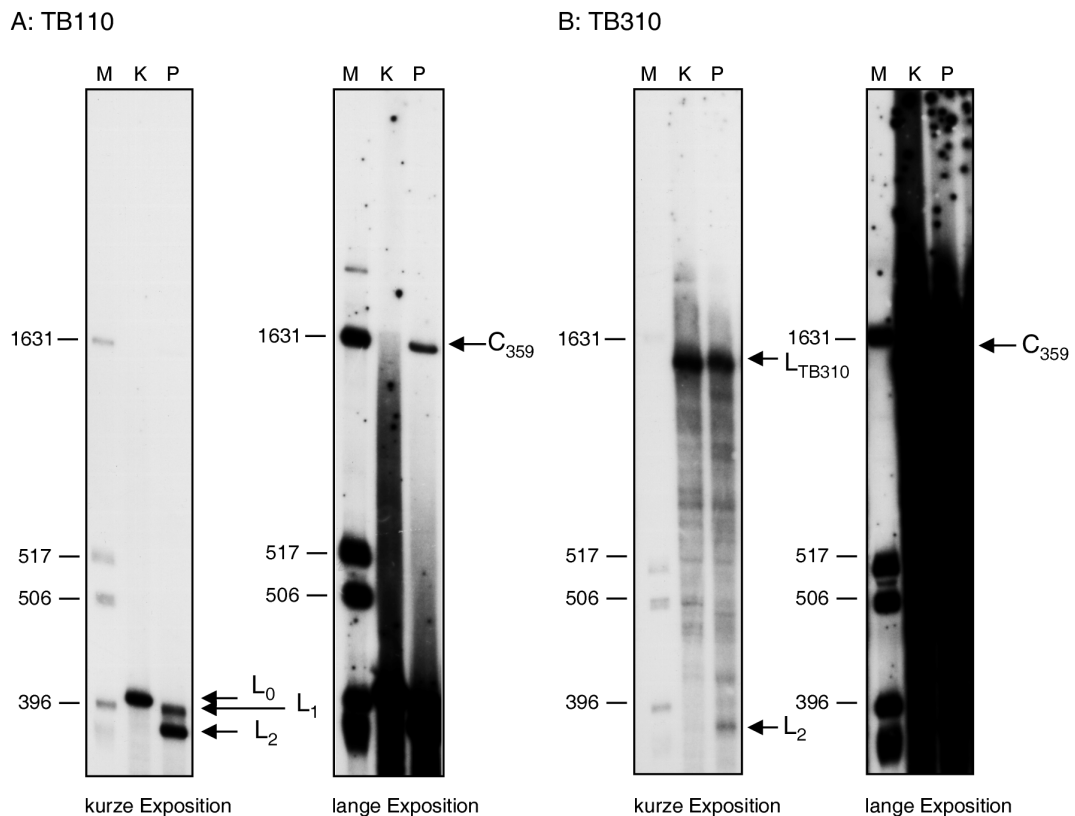


Abbildung 11: *In vitro*-Prozessierung oligomerer PSTVd Transkripte. Radioaktiv markiertes, durch Denaturierung und schnelle Renaturierung in Niedrigsalz strukturiertes Transkript TB110 (ExM^{TL}) und TB310 wurde bei $30^{\circ}C$ für 60 min in $50 \mu g$ Kernextrakt aus *S. demissum*-Kulturen inkubiert. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt und durch Exposition gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. In jeder Spur wurden 9×10^4 cpm Prozessierungsprodukte aufgetragen. Kurze Expositionen: 14 h, ohne Verstärkerfolie. Lange Expositionen: 5 d mit Verstärkerfolie. Als Kontrolle (K) wurde Transkript-RNA aufgetragen, die mit Puffer inkubiert wurde. Das eingesetzte mehr-als-Einheitslängen-Transkript TB110 als Substrat voller Länge (L_0), das mehr-als-Trimeren-Transkript TB310 als Substrat voller Länge (L_{TB310}), 3'-geschnittene Lineare (L_1), monomere Lineare (L_2) und zirkuläres Produkt monomerer Länge (C_{359}) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *HinfI*-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben. Die abgebildeten Spuren von TB110 und TB310 sind Ausschnitte der gleichen PAGE.

In vitro entstehen im Kernextrakt nur zwei definierte Schnittprodukte L_1 und L_2 , denen aufgrund ihrer Länge der spezifische 3'-Schnitt oder beide spezifischen 3'- und 5'-Schnitte zugeordnet werden können. Andere, unerwartete Schnittaktivitäten könnten anhand von anderen Produktlängen identifiziert werden. Der Nachweis der Prozessierungsprodukte erfolgt in Form einer denaturierenden gelelektrophoretischen Trennung, bei dem die verschiedenen linearen Produkte aufgrund ihrer Länge und die zirkulären Produkte aufgrund ihrer starken Verzögerung gegenüber den Linearen nachgewiesen werden können. Das System basiert auf radioaktiv markierten Transkripten und ist deshalb für einen direkten Nachweis verschieden langer Produkte in der PAGE möglichst sensitiv. Um die mit gerin-

ger Ausbeute entstehenden Zirkel zu sehen, ist im Gegensatz zu den linearen Produkten eine zehn- bis zwanzigfache Expositionszeit erforderlich. Es kann jedoch nur Aktivität nachgewiesen werden, wenn Substrat im Prozentbereich umgesetzt wurde, was für einen Aktivitätstest im Rahmen von Proteinreinigung relativ unsensitiv ist. Die gelelektrophoretische Trennung der Prozessierungsprodukte ist die einzige Möglichkeit gleichzeitig verschiedene Schnitt- und Ligationsprodukte und auch nicht umgesetztes Transkripts substrat nachzuweisen. Das mehr-als-Einheitslängen-Transkript TB110 war aufgrund seiner wenigen, definierten Prozessierungsprodukte am besten geeignet, um als Substrat für Aktivitätstests verwendet zu werden und die Anreicherung der prozessierungsspezifischen Spaltungs- und Ligationsaktivitäten zu verfolgen.

Experimente zur Zeitabhängigkeit der Prozessierung (vgl. Kap. 2.1) zeigten eine gute Nachweisbarkeit der gebildeten Produkte bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten. Längere Reaktionszeiten führten in der Regel nicht zu einer weiteren Akkumulation von Produkten. Zum Einen werden spezifische Produkte durch unspezifische RNasen zunehmend hydrolysiert. Zum Anderen kommt es zu einer Umlagerung von der prozessierungsaktiven ExM^{TL}-Struktur in die nicht-aktive ExL (Baumstark, 1997). Für die im folgenden beschriebenen Standardprozessierungsaktivitätstests wurde deshalb eine Inkubationszeit von 60 min gewählt. Sie wurden in dem von Baumstark & Riesner (1995) beschriebenen Puffer- und Reaktionsbedingungen bei 8 mM MgCl₂ und 30 °C durchgeführt (vgl. Kap. 5.4.5), bei denen vor dem Hintergrund der unspezifischen Degradation eine optimale Produktbildung erzielt werden kann.

2.4.2 Abhängigkeit der Prozessierung von der Kaliumchloridkonzentration

Bei verschiedenen chromatographischen Verfahren wird an das Säulenmaterial gebundenes Protein durch die Erhöhung der Gegenionen-, d.h. der Salzkonzentration eluiert. Bei den im folgenden beschriebenen Chromatographien zur Fraktionierung und Anreicherung von Prozessierungsaktivität sollte aus den zuvor beschriebenen Gründen (vgl. Kap. 2.4) KCl verwendet werden. Die KCl-Konzentration im Prozessierungsansatz wird durch die Zugabe des mit KCl eluierten Proteins erhöht. Das im Aktivitätstest als Substrat eingesetzte Transkript TB110 ist jedoch nur prozessierungsaktiv, wenn es unter Niedrigsalzbedingungen durch Denaturierung und schnelle Renaturierung in die ExM^{TL}-Struktur eingestellt wird (vgl. Kap. 1.7.1). Bei 4 °C und niedriger Ionenstärke bleibt diese Konformation stabil. Bei hoher Ionenstärke und erhöhter Temperatur lagert sie sich in die nicht prozessierungsaktive ExL-Struktur um. Standardprozessierungsreaktionen erfolgen deshalb bei niedriger Salzkonzentration. Eine stark beschleunigte Strukturumlagerung in die nicht aktive ExL-Konformation unter erhöhten KCl-Bedingungen im Prozessierungsansatz ist möglich und könnte einen Nachweis von vorhandener Prozessierungsaktivität unmöglich machen.

Um die KCl-Konzentration zu bestimmen, bis zu der ein Aktivitätstest möglich sein sollte, wurde zunächst die Abhängigkeit der Prozessierung von KCl-Konzentrationen untersucht. Die Ergebnisse variierten und waren von der Prozessierungsaktivität der jeweiligen Präparation abhängig. Sie waren von den verwendeten Zellen aus *S.tuberosum*- oder *S.demissum*-Kulturen unabhängig. Bei dem in Abb.12 dargestellten Kernextrakt aus *S.demissum* war das monomere Zwischenprodukt L₂ bei 100 mM KCl reduziert und ab 200 mM nur noch schwach sichtbar. Auch die Zirkel waren bei 100 mM KCl deutlich reduziert und konnten ab 200 mM nicht mehr nachgewiesen werden. Bei prozessierungsaktiveren Kernextrakten aus *S.demissum* oder *S.tuberosum* war eine Reduktion der Spaltungs- und Ligationsaktivitäten erst ab 200 mM KCl zu beobachten. Ein Nachweis

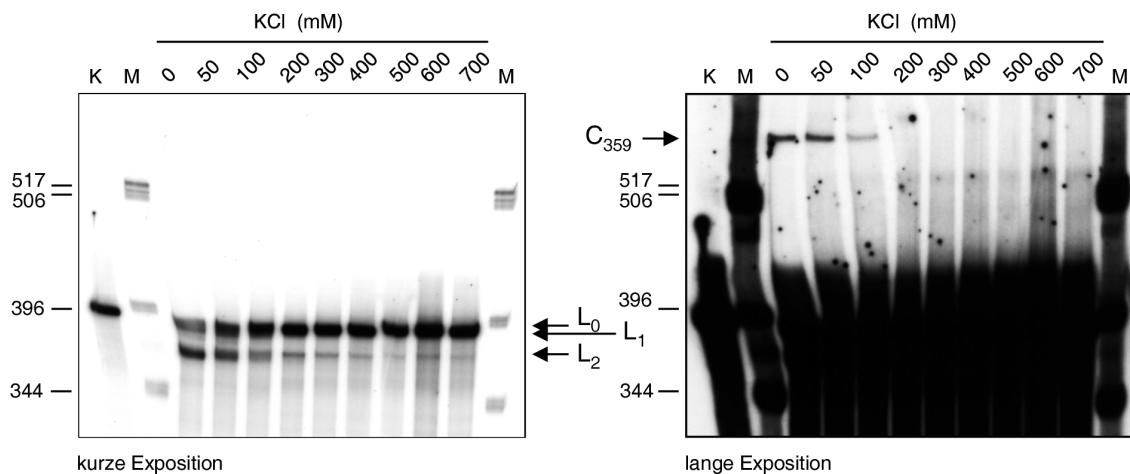


Abbildung 12: Kaliumchloridkonzentrationsabhängigkeit der Prozessierung. Radioaktiv markiertes, auf ExM^{TL} -Struktur eingestelltes Transkript TB110 wurde bei 30°C für 60 min mit den angegebenen KCl-Konzentrationen im Kernextrakt aus PSTVd-infizierten *S. demissum*-Kulturen inkubiert. Je Reaktionsansatz wurden $60\ \mu\text{g}$ Protein und 2×10^5 cpm Transkript eingesetzt. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt und durch Exposition gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. In jeder Spur wurden $4,5 \times 10^4$ cpm Prozessierungsprodukte aufgetragen. Kurze Expositionen: 4,5 h mit Verstärkerfolie. Lange Expositionen: 5 d mit Verstärkerfolie. Als Kontrolle (K) wurde TB110-Transkript-RNA aufgetragen. Das eingesetzte Transkript TB110 voller Länge (L_0), 3'-geschnittene Lineare (L_1), monomere Lineare (L_2) und zirkuläres Produkt monomerer Länge (C_{359}) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *HinfI*-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben. Die im Vergleich zu anderen Abbildungen reduzierte Verzögerung der Zirkel ist im hier ausnahmsweise verwendeten 1 x TBE Laufpuffer begründet.

von Prozessierungsprodukten sollte bei guter Prozessierungsaktivität bis zu 200 mM KCl möglich sein. Um ausreichend Prozessierungsprodukte nachweisen zu können, sollte eine KCl-Konzentration von 100 mM jedoch nicht überschritten werden.

2.4.3 Separation der Ligationsaktivität von Schneideaktivitäten

Der zur Anreicherung von Prozessierungsaktivität verwendete Proteinextrakt hatte einen basischen pH-Wert von 7,9 (vgl. Kap. 2.4). Er liegt oberhalb des isoelektrischen Punkts der meisten Proteine, sodaß diese negative Nettoladungen besaßen. Das Binde- und Elutionsverhalten der Prozessierungsaktivität wurde deshalb zunächst in der Anionenaustauscherchromatographie untersucht.

Für den Nachweis von Prozessierungsaktivität sollte das von der Säule eluierte Protein in einem möglichst kleinen Volumen vorliegen, was ein möglichst kleines Säulenvolumen voraussetzt. Da die im Extrakt vorhandene Nukleinsäure auch an Anionenaustauschermaterial bindet und die Kapazität für Proteinbindung verringert, wurde diese zunächst aus dem Gesamtextrakt entfernt. Der 600 mM KCl Proteinextrakt wurde auf 450 mM KCl verdünnt und über eine mit 450 mM KCl äquilibrierte 5,7 ml Q Sepharose FF-Säule gegeben. Bei diesen Bedingungen war annähernd 100% des Proteins im Durchlauf und 80-90% der Nukleinsäure war gebunden. Die Prozessierungsaktivität verblieb im Durchlauf. Die Proteinlösung wurde auf 40 mM KCl dialysiert und auf die mit 40 mM KCl äquilibrierte

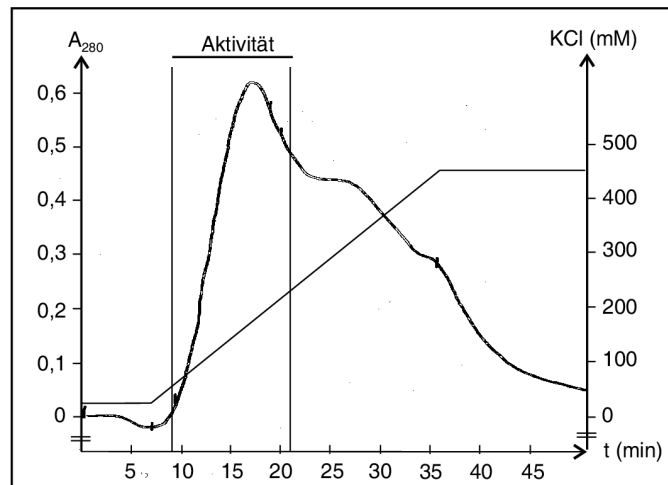


Abbildung 13: Q Sepharose-Anionenaustauscherchromatographie von Nukleinsäure-abgereichertem Kernprotein. Nukleinsäure-abgereichertes Kernprotein (55 mg) wurde bei 40 mM KCl und einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf eine 5,7 ml Q Sepharose FF-Säule aufgetragen. Gebundenes Protein wurde mit einem 30-450 mM KCl-Gradienten bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min und einem Elutionsvolumen von 15 ml eluiert und in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Minutenangaben im Chromatogramm entsprechen den Fraktionsnummern. Der verwendete Nukleinsäure-abgereicherte Kernextrakt wurde präpariert, indem Gesamtkernextrakt präpariert, von 600 auf 450 mM KCl verdünnt und auf eine auf 450 mM KCl äquilibrierte 5,7 ml Q Sepharose FF-Säule aufgetragen wurde. Die im Extrakt vorhandene Nukleinsäure wurde zu 80-90 % gebunden und annähernd 100 % des Proteins war im Durchlauf. Dieser wurde auf 40 mM KCl dialysiert und für die hier abgebildete Chromatographie verwendet. Fraktionen mit Prozessierungsaktivität sind gekennzeichnet (vgl. Abb. 14).

5,7 ml Q Sepharose FF-Säule aufgetragen. 50-60 % des Proteins wurde gebunden und 40-50 % befand sich im Durchlauf. In diesem war keine Prozessierungsaktivität nachweisbar, sodaß die für die Prozessierung verantwortlichen Proteine an das Säulenmaterial gebunden hatten. Die Elution erfolgte durch einen 30-450 mM KCl-Gradienten und Protein wurde fraktioniert gesammelt (Abb. 13).

Prozessierungsaktivitätstests der in Abb. 13 dargestellten Fraktionen zeigten, daß in den Fraktionen 10 bis 19 das eingesetzte Substrat TB110 zu linearen Schnittprodukten L_2 umgesetzt wurde (Abb. 14, kurze Exposition). Auch L_1 konnte in diesen Fraktionen nachgewiesen werden. Es wurde in den Fraktionen 14-17 jedoch nur mit geringer Ausbeute gebildet. Zirkuläre Produkte konnten dagegen in den Fraktionen 18+19 und 20+21 nachgewiesen werden (Abb. 14, lange Exposition), was nicht mit der Bildung von L_2 in den Fraktionen 10-19 korrelierte. In den Fraktionen 10 bis 17 entstand L_2 , aber keine Zirkel und nur in 18+19 wurden L_2 und Zirkel gebildet. In den Fraktionen 20+21 konnten mit etwa gleicher Ausbeute wie in 18+19 Zirkel nachgewiesen werden, obwohl nur eine sehr geringe Akkumulation von L_2 und keine Reduktion von eingesetztem Substrat L_0 nachzuweisen war. In 18+19 dagegen wurde das Substrat L_0 zu L_2 umgesetzt, das in deutlichen Mengen akkumulierte.

In den Fraktionen 10-19 konnte mit dem Auftreten von L_2 5'- und 3'-Schneideaktivität nachgewiesen werden. Die damit korrelierende Bildung von nur 3'-geschnittenem L_1 zeigte auch das Vorhandensein der 3'-Schneideaktivität in diesen Fraktionen. Ligationsaktivität

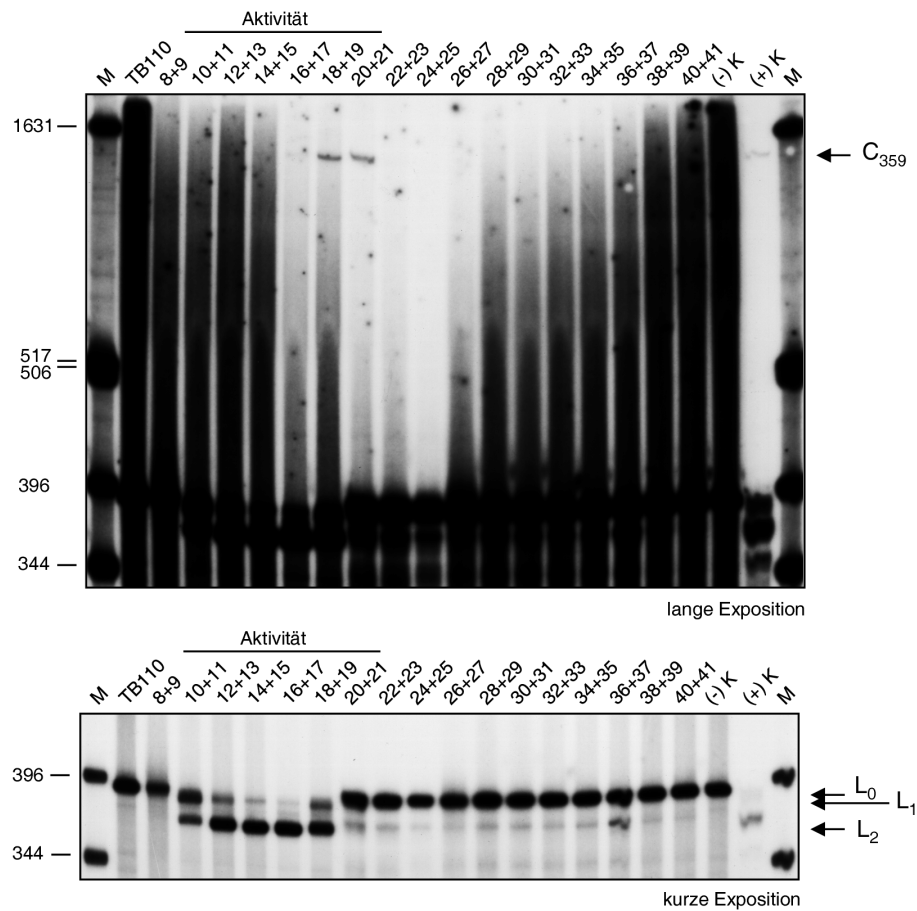


Abbildung 14: Verteilung von Schneide- und Ligationsaktivität nach Q Sepharose-Anionenaustauscherchromatographie. Je zwei in Abb. 13 dargestellte Proteinfraktionen wurden vereinigt und mit radioaktiv markiertem, auf ExM^{TL}-Struktur eingestelltem Transkript TB110 auf Prozessierungsaktivität getestet. Je Reaktionsansatz wurden 20 μ l Proteinlösung der angegebenen Fraktionen und $1,4 \times 10^5$ cpm nicht-geleliertes TB110 eingesetzt und bei 30 °C für 60 min inkubiert. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt und durch Exposition gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. In jeder Spur wurden $2,1 \times 10^4$ cpm Prozessierungsprodukte aufgetragen. Kurze Exposition: 14 h mit Verstärkerfolie. Lange Exposition: 4 d mit Verstärkerfolie. Als Kontrollen wurde Transkript-RNA (TB110), mit Puffer inkubierte Transkript-RNA (-K) und mit Gesamtkernextrakt inkubierte Transkript-RNA (+K) aufgetragen. Das eingesetzte Substrat TB110 (L₀), 3'-geschnittene Lineare (L₁), monomere Lineare (L₂) und zirkuläres Produkt monomerer Länge (C₃₅₉) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *Hinf*I-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben.

konnte dagegen nur in den Fraktionen 18-21 gezeigt werden. Es ist jedoch möglich, daß in den Fraktionen ab 22 aufwärts auch Ligationsaktivität vorhanden war. Sie konnte dann jedoch nicht nachgewiesen werden, da in diesen Fraktionen keine Schneideaktivität vorhanden war und das Substrat L₂ für die Ligation zu Zirkeln nicht gebildet wurde.

Mit dem Anionenaustauscher Q Sepharose FF war es möglich, die zu untersuchende Prozessierungsaktivität um den Faktor 6-8 anzureichern. Unter den verwendeten Bedingungen, wie Säulenmaterial, Säulenvolumen, Elutionsvolumen und -geschwindigkeit war

es möglich die Ligationsaktivität und die Schneideaktivität bei unterschiedlichen KCl-Konzentrationen zu eluieren. Die Schneideaktivität eluierte im Bereich von 60 bis 200 und die Ligationsaktivität im Bereich von 180 bis 220 mM KCl. Die Ligationsaktivität und die Schneideaktivität sind daher unterschiedlichen Enzymen zuzuordnen. Eine reine Selbstligation der L_2 zu Zirkeln kann ausgeschlossen werden, da die Bildung von Zirkeln nicht mit der Bildung von L_2 korrelierte. Die 5'- und 3'-Schneideaktivität trat in gleichen Fraktionen auf, was keine Aussage darüber zuläßt, ob das gleiche oder verschiedene Proteine für diese Aktivitäten verantwortlich sind.

2.4.4 Separation von Ligationsaktivitäten

Bei der in Kap. 2.4.3 beschriebenen Trennung der Ligations- und Schneideaktivität stand zu vermuten, daß in Fraktionen oberhalb von 21 noch Ligationsaktivität vorhanden war. Sie konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, da in diesen Fraktionen das Zwischenprodukt der Zirkularisierung L_2 nicht gebildet wurde. Um die Fraktionen weiter auf Ligationsaktivität zu untersuchen, wurde als Substrat ein PSTVd-Minimal-Transkript eingesetzt, daß 5' mit G_{96} beginnt und 3' mit G_{95} endet (Minimal L_2 , 123 Nt). Es entspricht dem in der Prozessierung durch einen 3'- und einen 5'-Schnitt entstehenden L_2 , das von 5'- G_{96} bis 3'- G_{95} einmal 359 Nt PSTVd-Monomerlänge enthält. Diesem Minimalkonstrukt fehlen im Gegensatz zum mehr-als-Einheitslängen-Transkript TB110 neben den Duplikationen 3'- und 5'-seitig der Schnittstelle zwischen G_{95} und G_{96} auch Sequenzen außerhalb der zentralen konservierten Region. Der linke Bereich des PSTVd ist bis C_{69} / G_{289} und der Rechte bis G_{125} / C_{236} deletiert (vgl. Abb. 1). C_{69} und G_{289} , sowie G_{125} und C_{236} sind jeweils mit einem CUUCGG-Loop verbunden. Das Konstrukt wurde im Rahmen anderer Arbeiten zur Prozessierung von Herrn Schrader hergestellt und zur Verfügung gestellt. Ein sogenanntes wildtyp Minimalkonstrukt (Minimal wt, 145 Nt) ist ein aktives Substrat für die Prozessierung im Kernextrakt. Ihm fehlen ebenso wie Minimal L_2 die rechten und linken Sequenzbereiche der Volllänge. Es besitzt jedoch im Gegensatz zu diesem die gleichen Duplikationen wie TB110. Es enthält die gleichen *in vitro* einstellbaren Sekundärstruktur motive wie die Volllänge TB110 und auch die Strukturumlagerungen nach der 5'-Schneidereaktion sind gleich. Es gilt als Modell für die Prozessierung des mehr-als-Einheitslängen-PSTVd-Transkripts, das die minimalen strukturellen Voraussetzungen für die Erkennung durch Wirtsfaktoren für die Prozessierung besitzt (Schrader, 1996).

Nukleinsäure-abgereichertes Kernprotein wurde durch Q SepharoseFF-Anionenaustauscherchromatographie fraktioniert (vgl. Kap. 2.4.3). Das Chromatogramm entsprach dem in Abb. 13 dargestellten. Es wurden wiederum je zwei Fraktionen vereinigt und zum Einen mit dem Substrat TB110 und zum Anderen mit Minimal L_2 auf Prozessierungsaktivität getestet. In den Fraktionen 11-26 wurde TB110 zu L_2 geschnitten, wobei sich die Hauptaktivität auf 13-22 verteilte (Abb. 15A, kurze Exposition). Zirkel (C_{359}) wurden dagegen in den Fraktionen 21-26 mit größerer und in 15-20 mit sehr geringer Ausbeute gebildet (Abb. 15A, lange Exposition). Dieser drastische Unterschied in der Menge der gebildeten Zirkel, korrelierte nicht mit Unterschieden in der Ausbeute an L_2 oder einer Abnahme an eingesetztem Substrat L_0 . Er kann nicht durch unterschiedliche Mengen L_2 erklärt werden. Die Ligationsaktivität der L_2 zu Zirkeln war auch hier im Vergleich zur Schneideaktivität zu höheren Salzkonzentrationen hin verschoben.

Eine Ligation von Minimal L_2 zu Zirkeln ($C_{Minimal}$) konnte in den Fraktionen 15-22 nachgewiesen werden und korrelierte nicht mit den Fraktionen 21-26 der Hauptligationsaktivität für das Substrat TB110 (Abb. 15B). Dies läßt darauf schließen, daß unterschiedliche

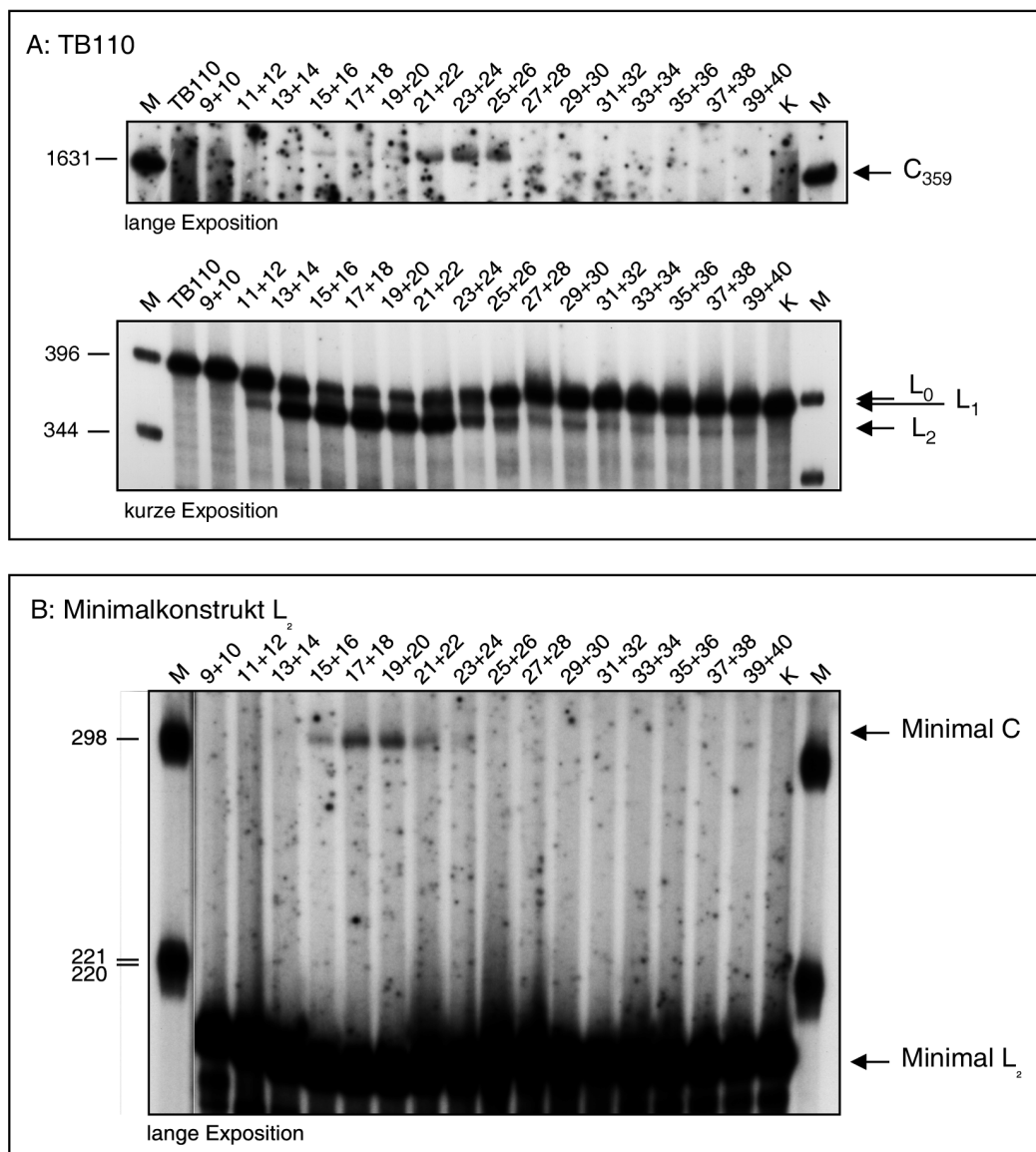


Abbildung 15: Verteilung von Ligationsaktivitäten nach Q Sepharose-Anionenaustauscherchromatographie. Nukleinsäure-abgereichertes Kernprotein (45 mg) wurde mit einer 5,7 ml Q Sepharose-Säule fraktioniert. Das Chromatogramm entsprach dem in Abb. 13 dargestellten. Es zeigte durch die geringere Menge verwendeten Proteins geringere Absorptionen. Es wurden je zwei Proteinfraktionen vereinigt und mit radioaktiv markiertem, auf ExM^{TL}-Struktur eingestelltem Transkripten TB110 und Minimal L₂ auf Prozessierungsaktivität getestet. Je Reaktionsansatz wurden 20 µl Proteinlösung der angegebenen Fraktionen und 1,2 × 10⁵ cpm nicht-geleliertes TB110 (A), bzw. 3,5 × 10⁴ cpm Minimal L₂ (B) eingesetzt und bei 30 °C für 60 min inkubiert. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt und durch Exposition gegen Fujii Film New-RX (A), bzw. Kodak Xomat Röntgenfilm (B) sichtbar gemacht. In jeder Spur wurden 2,5 × 10⁴ cpm (A), bzw. 8,5 × 10³ cpm (B) Prozessierungsprodukte aufgetragen. A: kurze Exposition: 14 h mit Verstärkerfolie, lange Exposition: 4 d mit Verstärkerfolie. B: lange Exposition 8 d mit Verstärkerfolie. Als Kontrollen (K) wurde mit Puffer inkubierte Transkript-RNA (A: TB110, B: Minimal L₂) aufgetragen. Das eingesetzte Transkript TB110 voller Länge (L₀), monomere Lineare (L₂), zirkuläres Produkt mit Einheitslänge (C₃₅₉), sowie Transkript Minimal L₂ voller Länge (L_{Minimal}) und zirkuläres Produkt von Minimal L₂ (C_{Minimal}) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *Hinf*I-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben.

Enzymaktivitäten für die Ligation des Prozessierungsprodukts L_2 und des Transkripts Minimal L_2 verantwortlich sind. In den Fraktionen 15-20 wurde im Vergleich zu 21-26 nur eine sehr geringe Menge an C_{359} -Zirkeln gebildet und es zeigte sich keine Korrelation mit einer unterschiedlichen Akkumulation von L_2 oder einer unterschiedlichen Abnahme von L_0 . Dies weist ebenfalls auf unterschiedliche Ligationsaktivitäten, bzw. Ligationsmechanismen in den Fraktionen 15-20 und 21-26 hin. Bei den Zirkeln in den Fraktionen 15-20 könnte es sich auch um eine Selbstligation handeln, die unter bestimmten Bedingungen und mit sehr geringer Ausbeute für die Prozessierung von monomeren L_2 zu Zirkeln beschrieben ist (Baumstark, 1997). Ein anderer enzymatischer Ligationsmechanismus wäre jedoch genauso möglich. Eine Aussage über eventuell vorhandene Ligationsaktivität für die Bildung von C_{359} aus L_2 in Fraktionen aufwärts von 26 läßt sich auch in diesem Experiment nur vermuten, da in diesen Fraktionen das Substrat der Zirkularisierung L_2 nicht gebildet wurde und Minimal L_2 nicht als Modell für L_2 verwendet werden kann.

Nach den bisherigen Untersuchungen der Prozessierung des Minimal wt-Konstrukts, sollte sich das Fehlen der rechten und linken Bereiche der Volllänge bei dem verkürzten Minimal L_2 -Konstrukt nicht auf die Prozessierung auswirken (Schrader, 1996). Ein anderer Unterschied der beiden Ligationssubstrate liegt darin, daß das Transkript Minimal L_2 5' eine Triphosphatgruppe (5'-pppG₉₆) und 3' eine Hydroxylgruppe (G₉₅OH-3') besitzt. Die Endgruppen von G₉₆ und G₉₅ des durch die 3'- und 5'-Schnittreaktionen entstehenden Prozessierungszwischenprodukts L_2 sind dagegen unbekannt. Die Trennung der beiden Ligationsaktivitäten für L_2 und Minimal L_2 , weist darauf hin, daß L_2 andere chemische Endgruppen besitzt und sich der enzymatische Ligationsmechanismus der Prozessierung von dem der Ligation einer 5'-Triphosphat- und einer 3'-Hydroxylgruppe unterscheidet.

2.4.5 Separation der 5'- von der 3'-Schneideaktivität

Versuche zur Bindung der für Prozessierungsaktivität verantwortlichen Proteine an SP Sepharose-Kationenaustauschermaterial zeigten, daß diese unter Niedrigsalzbedingungen bei pH 7,9 binden. Kernproteinextrakt wurde auf 50 mM KCl dialysiert und bei pH 7,9 auf eine 1 ml SP Sepharose-Säule aufgetragen. Bei diesem für Kationenaustauscherchromatographie basischen pH konnte 10-20% des Gesamtproteins gebunden werden. Der Rest befand sich im Durchlauf, in dem keine Prozessierungsaktivität nachgewiesen werden konnte. Gebundenes Protein wurde mit einem 50-600 mM KCl-Gradienten eluiert (Abb. 16), fraktioniert gesammelt und auf Prozessierungsaktivität getestet (Abb. 17).

In den Fraktionen 11-18 konnte eine Abnahme an Substrat L_0 und eine damit korrelierende Bildung von linearem Schnittprodukt L_3 nachgewiesen werden (Abb. 17, kurze Exposition). Diesem konnte eine Länge zwischen 360 und 370 Nukleotiden zugeordnet werden. In keiner der Fraktionen konnten jedoch Zirkel gezeigt werden (Abb. 17, lange Exposition). Da aus den akkumulierten Linearen L_3 keine Zirkel entstanden und L_3 länger als das 359 Nt lange L_2 war, schien es sich bei den Schnittprodukten nicht um L_2 zu handeln. L_3 war auch deutlich kürzer als 376 Nt langes L_1 . Eine Erklärung wäre, daß es sich um nur 5'-geschnittene Produkte mit einer erwarteten Länge von 364 Nt handelte und diese mit in den Fraktionen vorhandenen Enzymen nicht zu Zirkeln ligiert werden konnten. Die dafür notwendige Ligationsaktivität könnte abgetrennt worden sein oder aber eine Ligation des durch den 5'-Schnitt generierten Endes mit dem ungeschnittenen 3'-Endes des Transkripts war nicht möglich.

Zur Identifikation des Schnittprodukts L_3 wurde auf 50 mM KCl dialysiertes Gesamtprotein wie zuvor beschrieben auf eine 1 ml SP Sepharose-Säule aufgetragen. Die Pro-

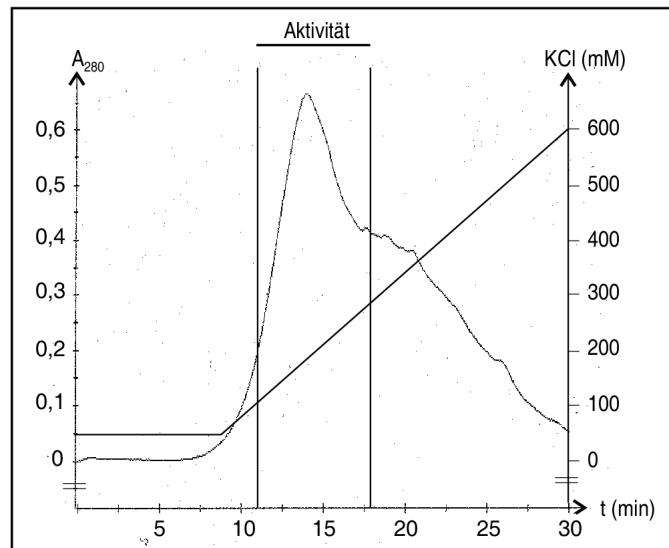


Abbildung 16: SP Sepharose-Kationenaustauscherchromatographie von Gesamtkernprotein. Kernprotein (40 mg) wurde von 600 auf 50 mM KCl dialysiert und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf eine 1 ml SP Sepharose-Säule (SP HiTrap) aufgetragen. Es wurden 10-20 % des Gesamtproteins gebunden, mit einem 50-600 mM KCl-Gradienten bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min mit einem Elutionsvolumen von 10 ml eluiert und in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Minutenangaben im Chromatogramm entsprechen den Fraktionsnummern. Fraktionen mit hauptsächlichster Prozessierungsaktivität sind gekennzeichnet (vgl. Abb. 17).

teine wurden in einem Schritt mit einem KCl-Stoß von etwa 350-390 mM eluiert und auf Prozessierungsaktivität getestet (Abb. 18). Zum Längenvergleich der Produkte in der denaturierenden PAGE wurde TB110 mit Gesamtprotein prozessiert und anstelle von Protein nur mit Puffer inkubiert. Die gelelektrophoretische Trennung der Prozessierungsprodukte zeigte, daß das Schnittprodukt der Prozessierung im SPHiTrap-Eluat (L₃, Spur: SP-Eluat) länger war als das der Inkubation mit Gesamtprotein (L₂, Spur:(+)K). Der Längenunterschied der L₃ zu 359 Nt langen L₂ ist kleiner als der zum 381 Nt langen L₀, sodaß es sich bei L₃ nicht um 376 Nt lange L₁ handeln kann. L₁ war bei dem hier verwendeten, sehr prozessierungsaktiven Gesamtextrakt nicht nachweisbar. Dem durch die Proteine im SP Sepharose-Eluat gebildeten L₃ konnte eine Länge von 362-366 Nt zugeordnet werden. Aufgrund der Längenunterschiede der verschiedenen linearen Produkte zueinander wurde geschlossen, daß es sich bei L₃ um ein nur 5'-geschnittenes Produkt der Prozessierungsreaktion handelt. Dieses im mechanistischen Modell der Viroidprozessierung (vgl. Kap. 1.7.4) vorgeschlagene Zwischenprodukt entsteht durch einen die Prozessierung einleitenden 5'-Schnitt und hat eine Länge von 364 Nt. Es akkumuliert jedoch bei der Prozessierung von TB110 im Gesamtkernextrakt nicht. Auch bei der Prozessierungsreaktion im SP Sepharose 350-390 mM Stoßeluat waren wie bei der graduellen Elution (Abb. 17) keine Zirkel nachweisbar, was die in Kap. 2.4.3 beschriebenen unterschiedlichen Enzymaktivitäten für die Schneide- und Ligationsaktivität bestätigt.

Prozessierungsaktivität konnte bei niedriger Salz- und basischen pH von 7,9 an Kationenaustauschermaterial gebunden werden. Da mehr als 80 % des Proteins bei diesem pH nicht gebunden wurde, konnte mit diesem einen Schritt eine Anreicherung der Aktivität um mindestens den Faktor 5 erreicht werden. Durch eine graduelle Erhöhung der Salzkonzentration

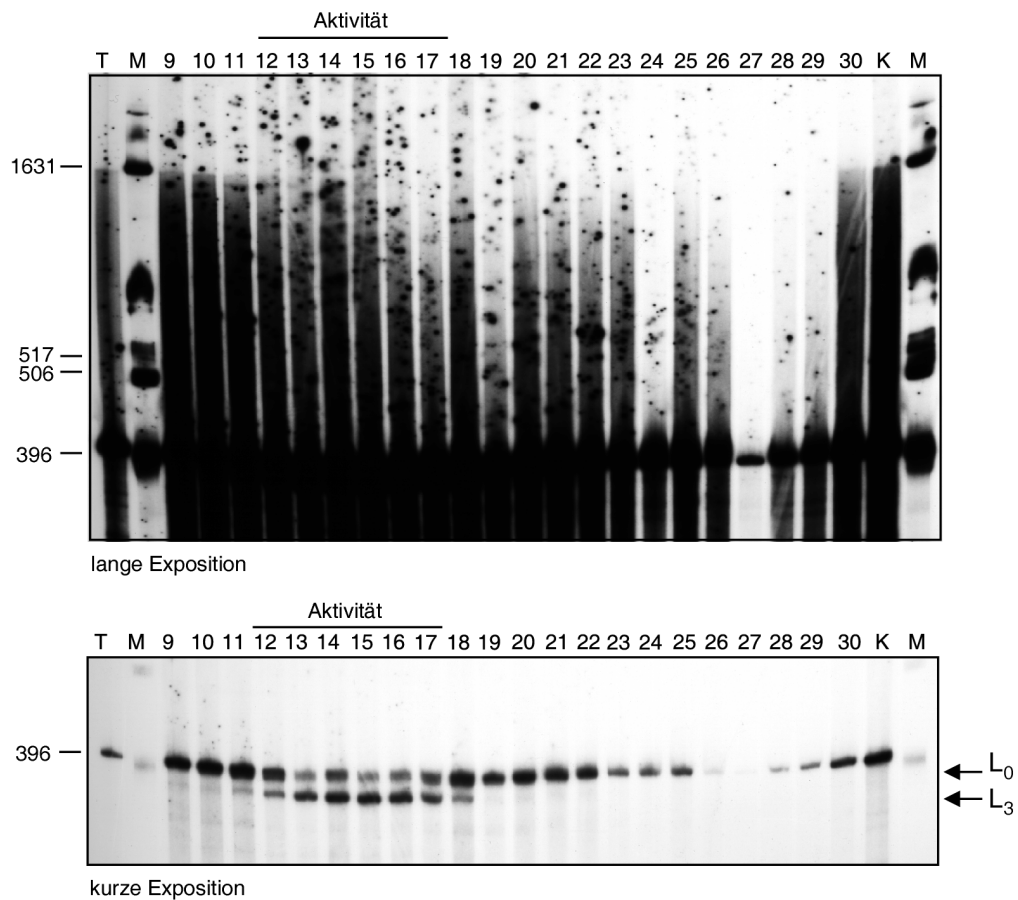


Abbildung 17: Verteilung von 5'- und 3'-Schneideaktivität nach SP Sepharose-Kationenaustauscherchromatographie. Die in Abb. 16 dargestellten Proteinfraktionen wurden mit radioaktiv markiertem, auf ExM^{TL}-Struktur eingestelltem Transkript TB110 auf Prozessierungsaktivität getestet. Je Reaktionsansatz wurden 20 μ l Proteinlösung der angegebenen Fraktionen und $1,7 \times 10^5$ cpm nicht-geluliertes TB110 eingesetzt und bei 30 °C für 60 min inkubiert. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt und durch Exposition gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. In jeder Spur wurden 4 μ l Prozessierungsprodukte aufgetragen. Kurze Exposition: 1 d mit Verstärkerfolie. Lange Exposition: 8 d mit Verstärkerfolie. Als Kontrollen wurde Transkript-RNA (T) und mit Puffer inkubierte Transkript-RNA (K) aufgetragen. Das eingesetzte Substrat TB110 (L₀) und Schnittprodukte einer Länge von 360-370 NT (L₃) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *Hinf*I-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben.

zentration eluierte Schneideaktivität im Bereich von ungefähr 215-410 mM zugegebenes KCl und konnte mit diesem weiteren Reinigungsschritt nochmal um etwa den Faktor 2 angereichert werden. Der Längenvergleich der Prozessierungsprodukte L₀, L₃ und L₂ zeigten, daß es sich bei der angereicherten Schneideaktivität um eine reine 5'-Schneideaktivität handelte. Ihre Separation bewies, daß auch der 3'- und der 5'-Schnitt der Prozessierung durch verschiedenen Enzyme vermittelt wird. Der im Prozessierungsmodell postulierte, einleitende 5'-Schnitt der Prozessierung von TB110 zu Zirkeln wurde mit dem Nachweis von L₃ bestätigt.

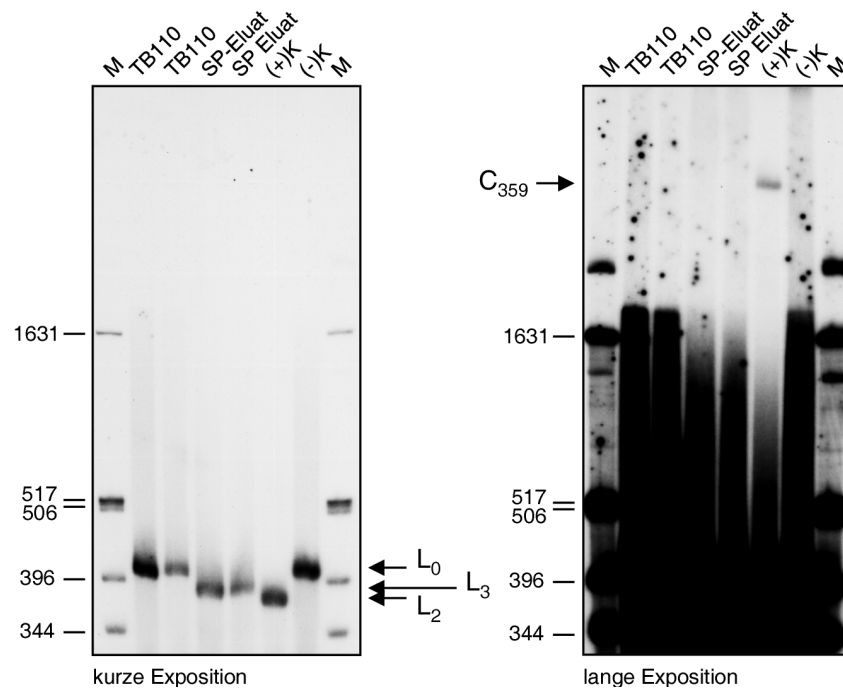


Abbildung 18: Separation von 5'-Schneideaktivität. Kernprotein (48 mg) wurde von 600 auf 50 mM KCl dialysiert und auf eine 1 ml SP Sepharose-Säule (SP HiTrap) aufgetragen. Die 10-20 % gebundenen Proteins wurden mit einem KCl-Stoß von 350-390 mM eluiert. Dieses SP Sepharose-Eluat und Gesamtproteinextrakt wurden mit radioaktiv markiertem, auf ExM^{TL}-Struktur eingestelltem Transkript TB110 auf Prozessierungsaktivität getestet. Je Reaktionsansatz wurden 20 μ l Proteinlösung und $1,2 \times 10^5$ cpm nicht-geeluiertes TB110 eingesetzt und bei 30 °C für 60 min inkubiert. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 7% PAGE getrennt und durch Exposition gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. In jeder Spur wurden $3,7 \times 10^4$ cpm Prozessierungsprodukte aufgetragen. Kurze Exposition: 1 h mit Verstärkerfolie. Lange Exposition: 2 d mit Verstärkerfolie. Als Kontrollen wurde Transkript-RNA (TB110), mit Puffer inkubierte Transkript-RNA (-K) und mit Gesamtkernextrakt prozessierte Transkript-RNA (+K) aufgetragen. Das eingesetzte Substrat TB110 voller Länge (L₀), 3' und 5' geschnittene, monomere Lineare (L₂), 5' geschnittene Lineare (L₃) und zirkuläres Produkt mit Einheitslänge (C₃₅₉) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *Hinf*I-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben.

2.4.6 Experimente zur Rekonstitution von Aktivität

Chromatographische Reinigungen von prozessierungsaktivem Protein führten häufig zu starkem oder vollständigem Aktivitätsverlust, was auf die Abtrennung von für die Aktivität notwendigen Proteinuntereinheiten hindeuten könnte. Zudem zeigten die bisherigen Ergebnisse, daß unterschiedliche Enzyme für die Ligation-, die 5'- und die 3'-Schneideaktivität verantwortlich sind. Diese Aktivitäten könnten von unterschiedlichen einzelnen Enzymen oder von Enzymkomplexen mit mehreren, funktionellen Untereinheiten verursacht werden, die durch chromatographische Verfahren voneinander getrennt werden könnten. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde Gesamtprotein mittels Anionen- und Kationenaustauscherchromatographie fraktioniert. Jede Einzelfraktion und vereinigte Fraktionen, die möglicherweise getrennte Untereinheiten wieder zusammenführen sollten, wurden auf Prozessierungsaktivität getestet.

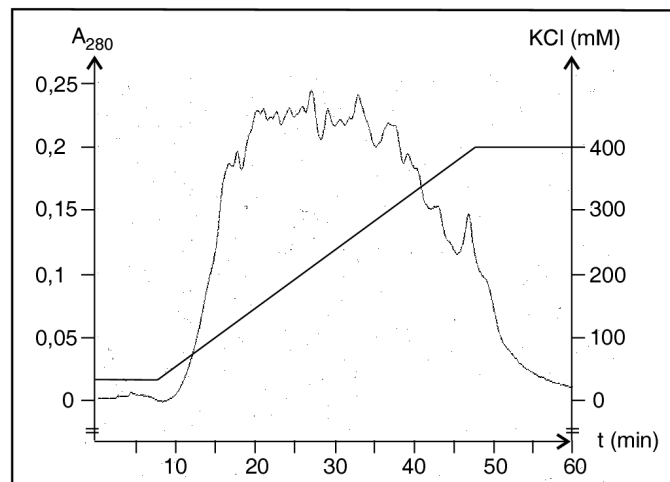


Abbildung 19: MonoQ-Anionenaustauscherchromatographie von Nukleinsäure-abgereichertem Kernprotein. Nukleinsäure-abgereichertes Kernprotein (30 mg) wurde bei 30 mM KCl auf eine 1 ml MonoQ-Säule aufgetragen. Gebundenes Protein wurde mit einem 30-400 mM KCl-Gradienten bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min mit 20 ml Elutionsvolumen eluiert und in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. Die Minutenangaben im Chromatogramm entsprechen den Fraktionsnummern. Fraktionen mit Aktivität sind gekennzeichnet (vgl. Abb. 20).

Zunächst wurde wie in Kap. 2.4.3 beschrieben, Nukleinsäure-abgereichertes Kernprotein präpariert. Nach der Dialyse auf 30 mM KCl wurde die Proteinlösung auf eine 1 ml Mono Q-Anionenaustauschersäule aufgetragen, mit einem 30-400 mM KCl-Gradienten eluiert und fraktioniert gesammelt (Abb. 19). Für Prozessierungsaktivitätstests wurden je zwei aufeinanderfolgende Fraktionen vereinigt (Abb. 20A). Lineare L_2 ließen sich ab Fraktion 10+11 nachweisen. Die Hauptschneideaktivität verteilte sich auf die Fraktionen 14-21 und nahm dann mit höheren Salzkonzentrationen bis Fraktion 32+33 langsam ab, wobei Reste von L_2 bis in Fraktion 44+45 nachzuweisen waren. Es fand nur eine geringe Reduktion des eingesetzten Substrats statt, was auf eine eher geringe Aktivität in den Fraktionen zurückzuführen war. Zirkuläre Produkte konnten in den Fraktionen 14-21 gezeigt werden. Das Auftreten der Ligationsaktivität korrelierte hier mit den Fraktionen der stärksten Akkumulation von L_2 . Um durch die Chromatographie eventuell voneinander getrennte Untereinheiten zu rekonstituieren, wurden je vier Fraktionen vereinigt und jede Viererfraktion mit jeder anderen Viererfraktion zusammengegeben und nach einer 20 minütigen Inkubation auf Aktivität getestet (Abb. 20B). So wurden z.B. die Fraktionen 16-19 (D) vereinigt und mit jeder anderen Viererfraktion A-K zusammen auf Aktivität getestet.

In allen Kombinationen von vereinigten Fraktionen konnten nur dann Schnitt- (L_2) oder Ligationsprodukte (C_{359}) nachgewiesen werden, wenn diese auch in den darin enthaltenen Einzelfraktionen gebildet wurden. Die Hauptschneideaktivität in den Fraktionen 14-21 verteilte sich auf die vereinigten Fraktionen C,D und E. Dementsprechend wurde die größte Ausbeute an L_2 in den Kombinationen nachgewiesen, die C,D oder E enthielten (z.B.: AC, BD, oder DG). Die Schneideaktivität eluierte mit abnehmender Aktivität sehr breit bis in die Fraktionen 44+45 und geringe Ausbeuten an L_2 konnten in allen Kombinationen nachgewiesen werden, die Fraktionen mit geringer Aktivität enthielten. Zum Beispiel wurde in BI, BK, HI, oder HK eine geringe Menge an L_2 gebildet. Dagegen konnte in den Kombinationen wie AA oder AB, die nur aus Fraktionen ohne Schneideaktivität

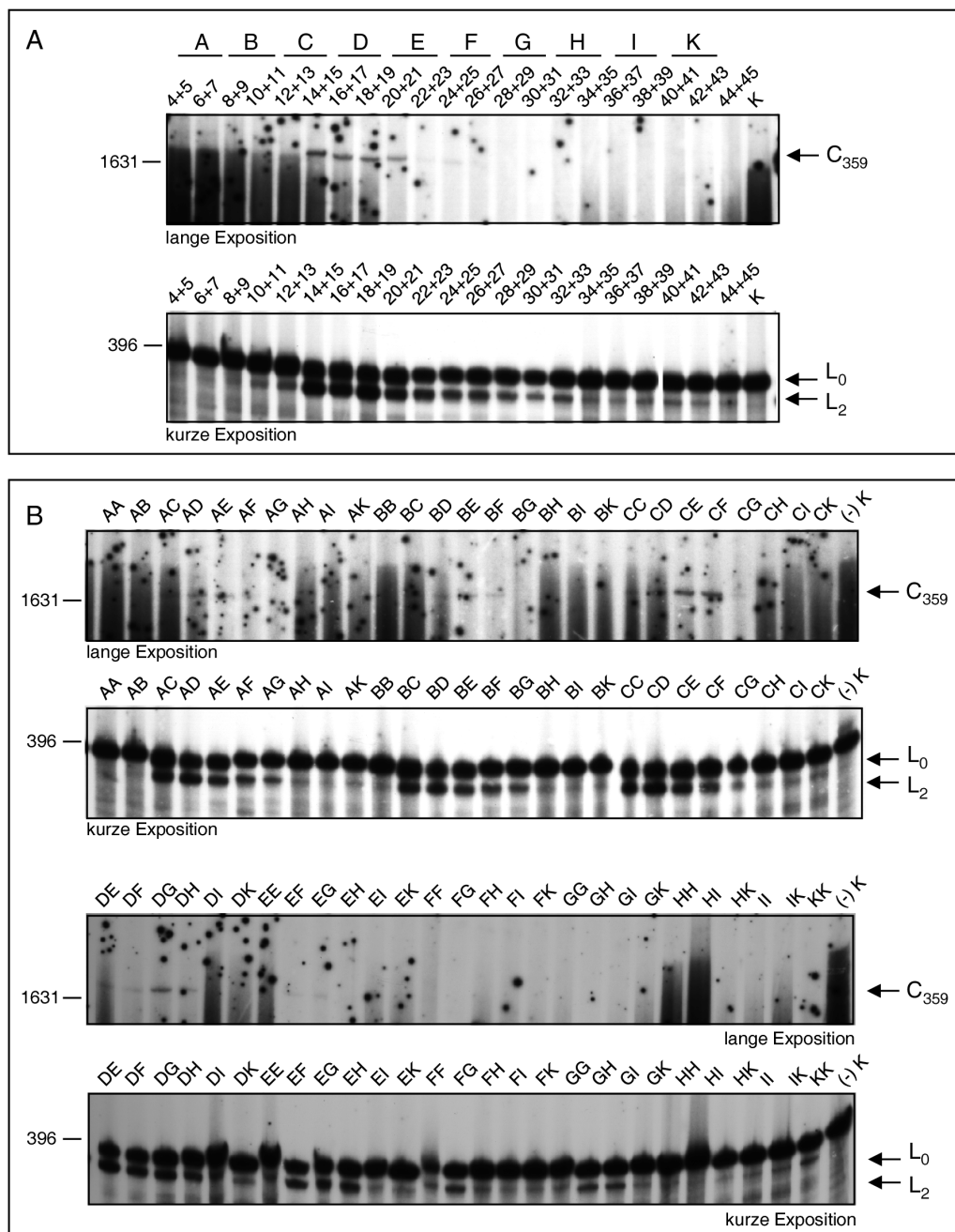


Abbildung 20: Verteilung von Schneide- und Ligationsaktivität nach Kombination von Fraktionen der MonoQ-Anionenaustauscherchromatographie. Die in Abb.19 dargestellten Proteinfraktionen (A) und vereinigte Fraktionen (B) wurden mit radioaktiv markiertem, auf ExM^{TL}-Struktur eingestelltem Transkript TB110 auf Prozessierungsaktivität getestet. Je Reaktionsansatz wurden 20 µl Proteinlösung der angegebenen Fraktionen und 2 x 10⁵ cpm nicht-gelueluertes TB110 eingesetzt und bei 30 °C für 60 min inkubiert. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt und durch Exposition gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. In jeder Spur wurden 5 x 10⁴ cpm Prozessierungsprodukte aufgetragen. Kurze Exposition: 14 h mit Verstärkerfolie. Lange Exposition: 4 d mit Verstärkerfolie. Als Kontrolle wurde mit Puffer inkubierte Transkript-RNA (K) aufgetragen. Das eingesetzte Substrat TB110 (L₀), monomere Lineare (L₂) und zirkuläres Produkt mit Einheitslänge (C₃₅₉) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *Hinf*I-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben. Für Aktivitätstests vereinigte Fraktionen sind mit A-K gekennzeichnet.

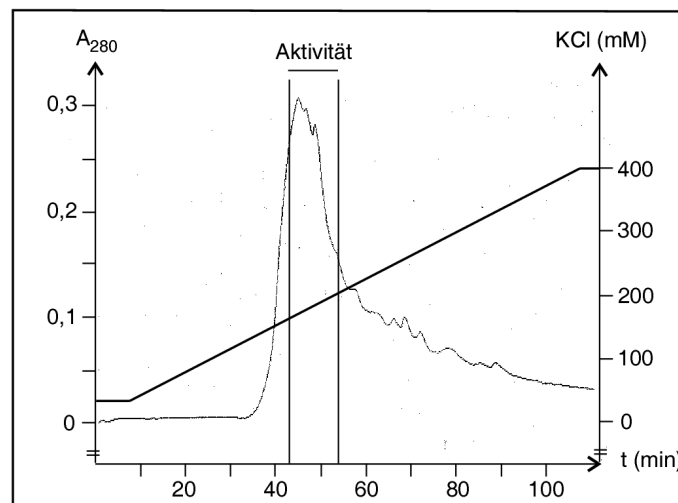


Abbildung 21: MonoS-Kationenaustauscherchromatographie von SP Sepharose teilgereinigtem Kernprotein. Durch SP Sepharose teilgereinigtes Kernprotein (400 mM SP Sepharose-Eluat) wurde mit PD10-Säulen auf 45 mM KCl entsalzt und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf eine 1 ml MonoS-Säule aufgetragen. Gebundenes Protein wurde mit einem 40-400 mM KCl-Gradienten bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min und einem Elutionsvolumen von 20 ml eluiert und in 0,4 ml Fraktionen gesammelt. Teilgereinigtes Kernprotein wurde hergestellt, indem Gesamtprotein (50 mg) präpariert, von 600 auf 50 mM KCl dialysiert und auf eine 1 ml SP Sepharose-Säule (SP HiTrap) aufgetragen wurde. Die 10-20% gebundenen Proteins wurden mit einem 400 mM KCl-Stoß eluiert. Fraktionen mit Prozessierungsaktivität sind im Chromatogramm gekennzeichnet (vgl. Abb. 22).

zusammengesetzt waren, auch keine Schnittprodukte gezeigt werden. In den vereinigten Fraktionen C,D und E wurde eine Akkumulation von Zirkeln nachgewiesen und nur Kombinationen, die C,D oder E enthielten, zeigten Ligationsaktivität. So wurden z.B. in AD, CE, CF, oder DG Zirkel gebildet. In keiner der Kombinationen von vereinigten Proben wurde eine Erhöhung der Ausbeute an Schnitt- oder Ligationsprodukten nachgewiesen. Dies zeigte, daß durch die Fraktionierung von Protein durch die MonoQ-Säule keine für die jeweilige Aktivität notwendigen Untereinheiten auseinandergetrennt und wieder rekonstituiert werden konnten.

Rekonstitutionsexperimente von durch Kationenaustauscherchromatographie fraktioniertem Protein ergaben ein vergleichbares Ergebnis. Gesamtprotein wurde wie in Kap. 2.4.5 beschrieben auf 50 mM KCl dialysiert und auf eine 1 ml SP Sepharose-Säule aufgetragen. Gebundenes Protein (10-20% des Gesamtproteins) wurde durch einen 400 mM KCl-Stoß eluiert, mit PD10-Säulen auf 45 mM KCl entsalzt und auf eine 1 ml MonoS-Kationenaustauschersäule aufgetragen. Gebundenes Protein wurde mit einem 40-400 mM KCl-Gradienten eluiert und fraktioniert gesammelt (Abb. 21).

Die Fraktionen wurden einzeln (Abb. 22A) und in Kombinationen (Abb. 22B) auf Prozessierungsaktivität getestet. Dazu wurden jeweils 6 aufeinanderfolgende Fraktionen vereinigt und jede Sechserfraktion (A-E) mit jeder anderen Sechserfraktion (A-E) und mit dem Durchlauf der MonoS-Säule (X) auf Prozessierungsaktivität getestet. Bei den Einzelfraktionen ließen sich in den Fraktionen 23-28 lineare Schnittprodukte nachweisen, die aufgrund der zuvor in Kap. 2.4.5 beschriebenen Ergebnisse L_3 sein müssen. Sie entstehen durch eine reine 5'-Schneideaktivität in diesen Fraktionen. Zirkularisierungsaktivität war

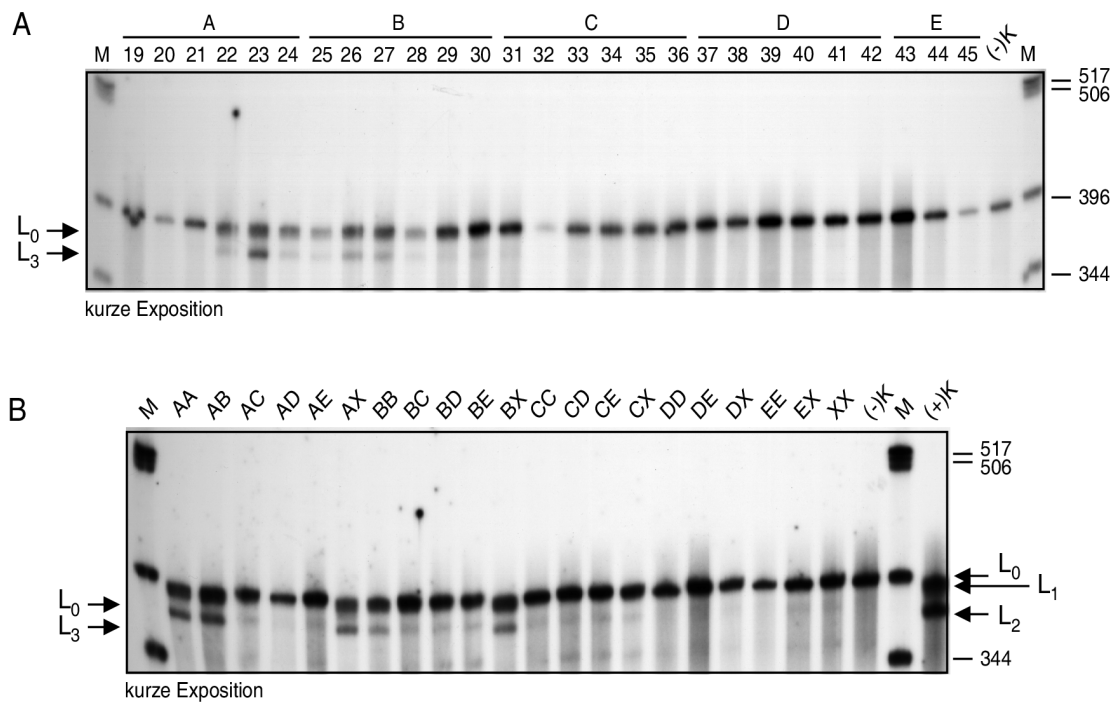


Abbildung 22: Verteilung von 5'-Schneideaktivität nach Kombination von Fraktionen der MonoS-Kationenaustauscherchromatographie Die in Abb. 21 dargestellten Proteinfractionen (A) und vereinigte Fraktionen (B) wurden mit radioaktiv markiertem, auf ExM^{TL}-Struktur eingestelltem Transkript TB110 auf Prozessierungsaktivität getestet. Je Reaktionsansatz wurden 20 μ l Proteinlösung der angegebenen Fraktionen und 6×10^4 cpm TB110 eingesetzt und bei 30 °C für 60 min inkubiert. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt und durch Exposition gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. In jeder Spur wurden 5 μ l Prozessierungsprodukte aufgetragen und 5 d exponiert. Als Kontrolle wurde mit Puffer ((-)K) und mit Gesamtprotein ((+)K) inkubierte Transkript-RNA aufgetragen. Das eingesetzte Substrat TB110 (L₀), 3'geschnittene Lineare (L₁) und monomere Lineare (L₂) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *Hinf*I-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben. Für Aktivitätstests vereinigte Fraktionen wurden sind mit A-E gekennzeichnet und X bezeichnet den Durchlauf der MonoS-Säule.

durch die verwendeten chromatographischen Trennverfahren nicht mehr vorhanden. In kombinierten Fraktionen war nur dann Aktivität nachzuweisen, wenn in ihnen Einzelfractionen mit 5'-Schneideaktivität enthalten waren. Eine Kombination von Fraktionen führte in keinem Fall zu einer stärkeren Reduktion von L₀ und einer erhöhten Akkumulation von L₃.

Bei den Versuchen zur Rekonstitution von Protein, daß durch Anionen- oder Kationenaustauscherchromatographie separiert wurde, ließ sich in keinem Fall eine Aktivitätssteigerung oder eine Rekonstitution von Schneide- oder Ligationsaktivität nachweisen. Auch konnte nach jedem der verwendeten chromatographischen Verfahren noch Aktivität nachgewiesen werden. Durch die Trennverfahren wurden keine für die Prozessierung notwendigen Enzymuntereinheiten voneinander separiert und anschließend rekonstituiert. Es konnten keine Hinweise auf Multienzymkomplexe gezeigt werden, weshalb es sich bei

den untersuchten 3'- und 5'-Schneideaktivitäten und der Ligationsaktivität eher um einzelne Enzyme handeln wird.

2.5 Charakterisierung der 5'-Schneideaktivität

2.5.1 Untersuchungen zur Größe des für die 5'-Schneideaktivität verantwortlichen Enzyms

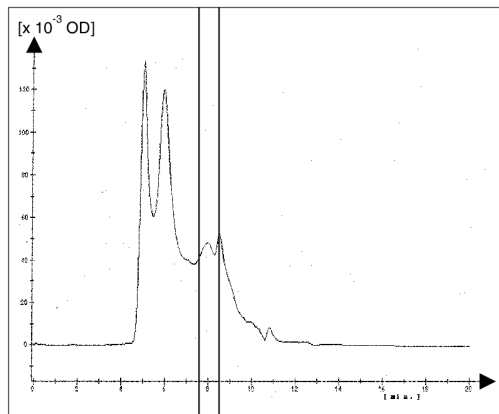
Zur Größenanalyse des Enzyms der 5'-Schneideaktivität wurde durch SP Sepharose teilgereinigter Kernextrakt verwendet. Gesamtkernextrakt wurde auf 50 mM KCl dialysiert und auf eine 1 ml SP Sepharose-Säule aufgetragen. Die 10-20 % gebundenen Proteins wurden mit einem 400 mM KCl-Stoß eluiert (vgl. Kap. 2.4.5). Die Konzentration dieser Proteinlösung war mit 2,4 mg/ml zu gering, um nach der Gelchromatographie Aktivität nachweisen zu können. Deshalb wurde das Protein durch Ultrafiltration auf 18 mg/ml aufkonzentriert. Dieses aufkonzentrierte Protein wurde mittels Gelchromatographie fraktioniert und auf Aktivität getestet. Es wurde eine Bio-Silect-SEC-250-5-Säule mit einem Trennbereich von 10-300 kDa verwendet. Für die Fraktionierung wurden 50 μ l Extrakt mit 0,9 mg Protein auf die Gelchromatographiesäule aufgetragen. Weniger Volumen konnte nicht eingesetzt werden, da bei geringeren Proteinmengen keine Schnittprodukte im Aktivitätstest nachweisbar waren und bei Konzentrationen über 20 mg/ml Protein ausfiel.

In den Fraktionen 16 und 17, die mit Retentionszeiten von 7,5 bis 8,5 Minuten eluierten, konnten Schnittprodukte nachgewiesen werden (vgl. Abb. 23 A,C). Ein direkter Längenvergleich zwischen L_2 der Prozessierung im Gesamtkernextrakt und den in den beiden Gelchromatographiefraktionen entstandenen Produkten zeigte, daß es sich um L_3 handelte (ohne Abb.). Aus dem Vergleich der Retentionszeiten der schneideaktiven Fraktionen mit denen eines Molekulargewichtstandards (vgl. Abb. 23 B) ließ sich für das Protein der 5'-Schneideaktivität ein natives Molekulargewicht zwischen 25 und 70 kD in der Gelchromatographie abschätzen, weshalb es wahrscheinlich keinen Multienzymkomplex darstellt. In der reduzierenden SDS-PAGE lag das Molekulargewicht der Proteine oder Proteinuntereinheiten der aktiven Fraktion 16 zwischen 23 und 97 kDa und das der Fraktion 17 zwischen 20 und 66 kDa (vgl. Abb. 23 D). Da beide Fraktionen die 5'-Schneideaktivität enthielten, liegt das Molekulargewicht des Enzyms, bzw. die Molekulargewichte seiner Untereinheiten im Bereich zwischen 23 und 66 kDa.

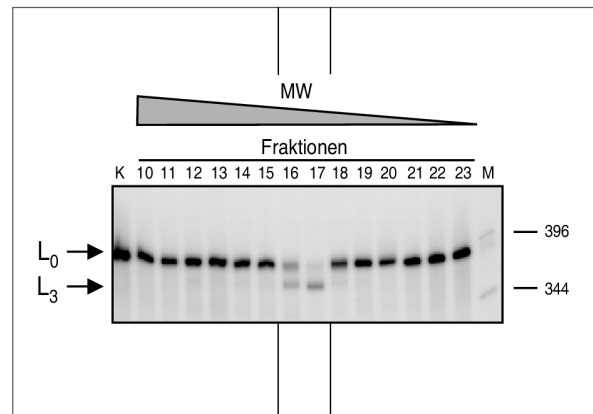
2.5.2 Teilreinigung der 5'-Schneideaktivität

Bei der Entwicklung eines Reinigungsprotokolls für die 5'-Schneideaktivität waren die Besonderheiten des Aktivitätstests zu berücksichtigen. Das verwendete Substrat TB110 ist nur prozessierungsaktiv, wenn es unter Niedrigsalzbedingungen durch Denaturierung und schnelle Renaturierung in die aktive Konformation ExM^{TL} eingestellt wird. Diese Struktur ist metastabil und lagert sich mit der Zeit in eine nicht prozessierungsaktive Konformation um. Diese Umlagerung wird durch erhöhte Temperatur und Salzbedingungen beschleunigt. Es konnten nach einer chromatographischen Trennung Proteinaliquots nur direkt und ohne Entfernung des Salzes in Prozessierungsaktivitätstests eingesetzt werden, wenn das Volumen des Aliquots so gewählt wurde, daß eine KCl-Konzentration von etwa 100 mM im Ansatz nicht überschritten wurde. Dies schränkte die maximal einsetzbare Proteinmenge ein. Zudem mußte für einen Nachweis von Prozessierungsprodukten Substrat im Prozentbereich umgesetzt werden. Es war deshalb notwendig, Protein möglichst konzentriert in kleinen Volumina zu eluieren. Auch zeigte sich eine deutliche Reduktion

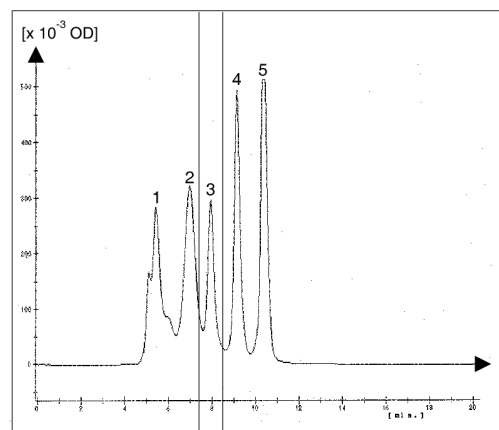
A: Gelchromatographie



C: Aktivitätstest



B: Gelchromatographie, MW-Standard



D: SDS-PAGE

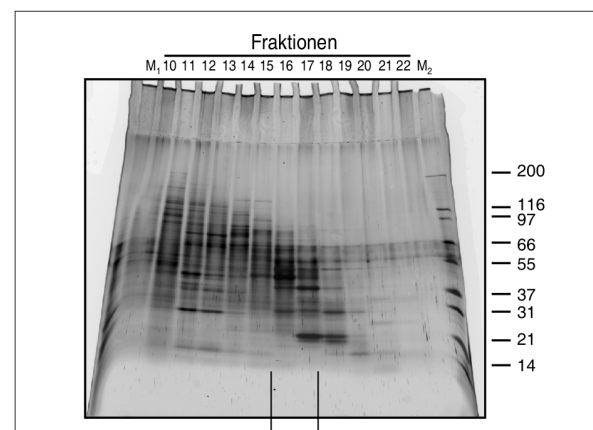


Abbildung 23: Größe der 5'-Schneideaktivität in der Gelchromatographie und der SDS-PAGE. Durch SP Sepharose teilgereinigtes Kernprotein (400 mM SP Sepharose Eluat) wurde durch Ultrazentrifugation um den Faktor 10 auf 18 mg/ml aufkonzentriert und 50 μ l dieser Proteinlösung (0,9 mg) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min mit einer Bio-Silect-SEC-250-5 Gelchromatographiesäule getrennt (A). Es wurde der Puffer OE150/10 verwendet. Protein wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und auf Prozessierungsaktivität getestet (C). Proteine mit bekanntem Molekulargewicht wurden unter den gleichen Bedingungen getrennt ((B): 1: 670 kDa, 2: 158 kDa, 3: 44 kDa, 4: 17 kDa, 5: 1.35 kDa). Die Proteine der angegebenen Fraktionen wurden in einer reduzierenden SDS-PAGE (5-20% PAA) getrennt und durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht (D). In den Spuren (M) wurde ein Proteinstandard aufgetragen, dessen Molekulargewichte in kDa angegeben sind. Je Prozessierungsreaktionsansatz wurden 20 μ l Proteinlösung der angegebenen Fraktionen und $1,2 \times 10^5$ cpm TB110 eingesetzt und bei 30 °C für 60 min inkubiert. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt und durch Exposition von 1 d gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht (C). In jeder Spur wurden $1,1 \times 10^4$ cpm Prozessierungsprodukte aufgetragen. Als Kontrolle (K) wurde mit Puffer inkubierte Transkript-RNA aufgetragen. Das eingesetzte Substrat TB110 (L_0) und 5'geschnittene Lineare (L_3) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *HinfI*-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben. In den Abb. A-D sind die Fraktionen mit Aktivität durch senkrechte Linien gekennzeichnet. Teilgereinigtes Kernprotein wurde hergestellt, indem Gesamtprotein (114 mg) präpariert, auf 50 mM KCl dialysiert und auf 2 ml SP Sepharose aufgetragen wurde. Die 10-20% gebundenen Proteins wurden mit einem 400 mM KCl-Stoß eluiert.

der Prozessierungsaktivität mit der Dauer der Reinigung. Unabhängig von der Reihenfolge der verwendeten Chromatographieverfahren verloren die Proben über den Zeitbedarf einer Aufreinigung so stark an Aktivität, daß alle eingesetzten chromatographischen Verfahren an einem Tag durchzuführen waren. Unabhängig von der Reihenfolge der Chromatographien konnte nach einem vierten Schritt in keinem Fall Aktivität nachgewiesen werden. Dieser starke Aktivitätsverlust machte eine möglichst schnelle Reinigung in möglichst wenigen Schritten notwendig.

Eine weitere Einschränkung in der Entwicklung eines Reinigungsprotokolls lag in der Dauer des Prozessierungsaktivitätstests. Für die Prozessierungsreaktionen, die Aufarbeitung der Proben für die PAGE und die eigentliche gelelektrophoretische Trennung der Produkte waren bei etwa 30 auf Aktivität zu testenden Fraktionen etwa 12 h anzusetzen. Daran schlossen sich bei Verwendung von Verstärkerfolien Expositionszeiten von 4 h bis zu mehreren Tagen an. Diese Zeiten machten Strategien unmöglich, bei denen nach einem chromatographischen Trennverfahren aktive Fraktionen durch den Aktivitätstest bestimmt und für einen nächsten Chromatographieschritt weiterverwendet werden. Nach dem Ergebnis eines Aktivitätstests und einem anschließenden, weiteren chromatographischen Schritt konnten keine Prozessierungsprodukte nachgewiesen werden. Dies machte es notwendig, mit Hilfe von Aktivitätstests zunächst die Reihenfolge der chromatographischen Verfahren zu etablieren. Für einen nächsten Chromatographieschritt wurden die aktiven Fraktionen dann anhand des Chromatogramms bestimmt und für weitere Chromatographien eingesetzt.

Mit zwei gleichzeitig durchgeführten Präparationen konnten maximal 60-100 mg Protein erhalten werden. Diese Ausgangsproteinmenge war notwendig, um nach den Reinigungsschritten noch Aktivität nachweisen zu können. Für die Präparation von prozessierungsaktivem Gesamtkernextrakt war es möglich eingefrorene Kerne als Ausgangsmaterial zu verwenden. Für die weitere Reinigung mittels chromatographischer Trennverfahren mußten jedoch Proteinextrakte aus frisch präparierten Kernen verwendet werden. Bei Extrakten aus eingefrorenen Kernen verteilte sich die Aktivität im Vergleich zu Extrakten aus nicht eingefrorenen Kernen in der Chromatographie über mehr Fraktionen, und die Anreicherung der Aktivität verschlechterte sich stark.

Mit einer Kombination aus Anionen- und Kationenaustauscherchromatographie wurde ein Verfahren zur Teilreinigung der 5'-Schneideaktivität etabliert, das in Abb. 24 zusammengefaßt ist. Zunächst wurden aus 1200 ml Suspensionskultur $1,6 \cdot 10^8$ Kerne isoliert. Aus ihnen wurde am gleichen Tag 50 ml Proteinextrakt mit 50-60 mg Protein präpariert. Dieser wurde über Nacht für 12-13 h auf 50 mM KCl dialysiert und anschließend zur Entfernung von denaturiertem Protein 1 h bei 100000 g zentrifugiert. Das Protein wurde bei pH 7,9 auf eine 2 ml SP Sepharose-Säule aufgetragen (Abb. 25A, I). Dabei wurde etwa 15 % des Proteins gebunden und 85% befand sich im Durchlauf. Gebundenes Protein wurde mit einem 400 mM KCl-Stoß in 3,5 Säulenvolumen eluiert (Abb. 25A, II). Bei höherer KCl-Konzentration von 600 mM eluierte kaum noch Protein (Abb. 25A, III). Mit diesem ersten Reinigungsschritt konnte in einem schnellen Arbeitsschritt eine Anreicherung der 5'-Schneideaktivität um den Faktor 6-7 erzielt werden. Gleichzeitig konnte das Extraktvolumen von 50 auf 7 ml verringert werden. Im Aktivitätstest wurden L_2 gebildet, sodaß im 400 mM SP HiTrap-Eluat neben der 5'-Schneideaktivität auch noch 3'-Schneideaktivität vorhanden war. Bei der Chromatographie banden Substanzen des Proteinextrakts an das Säulenmaterial, die dieses bei mehrfacher Nutzung zusetzten. Neben der erzielten Anreicherung konnte die Proteinlösung nach diesem Schritt auf hochtrennende, teure Chromato-

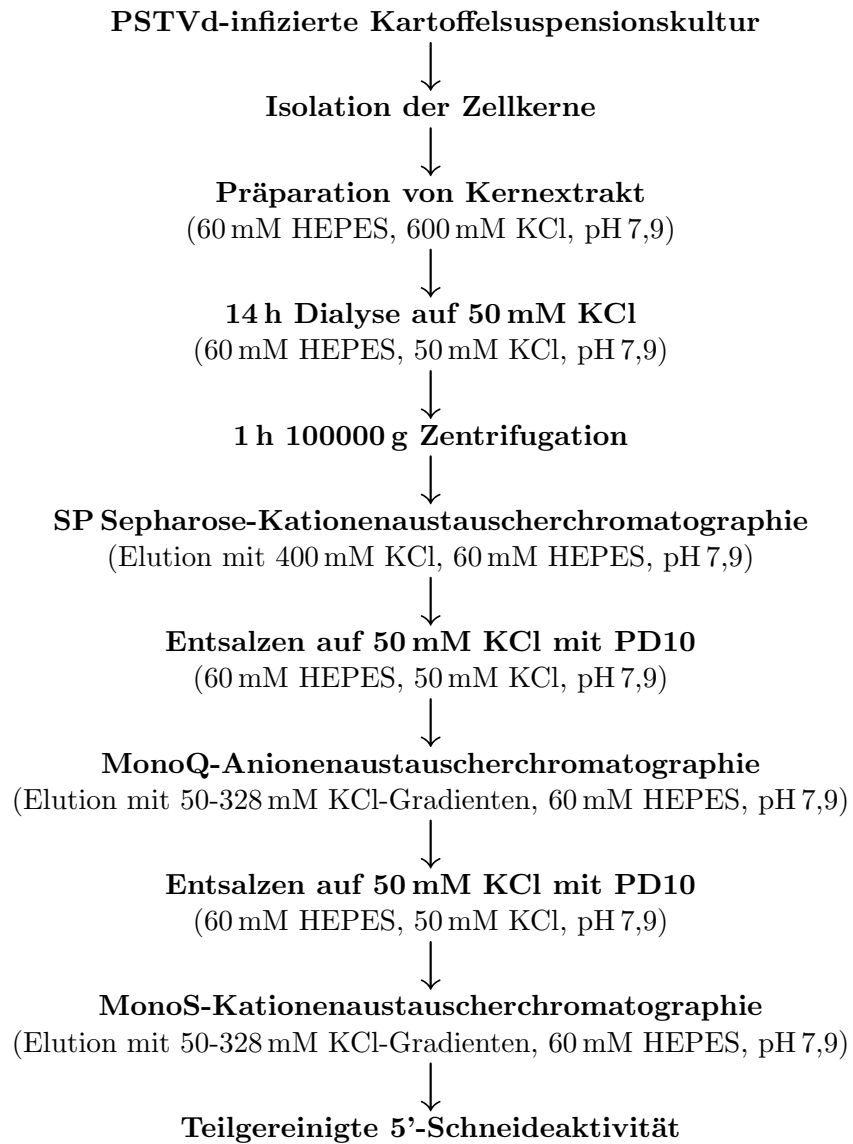


Abbildung 24: Schema zur Teilreinigung der 5'-Schneideaktivität.

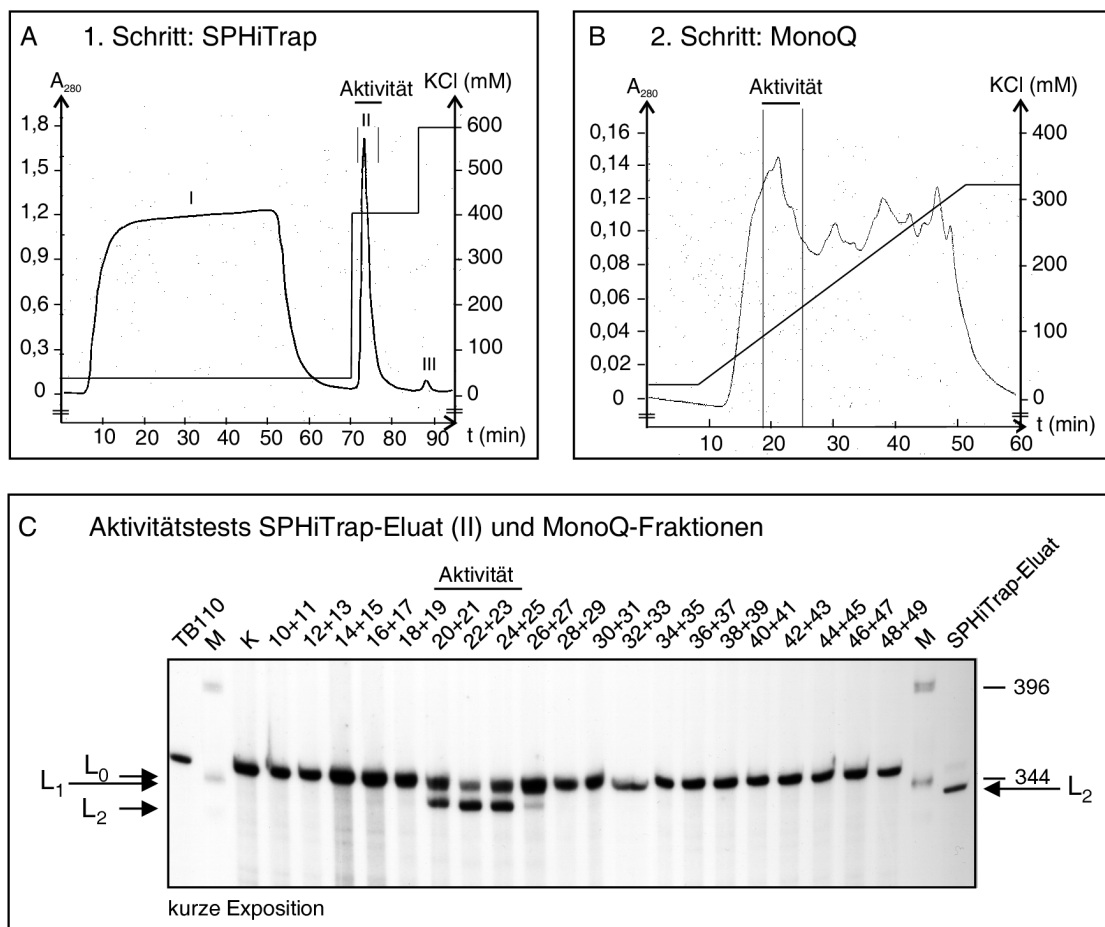


Abbildung 25: Teilreinigung der 5'-Schneideaktivität: Erster Schritt: SP-Sepharose- und zweiter Schritt: MonoQ-Chromatographie. (A) Profil der SP-Sepharose Kationenaustauscherchromatographie. Kernprotein (50 mg) wurde auf 50 mM KCl dialysiert und mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf 2 ml SP Sepharose aufgetragen. Etwa 85% des Proteins befand sich im Durchlauf und Waschpuffer (A, I). Gebundenes Protein wurde mit einem 400 mM KCl-Stoß bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min in 3,5 Säulenvolumen (7 ml) eluiert (A, II) und enthielt die 5'- und 3'-Schneideaktivität (C). Im 600 mM Eluat war nur noch eine geringe Menge Protein vorhanden (A, III). Das 400 mM SP HiTrap-Eluat wurde mit PD10-Säulen auf 50 mM KCl eingestellt und bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf eine 1 ml MonoQ-Säule aufgetragen. (B) Elutionsprofil der MonoQ-Anionenaustauscherchromatographie. Gebundenes Protein wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min mit einem 40-328 mM KCl-Gradienten von 20 Säulenvolumen (20 ml) eluiert (B) und in 0,5 ml Fraktionen gesammelt. 5'- und 3'-Schneideaktivität war in 3 Säulenvolumen (3 ml) angereichert (C). Das 400 mM SP HiTrap-Eluat und die Fraktionen der MonoQ-Chromatographie wurden mit radioaktiv markiertem, auf ExM^{TL}-Struktur eingestelltem Transkript TB110 auf Prozessierungsaktivität getestet (C). Je Reaktionsansatz wurden 20 µl Proteinlösung der angegebenen Fraktionen und 1,2 × 10⁵ cpm nicht-gelueliertes TB110 eingesetzt und bei 30 °C für 60 min inkubiert. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt. In jeder Spur wurden 4 µl Prozessierungsprodukte aufgetragen und durch 14 h Exposition gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. Als Kontrollen wurde Transkript-RNA (TB110) und mit Puffer inkubierte Transkript-RNA (K) aufgetragen. Das eingesetzte Substrat TB110 (L₀), 3'-geschnittene Lineare (L₁) und monomere Lineare (L₂) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *Hinf*I-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben. Fraktionen mit Aktivität sind gekennzeichnet.

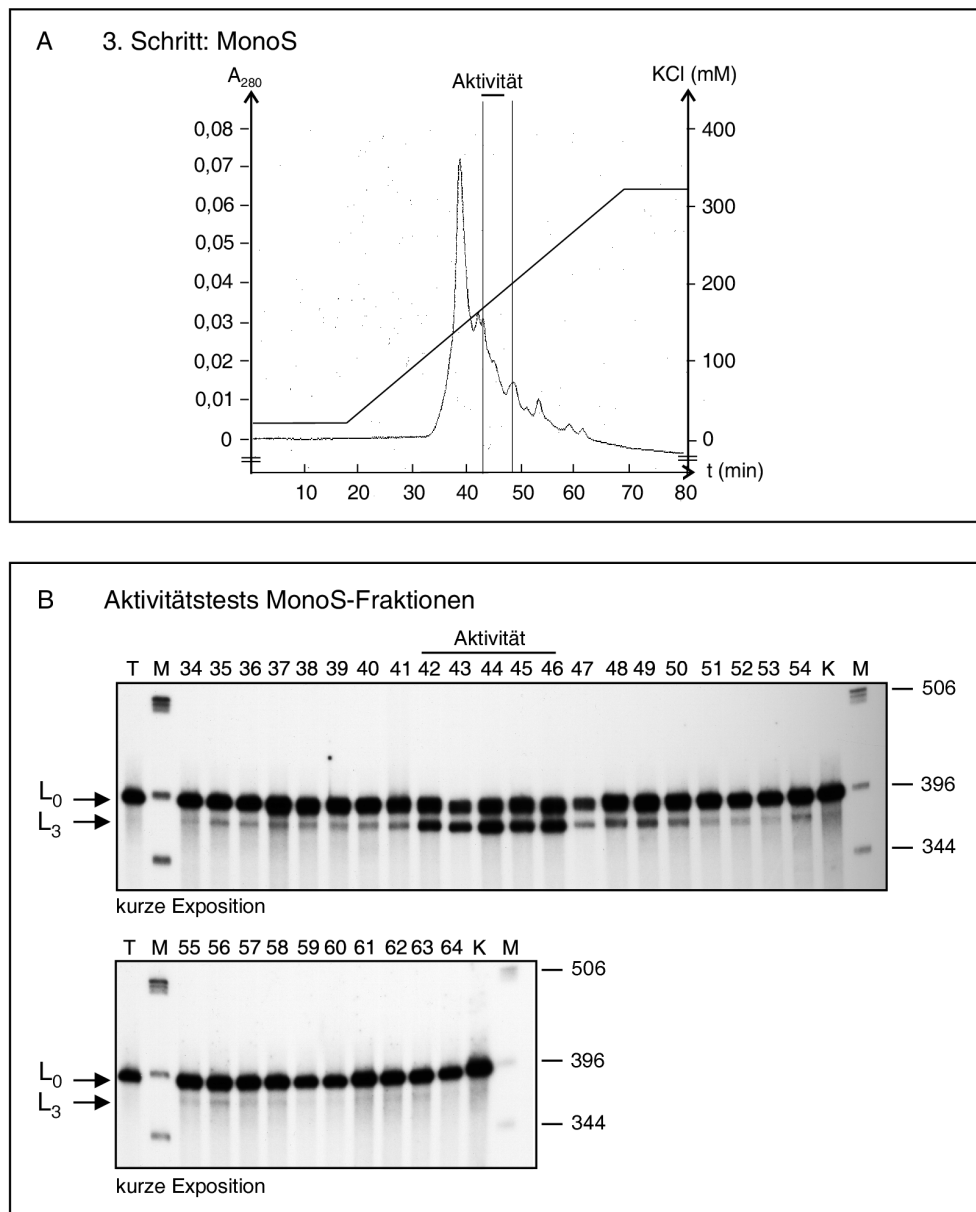


Abbildung 26: Teilreinigung der 5'-Schneideaktivität: Dritter Schritt: MonoS-Chromatographie. Schneideaktive Fraktionen der MonoQ-Chromatographie wurden mit PD10-Säulen auf 50 mM KCl eingestellt und mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 ml/min auf eine 1 ml MonoS-Säule aufgetragen, wobei 95% des Proteins gebunden wurde. Dieses wurde bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,2 ml/min mit einem 40-328 mM KCl-Gradienten von 10 Säulenvolumen (10 ml) eluiert (A) und in 0,2 ml Fraktionen gesammelt. 5'-Schneideaktivität war in 1 Säulenvolumen (1 ml) angereichert (B). Die Fraktionen der MonoS-Chromatographie wurden mit radioaktiv markiertem, auf ExM^{TL}-Struktur eingestelltem Transkript TB110 auf Prozessierungsaktivität getestet (B). Je Reaktionsansatz wurden 20 μ l Proteinlösung der angegebenen Fraktionen und $7,8 \times 10^4$ cpm geleliertes TB110 eingesetzt und bei 30 °C für 60 min inkubiert. Die Produkte der Prozessierungsreaktionen wurden in einer denaturierenden 5% PAGE getrennt. In jeder Spur wurden $1,6 \times 10^4$ cpm Prozessierungsprodukte aufgetragen und durch Exposition für 14 h gegen Röntgenfilm sichtbar gemacht. Als Kontrollen wurde Transkript-RNA (T) und mit Puffer inkubierte Transkript-RNA (K) aufgetragen. Das eingesetzte Substrat TB110 (L₀) und 5'-geschnittene Lineare (L₃) sind gekennzeichnet. Radioaktiv markierte *Hinf*I-Restriktionsfragmente von pBR322 sind als Längenstandard (M) aufgetragen und deren Größen in Basen angegeben. Fraktionen mit Aktivität sind gekennzeichnet.

Tabelle 1: Anreicherung von 5'-Schneideaktivität. Die Reinigungsfaktoren sind nur aus den Proteinmengen abgeschätzt, da der Aktivitätstest nicht quantifizierbar ist.

Reinigungsschritte	Protein mit Aktivität	Reinigungsfaktor
Gesamtkernprotein	50 mg	
SP Sepharose 400 mM Eluat	8 mg	6-7
MonoQ	300-400 μ g	20-25
MonoS	10-20 μ g	20-30
Reinigungsfaktor insgesamt		2500 - 5000

graphiesäulen aufgetragen werden, ohne diese zuzusetzen. Die preiswertere SP Sepharose wurde nach jeweils 5-6 Reinigungen ersetzt.

Das 400 mM Eluat der SP Sepharose-Säule wurde mit PD10-Säulen auf 50 mM KCl eingestellt und auf eine 1 ml Mono-Q-Anionenaustauscher-Säule aufgetragen, wobei 65-75% des Proteins gebunden wurden. 70-80% des gebundenen Proteins wurde mit 20 Säulenvolumen und einem 40-328 mM KCl-Gradienten eluiert und fraktioniert gesammelt (Abb. 25 B). Schneideaktivität eluierte im Bereich von 100-160 mM KCl in 3 Säulenvolumen (Abb. 25 C). Im Aktivitätstest wurden L_2 gebildet, sodaß auch hier 5'- und 3'-Schneideaktivität zusammen im gleichen KCl-Konzentrationsbereich eluierten (vgl. Kap. 2.4.3, 2.4.6). Die Fraktionen mit erwarteter Aktivität machten etwa 7-10% des gebundenen Proteins aus, sodaß mit diesem zweiten chromatographischen Schritt eine Anreicherung um den Faktor 20-25 erreicht werden konnte.

Anhand des Chromatogramms wurden die aktiven Fraktionen vereinigt, mit PD10-Säulen auf 50 mM KCl umgepuffert und die Proteinlösung auf eine Mono-S-Kationenaustauscher-Säule aufgetragen. Die 95% gebundenen Proteins wurden mit einem 40-328 mM KCl-Gradienten eluiert, fraktioniert gesammelt und zur Kontrolle der Reinigung auf Aktivität getestet (Abb. 26). Die Schneideaktivität eluierte in 1 Säulenvolumen im Bereich von 160-200 mM KCl und die aktiven Fraktionen enthielten etwa 3-7% des gebundenen Proteins. Wie in Kap. 2.4.5 gezeigt, eluierte in der Kationenaustauscherchromatographie in diesem Salzbereich nur 5'-Schneideaktivität. Im Aktivitätstest wurden L_3 gebildet und die 5'-Schneideaktivität war angereichert. Mit diesem dritten Schritt konnte eine weitere Reinigung um den Faktor 20-30 erreicht werden.

Insgesamt wurde eine Reinigung der 5'-Schneideaktivität um den Faktor 2500-5000 erzielt (vgl. Tab. 1). Da der Aktivitätstest nicht quantifizierbar ist, sind die angegebenen Reinigungsfaktoren nur aus den Proteinmengen abgeschätzt. Mit diesem Protokoll zur Teilreinigung der 5'-Schneideaktivität konnten 14 dominante Proteinbanden angereichert werden, die in Abb. 27 abgebildet und mit ihrem Molekulargewicht gekennzeichnet sind.

2.5.3 Untersuchungen zur Bindung von teilgereinigtem Protein an das mehrals-Einheitslängen PSTVd-Transkript TB110

Mit dem zuvor beschriebenen Reinigungsprotokoll (vgl. Kap. 2.5.2) konnte die 5'-Schneideaktivität einer begrenzten Zahl von Proteinen zugeordnet werden. Mit Hilfe von Markierungstransferexperimenten sollten nun die Proteine im teilgereinigten Extrakt identifiziert werden, die an das Prozessierungssubstrat TB110 binden. Bei Markierungstransferexperimenten werden alle Proteine radioaktiv markiert, die während einer UV-Bestrahlung

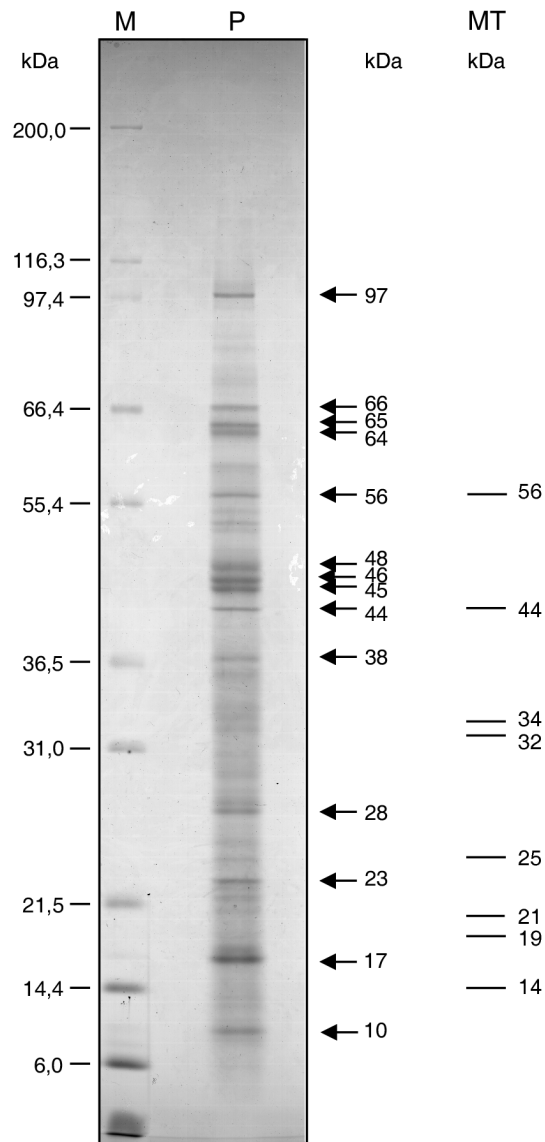


Abbildung 27: Angereicherte 5'-Schneideaktivität. Coomassie-gefärbte, reduzierte 7,5-15% SDS-PAGE von teilgereinigtem 5'-Schneideenzym (P). Es wurden 30-40 μg Protein aufgetragen, wozu acht Präparationen vereinigt und 1/4 davon aufgetragen wurden. Die angereicherten, dominanten Proteinbanden sind durch Pfeile markiert und deren Molekulargewichte in kDa angegeben. In der Spur (M) sind Proteine eines Standards aufgetragen und deren Molekulargewichte in kDa angegeben. Rechts (MT) sind die Positionen und Molekulargewichte der im Markierungstransfer als TB110 bindend detektierten Banden angezeichnet (vgl. Abb. 28).

in räumlicher Nähe zur RNA sind ($< 10 \text{ \AA}$). Stärke und Spezifität spielen dabei keine Rolle (Greenberg, 1980). Durch das UV-Licht wird eine kovalente Bindung der RNA an Protein induziert. Durch eine anschließende RNase-Verdauung wird der nicht durch Protein geschützte Bereich der RNA hydrolysiert. Durch die unverdaute, gebundene RNA wird Radioaktivität auf das Protein transferiert und markiertes Protein kann nach einer SDS-PAGE durch Exposition gegen Röntgenfilm detektiert werden.

Das für Markierungstransferexperimente verwendete Transkript TB110 ist nur in der Ex^{TL} -Struktur prozessierungsaktiv und nicht in der ebenfalls *in vitro* einstellbaren ExL-Struktur (vgl. Kap. 1.7.1). Der Tetraloop-Hairpin der Ex^{TL} -Konformation wird als Erkennungsmotif für die Bindung von Wirtsenzym(en) diskutiert, die das Schneiden des mehr-als-Einheitslängen Transkript TB110 vermitteln (vgl. Kap. 1.7.3). Das 5'-Schneideenzym sollte deshalb die Ex^{TL} -Struktur binden und die ExL-Struktur nicht. Um zwischen einer spezifischen und einer unspezifischen Proteinbindung des Transkripts zu unterscheiden, wurden Markierungstransferexperimente mit TB110 in beiden Konformationen durchgeführt. Bei einer spezifischen Bindung sollte mehr Transkript in der Ex^{TL} -Struktur gebunden werden als in der ExL-Struktur.

Die Präinkubation von Transkript mit Protein und die UV-Bestrahlung wurden zum Einen bei der Standardprozessierungstemperatur von 30°C und zum Anderen bei 4°C durchgeführt. Bei 4°C sollte sich die metastabile Ex^{TL} -Struktur nicht oder nur sehr langsam in die ExL-Konformation umlagern, was die Ausbeute an kovalent gebundenen Protein erhöhen sollte. Die UV-Bestrahlung erfolgte für 40 min, einer Zeitspanne, in der bei Prozessierungsreaktionen bei 30°C gut nachweisbare Produktmengen entstehen. In dieser Zeit sollte deshalb eine Menge Transkript kovalent gebunden werden, die einen Nachweis der wechselwirkenden Proteine möglich macht.

Mit dem Markierungstransferexperiment konnten bei 30°C und 4°C , sowie mit TB110 in der Ex^{TL} - und in der ExL-Struktur je acht verschiedene Proteinbanden mit Molekulargewichten von etwa 56, 44, 34, 33, 25, 21, 19 und 14 kDa detektiert werden (Abb. 28). Die stärksten Signalintensitäten waren bei 32, 25, 21 und 14 kDa zu beobachten. Bei der niedrigeren Inkubationstemperatur von 4°C konnte insgesamt mehr Transkript kovalent gebunden werden als bei 30°C . Die Molekulargewichte und Intensitätsverteilungen der detektierten Banden waren bei beiden Temperaturen gleich. Die höhere Markierung bei 4°C kann in der verlangsamten Diffusion begründet liegen, die zu einer längeren Verweildauer des markierten Transkripts am Protein führt und damit die Wahrscheinlichkeit einer kovalenten Verknüpfung durch das UV-Licht erhöht.

Zwischen den eingesetzten TB110-Strukturen Ex^{TL} und ExL konnten keine Unterschiede in der Bindung nachgewiesen werden. Das prozessierungsaktive und das nicht-aktive Substrat wurden mit gleicher Ausbeute kovalent an das jeweilige Protein gebunden. Anhand des Experiments kann deshalb keine eindeutige Zuordnung einer Bande zur 5'-Schneideaktivität erfolgen. Proteine aller acht Banden könnten die Aktivität vermitteln.

Bei diesem Experiment konnte wegen der sehr geringen Ausbeute bei der Präparation von teilgereinigtem 5'-Schneideenzym nur $0,4\text{-}0,6 \mu\text{g}$ Protein pro Ansatz verwendet werden. Gleichzeitig war für die Hydrolyse der notwendigen RNA-Menge so viel RNase A und RNase T1 einzusetzen, daß diese in der Silberfärbung des Proteingels im Bereich zwischen 14 und 45 kDa alle Proteinbanden überdeckten. Die Zuordnung der radioaktiv markierten Banden im Vergleich zum Bandenmuster aller Proteinbanden war deshalb nicht möglich. Eine Zuordnung der radioaktiv markierten Banden zu den dominanten Proteinbanden im SDS-Gel erfolgte deshalb anhand der Molekulargewichte.

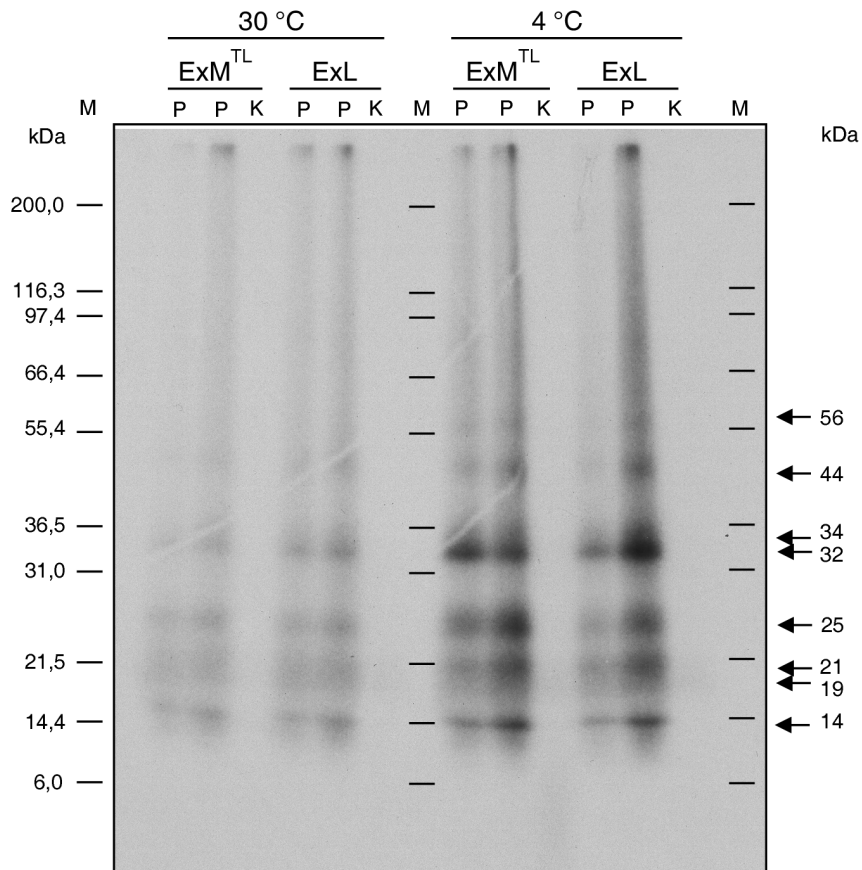


Abbildung 28: Bindungsuntersuchungen von TB110 in der Ex^{TL}- und der ExL-Struktur an Proteine des teilgereinigten 5'-Schneideenzymextrakts durch Markierungstransferexperimente. In jedem Ansatz wurden gleiche Mengen (0,4-0,6 μg) teilgereinigtes 5'-Schneideenzym einer Präparation und 7×10^5 cpm radioaktiv markiertes Transkript in der Ex^{TL}- oder ExL-Struktur verwendet. Die Inkubation und die kovalente Bindung durch UV-Bestrahlung erfolgten bei 30 °C und 4 °C. Nach dem Markierungstransfer wurden die Proteine in einer 10% PAGE getrennt und durch Exposition gegen Kodak X-OMAT Röntgenfilm sichtbar gemacht. In den Spuren (P) ist markiertes Protein und in (K) gleich behandelte Ansätze mit H₂O aufgetragen. Detektierte Proteinbanden sind mit Pfeilen gekennzeichnet und deren Molekulargewichte in kDa angegeben. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards (M) sind markiert und in kDa angegeben.

Bei keinem markierten Protein war ein Unterschied der kovalenten Verknüpfung zwischen der Ex^{TL}- und der ExL-Struktur nachweisbar, was darauf hindeutet, daß beide Substrate vom 5'-Schneideenzym gebunden werden. Dies steht im Widerspruch zum bisher aufgestellten Modell, daß die Schneidereaktion der Prozessierung durch die Erkennung und Bindung des Tetraloop-Elements der Ex^{TL}-Konformation spezifiziert wird. Das Ergebnis ist ein Hinweis darauf, daß beide Strukturen, die prozessierungsaktive Ex^{TL} und die inaktive ExL vom Wirtsenzym erkannt und gebunden werden. Es kann jedoch keine Aussage über Unterschiede in der Bindungsstärke und Bindungsspezifität der beiden Substrate getroffen werden.

2.5.4 Identifizierung der dominanten Proteinbanden nach Teilreinigung der 5'-Schneideaktivität

Die durch die Reinigung der 5'-Schneideaktivität angereicherten Proteinbanden wurden durch einen tryptischen Verdau fragmentiert und jeweils verschiedene Peptide massenspektrometrisch sequenziert. Da die Ausbeute pro Präparation bei nur etwa 10-20 μg Protein lag, wurden für die Sequenzierungen mehrere Präparationen vereinigt und in der reduzierenden SDS-PAGE getrennt. Aus dem in Abb. 27 dargestellten Gel wurden die durch Pfeile markierten Banden mit einem Molekulargewicht zwischen 66 und 17 kDa ausgeschnitten und verwendet. Da die Molekulargewichtsabschätzung der 5'-Schneideaktivität nach Gelchromatographie in der SDS-PAGE keine Banden oberhalb von 66 und unterhalb von 21 kDa zeigte, wurde die ebenfalls dominanten 97 und die 10 kDa Banden nicht sequenziert.

Die Sequenzierungen ergaben für verschiedene Banden deutliche Homologien, die in Tabelle 2 zusammengefaßt sind. Die vollständigen Ergebnisse sind im Anhang (Kap. 8) angegeben. Bei den Sequenzen ist zu beachten, daß Leucin und Isoleucin aufgrund ihrer identischen Massen nicht unterschieden und Lysin und Glutamin wegen ihrer ähnlichen Massen manchmal nicht eindeutig zugeordnet werden. Auch besteht die Möglichkeit, daß die erhaltenen Peptidsequenzen verschiedenen Proteinen zuzuordnen sind, die in der SDS-PAGE in einer Bande laufen.

Die Sequenzhomologiesuchen erfolgten am NCBI mit dem BLAST-Algorithmus ("Basic Local Alignment Search Tool") für kurze, möglichst exakte Treffer (Altschul *et al.*, 1997). Es wurde mit der Voreinstellung „nr“ gegen folgende Datenbanken gesucht: „All non-redundant GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR und PRF“. Es werden hier nur signifikante Homologien angegeben, sodaß z. B. Ergebnisse mit 100% Homologie für kurze, bis zu sieben Aminosäuren lange Peptide nicht verwendet wurden, wenn der E-Value-Wert zu groß war. Dieser Wert beschreibt die statistische Signifikanz für angegebene Treffer gegen die Datenbanksequenzen. Ein E-Value-Wert von z.B. 10 bedeutet, daß für die gesuchte Sequenz 10 homologe Treffer in der Datenbank nur aufgrund der statistischen Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins dieser Peptidsequenz in der Datenbank zu erwarten sind. So hat die Peptidsequenz ENYLK der 66,3 kDa Bande einen E-Value-Wert von 1911 und ergibt über 100 Treffer mit 100%iger Identität, sodaß mit dieser Peptidsequenz keine Aussage über die Identität der Proteinbande möglich ist. Zusätzlich zu den Homologiesuchen wurden einige der Proteinbanden auch über eine MS/MS-Ionensuche uninterpretierter MS/MS-Daten mit Hilfe der Mascot Suchmaschine von den Mitarbeitern des Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum identifiziert (Perkins *et al.*, 1999). Sie sind im Anhang mit (*) gekennzeichnet.

Aufgrund der Markierungstransferexperimente konnte ausgeschlossen werden, daß die Proteine oder Proteinuntereinheiten mit den Molekulargewichten 66, 65, 64, 48, 38 und 28 kDa für die 5'-Schneideaktivität verantwortlich sind. Im Bereich dieser Molekulargewichte konnte keine Bindung an das Substrat TB110 nachgewiesen werden. Die 66 kDa Proteinbande wurde als Sulfit Reduktase und die 64 kDa Bande als N-terminale Acetyltransferase identifiziert. Beide Enzyme schneiden keine Nukleinsäure, sodaß sie auch wegen ihrer Identität als 5'-Schneideenzym ausgeschlossen werden können. Das 38,0 kDa Protein ist homolog zum U2 Small Nuclear Ribonucleoprotein A, einer Proteinuntereinheit des für prä-mRNA Splicing verantwortlichen Splicisoms. Da in diesem Molekulargewichtsbereich keine Bindung an TB110 gezeigt werden konnte, ist dieses Protein wahrscheinlich nicht für die 5'-Schneideaktivität verantwortlich. Die Identitäten der 65, 48 und 28 kDa Pro-

Tabelle 2: Zusammenfassung der Sequenzier- und Markierungstransferdaten. Mit (--) gekennzeichnete Proteine kommen wahrscheinlich nicht, mit (+-) gekennzeichnete vielleicht und mit (++) gekennzeichnete wahrscheinlich als 5'-Schneideenzym in Frage.

Protein	Homologie zu	5'-Schneideenzym
66 kDa	Sulfit Reduktase	--
65 kDa	-	--
64 kDa	N-terminale Acetyltransferase	--
56 kDa	multifunktionale Aminoacyl-tRNA-Ligase	++
48 kDa	-	--
46 kDa	cDNA-Klon (EST)	+-
45 kDa	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase	--
	3-Ketoacyl-CoA Thiolase	--
44 kDa	Acetyl-CoA C-Acetyltransferase	--
	3-Ketoacyl-CoA Thiolase	--
38 kDa	U2 Small Nuclear Ribonucleoprotein A	--
28 kDa	-	--
23 kDa	-	+-
17 kDa	cDNA-Klon (EST)	+-
	ACP-Dehydratase	--

teinbanden konnten nicht sicher bestimmt werden. In diesen Molekulargewichtsbereichen konnte auch kein Markierungstransfersignal nachgewiesen werden, weshalb auch sie die angereicherte Aktivität wahrscheinlich nicht vermitteln.

Im Markierungstransferexperiment wurde eine Proteinbindung an TB110 bei 44 kDa nachgewiesen. Die 45 und 44 kDa Proteine wurden jedoch als Acetyl-CoA C-Acetyltransferasen oder 3-Ketoacyl-CoA Thiolasen identifiziert. Beide Enzyme schneiden keine Nukleinsäure, sodaß diese Proteinbanden wahrscheinlich nicht für die 5'-Schneideaktivität verantwortlich sind. Im Bereich des 17 kDa Proteins konnte ebenfalls ein Bindung an TB110 bei 19 und 14 kDa gezeigt werden. Die Homologie zu ACP-Dehydratase, die keine Nukleinsäuren schneiden, macht auch diese Proteinbande unwahrscheinlich für die 5'-Schneideaktivität. Das 17 kDa Protein zeigte jedoch auch Homologie zu einem nicht näher beschriebenen cDNA-Klon, sodaß diese Proteinbande vielleicht aus zwei verschiedenen Proteinen besteht und dieses Zweite vielleicht als 5'-Schneideenzym in Frage käme.

Die Identitäten der 46 und 23 kDa Banden konnten nicht eindeutig bestimmt werden. Im Größenbereich dieser Proteine konnten im Markierungstransfer Banden mit 44, 25, 21 und 19 kDa detektiert werden. Da eine Molekulargewichtsbestimmung im SDS-Gel immer mit einem gewissen Fehler behaftet ist und auch durch Markierungstransfer markiertes Protein eine veränderte Gelmobilität besitzen kann, ist nicht auszuschließen, daß eines dieser Proteine für die 5'-Schneideaktivität verantwortlich sein könnte.

Für das 56 kDa Protein konnte eine Homologie zu einer Multifunktionalen Aminoacyl-tRNA-Ligase gezeigt werden und es wurde ein, wenn auch schwaches, Markierungstransfersignal bei ebenfalls 56 kDa nachgewiesen. Aminoacyl-tRNA-Ligasen, bzw. -Synthetasen spielen in einem breiten Spektrum zellulärer Prozesse eine Rolle. Neben ihrer Funktion in der tRNA- und tmRNA-Aminoacylierung sind sie unter anderem an tRNA Prozessie-

rung und RNA Splicing beteiligt. Diese Identität des 56 kDa Proteins unterstützt seine mögliche Funktion als 5'-Schneideenzym.

Das 56 kDa Protein ist das einzige durch die Reinigung der 5'-Schneideaktivität angereicherte Enzym, für das aufgrund seiner Identität und dem Nachweis einer Bindung an das Substrat TB110 ein Hinweis auf seine mögliche Funktion in der Prozessierung des Substrats TB110 gezeigt werden konnte. Es ist jedoch nicht sicher auszuschließen, daß die 56 kDa Bande aus zwei oder mehreren Proteinen besteht und das Markierungstransfer-signal nicht auf die Bindung der sequenzierten Aminoacyl-tRNA-Ligase zurückzuführen ist. Die 46, 23, und 17 kDa Proteine könnten aus den zuvor beschriebenen Gründen aber auch für die 5'-Schneideaktivität verantwortlich sein. Im Markierungstransfer markierte Proteine, die im Proteingel nicht dominant vorhanden sind, sind als 5'-Schneideenzyme jedoch unwahrscheinlich, da die Proteine auf die 5'-Schneideaktivität angereichert waren.

3 Diskussion

Viroide nutzen für ihren gesamten Infektionsweg, d.h. für die Replikation, den Transport von Zelle zu Zelle und die systemische Verteilung in der Pflanze ausschließlich wirtseigene Systeme. Die Viroid-RNA präsentiert funktionelle Signale in Form von Sequenz- und Strukturmerkmalen, die von Wirtsfaktoren erkannt werden und die Wechselwirkungen vermitteln. Außer der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II, die die Viroid-RNA transkribiert, war bisher kein funktionell charakterisierter Wechselwirkungspartner von Viroiden bekannt. In der vorliegenden Arbeit sollten die für die Prozessierung verantwortlichen Wechselwirkungspartner charakterisiert werden.

Eine Hypothese für einen solchen Wechselwirkungsfaktor war die Ribonuklease MRP. Es stand zur Diskussion, daß Viroide die nukleäre Wirts-RNase MRP für ihre Prozessierung nutzen könnten (Baumstark, 1997). Ein anderer Ansatzpunkt war, daß für die MRP-RNA in gesunden und viroidinfizierten Kartoffelzellkulturen unterschiedliche Konzentrationen gezeigt worden waren, woraus auf eine mögliche Wechselwirkung mit Viroiden geschlossen wurde (Thiel, 1999). Eine Beteiligung der RNase MRP an der Prozessierung oder eine Reduktion der RNase MRP-RNA-Konzentration durch die Viroidinfektion konnten in dieser Arbeit experimentell jedoch nicht bestätigt werden.

Die Charakterisierung der an der Viroidprozessierung beteiligten Enzymaktivitäten anhand des mehr-als-Einheitslängen PSTVd-Transkripts TB110 zeigte, daß der im mechanistischen Modell der Prozessierung vorgeschlagene 5'- und 3'-Schnitt, sowie die Ligation von unterschiedlichen Enzymen vermittelt wird. Eine Teilreinigung der 5'-Schneideaktivität in Verbindung mit Bindungsuntersuchungen von TB110 an Proteine dieses teilgereinigten Extrakts und Sequenzierungen dieser Proteine identifizierte mögliche Enzyme der 5'-Schneideaktivität.

3.1 Etablierung eines prozessierungsaktiven Kernextrakts aus Viroidinfizierten *S. demissum*-Zellkulturen

Alle früheren Untersuchungen zur *in vitro*-Prozessierung des Transkripts TB110 waren mit Kernextrakt aus der nicht-infizierten *S. tuberosum*-Kultur (HH258) durchgeführt worden (Baumstark & Riesner, 1995; Baumstark *et al.*, 1997; Baumstark, 1997). Unterschiedliche Proteinpräparationen der HH258-Zellkultur zeigten in dieser Arbeit starke Schwankungen ihrer Prozessierungsaktivität, weshalb diese Kultur für Experimente mit jedesmal neu präpariertem Proteinextrakt nicht geeignet war. Die Aktivitätsschwankungen zeigten sich schon früher und hatten zur Folge, daß für Prozessierungsreaktionen der vorausgegangenen Arbeiten nur Kernextraktpräparationen mit guter Prozessierungsaktivität verwendet und andere verworfen wurden (T. Baumstark, persönliche Mitteilung). Mit einer Präparation von 2 ml, bei -70 °C lagerbarem Kernextrakt aus 400 ml Kultur konnten, je nach Aktivität, zwischen 200 und 400 einzelne Prozessierungsreaktionen angesetzt werden, sodaß Versuchsreihen durch die Verwendung einer identischen Extraktpräparation gut vergleichbar waren. Für die chromatographische Teilreinigung und Charakterisierung der an der Prozessierung beteiligten Enzymaktivitäten mußte jedesmal frisch präparierter Kernextrakt verwendet werden, wofür die Aktivitäten von Präparation zu Präparationen vergleichbar sein sollten. Ein Aktivitätstest des Gesamtextrakts vor einer Chromatographie zur eventuellen Standardisierung war durch den dafür notwendigen Zeitaufwand nicht möglich. Bis zum Ergebnis des Tests wäre der Extrakt für eine chromatographische Anreicherung von Proteinen nicht mehr verwendbar gewesen.

Aus einer PSTVd-infizierten *S. demissum*-Zellkultur (M316PSTVd) konnte mit den für die nicht-infizierte *S. tuberosum*-Kultur entwickelten Protokollen prozessierungsaktiver Kernextrakt präpariert werden. Da die infizierte Kultur etwas langsamer wuchs als die nicht-Infizierte, wurde zur Präparation der gleichen Zellzahl ein größeres Volumen an Zellkultur eingesetzt. Die infizierte Kultur enthielt mehr Stärke, welche die Präparation nicht störte und schon durch Zentrifugationsschritte bei der Kernpräparation vermindert wurde. Nach einer 154000 g Zentrifugation bei der Kernextraktion pelletierten die Stärkeeinschlüsse und waren im Proteinüberstand mikroskopisch nicht mehr sichtbar. Die im Proteinextrakt aus infizierten M316PSTVd-Zellen vorhandene PSTVd-RNA hatte keinen Einfluß auf die *in vitro*-Prozessierungsexperimente, da für diese extern zugegebenes, radioaktiv markiertes PSTVd-Transkript verwendet wurde.

Zeit- und konzentrationsabhängige Prozessierungsreaktionen zeigten, daß die Enzymaktivitäten im Kernextrakt aus *S. demissum*-Zellen vergleichbar zu denen aus *S. tuberosum*-Zellen waren. Das mehr-als-Einheitslängen Transkript TB110 wurde mit vergleichbarer Kinetik zu identischen linearen (L_1 , L_2) und zirkulären (C_{359} , C_a) Produkten prozessiert. Bei beiden Kulturen fand die spezifische Prozessierungsreaktion vor dem Hintergrund einer unspezifischen Degradation statt. Unterschiedliche Präparationen der *S. demissum*-Kultur zeigten dabei im Gegensatz zur *S. tuberosum*-Kultur nur geringe Aktivitätsschwankungen.

Eine Erklärung für die beobachteten starken Aktivitätsschwankungen von Kernextrakten der *S. tuberosum*-Kultur kann hier nicht gegeben werden. Die Zellen wurden, wie die *S. demissum*-Zellen, im Dunkeln bei konstanten Wachstumsbedingungen kultiviert. Sie wurden noch in der logarithmischen Wachstumsphase zur Vermehrung verdünnt und die Ernte der Zellen für Proteinpräparationen erfolgte drei oder vier Tage nach der Subkultivierung. Es sei hier jedoch angemerkt, daß es in früheren Experimenten zur Infektion dieser HH258-Kultur mit PSTVd zwar möglich war, das Viroid in die Zellen zu bringen, eine konstante Replikation jedoch nicht erzielt werden konnte (A. Fels, M. Rachen, persönliche Mitteilung).

In der *S. demissum*-Kultur wird PSTVd dagegen konstitutiv repliziert, was auf das konstante Vorhandensein aller Faktoren des Replikationsapparats schließen läßt. Diese Überlegung wurde für die Prozessierung dadurch bestätigt, daß zwischen verschiedenen Präparationen dieser Kultur nur geringe Prozessierungsaktivitätsschwankungen auftraten. Sie wurde deshalb für die Anreicherung und Charakterisierung von Prozessierungsaktivität verwendet.

3.2 Methodische Aspekte des Prozessierungsaktivitätstests

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Charakterisierungen der an der Prozessierung beteiligten Enzymaktivitäten erfolgten durch Fraktionierung von Proteinen und Anreicherung der Prozessierungsaktivitäten mittels chromatographischer Verfahren. *In vitro*-Prozessierungen des mehr-als-Dimeren-Transkripts TB210 und des mehr-als-Trimeren-Transkripts TB310 im Gesamtkernextrakt zeigten lineare Nebenprodukte unterschiedlicher Länge, die eine eindeutige Zuordnung der im mechanistischen Modell der Viroidprozessierung vorgeschlagenen spezifischen linearen (L_1 , L_2) und zirkulären Produkte (C_{359}) nicht zuließen. Deshalb wurde für Aktivitätstests das mehr-als-Einheitslängen-Transkript TB110 verwendet, wenn auch TB210- oder TB310-Transkripte die *in vivo* gebildeten oligomeren (+)-Replikationsintermediate besser repräsentieren. Die *in vitro* einstellbare prozessierungsaktive Sekundärstruktur von TB110 und die strukturellen Umlagerungen nach

dem die Prozessierung einleitenden 5'-Schnitt waren bekannt. TB110 gilt als Modells substrat für die Prozessierung oligomerer Replikationsintermediate und enthält die Struktur motive, die *in vivo* durch sequentielle Faltung während der Transkription gebildet werden (Baumstark *et al.*, 1997; Baumstark, 1997). Bei der Prozessierung im Gesamtkernextrakt entstehen wenige, definierte Prozessierungsprodukte (L_1 , L_2 , C_{359} , C_a). Es war deshalb geeignet, um als Substrat für Aktivitätstests verwendet zu werden und die Anreicherung der prozessierungsspezifischen Schnitt- und Ligationsaktivitäten zu verfolgen.

Die gelelektrophoretische Trennung der Prozessierungsprodukte war die einzige Möglichkeit gleichzeitig nicht umgesetztes Transkripts substrat und verschiedene Schnitt- und Ligationsprodukte zu zeigen. Es konnten jedoch nur Produkte nachgewiesen werden, wenn Substrat im Prozentbereich umgesetzt wurde. Es war deshalb notwendig, im Aktivitätstest möglichst viel Protein einzusetzen. Außerdem zeigten KCl-abhängige Prozessierungsreaktionen, daß für einen sicheren Nachweis von Aktivität eine KCl-Konzentrationen von 100 mM nicht überschritten werden sollte. Je höher die eingesetzte Salzkonzentration ist, desto schneller lagern sich die Transkripte von der prozessierungsaktiven ExM^{TL} -Struktur in die inaktive ExL -Konformation um, und desto unempfindlicher wird ein Aktivitätstest sein. Daher könnte bei höheren KCl-Konzentrationen Prozessierungsaktivität nicht mehr sicher nachweisbar sein. Die nach KCl-Elutionen im Aktivitätstest einsetzbare Proteinmenge war somit limitiert, da sie für Prozessierungsreaktionen ausreichend verdünnt eingesetzt werden mußte.

3.3 Methodische Aspekte der Proteinfractionierung und -anreicherung

Durch die KCl-Abhängigkeit der Prozessierung war es notwendig, Protein möglichst konzentriert von den eingesetzten Chromatographiesäulen zu eluieren ohne die Trennleistung durch zu geringes Elutionsvolumen zu sehr herabzusetzen. Chromatographische Fraktionierungen von Protein mit anschließendem Aktivitätstest zeigten eine starke Abnahme der Prozessierungsaktivität mit der Zeit. Wegen der langen Dauer eines Aktivitätstests von mindestens 12 h war es notwendig, für eine zweite oder dritte Chromatographie zunächst den vorausgehenden Schritt zu etablieren, und dann mit neuen Präparationen anhand des Chromatogramms die aktiven Fraktionen ungetestet zu vereinigen und weiterzuverwenden. Auch wenn die Proteinproben auf Eis gehalten wurden, erfolgten die Chromatographien bei Raumtemperatur. Eine Verminderung der Proteindegradation und eine Verbesserung der Aktivität wäre sicherlich mit Chromatographien bei 4 °C zu erzielen gewesen, was im Rahmen dieser Arbeit wegen nicht vorhandener apparativer Voraussetzungen nicht möglich war. Auch dann wäre ein zweiter oder dritter Chromatographieschritt mit zunächst auf Aktivität getesteten Fraktionen voraussichtlich nicht möglich gewesen. Für die Entwicklung eines Reinigungsprotokolls, machte dieser starke Aktivitätsverlust eine schnelle Reinigung in möglichst wenigen Schritten notwendig.

Für die Anreicherung der 5'-Schneideaktivität wurden nur Ionenaustauscher verwendet. Eine Gelchromatographie wurde nicht eingesetzt, da der Reinigungsfaktor eines solchen Schrittes zu gering war. Da das im Aktivitätstest verwendete Substrat nur in der metastabilen, *in vitro* eingestellten ExM^{TL} -Struktur prozessiert wird, konnte kein affinitätschromatographisches Verfahren verwendet werden, bei dem das RNA-Substrat vorab an Säulenmaterial gekoppelt wird. Unter den Kopplungsbedingungen kann die aktive Konformation nicht erhalten werden. Die Einstellung der Struktur durch einen denaturierenden Schritt bei 95 °C und anschließender schneller Renaturierung bei -20 °C im Eis/Ethanol-Gemisch ist bei immobilisierter RNA schlecht möglich. Zudem wird die

RNA von den Prozessierungsenzymen nicht nur gebunden, sondern auch geschnitten und wieder freigesetzt, sodaß diese Anwendung ungeeignet erschien. Die Verwendung von Affinitätschromatographiematerialien für die Reinigung von Nukleinsäure-bindenden Proteinen wie Heparin oder Blue-Sepharose war auch nicht möglich, da Protein von diesen Materialien erst in Salzkonzentrationsbereichen von 400 mM - 800 mM eluiert. Bei diesen Salzbedingungen können nur sehr geringe Volumina im Aktivitätstest eingesetzt werden und die Proteinkonzentrationen wären für einen Aktivitätsnachweis zu gering.

3.4 Die RNase MRP-RNA-Konzentration ist nicht abhängig von einer Viroidinfektion

Frühere Experimente zeigten im Vergleich zur nicht PSTVd-infizierten *S. tuberosum*-Zellkultur eine Reduktion der MRP-RNA-Menge in der PSTVd-infizierten *S. demissum*-Kultur (Thiel, 1999). Um einen generellen viroidspezifischen Effekt nachzuweisen, wurden MRP-RNA-spezifische Northernanalysen von gesunden und PSTVd-infizierten Tomaten durchgeführt. Da ein Nachweis von MRP-RNA in Tomate mit der von Thiel (1999) verwendeten MRP-RNA-spezifischen Sonde nicht möglich war, wurde zunächst eine andere Sonde (MRP51) entwickelt. Sie ist ebenfalls nicht-homolog, sollte aber aufgrund ihrer Länge und ihres Sequenzabschnitts spezifischer sein (vgl. Kap. 1.9). Mit dieser neuen Sonde war nun tatsächlich ein Nachweis der MRP-RNA in Tomate möglich, wobei die Signale auch bei optimierten Hybridisierungsbedingungen nur schwach waren. Ein besserer Nachweis der MRP-RNA wäre nur mit der Kenntnis der MRP-RNA-Sequenz aus Tomate und einer homologen Sonde möglich gewesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde für Tomate im Gegensatz zu *S. demissum*, *S. tuberosum* und den in Kiss *et al.* (1992) beschriebenen Hybridisierungen gegen MRP-RNA aus *A. thaliana*, Tabak und Ratte eine Doppelbande nachgewiesen. Es wird generell angenommen, daß die RNA-Komponente der RNase MRP durch ein „single copy“ Gen kodiert wird (z.Ü. Clayton (1994); Morrissey & Tollervey (1995); Tollervey & Kiss (1997)). In der Literatur beschriebene Southern Blot Analysen wiesen darauf hin, daß es sich bei dem MRP-RNA-Gen in Tomate um ein „single copy“ Gen handelt. Es wurde aber auch eine zweite schwache Hybridisierungsbande beschrieben, die zu einem ähnlichen Gen oder einem Pseudogen gehören könnte (Kiss *et al.*, 1992). Zwei unterschiedlich lange MRP-RNAs in Tomate sind deshalb durchaus möglich und kein Artefakt. Sie könnten aber ebenfalls von einem „single copy“ Gen stammen und das Produkt eines alternativen Splittings sein.

Northernanalysen mit der MRP51-Sonde bestätigten die Reduktion der MRP-RNA in der PSTVd-infizierten *S. demissum*-Kultur im Vergleich zur gesunden *S. tuberosum*-Kultur. Northernanalysen an Gesamt-RNA aus PSTVd-infizierten und gesunden Tomatenpflanzen zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der MRP-RNA-Konzentration. Da bei genetisch identischen, gesunden und PSTVd-infizierten Tomaten keine deutliche Reduktion der MRP-RNA-Menge in den infizierten Pflanzen gezeigt werden konnte, kann davon ausgegangen werden, daß die Viroidinfektion keinen Einfluß auf den RNase MRP-RNA-Gehalt in den Pflanzenzellen hat. Die Annahme, daß es sich bei der Reduktion der MRP-RNA in der infizierten Kartoffelsuspensionskultur um einen viroidspezifischen Effekt handelt, ist aufgrund der Ergebnisse mit Tomate unwahrscheinlich. Es ist eher anzunehmen, daß unterschiedliche MRP-RNA-Menge in den beiden Kartoffelkulturen die genetische Varianz der zwei unterschiedlichen Arten widerspiegeln. Die Ergebnisse zeigten keinen Zusammenhang zwischen der MRP-RNA-Konzentration und der Viroidinfektion,

wenn auch wegen der geringen Signalintensität bei Hybridisierungen mit der MRP51-Sonde sehr geringe Unterschiede in der MRP-RNA Konzentration nicht nachweisbar waren.

3.5 Eine Beteiligung der RNase MRP an der Prozessierung ist fraglich

Aufgrund der Beteiligung der RNase MRP an der Prozessierung verschiedener nukleolärer RNAs und einer möglichen Basenpaarung zwischen der MRP-RNA aus *A. thaliana* und Tabak und der oberen zentralen konservierten Region von PSTVd wurde eine Beteiligung der RNase MRP an der Prozessierung von Viroiden diskutiert (Baumstark, 1997) und experimentell untersucht. Dazu wurde der Peptidyltransferaseinhibitor Puromycin eingesetzt, der die RNase MRP und die RNase P spezifisch hemmt (Potuschak *et al.*, 1993). Eine experimentell beobachtete Hemmung der *in vitro*-Prozessierung durch Puromycin wurde deshalb als ein Indiz auf die Beteiligung der RNase MRP an der Prozessierung gesehen (T. Baumstark, persönliche Mitteilung).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Abnahme an Prozessierungsprodukten bei zunehmenden Puromycinkonzentrationen nicht auf eine Puromycin-abhängige Hemmung, sondern auf eine unspezifische Hydrolyse der eingesetzten Substrat- und Produkt-RNAs durch Puromycin zurückzuführen war, was zur Zeit jedoch nicht erklärt werden kann. Es konnte keine spezifische Hemmung der Viroidprozessierung durch Puromycin nachgewiesen werden. Ein neben der starken unspezifischen Hydrolyse der RNA eventuell vorhandener spezifischer Hemmeffekt kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden.

Potuschak *et al.* (1993) beschreibt als einziger eine spezifische Hemmung der RNase MRP durch Puromycin. Die Interpretation seiner Daten durch eine unspezifische Hydrolyse von RNA ist jedoch ebenso möglich, wie durch seine Interpretation einer spezifischen Hemmung der RNase MRP durch Puromycin. Auch über den Effekt von Puromycin auf die RNase P ist nur wenig bekannt. So wurde bisher eine Hemmung der RNase P durch Puromycin nur in Maus (Potuschak *et al.*, 1993), *Tetrahymena thermophila* (True & Celander, 1996), humanen Mitochondrien (Rossmanith & Karwan, 1998), *E. coli* (Vioque, 1989) und *Dictyostelium discoideum* (Stathopoulos *et al.*, 2000) gezeigt. Die Ergebnisse lassen somit offen, ob die RNase MRP oder die RNase P an der Viroidprozessierung beteiligt sein könnten.

3.6 Die 5'-Schneide-, die 3'-Schneide- und die Ligationsaktivität werden von unterschiedlichen Enzymen vermittelt

Für die Charakterisierung des oder der an der Prozessierung beteiligten Enzyme wurde Kernextrakt der PSTVd-infizierten *S. demissum*-Zellkultur verwendet, der im Vergleich zur nicht-infizierten *S. tuberosum*-Kultur von Präparation zu Präparation nur leichte Aktivitätsschwankungen zeigte. Als Modellsubstrat wurde das mehr-als-Einheitslängen Transkript TB110 eingesetzt. Proteine wurden mittels chromatographischer Trennverfahren fraktioniert und die zu untersuchende Prozessierungsaktivität angereichert. Durch verschiedene Chromatographien, konnte zum Einen die Ligationsaktivität von den Schneideaktivitäten und zum Anderen die 5'- von der 3'-Schneideaktivität separiert werden.

Im Allgemeinen wird für *Pospiviroidae* angenommen, daß die Schnittreaktion von oligomeren (+)-Replikationsintermediaten enzymatisch durch eine Nuklease erfolgt. Sie enthalten keine Ribozymdomänen und *in vitro*-Prozessierung konnte nur anhand von (+)-strängigen, mehr-als-Einheitslängen PSTVd-Transkripten im Kernproteinextrakt nachgewiesen werden (Baumstark & Riesner, 1995). Unter proteinfreien Bedingungen, bei

denen andere autokatalytische RNAs geschnitten werden, prozessiert oligomere PSTVd-RNA nicht (Tsagris *et al.*, 1987). Andere Autoren vertreten jedoch eine autokatalytische Schnittreaktion für *Pospiviroidae*, wobei die RNA-Polymerase II während der Viroidsynthese die richtige Faltungsumgebung für die autokatalytisch aktive Struktur der RNA anbieten soll (Symons, 1997). So wurde eine 1-5% Konversion einer dimeren RNA zu einem monomeren Produkt nachgewiesen, wobei die Schnittstelle in der unteren zentralen konservierten Region zwischen den Nukleotiden 250 und 240 lokalisiert wurde (Robertson *et al.*, 1985). Allerdings konnten die Ergebnisse in nukleasefreien Extrakten nicht reproduziert werden (Tsagris *et al.*, 1987). Für das zu den *Pospiviroidae* gehörende Hop Stunt Viroid wurde eine mögliche Hammerhead-ähnliche Sekundärstruktur und damit eine autokatalytische Schnittreaktion postuliert, aber nicht experimentell bestätigt (Amari *et al.*, 2001). Auch für die Ligation zu Zirkeln wird angenommen, daß sie im Kernextrakt hauptsächlich enzymatisch verläuft. Eine mit geringer Effizienz stattfindende Autoligation war unter bestimmten proteinfreien Bedingungen auch nachzuweisen (Baumstark *et al.*, 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Separation einer Ligationsaktivität von den Schneideaktivitäten und die Separation der 5'- von der 3'-Schneideaktivität durch chromatographische Fraktionierungen von Kernproteinen bewies, daß alle drei Schritte enzymatisch vermittelt werden und zwar durch verschiedene Enzyme, die sich in der Chromatographie unterschiedlich verhalten. Die Ergebnisse sind in guter Übereinstimmung mit der Tatsache, daß eine autokatalytische Prozessierung experimentell niemals nachgewiesen wurde. Anhand der Ergebnisse kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Proteine nur für die Einstellung und Beibehaltung einer bestimmten Struktur notwendig sind und die eigentliche Schnitt- und Ligationsreaktionen doch autokatalytisch ablaufen.

Chromatographische Reinigungen von prozessierungsaktivem Protein führten zu starkem Aktivitätsverlust. Rekonstitutionsexperimente ließen aber in keinem Fall eine Aktivitätssteigerung oder eine Rekonstitution von Schneide- oder Ligationsaktivität nachweisen. Durch die verwendeten chromatographischen Trennverfahren wurden keine für die jeweilige Aktivität notwendigen Enzymuntereinheiten voneinander separiert und anschliessend rekonstituiert, sodaß davon ausgegangen werden kann, daß es sich eher um einzelne Enzyme als um Multienzymkomplexe handelt. Eine Größenabschätzung für das Enzym der 5'-Schneideaktivität mittels Gelchromatographie ergab ein Molekulargewicht zwischen 23-66 kDa, was wegen der eher geringen Größe ebenfalls nicht auf einen Multienzymkomplex hinwies.

In vitro-Prozessierungen von TB110 im Gesamtkernextrakt führten zum Nachweis von 5'- und 3'-geschnittenem L₂ und nur 3'-geschnittenem L₁. Im mechanistischen Modell der Viroidprozessierung wurde ein nur 5'-geschnittenes Zwischenprodukt vorgeschlagen, daß durch einen die Prozessierung einleitenden 5'-Schnitt entsteht (Baumstark *et al.*, 1997). Durch Prozessierung von TB110 in einem teilgereinigten Proteinextrakt konnte nun erstmals das nur 5'-geschnittene Zwischenprodukt (L₃) nachgewiesen werden, wodurch das Modell bestätigt wurde.

3.7 Verschiedene Ligationsaktivitäten im Kernextrakt

Zur Charakterisierung von Ligationsaktivität wurde neben dem mehr-als-Einheitslängen Transkript TB110 als Substrat ein PSTVd-Minimal-Transkript eingesetzt, das 5' mit G₉₆ beginnt und 3' mit G₉₅ endet (MinimalL₂). Ihm fehlen die PSTVd-Stäbchenarme außerhalb der zentralen konservierten Region. Ansonsten entspricht es dem in der Prozessierung

durch einen 3'- und einen 5'-Schnitt entstehendem L_2 (5'-G₉₆ - 3'-G₉₅) mit monomerer PSTVd-Länge. Ein entsprechendes Minimalkonstrukt (Minimal wt), das im Gegensatz zu Minimal L_2 noch die gleichen Duplikationen enthält wie TB110, ist ein aktives Substrat für die Prozessierung im Gesamtkernextrakt (vgl. Kap. 2.4.4). Es bildet die gleichen *in vitro* einstellbaren Sekundärstrukturmotive wie Vollängen-TB110 und auch die im mechanistischen Modell der Viroidprozessierung beschriebenen Strukturumlagerungen nach dem die Prozessierung einleitenden 5'-Schnitt sind gleich. Es gilt als Modell für die Prozessierung von TB110, da es die minimalen strukturellen Voraussetzungen für die Erkennung durch Wirtsfaktoren und die Prozessierung besitzt (Schrader, 2001).

Die Experimente zeigten eine Separation der Ligationsaktivität für durch Prozessierung von L_0 entstehendem L_2 und der Ligationsaktivität für durch *in vitro*-Transkription synthetisiertem Minimal L_2 . Dies läßt darauf schließen, daß unterschiedliche Enzymaktivitäten für die Ligation des Prozessierungszwischenprodukts L_2 und des Transkripts substrats Minimal L_2 verantwortlich sind. Da die dem Minimal L_2 fehlenden rechten und linken Stäbchenarme keinen Einfluß auf die Prozessierung haben (Schrader, 2001), liegt der einzige relevante Unterschied der beiden Ligationssubstrate in den chemischen Endgruppen am 5'-G₉₆ und 3'-G₉₅. Das Transkript Minimal L_2 besitzt 5' eine Triphosphatgruppe (5'-pppG₉₆) und 3' eine Hydroxylgruppe (G₉₅OH-3'). Die Separation der beiden Ligationsaktivitäten zeigte, daß das Prozessierungszwischenprodukt L_2 andere chemische Endgruppen besitzt als Minimal L_2 , die jedoch nicht bekannt sind. Weil pflanzliche RNA-Ligasen 2'3'-Zyklophosphat- und 5'-Hydroxyl- oder 5'-Phosphatgruppen benötigen und eine geringfügige autokatalytische Ligation von L_2 auf eine 2'3'-Zyklophosphatgruppe hinwies, wurde die Entstehung einer 2'3'-Zyklophosphatgruppe während der Prozessierung diskutiert, konnte experimentell jedoch nicht nachgewiesen werden (Baumstark (1997), T. Baumstark, persönliche Mitteilung). Die Endgruppen von G₉₆ und G₉₅ des durch die 3'- und 5'-Schnittreaktionen entstehenden Prozessierungszwischenprodukts L_2 sind unbekannt.

Die Trennung der beiden Ligationsaktivitäten weist darauf hin, daß das Prozessierungsintermediat L_2 andere chemische Endgruppen besitzt als das Transkript Minimal L_2 und sich der enzymatische Ligungsmechanismus der Prozessierungsprodukte von dem der Modifikation und Ligation einer 5'-Triphosphat- mit einer 3'-Hydroxylgruppe unterscheidet. Im Kernextrakt existieren also mindestens zwei unterschiedliche Ligationsaktivitäten, bzw. -mechanismen. Minimal L_2 ist damit kein Modell für die Ligation von L_2 in einem auf Ligationsaktivität angereicherten Proteinextrakt. Inwieweit es ein Modell für die Ligation im Gesamtkernextrakt ist, kann hier nicht entschieden werden. Es wird angenommen, daß der nukleäre Extrakt aktive Phosphatasen und Kinasen, sowie ausreichend ATP enthält, um die Enden für die Ligation geeignet zu modifizieren (Baumstark, 1997). Inwiefern eine solche Modifikation den natürlichen Prozessierungsmechanismus widerspiegelt ist unklar, obwohl eine enzymatische Modifikation der Enden als Schritt in diesem Mechanismus auch möglich ist.

3.8 5'-Schneideenzym der Prozessierung

3.8.1 Identifizierung von möglichen 5'-Schneideenzymen

Mit dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Protokoll zur Teilreinigung der 5'-Schneideaktivität konnte eine Reinigung um den Faktor 2500-5000 erzielt werden. Es wurden 14 dominante Proteinbanden angereichert, wobei davon ausgegangen wird, daß die gesuchte Aktivität durch die Anreicherung in den Hauptbanden und nicht im Untergrund

liegt. Die notwendige Vereinigung von mehreren, nach dem dritten Schritt auf Aktivität getesteten Präparationen für die Sequenzierungen und das ungetestete Vereinigen von Proben aus den vorherigen Chromatographieschritten erhöhte sicherlich den Hintergrund. Mit Hilfe von Markierungstransferexperimenten eines solchen teilgereinigten Proteinextrakts wurden acht Proteine identifiziert, die an das Prozessierungssubstrat TB110 binden. Dabei konnte kein Unterschied zwischen der Bindung an die prozessierungsaktive Konformation ExM^{TL} und an die nicht-prozessierungsaktive ExL nachgewiesen werden. Beide Substrate schienen vom 5'-Schneideenzym erkannt und gebunden zu werden, was im Widerspruch zu der Modellvorstellung steht, daß nur die ExM^{TL} -Konformation von Wirtsenzymen erkannt und geschnitten wird. Aufgrund des experimentellen Ansatzes kann jedoch keine Aussage über mögliche Unterschiede in der Bindungsstärke und Bindungsspezifität getroffen werden.

Mit der Methodik des Markierungstransfers wurden inzwischen auch verschiedene Wirtsproteine detektiert, die mit dem Avocado Sunblotch Viroid wechselwirken. Massenspektrometrische Analysen der Proteine mit dem stärksten Quervernetzungssignal, identifizierten zwei ähnliche Chloroplasten-RNA bindende Proteine (PARBP33, PARBP35) einer Proteinfamilie, die in die Stabilisation, die Maturation und das Editing von chloroplastidären Transkripten involviert sind. Es wird angenommen, daß diese Proteine als RNA-Chaperone wirken und das Hammerhead-vermittelte Selbstschneiden der multimeren ASBVd-RNA erleichtern (Daros & Flores, 2002).

Die Teilreinigung der 5'-Schneideaktivität ergab mehrere angereicherte Proteinbanden, die ansequenziert wurden. Durch den Vergleich der Molekulargewichte der angereicherten Proteine mit den Molekulargewichten der im Markierungstransfer als TB110-bindend detektierten Proteinen, wurden mögliche 5'-Schneideenzyme identifiziert. Da für die Prozessierungsaktivität nach Gelchromatographie in der SDS-PAGE ein Molekulargewicht zwischen 23 und 66 kDa bestimmt wurde, kamen nur Proteine in diesem Größenbereich in Frage. Ein 56 kDa Protein war dabei das einzige, durch die Reinigung der 5'-Schneideaktivität angereicherte Enzym, für das sich durch eine Bindung an TB110 ein zusätzlicher Hinweis auf seine Beteiligung an der Prozessierung ergab und das durch Sequenzierung als eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase identifiziert werden konnte.

Homologiesuchen der sequenzierten Peptidfragmente des 56 kDa Proteins gegen Datenbanken (nr) ergaben die besten drei Alignments für Sequenzbereiche von Klonen des Chromosoms 3 aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenzen wurden von den Autoren im Rahmen des *Arabidopsis*-Genomprojektes erhalten und als multifunktionale Aminoacyl-tRNA-Synthetasen identifiziert. Sie existieren als reine „direct submission“-Datenbankeinträge und sind nicht näher beschrieben. Der Begriff multifunktional wird in diesem Zusammenhang für Aminoacyl-tRNA-Synthetasen mit Aktivitäten für die Beladung von verschiedenen tRNAs mit ihren jeweils dazugehörigen Aminosäuren verwendet. Homologiesuchen dieser Aminoacyl-tRNA-Synthetase-Proteinsequenzen aus *A. thaliana* gegen Datenbanken (nr und ausschließlich Swissprot) ergeben die besten Alignments gegen Prolyl- und Prolyl-Glutamyl-tRNA-Synthetasen. Es zeigten sich aber auch, nicht so gute, Homologien gegen Threonyl- und Histidyl-tRNA-Synthetasen. Die nach den *Arabidopsis*-Sequenzen nächstbesten Homologien für die Peptidfragmente des 56 kDa Proteins sind eine aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Prolyl-tRNA-Synthetase aus *Sacharomyces cerevisiae* und ein ebenfalls als multifunktionales tRNA-Synthetase-Homolog beschriebenes Protein aus *S. cerevisiae*. Zusammenfassend wird es sich beim 56 kDa Protein am ehesten um eine Prolyl- oder auch Prolyl-Glutamyl-tRNA-Synthetase handeln. Die bekannten Sequenzbereiche sind jedoch zu kurz, um eine genaue Zuordnung zu einer bestimmten Aminoacyl-

tRNA-Synthetase zu treffen. Zudem ist die *Arabidopsis*-Sequenz die einzige pflanzliche Sequenz einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase in den Datenbanken.

Für die 46, 23 und 17 kDa Proteine, die durch Sequenzierungen und Homologievergleiche nicht identifiziert werden konnten, ist eine Beteiligung an der Prozessierung jedoch nicht völlig auszuschließen, weil bei 44, 25, 21, 19 und 14 kDa Signale im Markierungstransfer nachweisbar waren. Obwohl es anhand der Ergebnisse möglich wäre, daß auch ein anderes Enzym den 5'-Schnitt vermittelt, beschränkt sich die folgende Diskussion auf die Aminoacyl-tRNA-Synthetase.

3.8.2 Aminoacyl-tRNA-Synthetasen als Splicingfaktoren für Group I Introns

Aufgrund der zuvor beschriebenen Gründe könnte eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase am 5'-Schnitt der Prozessierung beteiligt sein. Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (aaRS) sind für die spezifische Anheftung einer jeden Aminosäure an ihre entsprechende tRNA verantwortlich. Sie werden in zwei Familien mit je zehn Mitgliedern eingeteilt, die durch zwei unterschiedliche Sets von konservierten Aminosäuremotiven im aktiven Zentrum für die Aminosäureaktivierung und Aminoacyl-tRNA Synthese eingeteilt werden (Yarus & Illangasekare, 1999; Ribas de Pouplana & Schimmel, 2000).

Neuere Untersuchungen zeigten, daß diese klassische Enzymfamilie auch ein breites Repertoire anderer Funktionen besitzt. Spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetasen spielen z.B. eine Rolle in der tRNA-Prozessierung, im RNA-Splicing und im RNA-Transport. Einige aaRSs binden spezifisch mRNA und DNA und sind an ihrer eigenen Transkriptions- und Translationsregulation beteiligt. Sie haben eine Funktion als Splicingfaktoren für Group I Introns (zur Übersicht: Francklyn *et al.* (1997); Martinis *et al.* (1999a,b)).

Group I Introns vermitteln das Splicing von RNA, können aber auch einzelsträngige DNA schneiden. In einem ersten Schritt des Self-Splittings bindet exogenes Guanosin oder GTP an die G-Site und schneidet an der 5'-Splice-Site. Für den zweiten 3'-Splicing-Schritt, nimmt dann das 3'-terminale Guanosin des Introns den Platz an der G-Site ein, wird 3'-seitig vom Guanosin geschnitten und das Exon ligiert. Die Schnittstelle des einleitenden 5'-Schnitts wird dabei durch ein G:U-Wobblebasenpaar definiert. Die meisten Group I Introns benötigen für ihre Aktivität divalente Kationen, die in die Faltung der aktiven Struktur und / oder in die Chemie des aktiven Zentrums involviert sind. Group I Introns können *in vitro* autokatalytisch selbstschneiden, benötigen *in vivo* jedoch Proteinfaktoren, die die Faltung der RNA in die katalytisch aktive Struktur unterstützen.

Als wirtskodierte Splicingfaktoren für Group I Introns sind z.B. eine mitochondriale Tyrosyl-tRNA Synthetase (TyrRSs) aus *Neurospora crassa* (Akins & Lambowitz, 1987) und *Podospira anserina* (Kämper *et al.*, 1992) und eine Leucyl-tRNA Synthetase (LeuRS) aus *Service cerevisiae* (Herbert *et al.*, 1988; Labouesse, 1990) beschrieben (zur Übersicht: Dujardin & Herbert (1997); Cech & Golden (1999); Lambowitz *et al.* (1999)). Tertiärstrukturvoraussagen zeigten, daß Group I Introns Struktur motive von tRNA-ähnlichen Domänen besitzen (Caprara *et al.*, 1996a). Die Tyrosyl-tRNA-Synthetase aus *Neurospora crassa* erkennt ein konserviertes tRNA-ähnliches Strukturmotiv im aktiven Zentrum von mitochondrialen Group I Introns (Caprara *et al.*, 1996a; Mohr *et al.*, 2001) und induziert die Bildung der korrekten Tertiärstruktur des aktiven Zentrums des Group I Introns (Caprara *et al.*, 1996b; Chen *et al.*, 2000). Es wird angenommen, daß der Mechanismus der Intronbindung ähnlich zum Mechanismus der tRNA Bindung ist (Kittle *et al.*, 1991).

3.8.3 Erkennung der prozessierungsaktiven, metastabilen Struktur ExM^{TL} durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Das Transkript TB110 ist nur in seiner metastabilen ExM^{TL} -Struktur prozessierungsaktiv. Es bildet eine in der zentralen konservierten Region stark verzweigte Sekundärstruktur, die ein GAAA-Tetraloop-Motiv enthält. In direkter Nachbarschaft dieses Tetraloops liegt die 5'-Schnittstelle an einem G:U-Wobble-Basenpaar. GNRA-Tetraloops dienen als Erkennungsmotive für die Wechselwirkung mit Proteinen oder RNA. Sie sind als Wechselwirkungspartner für intra- und intermolekulare RNA-RNA-Interaktionen beschrieben und besitzen eine ungewöhnliche thermodynamische Stabilität (zur Übersicht: Jucker & Pardi (1995); Varani (1995)). Der Tetraloop in der ExM^{TL} -Struktur wurde deshalb als Erkennungsmotiv für die Bindung von Wirtsfaktoren diskutiert, welche die Prozessierung vermitteln. Das G:U-Wobble-Basenpaar soll der Erkennung und Lokalisation der Schnittstelle dienen (Baumstark *et al.*, 1997).

Aus neueren Mutationsanalysen bezüglich der Sekundärstrukturbildung und Prozessierungsaktivität *in vitro* wurde jedoch abgeleitet, daß der GAAA-Tetraloop der ExM^{TL} -Struktur nicht direkt als Erkennungsmotiv für einen Wirtsfaktor dient, sondern vielmehr als essentielles Strukturmotiv für die kinetische Bildung der metastabilen Substratkonformation. Seine konkrete Sequenz ist variabel, sofern sie die Tetraloop-Konsensussequenz GNRA besitzt. Er gilt als Faltungsnukleus für die Initiation des richtigen Faltungsweges. Auch wurde für das G:U-Wobble-Basenpaar an der 5'-Schnittstelle gezeigt, daß es zwar wesentlich zu deren effizienter Erkennung beiträgt, jedoch nicht direkt durch ein Protein erkannt zu werden scheint (Schrader, 2001).

Die ExM^{TL} -Struktur besitzt einen großen, zentralen Verzweigungsloop mit nur einem ungepaarten Nukleotid von dem sechs Helices ausgehen. Sie ähnelt damit auf Sekundärstrukturebene der Kleeblattstruktur von tRNAs, für welche die Bildung einer L-förmigen Tertiärstruktur bekannt ist. Das native, stäbchenförmige Viroid bildet keine Tertiärstruktur. Es gibt jedoch keine Untersuchungen zur Tertiärstruktur der ExM^{TL} -Konformation. Vorausgesetzt, die ExM^{TL} -Struktur würde Tertiärstrukturkontakte besitzen und würde eine tRNA-ähnliche L-Struktur bilden, könnte sie durchaus von tRNA-Synthetasen gebunden werden. Für solche Tertiärstrukturkontakte wäre die Beteiligung des GAAA-Tetraloops wahrscheinlich, da intramolekulare GNRA-Tetraloop-Helix-Wechselwirkungen zwischen weit entfernten Bereichen der Sekundärstruktur von Group I und Group II Introns, sowie in der RNase P beschrieben sind. Sie stabilisieren die Tertiärstruktur durch Wechselwirkung mit Tetraloop-Rezeptoren, die eine sequenzspezifische Bindungsoberfläche für GNRA-Tetraloops besitzen (Abramovitz & Pyle, 1997). Mit dieser Überlegung kann jedoch nicht erklärt werden, daß in den Markierungstransferexperimenten keine Unterschiede in der Bindung der verzweigten ExM^{TL} - und der stäbchenförmigen ExL -Struktur gezeigt werden konnten. Die Interpretation dieses Ergebnisses ist offen.

3.8.4 Vermittlung des 5'-Schnitts der Prozessierung durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen

Wenn tatsächlich eine Aminoacyl-tRNA-Synthetase an dem 5'-Schnitt der Viroidprozessierung beteiligt sein sollte, ließe sich folgender Mechanismus postulieren. Die metastabile, ExM^{TL} -Konformation besitzt, wie auch Group I Introns, eine tRNA-ähnliche Tertiärstruktur und wird von einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase gebunden. Diese fungiert als Splicingfaktor und der 5'-Schnitt am G:U Wobble-Basenpaar erfolgt mechanistisch vergleichbar zum 5'-Schnitt des Group I Intron Splicings. Diese Diskussion ist aber aus

folgenden Gründen spekulativ. Die vorliegende Arbeit konnte die Möglichkeit der Beteiligung einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase an der 5'-Schneideaktivität zeigen. Sie konnte jedoch nicht sicher ausschließen, daß ein anderes, nicht identifiziertes Enzym für diese Aktivität verantwortlich ist. Zudem liegen keine Daten über eine mögliche tRNA-ähnliche Tertiärstruktur der prozessierungsaktiven ExM^{TL}-Konformation vor. Auch das für einen Group I Intron Splicing-Mechanismus notwendige Nukleophil Guanosin oder GTP wirft die Frage auf, ob ein solcher Mechanismus tatsächlich den 5'-Schnitt der Prozessierung vermittelt. Es kann im Gesamtkernextrakt vorliegen, nach den Chromatographieschritten ist es aber allenfalls stark abgereichert vorhanden. Die beschriebenen Systeme zum Aminoacyl-tRNA-Synthetase vermittelten Group I Intron Splicing wurden anhand von mitochondrialen RNAs untersucht. Der 5'-Schnitt der Prozessierung findet dagegen im Nukleus statt, wo Aminoacyl-tRNA-Synthetasen aber auch lokalisiert sind (Ribas de Pouplana & Schimmel, 2000). Als Hinweis für einen solchen Mechanismus spricht, daß für die Einstellung der prozessierungsaktiven Konformation ExM^{TL} Mg²⁺-Ionen notwendig sind. Sie müssen für eine effiziente *in vitro*-Prozessierung auch im Reaktionspuffer vorliegen. Zweiwertige Kationen fungieren auch in der Struktureinstellung des aktiven Zentrum von Group I Introns. Außerdem wird die Prozessierungsschnittstelle, wie bei Group I Introns, durch ein G:U-Wobblebasenpaar determiniert. Eine zukünftige Klonierung der identifizierten Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Kartoffel und *in vitro*-Prozessierungsuntersuchungen mit gereinigtem, überexprimiertem Protein könnten die Beteiligung dieses Enzyms an der Prozessierung nachweisen oder widerlegen.

4 Material

4.1 Sterilisation von Geräten und Reaktionsgefäßen

Alle verwendeten Glasgeräte wurden für 4 h bei 180 °C hitzesterilisiert. Kunststoffgefäße und Pipettenspitzen wurden, sofern sie nicht steril gekauft wurden, für 20 min bei 121 °C autoklaviert.

4.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel entsprachen dem Reinheitsgrad *pro analysis* und wurden von den üblichen Herstellern für Laborchemikalien bezogen.

4.3 Puffer und Lösungen

Lösungen wurden mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Hausanlage für deionisiertes Wasser mit nachgeschaltetem Wasseraufreinigungssystem EPA Est. 41237-MA-1, Millipore GmbH, Neu Isenburg) angesetzt und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen und Lösungen für die Chromatographie wurden mit autoklaviertem Wasser angesetzt und durch Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm (ME 24 ST, Schleicher & Schuell, Dassel) filtriert. Wird im Text die Bezeichnung H₂O verwendet, steht sie für autoklaviertes Milli-Q-Wasser. Alle Lösungen zu Gelfärbungen wurden nicht autoklaviert oder sterilfiltriert.

Phenol wurde mit 100 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA gesättigt und mit 0,1% Hydroxychinolin versetzt. Chloroform wurde mit 1/24 Volumen Isoamylalkohol angesetzt (Sambrook *et al.*, 1989). Diese Lösungen werden verkürzt als Phenol und Chloroform bezeichnet.

Prozentuale Angaben beziehen sich, wenn es nicht anders angegeben ist, auf eingewogenes Gewicht pro Gesamtvolumen (w/v). Die Zusammensetzung häufig benutzter Puffer wird im folgenden aufgeführt. Weitere Lösungen werden in den Beschreibungen der entsprechenden Methoden vorgestellt.

1 x TE (TE)	10 x Laemmli-Puffer
10 mM Tris-HCl	500 mM Tris-HCl
1 mM EDTA	380 mM Glycin
pH 8.0	pH 8.3
10 x TBE	10 x TAE
890 mM Tris-HCl	400 mM Tris-HCl
890 mM Borsäure	200 mM Essigsäure
25 mM EDTA	10 mM EDTA
pH 8.3	pH 8.4

4.4 Bakterienstämme und Vektoren

Die „low copy“ Plasmide pTB110 und pTB310 sind im Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5αF^c kloniert. Der genetische Marker dieses Stammes ist: SupE44ΔlacU169-(ϕ80lacZΔM15)hsdR17recA1endA1gyra96thi-1relA1 (Hanahan, 1983). Alle Plasmide ent-

halten einen $\phi 10$ -Promotor für die T7-RNA-Polymerase zur *in vitro*-Transkription. Das Plasmid TB110 enthält die DNA-Sequenz zur Transkription eines mehr-als-Einheitslängen PSTVd-Transkripts. Es ist 381 Nukleotide lang und besteht aus 359 Nukleotiden der Einheitslänge des PSTVd-Monomers, 17 Nukleotiden Sequenzduplikation der UCCR und fünf Nukleotiden Vektorsequenz. Beginnend mit einem vektorspezifischen G am 5'-Ende folgen 376 PSTVd-spezifische Nukleotide von G₈₀ über 1/359 bis G₉₆, sowie nochmals vier Vektornukleotide. Das Plasmid pTB310 enthält zwei weitere PSTVd-Einheiten von jeweils 359 Nukleotiden zwischen Nukleotid 359 und Nukleotid 1 (Baumstark & Riesner, 1995; Baumstark, 1997), (vgl. Abb. 3).

Die Synthese von Minimal L2-RNA erfolgte durch Transkription von PCR-Produkten, die mir von Herrn O. Schrader zur Verfügung gestellt wurden. Minimal L2 beginnt mit 5'-G₉₆ und endet mit 3'-G₉₅. Es besteht nur aus der zentralen konservierten Region des PSTVd. Der linke Bereich des PSTVd ist bis C₆₉ / G₂₈₉ und der rechte bis G₁₂₅ / C₂₃₆ deletiert. C₆₉ und G₂₈₉, sowie G₁₂₅ und C₂₃₆ sind jeweils mit einer CUUCGG-Loopsequenz verbunden (Schrader, 2001).

4.5 DNA-Oligonukleotide

Das DNA-Oligonukleotid MRP51 wurde von der Firma Interactiva Biotechnologie GmbH (Ulm) in HPLC-gereinigter Form bezogen und hat folgende Sequenz: 5'-GCA-TCT-CTG-CGG-ATA-AGT-GGC-CCG-GGG-ACT-TTC-CTG-GGT-CGG-AAC-TTG-GAC-3'. Sie entspricht dem in Kiss *et al.* (1992) beschriebenen Sequenzabschnitt 41-91 der MRP-RNA aus *A. thaliana* (Accession Number: X65942).

4.6 Kartoffelzellkulturen

Für die Isolation von Zellkernen wurden zwei verschiedene permanente Kartoffelsuspensionskulturen verwendet: Die nicht-infizierte Zelllinie *Solanum tuberosum* HH258 (Behnke, 1975) und die PSTVd-intermediate (Wildtyp) infizierte Zelllinie *Solanum demissum* M316 PSTVd (Mühlbach & Sängler, 1981). Beide Zelllinien sind im Institut als Kallus- und Suspensionskulturen etabliert.

4.7 PSTVd-Rohextrakt

PSTVd-Rohextrakte zur Infektion von Tomatenpflanzen wurden aus infizierten Pflanzenblättern nach der in Riesner *et al.* (1987) beschriebenen Methode von Herrn B. Esters hergestellt. Dabei wurde RNA von niedrigem Molekulargewicht, einschließlich PSTVd, aus einem Phenolextrakt des infizierten Blattmaterials durch fraktionierte Fällungen gewonnen. Durch Anionenaustauscherchromatographie wurde dieses RNA-Gemisch getrennt und Viroid konnte als saubere Fraktion isoliert werden.

5 Methoden

5.1 Allgemeine Methoden

5.1.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Zur Bestimmung von Gesamtproteinkonzentrationen in heterogenen Gemischen wurde ein Bradford-Assay durchgeführt. Hierzu wurden 100 μl Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Reagenz vermischt, 20 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption (OD) bei 595 nm im Spektralphotometer (DU 640, Beckmann Instruments Inc., CA, USA) bestimmt. Anhand verschiedener BSA-Konzentrationen wurde eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe die unbekannte Proteinkonzentration errechnet wurde. Es konnten Konzentrationen von Proteinlösungen mit mindestens 20 ng/ μl bestimmt werden (Bollag *et al.*, 1996).

Bradford-Stammlösung		Bradford-Reagenz	
100 ml	95% Ethanol	15 ml	95% Ethanol
200 ml	88% Phosphorsäure	30 ml	88% Phosphorsäure
350 mg	Serva Blue G	30 ml	Bradford-Stammlösung
		425 ml	H ₂ O

Waren nach Proteinreinigungsschritten durch chromatographische Trennverfahren nur geringe Proteinmengen in kleinen Volumina vorhanden, wurden Proteinkonzentrationen spektralphotometrisch durch eine Absorptionsmessung bei 280 nm abgeschätzt. Es wurde zugrunde gelegt, daß 1 OD₂₈₀ einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml entspricht (Bollag *et al.*, 1996).

5.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen in Lösung wurde mit einem Spektralphotometer (DU 640, Beckmann Instruments Inc., CA, USA) die UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration wurde nach Sambrook *et al.* (1989) folgende Beziehung verwendet: Eine Absorption von 1 OD₂₆₀ entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNA und 33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA-Oligonukleotid. Durch das Verhältnis der Absorption bei 260 zu 280 nm konnte die Reinheit der Nukleinsäure nach Plasmidpräparationen bestimmt werden.

Nukleinsäurekonzentrationen in Proteinextrakten wurden bei bekannter Proteinkonzentration (Bradford-Assay) durch die Messung der Absorptionen bei 260 und 280 nm anhand des Nomographen in Bollag *et al.* (1996) abgeschätzt. Es liegt folgende Beziehung zugrunde: Proteinkonzentration (mg/ml) = 1,5 x A₂₈₀ - 0,75 x A₂₆₀.

5.1.3 Ethanol-Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Präzipitation von Nukleinsäuren erfolgte, wenn nicht anders angegeben, durch Einstellung der Lösung auf 300 mM NaOAc, Zugabe von 2,5 Volumen -20 °C kaltem 96% Ethanol, 30 min Inkubation auf Eis und Pelletierung durch 30-60 min Zentrifugation bei 4 °C und 12000 rpm (Tischzentrifuge). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet mit 1 Volumen 70% Ethanol gewaschen, 10 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 12000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge). Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet kurz an der Luft getrocknet und in einem geeigneten Puffer resuspendiert.

Nach enzymatischen Reaktionen mit radioaktiven Mononukleotiden (vgl. Kap. 5.4.4, 5.4.3) oder nach Dephosphorylierung von Restriktionsfragmenten von pBR322 (vgl. Kap. 5.4.2) wurde die Nukleinsäure zwei mal aus 2,5 M NH_4OAc (Zugabe von 0,5 Volumen 7,5 M NH_4OAc) und 20 mM MgCl_2 mit 2,5 Volumen 96% Ethanol oder Isopropanol präzipitiert. Die Fällung von Mononukleotiden wurde so vermindert.

5.1.4 TCA-Präzipitation von Proteinen

Zur Konzentrationserhöhung von Proteinlösungen zur Gelelektrophorese wurde eine Trichloressigsäure-Präzipitation (TCA) durchgeführt. Protein wurde dabei denaturiert. Zu 500 μl Proteinlösung wurden 50 μl 100% TCA gegeben, gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Durch 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 12000 rpm (Tischzentrifuge) wurden die Proteine pelletiert und der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Das Pellet wurde zweimal mit 500 μl eiskaltem Aceton ohne zu schütteln gewaschen und erneut für 10 min bei 4 °C und 12000 rpm zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde restliches Aceton durch kurzes Erwärmen des Reaktionsgefäßes auf 40 °C verdampft und das Pellet im benötigten Volumen 1 x Laemmli-Auftragspuffer resuspendiert (vgl. Kap. 5.5.3).

5.1.5 Phenol/Chloroform-Extraktionen

Um wässrige Nukleinsäurelösungen von Protein zu befreien, wurden Phenol/Chloroform-Extraktionen durchgeführt. Die zu reinigende Lösung wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform (1:1) versetzt und 1 min auf einem Vortex geschüttelt. Proben in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen wurden zur Phasentrennung 10 min bei 12000 rpm (Tischzentrifuge) und Proben in 50 ml-Falcon-Gefäßen für 30 min bei 4500 g (3850 rpm, Beckmann C PKR) zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde ohne Interphase abgenommen. Anschließend wurde die Lösung Chloroform extrahiert, um eventuelle Phenolreste zu entfernen. Es wurde 1 Volumen Chloroform zugegeben, gut gemischt und für 5 min bei 12000 rpm (Tischzentrifuge), bzw. 20 min bei 3850 rpm (Beckmann C PKR) zentrifugiert. Die wässrige Phase mit der gereinigten Nukleinsäure wurde zur weiteren Verwendung abgenommen.

5.1.6 Struktureinstellung von *in vitro*-Transkripten

In vitro-Transkripte wurden für Prozessierungsreaktionen (vgl. Kap. 5.4.5) in die ExM^{TL} - und für Markierungstransferexperimente (vgl. Kap. 5.10) in die ExM^{TL} - und die ExL -Konformation eingestellt (Baumstark & Riesner, 1995; Baumstark, 1997). Die metastabile ExM^{TL} -Struktur wurde durch Denaturierung der Transkripte (max. 50 μl -Ansätze mit max. 20 ng/ μl , bzw. 5×10^5 cpm/ μl Transkript) im TE-Puffer (Niedrigsalzpuffer) für 4 min bei 96 °C und anschließender schneller Renaturierung in -20 °C-Ethanol eingestellt („snap cooling“). Zur Einstellung der thermodynamisch optimalen Struktur ExL wurden Transkripte, wie zuvor beschrieben, zunächst nach Denaturierung bei 96 °C durch „snap cooling“ in die ExM^{TL} -Konformation eingestellt. Anschließend wurde die Probe auf 500 mM NaCl, 4 M Harnstoff, 1 mM Natrium-Kakodylat, 0,1 mM EDTA eingestellt und für 45 min bei 40 °C inkubiert. Über Nacht erfolgte eine langsame Renaturierung, indem die Probe in einem auf 40 °C temperierten Heatblockeinsatz in einer Styroporummhüllung über Nacht bei RT stehen gelassen wurde. Zur Einstellung definierter Salzbedingungen wurden Transkripte in der ExL -Konformation zuletzt auf Nitrozellulose-Schwimmfiltern (0,025 μm , Type VSWP, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) für 1 h auf Eis gegen 20 ml TE-Puffer dialysiert.

5.2 Biologische Systeme

5.2.1 Anzucht von *Escherichia coli* zur Plasmidpräparation

Zur Anzucht von *E. coli* für die Präparation von „low copy“ Plasmiden wurden Bakterien einer bei -70°C gelagerten Stammkultur auf LB Platten mit $50\ \mu\text{g}$ Ampicillin vereinzelt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus einer Kolonie wurde eine 8 ml LB Vorkultur mit $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm (Rundschüttler Gio Gyrotory, New Brunswick Scientific, Nürtingen) inkubiert. Morgens wurde diese Vorkultur in 800 ml TB Medium mit $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin überführt. Nach weiteren 8 h Wachstum (37°C , 200 rpm) wurden zur Plasmidvermehrung 4 ml Chloramphenicol ($34\ \text{mg}/\text{ml}$ in EtOH) zugegeben und nach weiterer Inkubation über Nacht (37°C , 200 rpm) konnten die Zellen für Plasmidpräparationen geerntet werden (vgl. Kap. 5.3.1).

LB Medium	TB Medium
10,0 g/l Bacto-Trypton	2,31 g/l KH_2PO_4
5,0 g/l Hefeextrakt	12,53 g/l K_2HPO_4
10,0 g/l NaCl	12,0 g/l Bacto-Trypton
pH 7.5 mit NaOH	24,0 g/l Hefeextrakt
	4 ml/l Glyzerin
LB Platten	
LB Medium	
15,0 g/l Agar	

5.2.2 Kultivierung von Kartoffelzellkulturen

Die Kultivierung der Kartoffelsuspensionskulturen HH258 und M316 PSTVd erfolgte in einem nach Mühlbach & Sänger (1981) verändertem Kulturmedium von Murashige & Skoog (1962) (Tab. 3). Es enthält neben verschiedenen anorganischen Komponenten die Vitamine Nikotinsäure und Pyridoxin-HCl, sowie 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Adeninsulfat, Saccharose und Kokosnußwasser (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Für die Langzeitkultivierung der Kalluskulturen wurde diesem Medium 1,2 % Bactoagar oder Gelrite zugefügt. Die Flüssigkulturen wurden in mit Silikosestopfen verschlossenen Kulturkolben im Dunkeln bei 24°C und 150 rpm (Durchmesser der gyrotorischen Umlaufbahn: 25,4 mm) in einem Klimakammerschuttler (Modell G25KC oder Innova 4330, New Brunswick Scientific, Nürtingen) inkubiert. Die Kalluskulturen wurden im Dunkeln bei 25°C inkubiert (25°C Raum im Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, Herr Prof. Alfermann).

Alle im folgenden beschriebenen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die verwendeten Glas- und Metallgeräte wurden mindestens vier Stunden bei 200°C ausgeheizt und die Silikoseverschlustopfen der Kulturkolben autoklaviert. Das Medium wurde zunächst ohne das Kokosnußwasser angesetzt, mit Kaliumhydroxid auf pH 5.8 eingestellt, autoklaviert und bei 4°C aufbewahrt. Vor dem ersten Gebrauch wurde dem Medium das Kokosnußwasser über eine Spritze mit aufgesetztem Sterilfilter ($0,2\ \mu\text{m}$ Porengröße, FP030/3, Schleicher und Schuell, Dassel) zugefügt. Für die Kalluskulturen wurde

Tabelle 3: Kulturmedium der Zellkulturen.

Komponente	Konzentration	
NH ₄ NO ₃	1650,0	mg/l
KNO ₃	1900,0	mg/l
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	490,0	mg/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	370,0	mg/l
KH ₂ PO ₄	170,0	mg/l
KJ	830,0	µg/l
H ₃ BO ₄	6,3	mg/l
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	22,3	mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8,6	mg/l
Na ₂ MoO ₂ x 2 H ₂ O	250,0	µg/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	25,0	µg/l
CoSO ₄ x 6 H ₂ O	25,0	µg/l
Na-EDTA	37,3	mg/l
FeSO ₄ x H ₂ O	27,8	mg/l
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	1,0	mg/l
Nikotinsäure	0,5	mg/l
Pyridoxin-HCl	0,5	mg/l
Adeninsulfat	40,0	mg/l
Kokosnußwasser	25,0	ml/l
Sacharose	30,0	g/l
pH 5.8 mit KOH		

diesem Medium vor dem Autoklavieren noch 1,2% Bactoagar (Sigma, Steinheim) oder 1,2% Gelrite (Roth, Karlsruhe) zugegeben und das Kokosnußwasser vor dem Gießen in zylindrische Polycarbonatdosen (d = 68 mm, h = 66 mm, Greiner GmbH, Frickenhausen) in das auf etwa 60 °C abgekühlte Medium sterilfiltriert.

Alle vier (HH258) bis sechs (M316 PSTVd) Wochen wurde zur Erhaltung der Kalluskultur ein Teil des neu gewachsenen Kallus auf frisches Nährmedium umgesetzt. Ausgehend von der Kalluskultur wurde eine Suspensionskultur angelegt, indem ein Kallusstück von etwa ein bis zwei Zentimeter Durchmesser in einen 100 ml Kulturerlenmeyerkolben mit 20 ml Flüssigmedium überführt und die Zellen mit Hilfe eines Spatels vereinzelt wurden. In einer Anlaufphase von zwei bis vier Wochen, in der sich die Zellzahl kaum erhöhte, wurde altes Medium durch Dekantieren entfernt und durch Frisches ersetzt. Danach erreichten die Kulturen ein Verdopplungsintervall von etwa einer Woche und konnten alle sieben Tage eins zu eins mit frischem Kulturmedium verdünnt werden, bis eine Kulturgröße von 100 ml in einem 500 ml Kulturerlenmeyerkolben erreicht war. Auf dieser Kulturgröße wurden die Suspensionskulturen stabil kultiviert, indem alle sieben Tage von der M316 PSTVd Kultur 50 ml abgenommen und durch 50 ml frisches Nährmedium ersetzt wurden. Von der etwas schneller wachsenden HH258 Kultur wurden alle sieben Tage 55 ml entnommen und durch 55 ml Medium ersetzt. Für Zellkernpräparationen (vgl. Kap. 5.3.2) wurden die Kulturen in 1 l Kulturelenmeyerkolben auf 200 ml gebracht und drei bis vier Tage nach der Verdünnung in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet.

5.2.3 Anzucht und PSTVd-Infektion von Tomatenpflanzen

Tomatenpflanzen (*Lycopersicon esculentum* der Handelssorte „Rutgers“) wurden im Gewächshaus bei einer Tagestemperatur zwischen 26 und 35 °C und einer nächtlichen Absenkung um 8 bis 10 °C angezogen. Während der Wintermonate wurden die Pflanzen zusätzlich zum Tageslicht mit 400 W (Natrium-Hochdrucklampen, SON-T 400) beleuchtet (September / Oktober, sowie März / April: 6.00-10.00 und 16.00-20.00 h Uhr, November-Februar: 6.00-11.00 und 14.00-20.00 Uhr). Die Pflanzen wurden 2-3 Wochen nach der Aussaat im Vierblattstadium pikiert und weitere 1-2 Wochen später bei einer Größe von etwa 10 cm mit dem PSTVd-Stamm RG1 infiziert. Zur Inokkulation wurden die Primärblätter mit Siliciumcarbid (Carborundum 320, Butzbacher Schleifmittelwerke) aus einem Salzsteuber bestäubt und ein Nukleinsäurerohextrakt aus PSTVd-infizierten Tomatenpflanzen mit einem Pinsel feste aufgetragen. Pro Pflanze wurden 12,5 ng PSTVd in 400 µl Inokkulationspuffer (2% K₂HPO₄, 1% Bentonit) verwendet. Durch die Reibung der Carborundum-Körner wurden kleine Verletzungen der Blattoberfläche erzeugt, über die die PSTVd-Infektion erfolgte. Nach einer Einwirkzeit von etwa 5-10 min wurden die Blätter mit Wasser abgespült. Die Blätter von infizierten und gesunden Pflanzen wurden 4 bis 8 Wochen nach der Inokkulation für RNA-Präparationen geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Eine eventuelle Lagerung erfolgte bei -70 °C.

Zur Infektion wurde der PSTVd-Stamm RG1 verwendet, der in Tomatenpflanzen eine sehr starke Symptomausprägung bewirkt (Gruner *et al.*, 1995). Er hat im Vergleich zum Wildtyp die Nukleotidaustausche G₄₆ zu C, C₄₇ zu A und U₃₁₇ zu C.

5.3 Präparative Methoden

5.3.1 Plasmidpräparation

Für „low copy“-Plasmid-DNA-Präparationen wurde eine nach Sambrook *et al.* (1989) veränderte Methode mit alkalischem Aufschluß angewandt. Die Bakterien von 800 ml Kultur (vgl. Kap.5.2.1) wurden 5 min bei 2740 g (5000 rpm, JA 10, Beckmann Coulter, München) und 4 °C pelletiert und in 20 ml eiskalter Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0) resuspendiert. Nach Zugabe von frisch angesetzter Lösung II (0,2 M NaOH, 1 % SDS) und vorsichtigem Mischen erfolgte eine 10 min Inkubation auf Eis. Dann wurden 30 ml Lösung III (Kaliumacetat mit 3 M Kalium, 5 M Acetat) zugegeben, das viskose Bakterienlysat mit der Lösung III vorsichtig, aber gut gemischt und 20 min auf Eis stehen gelassen. Nach kurzer Zentrifugation (247 g, 1500 rpm, JA10) wurde der Überstand über einen Faltenfilter gegeben und die Nukleinsäure im Filtrat durch Zugabe von 0,5 Volumen PEG (30 % PEG 6000, 1,5 M NaCl) durch 30 min Inkubation auf Eis gefällt. Nach 60 min Zentrifugation bei 4500 g und 4 °C (3850 rpm, Beckmann C PKR) wurde die pelletierte Nukleinsäure in 10 ml 1 x TE aufgenommen. Es folgte eine RNase A Behandlung (50 µg/ml, 15 min, 37 °C) und eine Proteinase K Verdauung (50 µg/ml, 15 min, 37 °C). Nach einer Phenol-Extraktion folgten mehrere Phenol/Chloroform-Extraktionen, bis keine Interphase mehr sichtbar war und im Anschluß daran eine Chloroform Extraktion (vgl. Kap. 5.1.5). Die Plasmide wurden dann mit 100 mM NaCl und 1 Volumen Isopropanol durch 30 min Inkubation auf Eis aus der wässrigen Phase gefällt. Nach 60 min Zentrifugation bei 4500 g und 4 °C (3850 rpm, Beckmann C PKR) wurde das Pellet in 10 ml 1 x TE resuspendiert. Die Plasmide wurden mit 0,5 Volumen PEG (30 % PEG, 1,5 M NaCl) erneut 30 min auf Eis gefällt und durch Zentrifugation bei 4500 g und 4 °C (3850 rpm, Beckmann C PKR) pelletiert. Das Pellet wurde

mit 70 % EtOH gewaschen, erneut 30 min zentrifugiert (4500 g, 4 °C) und die Plasmide in 500 μ l 1 x TE aufgenommen. Die Präparation wurde durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte aus der Agarosegelelektrophorese durch eine Mengenabschätzung der Plasmide im Vergleich zu einem aufgetragenen Molekulargewichtsstandard (vgl. Kap. 5.5.1) und durch Absorptionsmessungen (vgl. Kap. 5.1.2). Die Präparation lieferte zwischen 300 und 500 μ g Plasmid-DNA, deren Reinheit für enzymatische Reaktionen ausreichend war.

5.3.2 Isolation von Zellkernen aus Kartoffelsuspensionskulturen

Aus den Kartoffelsuspensionskulturen HH258 und M316 PSTVd wurden hochreine Zellkerne nach einem Protokoll von Baumstark & Riesner (1995) präpariert, daß auf einer Arbeit von Roberts & Okita (1991) für Suspensionszellen von Reis, Weizen und Tabak basiert. Das im folgenden beschriebene Protokoll bezieht sich auf zweimal 200 ml HH258 Suspensionskultur, bzw. dreimal 200 ml der langsamer wachsenden M316 PSTVd Kultur. Die Zellen wurden drei bis vier Tage nach dem Umsetzen geerntet und ergaben ein Frischgewicht von etwa 40 g. Die im folgenden beschriebenen Lösungen Plasmolytikum, Enzymlösung, 5 x Lysispuffer, Kissenpuffer E und Nuklear Resuspensions Puffer wurden durch 0,2 μ m Membranfilter (ME 24 ST, Schleicher & Schuell, Dassel) sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt. Die Enzymlösung, der Lysispuffer L15, der Gradientenpuffer L18 und der Waschpuffer 1 x L wurden am Verwendungstag angesetzt. Die Proteasehemmer Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, Stock: 100 mM in Ethanol), Leupeptin (Stock: 10 mM in H₂O) und Pepstatin A (Stock: 1 mM in Ethanol) wurden kurz vor Verwendung der jeweiligen Lösung zugegeben. Alle verwendeten Geräte wurden für mindestens 4 h bei 200 °C ausgeheizt.

Die Kartoffelzellen wurden durch Filtration mit einem Faltenfilter und anschließendem Waschen mit 150 ml Plasmolytikum vom Zellkulturmedium befreit und zur Plasmolyse in 200 ml Plasmolytikum 1 h bei 24 °C und 150 rpm im Klimakammerschüttler (vgl. Kap. 5.2.2) inkubiert. Nach Filtration der Zellen wurden diese zum Abdauen der Zellwand für 90-105 min in 150 ml Enzymlösung erneut im Schüttler inkubiert. Die Inkubation wurde beendet, wenn unter dem Mikroskop kaum Zellwandreste mehr erkennbar waren und die meisten Zellen als runde Protoplasten vorlagen. Die Protoplasten wurden durch 5 min Zentrifugation bei 4 °C und 210 g (1500 rpm, Minifuge, Heraeus Christ) in zwei großen Corexröhrchen pelletiert. Durch dreimaliges Resuspendieren in jeweils 25 ml Plasmolytikum und erneuter Zentrifugation wurden die Enzyme ausgewaschen. Die Protoplasten wurden dann in 50 ml eiskaltem Lysispuffer L15 vorsichtig resuspendiert.

Plasmolytikum	Enzymlösung
400 mM Mannit	1,0 % Cellulase OnozukaR10, Serva, Heidelberg
50 mM Kaliumcitrat	0,1 % Pectolyase Y23, Seishin, Tokyo, Japan
pH 5.8 mit Citronensäure	in Plasmolytikum

Lysispuffer (5 x L)

100 mM	MES pH 5.8
0,75 mM	Spermin
2,5 mM	Spermidin
50 mM	β -Mercaptoethanol
100 mM	Kaliumacetat

Lysispuffer L15

15 %	Ficoll 400
500 μ M	PMSF
0,6 μ M	Leupeptin
0,15 μ M	Pepstatin
in 1 x Lysispuffer	

Kissenpuffer E

87,6 %	Percoll
500 μ M	PMSF
in 1 x Lysispuffer	

Gradientenpuffer L18

18 %	Ficoll 400
500 μ M	PMSF
0,6 μ M	Leupeptin
0,15 μ M	Pepstatin
in 1 x Lysispuffer	

Nuklear Resuspensions Puffer

50 %	Glyzerin
0,12 %	Nonidet P40
500 μ M	PMSF
in 1 x Lysispuffer	

Alle weiteren Schritte fanden im Kühlraum auf Eis mit vorgekühlten Geräten statt. Durch vier- bis sechsmaliges douncen in einem 50 ml Potter mit Stempel S wurden die Protoplasten mechanisch aufgebrochen bis unter dem Mikroskop kaum noch intakte Protoplasten erkennbar waren. Das Homogenat wurde durch zwei Edelstahlsiebe (140 μ m und 40 μ m Maschenweite) in einen 200 ml Erlenmeyerkolben filtriert.

Das Filtrat (22-24 ml) wurde auf zwei Zweistufengradienten geschichtet, die jeweils in einem großen Corex Röhrchen aus 10 ml Kissenpuffer E und darüber 25 ml Gradientenpuffer L18 aufgebaut waren. Nach 60 min Zentrifugation bei 3600 g und 4 °C (6000 rpm, Minifuge, Heraeus Christ) befanden sich die Zelltrümmer in der obersten L15 Stufe und die Stärkekörner zum größten Teil am Boden. Die Zellkerne flottierten an der Interphase zwischen dem Kissenpuffer E und dem Gradientenpuffer L18. Sie wurden mit einer umgedrehten 10 ml Pipette geerntet (je etwa 10 ml) und zur Verringerung der Dichte mit 25 ml 1 x Lysispuffer (500 μ M PMSF, 0,6 μ M Leupeptin, 0,15 μ M Pepstatin A) gemischt. Nach dem Homogenisieren durch vorsichtiges pipettieren mit einer 25 ml Pipette wurden die Kerne durch 20 min Zentrifugation bei 1400 g und 4 °C (3850 rpm, Minifuge, Heraeus Christ) pelletiert. Der Zelltrümmer enthaltende Überstand wurde dekantiert und die Zellkerne in 2 ml Nuklear Resuspensions Puffer resuspendiert. Die Präparation ergab 0,8-1 x 10⁸ hochreine Zellkerne, die in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für Proteinextraktpräparationen bei -70 °C über ein Jahr aufbewahrt werden konnten.

5.3.3 Präparation von Proteinextrakten aus Zellkernen

Die Extraktion von Zellkernproteinen wurde nach einem Protokoll von Baumstark & Riesner (1995) durchgeführt, daß ebenso wie die Kernpräparation auf der Arbeit von Roberts & Okita (1991) basiert. Alle Arbeiten fanden im Kühlraum statt. Die im folgenden beschriebenen Lösungen Okita Extraktionspuffer (OE) und

Okita Lagerpuffer (OS) wurden durch $0,2\ \mu\text{m}$ Membranfilter sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

Eine Kernpräparation von $0,8\text{-}1 \times 10^8$ Zellkernen wurde, wenn sie bei -70°C gelagert wurden, auf Eis aufgetaut und in einem Falcon-Röhrchen mit 17,5 ml OE-Puffer 60 min an einer Rotationsvorrichtung langsam invertiert. Die Lösung wurde auf zwei Polyallomerröhrchen verteilt, mit 3-4 ml OE aufgefüllt und zur Abtrennung des unlöslichen Chromatingerüsts 60 min bei 154000 g (35000 rpm, SW40 Rotor, Beckmann Coulter, München) zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem 25 ml Polyallomerröhrchen (SW 28 Rotor) unter Rühren portionsweise mit Ammoniumsulfat versetzt, bis eine 75 %ige Sättigung (0,47 mg/ml) erreicht war. Die ausfallenden Proteine wurden durch 30 min Zentrifugation bei 83000 g (25000 rpm, SW 28 Rotor, Beckmann Coulter) pelletiert. Das Pellet wurde durch leichtes vortexen und gelegentliches pipettieren in 1 ml OS-Puffer gelöst. Die homogene, jedoch gelblich-trübe Suspension wurde in einem mit einer Dialysemembran (Ausschlußvolumen: 10000 kDa, Serva, Heidelberg) verschlossenen, umgedrehten 1,5 ml Reaktionsgefäß zwei mal 4-8 h gegen 400 ml OS dialysiert. Der Proteinextrakt wurde aliquotiert in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, bei -70°C gelagert und war für 6-9 Monate für Prozessierungsreaktionen (vgl. Kap. 5.4.5) verwendbar.

Wurde Gesamtprotein aus Zellkernen für chromatographische Fraktionierungen (vgl. Kap. 5.12) präpariert, wurden die Zellkerne direkt nach ihrer Präparation verwendet und nicht tiefgefroren. Der daraus hergestellte Proteinextrakt in OE-Puffer mit 600 mM KCl wurde nicht Ammoniumsulfat gefällt, sondern über Nacht gegen einen veränderten Niedrigsalz-OE-Puffer dialysiert (vgl. Kap. 5.12.1).

Okita Extraktion Puffer (OE)		Okita Lager Puffer (OS)	
60 mM	HEPES, pH 7.9	20 mM	HEPES, pH 7.9
0,12 mM	EDTA	10 mM	Magnesiumacetat
0,84 mM	Magnesiumacetat	50 mM	Kaliumacetat
600 mM	Kaliumchlorid	5 mM	EDTA
12 mM	β -Mercaptoethanol	12 mM	β -Mercaptoethanol
0,72 μM	Leupeptin	25 %	Glyzerin
0,18 μM	Pepstatin		
0,5 mM	PMSF		

5.3.4 Präparation von Gesamt-RNA aus Tomatenblättern

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus Tomatenpflanzen wurde die saure Guanidiniumthiocyanat/Phenol Methode nach Chomczynski & Sacchi (1987) verwendet. 3 g Blattmaterial wurde sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gemörsert. Das gefrorene Material wurde in 12 ml Guanidiniumthiocyanat-Reagenz überführt und durch Mischen eine homogene Lösung hergestellt. Zelltrümmer wurden durch 20 min Zentrifugation bei 3000 g (5000 rpm, Minifuge, Heraeus Christ) pelletiert. Zum Überstand wurden 0,03 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5.5 und 0,75 Volumen Ethanol zugegeben. Nach einer 15 min Inkubation auf Eis wurde 20 min bei 3000 g (5000 rpm, Minifuge, Heraeus Christ) zentrifugiert und das Pellet in 3 ml Resuspensionslösung aufgenommen. Der Extrakt wurde zunächst mit 2 Volumen Phenol/Chloroform und dann mit 2 Volumen Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäure auf etwa pH 5.0 ($10\ \mu\text{l}/10\ \text{ml}$) und mit NaCl auf 200 mM eingestellt. Nach der Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol

wurde für 15 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 3000 g (5000 rpm, Minifuge, Heraeus Christ) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut für 10 min zentrifugiert und in 0,6 ml TE resuspendiert.

Guanidiniumthiocyanat-Reagenz			Resuspensionslösung		
5	M	Guanidiniumthiocyanat	50	mM	Tris, pH 8.0
25	mM	Tris, pH 8.0	10	mM	EDTA
10	mM	EDTA	100	mM	NaCl
2	%	Sarkosyl	0,2	%	SDS
100	mM	β -Mercaptoethanol	3	mg/ml	Diethyldithiocarbamat
3-4	mg/ml	Diethyldithiocarbamat			

Nach einer Inkubation mit 20 μ g/ml DNase (etwa 600 u, Gibco BRL, Eggenstein) für 15 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung auf 0,2% SDS und 10 mM EDTA eingestellt und einmal Phenol/Chloroform extrahiert. Die Lösung wurde auf 0,3 M NaOAc eingestellt und die RNA durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol und 15 min Inkubation auf Eis präzipitiert. Die RNA wurde durch 30 min Zentrifugation in der Tischzentrifuge pelletiert, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und in 0,3 ml TE resuspendiert. Die Mengenabschätzung und Kontrolle der Reinheit der Präparation erfolgte durch Absorptionmessungen bei 260 und 280 nm (vgl. Kap. 5.1.2). Zur Überprüfung der Degradation wurde die präparierte RNA mit einer Agarosegelelektrophorese separiert (vgl. Kap. 5.5.1). Es konnten etwa 300 μ g Gesamt-RNA aus 3 g eingesetztem Blattmaterial präpariert werden.

5.4 Enzymatische Reaktionen

Enzymatische Standardreaktionen wurden unter den vom Hersteller angegebenen Inkubations- und Pufferbedingungen durchgeführt.

5.4.1 Linearisierung von Plasmiden

Zur Run-Off *in vitro*-Transkription wurden die Plasmide pTB110 und pTB310 mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* linearisiert. 100 μ g Plasmid-DNA wurde mit 48 u *EcoRI*, 35 μ l 10x Puffer H (für *EcoRI*, Promega, Madison, USA) und 17,5 μ l Spermidin in 350 μ l Gesamtvolumen für 15 h bei 37 °C inkubiert. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, in 100 μ l TE resuspendiert und die Linearisierung in einer Agarosegelelektrophorese (vgl. Kap. 5.5.1) überprüft.

5.4.2 Dephosphorylierung von DNA-Restriktionsfragmenten

Für die radioaktive 5'-Endmarkierung von *HinfI*-Restriktionsfragmenten von pBR322, die als Längenstandard in der denaturierenden Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet wurden, wurden diese zunächst mit Alkalischer Phosphatase 5'-dephosphoryliert. Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 2 h bei 45 °C inkubiert und die Alkalische Phosphatase dann für 10 min bei 75 °C hitzeinaktiviert. Der Ansatz wurde auf 200 μ l Volumen eingestellt, Phenol/Chloroform extrahiert, auf 0,3 M NaOAc eingestellt und die DNA-Fragmente mit 2,5 Volumen Ethanol für 30 min auf Eis präzipitiert. Die DNA wurde durch eine 60 min Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 12000 rpm pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in 12 μ l H₂O resuspendiert.

 Dephosphorylierungs-Ansatz

500 ng pBR322 / *HinfI*
 4 μ l 10 x Puffer (Boehringer, Mannheim)
 4 μ l Alkalische Phosphatase (Boehringer, Mannheim)
 ad 40 μ l H₂O

5.4.3 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden

Für Hybridisierungen eingesetzte, synthetisch hergestellte DNA-Oligonukleotide und als Längenstandard in der Gelelektrophorese verwendete *HinfI*-Restriktionsfragmente von pBR322 wurden mit der Polynukleotidkinase (PNK) in einer Phosphorylierungsreaktion radioaktiv markiert. Dabei wurde die markierte γ -Phosphatgruppe von $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP auf das 5'-OH des Oligonukleotids übertragen.

 Phosphorylierungs-Ansatz

5-10 pmol Oligonukleotid
 oder
 12 μ l dephosphorylierte Restriktionsfragmente (500 ng)
 2 μ l 10 x PNK-Puffer (Boehringer, Mannheim)
 5 μ l $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Hartman Analytics, Braunschweig)
 1 μ l PNK (Boehringer, Mannheim)
 ad 20 μ l H₂O

Der Reaktionsansatz für synthetisch hergestellte DNA-Oligonukleotide wurde für 45-60 min und der für Restriktionsfragmente für 90 min bei 37 °C inkubiert. Nach einer 10 min Inaktivierung der PNK bei 65 °C wurden die Oligonukleotide zur Entfernung radioaktiver Mononukleotide zweimal durch Zugabe von 3 Volumen Ethanol aus 2,5 M NH₄OAc, 20 mM MgCl₂ für 10 min auf Eis gefällt und durch 30 min Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei 12000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und die synthetisch hergestellten Oligonukleotide in 100 μ l TE, 0,1% SDS resuspendiert. Die Restriktionsfragmente wurden in 25 μ l Auftragspuffer für denaturierende PAGE resuspendiert. Die radioaktive Markierungen wurden durch eine Cerenkov-Messung von jeweils 1 μ l im Szintillationszähler (Modell LS 5000 TD, Beckmann Instruments, Inc., Palo Alto USA) bestimmt. Es wurden etwa 5×10^5 cpm/ μ l synthetische Oligonukleotide und 3×10^5 cpm Restriktionsfragmente hergestellt.

5.4.4 *In vitro*-Transkriptionen

Die als Substrat in Prozessierungsreaktionen verwendeten, radioaktiv markierten Transkripte wurden durch *in vitro* Run-Off-Transkription mit der DNA-abhängigen T7-RNA-Polymerase synthetisiert (Chamberlain *et al.*, 1983). Die Polymerase wird von Herrn B. Esters am Institut aus dem rekombinanten *E. coli*-Stamm BL21 mit dem Plasmid pAR1219 (Davanloo *et al.*, 1984; Hecker, 1989) präpariert. Als Template diente durch Restriktionsverdauung mit EcoRI linearisiertes Plasmid (pTB110, pTB310) oder PCR-Produkte mit T7-Promotor (MinimalL2). Die Transkription erfolgte für 3 h bei 37 °C und erneuter Zugabe von 300 u T7-Polymerase nach einer Inkubationszeit von 1,5 h.

In vitro-Transkriptions-Ansatz

1	μg	linearisiertes Plasmid oder 20 ng PCR-Produkt
4	μl	5 x Puffer A (100 mM NaP_i pH 7.7, 50 mM DTT)
4	μl	5 x Puffer B (40 mM MgCl_2 , 20 mM Spermidin-HCl pH 7.7)
4	μl	5 mM NTP-UTP (je 5 mM ATP, CTP, GTP, 250 μM UTP)
50	μCi	$\alpha^{32}\text{P}$ -UTP, 3000 Ci/mmol (Hartman Analytics, Braunschweig)
20	u	RNasin ^R (Promega, Madison, USA)
300	u	T7-RNA-Polymerase
ad 20 μl H_2O		

Für die Gelelektion der Transkripte wurden diese mit 2,5 Volumen Ethanol aus 300 mM NaOAc gefällt und in 15 μl denaturierenden Auftragspuffer aufgenommen (vgl. Kap. 5.7). Sollten nicht-gelelierte Transkripte verwendet werden, wurde die Plasmid-DNA durch RNase-freie DNase I entfernt. Der Ansatz wurde mit H_2O auf 100 μl erweitert, auf 10 mM MgCl_2 eingestellt und 30 min mit 300 u DNase I (Gibco BRL, Eggenstein) bei 37 °C inkubiert. Durch Einstellung auf 20 mM EDTA wurden Mg^{2+} -Ionen komplexiert und der Ansatz wurde mit H_2O auf 200 μl gebracht. Nach einer Phenol/Chloroformextraktion wurden die Transkripte zunächst mit 0,5 Volumen 7,5 M NH_4OAc und 1,5 Volumen Isopropanol für 30 min auf Eis präzipitiert. Nach 60 min Zentrifugation bei 12000 rpm in der Tischzentrifuge wurde das Pellet in 100 μl TE und 0,5 Volumen 7,5 M NH_4OAc für 30 min im Schüttler resuspendiert. Durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol und Inkubation für 30 min auf Eis wurde die NS erneut gefällt. Durch Zentrifugation für 60 min bei 12000 rpm (Tischzentrifuge) wurden die Transkripte pelletiert und in 50 μl TE resuspendiert.

Gelelierte und nicht-gelelierte Transkripte wurden auf Nitrozellulose Schwimmliter (0,025 μm , Type VSWP, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) gegeben und für 1 h gegen 20 ml TE-Puffer dialysiert. Eine anschließende Kontrolle der Transkripte durch eine Cerenkov-Messung von jeweils 1 μl im Szintillationszähler (Modell LS 5000 TD, Beckmann Instruments, Inc., Palo Alto USA) ergab Ausbeuten von etwa 5×10^5 cpm/ μl nicht-gelelierte und 5×10^4 cpm/ μl gelelierte Transkripte.

5.4.5 RNA-Prozessierungsreaktionen

Für Prozessierungsreaktionen wurden als Substrat radioaktiv markierte *in vitro*-Transkripte in der ExM^{TL} -Konformation verwendet. Eingefrorene Proteinextrakte wurden auf Eis aufgetaut und Proteinlösungen nach chromatographischen Trennmethode wurden auf Eis gehalten. Die Ansätze wurden auf Eis pipettiert. Für Experimente zur Rekonstitution von Prozessierungsaktivität wurden die kombinierten Fraktionen zunächst für 20 min auf Eis inkubiert. Der Start der Reaktionen erfolgte durch die Zugabe der Transkripte. Die Inkubation erfolgte standardmäßig für 60 min bei 30 °C. Bei Zugabe von mit KCl von Ionenaustauschmaterialien eluiertem Protein, wurde eine Gesamt-KCl-Konzentration von 100 mM im Ansatz nicht überschritten.

 Prozessierungs-Ansatz

5×10^4 - 10^5 cpm		<i>in vitro</i> -Transkript
5	μ l	10 x Puffer E (100 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM DTT)
4	μ l	100 mM $MgCl_2$
1-40	μ l	Proteinextrakt
ad 50 μ l H_2O		

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 μ l Stop-Lösung (27 mM EDTA, 0,5% SDS), 200 μ l Phenol (ohne Chloroform) und Mischen auf einem Vortex gestoppt. Nach je einmaliger Phenol- und Phenol/Chloroformextraktion wurde die RNA mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde für die denaturierende Gelelektrophorese in 10 μ l Auftragspuffer resuspendiert (vgl. Kap. 5.5.2). Nach einer Cerenkov-Messung von jeweils 1 μ l im Szintillationszähler (Modell LS 5000 TD, Beckmann Instruments, Inc., Palo Alto USA) wurden i.d.R. von allen Ansätzen die gleiche Menge Radioaktivität für die Gelelektrophorese verwendet. Sollten Proteinextrakte nach chromatographischen Trennungen auf Prozessierungsaktivität getestet werden, wurden zur Zeitersparnis jeweils 4-5 μ l Probe direkt für die Gelelektrophorese verwendet. Wurden die Prozessierungsreaktionen nach Chromatographien mit geringen Proteinmengen durchgeführt, konnte die Phenolextraktion weggelassen werden. Ebenso wurde die Chloroformextraktion für standardmäßige Kontrollen auf Prozessierungsaktivität nicht durchgeführt.

5.5 Gelelektrophoresen

5.5.1 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse von Plasmidpräparationen, Restriktionsverdauungen und Gesamt-RNA-Präparationen wurden native, 1%ige Agarosegele verwendet. Die Gelelektrophoresen wurden in einer Horizontal-Gelapparatur (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA; Modell HE33) durchgeführt. Die Gele (70 x 100 x 5 mm) enthielten 1 x TAE-Puffer und 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid. Die Proben wurde mit 2 x Auftragspuffer (1 x TAE, 50 % Glycerin (v/v) und je 0,25 % Bromphenolblau und Xylencyanol FF) im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Elektrophorese erfolgte mit 1 x TAE Elektrophoresepuffer bei 7 V/cm für ca. 1 h.

Der Nachweis von Nukleinsäuren in Agarosegelen erfolgte durch die Zugabe von Ethidiumbromid in die Gellösung. Durch die verstärkte Fluoreszenz von in Nukleinsäure interkaliertem Ethidiumbromid konnte diese auf einem UV-Transilluminator (UVT 2035, Herolab, St. Leon, 302 nm) sichtbar gemacht werden.

5.5.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Separation von Gesamt-RNA im Rahmen von Northernanalysen, zur Analyse von Prozessierungsreaktionen und für Gelelutionen von radioaktiv markierten Transkripten wurden vertikale Polyacrylamidgele (PAA-Gele) unter denaturierenden Bedingungen verwendet. Sie wurden aus einer 30% Acylamid/ N,N' -Methylenbisacrylamid-Stammlösung (30:1) angesetzt. Zur Entfernung von Acrylsäureresten wurde der Stammlösung der Ionenaustauscher Amberlite zugesetzt. Nach 1 h Rühren wurde das Amberlite durch Filtration entfernt. Durch die Kombination von Harnstoff und erhöhter Temperatur während der Elektrophorese wurden mögliche Sekundärstrukturen der Nukleinsäuren aufgelöst und

das Migrationsverhalten hing nur von der Nukleotidzahl ab. Die notwendige Temperatur von 55 °C wurde durch eine leistungsgesteuerte Gelelektrophorese erzielt, wodurch sich das Gel in Folge des hohen Stromflusses aufheizt.

Für die Gelelektrophorese von Gesamt-RNA und von Transkripten wurden 0,5 mm dicke Gele der Größe 210 x 170 mm (Breite x Höhe) verwendet. Als Elektrophoreseapparatur diente eine von der Werkstatt der Universität Düsseldorf angefertigte Kammer. Um eine möglichst gleichmäßige Wärmeverteilung zu erreichen, wurde eine 2 mm dicke Aluminiumplatte vor die äußere Glasplatte gespannt. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines aufgeklebten Temperaturstreifens mit reversibler Flüssigkristallanzeige (RS Components GmbH, Mörfelden-Walldorf) kontrolliert. Die Gele enthielten 5% PAA, 8 M Harnstoff, 0,5 x TBE und 0,1% N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED). Die Polymerisation wurde durch die Zugabe von 1/100 Volumen des Radikalbildners Ammoniumperoxodisulfat (APS, 10%) gestartet. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Zunächst wurde das Gel durch eine Vorelektrophorese bei einer konstanten Leistung von 40-45 W (Spannungsgerät: Amersham Pharmacia Biotech, EPS 3500, Heidelberg) für etwa 20 min auf 55 °C temperiert. Gesamt-RNA wurde mit 1 Volumen denaturierendem Auftragspuffer gemischt und die Transkripte nach ihrer Fällung in denaturierendem Auftragspuffer resuspendiert. Die Proben im Auftragspuffer wurden für 5 min bei 96 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese der Proben erfolgte für 20-30 min bei 40 W. Das Gel mit Gesamt-RNA wurde anschließend gebloftet (vgl. Kap. 5.9.1). Das Gel zur Gelelektion von Transkripten wurde auf einer Glasplatte mit Haushaltsfolie abgedeckt und für etwa 1 min gegen Röntgenfilm (Kodak X-OMAT) exponiert.

denaturierender Auftragspuffer

45	%	Formamid
4	M	Harnstoff
5	mM	EDTA
1	x	TBE
0,02	%	Bromphenolblau
0,02	%	XylencyanolFF

Die Analyse von Prozessierungsreaktionsprodukten erfolgte mit 0,4 mm dicken Gelen der Größe 310 x 390 mm (Breite x Höhe). Es wurden 5% oder 7% PAA-Gele mit 8 M Harnstoff und 0,5 x TBE verwendet. Die Elektrophorese erfolgte nach einer Vorelektrophorese zum Erwärmen des Gels in einer Sequenzierkammer (Modell S2, Gibco BRL Life Technologies GmbH, Eggenstein) für etwa 90 min bei einer konstanten Leistung von 90 W und einer Temperatur von 55 °C mit 0,5 x TBE Elektrophoresepuffer. Anschließend wurde das Gel auf einen alten Röntgenfilm aufgezogen und bei -70 °C gegen einen Röntgenfilm exponiert. Zur Verstärkung der Signale wurde, wenn es in den Bildunterschriften angegeben ist, mit einer Versärkerfolie (Typ Extrarapid, Empfindlichkeit 200, Calcium Wolframat, blauemittierend) exponiert.

5.5.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidsystem nach Laemmli (1970) benutzt. Als denaturierendes Agens wird Natriumdodecylsulfat (SDS) eingesetzt, das als amphiphiles Detergens die native

Proteinstruktur auflöst. Die zu analysierenden Proteine werden aufgrund der denaturierenden Bedingungen (Aufkochen im SDS-Puffer, 0,1% SDS im Gel und Elektrophoresepuffer) in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes getrennt. Es wurden vertikale Plattengele der Abmessung 210 x 170 x 1 mm oder, zum Ausschneiden von Proteinbanden für Sequenzierungen, der Abmessung 300 x 180 x 1,5 mm verwendet. Das Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamidverhältnis betrug 30:0,8 und die Acrylamidkonzentration der 1,5 cm langen Sammelgele 4%. Es wurden Trenngele mit 10% PAA oder PAA-Gradienten von 5-20 oder 7,5-15% verwendet. Gele mit PAA-Gradienten wurden mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen, wobei der höher konzentrierten PAA-Lösung 15% Sucrose zugegeben war, um die Gradientenausbildung zu stabilisieren.

Proteinproben wurden mit 1/4 Volumen 5x Auftragspuffer für 5 min bei 90 °C denaturiert, abgekühlt und verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 70 V für 14 h (170 mm Gellänge) oder 30 mA für 24 h (300 mm Gellänge). Als Elektrophoresepuffer wurde 1x Laemmli-Puffer mit 0,1% SDS verwendet. Es wurden Molekulargewichtsstandards von Sigma (High Molecular Weight) oder Novex (Mark12, Wide Range Protein Standard) eingesetzt, die Proteine der Größen 6-205, bzw. 2,5- 200 kDa enthielten.

Laemmli-Auftragspuffer		1 x Laemmli-Elektrophoresepuffer	
60 mM	Tris-HCl, pH 6.8	25 mM	Tris
5 %	β -Mercaptoethanol	190 mM	Glycine
2 %	SDS	0,1 %	SDS
25 %	Glyzerin		
0,1 %	Bromphenolblau		
Sammelgel		Trenngel	
125 mM	Tris-HCl, pH 6.8	380 mM	Tris-HCl, pH 8.8
4 %	PAA	verschieden %	PAA
0,1 %	SDS	0,1 %	SDS
0,1 %	TEMED	0,1 %	TEMED
1/100 Volumen	10% APS	1/100 Volumen	10% APS

5.6 Färbungen von Proteingelen

5.6.1 Silberfärbung von Proteingelen

Die Silberfärbung von Proteingelen erfolgte mit verkürzten Inkubationszeiten nach Blum *et al.* (1987). Es können etwa 2 ng Protein pro Bande nachgewiesen werden. Die Färbung erfolgte unter leichtem Schütteln auf einem Horizontalschüttler.

Silber-Färbeprotokoll

Fixieren	50% Ethanol, 12,5% Essigsäure	60 min
Waschen	50% Ethanol	2 x 20 min
	30% Ethanol	20 min
Verstärken	0,02% Natriumthiosulfat, 0,012% Formaldehyd	1 min
Waschen	Aqua dest	3 x 20 sec
Färben	0,2% Silbernitrat, 0,013% Formaldehyd	20 min
Waschen	Aqua dest	3 x 30 sec
Entwickeln	6% Natriumcarbonat, 0,02% Formaldehyd, 0,002% Natriumthiosulfat	5-15 min
Fixieren	25% Ethanol, 12% Essigsäure	10 min

5.6.2 Coomassiefärbung von Proteingelen

Eine Coomassiefärbung von Proteingelen ist mit einer Nachweisempfindlichkeit von 100 ng Protein/Bande unempfindlicher als eine Silberfärbung (Blum *et al.*, 1987). Sie hat jedoch den Vorteil, daß die Proteinbanden quantitativ gefärbt werden und die Banden für Proteinsequenzierungen verwendet werden können. Die Färbung und Entfärbung erfolgte unter leichtem Schütteln auf einem Horizontalschüttler.

Coomassie-Färbeprotokoll

Färben	0,2% Coomassie R250, 50% Methanol, 10% Essigsäure	1 h
Entfärben	10 % Methanol, 10% Essigsäure	Ü.N.-2,5 d bis Gel klar

5.7 Gelelution von Nukleinsäuren

Zur Gewinnung von radioaktiv markierten Transkripten mit korrekter und einheitlicher Länge wurden diese aus denaturierenden PAA-Gelen (vgl. Kap. 5.5.2) nach einem veränderten Protokoll von Krupp (1988) geleliert. Die korrekte Länge der Transkripte mit Hauptausbeute wurde durch 1 min Exposition gegen Röntgenfilm identifiziert und ausgeschnitten. Ein Gelstück mit 0,5 cm Breite wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 300 µl Elutionspuffer (10 mM MgCl₂, 300 mM NaOAc, 0,2% SDS), versetzt und für 14 h bei 4 °C geschüttelt. Nach Zugabe von 3 Volumen 96% Ethanol und Mischen schrumpften die Gelstücke und verfärbten sich weiß. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Transkripte wurden wie üblich mit Ethanol gefällt, in 50 µl TE resuspendiert und wie in Kap. 5.4.4 beschrieben weiterbehandelt.

5.8 Trocknen von Gelen

Zur Fokussierung der radioaktiven Banden und zur Vermeidung von Quensching bei der Exposition gegen Röntgenfilm, wurden Proteingele (1-1,5 mm dick) mit durch Markierungstransfer radioaktiv markierten Proteinen nach der Färbung auf 3MM-Chromatographiepapier (Whatmann) 2 h bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

5.9 Northernanalysen

5.9.1 Transfer der Nukleinsäure auf Nylonmembran

Für Northernhybridisierungen gegen MRP-RNA wurde Gesamt-RNA aus Tomatenpflanzen nach einer denaturierenden Gelelektrophorese (vgl. Kap. 5.5.2) auf Nylonmembran (Biodyne A, Pall Europe Ltd., Portsmouth, Großbritannien) transferriert. Es wurde ein „semi-dry“ Elektrotransfer in einer Elektrobplotapparatur (Modell TransBlot SD, BioRad, München) durchgeführt. Zwischen den beiden Elektroden wurden drei mit 0,5 x TBE getränkte Lagen Whatman 3MM Papier (Whatman International Ltd., Maidstone, Großbritannien), das Gel, die Nylonmembran und weitere drei mit 0,5 x TBE getränkte Lagen Whatman 3MM Papier geschichtet. Der Transfer erfolgte für 1 h bei einer Stromstärke von 400 mA mit maximal 15 V. Die kovalente Bindung der Nukleinsäure an die Membran erfolgte durch UV-Bestrahlung mit 254 nm in einer UV-Crosslink Apparatur (Stratalinker, Stratagene, La Jolla, USA, Funktion: AutoCrosslink, 1200 μ J x 100).

5.9.2 Membranhybridisierungen

Kovalent an die Membran fixierte MRP-RNA wurde durch Filterhybridisierungen mit radioaktiv markiertem, DNA-Oligonukleotid MRP51 (vgl. Kap. 4.5, 5.4.3) nachgewiesen. Die Membran wurde mit der RNA-Seite nach innen zusammengerollt und in einer Hybridisierungsflasche im Hybridisierungssofen (Modell OV2, Biometra, Göttingen) in 20 ml Hybridisierungslösung für 4 h bei 55 °C prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurde 1 x 10⁶ cpm MRP51-Sonde zugegeben und für 14 h bei 40 °C hybridisiert.

Zur Entfernung nicht spezifisch gebundener Sonde wurde die Membran zweimal 30 min mit jeweils 50 ml Waschlösung bei 40 °C gewaschen. Die Membran wurde anschließend in Polyethylenfolie eingeschweißt und für 14 d gegen Kodak-Xomat-AR-Röntgenfilm exponiert.

Hybridisierungslösung			Waschlösung		
6	x	SSC	5	x	SSC
5	x	Denhards	0,1	%	SDS
0,5	%	SDS			
50	μ g/ml	gescherte Heringssperm-DNA			

5.10 Markierungstransfer durch UV-Crosslinking

Die Wechselwirkung von Proteinen mit Nukleinsäure kann anhand einer durch UV-Licht von 254 nm induzierten, kovalenten Verknüpfung nachgewiesen werden. Die Nukleinsäure wird hierfür radioaktiv markiert, mit Proteinextrakt inkubiert und der Ansatz mit UV-Licht bestrahlt. Nach der Verknüpfung wird die Nukleinsäure, soweit sie nicht von Protein geschützt ist, mit einem geeigneten nukleolytischen Enzym degradiert. Die radioaktive Markierung ist damit auf das Protein transferriert. Der Nachweis kann nicht zwischen starken und schwachen Wechselwirkungen unterscheiden (Greenberg, 1980). Für Markierungstransferexperimente wurden aktive Proteinfractionen nach Teilreinigung der 5'-Schneideaktivität verwendet. Der Transfer wurde in Prozessierungspuffer durchgeführt. Zur Erhöhung der Proteinmenge wurden die Ansätze im Vergleich zu Standardprozessierungsreaktionen jedoch vervierfacht.

Markierungstransfer-Ansatz

8 x 10 ⁴ cpm	<i>in vitro</i> -Transkript ExM ^{TL} oder ExL
20 μ l	10 x Puffer E (100 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM DTT)
16 μ l	100 mM MgCl ₂
40 μ l	Proteinextrakt (etwa 0,4 μ g)
ad 200 μ l H ₂ O	

Etwa 0,4 μ g Protein wurden zunächst im Prozessierungspuffer für 5 min bei 4 °C, bzw. 30 °C präinkubiert. Nach Zugabe von radioaktiv markiertem Transkript in der ExM^{TL}-, bzw. ExL-Konformation wurde für weitere 15 min bei 4 °C, bzw. 30 °C inkubiert. Die anschließende Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm in einer UV-Crosslink Apparatur (Stratalinker, Stratagene, La Jolla, USA, Funktion: AutoCrosslink, 1200 μ J x 100) führte zu einer kovalenten Verknüpfung der an die RNA gebundenen Proteine. Zur Vergrößerung der Oberfläche der zu bestrahlenden Lösung wurde diese in kleinen Petrischalen durchgeführt. Es wurde mit 4 x 1,8 J für eine Dauer von 40 min bestrahlt und dazwischen die Lösung dreimal erneut gemischt. In dieser Zeit wird bei Prozessierungsreaktionen eine nachweisbare Produktmenge gebildet. Die 4 °C-Ansätze wurden auf Eis bestrahlt, die 30 °C-Ansätze bei Raumtemperatur (etwa 25 °C).

Anschließend wurden die Ansätze für 30 min bei 37 °C mit 10 μ g RNaseA und 20 u RNaseT1 inkubiert, um nicht durch Proteinbindung geschützte RNA zu hydrolysieren. Die Reaktion wurde durch eine TCA-Fällung gestoppt. Das Pellet wurde in 10 μ l Laemmli-Auftragspuffer resuspendiert. Die Proteine wurden in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE getrennt, das Gel silbergefärbt, getrocknet und die kovalent an RNA-Fragmente gebundenen Proteine durch Exposition gegen Röntgenfilm (Kodak X-OmatAR) detektiert (vgl. Kap. 5.5, 5.8).

5.11 Umpuffern und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

5.11.1 Dialyse

Gesamtproteinextrakt mit 600 mM KCl wurde zum Auftrag auf Ionenaustauscher auf etwa 50 mM KCl-Niedrigsalz dialysiert. Ein 21 mm breiter Dialyseschlauch mit einem Ausschlußvolumen von 12-14 kDa (regenerierte Zellulose, Serva, Heidelberg) wurde für mindestens 4 h in Dialyselösung voräquilibriert. Die Dialyse von etwa 25 ml Proteinlösung erfolgte für 12-13 h gegen 2 l Dialyselösung (60 mM HEPES, pH 7.9, 0,12 mM EDTA, 0,84 mM MgOAc, 10% Glycerin und 40 mM KCl) mit Proteasehemmern (0,5 mM PMSF, 0,72 μ M Leupeptin, 0,18 μ M PepstatinA, 5 mM DTT).

5.11.2 Gelfiltration

Proteinlösungen nach chromatographischen Fraktionierungen mit Volumen bis zu 10 ml wurden mit PD10-Säulen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) nach Angaben des Herstellers auf 40-50 mM KCl-Niedrigsalz eingestellt. Sie konnten dann auf Ionenaustauschermaterialien aufgetragen werden.

5.11.3 Ultrazentrifugation

Die Aufkonzentrierung von Proteinlösungen erfolgte mittels Ultrazentrifugation durch eine Membran aus regenerierter Zellulose mit einem Ausschlußvolumen von 10000 Da (Centricon YM-10, Amicon, Millipore, Eschborn) nach den Angaben des Herstellers.

5.12 Chromatographische Fraktionierung von Proteinen

Chromatographische Fraktionierungen von Proteinen wurden mit Hilfe einer Chromatographieanlage bestehend aus zwei HPLC Pumpen (Knauer HPLC Pump 64, Knauer GmbH, Berlin) mit nachgeschaltetem Mischer, einem UV/VIS Filterphotometer (Knauer), einem Zweikanalschreiber (LKB 2210 Recorder), einem Fraktionssammler (LKB 2111 Multirac) und einer einfachen Computersteuerung (Knauer) durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen waren durch Sterilfiltration steril und partikelfrei. Sie wurden vor der Benutzung entgast. Chromatographielösungen wurden Puffer mit 60 mM HEPES, pH 7.9, 0,12 mM EDTA, 0,84 mM MgOAc, 10% Glycerin und mindestens 40 mM KCl verwendet. Die KCl-Konzentrationen waren dem jeweils verwendeten chromatographischen Verfahren angepaßt und wurden aus einem 1000 mM-KCl- und einem 40 mM-KCl-Puffer gemischt. Da kein Leitfähigkeitsdetektor zur Verfügung stand, sind die bei Gradientenelutionen angegebenen KCl-Konzentrationen aus den eingestellten Mischverhältnissen des verwendeten Hoch- und Niedrigsalzpuffers und dem Totvolumen der jeweils verwendeten Chromatographiesäule abgeschätzt. Die Chromatographien erfolgten bei Raumtemperatur (RT). Proteinlösungen wurden beim Auftragen nicht bei 4 °C, sondern bei einer Temperatur von etwa 15 °C gehalten, um die erwärmungsbedingte Bildung von Luftbläschen in den Pumpen und den Säulen zu vermeiden. Wenn sie auf Eis gehalten wurden, konnten sich in den Pumpen Luftbläschen bilden, was zu reduzierten Pumpleistungen und damit zu falschen Salzkonzentrationen führte.

5.12.1 Proteinextrakte

Für chromatographische Fraktionierungen wurde Gesamtproteinextrakt aus Zellkernen verwendet, der wie in Kap. 5.3.3 beschrieben präpariert wurde. Die abschließende Aufkonzentrierung der Proteine durch eine Ammoniumsulfatfällung wurde jedoch nicht durchgeführt und die Extraktpräparation endete mit einem klaren Proteinüberstand nach der 154000 g Zentrifugation. Das Kernprotein lag in 60 mM HEPES, pH 7.9, 0,12 mM EDTA, 0,84 mM MgOAc und 600 mM KCl vor und wurde für die Ionenaustauscherchromatographie für 12-13 h auf 50 mM KCl dialysiert (vgl. Kap. 5.11.1). Zur Entfernung von denaturiertem Protein nach der Dialyse wurde Gesamtproteinextrakt für 1 h bei 100000 g (30000 rpm, SW 28 Rotor, Beckmann Coulter) zentrifugiert. Proteinlösungen nach chromatographischen Trennungen wurden direkt oder nach Entsalzen durch PD10-Säulen auf eine nächste Chromatographiesäule aufgetragen.

5.12.2 Chromatographiesäulen

Die für chromatographische Fraktionierungen verwendeten Chromatographiematerialien und -säulen wurden nach Angaben der Hersteller verwendet und gelagert. Sie sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Es wurden Fließgeschwindigkeiten von 0,2-1 ml/min verwendet und bei Drücken bis zu 2,7 (MonoQ, MonoS), bzw 6,7 mPa (Bio-Silect-SEC-250-5) gearbeitet.

Tabelle 4: Chromatographiesäulen

Name und Säulenmaterial		Hersteller
5,7 ml QSepharoseFF (63 x 9 mm)	Anionenaustauscher	(Amersham Pharmacia)
1 ml MonoQ	Anionenaustauscher	(Amersham Pharmacia)
1 ml SPHiTrap	Kationenaustauscher	(Amersham Pharmacia)
1 ml MonoS	Kationenaustauscher	(Amersham Pharmacia)
Bio-Silect-SEC-250-5 (300 x 7,8 mm, Trennbereich: 10-300 kDa)	Gelchromatographie	(BioRad)

5.13 Proteinsequenzierungen

Proteinsequenzierungen wurden im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität bei Herrn Dr. Hoffmann durchgeführt. Es wurden Proteinbanden (mind. 1 μg Protein) aus einem diskontinuierlichen SDS-Gel ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Dabei entstandene Peptide wurden massenspektrometrisch sequenziert.

6 Zusammenfassung

Viroide sind Pflanzenpathogene, die ausschließlich aus einer einzelstängigen, zirkulär geschlossenen RNA ohne Hüllproteine bestehen. Da sie für keine Proteine kodieren, nutzen sie für ihre Replikation ausschließlich wirtseigene Systeme, wobei die Wechselwirkungen mit Wirtsfaktoren durch Sequenz- und Struktur motive der Viroide vermittelt werden. *Pospiviroidae* replizieren im Zellkern durch einen asymmetrischen „rolling circle“-Mechanismus. Ausgehend von zirkulärem Viroid wird ein oligomerer, linearer (-)-Strang synthetisiert. Dieser dient wiederum als Template für die Synthese eines oligomeren (+)-Strangs, der in einem letzten Prozessierungsschritt zu Monomeren mit exakter Einheitslänge geschnitten und zu nativen Zirkeln ligiert wird. Für beide Transkriptionsschritte nutzen sie die wirtseigene DNA-abhängige-RNA Polymerase II als bisher einzigen, funktionell charakterisierten Wechselwirkungspartner von Viroiden.

Für das zu den *Pospiviroidae* gehörende Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) wurde gezeigt, daß geeignete mehr-als-Einheitslängen-Transkripte *in vitro* im Kernextrakt zu korrekten Monomeren geschnitten und zu Zirkeln ligiert werden. Es wurde ein mechanistisches Modell der Prozessierung vorgeschlagen, bei dem zunächst in einer metastabilen, verzweigten Substratkonformation ein einleitender 5'-Schnitt stattfindet. Nach einer Strukturumlagerung und einem 3'-Schnitt werden korrekte Zirkel ligiert.

Eine zuvor postulierte Beteiligung der RNase MRP an der Prozessierung oder eine Reduktion der RNase MRP-RNA-Konzentration in Pflanzenzellen durch eine Viroidinfektion konnten in dieser Arbeit so gut wie ausgeschlossen werden. Da keine anderen, eventuellen Wirtsfaktoren für die Prozessierung bekannt waren, wurden die an der Prozessierung beteiligten Enzymaktivitäten allgemein charakterisiert. Ausgehend von einem in vorausgegangenen Arbeiten etablierten, prozessierungsaktiven Kernextrakt aus einer nicht-infizierten *S. tuberosum*-Zellkultur wurde ein prozessierungsaktiver Kernextrakt aus einer PSTVd-infizierten *S. demissum*-Zellkultur entwickelt. Proteine dieses Extraktes wurden mittels chromatographischer Proteintrennverfahren fraktioniert und mit einem mehr-als-Einheitslängen-Transkript auf Prozessierungsaktivität getestet.

Es konnte gezeigt werden, daß die 5'-Schneide-, die 3'-Schneide- und die Ligationsaktivität von unterschiedlichen Enzymen vermittelt werden. Mit einem auf 5'-Schneideaktivität angereicherten Proteinextrakt, wurde das im mechanistischen Modell der Prozessierung vorgeschlagene 5'-Schnittprodukt erstmals direkt nachgewiesen. Mittels Gelfiltrationsexperimenten konnte dem 5'-Schneideenzym ein Molekulargewichtsbereich von 23-66 kDa zugeordnet werden. Die Separation zweier Ligationsaktivitäten für natürliche, monomere Prozessierungszwischenprodukte und für monomere *in vitro*-Transkripte zeigte, daß sich die chemischen Endgruppen des Prozessierungszwischenprodukts von denen des Transkripts unterscheiden. *In vitro*-Transkripte erschienen deshalb nicht geeignet, um die Ligationsaktivität zu untersuchen.

Es wurde ein Proteinreinigungsprotokoll entwickelt, mit dem die 5'-Schneideaktivität stark angereichert werden konnte und wenigen, dominanten Proteinbanden zuordbar war. In Verbindung mit Bindungsuntersuchungen der angereicherten Proteine an das Prozessierungssubstrat, führte dies zur Identifizierung einer Aminoacyl-tRNA-Synthetase als mögliches 5'-Schneideenzym. Für drei weitere, durch die Sequenzierungen nicht identifizierbare Proteine, war jedoch nicht sicher auszuschließen, daß auch sie die 5'-Schneideaktivität vermitteln könnten.

7 Literatur

- Abramovitz, D.L. & Pyle, A.M. (1997). Remarkable morphological variability of a common RNA folding motif: The GNRA tetraloop-receptor interaction. *J. Mol. Biol.*, **266**, 493–506. 3.8.3
- Akins, R.A. & Lambowitz, A.M. (1987). A protein required for splicing group I introns in *Neurospora* mitochondrial is mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase or a derivative thereof. *Cell*, **50**, 331–345. 3.8.2
- Altman, S. (1990). Ribonuclease P. Postscript. *J. Biol. Chem.*, **265**, 20053–20056. 1.9
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389–3402. 2.5.4
- Amari, K., Gomez, G., Myrta, A., Di Terlizzi, B. & Pallas, V. (2001). The molecular characterization of 16 new sequence variants of *hop stunt viroid* reveals the existence of invariable regions and a conserved hammerhead-like structure on the viroid molecule. *J. Gen. Virol.*, **82**, 953–962. 3.6
- Aschermann, K. (1997). *Charakterisierung des Gens eines viroidbindenden Proteins mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1.8
- Baumstark, T. (1997). *Alternative RNA-Strukturen in der Prozessierung von Viroiden*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1.7, 1.7.1, 1.7.3, 1.9, 2.1, 2.1, 2.2, 2.4.1, 2.4.1, 2.4.4, 3, 3.1, 3.2, 3.5, 3.7, 4.4, 5.1.6
- Baumstark, T. & 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 a potato nuclear extract. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 4246–4254. 1.6, 1.7, 1.7.1, 1.7.1, 2.1, 2.4.1, 3.1, 3.6, 4.4, 5.1.6, 5.3.2, 5.3.3
- Baumstark, T., Schröder, A.R. & Riesner, D. (1997). Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.*, **16**, 599–610. 1.3, 1.6, 1.7.1, 1.7.1, 4, 1.7.2, 1.7.3, 1.7.4, 5, 2.4.1, 3.1, 3.2, 3.6, 3.8.3
- Behnke, M. (1975). Regeneration in Gewebekulturen einiger dihaploider *Solanum tuberosum* Klone. *Z. Pflanzenzücht.*, **75**, 262–265. 4.6
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H.H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93–99. 5.6.1, 5.6.2
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D. & Edelstein, S.J. (1996). *Protein Methods*. Wiley-Liss, New York. 5.1.1, 5.1.2
- Bonfiglioli, R.G., Webb, D.R. & Symons, R.H. (1996). Tissue and intracellular distribution of coconut cadang cadang viroid and citrus exocortis viroid determined by *in situ* hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *Plant J.*, **9**, 457–465. 1.5
- Branch, A.D., Benenfeld, B.J. & Robertson, H.D. (1985). Ultraviolet light-induced crosslinking reveals a unique region of local tertiary structure in potato spindle tuber viroid and HeLa 5S RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 6590–6594. 1.7.1

- Branch, A.D., Benenfeld, B.J. & Robertson, H.D. (1988). Evidence for a rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9128–9132. 1.6
- Branch, A.D. & Robertson, H.D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science*, **223**, 450–455. 1.6
- Caprara, M.G., Lehnert, V., Lambowitz, A.M. & Westhof, E. (1996). A tyrosyl-tRNA synthetase recognizes a conserved tRNA-like structural motif in the group I intron catalytic core. *Cell*, **87**, 1135–1145. 3.8.2
- Caprara, M.G., Mohr, G. & Lambowitz, A.M. (1996). A tyrosyl-tRNA synthetase protein induces tertiary folding of the group I intron catalytic core. *J. Mol. Biol.*, **257**, 512–531. 3.8.2
- Cech, T.R. & Golden, B.L. (1999). Building a catalytic active site using only RNA. In *The RNA World* (Gesteland, R., Cech, T.R. & Atkins, J.F., Hrsg.), Volume II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, S. 321–350. 3.8.2
- Chamberlain, M., Kingston, R., Gilman, M., Wiggs, J. & deVera, A. (1983). Isolation of bacterial and bacteriophage RNA polymerases and their use in the synthesis of RNA *in vitro*. *Methods Enzymol.*, **101**, 540–568. 5.4.4
- Chen, X., Gutell, R.R. & Lambowitz, A.M. (2000). Function of tyrosyl-tRNA synthetase in splicing group I introns: An induced-fit model for binding to the P4-P6 domain based on analysis of mutations at the junction of the P4-P6 stacked helices. *J. Mol. Biol.*, **301**, 265–283. 3.8.2
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanat-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156–159. 5.3.4
- Clayton, A.D. (1994). A nuclear function of RNase MRP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 4615–4617. 1.9, 3.4
- Daros, J.-A. & Flores, R. (2002). A chloroplast protein binds a viroid RNA *in vivo* and facilitates its hammerhead-mediated self-cleavage. *EMBO J.*, **21**, 749–759. 3.8.1
- Davanloo, P., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Studier, F.W. (1984). Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2035–2039. 5.4.4
- Dickson, E. (1981). A model for the involvement of viroids in RNA splicing. *Virology*, **115**, 216–221. 1.4
- Diener, T.O. (1971). Potato Spindle Tuber „Virus“, IV. A replicating, low weight molecular RNA. *Virology*, **45**, 411–428. 1.1
- Diener, T.O. (1979). *Viroids and Viroid diseases*. Wiley-Interscience, New York. 1.4
- Diener, T.O. (1981). Are viroids escaped introns? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 5014–5015. 1.4
- Diener, T.O., Hrsg. (1987). *The viroids*. Plenum Press, New York. 1.4
- Diener, T.O. (1999). Viroids and the nature of viroid diseases. *Arch. Virol.*, **Suppl. 15**, 203–220. 1.2, 1.4, 1.8

- Diener, T.O., Hammond, R.W., Black, T. & Katze, M.G. (1993). Mechanism of viroid pathogenesis: Differential activation of the interferon-induced double-stranded RNA-activated, MW68000 protein kinase by viroid strains of varying pathogenicity. *Biochimie*, **75**, 533–538. 1.4
- Ding, B., Kwon, M.O., Hammond, R. & Owens, R. (1997). Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant J.*, **12**, 931–936. 1.3, 1.5
- Dujardin, G. & Herbert, C.J. (1997). Aminoacyl tRNA synthetases involved in group I intron splicing. In *Ribosomal RNA and Group I Introns* (Green, R. & Schroeder, R., Hrsg.), Volume 1. Landes Bioscience Austin, TX, S. 179–198. 3.8.2
- Fels, A. (1997). *Startstellen der Viroid-Replikation im Kernextrakt*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1.6
- Fels, A. (1998). *Startstellen der Viroid-Replikation im Kernextrakt*. Doktorarbeit, Heinrich Heine-Universität Düsseldorf. 2.1
- Fels, A., Hu, K. & Riesner, D. (2001). Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts predominantly at two specific sites. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4589–97. 1.6
- Flores, R., Navarro, J.A., de la Pena, M., Navarro, B., Ambros, S. & Vera, A. (1999). Viroids with hammerhead ribozymes: some unique structural and functional aspects with respect to other members of the group. *Biol. Chem.*, **380**, 849–854. 1.1, 1.2
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M. & Diener, T.O. (1998). A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Arch. Virol.*, **143**, 623–629. 1.2
- Francklyn, C., Musier-Forsyth, K. & Martinis, S.A. (1997). Aminoacyl-tRNA synthetases in biology and disease: New evidence for structural and functional diversity in an ancient family of enzymes. *RNA*, **3**, 954–960. 3.8.2
- Gadea, J., Mayda, M.E., Conejero, V. & Vera, P. (1996). Characterization of defense-related genes ectopically expressed in viroid-infected tomato plants. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **9**, 409–415. 1.8
- Gòmez, G. & Pallàs, V. (2001). Identification of an *in vitro* ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Mol. Plant Microbe Int.*, **14**, 910–913. 1.5
- Goodman, T.C., Nagel, L., Rappold, W., Klotz, G. & Riesner, D. (1984). Viroid replication: equilibrium association constant and comparative activity measurements for the viroid-polymerase interactions. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 6231–6246. 1.6
- Greenberg, J.R. (1980). Proteins crosslinked to messenger RNA by irradiating polyribosomes with ultraviolet light. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 5685–5701. 2.5.3, 5.10
- Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H. & Sanger, H.L. (1978). Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature*, **273**, 203–208. 1.2, 1.3
- Gruner, R. (1992). *Wechselwirkung des Viroids der Kartoffel-Spindelknollensucht (PSTVd) mit Wirtsfaktoren in Zellkernen der Tomate (Lycopersicon esculentum)*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1.8
- Gruner, R., Fels, A., Qu, F., Zimmat, R., Steger, G. & Riesner, D. (1995). Interdependence of pathogenicity and replicability with potato spindle tuber viroid (PSTVd). *Virology*,

- 209, 60–69. 1.4, 5.2.3
- Haas, B., Klanner, A., Ramm, K. & Sanger, 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**, 4063–4074. 1.4
- Hadidi, A. (1988). Synthesis of disease-associated proteins in viroid-infected tomato leaves and binding of viroid to host proteins. *Phytopathology*, **78**, 575–578. 1.8
- Hammond, R.W. (1992). Analysis of the virulence modulating region of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by site-directed mutagenesis. *Virology*, **187**, 654–662. 1.3
- Hammond, R.W. (1994). *Agrobacterium*-mediated inoculation of PSTVd cDNAs onto Tomato reveals the biological effect of apparently lethal mutations. *Virology*, **187**, 654–662. 1.3, 1.5
- Hammond, R.W. & Zhao, Y. (2000). Characterisation of a tomato protein kinase gene induced by infection by potato spindle tuber viroid. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **13**, 903–10. 1.8
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557–580. 4.4
- Harders, J., Lukacs, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, T.M. & Riesner, D. (1989). Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.*, **8**, 3941–3949. 1.5
- Hecker, R. (1989). *Die Struktur der intermediaren Ribonukleinsauren bei der Replikation von Viroiden*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 5.4.4
- Heinemann, U., Lauble, H., Frank, R. & Blocker, H. (1987). Crystal structure analysis of an A-DNA fragment at 1.8 Å resolution: d(GCCCGGGC). *Nucleic Acids Res.*, **15**, 9531–9550. 1.6
- Herbert, C.J., Labouesse, M., Dujardin, G. & Slonimski, P.P. (1988). The NAM2 proteins from *S. cerevisiae* and *S. douglasii* are mitochondrial leucyl-tRNA synthetases and are involved in mRNA splicing. *EMBO J.*, **7**, 473–483. 3.8.2
- Hiddinga, H.J., Crum, C.J., Hu, J. & Roth, D.A. (1988). Viroid-induced phosphorylation of a host protein related to a dsRNA-dependent protein kinase. *Science*, **241**, 451–453. 1.4
- Hovanessian, A.G. (1989). The double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon: dsRNA-PK. *J. Interferon Res.*, **9**, 641–647. 1.4
- Hu, K. (2000). *Wechselwirkung beider Startstellen der Transkription von mutierten zirkulären Viroid-Molekulen*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 2.1
- Hu, Y., Feldstein, P.F., Bottino, P.J. & Owens, R.A. (1996). Role of the variable domain in modulation potato spindle tuber viroid replication. *Virology*, **219**, 45–56. 1.3
- Jagus, R., Anderson, W. & Safer, B. (1981). The regulation of initiation of mammalian protein synthesis. *Progr. Nucleic Acids Res.*, **25**, 127–185. 1.4
- Jakab, G., Kiss, T. & Solymosy, F. (1986). Viroid pathogenicity and pre-rRNA processing: a model amenable to experimental testing. *Biochem. Biophys. Acta*, **868**, 190–197. 1.4

- Jucker, F.M. & Pardi, A. (1995). GNRA tetraloops make a U-turn. *RNA*, **1**, 219–222. 3.8.3
- Kämper, U., Kück, U., Cherniack, A.D. & Lambowitz, A.M. (1992). The mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase of *Podospira anserina* is a bifunctional enzyme active in protein synthesis and RNA splicing. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 499–511. 3.8.2
- Katze, M.G. (1992). The war against the interferon-induced dsRNA-activated protein-kinase: Can viruses win? *J. Interferon Res.*, **12**, 241–248. 1.4
- Keese, P. & Symmons, R.H. (1987). Molecular structure (primary and secondary). In *The Viroids* (Diener, T.O., Hrsg.). Plenum Press, New York, S. 63–98. 1.3
- Keese, P. & Symons, R.H. (1985). Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangement and their contribution to viroid evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 4582–4586. 1.2, 1, 1.3
- Kiss, T., Marshallsay, C. & Filipowicz, W. (1992). 7-2/MRP RNAs in plant and mammalian cells: association with higher order structures in the nucleolus. *EMBO J.*, **11**, 3737–3746. 1.9, 2.2, 3.4, 4.5
- Kittle, J.D., Mohr, G., Gianelos, J., Wang, H. & Lambowitz, A.M. (1991). The *Neurospora* mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase in vitro and uses the carboxy-terminal tRNA-binding domain along with other regions. *Genes and Development*, **5**, 1009–1021. 3.8.2
- Klaff, P., Gruner, R., Hecker, R., Sättler, A., Theissen, G. & Riesner, D. (1989). Reconstituted and cellular viroid-protein complexes. *J. Gen. Virol.*, **70**, 2257–2270. 1.8
- Krupp, G. (1988). RNA synthesis: strategies for the use of bacteriophage RNA polymerases. *Gene*, **72**, 75–89. 5.7
- Labouesse, M. (1990). The yeast mitochondrial leucyl-tRNA synthetase is a splicing factor for the excision of several group I introns. *Mol. Gen. Genet.*, **224**, 209–221. 3.8.2
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685. 5.5.3
- Lambowitz, A.M., Caprara, M.G., Zimmerly, S. & Perlman, P.S. (1999). Group I and group II ribozymes as RNPs: clues to the past and guides to the future. In *The RNA World* (Gesteland, R., Cech, T.R. & Atkins, J.F., Hrsg.), Volume II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, S. 451–485. 3.8.2
- Langland, J.O., Jin, S., Jacobs, B.L. & Roth, D.A. (1995). Identification of a plant encoded analog of PKR, the mammalian double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Plant Physiology*, **108**, 1259–1267. 1.4
- Langland, J.O., Langland, L.A., Browning, K.S. & Roth, D.A. (1996). Phosphorylation of plant eukaryotic initiation factor-2 by the plant-encoded double-stranded RNA-dependent protein kinase, pPKR, and inhibition of protein synthesis *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 4539–4544. 1.4
- Loss, P., Schmitz, M., Steger, G. & 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. 1.6
- Martin, W.H. (1922). Spindle Tuber, a new potato trouble. Hints to potato growers. *N.Y. State Potato Assoc.*, **3**, 4ff. 1.1

- Martinis, S.A., Plateau, P., Cavarelli, J. & Florentz, C. (1999). Aminoacyl-tRNA synthetases: A new image for a classical family. *Biochimie*, **81**, 683–700. 3.8.2
- Martinis, S.A., Plateau, P., Cavarelli, J. & Florentz, C. (1999). EMBO WORKSHOP REPORT, Aminoacyl-tRNA synthetases: a family of expanding functions. *EMBO J.*, **18**, 4591–4596. 3.8.2
- Mohr, G., Rennard, R., Cherniack, A.D., Stryker, J. & Lambowitz, A.M. (2001). Function of the *Neurospora crassa* mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase in RNA splicing. role of the idiosyncratic N-terminal extension and different group I introns. *J. Mol. Biol.*, **307**, 75–92. 3.8.2
- Morrissey, J.P. & Tollervey, D. (1995). Birth of the snoRNPs: the evolution of RNase MRP and the eukaryotic pre-rRNA-processing system. *TIBS*, **20**, 78–82. 1.9, 3.4
- Mühlbach, H.P. & Sanger, H.L. (1979). Viroid replication is inhibited by α -amanitin. *Nature*, **278**, 185–188. 1.6
- Mühlbach, H.P. & Sanger, H.L. (1981). Continuous replication of potato spindle tuber viroid (PSTVd) in permanent cell cultures of potato and tomato. *Biosci. Rep.*, **1**, 79–87. 4.6, 5.2.2
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). Revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, **15**, 473–497. 5.2.2
- Owens, R.A., Blackburn, M. & Ding, B. (2001). Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Mol. Plant Microbe Int.*, **14**, 905–909. 1.5
- Owens, R.A. & Hammond, R.W. (1990). Mutational analysis of viroids. *Sem. Virol.*, **1**, 101–107. 1.3, 1.5
- Pace, N.R. & Smith, D. (1990). Ribonuclease P: function and variation. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3587–3590. 1.9
- Paluh, J.L. & Clayton, D.A. (1996). A functional dominant mutation in *Schizosaccharomyces pombe* RNase MRP RNA affects nuclear RNA processing and requires the mitochondrial-associated nuclear mutation *ptp-1* for viability. *EMBO J.*, **15**, 4723–4733. 1.9
- Palukaitis, P. (1987). Potato Spindle Tuber Viroid: Investigations on the long-distance, intra-plant transport route. *Virology*, **158**, 239–241. 1.5
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M. & Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, **20**, 3551–3567. 2.5.4
- Potuschak, T., Rossmannith, W. & Karwan, R. (1993). RNase MRP and RNase P share a common substrate. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3239–3243. 1.9, 2.3, 3.5
- Qu, F., Heinrich, C., Loss, P., Steger, G., Tien, P. & Riesner, D. (1993). Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural elements. *EMBO J.*, **12**, 2129–2139. 1.6
- Rackwitz, H.R., Rohde, W. & Sanger, H.L. (1981). DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature*, **291**, 297–301. 1.6

- Repsilber, D., Wiese, U., Rachen, M., Schröder, A.R., Riesner, D. & 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. 1.6
- Ribas de Pouplana, S. & Schimmel, P. (2000). A view into the origin of life: aminoacyl-tRNA synthetases. *Cell. Mol. Life. Sci.*, **57**, 865–870. 3.8.2, 3.8.4
- Riesner, D. & Gross, H.J. (1985). Viroids. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 531–564. 1.3, 1.4
- Riesner, D., Klaff, P., Steger, G. & Hecker, R. (1987). Viroids: Subcellular location and structure of replicative intermediates. In *Endocytobiology* (Lee, J.J. & Fredrick, J.F., Hrsg.), Volume III. The New York Academy of Sciences, New York, S. 212–237. 4.7
- Roberts, M.W. & Okita, T.W. (1991). Accurate *in vitro* transcription of plant promoters with nuclear extracts prepared from plant cells. *Plant Mol. Biol.*, **16**, 771–786. 5.3.2, 5.3.3
- Robertson, H.A., Rosen, D.L. & Branch, A.D. (1985). Cell-free synthesis and processing of an infectious dimeric transcript of potato spindle tuber viroid RNA. *Virology*, **142**, 441–447. 1.6, 1.7, 3.6
- Rodrigo, I., Vera, P., Frank, R. & Conejero, V. (1991). Identification of the viroid-induced tomato pathogenesis-related (PR) protein P23 as the thaumatin-like tomato protein NP24 associated with osmotic stress. *Plant Mol. Biol.*, **16**, 931–934. 1.8
- Rossmannith, W. & Karwan, R.M. (1998). Characterization of human mitochondrial RNaseP: novel aspects in tRNA processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **247**, 234–241. 3.5
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Ed.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. 4.3, 5.1.2, 5.3.1
- Samuel, C.E. (1991). Antiviral actions of interferon-regulated cellular proteins and their surprisingly selective antiviral activities. *Virology*, **183**, 1–11. 1.4
- Sänger, H.L. (1972). An infectious and replicating RNA of low molecular weight: The agent of the exocortis disease of citrus. *Adv. Biosci.*, **8**, 103–116. 1.1
- Sbisà, E., Pesole, G., Tullo, A. & Saccone, C. (1996). The evolution of the RNase P- and RNase MRP-associated RNAs: Phylogenetic analysis and nucleotide substitution rate. *J. Mol. Evol.*, **43**, 46–57. 2.2
- Schindler, I.M. & Mühlbach, H.P. (1992). Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.*, **8**, 221–229. 1.6
- Schmitz, A. & Riesner, D. (1998). Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different potato spindle tuber viroid strains. *RNA*, **4**, 1295–1303. 1.4
- Schmitz, M. & Steger, G. (1992). Base-pair probability profiles of RNA secondary structures. *Comp. Appl. Biosci.*, **8**, 389–399. 1, 1.7.1
- Schnölzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H. & Sänger, H.L. (1985). Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV). *EMBO J.*, **4**, 2181–2190. 1, 1.3, 1.4

- Schön, A. (1999). Ribonuclease P: the diversity of a ubiquitous RNA processing enzyme. *FEMS Microb. Rev.*, **23**, 391–406. 1.9
- Schrader, O. (1996). *Untersuchung prozessierungsrelevanter Strukturelemente des PSTVd*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1.7.3, 2.4.4, 2.4.4
- Schrader, O. (2001). *Struktur motive für die Prozessierung des Viroids der Kartoffel-Spindelknollensucht (PSTVd)*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 3.7, 3.8.3, 4.4
- Schröder, A.W.R. (1998). *Konformationsspezifische Antisense RNAs für metastabile Viroid-Strukturen*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1.6
- Schumacher, J., Sängler, H.L. & Riesner, D. (1983). Subcellular localization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue. *EMBO*, **2**, 1549–1555. 1.5, 1.8
- Semancik, J.S., Hrsg. (1987). *Viroids and viroid-like pathogens*. CRC Press, Boca Raton. 1.4
- Semancik, J.S. & Weathers, L.G. (1972). Exocortis disease: Evidence for a new species of infectious low molecular weight RNA in plants. *Nature*, **237**, 242–244. 1.1
- Shen, L.X., Cai, Z. & Tinoco, I. Jr. (1995). RNA structure at high resolution. *FASEB*, **9**, 1023–1033. 1.7.1
- Singh, R.P. & Clark, M.C. (1971). Infectious low-molecular-weight ribonucleic acid from tomato. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 1077–1083. 1.1
- Spiesmacher, E., Mühlbach, H.P., Tabler, M. & Sängler, H.L. (1985). Synthesis of (+) and (-) RNA molecules of potato spindle tuber viroid (PSTV) in isolated nuclei and its impairment by transcription inhibitors. *Biosci. Rep.*, **5**, 251–265. 1.6
- Stathopoulos, C., Tsagla, A., Tekos, A. & Drainas, D. (2000). Effect of peptidyltransferase inhibitors on ribonuclease P activity from *Dictyostelium discoideum*. Effect of antibiotics on RNase P. *Mol. Biol. Rep.*, **27**, 107–111. 3.5
- Symons, R.H. (1997). Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2683–2689. 1.6, 3.6
- Symons, R.H.; Hrsg. (1990). Viroids and related pathogenic RNAs. *Semin. Virol.*, **1**. 1.4
- Thiel, V. (1999). *Wechselwirkung von Viroiden mit zellulärer RNA*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. 1.9, 1.10, 2.2, 3, 3.4
- Tollervey, D. & Kiss, T. (1997). Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **3**, 337–342. 1.9, 3.4
- Tornero, P., Conejero, V. & Vera, P. (1994). A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. *Mol. Gen. Genet.*, **243**, 47–53. 1.8
- True, H.L. & Celander, D.W. (1996). Ribonuclease P of *Tetrahymena thermophila*. *J. Biol. Chem.*, **271**, 16559–16566. 3.5
- Tsagris, M., Tabler, M. & Sängler, H.L. (1987). Oligomeric potato spindle tuber viroid RNA does not process autocatalytically under conditions where other RNAs do. *Virology*, **157**, 227–231. 1.6, 1.7, 3.6
- Varani, G. (1995). Exceptionally stable nucleic acid hairpins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**, 379–404. 1.7.1, 3.8.3

- Vioque, A. (1989). Protein synthesis inhibitors and catalytic RNA. Effect of puromycin on tRNA precursor processing by the RNA component of *Escherichia coli* RNaseP. *FEBS Letters*, **246**, 137–139. 3.5
- Warrilow, D. & Symons, R.H. (1999). Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato *in vivo*. *Arch. Virol.*, **144**, 2367–2375. 1.6
- Werner, R., Guitton, M.C. & Mühlbach, H.P. (1993). Nucleotide sequence of a cathepsin D inhibitor protein from tomato. *Plant Physiol.*, **103**, 1473. 1.8
- Werner, R., Mühlbach, H.P. & Guitton, M.C. (1995). Isolation of viroid-RNA-binding proteins from an expression library with nonradioactive-labeled RNA probes. *Bio-techniques*, **19**, 218–222. 1.8
- Wimberly, B., Varani, G. & Tinoco, I. Jr. (1993). The conformation of loop E of eukaryotic 5S ribosomal RNA. *Biochemistry*, **32**, 1078–1087. 1.7.1
- Wolff, P., Gilz, R., Schumacher, J. & Riesner, D. (1985). Complexes of viroids with histones and other proteins. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 355–367. 1.8
- Woo, Y.M., Itaya, A., Owens, R.A., Tang, L., Hammond, R.W., Chou, H.C., Lai, M.M.C. & Ding, B. (1999). Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *Plant J.*, **17**, 627–635. 1.5
- Yarus, M. & Illangasekare, M. (1999). Aminoacyl-tRNA Synthetases and Self-acylating Ribozymes. In *The RNA World* (Gesteland, R., Cech, T.R. & Atkins, J.F., Hrsg.), Volume II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, S. 183–196. 3.8.2
- Zhu, Y., Green, L., Woo, Y.M., Owens, R. & Ding, B. (2001). Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology*, **279**, 69–77. 1.5

8 Anhang

Tabelle 5: **Sequenzen und vermutete Identitäten der dominanten Proteinbanden nach Teilreinigung der 5'-Schneideaktivität.** Zusätzlich zu den Homologiesuchen wurden einige der Proteinbanden auch über eine MS/MS-Ionensuche uninterpretierter MS/MS-Daten mit Hilfe der Mascot Suchmaschine identifiziert (MS/MS-Fragmentation). Sie sind mit (*) gekennzeichnet. Es wurden jeweils nur die Ergebnisse mit der höchsten Homologie angegeben.

66 kDa		
YLLSSWGIEK (*)	Sulfit Reduktase	<i>N. tabacum</i>
Score: 36,3 bits, E-Value: 0,027, Identität: 10/10 (100%), Positive: 10/10 (100%)		
FYESVVLRL (*)	Sulfit Reduktase	<i>N. tabacum</i>
mit 75% Identität in <i>N. tabacum</i> -Sequenz enthalten		
FFTVQEFVK	-	
ENYLQ(GNGV)...K	-	
65 kDa		
keine Sequenzen	-	
64 kDa		
(W,GE)NQL	-	
IDPDNLEILR (*)	N-terminale Acetyltransferase	<i>A. thaliana</i>
Score: 36,3 bits, E-Value: 0,027, Identität: 10/10 (100%), Positive: 10/10 (100%)		
56 kDa		
QSAEADAQ	-	
IYEEFLAVPVSK/ und IYEEFLAVAVLK	multifunktionale Aminoacyl-tRNA- Ligase ähnliches Protein	<i>A. thaliana</i>
Score: 34 bits, E-Value: 0,16, Identität: 10/12 (83%), Positive: 11/12 (91%)		
DLEVPSPLR	multifunktionale Aminoacyl-tRNA- Ligase ähnliches Protein	<i>A. thaliana</i>
mit 78% Identität in <i>A. thaliana</i> -Sequenz enthalten		
48 kDa		
...KLF(Mox.)NK/ oder FGGVVPSSLHK(???)	-	
...VKLL...	-	
keine eindeutigen Sequenzen		

46 kDa

IISTSMKNK (*)	cDNA Kon, EST	<i>O. sativa</i>
QENGELVDLAAYAR	-	

45 kDa

TLDNDLFLLK	-	
LTDNDLFLVR	-	
YAGFPETVPIR	Acetyl-CoA C-Acyltransferase Präcursor	<i>A. thaliana</i>
	Score: 39,2 bits, E-Value: 0,003, Identität: 11/11 (100%), Positive: 11/11 (100%)	
	3-Ketoacyl-CoA Thiolase	<i>C. sativus</i>
	Score: 36,7 bits, E-Value: 0,02, Identität: 10/11 (90%), Positive: 11/11 (99%)	
FKDELLPVATK (*)	Acetyl-CoA C-Acyltransferase 3-Ketoacyl-CoA Thiolase Acetyl-CoA C-Acyltransferase Präcursor	<i>M. indica</i> <i>M. indica</i> Mango
	Score: 30,8 bits, E-Value: 1,2, Identität: 9/11 (81%), Positive: 11/11 (99%)	
DTYPDDILA AVLK	Acetyl-CoA C-Acyltransferase Präcursor	<i>Cucurbita sp.</i>
	Score: 37,0 bits, E-Value: 0,015, Identität: 11/13 (84%), Positive: 12/13 (91%)	

44 kDa

GLPILGVFR (*)	Acetyl-CoA-C-Acetyltransferase Präursor	<i>Cucurbita sp.</i>
	Score: 31,2 bits, E-Value: 0,92, Identität: 9/9 (100%), Positive: 9/9 (100%)	
	3-Ketoacyl-CoA-Thiolase	<i>G. hirsutum</i>
	Score: 31,2 bits, E-Value: 0,92, Identität: 9/9 (100%), Positive: 9/9 (100%)	
DKAAVDSHR/	Acetyl-CoA-C-Acetyltransferase Präursor	
	Score: 28,2 bits, E-Value: 7,2, Identität: 8/9 (88%), Positive: 9/9 (99%)	
RNRTIAAKDYR	cDNA-Klon, EST	<i>S. tuberosum</i>
DTYPDDILA AVLK	Acetyl-CoA-C-Acetyltransferase Präcursor	<i>Cucurbita sp.</i>
	Score: 37,0 bits, E-Value: 0,015, Identität: 11/13 (84%), Positive: 12/13 (91%)	
	3-Ketoacyl-CoA-Thiolase	<i>Cucurbita sp.</i>
	Score: 37,1 bits, E-Value: 0,015, Identität: 11/13 (84%), Positive: 12/13 (91%)	

38 kDa

LTADLIWK (*)	U2 Small Nuclear Ribonukleoprotein A	<i>A. thaliana</i>
Score: 29,9 bits, E-Value: 2,2, Identität: 8/8 (100%), Positive: 8/8 (100%)		
INPNLEGFLPK	U2 Small Nuclear Ribonukleoprotein A	<i>A. thaliana</i>
Score: 29,5 bits, E-Value: 2,9, Identität: 9/11 (81%), Positive: 9/11 (81%)		
VLSLLENNLTK	U2 Small Nuclear Ribonukleoprotein A	<i>A. thaliana</i>
Score: 27,8 bits, E-Value: 9,6, Identität: 8/10 (80%), Positive: 10/10 (100%)		
SGQLPADLNIGDHDVTAK	-	
LENGELSQFLNAAK	-	

28 kDa

KENGKLTDLYLKK	-
APQLFQENGELVDLYLQK	-
...LSWGGG	-

23 kDa

...LSGWG(GG;N)	-
(P deriv.?)LYPLDNDLT...	-
VPAN...oder PVAN	-

17 kDa

QNFFFAGIDK	cDNA Klon, EST	<i>L. esculentum</i>
	(3R)-Hydroxymyristoyl-(acyl carrier protein)-dehydratase	<i>A. thaliana</i>
	beta-Hydroxyacyl-ACP Dehydratase	<i>A. thaliana</i>
	3-Keto-Acyl-ACP-Dehydratase	<i>B. napus</i>
Score: 32,9 bits, E-Value: 0,28, Identität: 9/9 (100%), Positive: 9/9 (100%)		
KDPLSLF	-	

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich diese Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, den 10. Mai 2002