

Untersuchungen zum Pathogenitätsmechanismus von Viroid-RNA

In a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt von

Axel Schmitz

aus Siegen

Düsseldorf

2003

Referent: Professor Dr. Detlev Riesner

Koreferent: Privatdozent Dr. Thomas Lisowsky

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2003

Ja, ich weiß es besser: Gott hat den Menschen erschaffen,
damit er die Herrlichkeit der Welt bewundere.

Jeder Autor, und sei er noch so groß, wünscht, daß sein Werk gelobt werde.

Und in der Bibel, den Memoiren Gottes, steht ausdrücklich:
daß er die Menschen erschaffen zu seinem Ruhm und Preis.

Heinrich Heine

Danksagung

Herrn Professor Riesner gebührt mein Dank für die hervorragenden Arbeitsbedingungen im Institut für Physikalische Biologie und die mir gewährte wissenschaftliche Freiheit

Den „Nachwachsenden“ der Rechnergruppe, allen voran Steffi Gräf, gilt mein Dank für ihre Hilfsbereitschaft

Meinen Laborkolleginnen Viola Thiel, Katja Aschermann und Petra Stroeks danke ich für ein sehr gutes und freundschaftliches Klima und viele persönliche Unterhaltungen

Bedanken möchte ich mich außerdem bei den Herren Angel Ramirez und Roland Gandé, die mit viel Einsatz ihre F-Praktika absolvierten und so wertvolle Teilergebnisse beisteuerten

Dem Bass-Player Olli Bannach sei gedankt für viele mehr oder weniger wissenschaftliche Diskussionen und die exquisiten Probenabende im Bunker

Für den Austausch von Arbeitsmaterial und Ideen sowie seine Freundschaft danke ich Herrn Andreas Michels

Vielfacher Dank gebührt meinen Eltern dafür, daß sie meinen Weg stets unterstützten und mir die Freude an der Natur als hohes Gut vermittelt haben

Meiner lieben Frau Anja danke ich für ihre Liebe und Unterstützung.

Inhalt

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Das Zeitalter der RNA	1
1.2 Nukleinsäurestruktur und ihre Erkennung durch Proteine	2
1.3 Die kleinsten Parasiten	4
1.4 Der Nukleolus - Ort der Viroidanreicherung	6
1.5 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	7
2 Material und Methoden	9
2.1 Arbeit mit Nukleinsäuren	9
2.1.1 Präparation von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial	9
2.1.1.1 Aufreinigung von Viroid-RNA	9
2.1.1.2 Aufreinigung von mRNA	10
2.1.1.3 Isolation von Kern-DNA	10
2.1.2 PCR-Reaktionen	11
2.1.2.1 RT-PCR von PSTVd	11
2.1.2.2 PCR zum Erhalt der Templates für rr1- und rr2-RNA-Transkription	13
2.1.2.3 cDNA-Synthese von mRNA und PCR	13
2.1.2.4 RACE-PCR	14
2.1.3 Klonierungen und Plasmidpräparation	15
2.1.3.1 A-Tailing	15
2.1.3.2 Klonierung in pGEM®-T	16
2.1.3.3 Plasmidpräparation	16
2.1.3.4 Klonierung in pTYB®	17
2.1.4 <i>in vitro</i> -Transkription	18
2.2 Arbeit mit Proteinen	19
2.2.1 Herstellung pflanzlicher Proteinextrakte	19
2.2.2 <i>in vitro</i> -Phosphorylierungsexperimente	20
2.2.3 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine	21
2.2.3.1 Anzucht der Expressionskultur	21
2.2.3.2 Aufreinigung der rekombinanten Proteine	21
2.3 Gelelektrophoresen	23
2.3.1 SDS-PAGE	23
2.3.2 Agarosegele	24
2.3.3 Denaturierende PAGE von Nukleinsäuren	24
2.3.4 Native PAGE von Nukleinsäuren	25
2.3.5 Verzögerungsgele mit Proteinkinase PKR	25
2.3.6 Verzögerungsgele mit Arabidopsis-Nukleolin	26
2.3.7 Bidirektionelle PAGE zur Viroidaufreinigung	27

2.3.8 Elution von Nukleinsäuren aus verschiedenen Gelmatrices	27
2.4 Oligonukleotide	28
3 Ergebnisse	31
3.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren mittels PEG ₆₀₀₀	31
3.1.1 Anreicherung von Viroid-RNA	31
3.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA	33
3.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten	33
3.1.4 Gewinnung von Transkripten nach <i>in vitro</i> -Transkription	34
3.2 RNase-Aktivität in pflanzlichen Proteinfractionen	36
3.3 Modifikation der Rubisco in Proteinextrakten aus viroidinfizierten Pflanzen	38
3.4 Phosphorylierungsmuster von Proteinextrakten aus gesunden und viroidinfizierten Tomatenpflanzen	40
3.5 Verzögerungsgelelektrophorese mit dsRNA-abhängiger Proteinkinase (PKR)	47
3.5.1 Reinheit der verwendeten Proteine	47
3.5.2 Natur der untersuchten Nukleinsäuren	49
3.5.3 Affinität der Proteine zu den verschiedenen Ribonukleinsäuren	50
3.6 Klonierung eines Expressed-Sequence-Tags mit dsRNA-Bindedomäne aus der Tomate	53
3.6.1 HYL1 - ein RNA-bindendes Protein mit wachstumsregulierender Funktion	53
3.6.2 Klonierung eines HYL1-Homologs mittels RACE	54
3.6.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den HYL1-Homologen	56
3.7 Auswahl weiterer, putativer Wechselwirkungspartner von PSTVd	59
3.7.1 SRP9 und SRP14	59
3.7.2 Nukleolin und Fibrillarin	60
3.8 Expression rekombinanter Proteine in Escherichia coli	63
3.8.1 Arabidopsis-Fibrillarin	63
3.8.2 Arabidopsis-Nukleolin	67
3.9 Identifikation durch pflanzliches Nukleolin gebundener RNA-Bereiche	72
3.10 Verzögerungsgelelektrophorese mit Arabidopsis-Nukleolin	73
3.11 Sequenzanalyse von PSTVd-RNA	79
3.11.1 Alte und neue Sequenzvarianten von PSTVd	79
3.11.2 Suche nach PSTVd-homologen Sequenzen	83
4 Diskussion	87
4.1 Die Proteinkinase PKR wird nicht durch Viroid-RNA aktiviert	87
4.2 Weder thermodynamische Instabilität noch eine Biegung der Viroid-RNA korrelieren mit ihrer Pathogenität	89
4.3 Ein neues Pathogenitätsmodell - Wirkung von Viroidbruchstücken als miRNA	90
4.4 Modifikation der Rubisco in Extrakten aus infizierten Pflanzen	92
4.5 PSTVd und der Nukleolus	93
4.6 Ausblick	95

5 Literatur	97
6 Anhang	105
6.1 Neuer Expressed Sequence Tag aus <i>Lycopersicon esculentum</i>	105
6.2 Sequenzen der rekombinant exprimierten Arabidopsis-Proteine	106
6.2.1 Nukleolin	106
6.2.2 Fibrillarin	107
6.3 Neue Sequenzvarianten von PSTVd	108
7 Zusammenfassung	114
Akürzungsverzeichnis	116

1 Einleitung

Die Entdeckung der Doppelhelixstruktur der Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch Watson und Crick im Jahre 1953 läutete eine beispiellose Revolution in der Biologie ein. Nach jahrzehntelangem Rätseln über die Natur der Gene wurde jetzt auf einen Schlag klar, auf welche Weise Information in lebenden Systemen gespeichert ist und wie sie verdoppelt und weitervererbt werden kann. Die sich daraus ergebenden Fragen - wie diese Information abgelesen und umgesetzt wird, wurden in rascher Folge geklärt und führten zum zentralen Dogma der Molekularbiologie: die Basenabfolge der DNA wird kopiert in eine komplementäre Basenabfolge der Ribonukleinsäure (RNA), die in einem Tripletcode übersetzt die Aminosäuresequenz von Proteinen spezifiziert. Den identisch kopierbaren Nukleinsäuren kommt folglich die Rolle des Informationsübermittlers zu, die biochemisch so offensichtlich vielfältigeren Proteine sind demnach die omnipotenten Werkzeuge, die den Ablauf aller Lebensvorgänge vermitteln - daß heißt auch die Genexpression steuern und somit ihre eigene Produktion regulieren. In den letzten Jahren wird zunehmend klar, daß dieses überschaubare Szenario eine unzutreffende Vereinfachung darstellt.

1.1 Das Zeitalter der RNA

Es offenbarte sich überraschenderweise, daß auch RNA enzymatische Funktionen haben kann. Wurde zunächst „nur“ die spezifische Spaltung bestimmter RNAs durch Autokatalyse entdeckt (Guerrier Takada und Altman (1984), Cech *et al.* (1981)), so lieferte die detaillierte Strukturaufklärung der Ribosomen in den letzten Jahren nicht nur den Nachweis, daß die Knüpfung der Peptidbindung durch die ribosomale RNA katalysiert, sondern auch die Wechselwirkung mit der mRNA und den tRNAs fast ausschließlich durch die rRNA vermittelt wird (Yusupov *et al.* (2001), Ogle *et al.* (2001)); den ribosomalen Proteinen - immerhin bei Eukaryonten rund 80 verschiedenen - kommt scheinbar primär die Rolle zu, die rRNA an vielen Stellen zu stabilisieren.

Außerdem stellte sich heraus, daß die Genregulation ein weit vielschichtigerer Vorgang ist, als man je erwarten konnte. Es ist wohlbekannt, daß an regulatorische Bereiche der DNA bindende Proteine die Transkription der mRNA regulieren und mit letzterer wechselwirkende Proteine in einem zweiten Schritt steuern, ob und wann die mRNA dann translatiert wird. Offenbar bietet dieses Szenario jedoch weniger Regulationspotential, als für das Funktionieren hochkomplexer Lebensformen vonnöten ist. Und wieder kommen den RNAs weitere Aufgaben zu. Seit längerem bereits reift die Erkenntnis, daß mRNAs Strukturen ausbilden können, die ihre Stabilität und

Translationskompetenz *in cis* regulieren. Völlig neu dagegen ist, daß beide Eigenschaften durch zusätzlich exprimierte RNAs *in trans* beeinflußt werden können. Aus letzteren müssen in jedem Fall durch Nukleasen zunächst die nur 21-23 Nukleotide langen, sogenannten micro-RNAs (miRNAs) herausgeschnitten werden, die in Tieren die Translation ihrer mRNA-Zielsequenz verhindern, in Pflanzen dagegen i.d.R. deren Abbau determinieren (zur Übersicht: Carrington und Ambros (2003)). Der Mechanismus der RNA-vermittelten RNA-Degradation - die sogenannte RNA-Interference - wird darüber hinaus von vielen Organismen auch zur Abwehr von viralen Infektionen eingesetzt. Sogar im Bereich der Transkriptionsregulation spielen solche kleinen RNAs eine entscheidende Rolle: große Bereiche der komplexen, eukaryontischen Genome sind in der Folge kovalenter Modifizierungen von Histonen und DNA sehr kompakt strukturiert und als sogenanntes Heterochromatin transkriptionell „stillgelegt“. Unter anderem im Verlaufe der Keimzellenbildung und der embryonalen Entwicklung werden diese Modifikationen allerdings transient rückgängig gemacht, um später wieder in identischer Weise neu etabliert zu werden. Kleinen RNAs scheint eine Schlüsselfunktion bei der Determinierung bestimmter Bereiche zur Heterochromatinbildung und somit der transkriptionellen Inaktivierung darin eingeschlossener und angrenzender Gene zuzukommen (Schramke und Allshire (2003), zur Übersicht: Grewal und Moazed (2003)). Wenn also auch bei vielen molekularbiologischen Prozessen die RNA entscheidende Funktionen erfüllt, so sind doch alle nur als komplexes Wechselspiel zwischen Nucleinsäuren und an sie bindenden Proteinen zu verstehen.

1.2 Nucleinsäurestruktur und ihre Erkennung durch Proteine

Im Prinzip muß man davon ausgehen, daß für die Nucleinsäureerkennung wie für jede biochemische Fragestellung unendlich viele Möglichkeiten bestehen, sie durch Kombination der „richtigen“ Aminosäuren zur Polypeptidkette zu erfüllen. Tatsächlich beobachten wir jedoch, daß bestimmte Strukturen in Proteinen besonders häufig und in vielfacher Abwandlung für die Aufgabe der Bindung an Nucleinsäuren verwendet werden. Dabei gibt es Domänen, die offenbar zur Erkennung von DNA und RNA geeignet sind, aber auch solche, die bislang nur mit einem der beiden Vorgänge in Verbindung gebracht werden. Die beiden Nucleinsäuren unterscheiden sich in einem winzigen Detail, was sie faszinierenderweise perfekt zu ihren jeweiligen Aufgaben befähigt: der DNA fehlt die Hydroxylgruppe am C2-Atom der Ribose. Dies hat zwei wichtige Konsequenzen: zum einen wird sie dadurch viel stabiler als die RNA, bei der die Anwesenheit der OH-Gruppe eine Hydrolyse des Phosphatrückgrats und damit einen Bruch in der Polynucleotidkette deutlich erleichtert. Diese chemische Stabilität ist jedoch für die DNA unabdingbar, um ihre Aufgabe der

dauerhaften Speicherung von Erbinformationen zu erfüllen. Zu ebendiesem Zweck liegt sie als durchgängig basengepaarter Doppelstrang vor, was eine schnelle, identische Verdopplung der Erbinformation ermöglicht. Diese äußerliche Gleichförmigkeit könnte jedoch eine spezifische Erkennung bestimmter Abschnitte durch regulatorische Proteine erschweren. Auch hier erweist sich das Fehlen der Hydroxylgruppe als vorteilhaft, weil es der Ribose eine alternative Konformation ermöglicht, die für die RNA ausgeschlossen ist. Nur so kann die DNA-Doppelhelix die unter physiologischen Bedingungen beobachtete B-Helix einnehmen, die durch eine durchgängig geweitete „große Grube“ die spezifische Erkennung der Basenabfolge durch die Seitenketten DNA-bindender Proteine ermöglicht (Steitz (1999)).

Im Gegensatz zur DNA sind RNAs in der Zelle einem stetigen Auf- und -Abbau unterworfen. Daher ist in diesem Fall die durch die 2'Hydroxylgruppe vermittelte Instabilität durchaus sinnvoll. Offenbar ist diese Hydroxylgruppe aber auch für die Funktion von RNAs unabdingbar, weil sie für Wechselwirkungen benötigt wird, die die Ausbildung komplexer räumlicher Strukturen erst ermöglichen: in den kürzlich aufgeklärten Röntgenkristallstrukturen der ribosomalen Untereinheiten (Nenad *et al.* (2000), Wimberly *et al.* (2000)) erwiesen sich diese A-minor-Motiv genannten, vormals unbekanntes Tertiärstrukturelemente als die zahlenmäßig dominierenden „Long-Range-Interactions“ innerhalb der rRNA (Nissen *et al.* (2001)). A-minor-Motive bezeichnen die Einfügung von Adenin-Basen in die kleine Grube von RNA-Helices, welche durch Wasserstoffbrücken zu den 2'OH-Gruppen der Ribosen stabilisiert wird. Diese Art der Wechselwirkung dient darüber hinaus sogar der Überprüfung korrekter Kodon-Antikodon-Basenpaarung in der Akzeptor-Site der Ribosomen und damit indirekt der Gewährleistung des Einbaus der richtigen Aminosäuren in entstehende Proteinketten (Ogle *et al.* (2001)).

Die Erkennung von RNAs durch Proteine ist prinzipiell kein Problem, da sie i.d.R. einzelsträngig vorliegen und sich intramolekular in individuelle Strukturen falten. Diese weisen an vielen Stellen ungewöhnliche Basenpaare und ungepaarte Bereiche auf, die durch Proteine spezifisch erkannt werden können. Außerdem ist die große Grube der RNA-A-Helix in der unmittelbaren Umgebung solcher Sekundärstrukturelemente oftmals aufgeweitet und so auch hier für die basenspezifische Erkennung durch Protein-Seitenketten zugänglich. Die Existenz der 2'OH-Gruppe in der RNA schließlich wird von verschiedenen RNA-Bindemotiven in Proteinen durch die Ausbildung stabilisierender H-Brücken zu dieser Hydroxylgruppe ausgenutzt. Ein Beispiel ist die in der vorliegenden Arbeit u.a. untersuchte dsRNA-Bindedomäne (Abbildung 1), die vermittels dieser Wechselwirkungen eine hohe Affinität zu doppelsträngigen RNA-Bereichen aufweist (Bevilacqua und Cech (1996), Ryter und Schultz (1998), Ramos *et al.* (2000)). Primäres Untersuchungsobjekt

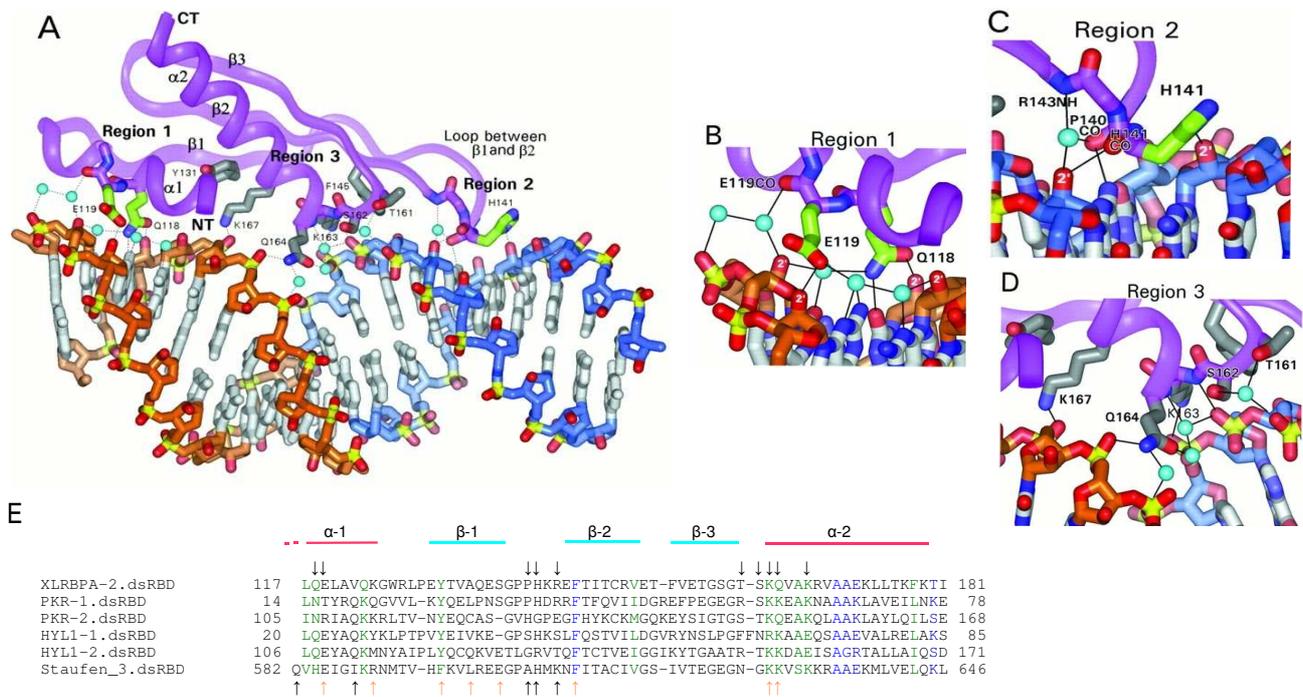


Abbildung 1: Die Doppelstrang-RNA-Bindedomäne (dsRBD)

- A) Röntgenkristallstruktur der zweiten dsRBD des Proteins XLRBPA aus *Xenopus* (lila) im Komplex mit dsRNA (gold und hellblau). Sauerstoffatome sind rot, Stickstoffatome blau und Phosphoratome in der RNA hellgrün dargestellt.
- B) - D) Detaildarstellungen der Kontakte zwischen Protein und RNA. Wassermoleküle sind türkis dargestellt, Wasserstoffbrücken durch schwarze Linien angedeutet, 2'Hydroxylgruppen der Ribosen sind gekennzeichnet. Region 1 (B) liegt innerhalb der Helix α -1, Region 2 (C) im Loop zwischen β -Faltblatt 1 und 2, Region 3 (D) im Loop zwischen β -Faltblatt 3 und der Helix α -2 (vgl. E)).
- E) Sequenzvergleich von dsRBDs aus verschiedenen Proteinen: XLRBPA-2.dsRBD ist die Sequenz der in A) abgebildeten Kristallstruktur, darunter stehen die Sequenzen der jeweils ersten und zweiten dsRBD der humanen, RNA-hängigen Proteinkinase PKR bzw. des Proteins HYL1 aus *Arabidopsis thaliana* (s. Abschn. 2....). Unten steht die Sequenz der dritten dsRBD des Staufen-Proteins aus *Drosophila melanogaster*, deren Struktur im Komplex mit einem RNA-Hairpin mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt wurde (Ramos *et al.* (2000)). Über den Sequenzen sind die Bereiche, welche α -Helices bzw. β -Faltblattstrukturen ausbilden, durch farbige Balken markiert. Die Pfeile über den Sequenzen markieren die in A)-D) hervorgehobenen Aminosäuren, welche Kontakte zur RNA ausbilden. Die schwarzen Pfeile unter den Sequenzen markieren Aminosäuren in der Staufen-Sequenz, für die mittels Nuklear-Overhauser-Effekt- (NOE-) Messungen eine unmittelbare Nähe zur RNA gezeigt werden konnte. Die Pfeile in Orange markieren Aminosäuren, deren Austausch zu Alanin die RNA-Bindung unterdrückt (Ramos *et al.* (2000)). Abbildungen A-D wurden entnommen aus Ryter und Schultz (1998).

der vorliegenden Arbeit ist jedoch eine RNA, deren Existenz ebenfalls das erstaunliche Potential dieser Substanzklasse verdeutlicht.

1.3 Die kleinsten Parasiten

1967 isolierte Theodor Diener als Erreger der Spindelknollensucht in der Kartoffel etwas, daß ins Weltbild der Molekularbiologie nicht so recht passt: eine nackte und mit 359 Nukleotiden relativ kleine RNA (zur Übersicht: Riesner und Gross (1985), Diener (1987)). Alle bis dato bekannten Erreger waren wenigstens in der Lage, für eigene Proteine zu kodieren, was für die Potato Spindle Tuber Viroid- (PSTVd-) RNA nicht der Fall ist. Auch ist aufgrund der bereits erwähnten,



Abbildung 2: Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd)

- a) Sekundärstruktur der 359 Nukleotide umfassenden, zirkulären RNA. In der virulenzmodulierenden Region (VM-Region) unterscheiden sich Sequenzvarianten verschiedener Pathogenität
- b) Eine gesunde Rutgers-Tomate (links) neben Individuen, die mit den PSTVd-Isolaten 23 („Mild“), 26 („Intermediate“) bzw. 48 („Lethal“) infiziert wurden. Die Aufnahme entstand 6 Wochen nach Infektion der Pflanzen

intrinsic Instabilität von RNA bemerkenswert, daß dieses Molekül ohne schützende Proteinhülle auftritt und stabil ist. Dies könnte bedingt sein durch die Tatsache, daß das Viroid im Gegensatz zu allen anderen RNAs zirkulär geschlossen ist, also kein freies Ende aufweist. Das Fehlen eigener Proteine hat aber auch zur Folge, daß dieses parasitierende Molekül nicht über besondere Mechanismen zum Eindringen in seine Wirte verfügt, sondern auf Verletzungen der Pflanzenoberfläche als Eintrittsstellen angewiesen ist. Außerdem kann seine Vermehrung und der Transport durch die Pflanze nur durch Wechselwirkungen mit wirtseigenen Faktoren erfolgen. Da der RNA-Polymerase II-Inhibitor α -Amanitin die Viroidreplikation unterdrückt, liegt nahe, daß dieser Proteinkomplex die Vervielfältigung der Viroid-RNA vermittelt (Schindler und Mühlbach (1992)). Weitere Proteinfaktoren, die für die Prozessierung und den Transport des Moleküls höchstwahrscheinlich benötigt werden, konnten dagegen bis heute nicht sicher identifiziert werden. Der Ablauf der Viroidreplikation dagegen konnte durch die Arbeit von Branch und Robertson (1984) zumindest teilweise aufgeklärt werden. In einem ersten Transkriptionsschritt wird die zirkuläre, einzelsträngige RNA demnach durch einen Rolling-Circle-Mechanismus in einen oligomeren Strang komplementärer Sequenz übersetzt, der dann wiederum als Matrize für die Übersetzung in die Ausgangssequenz dient. Bemerkenswert ist dabei, daß die RNA durch Umfaltungsprozesse zum einen ihre Erkennung durch das normalerweise DNA-abhängige Enzym RNA-Polymerase II in beiden Polaritäten gewährleisten kann, zum anderen aber auch ihre Prozessierung zum monomeren (+)-Strang durch Ausbildung einer metastabilen Struktur selbst ermöglicht (Baumstark *et al.* (1997)). Jedes bekannte Viroid hat ein begrenztes Wirtsspektrum, im

Fälle von PSTVd sind es vor allem viele Nachtschattengewächse, in denen seine Vermehrung effektiv verläuft. Nach wenigen Wochen erreicht es seinen endgültigen Titer von circa 1 Nanogramm pro Milligramm Blattmaterial, was etwa einem Promille der Nukleinsäuremenge in der Pflanze entspricht.

1.4 Der Nukleolus - Ort der Viroidanreicherung

Riesner und Mitarbeiter (Schumacher *et al.* (1983²)) untersuchten die subzelluläre Lokalisation der Viroid-RNA und stellten überraschenderweise fest, daß nahezu die gesamte Menge derselben in den Nukleoli akkumuliert und dort rein rechnerisch eine wenigstens mikromolare Konzentration erreicht. Dieses Ergebnis konnte später durch einen fluoreszenzmikroskopischen Nachweis *in situ* bestätigt werden (Harders *et al.* (1989)). Der Umstand, daß die meisten Wirtspflanzen bei Viroidbefall dennoch keinerlei Symptome zeigen, ist überaus irritierend, wenn man die bemerkenswerten metabolischen Abläufe an diesem Ort der Viroidakkumulation näher betrachtet. Die Nukleoli sind die Orte der Ribosomenbiogenese. Die drei größeren der insgesamt vier eukaryontischen rRNAs werden in Form eines zusammenhängenden Vorläufer-Transkripts synthetisiert. Um die großen benötigten Mengen davon herzustellen - rRNA macht immerhin rund 70 % der zellulären Gesamt-RNA aus - werden viele Kopien der sie kodierenden rDNA benötigt. Mehrere hundert (Säuger) oder tausend (Froschlurche und Pflanzen) rDNA-Einheiten sind im Genom in tandemartigen Anordnungen aufgereiht. Um diese Bereiche bilden sich die dichtesten Strukturen der Zelle - die Nukleoli - als Subkompartimente des Zellkerns. Innerhalb der Nukleoli wird die prä-rRNA nicht nur transkribiert, sondern auch zu den reifen rRNAs prozessiert und mit den circa 80 ribosomalen Proteinen zu den fertigen Untereinheiten assembliert. In jeder Sekunde werden in einer teilungsaktiven Zelle ungefähr 100 Primärtranskripte fertiggestellt (González-Melendi *et al.* (2001), Dundr *et al.* (2002)). Ein einzelnes dieser Transkripte besitzt in ausgezogenem Zustand eine Länge, die dem Durchmesser des Nukleolus entspricht. Ohne Weiterverarbeitung der Transkripte wäre dieses Organell daher innerhalb von 10-30 Minuten vollständig mit RNA ausgefüllt. Tatsächlich erfolgt jedoch nach der Transkription die Prozessierung und Modifizierung der rRNA sowie die Assemblierung mit den ribosomalen Proteinen. Dieser Vorgang bedarf der Mitwirkung von über 100 zusätzlichen Proteinen, die in jüngster Zeit größtenteils identifiziert werden konnten (Harnpicharnchai *et al.* (2001), Grandi *et al.* (2002)), deren jeweilige Funktion jedoch nur in den wenigsten Fällen bekannt ist (zur Übersicht: Fatica und Tollervey (2002)). Außerdem sind an diesen mehrstufigen Vorgängen, die pro Transkript nur wenige Minuten in Anspruch nehmen, eine Vielzahl kleiner RNAs (small nucleolar

(sno) RNAs, zur Übersicht: Terns und Terns (2002)) beteiligt.

1.5 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

Ganz wenige Spezies zeigen bei Viroidbefall deutliche Krankheitssymptome, unter ihnen die Tomatenvarietät Rutgers. Das Ausmaß der Symptome ist außerdem abhängig von der genauen Nukleotidsequenz der replizierenden PSTVd-Variante. Insbesondere Sequenzveränderungen in der virulenzmodulierenden Region (VM-Region) des Viroids haben drastische Auswirkungen auf ihre Pathogenität (Abbildung 2). Der Autor dieser Arbeit konnte zeigen, daß steigende Pathogenität mit einer zunehmenden Krümmung der betreffenden Domäne einhergeht (Schmitz und Riesner (1998)). Sofern diese Struktureigenschaft die Symptomatik tatsächlich bedingt, würde dies eine Wechselwirkung der Viroid-RNA mit einem Proteinmolekül der Wirtspflanze als krankheitsauslösendes Moment nahelegen, da die Stärke der Bindung von Proteinen an RNA von der räumlichen Struktur beider Partner abhängig ist. Hiddinga und Kollegen hatten 1988 die verstärkte Phosphorylierung eines 68 kDa-Proteins in viroidinfizierten Pflanzen beobachtet. Immunologische und biochemische Indizien deuteten darauf hin, daß es sich dabei um das pflanzliche Homolog einer RNA-bindenden Proteinkinase handelt, die aus Säugern bekannt und mittlerweile sehr gut charakterisiert ist (zur Übersicht: Williams (1999)). In Säugetierzellen wird das Enzym durch Kontakt mit dsRNA aktiviert, was in der Folge zum schnellen Erliegen der Translation führt. Dieses Protein erschien folglich als aussichtsreicher Kandidat für die Rolle des pathogenen Wechselwirkungspartners von PSTVd. Die Überprüfung dieses Sachverhalts war ein frühes Ziel der vorliegenden Arbeit. Aus mehreren Gründen mußte jedoch die Aufgabenstellung während der Arbeit geändert werden. So konnte weder eine Korrelation zwischen der Pathogenität des Viroids und dem Phosphorylierungszustand des Enzyms festgestellt noch überhaupt die Beobachtung von Hiddinga bezüglich einer verstärkten Phosphorylierung des 68 kDa-Proteins in infizierten Pflanzen reproduziert werden. Auch eine Analyse der RNA-bindenden Eigenschaften des angereicherten, pflanzlichen Enzyms erbrachte keine Ergebnisse, welche die Hypothese einer pathogenitätsrelevanten Wechselwirkung zwischen ihm und der Viroid-RNA erhärten würden. Zu diesem Zeitpunkt der Arbeit wurde von Lu und Fedoroff (2000) die Entdeckung eines HYL1 genannten Proteins in *Arabidopsis thaliana* publiziert, welches wie die Proteinkinase PKR zwei N-terminale dsRNA-Bindedomänen (dsRBDs) besitzt, jedoch im Gegensatz zur PKR nachgewiesenermaßen eine wichtige Funktion in der Steuerung des Pflanzenwachstums hat. Daher wurde nun versucht, ein Homolog von HYL1 aus Tomatenpflanzen zu klonieren, um seine Wechselwirkung mit PSTVd zu untersuchen. Tatsächlich konnte ein solches Homolog mittels

RACE-PCR identifiziert werden, was sich auf hochinteressante Weise von HYL1 unterscheidet. Allerdings gelang es nicht, die N-terminale Hälfte und damit den RNA-bindenden Teil des Proteins zu erhalten, sodaß seine Expression unmöglich war. Außerdem rückte im Verlaufe der Arbeit die Frage in den Vordergrund, warum die meisten Wirtspflanzen keine Symptome zeigen, obwohl sich die Viroid-RNA zu so erstaunlich hoher Konzentration in den Nukleoli anreichert. Es erschien sinnvoll, die Wechselwirkung von PSTVd mit besonders abundanten, nukleinsäurebindenden Proteinen dieses Organells - namentlich Nukleolin und Fibrillarin - zu untersuchen. Für beide Proteine gelang es nicht, ihre Homologe in der PSTVd-Wirtspflanze Tomate zu identifizieren. Daher wurden die für sie kodierenden cDNA-Sequenzen schließlich aus *Arabidopsis thaliana* kloniert und die Proteine in *Escherichia coli* exprimiert. Nach Aufreinigung der rekombinanten Polypeptide verblieb nur das Nukleolin in löslicher Form. Damit gelang erstmals die Identifikation von durch Nukleolin gebundenen Bereichen in pflanzlicher rRNA. Seine Affinität zu PSTVd ist relativ gering, sodaß eine anfängliche Hypothese, wonach ein abundantes Protein des Nukleolus die Viroid-RNA fest bindet und damit ihre Akkumulation in diesem Organell ohne schädigende Auswirkungen für die Pflanze erlaubt, noch nicht sicher bestätigt werden konnte.

Eine abschließende *in silico*-Analyse der Viroidsequenz legt eine pathogene Wirkung dieser RNA ohne Notwendigkeit einer Wechselwirkung mit Proteinen nahe. Demnach könnten Bruchstücke der PSTVd-Sequenz als miRNAs wirken und bei weitgehender Sequenzkomplementarität zu endogenen mRNAs deren Abbau vermitteln.

Der Darstellung der Untersuchungen zur pflanzlichen PKR und zum *Arabidopsis*-Nukleolin werden im Ergebnisteil dieser Arbeit zwei davon unabhängige Beobachtungen vorangestellt. Die eine betrifft die Stabilität der Viroid-RNA in unterschiedlichen Proteinfractionen aus Pflanzenmaterial, die andere eine Modifikation der großen Untereinheit der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (Rubisco) in infizierten Pflanzen, deren Ausmaß ein sensibles Maß für die Pathogenität der infizierenden Viroid-RNA ist.

Der Ergebnisteil beginnt jedoch mit einer methodischen Verbesserung zur Aufreinigung und Fraktionierung verschiedener Nukleinsäuren, die in der vorliegenden Arbeit durch Fällungen mit Polyethylenglykol erreicht werden konnte.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeit mit Nukleinsäuren

2.1.1 Präparation von Nukleinsäuren aus Pflanzenmaterial

2.1.1.1 Aufreinigung von Viroid-RNA

Benötigte Lösungen:

<u>TNE-Puffer</u>	<u>Phenol</u>	<u>PEG-Lsg.</u>	<u>NaCl-Lsg.</u>
100 mM Tris/HCl, pH 7.5	Kristallines Phenol	50 % (w/v) PEG ₆₀₀₀	5 M NaCl
100 mM NaCl	in H ₂ O gelöst		
10 mM EDTA	(nicht äquilibriert)		
2 % β-Mercaptoethanol		<u>5 mM Tris/HCl, pH8.0</u>	
2 % SDS			

Ablauf:

1. Mörsern des Pflanzenmaterials zu einem möglichst feinen Pulver
2. Zugabe von 2 Volumen TNE-Puffer und 2 Volumen Phenol, kräftiges Schütteln
3. Phasentrennung durch kurzzeitige Zentrifugation, Überführen der oberen Phase in neues Gefäß
4. Zugabe von 1 Pflanzenvolumen Phenol, 1 Volumen Chloroform, kräftiges Schütteln
5. Wiederholung von 3., dann 4., jedoch mit 2 Volumen Chloroform, dann Wiederholung von 3.
6. Einstellen der wässrigen Phase auf 6 % PEG₆₀₀₀, 500 mM NaCl, sorgfältiges Vermischen durch Invertieren, Inkubation auf Eis 1 h, dann Zentrifugation bei mind. 10 000 g für 20 min
7. Der Überstand der Zentrifugation enthält die PSTVd-RNA; die Konzentration an PEG₆₀₀₀ wird im Überstand auf 15 % erhöht, die Konzentration an NaCl durch Zugabe von NaCl-Lsg. bei 500 mM gehalten, Inkubation auf Eis 1 h, dann Zentrifugation
8. Überstand vollständig entfernen; das Pellet enthält die PSTVd-RNA. Es wird in 1/125 des Ausgangsvolumens der wässrigen Phase gelöst (in 5 mM Tris/HCl, pH 8.0) und wie unter 6. behandelt
9. Der Überstand der Zentrifugation enthält die PSTVd-RNA; die Konzentration an NaCl wird durch Verdünnen mit H₂O auf 200 mM gesenkt und die Nukleinsäure durch Zugabe von 2.5 Volumen EtOH und Inkubation auf Eis für 15 min präzipitiert; anschließend Zentrifugation
10. Pellet mit dem doppelten Volumen aus 9. an 70 %igem EtOH überschichten und

erneut zentrifugieren, anschließend bei Raumtemperatur trocknen lassen und in gewünschtem Puffer lösen.

Es ist mit ca. 0.5 ng PSTVd-RNA pro mg Blatt bei einer Gesamtmenge von ca. 2 ng Nukleinsäure pro mg Blatt im finalen pellet zu rechnen.

Zur Darstellung hochreiner PSTVd-RNA wird die aus 10. erhaltene Präparation wie unter 2.3.7 beschrieben aufgetrennt und wie in 2.3.8 erklärt aus dem Gel eluiert.

2.1.1.2 Aufreinigung von mRNA

1. Vorgehen wie unter 2.1.1.1 Punkt 1.-5. beschrieben
2. Einstellen der wässrigen Phase auf 15 % PEG₆₀₀₀, 500 mM NaCl, sorgfältiges Vermischen durch Invertieren, Inkubation auf Eis 1 h, dann Zentrifugation bei mind. 10 000 g für 20 min
3. Überstand vollständig entfernen; Pellet mit dem zweifachen Volumen aus 2. an 70 % EtOH überschichten und zentrifugieren, anschließend Pellet bei Raumtemperatur trocknen lassen
4. Pellet in 0.1 fachem Volumen des eingesetzten Pflanzenmaterials lösen (in 5 mM Tris/HCl, pH 8.0), 1:200 verdünnen und die Nukleinsäurekonzentration spektralphotometrisch bestimmen
5. Behandlung der in 4. erhaltenen Gesamt-Nukleinsäure mit DNase I für 15 min bei Raumtemperatur unter folgenden Bedingungen:
 - 20 mM Tris/HCl, pH 8.0
 - 50 mM KCl
 - 2 mM MgCl₂
 - 200 µg/ml Gesamt-Nukleinsäure
 - 2 units DNase I (GibcoBRL 18047-019) pro µg Nukleinsäure
6. Mg²⁺-Ionen durch Zugabe von 0.5 M EDTA-Lsg. komplexieren, dann Extraktion mit Phenol, Phenol-Chloroform und schließlich Chloroform
7. Wiederholung von 2. und 3.; Pellet in 0.8 µl pro µg eingesetzter Gesamt-Nukleinsäure lösen, 1:100 verdünnen und die RNA-Konzentration spektralphotometrisch bestimmen
8. Aufreinigung von polyA⁺-RNA aus der Gesamt-RNA mittels Oligotex® (Qiagen, Hilden)

2.1.1.3 Isolation von Kern-DNA

Benötigte Lösungen:

	<u>ASP-Puffer</u>	
	17.2 g Saccharose	250 mM
	10 ml 1M Tris/HCl, pH 7.5	50 mM
	1 ml 2 M KCl	10 mM
<u>Zellkern-Resuspensionspuffer</u>	600 µl 1 M MgCl ₂	3 mM
20 mM Tris/HCl, pH 8.0	38 µl 0.8 M Spermin	152 µM
25 mM NaCl	100 µl 1 M Spermidin	502 µM
100 ng/µl RNaseA	ad 200 ml H ₂ O	

120 ml des ASP-Puffers durch Zugabe von
720 µl NP40 auf 0.6 % NP40 einstellen (dieser Puffer wird im Folgenden ASP* genannt).

Ablauf:

1. 5 g Pflanzenmaterial in 15 ml ASP* mörsern, durch 6 Lagen Miracloth filtern, Filtrat in Zentrifugenröhrchen auf Eis auffangen
2. Zentrifugation 8 min bei 800 g in Ausschwenkrotor (z.B. 2150 rpm in Heraeus-Zentrifuge RF)
3. Überstand verwerfen, pellet in 15 ml ASP* resuspendieren, Wiederholung von 2.
4. Überstand verwerfen, pellet in 1 ml ASP resuspendieren, 9 ml Percoll zugeben
5. Zentrifugation 11 min bei 4300 g in Ausschwenkrotor (z.B. 5000 rpm in Zentrifuge RF)
6. die in Form eines Häutchens flotierenden Kerne mit einer abgeschnittenen 1000 µl-Spitze „schlürfend“ abnehmen, sodaß möglichst wenig Percoll (≤ 1 ml) mitgenommen wird; anschließend in ein neues, gekühltes Zentrifugenröhrchen überführen
7. 19 ml ASP zugeben, vorsichtig durchmischen, Zentrifugation 10 min bei 1000 g in Ausschwenkrotor (z.B. 2400 rpm in Zentrifuge RF)
8. Überstand verwerfen, Zellkernpellet in 300 µl Zellkern-Resuspensionspuffer resuspendieren, in Eppi überführen und 30 min bei 37° C inkubieren
9. Einfrieren in flüssigem Stickstoff, dann auftauen, dann nochmals einfrieren und auftauen
10. SDS zu einer Konzentration von 2 % zugeben, dann Extraktion mit äquilibriertem Phenol, dann mit Phenol/Chloroform, dann mit Chloroform
11. DNA ausfällen durch Einstellen der wässrigen Phase auf 10% PEG₆₀₀₀, 500 mM NaCl, Inkubation 30 min bei Raumtemperatur, Zentrifugation bei mind. 10 000 g und Raumtemperatur
12. Überstand vollständig abnehmen, Pellet mit 500 µl 70 % EtOH überschichten, 20 min bei mind. 10 000 g zentrifugieren
13. Pellet mit 250 µl 70 % EtOH überschichten und zentrifugieren, schließlich bei Raumtemperatur trocknen lassen und in 50 µl 5 mM Tris/HCl pH 8.0 lösen
14. eine 1:10 Verdünnung der gelösten Kern-DNA spektralphotometrisch vermessen.

2.1.2 PCR-Reaktionen

2.1.2.1 RT-PCR von PSTVd

A) Reverse Transkription

1. Ein PSTVd-Präp enthaltend 5 ng PSTVd wird mit 20 pmol RT-Primer (z.B. AS2) versetzt, auf

5 µl mit H₂O aufgefüllt, 90 s auf 94° C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

2. den 5 µl PSTVd-Primer-Ansatz mit 15 µl Mix versetzen

3. Inkubation 80 min bei 42° C (vor Verdunstung schützen!)

4. Zugabe von 0.835 µl 5 M NaCl und 60µl EtOH, Inkubation 15 min auf Eis, dann Zentrifugation

5. pellet mit 150 µl 70 % EtOH überschichten und zentrifugieren, anschließend trocknen lassen und in 11 µl 5 mM Tris/HCl, pH 8.0 lösen, davon 1 µl / 25 µl PCR-Volumen einsetzen (s.u.).

<u>Mix</u> (für 4 RT-Reaktionen)

17.87 µl 5 X First strand buffer

8.93 µl 100 mM DTT

4.47 µl 10 mM each dNTP

1.11 µl Superscript II® RT (Invitrogen)

34.7 µl H ₂ O

<u>67 µl</u>

B) PCR

PCR-Reaktionen von PSTVd-cDNA werden mit der Proofreading-Polymerase Platinum Pfx von Invitrogen durchgeführt, wobei den Empfehlungen des Herstellers gefolgt wird. Der Reaktionsansatz enthält:

1 X Pfx-Polymerase-Puffer

1 X Enhancer

1 mM MgSO₄

0.3 mM each dNTP

0.3 µM each Primer (z.B. AS1 und AS2)

0.2 µl Plat.-Pfx-Polymerase / 25 µl PCR-Volumen

1 µl Template aus der RT-Reaktion (s.o., Schritt 5.) / 25 µl

Da das Enzym im Komplex mit einem inhibierenden Antikörper vorliegt, müssen die PCR-Ansätze anfänglich 2 min auf 94° C erhitzt werden.

Anschließend werden 36 Zyklen folgender Art durchlaufen:

15 s Denaturierung bei 94° C, 30 s Annealing bei 50° C, 30 s Polymerisation bei 68° C (beim letzten Zyklus 80 s Polymerisation bei 68° C).

Nach Beendigung der PCR wird die wässrige Phase unter dem Paraffin abgenommen, das genaue Volumen wird nochmals bestimmt und die Lösung auf 13 % PEG₆₀₀₀, 0.5 M NaCl und 4 mM EDTA eingestellt. Nach sorgfältigem Vermischen erfolgt eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur und eine 15 minütige Zentrifugation bei mind. 12 000 g. Der zähflüssige Überstand wird langsam und vollständig mit der Pipette abgenommen und die pelletierte DNA (i.d.R. nicht zu sehen) zweimal durch Überschichten mit 75 µl 70 % EtOH und anschließende Zentrifugation gewaschen. Das getrocknete Pellet wird in 50 µl 5 mM Tris/HCl pH 8.0 gelöst und spektralphotometrisch vermessen. Ungefähre Ausbeuten: 70-500 ng DNA.

Zur Sequenzierung wird ein 100 ng DNA enthaltendes Aliquot wiederum mit 13 % PEG, 0.5 M NaCl (jetzt ohne EDTA) gefällt, zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und dann in 5 µl reinem H₂O

gelöst.

2.1.2.2 PCR zum Erhalt der Templates für rr1- und rr2-RNA-Transkription:

Das Template für die PCR-Reaktionen besteht in diesem Fall aus der in 2.1.1.3 präparierten Kern-DNA. Es werden $2 \cdot 10^6$ Templatekopien auf 25 μ l PCR-Volumen eingesetzt, wobei mit einer Größe des haploiden *Arabidopsis thaliana*-Genoms von $7 \cdot 10^7$ bp und 500 rDNA-Kopien pro haploidem Chromosomensatz gerechnet wurde. Die Parameter der PCR-Reaktion waren identisch zu den unter 2.1.2.1 beschriebenen, jedoch wurden 42 Zyklen durchgeführt. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte ebenfalls wie unter 2.1.2.1 beschrieben.

2.1.2.3 cDNA-Synthese von mRNA und PCR

1 μ g polyA⁺-RNA aus 2.1.1.2 Schritt 8 wird in einem Volumen von 26 μ l mit 7.7 μ M *polydT*-Primer und 0.77 mM each dNTP versetzt, 2 min auf 70° C erhitzt und auf Eis abgekühlt.

Sodann erfolgt die Zugabe von 8 μ l 5 X First-Strand-Buffer (Invitrogen) und 4 μ l 100 mM DTT, worauf 2 min bei 42° C erhitzt wird. Nach Zugabe von 2 μ l Superscript II® RT wird weitere 50 min bei 42° C und anschließend 15 min bei 70° C inkubiert.

Für PCR-Reaktionen mit zwei spezifischen Primern und cDNA als Template kann eine Verdauung der mRNA durch Zugabe von 1 unit RNaseH zu 8 μ l RT-Ansatz und Inkubation bei 37° C für 30 min hilfreich sein. Sodann wird die Lösung auf 5 mM EDTA, 12 % PEG₆₀₀₀ und 0.5 M NaCl eingestellt, 30 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70 % EtOH gewaschen und zu 10 ng/ μ l (bezogen auf eingesetzte mRNA) gelöst. Davon werden dann 2-4 μ l als Template in eine 25 μ l umfassende PCR-Reaktion mit der Platinum Pfx®-Polymerase eingesetzt, die ähnlich wie in 2.1.2.1 erfolgt, jedoch mit folgenden Änderungen:

PCR von Arabidopsis-Nukleolin mit den Primern *nuf* und *nur*: 0.25 μ l Plat.-Pfx-Polymerase auf 25 μ l PCR, 4 μ l Template, 5 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 47° C, dann 38 Zyklen mit einer Ann.-Temp. von 54° C, Polymerisationszeit je 140 s, letzter Zyklus 200 s.

PCR von Arabidopsis-Fibrillarlin mit den Primern *fif* und *fir2*: 0.25 μ l Plat.-Pfx-Polymerase auf 25 μ l PCR, kein Enhancer (!), 2 μ l Template, 5 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 53° C, dann 30 Zyklen mit einer Ann.-Temp. von 61° C, Polymerisationszeit je 70 s, letzter Zyklus 140 s.

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt wie unter 2.1.2.1 beschrieben.

2.1.2.4 RACE-PCR

Für RACE-PCRs muß das Template aus dsDNA bestehen, an deren Enden partiell doppelsträngige Adapter ligiert werden. Dazu werden folgende Lösungen benötigt (Chenichik *et al.* (1996)):

<u>5 X Second Strand Buffer</u>	<u>Mix I</u>	<u>Mix II</u>
100 mM Tris/HCl, pH 7.5	33.5 µl 5 X Sec. Str. Buffer	4.8 µl 10 u/µl DNA-Pol I
500 mM KCl	0.875 µl 10 mg/ml BSA	1.92 µl 5 u/µl E.coli DNA-Ligase
50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	<u>0.69 µl</u> 38 mM β-NAD	0.5 µl 4 u/µl RNaseH
25 mM MgCl ₂	35.07 µl	<u>0.78 µl</u> H ₂ O
		8.0 µl

Sodann erfolgt die Zweitstrangsynthese:

64.4 µl H ₂ O	→ Inkubation 90 min bei 16° C,
21.3 µl Mix I	→ Zugabe von 4.43 µl 3 u/µl T4-DNA-Polymerase
2.13 µl 10 mM each dNTP	→ Inkubation 45 min bei 16° C
13.3 µl RT-Ansatz (aus 2.1.2.3)	→ Fällung mit 12 % PEG ₆₀₀₀ wie unter 2.1.2.3
<u>5.32 µl</u> Mix II	beschrieben.
106.5 µl	→ mit 70 % EtOH gewaschenes pellet in 13 µl H ₂ O lösen

An die doppelsträngige cDNA muß nun der partiell doppelsträngige Adapter ligiert werden, welcher aus den Oligos *ado* und *adu* durch Erhitzen auf 75° C und schnelles Abkühlen resultiert. Das Oligo *ado* sollte bei dieser Hybridisierung in einem wenigstens 5fachen Überschuß vorliegen. In der vorliegenden Arbeit wurde die leidvolle Erfahrung gemacht, daß die darauf folgende Ligation des Adapters an die dsDNA nicht funktioniert, wenn die DNA zuvor nicht an ihren 5' Enden phosphoryliert wurde. Daher:

<u>5 X Ligationspuffer</u>	<u>Phosphorylierung</u>
250 mM Tris/HCl, pH 7.8	1.93 µl cDNA
50 mM MgCl ₂	0.4 µl 10 µM ATP
5 mM ATP	0.3 µl 160 mM DTT
5 mM DTT	0.4 µl 5 u/µl T4 Polynukleotid-Kinase (NEB)
25 % (w/v) PEG ₆₀₀₀	0.85 µl 5 X Ligationspuffer
	<u>0.6 µl</u> 10 µM Adapter (<i>ado</i> 5:1 <i>adu</i>)
	4.5 µl

→ Inkubation 30 min bei 37° C, dann 20 min auf Eis, dann

Zugabe von 0.6 µl 10 mM ATP, 0.3 µl 5 X Ligationspuffer, 0.5 µl 1 u/µl T4 DNA-Ligase (Roche)

→ Inkubation 20 h bei 16° C, → Hitzeinaktivierung der Ligase 4 min bei 65° C

→ Ligationsansatz 1:64 verdünnen mit 10 mM Tricin/KOH, pH 8.4.

Von diesem verdünnten Ligationsansatz werden 2.5 µl auf 25 µl RACE-PCR-Volumen als Template eingesetzt.

Die RACE-PCR-Reaktionen wurden mit einem Gemisch aus Taq- und einer Proofreading-Polymerase, welches zudem durch Antikörper-vermittelte Inhibierung der Taq-Polymerase eine Hot-Start-PCR ermöglicht, durchgeführt (Advantage® cDNA PCR-Kit (Clontech)). Es wurden „Touchdown“-PCR-Bedingungen geschaffen, d.h. anfänglich 5 Zyklen bei 72° C , dann 5 Zyklen bei 70° C und schließlich 30-40 Zyklen bei 64-68° C Annealing- und Polymerisationstemperatur durchlaufen. Dadurch soll gewährleistet werden, daß zunächst nur der genspezifische Primer an die DNA binden kann und so die spezifische Templatmenge erhöht wird, bevor mit 68° C eine Temperatur herrscht, bei welcher der Adapterprimer *ap1* an den nun doppelsträngigen Adapter bindet und eine exponentielle Amplifikation des gewünschten Fragments erlaubt (vgl.3.6).

2.1.3 Klonierungen und Plasmidpräparation

2.1.3.1 A-Tailing

PCR-Produkte wurden i.d.R. zunächst in den Vektor pGEM®-T (Promega) kloniert. Dieses linearisierte Plasmid besitzt an seinen Enden 5´überhängende Thymin-Nukleotide, um die schnelle Klonierung mit Taq-DNA-Polymerase erzeugter PCR-Produkte zu erleichtern, da diese 3´überhängende Adenosine aufweisen. Proofreading-Polymerasen wie die in vorliegender Arbeit verwendete Pfx-Polymerase erzeugen dagegen Blunt-End-Produkte, die jedoch durch anschließende Inkubation mit dATP und Taq-Polymerase zur Klonierung in den pGEM®-T vorbereitet werden können. Dazu wird das PCR-Produkt mit PEG₆₀₀₀ gefällt (s. 2.1.2), zweimalig mit 70 % EtOH gewaschen und nach Trocknung gelöst in

0.5	µl	10 X Taq-Polym.-Puffer ohne Mg ²⁺ (Promega)	
2.49	µl	H ₂ O	
0.3	µl	25 mM MgCl ₂	→ 1.5 mM
0.714	µl	1.4 mM dATP	→ 0.2 mM
<u>1</u>	<u>µl</u>	Taq-DNA-Polymerase (Promega)	→ 5 units
5	µl		

Die Inkubation des Ansatzes erfolgt bei 70° C für 30 min.

Sofern die PCR Produkte verschiedener Länge geliefert hat, sollte der Ansatz nun zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt und das gewünschte Produkt wie unter 2.3.8 beschrieben aus dem Gel eluiert werden. Ist dagegen nur ein Produkt der gewünschten Länge entstanden, so sollte dies aus obigem Ansatz mit PEG₆₀₀₀ gefällt, zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und in 5 mM Tris/HCl, pH 8.0 gelöst werden.

2.1.3.2 Klonierung in pGEM®-T

Das Insert sollte in 2-4fachem, molaren Überschuß über den Vektor vorliegen, d.h. in einer Konzentration von 8-16 ng/µl für ein 1000 bp umfassendes PCR-Produkt. Die Ligation erfolgt dann mittels folgendem

<u>Mix</u>	
	3.25 µl 2 X Ligationspuffer (Promega)
	0.65 µl H ₂ O
	0.65 µl pGEM®-T-DNA (33 ng)
	<u>0.65 µl</u> T4-DNA-Ligase (Promega)
	5.20 µl

Je 1.6 µl Mix wird mit 0.4 µl Insert vermischt; als Kontrolligation wird 1.6 µl Mix mit 0.4 µl H₂O versetzt. Die Ligationsreaktion wird über Nacht bis über 3 Tage bei 4° C inkubiert. Anschließend:

- 2 µl Ligationsansatz + 5 µl 10 mM Tricin/KOH, pH 8.4
- Inkubation bei 65° C für 12 min (Inaktivierung der Ligase)
- 7 µl Ligat.-Ansatz + 1.29 µl 50 % PEG + 0.921 µl 5 M NaCl, sorgfältig vermischen, Inkubation 30 min Raumtemperatur, Zentrifugation 20 min 17 000 rpm, 18° C
- Pellet zweimal mit 30 µl 70 % EtOH waschen
- pellet in 5 µl H₂O lösen, in 45 µl DH5α -Zellen elektrotransformieren
- sofort nach Beendigung des Entladungs-Pulses 950 µl SOC (Sambrook *et al.* (1989)) zugeben
- Zellen in Reagenzglas überführen, 45 min schütteln bei 37° C
- 80 µl auf IPTG/X-Gal-Platten (Sambrook *et al.* (1989)) ausplattieren, die restlichen 920 µl bei 1000 g (3400 rpm in Eppifuge) pelletieren, in 80 µl SOC resuspendieren und ebenfalls ausplattieren

Am nächsten Morgen sollten auf den Ligations-Transformationen deutlich mehr Kolonien, am besten mehr weiße Kolonien gewachsen sein als auf den Platten mit der Ligationskontrolle (H₂O).

2.1.3.3 Plasmidpräparation

1. weiße Klone auf IPTG/X-Gal-Masterplatte übertragen und außerdem in je 5 ml LB/Amp über Nacht bei 37° C schütteln
2. Ernte nach 15 h 30 min: Zellen bei max. 3000 g 12 min pelletieren (2400 rpm in GPKR)
3. alkalische Lyse mit je 300 µl P1, P2, P3 (Sambrook *et al.* (1989)), P1 enthält 100 ng/µl RNaseA
Nicht länger als 5 min bei Raumtemperatur nach Zugabe von P2 inkubieren!
Jeweils vorsichtig 6mal invertieren!
4. Zentrifugation 15 min bei 18° C und 12 000 rpm, Überstand abnehmen, dieser muß

absolut klar sein, im Zweifelsfalle nochmal zentrifugieren

5. Zugabe von 166 µl 50 % PEG und 118 µl 5 M NaCl zu 900 µl Cleared Lysate, sorgfältig vermischen durch Invertieren, Inkubation 30 min bei Raumtemperatur
6. Zentrifugation bei 18° C, Überstand vollständig abnehmen, Pellet waschen mit 1 ml 70 % EtOH
7. Pellet lösen in 15 µl 5 mM Tris/HCl pH 8.0
8. 1:50 oder ggf. 1:150-Verdünnung im Spektralphotometer vermessen: es sind 5-90 µg Plasmid zu erwarten.

2.1.3.4 Klonierung in pTYB®

Die PCR-Produkte, welche in den Expressionsvektor pTYB® kloniert werden sollten, lagen zunächst „subkloniert“ in pGEM®-T vor. Nach Verdauung mit den Restriktions-Endonukleasen NdeI und SapI wurden die gewünschten Inserts aus Agarosegelen eluiert. Jedoch war es nicht möglich, die so erhaltenen Fragmente in den Expressionsvektor zu ligieren. Daher wurde schließlich auf eine Gelelution sowohl dieser Inserts wie des ebenso verdauten pTYB®-Vektors verzichtet. Zu diesem Zweck mußte jedoch zum einen sichergestellt werden, daß der Vektor pTYB® vollständig verdaut war, was durch mehrmalige Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen erreicht werden konnte. Das durch die Enzyme entfernte Insert konnte durch eine Fällung der Plasmid-DNA mit 6 % PEG₆₀₀₀ und 0.5 M NaCl abgetrennt werden. Zum anderen mußte das Plasmid pGEM®-T zerstört werden, da es sonst mit dem pTYB®-Vektor in der Ligationsreaktion konkurriert hätte. Dies gelang durch den zusätzlichen Einsatz der Endonukleasen PvuII (bei Behandlung des Fibrillarin-Inserts, besitzt 2 Schnittstellen auf pGEM®-T) bzw. NcoI (bei Behandlung des Nukleolin-Inserts, besitzt 1 Schnittstelle auf pGEM®-T). Nach zweimaliger Verdauung und Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme (NdeI-, SapI-, NcoI-Verdauung von pGEM®-T-Nukleolin) bzw. Phenol-/Chloroform-Extraktion ((NdeI-, SapI-, PvuII- Verdauung von pGEM®-T-Fibrillarin) wurden die Inserts mit 6 % (Nukleolin) bzw. 13 % (Fibrillarin) PEG₆₀₀₀ und 500 mM NaCl gefällt, die pellets mit 70 % EtOH gewaschen und zu 52 ng/µl (Fibrillarin) bzw. 130 ng/µl (Nukleolin) in H₂O gelöst. Damit wurde bei folgender Ligation ein 3facher (Fibrillarin) bzw. 3.6facher (Nukleolin) Überschuß an Insert über den

Vektor pTYB® gewährleistet. Zur Ligation diente folgender Mix:
Je 7.95 µl Mix wurden mit 1.05 µl Insert bzw. 1.05 µl H₂O (Kontrolle) versetzt und die Ansätze über Nacht

<u>Mix</u>
14.06 µl 2 X Ligationspuffer (Promega)
6.58 µl H ₂ O
1.88 µl pTYB®/NdeI/SapI (→ 470 ng)
<u>2.34 µl</u> T4-DNA-Ligase (Promega)
24.9 µl

bei 16° C inkubiert. Nach Komplexierung der Mg²⁺-Ionen mittels EDTA wurde die Ligase durch Erhitzen auf 65° C für 12 min inaktiviert und die DNA anschließend mit 7 % PEG₆₀₀₀ und 500 mM NaCl durch Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur gefällt. Die Pellets wurden mit 70 % EtOH gewaschen, in je 3 µl 5 mM Tris/HCl, pH 8.0 gelöst und nochmals mit NcoI und SapI verdaut, um gegebenenfalls entstandene Religate der Vektoren zu inaktivieren. Es schloss sich wiederum eine Hitzeinaktivierung der Enzyme, eine Fällung der DNA mit 6 % PEG₆₀₀₀ und 500 mM NaCl sowie ein zweimaliges Waschen der Pellets mit 70 % EtOH an, worauf die Nukleinsäure in je 5 µl H₂O gelöst und zur Elektrotransformation von DH5α-Zellen - wie unter 2.1.4.2 beschrieben - eingesetzt wurde. Allerdings war hier eine Blau-/Weiss-Selektion insertragender Kolonien nicht möglich. Gewachsene Klone wurden wie unter 2.1.4.3 beschrieben angezogen, die Plasmid-DNA aus ihnen präpariert und mittels Restriktionsverdauung auf das Tragen der gewünschten Inserts hin überprüft. 1 ng dieser Plasmide wurden daraufhin mittels Hitzeschock (Sambrook *et al.* (1989)) in 49 µl Escherichia coli-Zellen des Expressionsstammes BL21 CodonPlus® (DE3) RIL (Stratagene) transformiert. Dabei war die Ausbeute an Transformanden sehr gering: nach Ausplattieren des gesamten Transformationsansatzes resultierten nur maximal 20 Kolonien.

2.1.4 *in vitro*-Transkription

In vitro-Transkriptionen wurden nach einem Protokoll von Hecker (1989) durchgeführt.

Benötigte Lösungen:

<u>10 X NTP</u>	<u>5x IVT A</u>	<u>5 X IVT B</u>
10 mM each NTP	10.5 mM NaH ₂ PO ₄	40 mM MgCl ₂
	90.5 mM Na ₂ HPO ₄	20 mM Spermidin
	50 mM DTT	mit 10 M NaOH auf pH 7.7 einstellen
	(sollte pH 7.7 aufweisen)	

Transkriptionsansatz:

50 nM Template-DNA
 1 X IVT A
 1 mM each NTP
 1 X IVT B
 1.2 µl RNAsin (Promega) / 100 µl Transkriptionsansatz
 15 u/µl T7-RNA-Polymerase des Hauses

Der Ansatz wird 90 min bei 37° C inkubiert, dann wird nochmals eine gleiche Menge T7-RNA-Polymerase hinzugegeben und die Inkubation bei 37° C für weitere 90 min fortgesetzt. Es schließt sich die Komplexierung des Mg²⁺ durch Zugabe von EDTA und eine Fällung der Nukleinsäure durch Einstellen der Lösung auf 15-20 % PEG₆₀₀₀ (20 % für Transkripte unter 300 nt Länge) und

500 mM NaCl sowie Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min an. Die durch Zentrifugation pelletierte Nukleinsäure wird mit 70 % EtOH gewaschen und in einem gewünschten Puffer gelöst. Falls gewünscht, kann die Template-DNA nun durch eine Verdauung mit DNase entfernt werden. Sofern das Template aus linearisierter Plasmid-DNA besteht, kann es vor der Einstellung auf 15 % PEG₆₀₀₀ mit nur 6 % PEG₆₀₀₀ selektiv gefällt werden (s. 3.1.4). Es steht so für weitere Transkriptionen zur Verfügung; die Transkripte werden in diesem Fall anschließend durch Erhöhung der PEG₆₀₀₀-Konzentration im Überstand bei Beibehaltung von 500 mM NaCl gefällt und wie oben beschrieben gewaschen und gelöst.

2.2 Arbeit mit Proteinen

2.2.1 Herstellung pflanzlicher Proteinextrakte

Die Herstellung der Proteinextrakte orientierte sich an einem Protokoll von Langland und Mitarbeitern (1995), weist demgegenüber jedoch folgende Veränderungen auf: zum Schutz der RNA wurden 10 mM statt 5 mM EDTA eingesetzt; um den *in vivo*-Zustand der Kinasen „einzufrieren“, wurden dem Aufschlußpuffer 5 mM NaF und 5 mM Aminopurin zugesetzt; die Konzentration an PMSF betrug hier nur 200 µM statt 2 mM; an Stelle des Proteinaseinhibitors Aprotinin wurden Pepstatin und Leupeptin (je 1 µM) verwendet.

Benötigte Lösungen:

<u>Aufschlußpuffer</u>	<u>RSW-Puffer</u>	<u>Dialysepuffer</u>
50 mM Tris/HCl, pH 7.5	wie Aufschlußpuffer, jedoch	20 mM Tris/HCl, pH 7.5
100 mM KCl	mit 1.5 M KCl	100 mM KCl
10 mM EDTA		5 mM MgCl ₂
5 mM DTE		5 mM MnSO ₄
10 mM NaF		5 mM DTE
10 mM 2-Aminopurin		10 mM NaF
200 µM PMSF		1 mM Benzamidin
1 µM Pepstatin		200 µM PMSF
1 µM Leupeptin		10 % Glycerin

Ablauf:

Alle Arbeitsschritte werden bei 4° C oder auf Eis ausgeführt!

1. Pflanzenmaterial in zwei Volumen Aufschlußpuffer mörsern
2. Filtration durch 6 Lagen Miracloth
3. Filtrat 20 min bei 10⁴ g zentrifugieren; der Überstand wird S10 genannt, ein Aliquot desselben kann abgenommen werden
4. Zentrifugation des Überstandes aus 3. für 90 min bei 10⁵ g; der Überstand wird S100 genannt
5. Das Pellet aus 4. enthält die Ribosomen; es wird in einem halben Pflanzenvolumen RSW-Puffer resuspendiert und anschließend wiederum 90 min bei 10⁵ g zentrifugiert, der Überstand heißt Ribosomal Salt Wash (RSW), das pellet wird verworfen
6. Vor dem Einsatz der Proteinpräparationen im Phosphorylierungsexperiment müssen diese über Nacht gegen das 300fache, dann je 4 h gegen das 200fache und gegen das 100fache Pflanzenvolumen Dialysepuffer dialysiert werden
7. Tritt während der Dialyse ein Niederschlag auf, so wird dieser durch Zentrifugation bei 10⁴ g für 10 min entfernt; die Präparationen werden aliquotiert und bei -80° C gelagert.

2.2.2 *in vitro*-Phosphorylierungsexperimente

Proteinpräparationen aus Tomatenpflanzen, die mit verschiedenen Sequenzvarianten von PSTVd infiziert waren, wurden durch Analyse von Verdünnungsreihen in Coomassie-Blue-gefärbter SDS-PAGE hinsichtlich ihrer Proteinkonzentrationen verglichen. Sodann wurden vergleichbare Proteinmengen enthaltende Aliquots durch Zugabe von Dialysepuffer auf ein gleiches Volumen von 12 µl gebracht und mit 1.7 µl Phosphorylierungsmix versetzt.

37 mM DTE
 15 mM PMSF
 7.4 µM Pepstatin
 7.4 µM Leupeptin
 37 µM ATP
 2.5 µCi/µl γ-³²P-ATP (0.54 µM)

In einzelnen Ansätzen wurde außerdem das dsRNA-Analog poly(IC) oder der PKR-Inhibitor Aminopurin (beide von Sigma) zugesetzt.

Nach einer Inkubation bei 26° C für 5-12 min wurden 14 µl 2 X SDS-Auftragspuffer zugegeben, die Ansätze 5 min bei 95° C denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgte eine Färbung der Gele mit Coomassie-Brilliant-Blue und anschließende Autoradiographie für 1-27 h.

2.2.3 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

2.2.3.1 Anzucht der Expressionskultur

1. Eine „gepickte“ Kolonie aus 2.1.3.4 wird in 20 ml LB-Vorkultur enthaltend 50 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Chloramphenicol angezogen
2. nach 5-9 Stunden sind 0.6 A₆₀₀ erreicht, 800 µl der Vorkultur wird mit 800 µl SOB-Medium (Sambrook *et al.* (1989)) enthaltend 30 % Glycerin versetzt, auf Eis gekühlt und dann bei -80° C eingefroren; mit 2 ml der Vorkultur wird 1 Liter LB enthaltend 50 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml Chloramphenicol beimpft
3. nach 4-6 Stunden sind 0.6 A₆₀₀ erreicht, die Expression des rekombinanten Proteins wird nun durch Zugabe von IPTG zu 0.4 mM induziert; anschließend wird die Kultur entweder 15 h bei 15° C (Nukleolin) oder 5 h bei Raumtemperatur (Fibrillarlin) geschüttelt
4. Die Kultur wird in Aliquots á 250 ml für 10 min bei 5000 g und 4° C zentrifugiert (6100 rpm in JA 10)
5. Die Zellpellets werden in je 20 ml 175 mM NaCl resuspendiert, in Falconröhrchen überführt und die Zellen in einem Ausschwenkrotor bei max. 5000 g erneut pelletiert. Der Überstand wird entfernt, die Zellpellets werden bis zu ihrer Aufarbeitung bei -20° C gelagert.

2.2.3.2 Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Die Aufreinigung folgt den Empfehlungen des Herstellers des IMPACT®-Expressionssystems (NewEnglandBiolabs).

Benötigte Lösungen:

<u>Säulenpuffer (Fibrillarlin)</u>	<u>Säulenpuffer (Nukleolin)</u>	<u>Waschpuffer</u>
20 mM Tris pH 8.0	20 mM Mes/NaOH, pH 6.0	wie Säulenpuffer, jedoch
500 mM NaCl	500 mM NaCl	mit 0.5-1.5 M NaCl
1 mM EDTA	1 mM EDTA	
0.1 % Triton X-100	0.1 % Triton X-100	

Ablauf:

Alle Arbeitsschritte werden bei 4° C oder auf Eis ausgeführt!

1. 2 ml „Slurry“ (≡ 1 ml Chitin-Affinitäts-Matrix) werden äquibriert mit 10 Volumen Säulenpuffer in einem „Gravity-Flow“-Chromatographie-Röhrchen mit ca. 15 mm Durchmesser
2. Ein 250 ml-Zellpellet wird in 12.5 ml Column-Buffer enthaltend 20 µM PMSF resuspendiert und im Falconröhrchen sonifiziert: 1 X 1 min bei 35 W, 5 X 1 min bei 31 W, 4 X 1 min bei 25 W

(Schalter rechts auf 0.9, Einstellung „low“, feine Spitze am Labsonic® U (Braun Biotech)),
Abnehmen eines 50 µl Aliquots („total cell“)

3. Zentrifugation 30 min bei 14 000 rpm und 4° C in JA 17 (20 000g), Abnehmen eines 50 µl Aliquots („cleared lysate“)

4. Das Zellysat in ca. 25 min auf das Chromatographieröhrchen laden, ein 50 µl-Aliquot des Durchflusses aufbewahren („flow through“)

5. Fibrillarin: Säulchen spülen mit 100 ml Waschpuffer enthaltend 1.5 M NaCl, anschließend mit 24 ml Waschpuffer enthaltend 1 M NaCl

Nukleolin: Säulchen spülen mit 50 ml Waschpuffer enthaltend 1.5 M NaCl, anschließend mit 8 ml Waschpuffer enthaltend 0.5 M NaCl , dann mit 8 ml Fibrillarin-Säulenpuffer

In beiden Fällen ein 5 µl-Aliquot der Säulenmatrix aufbewahren

6. Säulchen spülen mit 12 ml Fibrillarin-Waschpuffer enthaltend 1 M NaCl (Fibrillarin) bzw. 0.5 M NaCl (Nukleolin) und 50 mM DTT (Elutionspuffer)

7. Verschließen der Chromatographiesäule enthaltend 1 Volumen Elutionspuffer, Inkubation über Nacht

8. Elution mit 1 ml Elutionspuffer, Chromatographiesäule erneut verschließen und Inkubation fortsetzen; ein 5 µl-Aliquot der Säulenmatrix abnehmen; Eluat mit 10 % Glycerin versetzen

9. Analyse der Aufreinigungsschritte mittels SDS-PAGE (Coomassie-Blue-gefärbt), dabei Auftragspuffer ohne β-Mercaptoethanol verwenden, um Inteinspaltung überprüfen zu können; aufzutragende Proben:

- 5-20 µl „total cell“, „cleared lysate“, „flow through“, am besten jeweils Verdünnungsreihe
- 5 µl Säulenmatrix vor und nach DTT-Spaltung
- 2-50 µl Eluat, ggf. durch Acetonfällung aufkonzentriert

10. Aufkonzentrierung und Pufferwechsel für das rekombinante Nukleolin mittels Centricon®YM-30-Ultrafiltrations-Röhrchen:

Dialysepuffer (Nukleolin)

10 mM Tris pH 7.5

50 mM KCl

7 mM DTT

2 ml Eluat bei 3000 g im Festwinkelrotor für 35 min filtrieren

(sollten noch ca. 500 µl übrig sein), dann Zugabe von 1 ml

Dialysepuffer und nochmalige Filtration bei 3000 g für 1 h, dann Vorgang noch dreimal wiederholen (insgesamt 4 ml Dialysepuffer zugeben); das aufkonzentrierte Nukleolin schließlich mit Glycerin zu 30 % versetzen und aliquotiert bei -20° C lagern.

2.3 Gelelektrophoresen

2.3.1 SDS-PAGE

Diskontinuierliche, denaturierende PAGE von Proteinen nach Laemmli (1970):

Benötigte Lösungen:

<u>4 X Trenngelpuffer</u>	<u>4 X Sammelgelpuffer</u>	<u>10 X Laufpuffer</u>
1.5 M Tris/HCl pH 8.8	0.5 M Tris/HCl pH 6.8	250 mM Tris 1.92 M Glycin

Alle Puffer werden autoklaviert, das Trenn- und Sammelgel sowie der Laufpuffer werden außerdem mit SDS zu 0.1 % versetzt. Direkt nach dem Gießen des Trenngels wird dieses mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Vor dem Gießen des Sammelgels wird das Isobutanol entfernt und zweimal mit Wasser gespült.

Die Proben werden mit einem Volumen 2 X SDS-Auftragspuffer versetzt, 5 min auf 95° C erhitzt und anschließend kurz zentrifugiert.

2 X SDS-Auftragspuffer

125 mM Tris/HCl pH 6.8, 5 % SDS, 30 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 0.02 % Bromphenolbl.

Die Färbung der Gele erfolgt mit Coomassie Brilliant Blue (Nachweisgrenze ca. 30 ng / Bande) oder mit Silbernitrat (Nachweisgrenze ca. 1 ng / Bande).

Coomassie-Blue-Färbelösung

0.1 % (w/v) Coomassie Blue R250
45 % Methanol
10 % Essigsäure

Entfärbelösung

10 % Methanol
10 % Essigsäure

Das Gel wird mindestens 10 min in Färbelösung geschüttelt, welche mehrfach wiederverwendet werden kann. Die anschließend angewendete Entfärbelösung kann zwischendurch gewechselt werden. Ein zugefügtes Stück Zellstoff kann die Entfärbung durch Adsorption des Farbstoffs erleichtern.

Färbung mit Silbernitrat

Fixierer 1

50 % EtOH
12 % Essigsäure

Fixierer 2

30 % EtOH

Stoppbad

25 % EtOH
12 % Essigsäure

Verstärker

0.2 g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
(frisch angesetzt)

Färbelösung

2 g/l AgNO_3
750 $\mu\text{l/l}$ 36 %ige
Formaldehydlösung

Ablauf

- 20 min in Fixierer 1
- 20 min in Fixierer 2
- 1 min in Verstärker
- 3 X 20 s waschen mit demineralisiertem H₂O
- 20 min in Färbelösung
- 3 X 20 s waschen mit demineralisiertem H₂O
- Schütteln in Entwickler bis Färbung zufriedenstellend
- 10 min in Stoppbad

2.3.2 Agarosegele

Agarosegele dienen der Auftrennung großer (500-10 000 bp) DNA-Moleküle.

<u>10 X Na-TAE</u>	<u>0.4 X Na-TAE-Auftragspuffer</u>
1 M Natriumacetat	0.4 X Na-TAE-Puffer
400 mM Tris	40 % Glycerin
10 mM EDTA	0.02 % Bromphenolblau
Einstellung von pH 8.4 mittels Essigsäure	0.02 % Xylencyanol

Die Elektrophorese in Agarosegelen wird in einer Kammer der Firma *Hofer Scientific Instruments* durchgeführt. Das vertikale, zwischen zwei Glasplatten befindliche Gel ist dabei vollständig in das 4 l umfassende, gekühlte Pufferbad des Anodenraums eingetaucht. Es hat die Abmessungen 150 mm × 160 mm × 1.1 mm. Zwischen die Glasplatten wird zunächst etwa 2 cm hoch ein 4 %iges Polyacrylamidgel vom Vernetzungsgrad 43:1 gegossen. Sodann wird die Agarose zu 0.9-1.5 % (w/v) in 0.2 X Na-TAE-Puffer mittels Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlung auf etwa 50 ° C zwischen die Glasplatten auf das Polyacrylamidgel gegossen.

Die Nukleinsäureproben werden mit 1 Volumen 0.4 X Na-TAE-Auftragspuffer versetzt und in einem Gesamtvolumen von unter 10 µl in 5 mm breite Auftragstaschen pipettiert. Die Elektrophorese verläuft bei 12-19 V/cm und 18° C für 30-60 min. Anschließend wird das Gel für 5 min in einer Ethidiumbromidlösung der Konzentration 1 µg/ml und für 3 min in Wasser geschüttelt. Die Nukleinsäurebanden können dann auf einem UV-Schirm sichtbar gemacht werden.

2.3.3 Denaturierende PAGE von Nukleinsäuren

Die denaturierende Elektrophorese von Nukleinsäuren verläuft in 4-7 %igen Polyacrylamidgelen vom Vernetzungsgrad 29:1 enthaltend 8 M Harnstoff. Diese werden nicht gekühlt - die zur Denaturierung benötigte Erwärmung wird durch den Stromfluß bewirkt. An die Gele der

<u>10 X TBE</u> 890 mM Tris 890 mM Borsäure 25 mM EDTA Puffer hat pH 8.4
--

Abmessung 19 cm × 16 cm × 0.5 mm wird daher bereits vor

Auftragung der Proben eine Spannung von über 1000 V angelegt,

woraus eine Leistungszufuhr von ca. 70 W resultiert, die zu einer

Erwärmung des Gels auf 55-60° C führt. Gel und Laufpuffer ist 0.5

X TBE. Die aufzutragenden Nukleinsäureproben werden zunächst

in einem Volumen von 10 µl mit Formamid zu einer Konzentration

von mindestens 50 % versetzt. Daraufhin werden sie für 90 s auf 95° C erhitzt und anschließend in einem EtOH/H₂O-Gemisch von -20° C abgeschreckt. Nach Beendigung der Elektrophorese schließt sich eine Färbung der Nukleinsäuren mit Silbernitrat an:

<u>Fixierer</u> 10 % EtOH 0.5 % Essigsäure
--

<u>AgNO₃-Lösung</u> 1.9 g/l AgNO ₃

<u>Entwickler</u> 15 g/l NaOH 0.12 g/l NaBH ₄ → in H ₂ O lösen, dann Zugabe von 4.4 ml/l 36 %ige Formaldehydlsg.
--

<u>Stoppbad</u> 7.5 g/l NaHCO ₃

Ablauf der Färbung:

- 10 min in Fixierer
- 20 min in AgNO₃-Lösung
- ca. 5 min in Entwickler bis Färbung zufriedenstellend
- 10 min in Stoppbad

2.3.4 Native PAGE von Nukleinsäuren

Die native Elektrophorese von Nukleinsäuren unter 1000 bp verläuft in 4-10 %igen Polyacrylamidgelen vom Vernetzungsgrad 29:1 oder 43:1. Die verwendete Elektrophoreseapparatur ist identisch zu der unter 2.3.2 beschriebenen. Gel- und Laufpuffer ist hier ebenfalls 0.2 X Na-TAE. Die

Elektrophorese verläuft bei 4° C - 20° C und elektrischen Feldstärken von 20-30 V/cm.

Die Nukleinsäuren werden anschließend mittels AgNO₃-Färbung wie unter 2.3.3 beschrieben sichtbar gemacht.

2.3.5 Verzögerungsgele mit Proteinkinase PKR

Vor dem Auftrag auf das Polyacrylamidgel wurden die Nukleinsäuren mit den Proteinen in einem Volumen von 10 µl unter folgenden Bedingungen ca. 10 min bei Raumtemperatur und anschließend

10 min auf Eis inkubiert:

PKR-Inkubationspuffer
 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
 60 mM KCl
 5 mM MgCl₂
 1 mM DTT
 5 % Glycerin
 0.004 % Bromphenolblau

Die Proben wurden anschließend ohne weitere Zugabe eines (Auftrags-)Puffers auf ein 5 %iges Polyacrylamidgel vom Vernetzungsgrad 43:1 geladen. Zur Elektrophorese in der unter 2.3.2 beschriebenen Apparatur wurde ein diskontinuierliches Gelsystem von Doktycz (1993) in abgewandelter Form verwendet:

<u>Kathodenpuffer</u>	<u>Gelpuffer</u>	<u>Anodenpuffer</u>
50 mM Tricin	35 mM Format	100 mM Tris/HCl, pH 8.25
25 mM NaOH	40 mM Tris	1 mM MgSO ₄
1 mM MgSO ₄	1 mM MgSO ₄	
sollte pH 8.3 aufweisen	sollte pH 8.2 aufweisen	

Die Elektrophorese lief bei 17 V/cm und 8° oder 21° C für 60-75 min, der Bromphenolblaumarker hatte dann den unteren Rand des Gels erreicht. Die Färbung der Nukleinsäuren erfolgte mit Silbernitrat wie unter 2.3.3 beschrieben.

2.3.6 Verzögerungsgele mit Arabidopsis-Nukleolin

Vor dem Auftrag auf das Polyacrylamidgel wurden die Nukleinsäuren mit den Proteinen in einem Volumen von 5 µl unter folgenden Bedingungen ca. 30 min auf Eis inkubiert:

15 mM Tris/HCl, pH 7.5
 100 mM KCl
 1 mM MgCl₂
 3 % Glycerin
 0.008 % β-Mercaptoethanol
 0.004 % Bromphenolblau

Die Proben wurden anschließend ohne weitere Zugabe eines (Auftrags-)Puffers auf ein 5 %iges Polyacrylamidgel vom Vernetzungsgrad 43:1 geladen. Zur Elektrophorese in der unter 2.3.2 beschriebenen Apparatur wurde als Lauf- und Gelpuffer 0.2 X Na-TA (vgl. 2.3.2) ohne EDTA und mit 0.5 mM MgSO₄ verwendet. Die Elektrophorese lief bei 30 V/cm und 6° C für 60-70 min, der Bromphenolblaumarker hatte dann das Gel soeben verlassen. Der Pufferinhalt des Kathodenraums wurde nach ca. 30 min ausgetauscht, da sich die Pufferkapazität des 0.2 X Na-TA-Puffers dann

nahezu erschöpft hatte. Ein Austausch des Puffers im Anodendraum war nicht nötig, da dieser mit 4 l das etwa 8fache Volumen des Kathodenraums aufweist. Die Färbung der Nukleinsäuren erfolgte mit Silbernitrat wie unter 2.3.3 beschrieben.

2.3.7 Bidirektionelle PAGE zur Viroidaufreinigung

Das Verfahren der bidirektionellen Gelelektrophorese von Schumacher und Kollegen (1986) nutzt die Eigenschaft der Viroid-RNA aus, aufgrund ihrer zirkulären Geschlossenheit unter nativen Bedingungen relativ gut, unter denaturierenden Bedingungen dagegen außerordentlich verzögert in der PAGE zu wandern. Das Protokoll dieser Autoren wurde in der vorliegenden Arbeit dahingehend verbessert, daß durch eine veränderte Laufpuffer- und Gelzusammensetzung ein Austausch des Laufpuffers nach der zuerst durchgeführten, nativen Gelelektrophorese unnötig wird. Als Laufpuffer wird hier 0.4 X TBE verwendet, während das 5 %ige Polyacrylamidgel des Vernetzungsgrades 43:1 0.4 X TBE und außerdem 4 M Harnstoff enthält. Die Elektrophorese in der unter 2.3.2 beschriebenen Apparatur verläuft zunächst bei einer Temperatur von maximal 15 ° C für etwa 1 h bei 40 V/cm, der Xylencyanolmarker sollte etwa 1 cm vom unteren Rand des Gels entfernt sein. Sodann wird der Stromfluß unterbrochen und das anodische Pufferbad (gleichzeitig Temperierbad für das eingetauchte Gel) auf mindestens 37° C erhitzt. Anschließend wird die Elektrophorese mit umgekehrter Polarität für etwa 35 min bei 40 V/cm wieder aufgenommen. Der Xylencyanolmarker sollte das Gel dann bereits verlassen haben. Das Gel wird wie unter 2.3.2 beschrieben mit Ethidiumbromid gefärbt, die PSTVd-Bande befindet sich etwa in der Mitte des Gels. Es kann etwa 1 g-Blattäquivalent der unter 2.1.1.1 Schritt 10 präparierten Nukleinsäure pro cm Slot aufgetragen werden.

2.3.8 Elution von Nukleinsäuren aus verschiedenen Gelmatrices

Die Elution von DNA aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits der Firma Qiagen.

Zur Elution von Nukleinsäuren aus Polyacrylamidgelen wird die ausgeschnittene Bande mit einem Skalpell in etwa 1 mm³ große Stücke zerkleinert, in ein Eppendorfgefäß überführt und mit dem mehrfachen Volumen folgenden Elutionspuffers versetzt:

Elutionspuffer

20 mM Tris, pH 8.0
 200 mM NaCl
 1 mM EDTA
 0.1 % SDS

Die Ansätze werden daraufhin bei 4° C für etwa 3 h geschüttelt. Der Elutionspuffer wird dann mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Gefäß überführt, die Nukleinsäure anschließend durch Zugabe von 3 Volumen kalten Ethanol 15 min auf Eis gefällt. Nach Zentrifugation wird das Nukleinsäurepellet in 100 µl 5 mM Tris/HCl pH 8.0 gelöst und die Lösung einer Phenol-/Chloroform- und anschließender Chloroform-Extraktion unterzogen. Die wässrige Phase wird schließlich auf 20 % PEG₆₀₀₀ und 500 mM NaCl eingestellt und für 20 min bei Raumtemperatur und 20 min auf Eis inkubiert. Das nach Zentrifugation resultierende Nukleinsäurepellet wird zweimal mit 70 % EtOH gewaschen und nach Trocknung bei Raumtemperatur in einem geeigneten Volumen des gewünschten Puffers gelöst.

2.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden in der Regel bei der Firma MWG Biotech bestellt und mittels Massenspektrometrie auf ihre korrekte Länge hin überprüft.

<i>ado</i>	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CTC GAG CGG CCG CCC GGG CAG GT
<i>adu</i>	ACC TGC CC
<i>apl</i>	CCA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC
<i>AS1tr</i>	G GCC GAC AGG AGT AAT TCC C
<i>AS2</i>	GCT GGG CAC TCC CCA C
<i>fib</i>	GTG GAG TCG AT (A/G/C) CAG TTG GCC
<i>fif</i>	GGT GGT CAT ATG AGA CCC CCA GTT ACA GGA GG
<i>fir2</i>	GGT GGT TGC TCT TCC GCA TGA GGC TGG GGT CTT TTG TTT CTT C
<i>fivep</i>	GCT TCC TTC TTC GTT CTA GCT GC
<i>gsp1</i>	CAC ACT CCC AAA TGC TGC CTC CTT TAA CCC
<i>gsp2</i>	GAA GAC AAT ACA GGC AGC TAT CCC GC
<i>gspI</i>	GTT (A/G/T) GG (A/G/C/T) GT (A/G/T) GT (C/T) TC (A/G/T) AT (C/T) TT (C/T) TC
<i>gspII</i>	AC (A/T) AG (A/G) AC (A/G/C/T) AA (A/G) AA (A/G) GA (C/T) GC (A/C/T) GA (A/G)

gspA GAG TAT GC (T/A) CAG AAG ATG AAT TAT GC
hya TTA TGC GTG GCT TGC TTC TGT CTC C
hyb ATG ACC TCC ACT GAT GTT TCC TCT GG
nuIII AAG AAA GGC AAG A (A/G) GG (A/C) TGC TG (A/C)
nuf GGT GGT CAT ATG ACA AAG CCA CTC AAG AAA GGT A
nucl AAG CAA ACC CCT TGG AAG AAC CAG
nuclD AA (G/C) CAA ACC C (C/T) TTG GA (A/G) GA (A/C) CCA G
nur GGT GGT TGC TCT TCC GCA CTC TTC ATC ATT AAA GAC CGT CTT CG
polydT TTC TAG AAT TCA GCG GCC GCT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT
 TTT TT (G/A/C) (G/A/C/T)
QFV6 TCG CGC CCG CAG GAC CAC
RGV5 GGA AGG ACA CCC AAG AAA GGA AGG GTC AAA A
 wie oben liegt *RGV5* vor, ist jedoch fehlerhaft; er sollte folgendermaßen aussehen:
 GGA AGG ACA CCC GAA GAA AGG AAG GGT GAA AA
rr1f TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GGT GGG TGT TGA G
rr1r CTC AGC AAT TTT TGT CCG AGA ACT G
rr2f TAA TAC GAC TCA CTA TAG GCA ACC ATC TTT TGA TGG GAG TC
rr2r GTG AAT TAA CTG AGA AGG ATA GGT GGT
srp9 ACA GAT CAA GC (A/T) CAA GA (A/C) GCG AAG AAG
srp14 GAG AAG GG (A/T) TCT GT (G/C) TGG GTT AC
srp54 GGG TGA TTG GTC TGG GTT CAT GG

3. Ergebnisse

3.1 Aufreinigung von Nukleinsäuren mittels PEG₆₀₀₀

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde es notwendig, größere Mengen an PSTVd-RNA aus infiziertem Pflanzenmaterial aufzureinigen. In diesem Zusammenhang gelang eine deutliche Vereinfachung des bestehenden Aufreinigungsprotokolls, indem fraktionierte Fällungen mit PEG₆₀₀₀ aufwendigere, vormals durchgeführte Arbeitsschritte ersetzen. Im weiteren Verlauf wurde dann festgestellt, daß mit Fällungen dieser Art viele molekularbiologische Arbeitsabläufe vereinfacht und zum Teil auch verbessert durchgeführt werden können.

3.1.1 Anreicherung von Viroid-RNA

Zum Zwecke der Viroidaufreinigung wurde ein im Institut angewandtes Protokoll (Riesner *et al.* (1987)) zu Rate gezogen (s. Abbildung 3a)). Um Zeit zu sparen wurde versucht, dieses umständliche Protokoll stark zu verkürzen und sich auf die Abtrennung großer Nukleinsäuren mittels LiCl- und PEG-Fällung zu beschränken. Dabei fiel auf, das bei einer Fällung mit 10 % PEG₆₀₀₀ durchaus nicht alle PSTVd-RNA im Überstand verbleibt, sondern ein Teil ins Pellet und so verloren geht. Diese Beobachtung führte zur Ausarbeitung eines neuen, deutlich einfacheren und besseren Protokolls zur PSTVd-Anreicherung: wird nämlich nach der anfänglichen Phenol/Chloroform-Extraktion die wässrige Phase auf 6 % PEG₆₀₀₀ und 500 mM NaCl eingestellt, so kann in diesem ersten Schritt circa 70 % der gesamten Nukleinsäure abgetrennt werden, ohne nennenswerte Verluste an der gewünschten PSTVd-RNA zu erleiden, da diese bei der verringerten PEG-Konzentration tatsächlich vollständig im Überstand verbleibt. Durch Erhöhung der Konzentration an PEG im Überstand auf 15 % fallen alle restlichen Nukleinsäuren inklusive PSTVd aber exklusive der unerwünschten tRNA aus. Um verbliebene Reste an großen Nukleinsäuren zu entfernen, wird das resultierende pellet in einem kleinen Volumen gelöst und die 6 % PEG-Fällung wiederholt. Aus dem Überstand wird PSTVd schließlich durch Zugabe von 2.5 Volumen EtOH gefällt. Bei der zweiten 6 %-Fällung kommt es zu einem geringen Verlust an PSTVd-RNA von etwa 10 % der Gesamtmenge. Dafür besteht die resultierende Präparation zu wenigstens 20 % aus PSTVd-RNA gegenüber maximal 2 % nach dem alten Protokoll. Dieser Unterschied rührt daher, daß bei dem Vorgehen nach letzterem keine Abtrennung der tRNA erfolgt. Da PEG selektiv Nukleinsäuren fällt, ist nach dem neuen Protokoll eine vorherige Abtrennung sekundärer Pflanzenstoffe unnötig. DNA und strukturierte, große RNAs wiederum werden durch die 6 %-PEG-

a)

Altes Protokoll (Riesner *et al.* (1987))

- Blattmaterial in Waring-Blendor zerkleinern nach Zugabe von 1.5 Vol. Puffer
- Zentrifug., Überst. + 1 Vol. EtOH
- Zentrifug., pellet in 0.5 Vol. Puffer lösen
- Ph.- → Ph./Chl.- → Chl.-Extraktion
- Entfernung sekundärer Pfl.-stoffe durch Einstellen eines 2-Phasen-Gemischs mit PEG und $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$
- Nukl.-s. aus unterer Phase mittels CTAB fällen, pellet in 0.04 Vol. Puffer lösen
- Fällung großer, strukturierter RNAs mit 2 M LiCl
- Fällung der restl. Nukl.s. aus dem Überstand durch Zugabe von 3 Vol. EtOH
- Lösen des pellets, DNase-Verdau
- Ph./Chl.-Extraktion
- Fällung großer Nukl.-s. mit 10 % PEG
- Fällung kleiner Nukl.-s. enthaltend PSTVd aus dem Überstand

→ Finales pellet enthält max. 2 % PSTVdNeues Protokoll (diese Arbeit)

- Blattmaterial in flüssigem Stickstoff mörsern, Zugabe v. 2 Vol. Puffer
- Ph.- → Ph./Chl.- → Chl.-Extraktion
- Fällung großer Nukl.-s. durch Einstellen auf 6 % PEG, 500 mM NaCl
- Fällung von Nukl.-s. mittlerer Größe aus dem Überst. durch Erhöhung auf 15 % PEG
- Pellet in 0.0125 Vol. Puffer lösen, nochmalige Fällung mit 6 % PEG
- Fällung von PSTVd aus dem Überstand durch Zugabe von 2.5 Vol. EtOH

→ Finales pellet enthält mind. 20 % PSTVd

b)

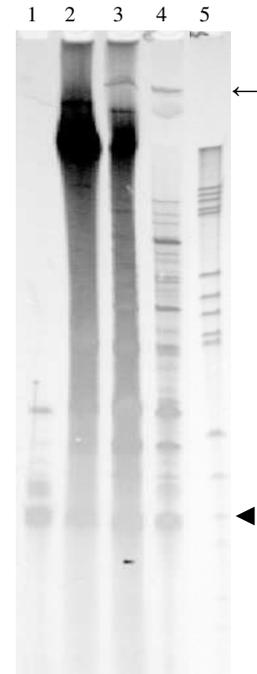


Abbildung 3: Neues Protokoll zur Anreicherung von PSTVd-RNA

a) Gegenüberstellung von altem und neuem Protokoll

b) Analyse der Nukleinsäurefraktionen nach dem neuen Protokoll

Denaturierende PAGE, 6 % (29:1), 0.5 X TBE, 8 M Harnstoff, 60° C, gefärbt mit AgNO_3

1: gefälltes Aliquot des Überstands der 15 % PEG-Fällung entsprechend 1 mg Blattäquivalent

2: Pellet der ersten 6 % PEG-Fällung entsprechend 40 mg Blattäquivalent

3: Pellet der zweiten 6 % PEG-Fällung entsprechend 400 mg Blattäquivalent

4: Finales pellet entsprechend 40 mg Blattäquivalent, der obere Pfeil bezeichnet die Bande der zirkulären PSTVd-RNA, welche unter denaturierenden Bedingungen extrem verzögert läuft. Das Pflanzenmaterial der dargestellten Präparation enthielt nur etwa 1/10 der „normalen“ PSTVd-Menge, weswegen in diesem Fall der Anteil der PSTVd-RNA im finalen pellet unter 20 % liegt

5: Plasmid pBR 322 verdaut mit *Hae*III, Fragmente der Länge 587, 540, 502, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184, 123/124, 104 und 89 (Pfeilspitze) Nukleotide

Fällungen fast vollständig entfernt. In der denaturierenden PAGE von Abbildung 3b) wurden gleiche Blattäquivalente des ersten 6 %-pellets (Spur 2) und der finalen Präparation (Spur 4) aufgetragen. Spur 3 zeigt dagegen die zehnfache Menge an Blattäquivalent, und zwar vom zweiten 6 %-pellet. Da die Bande der cPSTVd-RNA in Spur 3 und 4 etwa gleich stark sind, in Spur 3 jedoch 10fach mehr Blattäquivalent aufgetragen wurde, entspricht der Verlust an PSTVd bei dieser zweiten 6 %-Fällung wie oben erwähnt ungefähr 10 %. 1/40 der Blattäquivalente von Spur 2 und 4 wurde in Spur 1 aufgetragen, und zwar ein gefälltes Aliquot des Überstands der 15 %-PEG-Fällung. Nur Nukleinsäuren unter ca. 120 Nukleotiden Länge verbleiben in diesem Überstand, darunter der Großteil der unerwünschten tRNA.

Fraktionierte Fällungen mit PEG_{6000} wurden im weiteren Verlaufe der Arbeit auf viele Frage-

stellungen angewandt. Kurz gesprochen ist grundsätzlich die Tatsache von Vorteil, daß Nukleinsäuren unterhalb einer gewissen Größe - und somit auch Nukleotidtriphosphate und Primer - bei der PEG-Fällung im Überstand verbleiben. Da die meisten Proteine erst bei hohen PEG-Konzentrationen (15-30 %) präzipitieren und hohe Ionenstärke ihre Ausfällung zusätzlich erschwert, während Nukleinsäure mit PEG stets in Anwesenheit von 500 mM NaCl gefällt wird, ist eine Abtrennung von Proteinen durch Phenol/Chloroform-Extraktion i.d.R. überflüssig. Die hohe Reinheit auf diesem Wege präparierter Nukleinsäure wird durch ihre UV-Absorptionsspektren belegt sowie durch die Tatsache, daß diese Präparationen gut sequenzierbar sind. Im Folgenden sollen nur drei Anwendungsbereiche geschildert werden, bei denen die PEG-Fällung sehr gute Dienste leistet.

3.1.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die Bakterienkultur wird zunächst nach dem Protokoll der alkalischen Lyse (Sambrook *et. al.* (1989)) bearbeitet. Nach Denaturierung der Proteine durch Zugabe der Lösung enthaltend Kaliumacetat und Essigsäure und Abtrennung des Präzipitats mittels Zentrifugation wird der Überstand auf 7 % PEG₆₀₀₀ und 500 mM NaCl eingestellt. Nach 30minütiger Inkubation bei 20° C wird die Plasmid-DNA durch Zentrifugation gewonnen. Entscheidend ist hier nur die vollständige Entfernung des Überstands. Nach zweimaliger Waschung des Nukleinsäurepellets mit 70 % EtOH ist es von hervorragender Reinheit und für Sequenzierungen tauglich (s. Abbildung 4a)). Es ist darüber hinaus möglich, linearisierte von „supercoiled“-DNA zu trennen, da für Plamide unter 4000 bp erstere bereits bei 6 %, letztere dagegen erst bei 7 % PEG₆₀₀₀ ausfällt. Diese Trennung ist zwar nicht vollständig, kann aber zur schnellen Anreicherung der gewünschten Form dienen.

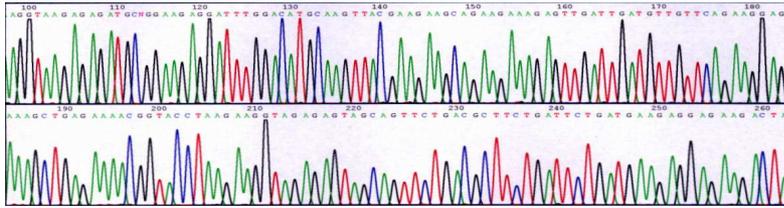
3.1.3 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Nukleinsäure wird direkt nach Beendigung der PCR durch Zugabe von PEG und NaCl-Lösungen ausgefällt. Um eine geringstmögliche Konzentration an PEG einzusetzen, ist zu bedenken, daß

- 900 bp DNA bei 8.5 % PEG₆₀₀₀, 500 mM NaCl,
- 359 bp DNA bei 13 % PEG₆₀₀₀, 500 mM NaCl präzipitiert, sofern die Fällung vorher

30 min bei 20° C inkubiert wurde. Das durch Zentrifugation gewonnene Pellet ist i.d.R. unsichtbar, wird mit 70 % EtOH gewaschen, in Puffer gelöst und spektralphotometrisch vermessen. Zur Sequenzierung wird ein Aliquot enthaltend die erforderliche Menge nochmals mit PEG₆₀₀₀ gefällt, das Pellet zweimalig mit 70 % EtOH gewaschen und in Wasser gelöst. Abbildung 4 b) zeigt einen Ausschnitt aus der Sequenzierung eines PCR-Produkts, welches auf diese Weise aufgereinigt wurde.

a)



b)

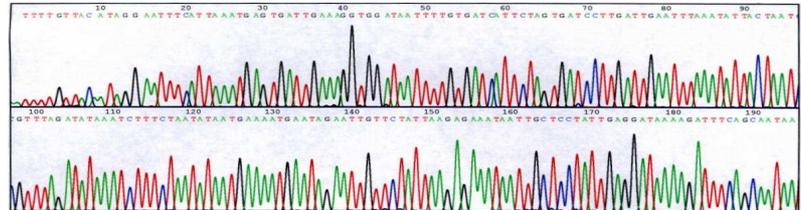


Abbildung 4: Sequenzierungen mittels PEG gefällter DNA

- a) Elektropherogramm der Sequenzierung von Plasmid-DNA (Arabid. Nukleolin-Sequenz im Vektor pGEM-T®)
 b) Elektropherogramm der Sequenzierung eines PCR-Produkts (Cytochrom C-Oxidase-Gen einer Biene)

3.1.4 Gewinnung von Transkripten nach *in vitro*-Transkription

Auch in diesem Fall ist eine der PEG-Fällung vorangestellte Phenol/Chloroform-Extraktion unnötig. Transkripte bis minimal 100 nt können durch eine Fällung mit 20 % PEG₆₀₀₀ gewonnen werden, längere Transkripte auch durch deutlich geringere Konzentrationen. Sofern das Template für die Transkriptionen aus linearisierter Plasmid-DNA bestand und die Transkripte unter 500 nt lang sind, hat die PEG-Fällung den zusätzlichen Vorteil, daß die Template-DNA zunächst durch Inkubation mit 6 % PEG₆₀₀₀ und 500 mM NaCl auf Eis selektiv gefällt und erneut für Transkriptionen zur Verfügung stehen kann. Durch Erhöhung der PEG-Konzentration des Überstands werden in einem zweiten Schritt die Transkripte gewonnen. Ein solches Experiment ist in Abbildung 5 gezeigt. Eine Auswertung ergab, daß nur 1 % der 368 nt langen Transkripte mit dem Plasmid bei 6 % PEG ausgefallen ist und das deutlich weniger als 10 % des Plasmids in der RNA-Präparation verbleiben.

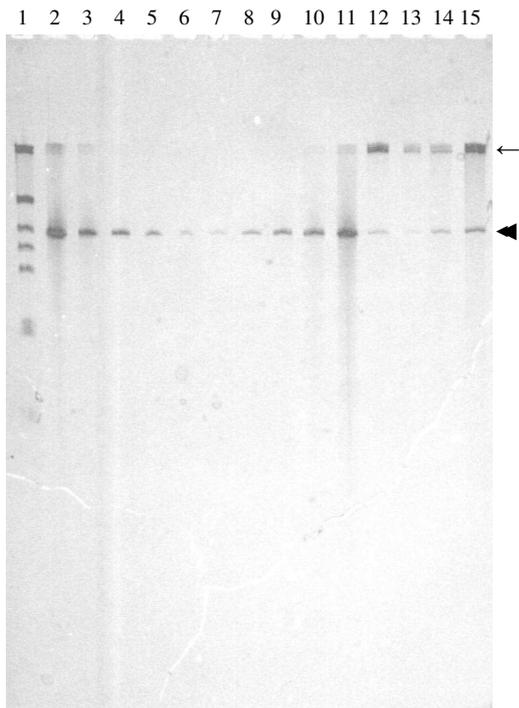


Abbildung 5: Fraktionierte Fällung nach *in vitro*-Transkription
Denaturierende PAGE, 5 % (29:1), 0.5 X TBE, 8 M Harnstoff, 60° C

1: Plasmid pBR322, verdaut mit *Hinf*I, Fragmente der Länge 1632, 517/504, 396, 344, 298 und 220/221 Nukleotiden

2-6: 15 % PEG-Pellet (pRH 713-Transkript, 368 nt), 1/500 bis 1/50 000 des Ansatzes, Faktor zwischen 2 Slots: $\sqrt{10}$

7-11: 15 % PEG-Pellet (pRH 714-Transkript, 368 nt), 1/50 000 bis 1/500 des Ansatzes, Faktor zwischen 2 Slots: $\sqrt{10}$

12-13: 6 % PEG-Pellet (pRH 713/*Eco*RI), 1/500 bzw. 1/(500 \cdot $\sqrt{10}$) des Ansatzes

14-15: 6 % PEG-Pellet (pRH 714/*Eco*RI), 1/(500 \cdot $\sqrt{10}$) bzw. 1/500 des Ansatzes

Die Position der linearisierten Plasmide ist mit einem Pfeil, jene der Transkripte mit einer Pfeilspitze markiert

3.2 RNase-Aktivität in pflanzlichen Proteinfractionen

Als Vorexperiment für die in Abschnitt 3.4 geschilderte Phosphorylierungsanalyse wurde überprüft, inwieweit extern zugegebene RNA in zwei verschiedenen Proteinfractionen stabil bleibt: die in dieser Arbeit untersuchte, pflanzliche Proteinkinase PKR (pPKR) liegt sowohl frei im Cytosol als auch ribosomenassoziiert vor (Langland *et al.* (1995), s. auch Abschn. 3.4). Beide Fraktionen lassen sich durch eine Ultrazentrifugation bei 10^5 g voneinander trennen. Unter diesen Bedingungen pelletieren die Ribosomen, sodaß der Überstand (S100) nurmehr freie, cytosolische Proteine enthält. Die mit den Ribosomen assoziierten Polypeptide lassen sich durch Inkubation der Ribosomen in Hochsalzpuffer von letzteren ablösen, die betreffende Präparation wird als Ribosomal Salt Wash (RSW) bezeichnet. Beide Präparationen wurden in dieser Arbeit anschließend mittels Dialyse auf gleiche Salzbedingungen eingestellt.

Hochreine dsRNA (s. Abschn. 3.5), 7S-RNA bzw. zirkuläre PSTVd-(+)-RNA wurde mit den Proteinfractionen für 15 min bei 26° C inkubiert, sodann wurde wie bei einem Phosphorylierungs-experiment eine ATP-haltige Lösung zugegeben und für weitere 15 min bei 26° C inkubiert. Nach anschließender Phenol/Chloroform-Extraktion wurde tRNA als Fällungshilfe zugegeben, die Nukleinsäure präzipitiert und anschließend mittels denaturierender PAGE aufgetrennt. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 6 dargestellt. Bei dem in Abbildung 6 a) gezeigten Experiment wurde PSTVd- und 7S-RNA getrennt in beide Proteinfractionen gegeben und außerdem überprüft, inwieweit der RNase-Inhibitor RNasin® (Promega) einen Einfluß auf die Stabilität der RNA ausübt.

7S-RNA wird in beiden Fraktionen in An- und Abwesenheit von RNasin® vollständig degradiert (vgl. Spur 1 mit 4-5 und 8-9). PSTVd dagegen wird nur im RSW abgebaut, was auch in diesem Fall nicht durch RNasin® inhibiert werden kann (vgl. Spur 2-3 mit 10-11). Im cytosolischen Überstand (S100) dagegen ist die zirkuläre Viroid-RNA auch in Abwesenheit von RNasin® stabil, wenn auch etwa 50 % der Moleküle einen Strangbruch erleiden und nach der Inkubation linear vorliegen (Spur 6-7). Bei dem in Abbildung 6 b) gezeigten Experiment wurde 7S-RNA und dsRNA vereinigt mit den beiden Proteinfractionen inkubiert. Hier wurde außerdem der gebräuchliche RNase-Inhibitor Ribosyl-/Vanadyl-Komplex in zwei unterschiedlichen Konzentrationen auf seine schützende Wirkung unter diesen Bedingungen untersucht. Auch wurde in zwei Fällen ein großer Überschuß tRNA zugegeben, um zu überprüfen, ob 7S- und dsRNA in ihrer Anwesenheit an Stabilität gewinnen. Wie in Abbildung 6 b) zu erkennen, vermag die tRNA keine schützende Wirkung auszuüben (Spur 16 und 20). Ribosyl-/Vanadyl-Komplex wiederum muß in einer Konzentration

von 20 mM vorliegen, um die RNase nennenswert zu inhibieren (vgl. Spur 17 mit 18 und Spur 21 mit 22). In diesem Fall übersteht die dsRNA unbeschadet die Inkubation im S100, während die 7S-RNA nurmehr in der Hälfte der eingesetzten Menge vorliegt (Spur 17). Im RSW bleibt auch in Anwesenheit von 20 mM Ribosyl-/Vanadyl-Komplex nur maximal ein Viertel der 7S-RNA übrig, während die dsRNA nur geringe Verluste erleidet (Spur 21). Ohne die Zugabe von Ribosyl-/Vanadyl-Komplex werden beide RNAs in beiden Proteinfractionen vollständig degradiert (Spur 19 und 23).

Diese Versuche waren folglich in zweierlei Hinsicht sehr aufschlußreich: zum einen durch das überraschende Ergebnis einer besonders potenten RNase-Aktivität im RSW, die in der

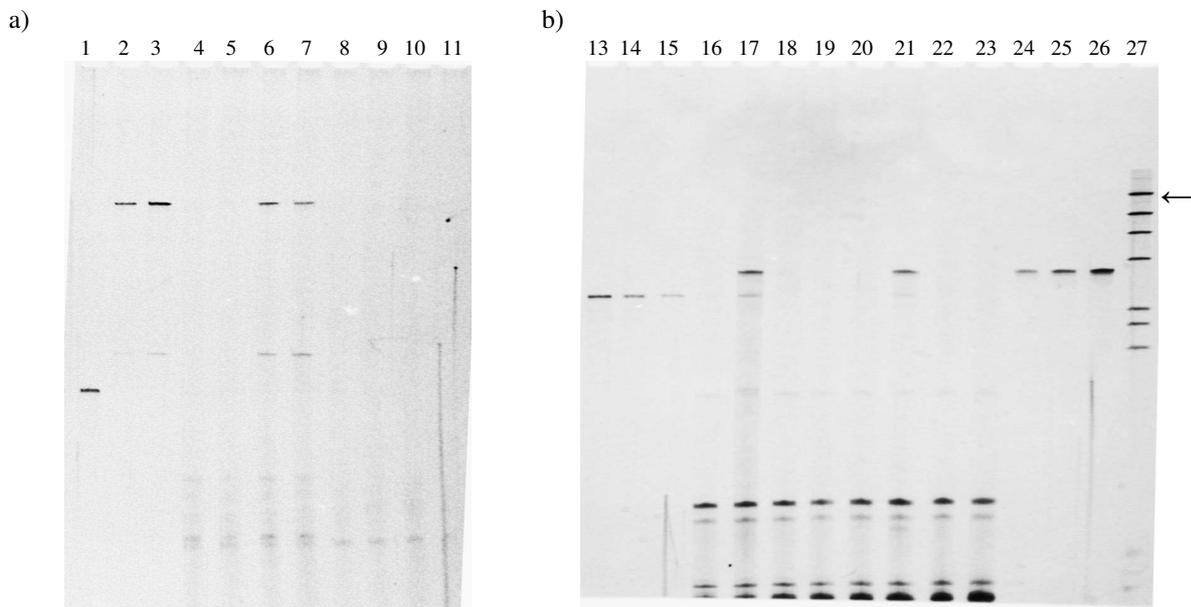


Abbildung 6: Stabilität verschiedener RNAs in Anwesenheit cytosolischer (S100) bzw. ribosomenassoziiierter (RSW) Proteine

Denaturierende PAGEs, 5 % (a) bzw. 6.3 % (b) (29:1), 0.5 X TBE, 8 M Harnstoff, 60° C, silbergefärbt

a) 7S-RNA und PSTVd-RNA

1: 2 ng 7S-RNA

2-3: 1 bzw. 2 ng PSTVd-RNA

4-5: 1.8 ng 7S-RNA, inkubiert in S100, 4: + RNAsin®,

6-7: 1.8 ng PSTVd-RNA, inkubiert in S100, 6: + RNAsin®

8-9: 1.8 ng 7S-RNA, inkubiert in RSW, 8: + RNAsin®

10-11: 1.8 ng PSTVd-RNA, inkubiert in RSW, 10: + RNAsin®

b) 7S-RNA und dsRNA

13-15: 2, 1 und 0.5 ng 7S-RNA

16-19: 1 ng 7-RNA und 2 ng dsRNA, inkubiert in S100

16: + 150 ng tRNA, 17: + 20 mM, 18: + 2 mM Ribosyl-/Vanadyl-Komplex

20-23: 1 ng 7-RNA und 2 ng dsRNA, inkubiert in RSW,

20: + 150 ng tRNA, 21: + 20 mM, 22: + 2 mM Ribosyl-/Vanadyl-Komplex

24-26: 1, 2 und 4 ng dsRNA,

27: Plasmid pBR322, verdaut mit AluI, Fragmente der Länge: 908 (Pfeil), 656/659, 521, 403, 281, 257, 226, 100 nt

cytosolischen Fraktion fehlt, und zum anderen durch den Beleg, daß die Stabilität der Viroid-RNA auch die vollständig basengepaarter RNA noch übertrifft. Eine hohe RNase-Toleranz der Viroid-RNA ist bereits bekannt. Sie wird auf zwei Faktoren zurückgeführt, und zwar ihre zirkuläre Geschlossenheit einerseits und die unverzweigte Struktur mit einem hohen Anteil intramolekularer Basenpaare andererseits (Diener (1987)). Letzteres Argument scheint nach den oben dargestellten Ergebnissen nicht entscheidend zu sein, da die vollständig basengepaarte dsRNA nur in Anwesenheit von Ribosyl-/Vanadyl-Komplex etwas stabiler ist als die strukturierte 7S-RNA, jedoch im Gegensatz zur Viroid-RNA in Abwesenheit von Inhibitor auch in der cytosolischen Fraktion vollständig degradiert wird. Folglich ist es offenbar das Fehlen freier Enden, welches der Viroid-RNA ihre hohe Stabilität verleiht.

3.3 Modifikation der Rubisco in Proteinextrakten aus Viroid-infizierten Pflanzen

Für den in Abschnitt 3.4 beschriebenen Vergleich der Phosphorylierungsintensität der putativen pPKR in Extrakten aus gesunden versus verschiedenen infizierten Tomatenpflanzen war es entscheidend, möglichst gleiche Proteinmengen der verschiedenen Präparationen einzusetzen. Zur vergleichenden Quantifizierung wäre eine summarische Bestimmung der Proteinkonzentration - z.B. mit dem sogenannten Bradford-Assay - ungeeignet gewesen, da 30-50 % des löslichen Proteins höherer Pflanzen durch das eine Enzym Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) gestellt werden. Dagegen können in der denaturierenden PAGE viele verschiedene Polypeptide hinsichtlich ihrer Menge in den verschiedenen Extrakten verglichen werden, sodaß Verdünnungsreihen der letzteren in der SDS-PAGE einen besseren Aufschluß über die Konzentrationen verschiedener Proteine geben. Sofern sehr wenig Proteinextrakt aufgetragen wird, ist nur die abundante, große Untereinheit der Rubisco zu erkennen. Unter diesen Bedingungen fiel auf, daß diese große Untereinheit (55 kDa) als Doppelbande erscheint, und daß der relative Anteil der schneller laufenden Form ein sensitives Maß für die Pathogenität des PSTVd-Stammes ist, mit dem die Pflanze infiziert war (Abbildung 7). Der Effekt war in verschiedenen, unabhängigen Aufschlüssen reproduzierbar und auch bereits deutlich zu sehen, wenn die Symptome der infizierten Pflanzen erst ganz wenig voneinander differierten. Für die 14 kDa schwere, kleine Untereinheit des Enzyms konnte kein vergleichbarer Effekt detektiert werden. Es wurde in der Folge untersucht, ob der Unterschied zwischen beiden Formen auch bereits in der Pflanze vorliegt. Dazu wurden einerseits frische Blätter in flüssigem Stickstoff mit einem Spatel zerstoßen, anschließend aufgetaut und

sofort mit denaturierendem Auftragspuffer erhitzt. Zum anderen wurden intakte Chloroplasten präpariert und die Proteine in der SDS-PAGE aufgetrennt. In keinem der beiden Fälle war der oben beschriebene Effekt festzustellen (Daten nicht gezeigt). Daraus wird geschlossen, daß die Rubisco *in vivo* unverändert vorliegt und erst im Verlaufe der Extraktpräparation eine Modifikation erfährt. Unter Umständen ist der Effekt nicht Rubisco-spezifisch, sondern an diesem abundanten Enzym nur besonders gut zu erkennen. Es konnte nicht geklärt werden, ob der Laufunterschied der beiden Formen in der SDS-PAGE auf einer tatsächlichen Längendifferenz der betreffenden Polypeptide beruht, was auf eine Proteaseaktivität hinweisen würde, oder auf einer anderen Modifizierung wie z.B. Phosphorylierung beruht. Auf jeden Fall bleibt festzustellen, daß es eine biochemische Aktivität gibt, die umso mehr zunimmt, als die Pflanze durch die Viroid-RNA geschädigt wird, und die in der Lage ist, die große Untereinheit der Rubisco in eine Form mit höherer elektrophoretischer Mobilität zu verwandeln.

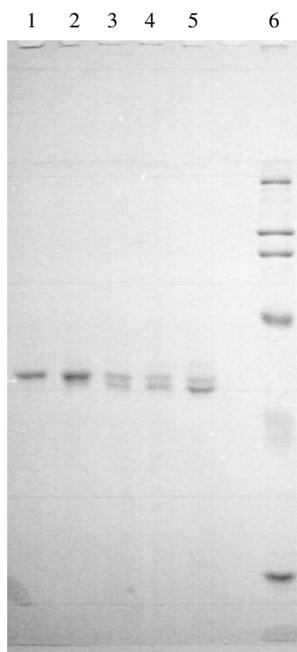


Abbildung 7: Zwei Formen der großen Untereinheit der Rubisco

Protein-SDS-PAGE, Trenngel 10 % (29:1), gefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blue

- 1: RSW- Proteinextrakt aus nicht infizierter Pflanze
- 2: aus mit Isolat 23 („Mild“) infizierter Pflanze
- 3: aus mit Isolat 26 („Intermediate“) infizierter Pflanze
- 4: aus mit Sequenzvariante M1 („Intermediate“) infizierter Pflanze
- 5: aus mit Isolat 48 („Lethal“) infizierter Pflanze
- 6: Molekulargewichtsstandard mit Proteinen der Größe 116, 97, 90, 66, 45 und 26 (Pfeil) kDa

3.4 Phosphorylierungsmuster von Proteinextrakten aus gesunden und viroidinfizierten Tomatenpflanzen

Die Funktion vieler Proteine wird durch Phosphorylierung von Serin-, Threonin- oder Tyrosinseitenketten reguliert. Dabei wird die endständige γ -Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat durch Kinasen genannte Enzyme auf diese Seitenketten übertragen. Durch Inkubation von Proteinextrakten mit radioaktiv markiertem γ - ^{32}P -ATP, gefolgt von elektrophoretischer Auftrennung der Proteine und Autoradiographie, kann man die Molekulargewichte von Kinase-Substraten im untersuchten Extrakt feststellen. Auf diesem Wege machte die Arbeitsgruppe von Don Roth die Beobachtung, daß die Intensität der am stärksten markierten Proteinbande in Extrakten aus Tomatenblättern bei PSTVd-Infektion nochmals um den Faktor 3 zunimmt (Hiddinga *et al.* (1988)). Auch die Zugabe von doppelsträngiger RNA (in einer Konzentration von 10-50 ng/ μl) zu Extrakten aus gesunden Pflanzen intensiviert die Markierung dieser Doppelbande bei 68 kDa. Säugtiere besitzen ein PKR (Proteinkinase RNA-activated) genanntes Enzym desselben Molekulargewichts, das sich nach Kontakt mit dsRNA selbst *in trans* phosphoryliert. Es wird dadurch aktiviert und kann in der Folge sein Substrat - den eukaryontischen Translations-Initiationsfaktor 2 α (eIF2 α) - phosphorylieren. Diese Modifikation inaktiviert eIF2 α und führt schnell zum Erliegen der Translation. Hiddinga und Kollegen konnten das markierte Protein mittels Antikörpern gegen die Säuger-PKR präzipitieren und auch zeigen, daß dieses Protein selbst eine Kinase ist. Sie zogen daraus den Schluß, daß es sich um das pflanzliche Homolog zur Säuger-PKR handelt. Aufgrund der bei Säugern gezeigten Inhibition der Translation nach PKR-Aktivierung wäre vorstellbar, daß auch die verstärkte Phosphorylierung des pflanzlichen Homologs bei Viroidinfektion einen negativen Einfluß auf den zellulären Metabolismus ausübt. Sofern diesem Effekt eine Schlüsselrolle im Pathogenitätsmechanismus zukommt, sollte das Ausmaß der Krankheitssymptome mit dem Phosphorylierungszustand der pflanzlichen PKR korrelieren. Wie bereits mehrfach erwähnt, sind von PSTVd verschiedene Sequenzvarianten bekannt, die zu gleichem Titer in der Pflanze repliziert werden, jedoch unterschiedlich starke Symptome im Wirt hervorrufen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es zunächst, das Phosphorylierungsexperiment von Hiddinga *et al.* mit Proteinextrakten aus Tomatenpflanzen durchzuführen, die mit unterschiedlich pathogenen Varianten von PSTVd infiziert waren.

Die Herstellung der Proteinextrakte orientierte sich an einem Protokoll derselben Arbeitsgruppe (Langland *et al.* (1995)) mit folgenden Modifizierungen: um den *in vivo*-Zustand der Kinase bis zur Durchführung des Phosphorylierungsexperimentes zu konservieren, wurde dem Aufschlußpuffer 10 mM Aminopurin, dem Aufschluß- und Dialysepuffer 10 mM NaF zugefügt.

Aminopurin sollte weitergehende Phosphorylierung der PKR im Verlaufe des Aufschlusses inhibieren, der Phosphataseinhibitor NaF ihre Dephosphorylierung. Da dem Dialysepuffer kein Aminopurin zugesetzt wurde, sollten die Proteinpräparationen nach erfolgter Dialyse wieder phosphorylierungskompetent sein.

Die PKR liegt sowohl frei im Cytosol als auch ribosomenassoziiert vor (Langland *et al.* (1995)). Der Überstand einer Zentrifugation bei 10^4 g (S10) enthält beide Fraktionen; durch eine Zentrifugation bei 10^5 g werden die Ribosomen pelletiert, sodaß der Überstand (S100) nurmehr die cytosolische PKR enthält, während man durch Inkubation des Pellets in Hochsalzpuffer die mit den Ribosomen assoziierte PKR von diesen ablösen kann (Ribosomal salt wash (RSW)). Das Phosphorylierungsexperiment von Hiddinga und Kollegen wurde mit einer S90-Präparation, jene der vorliegenden Arbeit entweder mit S10-, S100- und RSW-Präparationen oder nur mit den beiden letzteren durchgeführt. Abbildung 14 zeigt ein exemplarisches Ergebnis. Das stärkste Signal ist in

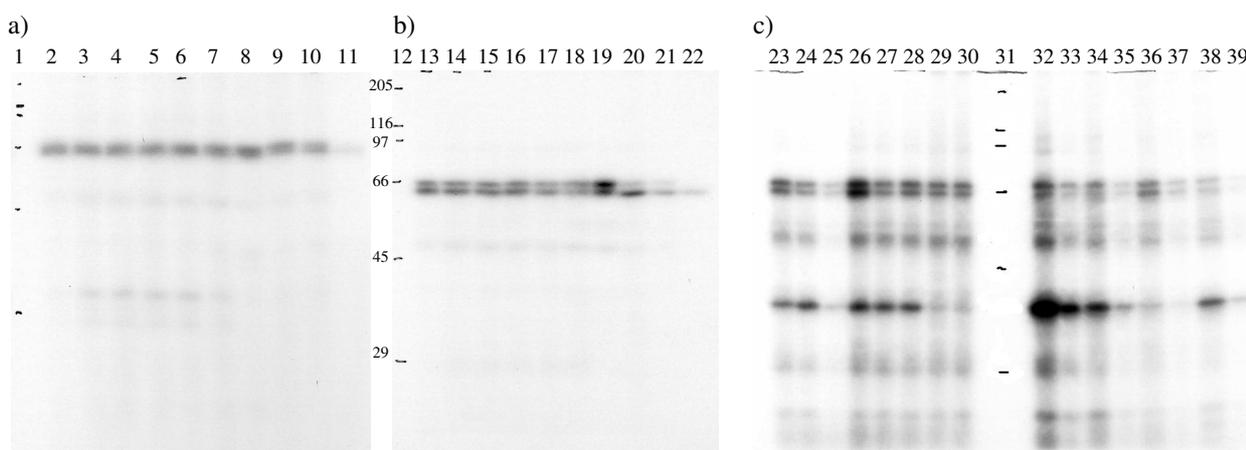


Abbildung 14: *in vitro*-Phosphorylierungsmuster von Proteinen aus der Tomate (*Lycopersicon esc. var. Rutgers*)

Nach 15minütiger Inkubation mit γ - 32 P-ATP wurden die Proteine in SDS-haltigem Puffer denaturiert und mittels denaturierender SDS-PAGE (10 %iges Trenngel) aufgetrennt. Nach Färbung der Gele mit Coomassie-Brilliant-Blue wurden die radioaktiv markierten Proteinbanden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

a) S10 Proteinextrakte (s.Text)

1, 12 und 31: Molekulargewichtsstandard mit Proteinen der Größe 29, 45, 66, 97, 116 und 205 kDa

2-6: nicht infiziert, **2:** + 25 mM Aminopurin, **4-6:** + 2, 70 bzw. 200 ng/ μ l poly (IC) (dsRNA), **7-11:** PSTVd-infiziert, **7-7-8:** infiziert mit Isolat 23 („Mild“), **8:** + 25 mM Aminopurin, **9:** inf. m. Isolat 26 („Intermediate“), **10:** inf. m. M1 („Intermediate“), **11:** inf. m. Isolat 48 („Lethal“)

b) S100-Proteinextrakte

13-22: wie **2-11**, **13-17:** nicht infiziert, **13:** + 25 mM Aminopurin, **15-17:** + 2, 70 bzw. 200 ng/ μ l poly (IC), **18-19:** infiziert m. Isolat 23 („Mild“), **19:** + 25 mM Aminopurin, **20:** inf. m. Isol. 26, **21:** inf. m. M1 (beide „Intermediate“), **22:** inf. m. Isol. 48 („Lethal“)

c) RSW-Proteinextrakte

23-30: nicht infiziert, **23-24:** + 1 mM bzw. + 10 mM Aminop., **25:** + „kaltes“ ATP, **26:** nach Einfrieren bei -180° C, **28-30:** + 2, 70 bzw. 200 ng/ μ l poly (IC), **32-33:** infiziert mit Isolat 23, **34-35:** infiziert mit Isolat 26, **36-37:** infiziert mit M1, **38-39:** infiziert mit Isolat 48; in **32-39** wurden je 16 μ l (1.Spur) bzw. 8 μ l Ansatz aufgetragen

der S10- und der S100-Präparation in Übereinstimmung mit der Beobachtung von Hiddinga und

Kollegen eine (Doppel-)Bande bei 66-68 kDa (Abb. 14 a) + b)). Dagegen wird in der RSW-Fraktion auch ein Polypeptid von circa 38 kDa stark phosphoryliert (Abb. 14 c)). Die Phosphorylierung der 66-68 kDa-Doppelbande wird allerdings in keinem Fall durch die Zugabe von dsRNA verstärkt (vgl. Spur 3 mit 4-6, Spur 14 mit 15-17 und Spur 27 mit 28-30) und auch nicht durch Zugabe von Aminopurin zum Phosphorylierungsansatz inhibiert (vgl. z.B. Spur 13 mit 14). Außerdem ist keine Intensivierung des Signals in Extrakten aus viroidinfizierten Pflanzen feststellbar. Ganz im Gegenteil ist die Phosphorylierung in diesen Extrakten eher schwächer als in jenem aus einer gesunden Pflanze. Es wurden insgesamt fünf unabhängige Proteinpräparationen und nachfolgende Phosphorylierungsexperimente durchgeführt. In keinem Fall korrelierte die Phosphorylierung der 68 kDa-Doppelbande schlüssig mit dem Krankheitszustand der Tomatenpflanzen. In einem Fall variierten zwei parallel präparierte, gesunde Pflanzen diesbezüglich ebenso stark untereinander wie gegenüber den viroidinfizierten. Einzig konstant blieb die relativ schwache Markierung in Extrakten aus besonders kranken Pflanzen, welche mit dem Isolat 48 („Lethal“) infiziert waren (Spur 11, 22, 38 + 39).

Um bestmögliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die Pflanzenspitzen (das oberste sich entfaltende Blättchen), das erste und das zweite Blatt darunter in einem abschließenden Experiment getrennt präpariert. Bei diesen Aufschlüssen wurde auf den Einsatz von Aminopurin verzichtet, da dieses Reagenz in keinem Phosphorylierungsexperiment inhibierend gewirkt hatte. Auch wurden bei diesem Experiment keine S10- Präparationen untersucht, sondern nur die cytosolische (S100) und ribosomenassoziierte (RSW) Fraktion analysiert. Das Ergebnis des Phosphorylierungsexperiments der S100-Präparationen ist in Abbildung 15 a), jenes der RSW-Präparationen in Abbildung 15 b) gezeigt. In den 6 rechten Spuren wurden die phosphorylierten Proteine der Pflanzenspitze, in den 6 mittleren Spuren jene des ersten Blattes und links die des zweiten Blattes aufgetrennt. In beiden Fraktionen ist für die Markierung der 66-68 kDa-Doppelbande weder in der Pflanzenspitze noch im ersten Blatt darunter eine Korrelation mit dem Gesundheitszustand der Pflanzen zu erkennen. Lediglich im zweiten Blatt unterhalb der Spitze wird diese Doppelbande in den viroidinfizierten Pflanzen stärker phosphoryliert. Dieser Unterschied ist bei der cytosolischen S100-Fraktion noch deutlicher zu sehen. Eine Korrelation dieser Verstärkung mit dem Pathogenitätsgrad der Viroid-RNA ist jedoch wenn überhaupt nur schwach ausgeprägt: in der RSW-Fraktion ist die radioaktive Markierung der Doppelbande in Pflanzen mit milden Symptomen (inf. m. Isolat 23, Abb. 15 b), Spur 23) ebenso stark wie in jenen, die mit zwei unterschiedlichen, intermediäre Symptome induzierenden Stämmen infiziert waren (Isolat 26 und M1, Spuren 24 und 25), In der S100 Fraktion besteht zwischen diesen Mild- (Spur 3) und Intermediate-Pflanzen (Spur 4 und 5)

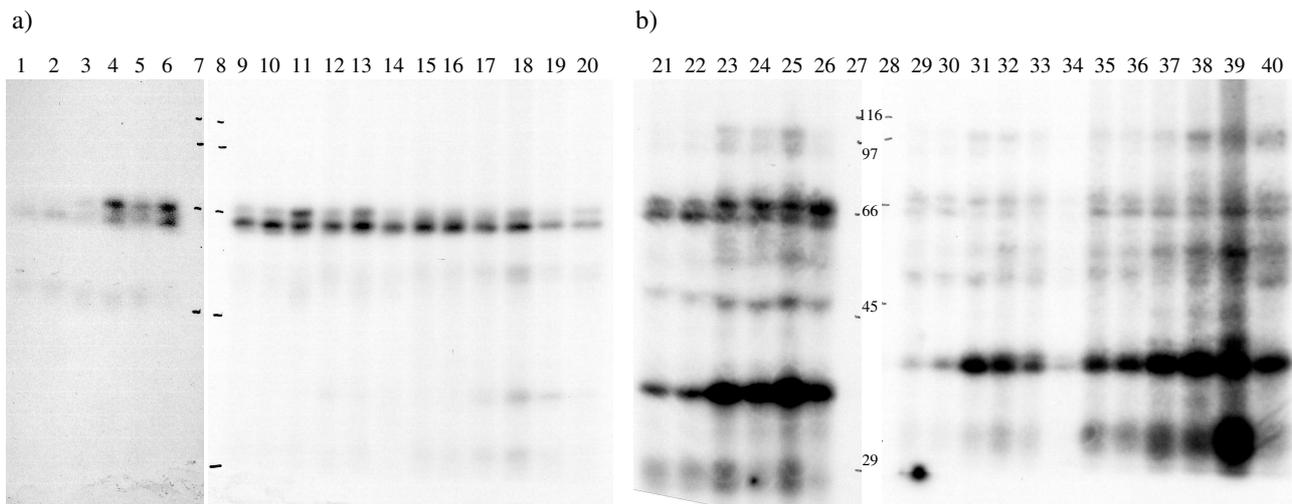


Abbildung 15: *in vitro*-Phosphorylierungsmuster in Proteinpräparationen aus Pflanzenspitze, 1. und 2. Blatt

Behandlung der Proben und Art des Nachweises: siehe Abb. 14

1-6 und 21-26: Extrakte aus dem zweiten Blatt, **9-14 und 29-34:** Extrakte aus dem ersten Blatt, **15-20 und 35-40:** Extrakte aus der Pflanzenspitze, **7-8, 27-28:** Molekulargewichtsstandard mit Proteinen der Größe 29, 45, 66, 97 u. 116 kDa

a) S100-Proteinextrakte

1+2, 9+10, 15+16: nicht infiziert, **1, 9 und 15:** + 100 ng/μl poly (IC), **3, 11, 17:** infiziert mit Isolat 23 („Mild“), **4, 12, 18:** inf. m. Isolat 26 („Intermediate“), **5, 13, 19:** inf. m. M1 („Intermediate“), **6, 14, 20:** inf. m. Isolat 48 („Lethal“)

b) RSW-Proteinextrakte

21+22, 29+30, 35+36: nicht infiziert, **21, 29 und 35:** + 100 ng/μl poly (IC),

23, 31, 37: infiziert mit Isolat 23 („Mild“), **24, 32, 38:** inf. m. Isolat 26 („Intermediate“), **25, 33, 39:** inf. m. M1 („Intermediate“), **26, 34, 40:** inf. m. Isolat 48 („Lethal“)

zwar ein deutlicher, zwischen letzteren und der besonders kranken Isolat 48-Pflanze (Spur 6) jedoch nur ein marginaler Unterschied. Immerhin ist das Phosphorylierungssignal der Doppelbande in diesem zweiten Blatt in beiden Fraktionen erstmals mehr oder weniger am stärksten in jenen Pflanzen, die mit dieser besonders pathogenen Variante von PSTVd infiziert waren. Wie bei allen vorher präparierten Extrakten war es auch für die hier gezeigten in keinem Falle möglich, die Phosphorylierung durch Zugabe von dsRNA zu steigern (vgl. Spur 1 mit 2, 9 mit 10, 15 mit 16, 21 mit 22, 29 mit 30 und 35 mit 36).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß nur in einem von 8 Experimenten eine deutliche Steigerung der Phosphorylierung der 66-68 kDa-Doppelbande in viroidinfizierten versus gesunden Pflanzen feststellbar war. Eine signifikante Korrelation dieser Steigerung mit dem Pathogenitätsgrad des Viroids blieb jedoch auch in diesem Falle aus.

Sofern die verstärkte Phosphorylierung auf die Anwesenheit der Viroid-RNA in den Proteinextrakten zurückzuführen wäre, sollte sie auch durch externe Zugabe von PSTVd zu einem gesunden Extrakt induzierbar sein. Zur Vorbereitung auf ein entsprechendes Experiment wurde zunächst die Kinetik der Phosphorylierung in der S100-Fraktion mit jener in der RSW-Fraktion verglichen (Abbildung 16 a)). Überraschenderweise verhalten sich beide Präparationen

diesbezüglich sehr unterschiedlich: während die Doppelbande im S100-Extrakt bereits eine Minute nach Zugabe des γ - 32 P-ATP stark markiert ist und diese Markierung durch Verlängerung der Inkubation kaum zunimmt, verläuft die Phosphorylierung des Proteins im RSW viel langsamer. Es ist denkbar, daß eine Intensivierung der Phosphorylierung durch Zugabe von RNA sich nicht auf das Plateau-Niveau dieser Modifikation auswirkt, sondern nur durch ein schnelleres Einsetzen der Reaktion bemerkbar ist. Aus diesem Grund wurde die diesbezüglich „trägerere“ RSW-Fraktion für das nachfolgende Experiment ausgewählt. Diese Präparation hat den Nachteil einer hohen RNase-

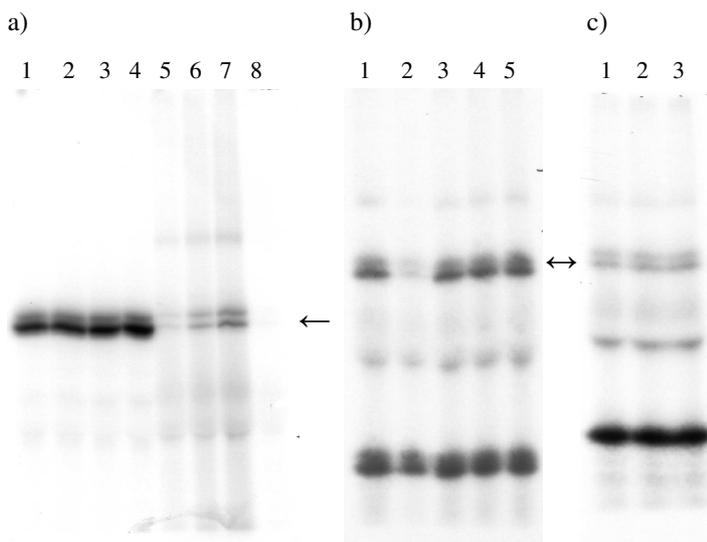


Abbildung 16: Phosphorylierung nach Zugabe von PSTVd-RNA zu einem Extrakt aus nicht infizierter Pflanze

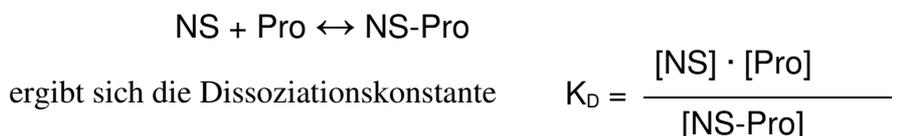
- a) Kinetik der Phosphorylierung ohne Zugabe von RNA
1-4: S100 Proteinextrakt, Inkubation mit γ - 32 P-ATP für 1, 5, 10 bzw. 15 min,
5-8: RSW-Proteinextrakt
5-7: Inkubation mit γ - 32 P-ATP für 1, 5 bzw. 10 min
8: Inkubation mit γ - 32 P-ATP für 10 min, außerdem Zugabe von 20 mM Ribosyl-Vanadyl-Komplex
- b) RSW-Extrakt mit Zugabe von RNA
 Inkubation 10 min auf Eis, nach Zugabe von γ - 32 P-ATP 7 min bei 26° C
1-3: ohne Zugabe von RNA, **2:** + 2 μ l RNAsin®
4: Zugabe von 7S-RNA zu 200 nM
5: Zugabe von „Lethal“-PSTVd-RNA zu 200 nM
- c) RSW-Extrakt mit Zugabe von RNA
 Inkubation 12 min auf Eis, nach Zugabe von γ - 32 P-ATP 7 min bei 26° C
1: ohne Zugabe von RNA
2: Zugabe von „Intermediate“-PSTVd-RNA zu 900 nM
3: Zugabe von „Lethal“-PSTVd-RNA zu 900 nM
- Pfeile markieren die Position der putativen pPKR (66-68 kDa)

Aktivität (vgl. Abschnitt 3.2), die jedoch durch Ribosyl-Vanadyl-Komplex unterdrückt werden kann. Allerdings zeigten Vorexperimente, daß sowohl dieser RNase-Inhibitor (Abb. 16 a), Spur 8) als auch das Peptid RNasin® (Promega) (Abb. 16 b), Spur 2) die Phosphorylierung der 66-68 kDa-Doppelbande inhibiert, sodaß auf ihren Einsatz verzichtet werden mußte. Daher wurde sichergestellt, daß die Viroid-RNA eine Inkubation mit dem RSW-Proteinextrakt übersteht, sofern diese bei 0° C durchgeführt wird (Daten nicht gezeigt). Darauf folgte die Zugabe von radioaktivem ATP und eine 7minütige Inkubation bei 26° C. Weder eine Viroidkonzentration von 200 nM (Abb. 16 b), Spur 5) noch eine Erhöhung dieser Konzentration auf 900 nM (Abb. 16 c), Spur 2 und 3) beförderte die Phosphorylierung der 66-68 kDa-Doppelbande. Die eingesetzte Menge des Proteinextrakts zeigte in der Coomassie-Färbung nie eine nennenswerte Bande bei diesem

Molekulargewicht, woraus abgeschätzt werden kann, daß die Konzentration der putativen pPKR im Phosphorylierungsansatz unter 100 nM gelegen haben muß. Selbst bei einer relativ schwachen Affinität der PKR zur Viroid-RNA mit einer angenommenen Dissoziationskonstanten von 10^{-6} M sollten bei 900 nM PSTVd wenigstens 40 % des Proteins im Komplex mit dem Viroid vorliegen, sodaß eine Verstärkung des Phosphorylierungssignals auftreten müßte, wenn die Komplexbildung das Enzym zu verstärkter Phosphorylierung anregen würde. Ein solcher Effekt konnte jedoch auch bei einer Wiederholung des in Abb. 16 gezeigten Experiments nicht nachgewiesen werden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß die pPKR in den Proteinextrakten u.U. nicht bindungskompetent ist. Sofern sie z.B. im Komplex mit einer endogenen Nukleinsäure vorliegt, wäre sie aus diesem Grunde ggf. nicht zur Bindung an die extern zugegebene Viroid-RNA befähigt.

3.5 Verzögerungsgelelektrophorese mit dsRNA-abhängiger Proteinkinase (PKR)

Die im vorangehenden Kapitel geschilderten Untersuchungen zum Einfluß verschiedener RNAs auf den Phosphorylierungszustand der pflanzlichen PKR sollten durch die direkte Bestimmung der Affinität dieses Enzyms zu den untersuchten RNAs ergänzt werden. Diese Bestimmung erfolgte mit der Methode der Gelverzögerung. Grundlage dieses Verfahrens ist die Tatsache, daß ein Komplex (NS-Pro) aus Protein (Pro) und Nukleinsäure (NS) in der nativen Gelelektrophorese deutlich langsamer läuft als die freie Nukleinsäure. Sofern der Komplex über die gesamte Dauer der Elektrophorese stabil ist, zeichnen sich die Komplexe als diskrete Banden ab. Zerfällt er dagegen während dieser Zeit, so ist eine Bindung nur daran zu erkennen, daß die Intensität der freien Nukleinsäurebande in Anwesenheit des Proteins abnimmt. Für die Gleichgewichtsreaktion



wobei [X] eine Konzentration im Gleichgewicht bedeutet.

Im Gelverzögerungsexperiment wird durch Inkubation der Nukleinsäure mit steigenden Mengen an Protein nach dem Konzentrationsverhältnis gesucht, bei dem nurmehr die Hälfte der eingesetzten Nukleinsäure ([NS]₀) frei vorliegt. Dann gilt also $[\text{NS}] = 1/2 \cdot [\text{NS}]_0$

$$\text{und außerdem } [\text{NS}] = [\text{NS-Pro}]$$

$$\text{weil } [\text{NS}] + [\text{NS-Pro}] = [\text{NS}]_0$$

Bei der Bedingung $[\text{NS}] = [\text{NS-Pro}]$

ist die Dissoziationskonstante (s.o.) folglich gegeben durch $K_D = [\text{Pro}]$

Im Experiment wird außerdem gewährleistet, daß die eingesetzte Menge an Nukleinsäure deutlich unter der an Protein liegt, da die Gleichgewichtskonzentration des freien Proteins dann nahezu seiner Ausgangskonzentration entspricht und sich die Bestimmung der Dissoziationskonstanten weiter vereinfacht zu $K_D = [\text{Pro}] \approx [\text{Pro}]_0$

3.5.1 Reinheit der verwendeten Proteine

Als Ausgangsmaterial wurden zwei verschiedene Proteinpräparationen von Don Roth zur Verfügung gestellt: zum einen ein rekombinant hergestelltes, hochreines Polypeptid von etwa 20 kDa, welches das N-terminale Drittel der humanen PKR umfasst und im folgenden als p20 bezeichnet wird; zum anderen ein aus Rutgers-Tomaten angereichertes Protein von 68 kDa, welches

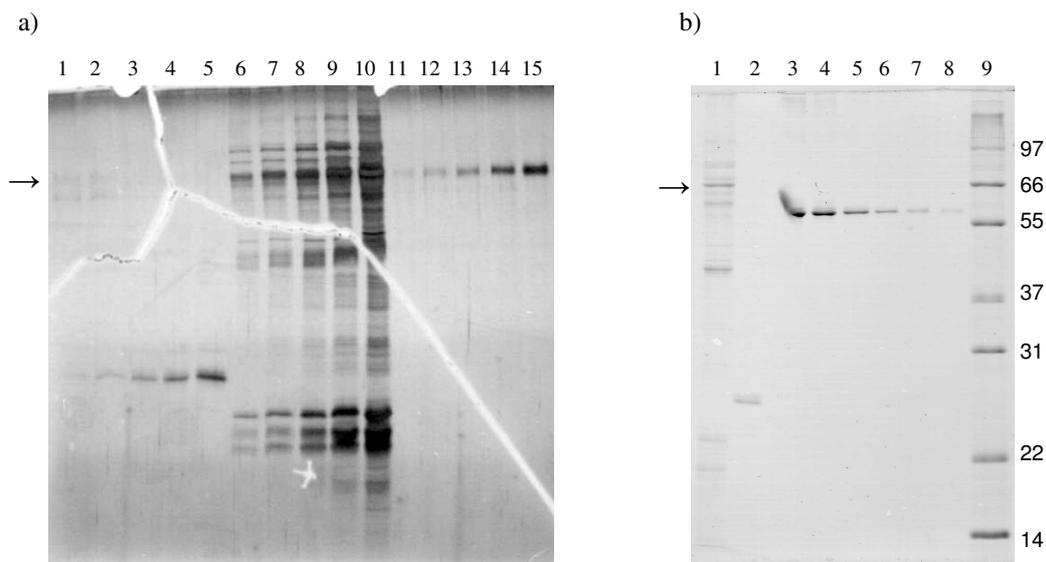


Abbildung 17: Analyse der von Don Roth erhaltenen Proteinpräparationen

Protein-SDS-PAGEs, Trenngele 12 % (29:1)

a) gefärbt mit AgNO_3

1-5: 0.063, 0.125, 0.25, 0.5 und 1 μl der 1:100 verdünnten p20-Präparation

6-10: 0.094, 0.188, 0.375, 0.75 und 1.5 μl der pPKR-Präparation

11-15: 2, 4, 8, 16 und 32 ng BSA (reduziert mittels β -Mercaptoethanol)

b) gefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blue

1: 2.5 μl der pPKR-Präparation

2: 4 μl der 1:100 verdünnten p20-Präparation

3-8: 1000, 500, 250, 125 und 62.5 ng BSA (nicht reduziert)

9: Molekulargewichtsstandard mit Proteinen der angezeigten Größen

Die Laufweite der pPKR ist in beiden Gelen durch einen Pfeil gekennzeichnet

nach seinen Angaben das in den Rohextrakten des vorangehenden Kapitels stark phosphorylierte Protein und damit die pflanzliche PKR (pPKR) darstellt. Verdünnungsreihen beider Präparationen wurden auf das in Abbildung 17 a) dargestellte, denaturierende und mit AgNO_3 gefärbte Polyacrylamidgel aufgetragen. Deutlich ist zu erkennen, daß das p20-Protein rein vorliegt, während die pPKR-Präparation aus vielen verschiedenen Proteinen besteht. Dabei ist zu bedenken, daß mittels der sensitiven Silberfärbung gleiche Mengen verschiedener Proteine durchaus unterschiedlich stark angefärbt werden können. Einen besseren Eindruck über den Anteil der pPKR in der betreffenden Präparation liefert daher das mit Coomassie-Blue gefärbte und in Abbildung 17 b) dargestellte Gel. Das zur Konzentrationsabschätzung aufgetragene BSA läuft hier im Gegensatz zu Abb. 17 a) schneller als die mit einem Pfeil markierte pPKR, da die BSA-Proben in diesem Fall in Auftragspuffer ohne Mercaptoethanol denaturiert wurden. Aus dem in Abb. 17 b) gezeigten Gel wurde die Menge der 68 kDa-Bande in der pPKR-Präparation zu maximal 300 ng bestimmt. Diese Abschätzung diente zur Berechnung der pPKR-Konzentration in den folgenden Verzögerungsgel-

experimenten. Für die p20-Präparation hatte Don Roth eine Konzentration von 5.5 µg/µl angegeben, auf das Gel in Abb. 17 b) wären folglich 220 ng dieses Proteins aufgetragen worden, was recht gut mit den Intensitäten des BSA-Mengenstandards übereinstimmt, wenn man bedenkt, daß die p20-Bande aufgrund des geringen Molekulargewichts weniger scharf fokussiert wird als die deutlich größeren pPKR- und BSA-Proteine.

3.5.2 Natur der untersuchten Nukleinsäuren

Es wurden die Dissoziationskonstanten für die Reaktionen von p20 und pPKR mit folgenden Nukleinsäuren bestimmt:

- doppelsträngige RNA mit 359 Basenpaaren
- 7S-RNA aus Tomate (308 Nukleotide)
- *in vitro*-Transkript mit (-)PSTVd-Sequenz (368 Nukleotide)
- zirkuläre (+)PSTVd-RNA der Isolate 23 („Mild“), 26 („Intermediate“) und 48 („Lethal“) (je 359 Nukleotide)

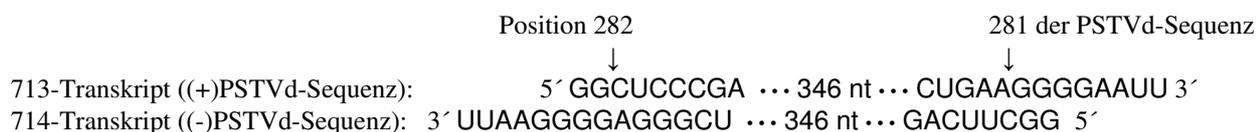
Die doppelsträngige RNA diente als Positivkontrolle: zumindest für das p20-Fragment der humanen PKR ist bekannt, daß es durchgängig basengepaarte RNA mit höchster Affinität bindet (Schmedt *et al.* (1995)). Zur Herstellung der dsRNA wurden *in vitro*-Transkripte mit PSTVd-(+)- und (-)-Sequenz gegeneinander hybridisiert und überhängende, einzelsträngige Nukleotide durch Behandlung mit S1-Nuklease entfernt (siehe Abbildung 18).

Die 7S-RNA wurde nach elektrophoretischer Auftrennung von Tomaten-Nukleinsäure aus dem Polyacrylamidgel eluiert. Anhand der Affinität, mit der die beiden Proteine diese RNA binden,

Plasmid pRH713 bzw. pRH714 → Restriktionsverdauung mit *EcoRI*

→ *in vitro*-Transkription mit T7-RNA-Polymerase → Transkripte aufheizen und langsam abkühlen

Entstehender Doppelstrang mit überhängenden Enden:



→ Enzymatische Behandlung mit S1-Nuklease → Entstehung von „blunt end“- dsRNA mit 359 Basenpaaren:



Abbildung 18: Herstellung von durchgängig basengepaarter RNA (dsRNA)

Parameter bei der S1-Verdauung: [RNA] = 30 ng/µl, 1 u S1-Nuklease / 20 ng RNA, 90 min 20° C

sollte beurteilt werden, wie spezifisch eine Wechselwirkung der Proteine mit Viroid-RNA ist. Die zirkuläre (+)PSTVd-RNA wurde wie die 7S-RNA ausgehend von Tomaten-Nukleinsäure infizierter Pflanzen geleluert. Dabei kam das von Schumacher (1983¹) entwickelte Verfahren der bidirektionellen Gelelektrophorese in einer verbesserten, vereinfachten Form zum Einsatz (s. 2.3.7). Die lineare (-)PSTVd-RNA ist diejenige, welche auch zur Herstellung der dsRNA verwandt wurde, ihre Natur ist somit aus Abbildung 12 ersichtlich.

3.5.3 Affinität der Proteine zu den verschiedenen Ribonukleinsäuren

Die Gelverzögerung von dsRNA mit p20 lieferte in der vorliegenden Arbeit ein entsprechendes Ergebnis, wie es Schmedt und Kollegen (1995) publizierten: mit steigender Proteinkonzentration zeigen sich zunächst ein bis mehrere, diskrete Komplexe von Protein und RNA oberhalb der freien Nukleinsäure (Abbildung 19, Spur 4, 9, 28 und 48), die bei weiter steigender Menge an Protein in einen zunehmend verzögerten Schmier übergehen (Spur 5-6, 10 und 29). Manche und Kollegen (1992) bestimmten den minimalen Platzbedarf eines PKR-Moleküls auf der doppelsträngigen RNA zu einer Helixwindung von circa 11 Basenpaaren. Das Auftreten mehrerer Komplexe in der Gelverzögerung wird von den Autoren folglich als zunehmende Beladung der Nukleinsäure mit mehreren Proteinmolekülen interpretiert. Im vorliegenden Fall wäre daher als äußerstes eine Besetzung der 359 Basenpaare umfassenden dsRNA mit 32 p20-Molekülen möglich. Die Wechselwirkung von dsRNA mit p20 ist durch Zugabe von tRNA in 680fachem, molaren Überschuß über die dsRNA nicht kompetitierbar und insofern hochspezifisch (Spur 11-14). Die (-)PSTVd-RNA wird von dem Protein mit einer Dissoziationskonstanten von circa 1 μM 10fach schlechter gebunden als dsRNA (Spur 17 und 37-38)); 7S- und (+)-PSTVd-RNA werden noch geringfügig schlechter gebunden (vgl. Spur 38 mit 33 und 43). Die Zugabe von tRNA als Kompetitor hat im Falle der (-)PSTVd-RNA den Effekt, die apparente Dissoziationskonstante geringfügig heraufzusetzen (vgl. Spur 17 mit 21). Wenn die Stärke der Wechselwirkung von p20 mit der tRNA mit einem angenommenen K_D von $4 \cdot 10^{-6}$ M nur ein Viertel so stark ist wie jene mit (-)PSTVd-RNA, so würde bei der eingesetzten tRNA-Konzentration von $4 \cdot 10^{-6}$ M nurmehr die Hälfte des p20-Proteins frei vorliegen, sodaß wie beobachtet eine Verdopplung der eingesetzten p20-Konzentration notwendig ist, um den gleichen Verzögerungseffekt zu erzielen, wie er in Abwesenheit der tRNA auftritt. Dies erklärt auch, warum der Beladungszustand der dsRNA bei einer p20-Konzentration von 10^{-6} M in Anwesenheit von $4 \cdot 10^{-6}$ M tRNA geringer ausfällt als in ihrer Abwesenheit (vgl. Spur 10 mit 14). Doppelsträngige DNA wird von p20 mit einem K_D von $\geq 4 \cdot 10^{-6}$ M gebunden,

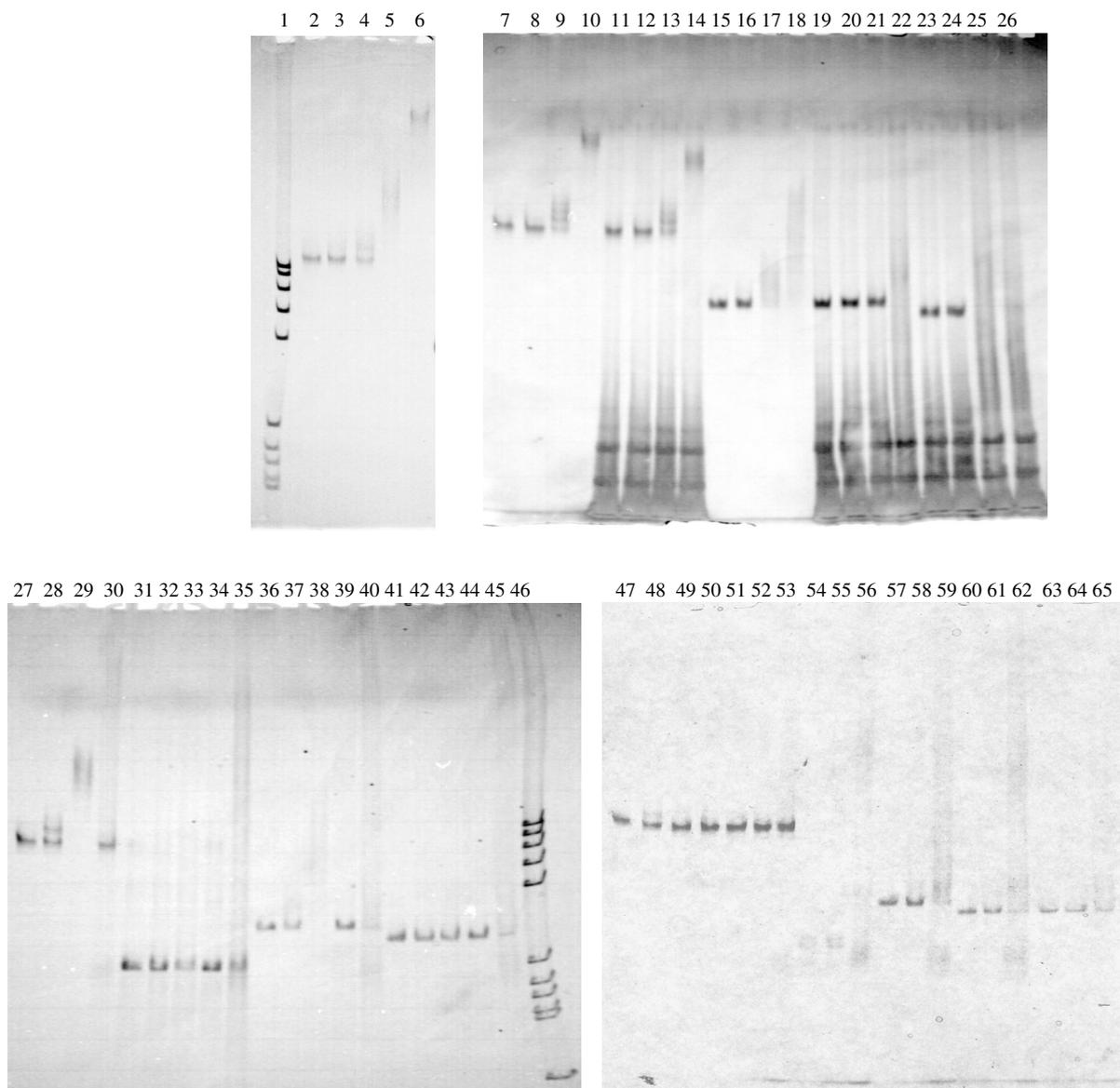


Abbildung 19: Gelverzögerung mit putativer pflanzlicher PKR (pPKR) bzw. der RNA-Bindedomäne humaner PKR (p20)

Native PAGEs, 5 % (43:1), diskontin. Puffersystem (s. 2.3.5) enthaltend 0.5 mM MgSO₄, 8° (1-26) bzw. 21° C (27-65)

1 und 46: Plasmid pBR322, verdaut mit HaeIII, Fragmente der Länge 587, 540, 502, 458, 434, 267, 234, 213, 192, 184 und 124 Basenpaaren

2-6: 12 ng dsRNA, + 0, 1, 10, 100 bzw. 1000 nM p20

7-10 und 11-14: 12 ng dsRNA, + 0, 10, 100 und 1000 nM p20, 11-14: + 4.3 µM tRNA

15-18 und 19-22: 12 ng (-)PSTVd-RNA, + 0, 100, 1000 bzw. 2500 nM p20, 19-22: + 4.3 µM tRNA

23-25: 12 ng (+)PSTVd-RNA, + 0, 1000 bzw. 2500 nM p20 + 4.3 µM tRNA, 26: 4.3 µM tRNA + 2500 nM p20

27-29: 12 ng dsRNA + 0, 100 und 1000 nM p20, 30: 12 ng dsRNA + 140 nM pPKR

31-33: 12 ng 7S-RNA + 0, 1000 bzw. 2000 nM p20, 34-35: 12 ng 7S-RNA + 36 bzw. 140 nM pPKR

36-38: 12 ng (-)PSTVd + 0, 1000 bzw. 2000 nM p20, 39-40: 12 ng (-)PSTVd + 36 bzw. 140 nM pPKR

41-43: 12 ng (+)PSTVd + 0, 1000 bzw. 2000 nM p20, 44-45: 12 ng (+)PSTVd + 36 bzw. 140 nM pPKR

47-48: 12 ng dsRNA + 0 bzw. 100 nM p20, 49-50: 12 ng dsRNA + 10 bzw. 100 nM dephosphoryliertem p20

51: 12 ng dsRNA + Calf Intestine Phosphatase, 52-53: 12 ng dsRNA + 36 bzw. 140 nM dephosphorylierter pPKR

54-56: 12 ng 7S-RNA + 0, 36 bzw. 140 nM dephosphorylierter pPKR

57-59: 12 ng (-)PSTVd-RNA + 0, 36 bzw. 140 nM dephosphorylierter pPKR

60-62: 12 ng Isolat 23- („Mild“-) (+)PSTVd + 0, 36 bzw. 140 nM dephosphorylierter pPKR

63-65: 12 ng Isolat 48- („Lethal“-) (+)PSTVd + 0, 36 bzw. 140 nM dephosphorylierter pPKR

d.h. etwa 4fach schwächer als die untersuchten RNAs (Ergebnis nicht gezeigt).

Im Gegensatz zur RNA-Bindedomäne der humanen PKR (p20) bindet die pPKR die 7S-, (-)PSTVd- und (+)PSTVd-RNA besser als durchgängig basengepaarte dsRNA. Verzögerte Komplexe sind mit diesem Protein nicht erkennbar, jedoch nimmt die Bande der freien Nukleinsäure für 7S-, (-)- und (+)-PSTVd-RNA deutlich ab, wenn die pPKR-Konzentration $1.4 \cdot 10^{-7}$ M beträgt, während dsRNA dann noch größtenteils frei vorliegt (vgl. Spur 30 mit 35, 40 und 45). In einem nicht gezeigten Experiment konnte für die Affinität der pPKR zur dsRNA eine Dissoziationskonstante von $\leq 7 \cdot 10^{-7}$ M abgeschätzt werden. Die Wechselwirkung wäre damit etwa 5fach schwächer als jene zwischen pPKR und den strukturierten RNAs.

Da die pPKR-Präparation aus mehreren Proteinen besteht, wäre a priori nicht auszuschließen, daß eine RNase-Aktivität zur Abschwächung der freien Nukleinsäurebanden durch Degradation der RNA führt. Dies konnte jedoch durch Inkubation von Viroid-RNA mit pPKR und anschließender Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen ausgeschlossen werden, da dann die RNA in unbeschadetem Zustand freigesetzt wurde (Ergebnisse nicht gezeigt).

Nachdem Jammi und Beal 2001 feststellten, daß bereits phosphorylierte, humane PKR RNA deutlich schlechter bindet als die dephosphorylierte Form, wurde ein Gelverzögerungsexperiment mit p20- und pPKR-Präparationen wiederholt, die zuvor mit alkalischer Phosphatase behandelt worden waren. Im vorliegenden Fall hatte die Behandlung des p20-Proteins mit diesem Enzym keinen oder sogar einen negativen Einfluß auf die Affinität zu dsRNA (Abb. 19, vgl. Spur 48 mit 50). Mit alkalischer Phosphatase behandelte pPKR zeigte ebenfalls keine Veränderung in ihrem Bindeverhalten: noch immer wurde bei einer pPKR-Konzentration von $1.4 \cdot 10^{-7}$ M keine Verzögerung von dsRNA (Spur 53), wohl aber von 7S-, (-)PSTVd- und (+)PSTVd-RNAs beobachtet (Spur 56, 59, 62 und 65). Im Falle von 7S-RNA (Spur 56) ist dieser Effekt nur schwer erkennbar, da eine punktförmig angefärbte Substanz der Proteinpräparation nur geringfügig weiter läuft als die freie 7S-RNA. In diesem Experiment wurden außerdem zwei (+)PSTVd-Sequenzvarianten sehr unterschiedlicher Pathogenität hinsichtlich ihrer pPKR-Bindung verglichen. Die PSTVd-Isolate 23 („Mild“) und 48 („Lethal“) zeigen diesbezüglich gleiches Verhalten, d.h. eine weitgehende Verzögerung bei $1.4 \cdot 10^{-7}$ M pPKR (Spuren 62 und 65).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die humane PKR dsRNA deutlich besser bindet als 7S-RNA, (-)PSTVd- und (+)PSTVd-RNA, während die Präparation enthaltend die putative pPKR eine höhere Affinität zu den strukturierten RNAs aufweist als zur dsRNA. Die Unterschiede in den Affinitäten der pPKR zu diesen verschiedenen, strukturierten RNAs sind zu gering, um mit der Methode der Gelverzögerung zuverlässig aufgelöst werden zu können.

3.6 Klonierung eines Expressed-Sequence-Tags mit dsRNA-Bindedomäne aus der Tomate

Die Phosphorylierung des 68 kDa-Proteins aus der Tomate war weder in Proteinextrakten aus viroidinfizierten Pflanzen signifikant verstärkt, noch ließ sie sich durch externe Zugabe von PSTVd-RNA beeinflussen. Jedoch zeigte die bezüglich dieses Proteins angereicherte Präparation von Don Roth eine signifikante Bindung an Viroid- und 7S-RNA, welche ihre Affinität zu reiner dsRNA noch übertraf. Für eine weitere Charakterisierung dieser Wechselwirkungen wäre eine möglichst reine Präparation der putativen Pflanzen-PKR notwendig gewesen. So sollte ausgeschlossen werden, daß die übrigen Proteine der angereicherten Fraktion die beobachteten Effekte verursachten. Eine reinere Präparation der pflanzlichen PKR konnte jedoch vom Kooperationspartner Don Roth nicht zur Verfügung gestellt werden. Eine Klonierung und rekombinante Expression des Enzyms wäre eine gute Alternative zu ihrer biochemischen Aufreinigung, jedoch läßt sich kein pflanzliches Homolog dieses Proteins in den bislang sequenzierten Genomen identifizieren.

3.6.1 HYL1 - ein RNA-bindendes Protein mit wachstumsregulierender Funktion

Zu diesem Zeitpunkt wurde von Lu und Fedoroff (2000) die Entdeckung eines pflanzlichen Proteins mit dsRNA-Bindedomäne publiziert, dessen Ausfall in *Arabidopsis thaliana* einen auffälligen Wachstumsphänotyp verursacht: mutante Pflanzen zeigen verringertes Längenwachstum, stärkere Verzweigungen und nach oben gekrümmte Blätter, weswegen die Autoren das Protein Hyponastic Leaves (HYL1) nannten. Abbildung 20 veranschaulicht die verblüffende Ähnlichkeit zwischen HYL1 und der humanen PKR hinsichtlich der Anordnung der zwei dsRNA-Bindedomänen (dsRBDs). Die C-terminale Hälfte von HYL1 besitzt allerdings weder zur PKR noch zu einem

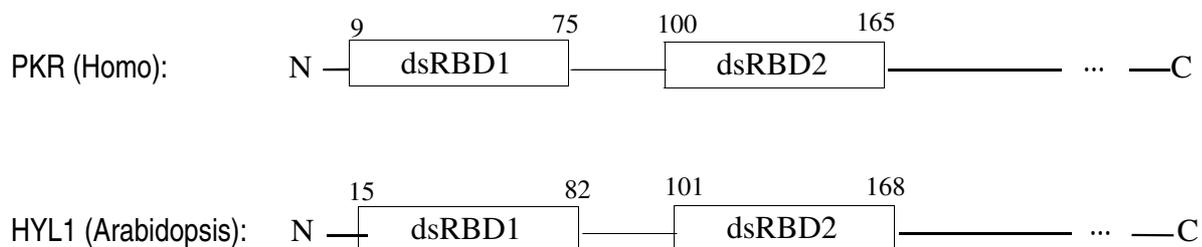


Abbildung 20: Vergleich von PKR und HYL1 bezüglich der Anordnung der RNA-Bindedomänen
Die Zahlen geben die Aminosäurepositionen an. Für ein Alignment der dsRBDs siehe Abbildung 1

anderen, bekannten Protein signifikante Homologie. Die Anwesenheit der dsRNA-Bindedomänen und die Bedeutung des Proteins für die Regulation des Pflanzenwachstums lassen es denkbar erscheinen, daß die Wechselwirkung von PSTVd mit einem Homolog von HYL1 in der Tomate die Krankheitssymptome verursacht. Lu und Fedoroff konnten außerdem zeigen, daß HYL1 im Zellkern lokalisiert ist. Diese Tatsache macht eine Wechselwirkung mit PSTVd nicht unwahrscheinlicher. Aus diesen Gründen faßte der Autor den Entschluß, daß Homolog von HYL1 aus der Tomate zu klonieren, um nach seiner Expression in *Escherichia coli* die Wechselwirkung des Proteins mit PSTVd zu untersuchen.

3.6.2 Klonierung eines HYL1-Homologs mittels RACE

Als Verfahren zur Klonierung einer zu Hyl1 homologen cDNA wurde die Methode der Rapid Amplification of cDNA-Ends (RACE), modifiziert nach Chenchik und Kollegen (1996), gewählt. Dieses Verfahren erlaubt die Amplifikation unbekannter 5'- und 3'-Enden von cDNAs mittels PCR, sofern Sequenzabschnitte aus dem mittleren Bereich dieser cDNAs bekannt sind oder durch Vergleich mit bekannten Sequenzen abgeleitet werden können. Ausgehend von poly-A⁺-RNA des gewünschten Organismus wird mittels Reverser Transkriptase cDNA synthetisiert, die mit Hilfe von RNase H, DNA-Polymerase I und DNA-Ligase in doppelsträngige DNA überführt wird. RNase H und in einem zweiten Schritt zugegebene T4-DNA-Polymerase bewirken, daß diese dsDNA glatte Enden („blunt ends“) besitzt. Ein aus den Oligonukleotiden *ado* und *adu* bestehender, partiell doppelsträngiger Adapter wird nun an beide Enden der dsDNA ligiert. Damit ist das Template-

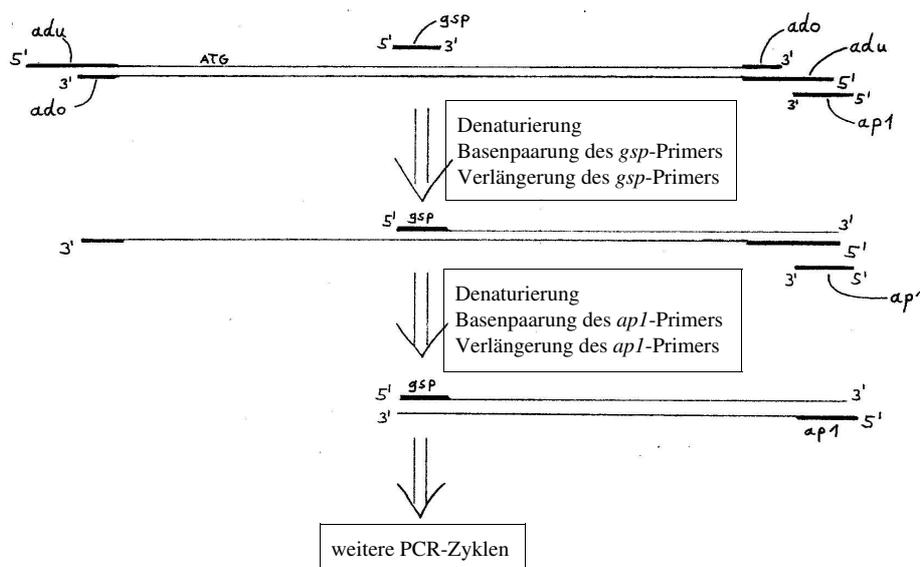


Abbildung 21: Erste Reaktionsschritte einer 3' RACE

Erläuterungen: siehe Text

Material für die nun folgende PCR-Amplifikation fertiggestellt. Abbildung 21 zeigt schematisch die nun folgenden Schritte: einer der beiden Primer jeder PCR-Reaktion ist der Adapter-Primer *apl*. Seine Sequenz entspricht dem einzelsträngigen Bereich des *adu*-Oligos, sodaß er anfangs nicht basenpaaren kann, da der komplementäre Gegenstrang noch fehlt. Selektive Amplifikation einer gewünschten Sequenz aus dem cDNA-Gemisch wird möglich durch Verwendung des zweiten PCR-Primers, dessen Sequenz einem Teil der gewünschten cDNA entspricht. Sofern dieser genspezifische Primer (*gsp*) wie im Beispiel von Abb. 21 die Sequenz der mRNA aufweist, wird er im ersten PCR-Schritt in Richtung des 3'-Endes der mRNA verlängert. Die Reaktion wird folglich als 3'RACE bezeichnet. Ein genspezifischer Primer mit einer zur mRNA komplementären Sequenz wird in Richtung des 5'-Endes der mRNA verlängert, man spricht von einer 5'RACE-Reaktion. In jedem Fall wird durch die vom genspezifischen Primer (*gsp*) ausgehende Strangsynthese die zum *adu*-Oligo komplementäre Sequenz am Ende der cDNA geschaffen. Erst jetzt kann auch der *apl*-Primer basenpaaren, allerdings nur auf die durch den *gsp*-Primer „ausgewählte“ cDNA, deren selektive Amplifikation in den weiteren PCR-Zyklen erfolgt. Zum Erhalt der gesamten cDNA-Sequenz sind folglich sowohl 5'RACE als auch 3'RACE notwendig, die beiden genspezifischen Primer werden dazu so ausgewählt, daß ein überlappender Bereich entsteht. Im vorliegenden Fall wurde eine adapterligierte cDNA-Bank von *Lycopersicon esculentum var. Rutgers* angelegt. Zum Erhalt des Hyl1-Homologs wurden zunächst genspezifische Primer (*gsp1* und *gsp2*) verwendet, die genau der Arabidopsis-Sequenz entsprachen. Die damit durchgeführten RACE-Reaktionen lieferten jedoch keine spezifischen Produkte.

Daher wurden neue Primer entworfen, deren Sequenzen sich an der Aminosäureabfolge des HYL1-Proteins orientierten und viele der sich daraus ergebenden Nukleotidsequenzen beinhalteten. Der Primer *gspI* für die 5'RACE war infolgedessen 864fach, der Primer *gspII* für die 3'RACE war 768fach degeneriert. Auch mit diesen Oligonukleotiden konnte keine Hyl1-ähnliche Sequenz aus der Tomate amplifiziert werden. Dagegen resultierten aus der 5'RACE Produkte, die an beiden Seiten von *gspI*, aus der 3'RACE solche, die an beiden Enden von *gspII* flankiert waren.

In einem dritten Versuch wurde die Sequenz der Hyl1-mRNA mit jener der homologen Odb1-mRNA aus *Oryza sativa* (Reis) verglichen, um konservierte Sequenzabschnitte zu identifizieren. ODB1 hat im Bereich der konservierten dsRNA-Bindedomäne (dsRBD) große Ähnlichkeit zu HYL1. Abbildung 22 veranschaulicht, wie der neue 3'RACE-Primer *gspA* anhand des Sequenzvergleichs entworfen wurde. *gspA* ist nur zweifach degeneriert, nimmt dafür aber einige mögliche G-T-Basenpaare in Kauf. Auch mit Hilfe dieses Primers konnte zunächst kein befriedigendes PCR-Produkt amplifiziert werden. Spätestens jetzt stellte sich die Frage, ob die

Aminosäuresequenz: E Y A Q K M N Y A
 Hyl 1-mRNA-Sequenz: 5' ... GAA UAC GCU CAA AAG AUG AAU UAC GCG... 3'
 Odb 1-mRNA-Sequenz: 5' ... GAG UAU GCA CAG AAG AUG AAU UAU GCC... 3'
 gspa-Primer: 5' GAG TAT GC ^T_A CAG AAG ATG AAT TAT GC 3'

Abbildung 22: Entwurf des Primers *gspa* durch Sequenzvergleich zweier dsRBD-Proteine aus Arabidopsis (HYL1) und Oryza (ODB1)

Die gezeigte Aminosäuresequenz liegt innerhalb der zweiten dsRBD und ist zwischen beiden Proteinen konserviert. Der Primer *gspa* nimmt an mehreren, fettgedruckten Stellen G-T-Basenpaare in Kauf, ist dafür aber nur zweifach degeneriert.

cDNA-Bank überhaupt funktionell war. Zur Überprüfung dieser Frage wurde daher zum einen ein spezifisches Oligo eingesetzt, welches die 3'RACE einer bereits bekannten Tomatensequenz erlauben sollte

(*srp54*). Zum anderen wurde eine adapterligierte cDNA-Bank aus Arabidopsis thaliana hergestellt, um mit Hilfe der bereits vorhandenen, Arabidopsis-spezifischen Primer *gsp1* und *gsp2* zu überprüfen, ob die beiden Hälften der Hyl1-Sequenz mit dem RACE-Verfahren amplifizierbar sind. Außerdem wurden Primer eingesetzt, die eine End-zu-End-Amplifikation der Hyl1-DNA erlauben sollten (*hya* und *hyb*). Die daraufhin durchgeführten Kontrollexperimente zeigten, daß die Methode bislang grundsätzlich nicht funktionierte, obwohl die Genbanken Vollängen-cDNAs enthielten. Eine Überprüfung aller Arbeitsschritte führte zu dem Verdacht, daß die Ligation der Adapter nur erfolgen kann, wenn die 5'-Enden der dsDNA phosphoryliert sind (Bernd Esters, pers. Mitteilung). Obwohl ein entsprechender Arbeitsschritt im publizierten Protokoll (Chenchik *et al.* (1996)) nicht vorgesehen ist, wurde daher eine 5'-Phosphorylierung der cDNA mit Polynucleotidkinase durchgeführt und die Adapterligation wiederholt. Tatsächlich lieferten beide oben geschilderten RACE-Positivkontrollen in der nachfolgenden PCR die gewünschten Produkte. In der Folge wurde auch in einer RACE-Reaktion mit dem Oligo *gspA* und Tomaten cDNA als Template erstmals ein scheinbar spezifisches Produkt von circa 1200 Basenpaaren Länge amplifiziert (s. 6.1).

3.6.3 Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den HYL1-Homologen

Die Sequenzierung dieser DNA und eine nachfolgende *in silico*-Translation offenbarte, daß das codierte Protein tatsächlich Ähnlichkeit zu HYL1 aus Arabidopsis aufweist, in seiner C-terminalen Hälfte jedoch völlig von der HYL1-Sequenz abweicht. Das Protein kann aber dennoch als direktes Homolog zu HYL1 gelten. Dies sei im Folgenden näher erläutert: das Arabidopsis thaliana-Genom codiert laut der *Protein Families Database of Alignments and HMMs* (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/>) für insgesamt 20 dsRBD-enhaltende Proteine, wovon 6 sogar die in der PKR und in HYL1 gefundene Anordnung von zwei dsRBDs nahe dem N-Terminus aufweisen. Ein Sequenzvergleich mit dem Programm Blast offenbart jedoch, daß keines dieser Arabidopsis-Proteine zu

Consensus key (see documentation for details)

* - single, fully conserved residue
 : - conservation of strong groups
 . - conservation of weak groups
 - no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

                                     [
RBP2_[Brass.oler.]  --MTSN-----DVSSG-----VSNCYVFKSRLQEYAQKYKLPPIYETVKEGPS
HYL1_[Arabid.]     --MTST-----DVSSG-----VSNCYVFKSRLQEYAQKYKLPVYEVIVKEGPS
ODB1_[Oryza]       MDMPP TPLPPETANTSPAPNGATAGIRVENCYVFKSRLQEYAQKTGLQTPEYHTFKEGPS
NEW_[Lycopers.]   -----
Q8GY79_[Arabid.]  -----MYKNQLQELAQRSCFNLP SYTCIREGPD
                                     ]
RBP2_[Brass.oler.]  HKSLFQSTVIVDGVRYDSLPGFFNRKAAEQSAAEVALQELSKSTELGQCVS LPHVHEMGLC
HYL1_[Arabid.]     HKSLFQSTVILDGVRYNLPGFFNRKAAEQSAAEVALRELAKSSELSQCVSQP VVHETGLC
ODB1_[Oryza]       HEPVFKSTVVINNTSYDSLPGFFNRKAAEQSAAEVALMEIVKSI PANANIP-AVQETGLC
NEW_[Lycopers.]   -----
Q8GY79_[Arabid.]  HAPRFKASVNFNGEIFESP TYCSTLRQAEHAAA E VSLNVLSSRVPSKSLTAKILDEGTIY

RBP2_[Brass.oler.]  KNLLQEYAQKMNYAIPLYQCQKSETLGRAPQFTCTVEIG-GIKYTGAA TKKKEAEISAG
HYL1_[Arabid.]     KNLLQEYAQKMNYAIPLYQCQKVELTGRVTQFTCTVEIG-GIKYTGAA TRTKKDAEISAG
ODB1_[Oryza]       KNLLQEYAQKMNYAIPSYICTKSASG--LAPFICTVEIWWEYKYIGAAARTKKDAEIKAA
NEW_[Lycopers.]   -----IPQYECERYDSESKII SFCTVDVG-GMKYIGAAARTKKKEAEIKAA
Q8GY79_[Arabid.]  KNLLQETAHRAGLDLPMTSVSRGS-CHFPGF SCTVELA-GMTFTGESAKTKQAEKNAA
                                     ]
                                     : * * . : : * * * * : : * : : * * * * * . *
RBP2_[Brass.oler.]  RTALLAIQSESKIDLANNYSTQLTVLPCEKKTVEVASPVK E TI-----IKTPKARRAQF
HYL1_[Arabid.]     RTALLAIQSDTKNNLAN-YNTQLTVLPCEKKTIQAAIPLK E T-----VKTLKARKAQF
ODB1_[Oryza]       RTALLAIQSQSEGSANG--ATKYIVVPGKRVGKEVEKRP I ET-----PKPLKVKKGGF
NEW_[Lycopers.]   RTALLAVQ--SSGFAPN--YSSYTVVP-MKKVTDLAISNQES-----AAALPKPKHRF
Q8GY79_[Arabid.]  IAAWSLLKMS SLDSD E E K Q E A V A R V L S R F K P K E V R R R E T T N Q W R R R T S Q Q D S N K D L L
                                     : * : : : . . * * * : : * : : : : : : : : : : : : : : :
RBP2_[Brass.oler.]  KKKARKGK LK-----VAKDLL-----EDSTVPPQP-----TEH
HYL1_[Arabid.]     KKKAQKGR T-----VAKNP-----EDIIIPPQP-----TDH
ODB1_[Oryza]       KKKWNRKFMKKGQAVDVEKDEARVAGDAHDSVLMQP-----TVI
NEW_[Lycopers.]   KKKQTR-NFS-----DVSYHVR-----TKIFGDS-----EVQ
Q8GY79_[Arabid.]  IERLRWINLLTNQASSSSSTPNQHKNSSSIFSLIPPPPPPKSSKILPFIQQYKDRSSQE
                                     : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

```

Abbildung 23: Sequenzvergleich mit dem neu entdeckten dsRBD-Protein (NEW) aus *Lycopersicon esculentum*

Die N-terminalen Hälften der Proteine wurden mit dem Programm CLUSTALW aligned. Eckige Klammern über den Sequenzen markieren jeweils den Anfang und das Ende der beiden dsRNA-Bindedomänen (dsRBDs).

RBP2, HYL1, ODB1 und NEW zeigen große Ähnlichkeit, insbesondere auch im durch eine Linie über den Sequenzen gekennzeichneten Bereich. Q8GY79 ist ein hypothetisches Protein mit zwei dsRBDs aus *Arabidopsis*, welches jedoch im c-terminal an die zweite dsRBD angrenzenden Bereich keine Ähnlichkeit mit den vier anderen Proteinen aufweist.

Arabidopsis-HYL1 so ähnlich ist wie das neu entdeckte Tomatenprotein (im folgenden NEW genannt) einerseits sowie ODB1 aus Reis und RBP2 aus *Brassica oleracea* andererseits.

Insbesondere die C-Termini der zweiten dsRBDs und die daran angrenzenden Bereiche weisen durch ihre große Ähnlichkeit diese vier Polypeptide als Homologe aus. Im Sequenz-Alignment von Abbildung 23 ist der genannte Bereich durch einen über den Sequenzen liegenden Strich

hervorgehoben. In dieses Alignment wurde außerdem eines der *Arabidopsis*-Proteine mit zwei N-terminalen dsRBDs aufgenommen, welches nicht zu den anderen vier Sequenzen homolog ist.

Obwohl die C-Termini von NEW, HYL1 und ODB1 keine Sequenzähnlichkeit aufweisen, haben sie doch eine interessante Eigenschaft gemein. In allen drei Fällen bestehen sie aus wiederholten Sequenzabschnitten ähnlicher Länge. Diese wurden in Abbildung 24 hervorgehoben. Am

Ebene ein relativ geringes, evolutionsgeschichtliches Alter der Sequenzverdopplungen.

Im ODB1-Protein aus *Oryza sativa* schließlich sind die Sequenzwiederholungen weniger eindeutig. Dennoch weisen Abschnitte von etwa 20 Aminosäuren in der C-terminalen Hälfte eine signifikante Ähnlichkeit zueinander auf.

Die Wiederholungssequenzen haben in allen drei Proteinen mit 78 bis 88 Aminosäuren einen ähnlichen Abstand von der RNA-Bindedomäne. Außerdem weisen sie in jedem Fall einen isoelektrischen Punkt im sauren Bereich auf, sind also unter physiologischen Bedingungen negativ geladen. Es bleibt zu erwähnen, daß das Kernlokalisationsignal ((K/R)(K/R)XXXXXXXX(K/R)X(K/R)(K/R)), welches in HYL1 und ODB1 vorliegt, im neu entdeckten Tomatenprotein durch Sequenzveränderung nicht mehr existiert, was aber eine Kernlokalisierung für dieses Protein nicht ausschließt.

Mit einem genspezifischen Primer (*fivep*) wurde nun versucht, auch das 5'-Ende dieser interessanten Sequenz und damit die N-terminale Hälfte des codierten Proteins zu bestimmen. Die Sequenzierung verschiedener RACE-Produkte offenbarte schließlich noch einen weiteren, fatalen Fehler: der Adapterprimer *ap1* endete 3' mit einem Thymin statt einem Cytosin. Dieser Fehler wurde vom Hersteller Interactiva mittels Massenspektrometrie bestätigt und das Oligo daraufhin neu synthetisiert. Die mit dem korrekten Primer durchgeführten RACE-Reaktionen verliefen sogleich mit deutlich besserer Effizienz. Leider konnte dennoch weder mit *fivep* noch mit irgend einem anderen Primer je eine erfolgreiche 5'-RACE durchgeführt werden.

3.7 Auswahl weiterer potentieller Wechselwirkungspartner von PSTVd

Da sich die Versuche zur Klonierung eines Hyll1-Homologs unerwartet schwierig gestalteten, blieb ausreichend Zeit, die generelle Taktik zu überdenken.

Es erschien sinnvoll, Primer für weitere, putative Bindungspartner der Viroid-RNA zu entwerfen.

3.7.1 SRP9 und SRP14

Die zelluläre 7S-RNA, welche durch Assoziation mit den Proteinen SRP9, SRP14, SRP19, SRP54, SRP68 und SRP72 den Signal Recognition Particle (SRP) bildet, dem eine essentielle Funktion im intrazellulären Proteintransport zukommt, weist folgende Ähnlichkeiten zur Viroid-RNA auf:

- PSTVd besitzt mit 359 nt eine vergleichbare Größe zur 303 nt langen 7S-RNA

- die 7S-RNA hat eine hantelförmige Struktur mit langem, unverzweigtem und insofern PSTVd-ähnlichen Mittelteil
- es besteht eine Sequenzähnlichkeit zu PSTVd im Bereich der sogenannten Alu-Domäne der 7S-RNA (Haas *et al.* (1988))
- die Arbeitsgruppe von Pederson (Politz *et al.* (2000)) stellte fest, daß ein Teil der 7S-RNA-Moleküle im Nukleolus vorliegt, ebenso konnten sie in diesem Kompartiment zwei der an die 7S-RNA bindenden Proteine nachweisen. Die Autoren postulierten daraufhin, daß der Nukleolus nicht nur der Ort der Ribosomen-, sondern auch der SRP-Assemblierung ist
- die Menge an aus Pflanzenmaterial isolierbarer 7S-RNA entspricht recht genau der isolierbaren Menge an PSTVd.

Da annähernd die gesamte Menge an Viroid-RNA in den Nukleoli vorliegt, während der Großteil der 7S-RNA in Form der SRPs im Cytosol funktionell ist, dürfte die Konzentration von PSTVd jene der 7S-RNA im Nukleolus deutlich übersteigen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden RNAs wäre denkbar, daß PSTVd mit einem oder mehreren Proteinen des SRPs wechselwirkt und so die Assemblierung von 7S-RNA mit den SRP-Proteinen stört. Insbesondere könnte dieses Szenario auf die beiden Proteine SRP9 und SRP14 zutreffen, da jene an die Alu-Domäne der 7S-RNA binden, deren Basenabfolge Ähnlichkeit zur PSTVd-RNA aufweist (Haas *et al.*, 1988). Aus diesem Grund wurden Primer für 3' RACE-Reaktionen zur Amplifikation von SRP9- sowie SRP14-cDNA aus Rutgers-Tomate entworfen. Beide Proteine sind bereits aus zwei anderen Angiospermen bekannt. So wurden für das SRP9-Oligo (*srp9*) die für dieses Protein codierenden Sequenzen aus *Arabidopsis* und *Zea mays* (Mais), für das SRP14-Oligo (*srp14*) jene aus *Arabidopsis* und *Oryza sativa* *in silico* verglichen, um möglichst konservierte Sequenzabschnitte auszuwählen. Beide Primer wurden schließlich als je vierfach degenerierte Gemische eingesetzt.

3.7.2 Nukleolin und Fibrillarin

Die bereits mehrfach erwähnte Tatsache, daß das Viroid in hoher Kopienzahl in den Nukleoli der Pflanzenzellen akkumuliert, rückte im Verlaufe dieser Arbeit immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Rein rechnerisch ergibt sich eine PSTVd-Konzentration von 0.03 bis 0.3 mM, wenn man die von Schumacher und Kollegen (1983²) bestimmte Zahl von 10^4 bis 10^5 Viroidmolekülen in einem Nukleolus von 1 µm Durchmesser zugrundelegt. Sofern ein putativer Bindungspartner von PSTVd im Nukleolus ähnlich oder geringer konzentriert ist, würde damit mehr als die Hälfte dieses Proteins im Komplex mit PSTVd vorliegen, auch wenn die Wechselwirkung zwischen beiden mit

einer Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich nicht besonders spezifisch ist. Da insbesondere im Nukleolus eine Vielzahl nukleinsäurebindender Proteine benötigt werden, wäre davon auszugehen, daß einige in ihrer Funktion erheblich beeinträchtigt werden. Die meisten Wirtspflanzen zeigen jedoch keinerlei Symptome bei PSTVd-Befall. Diese Umstände legen nahe, daß die freie Konzentration des Viroidmoleküls im Nukleolus deutlich unter dem rechnerischen Wert liegen muß. Dies könnte z.B. dadurch gewährleistet werden, daß die Viroid-RNA von einer bestimmten Komponente im Nukleolus fest gebunden und die freie Konzentration an PSTVd damit deutlich gesenkt wird. Die Pathogenität gewisser Sequenzvarianten von PSTVd könnte dementsprechend nicht in einer besonders starken, sondern in einer zu schwachen Wechselwirkung mit dieser Wirtskomponente begründet sein, wodurch eine für die Pflanze unverträglich hohe Konzentration an freier Viroid-RNA im Nukleolus resultieren würde.

Von einer solchen Komponente wäre auf jeden Fall zu fordern, daß sie selbst in großer Menge vorliegt und/oder von der Pflanze bei PSTVd-Befall stärker exprimiert wird.

Aus diesen Gründen wurde der Entschluß gefasst, besonders abundante Proteine des Nukleolus auf ihre Wechselwirkung mit PSTVd hin zu untersuchen. Als häufigste Proteine dieses Organells gelten Nukleolin und Fibrillarin. Beide sind in die Bildung funktioneller rRNA involviert. Während Nukleolin die prä-rRNA selbst bindet, ist von Fibrillarin bislang nur bekannt, daß es im Komplex mit kleinen, nukleolären RNAs (snoRNAs) vorliegt, die für die Modifizierung und Prozessierung der rRNA essentiell sind.

Homologe des Nukleolins wurden bereits in mehreren Pflanzen identifiziert. Für den Entwurf eines Primers wurden daher die Nukleolin-codierenden Sequenzen von Alfalfa, Pisum, Arabidopsis und Mensch verglichen und so zwei besonders konservierte Bereiche identifiziert. Deren einer liegt recht nahe am 5' Ende, der andere nahe dem 3' Ende der insgesamt circa 2 kb langen mRNAs. Es wurde zunächst ein Primer bestellt, der komplementär zu dem 3' gelegenen, konservierten Abschnitt ist. Dieser Primer (*nucl*) ist nicht degeneriert, da unter Berücksichtigung der Verwandtschaftsverhältnisse der verglichenen Organismen stets eine wahrscheinliche Alternative bei nicht identischen Nukleotidpositionen existierte. Da mit diesem Primer kein Erfolg erzielt werden konnte, wurde dann ein 16fach degeneriertes Gemisch dieser Sequenz bestellt (*nucl_d*), dessen Verwendung in der PCR allerdings ebenso wenig fruchtete wie die eines 8fach degenerierten Oligonukleotids, welches dem 5' gelegenen, konservierten Abschnitt der Nukleolin-mRNAs entspricht (*nuIII*).

Für Fibrillarin wurden die codierenden Sequenzen von Arabidopsis, Mensch und Zebrafisch verglichen und ein 3fach degenerierter Primer bestellt (*fib*), der für 5' RACE-PCRs eingesetzt

wurde, die ebenfalls nicht zum Erhalt einer Tomaten-Fibrillarin-Sequenz führten.

Auch mit oben erwähnten Primern *srp9* und *srp14* konnten keine Homologe der betreffenden Proteine aus der Tomate identifiziert werden.

Ein inhärentes Problem der RACE-Methode ist, daß der Adapterprimer zu unerwünschten Produkten führt, die seine Sequenz an beiden Enden tragen. Sobald dieses Oligonukleotid auf eine mehr oder weniger komplementäre Sequenz im cDNA-Gemisch passt, führt dies zur Verlängerung und damit Generierung einer zweiten Bindestelle am nun doppelsträngigen, adapterligierten Ende. Aber auch durch die Verwendung degenerierter Primer steigt die Gefahr der Amplifikation unerwünschter Sequenzabschnitte, die an beiden Seiten von diesen Oligonukleotiden flankiert sind. Beide Artefakte traten mehrfach in dieser Arbeit auf, aber auch die „ordnungsgemäße“ Amplifikation interessanter aber unerwünschter Sequenzen konnte mit verschiedenen, degenerierten Primern „erfolgreich“ durchgeführt werden. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die RACE-Methode für heterologes Screening nur sehr bedingt geeignet ist, obwohl in der Literatur diesbezüglich erfolgreiche Anwendungen existieren.

Im vorliegenden Fall wurde schließlich der Entschluß gefaßt, auf die Proteine aus der PSTVd-Wirtspflanze Tomate zu verzichten und stattdessen die codierenden Sequenzen gezielt aus einer *Arabidopsis thaliana* cDNA-Bank zu amplifizieren.

3.8 Expression rekombinanter Proteine in *Escherichia coli*

Die kodierenden Sequenzen der Proteine wurden in den Expressionsvektor pTYB 1 von New England Biolabs inseriert (http://biosun.bio.tu-darmstadt.de/Bioinf-Dateien/IMPACT_T7_Sys_man.pdf). Bei diesem System wird an das gewünschte Protein eine 58 kDa umfassende Polypeptidsequenz angehängt, die eine Intein- und daran anschließend eine Chitinbindedomäne umfasst. Vermittels letzterer erfolgt die Aufreinigung des rekombinanten Proteins über eine Chitin-Chromatographie-Matrix. Nach dem Spülen der Säule wird die Matrix mit 50 mM DTT inkubiert. Diese Bedingungen induzieren die Abspaltung der gewünschten Sequenz von der Chitinbindedomäne durch die zwischen beiden inserierte Inteinsequenz.

3.8.1 Arabidopsis-Fibrillarin

Die für ein Arabidopsis-Fibrillarin kodierende und in 6.2.2 gezeigte Sequenz mit der GenBank Accession-No. NM_124626 wurde mit den Primern *fif* und *fir2* aus einer Arabidopsis-cDNA-Bank amplifiziert und in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert. Aus diesem wurde das Fibrillarin-Insert mittels der Restriktionsenzyme *SapI* und *NdeI* ausgeschnitten und in den ebenso restriktionsverdauten Expressionsvektor pTYB1 inseriert. Die Expression erfolgte in BL21 CodonPlus®(DE3)RIL-Zellen (Stratagene), welche zur effizienten Expression mit extra-tRNAs für in Prokaryonten seltene Arginin-, Isoleucin- und Leucin-Codons ausgestattet sind.

Abbildung 25 veranschaulicht die Expression und Aufreinigung des rekombinanten Arabidopsis-Fibrillarins. Der Doppelpfeil am linken Rand weist auf eine Proteinbande bei etwa 86 kDa, die nach Induktion der Expression des rekombinanten Proteins mittels IPTG im Gesamt-Zellaufschluß deutlich zunimmt (vgl. Spur 9 mit 4). Ein Protein desselben Molekulargewichts wird durch die Chitinbeads aus dem Zellysat aufgereinigt (Spur 17). Die nachfolgende Inkubation des Säulenmaterials mit 50 mM DTT induziert die Abspaltung der Fibrillarin-Polypeptidsequenz von der Chitinbindedomäne durch die zwischen diesen beiden inserierte Inteindomäne. Spur 19 und 20 des Gels zeigen die nach dieser induzierten Abspaltung auf der Säulenmatrix verbleibenden Polypeptide: zum einen der Chitin-Intein-Tag bei 58 kDa, zum anderen noch ungespaltenes Fusionsprotein bei 86 kDa (soll: 90 kDa). Das Eluat (Spur 13-15) besteht hier leider nicht nur aus dem gewünschten Fibrillarin, sondern aus vielen verschiedenen Proteinen. Dies legt nahe, daß Arabidopsis-Fibrillarin mit einer Vielzahl von Proteinen aus *Escherichia coli* so stark wechselwirkt, daß ihre Assoziation trotz stringenter (1-1.5 M NaCl) Waschungen der Säule vor der Elution erhalten bleibt. Da die Spaltung des Fusionsproteins noch nicht vollständig erfolgt war, wurde nun

täglich ein Säulenvolumen mit DTT-haltigem Puffer eluiert. Die in Spur 6 bis 9 von Abbildung 26 aufgetragenen Eluate wurden also im Abstand von je 24 Stunden gewonnen; daß in Spur 9 analysierte dagegen 3 Tage nach dem in Spur 8 aufgetrennten. Deutlich ist zu erkennen, daß der Anteil des Fibrillarins (Doppelpfeil links) im Eluat immer weiter zunimmt. Das apparente

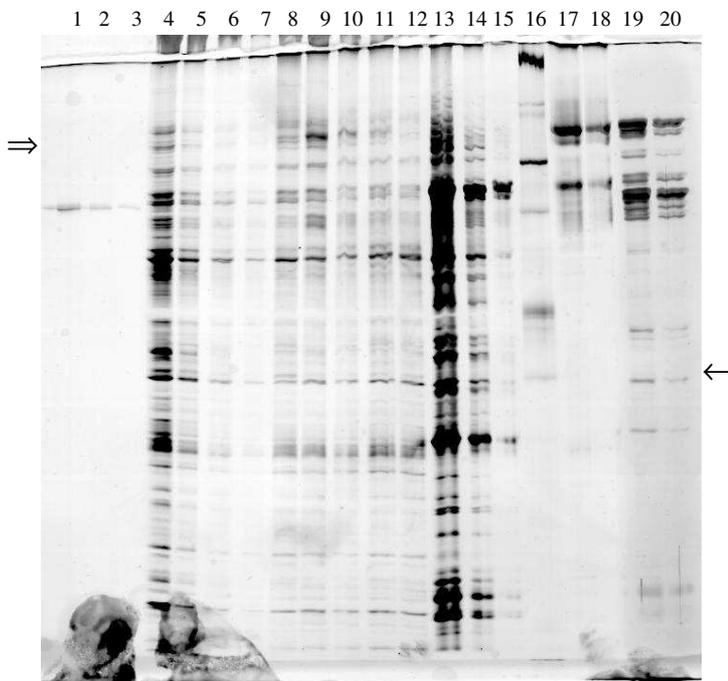


Abbildung 25: Expression von rekombinantem Arabidopsis-Fibrillarlin

Protein-SDS-PAGE, Trenngel 12 % (29:1), silbergefärbt

- 1-3:** 100, 31 und 10 ng BSA
- 4-7:** 40, 13, 4 und 1.3 µl Bakt.-kultur vor Induktion
- 8+11:** 6 µl Überstand induzierter Bakterienkultur nach Sonifikation und Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation
- 9-10:** 6 und 3 µl Bakt.-kultur nach Induktion mit 0.4 mM IPTG für 5 Stunden bei RT die Laufweite eines induzierten Proteins wird durch den Doppelpfeil am linken Rand des Gels angezeigt
- 12:** Durchfluß der Affinitätschromatographie entsprechend 6 µl Kultur
- 13-15:** durch Acetonfällung aufkonzentriertes Eluat der Affinitätschromatographie (Verdünnungsreihe)
- 16:** Molekulargewichtsstandard mit Proteinen der Größe 31 (Pfeil rechts), 37, 55, 66, 97 und 116 und 205 kDa
- 17-18:** Mittels Chitin-Affinitätschromatographie aufgereinigte Proteine vor Induktion der Inteinspaltung durch DTT
- 19-20:** wie Spur 17 und 18, jedoch nach Induktion der Inteinspaltung mittels DTT

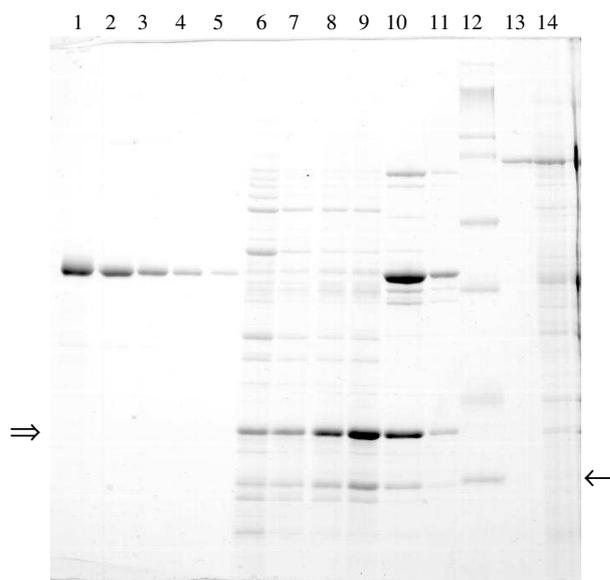
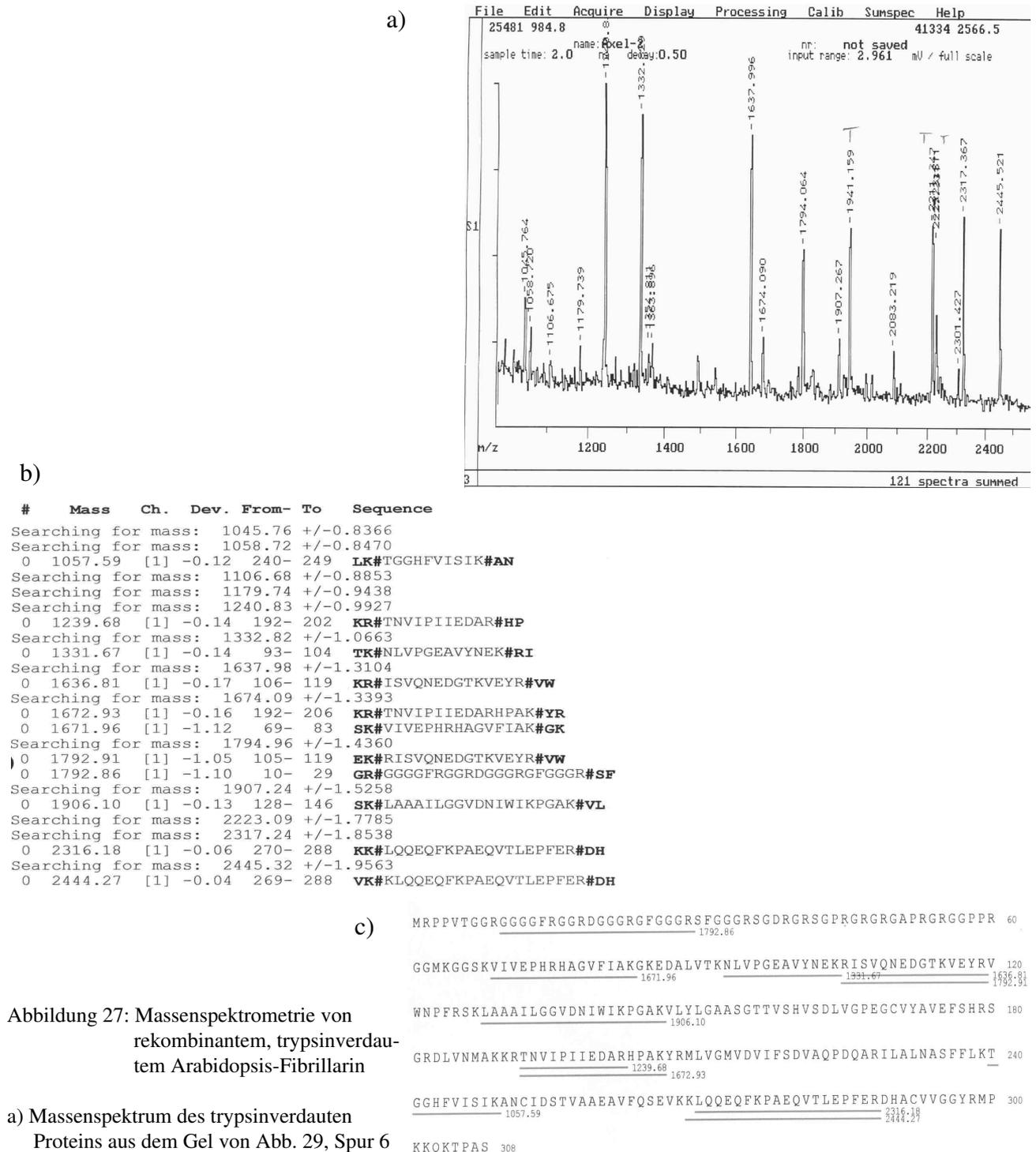


Abbildung 26: Aufreinigung von rekombinantem Arabidopsis-Fibrillarlin

Protein-SDS-PAGE, Trenngel 9.5 % (29:1), gefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blue

- 1-5:** 2, 1, 0.5, 0.25 und 0.125 µg BSA
- 6-9:** durch Acetonfällung aufkonzentrierte Fibrillarlin-Eluate vom 4., 5., 6. bzw. 9.12.2002 (Doppelpfeil links weist auf Fibrillarlin)
- 10-11:** 7 µl bzw. 1 µl Chromatographiematrix („Chitin-beads“), mit Auftragspuffer denaturiert
- 12:** Molekulargewichtsstandard mit Proteinen der Größe 31 (Pfeil rechts), 37, 55, 66, 97 und 116 kDa
- 13:** Nukleolin-Eluat der Affinitätschromatographie
- 14:** 10 µl Bakterienkultur nach Induktion mit 0.4 mM IPTG für 15 Stunden bei 15° C (Nukleolin-Expression)

Molekulargewicht dieser schließlich klar dominierenden Bande liegt bei 34 kDa, daß tatsächliche Molekulargewicht der Arabidopsis-Fibrillarinsequenz bei 33 kDa. Die Identität der 34 kDa-Bande als Arabidopsis-Fibrillarlin konnte durch eine von Sabine Metzger durchgeführte Trypsin-Verdauung und anschließende Analyse der entstandenen Fragmente mittels Massenspektrometrie klar bestätigt werden (Abb. 27, s. auch Abb. 29, Spur 6). Das Protein scheint nach Abspaltung vom



Chitin-Intein-Tag größtenteils unlöslich zu werden. So ist zu erklären, daß auch nach mehrmaliger Elution noch immer viel Fibrillarin auf der Säulenmatrix verbleibt (Abb. 26, Spur 10 und 11). Es wurde versucht, den Anteil an löslichem Protein durch Austausch des NaCl gegen das „physiologischere“ KCl zu erhöhen. Dabei wurde außerdem der pH-Wert auf 6.0 abgesenkt. Bei diesem pH-Wert weist das Arabidopsis-Fibrillarin eine geringfügig höhere, positive Ladung auf als beim pH-Wert des vormals benutzten Puffers von 8.4, was seine Löslichkeit fördern sollte. Schließlich kam bei diesem Versuch ein anderes Detergenz (Tween 20 statt Triton X-100) zum Einsatz. Die Veränderung dieser Parameter hatte jedoch keine Verbesserung der Ausbeute an Fibrillarin zur Folge. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits an Fibrillarin aus unterschiedlichen Organismen gemacht: auch rekombinantes *Trypanosoma brucei*-Fibrillarin mit einem Histidin-Tag wird bei Elution von der Affinitätsmatrix unlöslich (Dunbar *et al.* (2000)). Rekombinantes Maus-Fibrillarin wird unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt (Pearson *et al.* (1999) und Lin *et al.* (2002)) und das Homolog aus *Giardia lamblia* liegt nach Expression bei 37° C größtenteils in Inclusion-Bodies vor (Gosh *et al.* (2001)).

Im vorliegenden Fall betrug die Konzentration an Fibrillarin im Eluat maximal 8 ng/µl. Aufgrund dieser geringen Konzentration und der hohen Ionenstärke von 1 M NaCl im Eluat wurde versucht, daß Protein zu konzentrieren, um es für RNA-Bindestudien einsetzen zu können. Eine Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration in Amicon® YM30-Röhrchen führte ebenso wie eine „klassische“ Dialyse zu einem kompletten Verlust des Fibrillarins. Es liegt nahe anzunehmen, daß das Protein an der jeweiligen Dialysemembran präzipitierte. Daher wurde versucht, das Protein nativ zu fällen, um es anschließend in höherer Konzentration und in geeignetem Puffer zu lösen. Mittels PEG₆₀₀₀ konnte Fibrillarin selbst bei der relativ hohen Konzentration von 35 % nicht ausgefällt werden. Dagegen wurde es mit Ammoniumsulfat bei 57 % Sättigung vollständig präzipitiert. Anschließend konnte es durch lange Inkubation bei 4° C wieder partiell in Lösung gebracht werden, jedoch lag in dieser aufkonzentrierten Präparation wiederum eine hohe Salzkonzentration oder ein extremer pH-Wert vor. Dies wird aus den damit durchgeführten Gelverzögerungsexperimenten geschlossen, bei denen der Bromphenolblau-Farbmarker sich hellblau verfärbte, was auf einen niedrigen pH-Wert hindeutet, und sehr langsam ins Gel einlief, was durch eine hohe Ionenstärke der aufgetragenen Probe erklärt werden kann. Aus diesen Gründen wurden die betreffenden Bindestudien nicht weitergeführt, obwohl überraschenderweise eine Bindung aller untersuchten RNA-Proben bereits bei einer geringen Proteinkonzentrationen von ca. 40 nM beobachtet werden konnte (Abbildung 28). Stattdessen wurde sich auf die Experimente mit dem parallel exprimierten Arabidopsis-Nukleolin konzentriert.

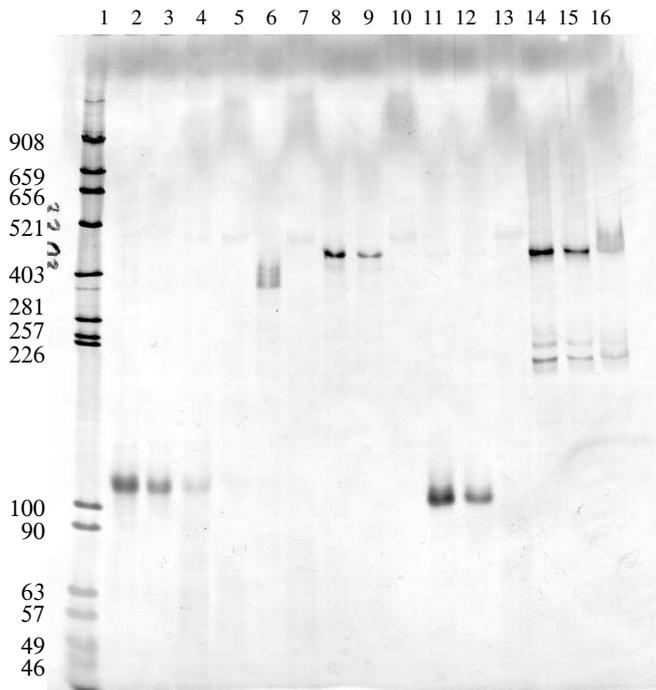


Abbildung 28: Verzögerungsgel mit Arabidopsis-Fibrillarin

Native PAGE (5 % (43:1)) mit 0.2 X Na-TAE-Puffer enthaltend 0.5 mM MgSO₄, silbergefärbt

- 1:** Plasmid pBR 322 / *AluI* mit Fragmenten der angezeigten Längen
- 2-3:** 24 ng bzw. 12 ng U14-RNA
- 4-5:** 24 ng U14-RNA + 40 bzw. 80 nM Fibrillarin
- 6-7:** 12 ng rr2-RNA + 0 bzw. 80 nM Fibrillarin
- 8-9:** 24 bzw. 12 ng (+)PSTVd-RNA
- 10:** 24 ng (+)PSTVd-RNA + 80 nM Fibrillarin
- 11-12:** 24 bzw. 12 ng 5S-RNA
- 13:** 24 ng 5S-RNA + 80 nM Fibrillarin
- 14-15:** 24 bzw. 12 ng rr1-DNA
- 16:** 24 ng rr1-DNA + 80 nM Fibrillarin

3.8.2 Arabidopsis-Nukleolin

Unter Verwendung der Primer *nuf* und *nur* konnte die in 6.2.1 gezeigte Sequenz für Arabidopsis-Nukleolin (GenBank Accession-No. AP001303, Protein Acc.-No. BAB02219) aus Arabidopsis-cDNA amplifiziert und in den Vektor pGEM-T (Promega) kloniert werden. Die Insertion in den Expressionsvektor pTYB1 und die Expression in *Escherichia coli* erfolgte wie in Abschnitt 3.8.1 für Fibrillarin beschrieben.

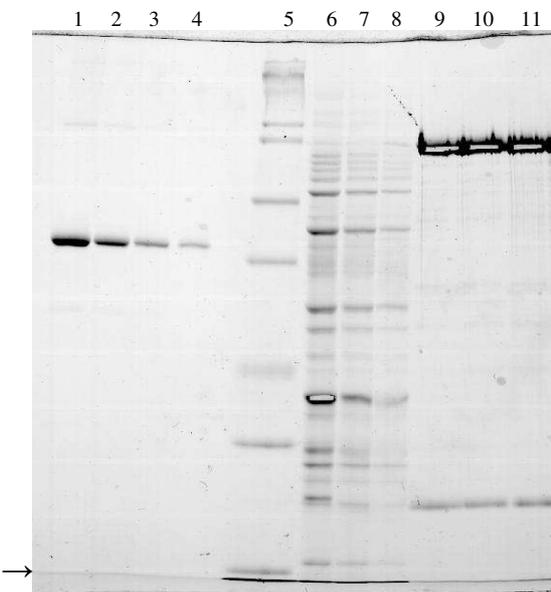


Abbildung 29: Gel vor Trypsinverdau und Massenspektrometrie

Protein-SDS-PAGE, Trenngel 10 % (29:1), gefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blue

- 1-4:** 1, 0.5, 0.25 und 0.125 µg BSA
- 5:** Molekulargewichtsstandard mit Proteinen der Größe 21 (Pfeil), 31, 37, 55, 66, 97 und 116 kDa
- 6-8:** durch Acetonfällung aufkonzentriertes Fibrillarin-Eluat vom 4.12.02, die ausgeschnittene Bande bei 34 kDa wurde von Sabine Metzger analysiert (s.Text)
- 9-11:** Nukleolin-Eluat vom 25.11.02, die ausgeschnittenen Banden bei 92 kDa wurden von Sabine Metzger analysiert (s.Text)

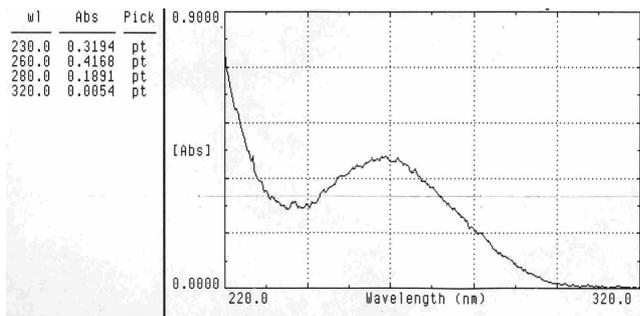


Abbildung 30: UV-Absorptionsspektrum von rekombinantem Arabidopsis-Nukleolin

Die Nukleolin-Präparation wies nach Vergleich mit einer BSA-Verdünnungsreihe in der Protein-SDS-PAGE eine Konzentration von ca. 60 ng/μl auf

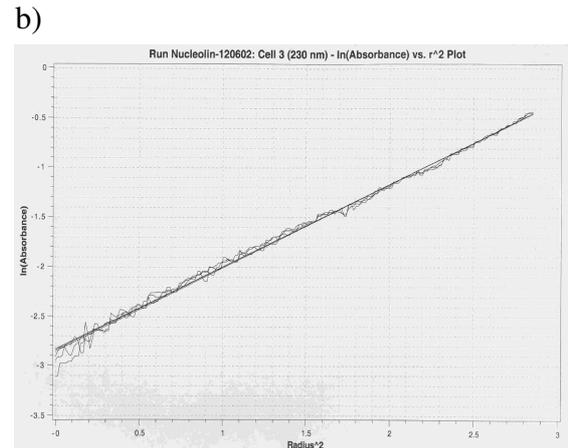
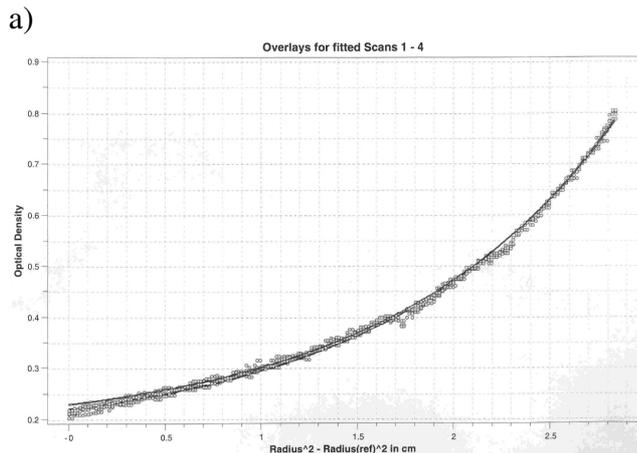


Abbildung 31: Molekulargewichtsbestimmung von rekombinantem Arabidopsis-Nukleolin in der analytischen Ultrazentrifuge

Auswertung einer Ultrazentrifugation bei 14300 rpm mit dem Programm UltrascanII 6.0 von Borries Demeler

Parameter: Dichte 0.9989 g/cm für den verwendeten Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM NaCl), Partielles spez. Vol. des Proteins 0.7115 g/cm³, Temperatur 20° C, Optische Dichte der Lösung vor der Zentrifugation 0.4 A₂₃₀

a) Auftragung der A₂₃₀ gegen das Quadrat des Radius nach Einstellung des Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichts

b) Auftragung des Logarithmus der Absorption gegen das Quadrat des Radius

Aus der Steigung der Geraden wurde mit dem Auswerteprogramm ein Molekulargewicht von 62 kDa bestimmt für das untersuchte Protein bestimmt.

Nach Aufreinigung des Fusionsproteins und DTT-induzierter Spaltung konnten im Eluat nur zwei Polypeptidketten detektiert werden: eine schwache Bande bei ca. 24 kDa und eine viel stärkere bei ca 92 kDa apparenten Molekulargewichts (Abb. 29, Spur 9-11). Dies führte zunächst zu dem Schluß, daß die Abspaltung der Chitinbindedomäne nicht ordnungsgemäß verlief, da Arabidopsis-Nukleolin ein Molekulargewicht von nur 66 kDa aufweisen sollte. Die Identität der dominierenden 92 kDa-Bande als Arabidopsis-Nukleolin kann jedoch aus folgenden Gründen als gesichert gelten:

1. Das UV-Spektrum des Eluats zeigt eine sehr geringe Absorption bei 280 nm und einen Quotienten A₂₆₀/A₂₈₀ von 2.0 (Abb. 30). Der Chitin-Intein-Tag des Fusionsproteins weist jedoch mit 22 Tyrosin- und 6 Tryptophanresten bei einer Länge von 517 Aminosäuren einen hohen Anteil an aromatischen Seitenketten auf, sodaß bei unvollständiger Abspaltung dieses Tags eine stärkere Absorption bei 280 nm zu erwarten wäre. Das beobachtete UV-Spektrum entspricht dagegen

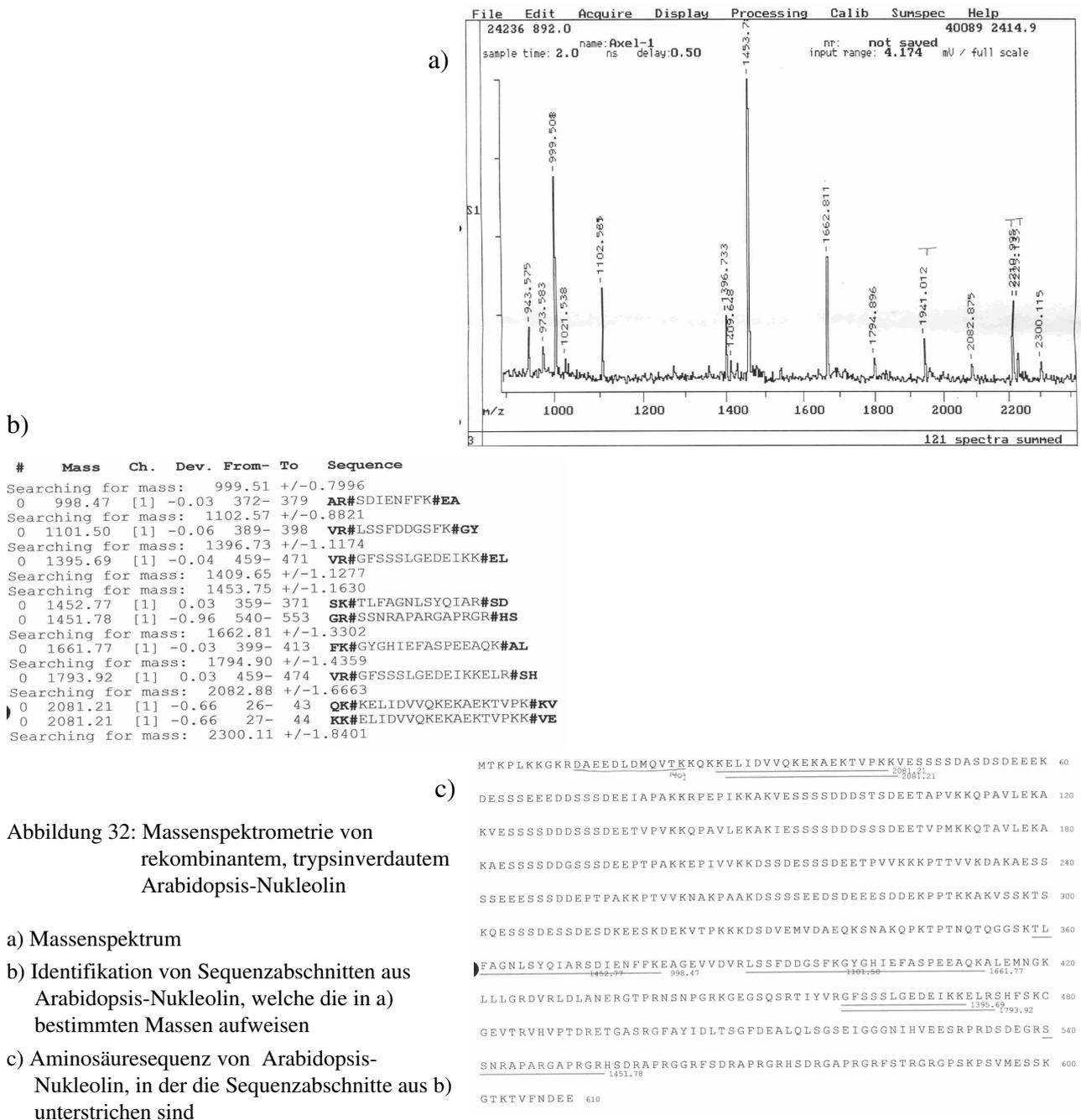


Abbildung 32: Massenspektrometrie von rekombinantem, trypsinverdaulichem Arabidopsis-Nucleolin

a) Massenspektrum

b) Identifikation von Sequenzabschnitten aus Arabidopsis-Nucleolin, welche die in a) bestimmten Massen aufweisen

c) Aminosäuresequenz von Arabidopsis-Nucleolin, in der die Sequenzabschnitte aus b) unterstrichen sind

durchaus den Erwartungen für Arabidopsis-Nucleolin, da dieses Protein mit nur 4 Tyrosin- und keinem Tryptophanrest bei einer Länge von 610 Aminosäuren eine für ein Protein unterdurchschnittliche Absorption bei 280 nm und einen relativ großen Quotienten A_{260}/A_{280} aufweisen sollte.

2. Das eluierte Protein wurde von Luitgard Nagel-Steger einem Sedimentation-Diffusions-Gleichgewichtslauf in der analytischen Ultrazentrifuge unterzogen (Abbildung 31). Dabei konnte ein Molekulargewicht von 62 kDa bestimmt werden.

3. Schließlich wurde für die 92 kDa-Bande von Sabine Metzger eine Trypsin-Verdauung mit anschließender massenspektrometrischer Analyse durchgeführt. Dabei konnten mehrere Sequenzabschnitte von Arabidopsis-Nucleolin detektiert werden. Trypsinfragmente des Chitin-Intein-Tags

traten dagegen nicht auf (Abbildung 32).

Diese Ergebnisse belegen, daß Arabidopsis-Nukleolin im SDS-Proteingel ein anormales, verzögertes Laufverhalten aufweist. Diese Eigenschaft zeigen auch die Nukleolin-Homologe aus Hamster (Lapeyre *et al.* (1987)), *Xenopus* (Caizergues-Ferrer *et al.* (1989)) und Erbse (Tong *et al.* (1997)). Sie wird auf die negative Nettoladung der N-terminalen Hälfte dieser Proteine zurückgeführt. Es bleibt zu erwähnen, daß das Fusionsprotein größtenteils bereits in den Bakteriezellen gespalten wurde. Dies ist aus einem Vergleich der Spuren 13 und 14 in Abb. 26 ersichtlich: in ersterer ist das aufgereinigte Protein, in letzterer ein Aliquot der exprimierenden *E.coli*-Kultur aufgetragen. Die prominenteste Bande im Zellaufschluß läuft auf derselben Höhe wie das bereits abgespaltene Nukleolin im Eluat. Diese Spaltung *in vivo* ist laut dem Hersteller des pTYB-Expressionssystems dann zu erwarten, wenn die Sequenz des eingefügten Proteins auf Glutaminsäure, Asparaginsäure, Histidin oder Arginin endet. Die C-terminale Aminosäure von Arabidopsis-Nukleolin ist Glutaminsäure. Wie aus Spur 14 in Abb. 26 ersichtlich ist, wird das rekombinante Protein jedoch in außerordentlich großer Menge translatiert. Daher führt der geringe Anteil an nach dem Zellaufschluss noch nicht gespaltenem Fusionsprotein zu einer immer noch guten Ausbeute von ca. 10 mg aufgereinigtem Protein je Liter Bakterienkultur. Um weitere Selbstspaltung zumindest im Verlaufe des Zellaufschlusses zu unterdrücken, wurde dieser mit Puffern vom pH 6.0 durchgeführt, da bei leicht saurem pH-Wert die Inteinspaltung nach Angaben des Herstellers mit sehr geringer Effizienz abläuft.

Durch Ultrazentrifugation in Amicon® YM30-Röhrchen wurde das Nukleolin schließlich aufkonzentriert und die Zusammensetzung des Puffers verändert. Eine erste Präparation wurde so auf 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM NaCl, 2 mM DTT eingestellt. Mit diesem Protein wurden Verzögerungsgelelektrophoresen durchgeführt, wobei bereits eine spezifische Bindung an die 5'-ETS-Sequenz der rRNA von *Arabidopsis thaliana* (s. Abschn. 3.9) festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis war jedoch nicht zufriedenstellend reproduzierbar, außerdem konnte diese Bindung durch einen Überschuß an tRNA kompetitiert werden. PSTVd-RNA wurde von dem Protein bis zu einer Konzentration von 13 µM nicht gebunden. Konsistentere Ergebnisse wurden schließlich mit einer Nukleolin-Präparation erzielt, die mittels Ultrafiltration stufenweise auf 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM KCl, 7 mM DTT eingestellt worden war. Durch die Ultrafiltration des Eluats - mit einem Ausschlußgewicht der Membran von 30 kDa - nahm der Anteil des 24 kDa-Proteins (vgl. Abb. 29, Spur 9-11) noch weiter ab. Das aufkonzentrierte Eluat wurde mit Glycerin zu einer Konzentration von 30 % versetzt. Die Bestimmung der Konzentration an Nukleolin erfolgte zum einen durch Beurteilung der Bandenintensität in einer mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbten

Protein-SDS-PAGE, zum anderen mit Hilfe des Bradford-Assays, wobei in beiden Fällen Verdünnungsreihen von BSA als Referenz dienten. Beide Methoden ergaben eine Nukleolin-Konzentration von $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, was bei einem Molekulargewicht von 66 kDa $76 \mu\text{M}$ entspricht.

3.9 Identifikation durch pflanzliches Nukleolin gebundener RNA-Bereiche

Letztlich sollte untersucht werden, ob das Nukleolin aus *Arabidopsis* eine nennenswerte Affinität zur PSTVd-RNA aufweist. Zu diesem Zweck mußte zunächst überprüft werden, ob das rekombinante Protein hinsichtlich seiner RNA-Bindeeigenschaften funktionell ist, d.h. sein natürliches „Substrat“ erkennt.

Letzteres ist bislang jedoch bei Pflanzen noch unbekannt. Für Nukleolin aus Wirbeltieren konnte die Arbeitsgruppe von Bouvet zeigen, daß das Protein mehrere Stellen am Beginn der prä-rRNA erkennt, und daß es sich dabei um Haarnadelschleifen mit konservierter Loop-Sequenz handelt (Ghisolfi-Nieto *et al.* (1996)). Dieselbe Arbeitsgruppe identifizierte später als weiteres Bindemotiv die Sequenz GAUCGAGUGUGG (Ginisty *et al.* (2000)), von der nicht bekannt ist, in welchem strukturellen Kontext sie vorliegt, wohl aber, daß sie 6 Nukleotide downstream der ersten Prozessierungsstelle in der prä-rRNA beginnt. Die Bindung von Nukleolin an diesen Sequenzabschnitt ist notwendig, damit der Schnitt an dieser Stelle erfolgen kann. Beide Bindemotive befinden sich somit im 5' External Transcribed Spacer (5' ETS) der prä-rRNA. Die Sequenz des 5' ETS variiert bereits zwischen nahe verwandten Organismen sehr stark. Außerdem ist auch das Protein Nukleolin zwischen Pflanzen und Tieren nicht hochkonserviert - das pflanzliche besitzt sogar nur zwei, das tierische dagegen vier RNA-Bindemotive. Aus diesen Gründen wurde davon ausgegangen, daß auch die vom Nukleolin erkannten RNA-Strukturen zwischen diesen beiden Gruppen differieren. Wahrscheinlich ist jedoch, daß die Funktion des Nukleolins in beiden Organismengruppen eine ähnliche ist. Dies würde bedeuten, daß das Protein auch in Pflanzen Bindestellen am Anfang der prä-rRNA und im Bereich der ersten Prozessierungsstelle dieses Moleküls aufweisen sollte.

Doelling und Kollegen (1993, 1995) identifizierten den Transkriptionsstartpunkt der prä-rRNA-Synthese in *Arabidopsis thaliana*. Er liegt 1837 Nukleotide upstream des Beginns der 18 S rRNA. Die ersten 343 Nukleotide dieses 5' ETS wurden als eine erste Positivkontrolle für die Nukleolin-Bindestudien ausgewählt. Im folgenden wird diese RNA als rr1 bezeichnet (s. Abb. 33).

Die erste Prozessierungsstelle in der prä-rRNA ist in *Arabidopsis thaliana* noch nicht bekannt, wurde jedoch im verwandten Kreuzblütler *Raphanus sativa* (Rettich) experimentell bestimmt (Delcasso-Tremousaygue *et al.* (1988), Echeverria *et al.* (1994)). Demnach umfasst der 5' ETS beim Rettich nur 740 Nukleotide und wird an Position 186 ein erstes Mal gespalten. Ein Sequenzvergleich der 5' ETS von *Arabidopsis* und *Raphanus* mit dem Programm *BLAST* liefert ein interessantes Ergebnis: demnach ist die Sequenz des ETS ab der *Raphanus*-Prozessierungsstelle zwischen beiden Organismen konserviert - sie weist hier eine Identität von 75 % auf. Es liegt daher

nahe, für die Arabidopsis prä-rRNA eine erste Prozessierungsstelle bei Nukleotid 1280 zu postulieren - der zum Raphanus-“Prozessierungsnukleotid“ äquivalenten Position. Folglich wurde die RNA-Sequenz um diese putative Spaltstelle herum als zweite Positivkontrolle ausgewählt, und zwar der Bereich zwischen Nukleotid 1136 und 1476 des Arabidopsis 5' ETS. Diese RNA hat somit eine zu rr1 ähnliche Länge von 341 Nukleotiden und wird im folgenden als rr2 bezeichnet (Abbildung 33). Zur Herstellung der rr1- und rr2-RNAs wurden zunächst Zellkerne aus Arabidopsis -Pflanzen isoliert, aus diesen die DNA präpariert und letztere als Template zur PCR-Amplifikation mit den Primern *rr1f* und *rr1r* bzw. *rr2f* und *rr2r* eingesetzt. *rr1f* und *rr2f* enthalten 5' seits der Arabidopsis rDNA-Basenabfolge die Sequenz des Promotors für die RNA-Polymerase des Phagen T7. Die PCR-Produkte konnten folglich direkt zur *in vitro*-Transkription eingesetzt werden, aus welcher die RNAs rr1 und rr2 resultierten.

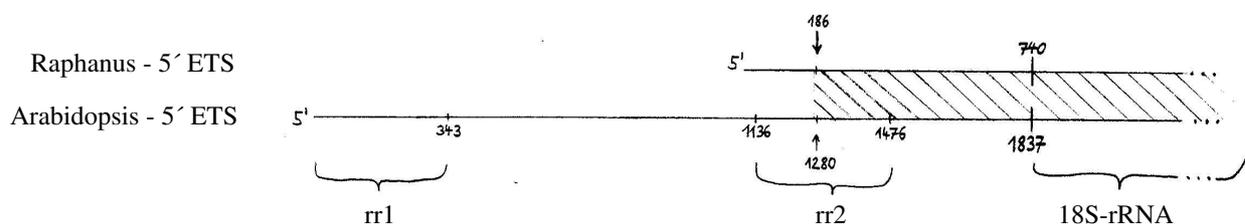


Abbildung 33: Auswahl der Positivkontrollen rr1 und rr2 für Verzögerungsgele mit Arabidopsis-Nukleolin

Der 5' External Transcribed Spacer (5' ETS) der prä-rRNA umfasst 740 nt im Rettich (*Raphanus sativa*) und 1837 nt in *Arabidopsis thaliana*. Der durch Schrägstriche markierte Bereich ist zwischen beiden Pflanzen konserviert. Für *Raphanus sativa* ist die Lage der ersten Prozessierungsstelle in der prä-rRNA bekannt (Pos. 186).

Die Positivkontrolle rr2 ist ein Transkript, welches einen Bereich von 341 nt um die äquivalente Position 1280 im Arabidopsis 5' ETS repräsentiert.

Die Positivkontrolle rr1 umfasst den Bereich vom Beginn der Arabidopsis prä-rRNA bis zur Position 343.

3.10 Verzögerungsgelelektrophorese mit Arabidopsis-Nukleolin

Die Dissoziationskonstanten für Komplexe, die Nukleolin mit verschiedenen Nukleinsäuren ausbildet, wurden mit der Methode der Verzögerungsgelelektrophorese bestimmt. Das Prinzip dieses Verfahrens wurde unter 3.5 bereits erläutert. Folgende Nukleinsäuren wurden hinsichtlich ihrer Affinität zu Arabidopsis-Nukleolin untersucht:

- rr1-RNA (23 nM, *in vitro*-Transkript vom PCR-Produkt)
- rr2-RNA (23 nM, *in vitro*-Transkript vom PCR-Produkt)
- 7S-RNA aus Tomate (26 nM, durch Gelelution aufgereinigt)
- zirkuläre (+)PSTVd-RNA der Isolate 23 (Mild), 26 (Intermediate) und 48 (Lethal) (je 22 nM)
- (-)PSTVd-RNA, *in vitro*-Transkript vom *EcoRI*-gedauten Plasmid pRH714 (22 nM)
- dsRNA mit PSTVd-Sequenz (vgl. 3.5) (11 nM)

- dsDNA verschiedener Sequenz:

- das Template für die rr1-Transkription (11 nM)
- das Template für die rr2-Transkription (11 nM)
- Promotorbereich des Rbcs2-Gens aus Tomate mit zentral gelegener TATA-Box
- PSTVd-cDNA

Es wurden je 13 ng Nukleinsäure mit dem Protein inkubiert, was in einem Reaktionsvolumen von 5 µl die in Klammern angegebenen Nukleinsäurekonzentrationen ergibt. Da minimal 83 ng Nukleolin eingesetzt wurden, was in selbigem Volumen 250 nM entspricht, war in jedem Fall ein wenigstens 10facher, molarer Überschuß an Protein gewährleistet. Jeder Proteinkonzentrationsreihe der in Abbildung 34 gezeigten Verzögerungsgele ist eine Spur vorangestellt, in welcher die halbe Menge (je 6.5 ng) der betreffenden Nukleinsäure ohne Protein aufgetragen wurde. Anhand dieser Referenz wurde jeweils die Proteinkonzentration bestimmt, bei welcher die Menge an freier Nukleinsäure auf die Hälfte abgenommen hatte. Diese Proteinkonzentration entspricht näherungsweise der Dissoziationskonstanten für die Reaktion der jeweiligen Nukleinsäure mit Nukleolin (s. 3.5). Diese Dissoziationskonstanten wurden für die RNAs rr1, rr2, 7S, (+)PSTVd und dsRNA auch in Anwesenheit von 1.7 µM tRNA bestimmt. Für die putativen Positivkontrollen rr1 und rr2 wurde außerdem untersucht, ob die Bindung durch Zugabe von Heparin zu einer Konzentration von 20 ng/µl bzw. von dem dsDNA-Analog poly(dIdC) zu einer Konzentration von 50 ng/µl kompetitierbar war. Die ermittelten Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Bindung von Arabidopsis-Nukleolin an verschiedene Nukleinsäuren

Bei allen Proben außer der letzten Spalte handelt es sich um RNAs.

Die Dissoziationskonstanten (K_D) sind in µM angegeben

n. b. : nicht bestimmt; n. g.: nicht gezeigt

Probe	rr1	rr2	7S	(-)PSTVd	(+)PSTVd	dsRNA	dsDNA
K_D ohne Kompetitor	≤ 0.5 Abb. 34 Spur 3, 25, 44	≤ 0.5 Abb. 34 Spur 76	≤ 1 Abb. 34 Spur 52	~ 3 Abb. 34 Spur 55/56	4 Abb. 34 Spur 31, 35, 39	~ 10 Abb. 34 Spur 80/81	~ 3 Abb. 34 Spur 61/62, 69/70
K_D in Gegenwart von 1.7 µM tRNA	≤ 0.85 Abb. 34 Spur 5	≤ 0.85 n. g.	~ 2.6 Abb. 34 Spur 14/15	n. b.	~ 10 Abb. 34 Spur 11	> 15 Abb. 34 Spur 20	n. b.
Kompetition durch 20 ng/µl Heparin	n. b.	ja n. g.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Kompetition durch 50 ng/µl poly(dIdC)	nein Abb. 34 Spur 4	nein n. g.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.	n. b.
Anzahl sichtbarer Komplexe	3 Abb. 34 Spur 3, 25,	2 Abb. 34 Spur 49, 76	0	0	0	0	0

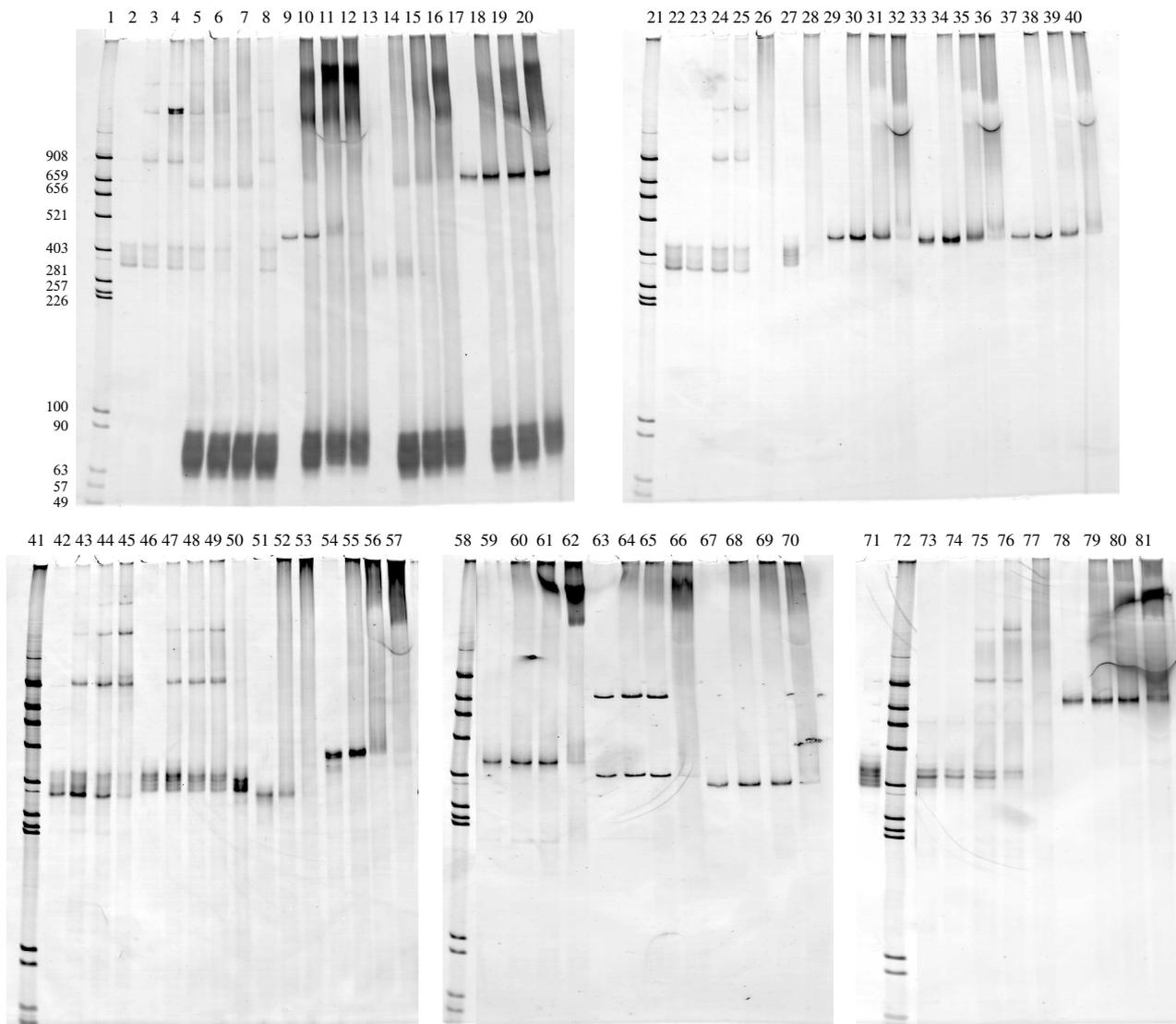


Abbildung 34: Analyse der Affinität von Arabidopsis-Nukleolin zu verschiedenen Nucleinsäuren

Native PAGEs (5 % (43:1)), 0.2 X Na-TA enthaltend 0.5 mM MgSO₄, 7° C, silbergefärbt

- 1, 21, 41, 58, 72:** Plasmid pBR322, verdaut mit AluI, Fragmente der Länge 908, 659, 656, 521, 403, 281, 257, 226, 100, 90, 63, 57 und 49 bp
- 2:** 6 ng rr1-RNA, **3-6+8:** 12 ng rr1-RNA, **3+4:** + 0.5 µM Nukl., **4:** + 50 ng/µl poly(dIdC), **5-8:** + 40 ng/µl tRNA, **5:** + 0.85 µM Nukl., **6-8:** + 1.7 µM Nukl., **8:** nach Vorinkubation EtOH-gefällt
- 9:** 6 ng (+)PSTVd-RNA, **10-11:** 12 ng (+)PSTVd-RNA, **10:** + 6.8 µM Nukl., **11+12:** +15 µM Nukl. + 40 ng/µl tRNA
- 13:** 6 ng 7S-RNA, **14-16:** 12 ng 7S-RNA + 40 ng/µl tRNA, **14:** + 1.7 µM, **15:** + 3.4 µM, **16:** + 6.8 µM Nukl.
- 17:** 6 ng dsRNA, **18-20:** 12 ng dsRNA + 40 ng/µl tRNA, **18:** + 3.4 µM, **19:** + 6.8 µM, **20:** + 15 µM Nukl.
- 22:** 12 ng rr1-RNA, **23:** 6 ng rr1-RNA, **24-26:** 12 ng rr1-RNA, **24:** + 0.25 µM, **25:** + 0.5 µM, **26:** + 1 µM Nukl.
- 27:** 6 ng rr2-RNA, **28:** 12 ng rr2-RNA + 1 µM Nukl
- 29:** 6 ng (+)PSTVd-RNA (Mild), **30-32:** 12 ng (+)PSTVd-RNA (Mild), **30:** + 2 µM, **31:** + 4 µM, **32:** + 8 µM Nukl.
- 33-36:** wie **29-32**, jedoch (+)PSTVd-RNA (Intermediate), **37-40:** wie **29-32**, jedoch (+)PSTVd-RNA (Lethal)
- 42:** 6 ng rr1-RNA, **43-45:** 12 ng rr1-RNA, **43:** + 0.25 µM, **44:** + 0.5 µM, **45:** + 0.75 µM Nukl.
- 46:** 6 ng rr2-RNA, **47-50:** 12 ng rr2-RNA, **47:** + 0.5 µM, **48:** + 0.75 µM, **49+50:** + 1 µM Nukl., **50:** nach Vorinkubation hitzedenaturiert und EtOH-gefällt
- 51:** 6 ng 7S-RNA, **52+53:** 12 ng 7S-RNA, **52:** + 1 µM, **53:** + 2 µM Nukl.
- 54:** 6 ng (-)PSTVd-RNA, **55-57:** 12 ng (-)PSTVd-RNA, **55:** + 2 µM, **56:** + 4 µM, **57:** + 8 µM Nukl.
- 59:** 6 ng rr1-DNA, **60-62:** 12 ng rr1-DNA, **60:** + 1 µM, **61:** + 2 µM, **62:** + 4 µM Nukl.
- 63-66:** wie **59-62**, jedoch PSTVd-cDNA, **67-70:** wie **59-62**, jedoch rr2-DNA
- 71, 73, 75-77:** 12 ng rr2-RNA, **74:** 6 ng rr2-RNA, **75:** + 0.25 µM, **76:** + 0.5 µM, **77:** + 1 µM Nukl.
- 78:** 6 ng dsRNA, **79-81:** 12 ng dsRNA, **79:** + 3.3 µM, **80:** + 6.6 µM, **81:** + 13 µM Nukl.

Da die drei untersuchten Sequenzvarianten der zirkulären (+)PSTVd-RNA einerseits und insgesamt vier verschiedene dsDNA-Sequenzen andererseits je gleiche Affinität zum Protein zeigten, sind die Ergebnisse in der Tabelle in nur je einer Spalte zusammengefasst.

Tatächlich weist Nukleolin zu den putativen Positivkontrollen rr1 und rr2 die höchste Affinität auf ($K_D \leq 0.5 \mu\text{M}$). Im Vergleich zu diesen RNAs muß für 7S-RNA die doppelte, für (-)PSTVd-RNA und dsDNA die sechsfache, für (+)PSTVd-RNA die achtfache und für dsRNA die zwanzigfache Menge an Nukleolin zugegeben werden, um Halbbindung der Nukleinsäure zu erreichen.

Bemerkenswert ist das Auftreten mehrerer Komplexbanden für die rRNA-Fragmente (Abb. 34, Spur 45 und 76). Diese Beobachtung legt nahe, daß auf den ersten 343 Nukleotiden der prä-rRNA von Arabidopsis drei und im Bereich von 341 Nukleotiden um die putative Prozessierungsposition herum zwei Bindestellen für dieses Protein vorliegen. Bei hohen Nukleolinkonzentrationen verschwinden die Komplexbanden von rr1 und rr2 zugunsten eines stark verzögerten „Schmiere“ (Abb. 34, Spur 26 und 77). Dies könnte auf eine Selbstassoziation der Nukleolin-Moleküle zurückzuführen sein, wie sie von Sapp und Kollegen (1986) beschrieben wurde.

Ghisolfi-Nieto und Kollegen konnten 1996 mittels Gold-gekoppelter Antikörper und Elektronenmikroskopie zeigen, daß Nukleolin bereits mit kurzen rRNA-Transkripten assoziiert ist. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit vermutet, daß auf der rRNA Strukturen erkannt werden, die sich *in vivo* während der rRNA-Transkription transient ausbilden. Aus diesem Grunde wurden die rr1- und rr2-RNAs, aber auch die 7S- und die (-)PSTVd-RNA durch Denaturierung und blitzartiges Abkühlen vorbehandelt, da unter diesen Bedingungen kinetisch bevorzugte Strukturelemente ausgebildet werden, die denen gleichen könnten, die sich während der Synthese der RNA ausbilden. Diese Behandlung führte jedoch bei der rr2-RNA nicht stets zum gleichen Ergebnis: zwar wurden stets zwei Komplexe mit Nukleolin beobachtet, jedoch lag die für Halbbindung der RNA erforderliche Menge an Nukleolin bisweilen bei $1 \mu\text{M}$ (Abb. 34, Spur 49). Die betreffende rr2-Präparation wurde in Spur 71 einer solchen gegenübergestellt, die Halbbindung bei $\leq 0.5 \mu\text{M}$ Nukleolin aufwies (Spur 73). Deutlich ist zu erkennen, daß die schlechter gebundene Präparation aus vier diskreten Banden, die besser gebundene dagegen aus einer dominierenden Bande besteht. Es ist daher davon auszugehen, daß erstere ein Ensemble verschiedener Strukturen beinhaltet, von denen nur eine Subpopulation mit hoher Affinität von dem Protein gebunden wird.

Interessanterweise bindet Nukleolin die 7S-RNA ($K_D \leq 1 \mu\text{M}$) nur geringfügig schwächer als die rRNA. Eine ähnlich hohe Affinität des Nukleolins zur tRNA könnte erklären, warum beim Einsatz dieses Kompetitors auch für die Positivkontrollen rr1 und rr2 eine Erhöhung der eingesetzten Menge an Nukleolin erforderlich ist, um Halbbindung zu gewährleisten: eine Dissoziationskon-

stante von 1 μM würde bei eingesetzten Konzentrationen von 1.7 μM tRNA und 0.5 μM Nukleolin bedeuten, daß nurmehr 0.21 μM Nukleolin frei - d.h. zur Bindung an das eigentliche Bindetarget - vorliegen. Bei eingesetzten 1 μM Nukleolin lägen dagegen wieder 0.46 μM des Proteins frei vor. Heparin unterdrückt die Bindung des Nukleolins an die RNA vollständig, das dsDNA-Analog poly(dIdC) beeinflusst sie dagegen nicht. Letzteres kann mit der geringen Affinität von dsDNA zum Nukleolin erklärt werden ($K_D \sim 3 \mu\text{M}$).

Noch geringer fällt die Affinität des Proteins zur PSTVd-RNA aus ($K_D \sim 4 \mu\text{M}$). Die (+)PSTVd-RNA wurde vorher keiner kinetischen Struktureinstellung unterzogen, da das Viroid im Nukleolus wahrscheinlich in seiner thermodynamisch günstigsten Konformation akkumuliert. Die Zwischenstellung der Viroid-RNA bezüglich einer Wechselwirkung mit Nukleolin hat gewisse Parallelen hinsichtlich ihrer räumlichen Struktur: die strukturierte 7S-RNA wird vom Nukleolin relativ stark, durchgängig basengepaarte dsRNA dagegen sehr schwach gebunden ($K_D \sim 10 \mu\text{M}$). Die Viroid-RNA ist unverzweigt und gewährleistet ein hohes Maß an Basenpaarung, ohne den Zustand einer durchgängigen Doppelhelix zu erreichen. Die verwendete (-)PSTVd-Sequenz wiederum weist im Gegensatz zur zirkulären (+)PSTVd-RNA kurze, überhängende Enden auf, was nach obiger Argumentation die etwas höhere Affinität ($K_D \sim 3 \mu\text{M}$) des Proteins zu diesem *in vitro*-Transkript erklären könnte.

Abschließend bleibt zu erwähnen, daß die Denaturierung eines Komplexes aus dem rekombinanten Arabidopsis-Nukleolin und der rr1-RNA durch Erhitzung und anschließende Fällung mittels Ethanol die Nukleinsäure unbeschadet wieder freisetzt (Abb. 34, Spur 50). Damit ist ausgeschlossen, daß die beobachtete Abnahme der freien Nukleinsäurebanden in den Verzögerungsgelen auf eine RNase-Aktivität in der Proteinpräparation zurückzuführen wäre. Bemerkenswert ist, daß die Komplexe aus diesen beiden Bindepartnern eine Fällung mit Ethanol ohne vorherige Hitzedenaturierung teilweise überstehen (Abb. 34, Spur 8).

3.11 Sequenzanalyse von PSTVd-RNA

Im Verlaufe der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Nachtschattengewächse mit PSTVd infiziert. Neben unterschiedlichen Varietäten der Tomate waren dies:

- *Cyphomandra spec.* (Tomatenbaum)
- *Scopolia carniolica* bzw. *lurida* (Tollkraut)
- *Solanum nigrum* (schwarzer Nachtschatten)
- *Solanum dulcamarae* (bittersüßer Nachtschatten).

All diese Pflanzen zeigten keine erkennbaren Krankheitssymptome. *Cyphomandra* und *Solanum nigrum* wurden mit mehreren Sequenzvarianten unterschiedlicher Pathogenität infiziert und auf ihren Gehalt an PSTVd-RNA hin untersucht. Dabei wurden stets wie in der Tomate Mengen von 0.3-1 ng Viroid-RNA pro Milligramm Blatt festgestellt, was circa 1 ‰ der isolierbaren Nukleinsäure entspricht. Für die verschiedenen Sequenzvarianten von PSTVd gab es dabei keinen erkennbaren Zusammenhang zwischen ihrer Pathogenität in der Rutgers-Tomate und dem Titer, zu dem sie in den verschiedenen Pflanzen repliziert wurden.

3.11.1 Alte und neue Sequenzvarianten von PSTVd

Einzelne Individuen der oben genannten Pflanzen wurden in infiziertem Zustand über Monate oder Jahre kultiviert. Um die Pathogenität der jeweiligen PSTVd-RNA zu überprüfen, wurde diese schließlich aus den Pflanzen präpariert und in je 2 Rutgers-Tomaten inokuliert. Eine der beiden Tomatenpflanzen wurde jeweils mit ca 0.5 ng, die andere mit 5 ng zirkulärer PSTVd-RNA infiziert. Es resultierten Krankheitssymptome aller Schweregrade. Nach 4 Wochen wurde aus allen Pflanzen die Viroid-RNA isoliert und mittels RT-PCR in doppelsträngige DNA überführt, worauf sich die Sequenzierung der letzteren anschloß. Abbildung 35 zeigt Photographien der verschiedenen Tomatenpflanzen sowie die Abweichungen der in ihnen replizierten Viroid-RNA gegenüber der Referenzsequenz PSTVd 1 (Gross *et al.* (1978)). Außerdem ist in Abbildung 35 vermerkt, mit welchem PSTVd-Isolat die Pflanzen infiziert worden waren. Für jede Sequenzvariante wurde die thermodynamisch optimale Sekundärstruktur mit dem Programm M-Fold (Zuker (2003)) berechnet. Die freien Energien dieser optimalen Strukturen sowie das jeweilige Basenpaarungsmuster im Bereich der VM-Region sind ebenfalls in der Abbildung dargestellt. Die Sequenzen von acht der PSTVd-Isolate (Pflanze 1, 3, 5, 6, 9, 16, 17 und 18, in der Abbildung grün umrandet) wurden durch eine zweite RT-PCR mit einem anderen Primerpaar überprüft, was in jedem Fall die zuerst erhaltene Sequenz bestätigte. Die Ergebnisse der Untersuchung können wie folgt zusammengefaßt werden:



Pflanze Nr.	1	4	8	13	20	7	5	15	19	3	17	14	11	12	6	9	18	10	16
Sequenzunterschiede gegenüber PSTVd 1 (GenBank-Acc.-No. V01465) :	+A _{60a} +U _{302a}	nicht lesbar	keine	keine	G ₄₆ →C C ₄₇ →A -A ₆₀ (z.T.) 309 U+A U ₃₁₇ →C(U)	keine	G ₄₆ →C C ₄₇ →A	G ₄₆ →C C ₄₇ →U	G ₄₆ →C C ₄₇ →A -A ₆₀ U ₃₀₉ →A U ₃₁₇ →C	G ₄₆ →C C ₄₇ →A C ₁₆₆ →A U ₁₉₄ →C C ₁₉₆ →U U ₃₀₉ →A U ₃₁₇ →C	G ₄₆ →C C ₄₇ →A (-A ₆₀) U ₃₁₇ →C	keine ganz schwach G ₄₆ →C C ₄₇ →U U ₃₁₃ →A	G ₄₆ →C C ₄₇ →U U ₃₁₃ →A U ₃₁₇ →C	wie 11	wie 5	wie 11	G ₄₆ →C C ₄₇ →A -A ₆₀ U ₃₁₇ →C	G ₄₆ →C C ₄₇ →U U ₃₁₃ →A U ₃₁₇ →C	G ₄₆ →C C ₄₇ →U +C _{148a} C ₁₆₇ →A (T) U ₃₀₉ →A(U) U ₃₁₃ →A U ₃₁₇ →C
Name der Sequenz:	QFA			PSTVd1	PSTVd1	PSTVd1	M3/M1	Neu	Neu	Neu	RG1 (ohne -A ₆₀)						Neu	Neu	Neu
Freie Energie der PSTVd-RNA (kcal/mol):	-160.5			-160.7			-158.1	-154.2	-156.1	-156.9	-157.2						-156.8	-157.6	-157.3
Pflanze war infiziert worden mit:	Isolat 23 („Mild“) Gemisch enthaltend +A _{60a} +U _{302a}	Durch <i>Solan. dulcam.</i> (13 Monate), anschl. durch <i>Scopolia carn.</i> (14 Monate) passagiertes M1: G ₄₆ →C C ₄₇ →A	Durch <i>Scopolia lurida</i> (17 Monate) passagiertes 310 G: A ₃₁₀ →G	Durch <i>Solanum dulcamarae</i> (30 Monate) passagiertes 310 G: A ₃₁₀ →G	Variante 6-800: G ₄₆ →C C ₄₇ →A -A ₆₀ U ₃₀₉ →A U ₃₁₇ →C entstanden aus M1, passagiert durch <i>Solanum dulcamarae</i> (13 Monate)	wie 8	Isolat 26 („Intermediate“) Gemisch nicht lesbar	Durch <i>Solanum dulcamarae</i> (30 Monate) passagiertes Isolat 48 („Lethal“): G ₄₆ →C C ₄₇ →U(A) U ₃₁₃ →A/U U ₃₁₇ →C	wie 20	wie 4	Neue Variante 3-800: G ₄₆ →C C ₄₇ →A -A ₆₀ U ₃₀₆ →A U ₃₁₇ →C entstanden aus M1, passagiert durch <i>Solanum dulcamar.</i> (13 Monate)	wie 13	Durch <i>Solanum nigrum</i> (33 Monate) passagiertes Isolat 48 („Lethal“): G ₄₆ →C C ₄₇ →U(A) U ₃₁₃ →A/U U ₃₁₇ →C	wie 11	wie 5	Isolat 48 („Lethal“) G ₄₆ →C C ₄₇ →U(A) U ₃₁₃ →A/U U ₃₁₇ →C	wie 17	wie 9	wie 15
Intermediate	Pflanze 1	Pflanze 5	Pflanze 15	Pflanze 19	Pflanze 3	Pflanze 17	Pflanze 9-12	Pflanze 18	Pflanze 16										
40 U 50 60 : U AA AAAA- CUCC GACGAG AAGA AGA GGGG UUCGUU UUCU UUU : C CA AUCUC 320 310 300	40 U 50 60 : U AA AA- A CUCC GACGAG AAGA AA AGA GGGG UUCGUU UUCU UUU : C CA AUC C 320 310 300	40 U 50 60 : CU AA AAAA- CUCC GACGAG AAGA AGA GGGG UUCGUU UUCU UUU : CC A- AUCUC 20 310 300	40 U 50 60 : U C AA AAAA- CUCC GA UAG AAGA AGA GGGG CU GUU UUCU UUU : C C CA AUCUC 310 300	40 U 50 60 : U - AAA AAA- CUCC GA CAAG AGA AGA GGGG CU GUUC UCU UUU : C C AA- AUCUC 20 310 300	40 U 50 60 : U - AA AAAA- CUCC GA CAAG AAGA AGA GGGG CU GUUC UUCU UUU : C C A- AUCUC 320 310 300	40 U 50 60 : U - AA AAAA- CUCC GA CUAG AAGA AGA GGGG CU GUUC UUCU UUU : C C A- AUCUC 320 310 300	40 U 50 60 : U - AA AAAA- CUCC GA CAAG AAGA AGA GGGG CU GUUC UUCU UUU : C C A- AUCUC 320 310 300	40 U 50 60 : U - AA AAA- CUCC GA CAAG AAGA AGA GGGG CU GUUC UUCU UUU : C C A- AUCUC 20 310 300	40 U 50 60 : U - AAA AAAA- CUCC GA CAAG AAGA AGA GGGG CU GUUC UUCU UUU : C C AA- AUCUC 320 310 300										

Abbildung 35: Neue und alte Sequenzvarianten von PSTVd

Erläuterungen: siehe Text

1. Zwei Sequenzvarianten wurden in jeweils mehreren Pflanzen gefunden, obwohl diese mit unterschiedlichen Isolaten infiziert worden waren. Bei diesen Sequenzvarianten handelt es sich um die Referenzsequenz PSTVd 1 (Gross *et al.* (1978)) und um eine bislang unbekannte Variante mit den Sequenzaustauschen $G_{46} \rightarrow C$, $C_{47} \rightarrow U$, $U_{313} \rightarrow A$ und $U_{317} \rightarrow C$. Daraus kann geschlossen werden, daß diese Varianten besonders optimale, konkurrenzfähige Alternativen für die Viroidsequenz darstellen. Eine solche Durchsetzungsfähigkeit wurde für die Sequenz PSTVd 1 kürzlich auch von anderen gefunden (Owens *et al.* (2003)). Ein gegenteiliger Effekt läßt sich für Varianten beobachten, die durch *in vitro*-Mutagenese erzeugt wurden. Die PSTVd-Sequenzen 310G (Owens *et al.* (1991)) und M1 (Hammond (1992)) wurden in keiner Pflanze gefunden, obwohl sie das Ausgangsinokulat für verschiedene Isolate darstellten. Die Variante 310G revertiert zu PSTVd 1, die Variante M1 mutiert zu verschiedenen neuen Sequenzen; stets jedoch erfolgt hier ein Austausch an Nukleotidposition 317 von U nach C.

2. Es wurden sechs neue, d.h. noch nicht in die GenBank aufgenommene Sequenzvarianten von PSTVd entdeckt. Dabei handelt es sich um die in den Pflanzen 3, 9-12, 15, 16, 18 und 19 replizierten PSTVd-RNAs; sie sind in Abbildung 35 rot gekennzeichnet.

3. In der Regel beschränken sich die Sequenzunterschiede auf die obere und untere VM-Region. Einzige Ausnahmen sind die Nukleotidpositionen C_{166} , welche in Pflanze 3, und C_{167} , welche in Pflanze 16 zu einem A mutierte sowie die in Pflanze 3 mutierten Positionen U_{194} und C_{196} . Pflanze 16 enthält außerdem ein zusätzliches C zwischen den Nukleotidpositionen C_{148} und G_{149} .

4. In einigen Fällen zeigen Tomatenpflanzen Symptome unterschiedlicher Stärke, obwohl dieselbe Sequenzvariante von PSTVd in ihnen gefunden wurde. Aus den Elektropherogrammen der Sequenzierungen geht hervor, daß in drei dieser Fälle eine der beiden Pflanzen außerdem zusätzliche Sequenzvarianten enthält. Solche Gemische fanden sich in Pflanze 20 (milde Symptome) und Pflanze 17 (intermediäre Symptome), deren PSTVd-Population auch die Sequenzvariante enthielt, welche in Pflanze 18 lethale Symptome induzierte. In Pflanze 14 dominiert die in den Pflanzen 8, 7 und 13 milde Symptome bedingende Referenzsequenz Intermediate (DI). Ein ganz schwacher Untergrund von Viroid-RNA abweichender Sequenz verändert das Krankheitsbild von Pflanze 14 aber zu schweren Symptomen. Für die Pflanzen 5 und 6 konnte trotz zweimaliger Sequenzierung kein Unterschied in ihren PSTVd-Populationen detektiert werden, obwohl Pflanze 5 nur intermediäre, Pflanze 6 dagegen schwere bis lethale Symptome zeigt. Letztere wurde allerdings mit der zehnfachen Menge (5 ng) PSTVd-RNA infiziert wie Pflanze 5. Dies macht deutlich, daß bei Pathogenitätsuntersuchungen auf gleiche Inokulatmengen geachtet werden sollte.

5. Die freie Energie der PSTVd-Sequenzvarianten korreliert nicht schlüssig mit der Pathogenität.

6. Die *in silico* bestimmten Basenpaarungsmuster in der VM-Region können identisch sein, obwohl von den betreffenden Sequenzvarianten unterschiedliche Symptome im Wirt hervorgerufen werden. Jeweils gleiche Sekundärstruktur weisen demnach die PSTVd-Sequenzen aus den Pflanzen 3 (intermediäre Symptome) und 16 (lethale Symptome) sowie 17 (intermediäre Symptome) und 9-12 (lethale Symptome) auf. Die lethale Sequenzvarianten aus den Pflanzen 16 und 9-12 haben die Austausch $C_{47} \rightarrow U$ und $U_{313} \rightarrow A$ gemein, sodaß das Basenpaar $U_{47}-A_{313}$ gebildet wird.

Demgegenüber findet sich in den intermediäre Symptome induzierenden Varianten aus den Pflanzen 3 und 17 das Basenpaar $A_{47}-U_{313}$.

7. Pflanze 17 enthielt wie unter 3. erwähnt ein Sequenzgemisch von PSTVd. Die in geringerer Menge enthaltene Variante induziert in „Reinkultur“ lethale Symptome, wie die selbige tragende Pflanze 18 zeigt. Paradoxerweise sollte die in Pflanze 17 dominierende PSTVd-Sequenz jedoch auch lethale Symptome hervorrufen - es handelt sich um die pathogene Variante RG1 - obwohl Pflanze 17 ganz deutlich nicht ein solches Krankheitsbild aufweist. Zweifel an der RG1 zugewiesenen Symptomatik werden auch durch einen anderen Umstand genährt: ein im hiesigen Institut mit RG1 gekennzeichnetes, altes PSTVd-Isolat (Nr. 48) wurde nach RT-PCR ebenfalls sequenziert. Dabei stellte sich heraus, daß auch in diesem Fall ein Gemisch von Sequenzen vorliegt, unter denen sich die „offizielle“ (Datenbank-) RG1-Sequenz befindet. Mit dem Isolat 48 wurden im vorliegenden Fall die Pflanzen 9 und 10 infiziert, welche beide lethale Krankheitssymptome entwickelten. Jedoch setzte sich in beiden Fällen eine Sequenzvariante durch, die nicht der RG1-Sequenz entspricht. Nach Erhalt dieser Ergebnisse wurden nochmals Pflanzen infiziert, und zwar wiederum mit Isolat 48 sowie außerdem mit *in vitro*-Transkripten, welche RG1-Sequenz aufwiesen. Tatsächlich konnte so bestätigt werden, daß die RG1-Sequenz keine lethale, sondern allenfalls schwere Symptome in den Tomatenpflanzen induziert, während sich die Symptomatik des Isolats 48 als erheblich schwerwiegender - d.h. lethal - erweist. Die Sequenzierung der daraufhin in den Pflanzen replizierten PSTVd-RNAs nach RT-PCR bestätigte außerdem die neue, in Abb. 35 den Pflanzen 9-12 zugewiesene Sequenz.

Dieser Umstand ist von großer Wichtigkeit, da die am Beginn dieser Arbeit stehende Hypothese, daß steigende Pathogenität mit einer zunehmenden Krümmung der VM-Region einhergeht, sich u.a. auf die besonders starke Krümmung der Sequenzvariante RG1 stützt (Schmitz und Riesner (1998)). Ein weiteres Argument der Hypothese war das Fehlen einer Krümmung bei der Sequenzvariante Mild, wobei sich auf Sequenz- und Pathogenitätsdaten gestützt wurde, welche von Owens und Mitarbeitern (1996) publiziert worden waren. Sequenzierungen von PSTVd-cDNAs im Verlaufe

einer im hiesigen Institut durchgeführten Diplomarbeit zeigten jedoch, daß die Autoren offenbar irrtümlich eine Mild-Sequenz angegeben haben, die nicht derjenigen entspricht, mit welcher sie die Pflanzen infizierten.

Aus diesen Gründen ist es jetzt mehr als zweifelhaft, daß eine Krümmung der VM-Region ursächlich die Pathogenität der PSTVd-RNA bestimmt.

3.11.2 Suche nach PSTVd-homologen Sequenzen

Im Verlaufe der Sequenz-Alignments von PSTVd wurde die Viroidsequenz *in silico* mit Nukleotidsequenzen verschiedener Organismen verglichen. Dabei fiel auf, daß speziell ein kurzes Teilstück der PSTVd-Sequenz komplementär zu Abschnitten vieler verschiedener mRNAs unterschiedlicher Organismen ist. Dieses Teilstück von etwa 20 Nukleotiden ist der obere Strang der Virulence-Modulating-Region (VM-Region).

Wie in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, vermitteln kurze RNAs von 20-24 nt die posttranskriptionelle Regulation vieler mRNAs. So exprimieren Tiere verschiedene RNA-Moleküle von etwa 70 nt, die eine unverzweigte Haarnadel-(Stem-Loop-)Struktur ausbilden. Aus deren Stamm wird spezifisch ein microRNA (miRNA) genannter Abschnitt von 20-24 nt herausgeschnitten, der mit der 3'UTR einer Ziel-mRNA partiell basenpaaren kann und ihre Translation verhindert. Seit kurzem ist bekannt, daß in Pflanzen ein ähnlicher Mechanismus zur Genregulation existiert. Allerdings weisen pflanzliche miRNAs ein höheres Maß an Sequenzkomplementarität zu ihren Zielsequenzen auf als die tierischen.

Papaefthimiou und Kollegen (2001) fanden in viroidinfizierten Pflanzen 22-23 nt lange RNAs mit PSTVd-Sequenz. Die Tatsache, daß die obere VM-Region komplementär zu verschiedenen mRNA-Sequenzen ist, legt nahe, daß sie vom pflanzlichen Organismus als miRNA interpretiert werden könnte und die Expression komplementärer mRNAs dadurch negativ beeinflußt wird. Die unterschiedliche Pathogenität verschiedener Sequenzvarianten von PSTVd würde sich in diesem Modell zwangsläufig aus einem mehr oder weniger hohem Maß an Sequenzkomplementarität zu den mRNAs ergeben. Abbildung 36 zeigt das Beispiel einer mRNA aus der Kartoffel, die in ihrer 3'UTR 131 nt hinter dem Stoppcodon einen Bereich aufweist, der komplementär zur oberen VM-Region der Sequenzvariante PSTVd 1 (Gross *et al.* (1978)) ist. Das von dieser mRNA kodierte Protein weist keine Ähnlichkeiten zu Proteinen bekannter Funktion auf, ist jedoch in höheren Pflanzen offenbar hochkonserviert, wie Sequenzvergleiche mit Proteinen aus Arabidopsis (Abb. 36 c)) und Oryza (nicht gezeigt) belegen.

a)

```

>gi |21922394 | qb| BQ506533.2 | BQ506533
EST613948 Generation of a set of potato cDNA clones for
microarray analyses mixed potato tissues Solanum
tuberosum cDNA clone STMGK87 3' end.
Length = 761

Score = 40.1 bits (20), Expect = 2.5      Query (PSTVd1)           : 45 agcagaaaagaaaaaagaag 64
Identities = 20/20 (100%)                Sbjct (cDNA clone STMGK87): 66 agcagaaaagaaaaaagaag 85
Strand = Plus / Plus

```

b)

```

L D D S E S W T R E L A L S L I L E M L
-3 ttagatgattctgagtcattggacaagggaactggccctatctctgattcttgaatgctg -62
K N Q K N A M E D S V E I I I E K L L H
-63 aagaatcagaaaaatgctatggaggactctgttgagatcataattgaaaagctgctccat -122
V T K D D V A K V A N E A E N C L S T I
-123 gtgaccaaggatgatgttgcaaaagttgcaaatgaagctgagaattgtttatctacaatt -182
L S Q Y D P F R C L S V I V P L L V T E
-183 ttgtcccagtagcaccattcagatgcctaagtgttattgttctttacttgcaccgaa -242
D E K T L V T C I N C L T K L V G R L S
-243 gatgagaagactcttgtaacttgatgtaactgtttgacgaagcttgggaaggctctct -302
Q E E L M S Q L P S F L P S L F D A F G
-303 caggaggaattgatgtctcagcttccttcattctctgcttcctgcttggatgcttttgg -362
N Q S A D V R K T V V F C L V D I Y I M
-363 aaccagagtgtgatgtccgaagactgttattctgtttggttgacatatacatcatg -422
L G K A F M P Y L E G L N S T Q L R L V
-423 ctgggcaaagcatttatgccatacttgaagggtgaacagcacacagttacgattggtg -482
T I Y A N R I S Q A R T G T P V D A S H
-483 accatttatgcaaatcgaatatcacaggccagaacaggtactccggtagatgcaagccat -542
S * V F F F F F F W V F I V G I D V C I
-543 agttagggttttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttctttt -602
C D L I F D A F C I S V * M C I S F L V
-603 tgtgatattaatattgatgccttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttctttt -662
G E V V F F F F F L F C * L V G S F G V R
-663 ggtgagggttattcttcttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttctttt -722
T I V I L Y T V N F E L I
-723 acaattgtgatattgtacacagtgaactttgagctcata -761

```

c)

```

>SDSCNR: 1915698 expressed protein [Arabidopsis thaliana] NP_849997.1
[NM_179666]
Length = 1330

Score = 295 bits (754), Expect = 3e-79
Identities = 148/178 (83%), Positives = 164/178 (92%)

Query (Solanum-ORF (s.b)) :      1 LDDSESWTRELALSLEMLKQKNAMEDSVEIIIEKLLHVTKDDVAKVANAENCLSTI 60
                                LDD + +ELALSLEMLK+QK+AMEDSVEI+IEKLLHV+KD V KV+ EAE CL+T+
Sbjct (Arabidopsis-Protein): 1151 LDDEDFSIKELALSLEMLKQKAMEDSVEIIVIEKLLHVSKDTPKVVSTEAQCLTTV 1210

Query:      61 LSQYDPFRCLSVIVPLLVTEDEKTLVTCINCLTKLVGRLSQEELMSQLPSFLPSLFD AFG 120
                                LSQYDPFRCLSVIVPLLVTEDEKTLV C INCLTKLVGRLSQEELM QL SFLP++F+AFG
Sbjct:     1211 LSQYDPFRCLSVIVPLLVTEDEKTLVACINCLTKLVGRLSQEELMDQLSSFLPAVFEAFG 1270

Query:     121 NQSADVRKTVVFCVLDIYIMLGKAFMPYLEGLNSTQLRLVTIYANRISQARTGTPVDA 178
                                +QSADVRKTVVFCVLDIYIMLGKAF+PYLEGLNSTQ+RLVTIYANRISQAR G P+DA
Sbjct:    1271 QSADVRKTVVFCVLDIYIMLGKAFMPYLEGLNSTQVRLVTIYANRISQARNGAPIDA 1328

```

Abbildung 36: mRNA-Sequenz aus Kartoffel mit Sequenzkomplementarität zu PSTVd1

- Bester pflanzlicher „Treffer“ eines Sequenzvergleichs aller ESTs der GenBank mit PSTVd1 durch das Programm BLASTN.
- Translation des insgesamt 761 nt umfassenden cDNA-Abschnittes aus a); die zur oberen VM-Region komplementäre Sequenz ist rot markiert, sie liegt 131 nt hinter dem ersten Stoppcodon (Stoppcodons sind durch rote Sternchen gekennzeichnet)
- Sequenzvergleich der aus b) erhaltenen Peptidsequenz mit dem Programm BLASTP. Höchste Homologie zur Solanum-Sequenz weist das gezeigte Protein aus Arabidopsis thaliana auf

In Abbildung 37 ist die Komplementarität einer besonders pathogenen Sequenzvariante von PSTVd zu einer mRNA gezeigt, die für eine Stearoyl-Acyl-Carrier Protein Desaturase kodiert. Wieder liegt der zur oberen VM-Region komplementäre Bereich in der 3' UTR der mRNA, und zwar 214 nt hinter dem Stoppcodon. Abbildung 38 verdeutlicht, daß endogene, pflanzliche miRNAs ihre regulierende Funktion ebenfalls durch Basenpaarung mit der 3' UTR von mRNAs ausüben können.

a)

```
>q1|169564|qb|M91238.1|POTSACPD Solanum tuberosum stearoyl-acyl carrier protein desaturase mRNA,
  complete cds
  Length = 1507

  Strand = Plus / Minus

PSTVd: 43   tgactagaaaagaaaaaa-gaa 63
          ||||| ||||| ||||| ||||| |||
Sbjct: 1472 tgacttgaaaagaaaaaaagaa 1451
```

b)

```
1201 tttcagctgg atttttggta aagagattaa gctgtaagca cttgtgttgc agggcaatgc
1261 catattactt tctgatcata taaatttggc ataaatttat gttaagaaac ttaagggta
1321 tgatatgaag tctgtgcagg gtagtgaag ctacttcgct agagtactgg tttttctttt
1381 tgcaattgtg tttaggccat agggaaaaac atagtctta gcaataaaga tgaacctttt
1441 ggtacccttt ttcttttttt cttttcaagt caagattatg cattatatat atgacttatt
1501 aggcggc
```

Abbildung 37: mRNA-Sequenz aus Kartoffel mit Sequenzkomplementarität zur pathogenen PSTVd-Variante aus den Pflanzen 9-12 (vgl. Abb. 35)

- a) Ergebnis eines Vergleichs von Solanum- und Lycopersicon-Nukleotidsequenzen mit der PSTVd-Sequenz durch das Programm BLASTN.
- b) Laut Datenbank befindet sich auf der in a) identifizierten mRNA ein ORF zwischen den Nukleotiden 56 und 1237. Das Ende der mRNA-Sequenz ist gezeigt; das Stoppcodon ist unterstrichen, der zur oberen VM-Region komplementäre Abschnitt ist rot markiert.

a)

```
Os 04048: 5'UAGGCAACUCAUUCUUGGCUG 3'
          | ||||| ||||| ||||| |||||
miRNA 169: 3'AGCCGUUCAGUAGGAACCGAC 5'
```

b)

```
S I Y E H E D M D H F H S F D H L R T H
903 agcatatatgaacacgaagacatggaccacttccatagctttgatcatctccggacacac 962
  F F T P L P S L M D V E H G A G N P F K
963 ttcttcaccccgctcccagcctcatggatgtcgagcacgggctggtaaccccttcaag 1022
  W T A A S D G C C D L L K A * L E G G Y
1023 tggacagcagcctctgatggctgctgtgacctcctcaaagcatgactagaggggggatac 1082
  T G Q P K L A N I S S F C W I H C P A P
1083 accgggcagccgaagctggcaaacatcagcagtttctgctggatcattgccagctcca 1142
  G Q G L S L L V L A V C R Q L I L G * S
1143 ggtcagggattgtccctgctggtattggctgtctgtaggcaactcattcttggctgatcg 1202
  V P L I A Y L S R K L Q H R F L G S C G
1203 gttccgctcatcgcctacttgtcccggaaactccagcaccggtttctgggatcctgcggt 1262
```

Abbildung 38: microRNA 169 aus *Oryza sativa* (Reinhart *et al.* (2002))

- a) imperfekte Komplementarität zwischen der miRNA und ihrer wahrscheinlichen mRNA-Zielsequenz. Zwar steht für miRNA 169 wie für die meisten miRNAs der biochemische Nachweis ihrer Funktionalität aus, jedoch ist letztere höchstwahrscheinlich aufgrund der Konservierung sowohl der miRNA wie der Ziel-mRNA zwischen Arabidopsis und Reis.
- b) Lage der miRNA-Bindestelle im 3' UTR der mRNA. Es ist nur ein Ausschnitt der mRNA gezeigt; der zur miRNA komplementäre Abschnitt ist rot markiert; Stoppcodons sind durch rote Sternchen gekennzeichnet.

4. Diskussion

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Annahme, daß die Pathogenität verschiedener Sequenzvarianten des Potato Spindle Tuber Viroids mit einer Krümmung der virulenzmodulierenden Region des Moleküls korreliert. Während die Stärke der Wechselwirkungen von Nukleinsäuren untereinander durch das Ausmaß ihrer Sequenzkomplementarität bestimmt wird, ist für die Bindung von Proteinen an RNA-Moleküle die räumliche Struktur der Partner von entscheidender Bedeutung. Im Falle der Viroid-Pflanze-Beziehung wurde daher davon ausgegangen, daß die Krümmung der VM-Region die Affinität der PSTVd-RNA zu einem Protein der Pflanze moduliert und die Krankheitssymptome des Wirtes mit der Stärke dieser Wechselwirkung variieren. Von einem solchen Protein wäre somit zu fordern, daß es einen erheblichen Einfluß auf den Stoffwechsel der Pflanze ausübt. Diese Bedingung würde u.U. erfüllt von einer Proteinkinase, deren verstärkte Phosphorylierung in viroidinfizierten Pflanzen von Hiddinga und Mitarbeitern (1988) beobachtet worden war.

4.1 Die Proteinkinase PKR wird nicht durch Viroid-RNA aktiviert

In der vorliegenden Arbeit wurde somit zuerst überprüft, ob das Ausmaß der Phosphorylierung dieses Enzyms mit den Symptomen der Wirtspflanze korreliert. Dabei konnte weder ein diesbezüglicher Zusammenhang festgestellt noch überhaupt die verstärkte Phosphorylierung des Proteins in infizierten Pflanzen beobachtet werden. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Don Roth legen nahe, daß es sich bei dem Enzym um das pflanzliche Homolog der Proteinkinase PKR handelt, die sich nach Kontakt mit dsRNA durch Phosphorylierung *in trans* selbst aktiviert und dann den Initiationsfaktor der Translation eIF2 α durch Phosphorylierung inaktivieren kann, was zum Erliegen der Translation führt. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch durch Zugabe von dsRNA keine Verstärkung der Phosphorylierung des pflanzlichen Enzyms induziert werden. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Krishna und Mitarbeitern (1997), die keine Inhibition der Translation in pflanzlichen Proteinextrakten nach Zugabe von dsRNA beobachten konnten. Nach den Aussagen von Don Roth ist es unberechenbar, ob ein solcher Proteinextrakt hinsichtlich seiner Translationsaktivität dsRNA-sensitiv ist oder nicht (Langland *et al.* (1996) und mündliche Mitteilung). Es wird spekuliert, daß dies von dem jeweiligen Level eines proteinösen Inhibitors der PKR abhängig ist (Langland *et al.* (1996)).

Berücksichtigt man die subzelluläre Lokalisation von PSTVd und PKR, so ist eine Wechselwirkung zwischen beiden *in vivo* nur im Nukleolus wahrscheinlich, da nahezu die gesamte Viroid-RNA in

diesem Organell akkumuliert (Schumacher *et al.* (1983)). Die PKR konnte in Säugerzellen ebenfalls im Nukleolus nachgewiesen werden, ihre Hauptmenge liegt jedoch höchstwahrscheinlich im Cytosol frei und ribosomenassoziiert vor. Erst im Verlaufe der Proteinpräparation aus infizierten Pflanzen kommt dieser Hauptanteil der PKR folglich in Kontakt mit dem Viroid. In der vorliegenden Arbeit wurde wie in jener von Hiddinga und Mitarbeitern beobachtet, daß die putative pflanzliche PKR auch ohne Behandlung mit dsRNA die am stärksten markierte Bande in Phosphorylierungsexperimenten von S100-Proteinextrakten darstellt. Diese hohe konstitutive Aktivität der PKR war nach Aussage von Hiddinga und Mitarbeitern in Extrakten aus viroidinfizierten Pflanzen nochmals um den Faktor 3 erhöht. Sofern diese Erhöhung auf der Wechselwirkung des Proteins mit PSTVd beruht, müßte folglich davon ausgegangen werden, daß ein nennenswerter Anteil der Kinase im Komplex mit der Viroid-RNA vorliegt. Bei der Herstellung der Proteinextrakte wird 1 g Pflanzenmaterial in 2 ml Puffer homogenisiert, nach Dialyse resultiert dann ein Volumen der S100-Präparation von etwa 1 ml. Selbst bei vollständiger Freisetzung der Viroid-RNA aus den Zellkernen würde die Konzentration von PSTVd im Proteinextrakt S100 somit 5 nM nicht überschreiten. Damit ein nennenswerter Anteil der pflanzlichen PKR unter diesen Bedingungen im Komplex mit der Viroid-RNA vorliegt, müssten drei Bedingungen erfüllt sein: erstens müßte die pflanzliche PKR bindungskompetent sein, sollte also nicht bereits im Komplex mit endogenen Nukleinsäuren vorliegen. Zweitens müßte die Konzentration des Enzyms ähnlich niedrig sein wie jene der PSTVd-RNA und drittens müßte die Dissoziationskonstante für die Wechselwirkung des Viroids mit der pflanzlichen PKR einen Wert unter 5 nM aufweisen. Eine so hochaffine Bindung des Enzyms an die PSTVd-RNA konnte in den Gelverzögerungsexperimenten jedoch nicht beobachtet werden (Kapitel 3.5). Die Dissoziationskonstante für diese Wechselwirkung wurde in diesen Versuchen zu 140 nM bestimmt. Aus diesem Grunde ist es so gut wie ausgeschlossen, daß ein signifikanter Anteil der PKR im S100 aus infizierten Pflanzen im Komplex mit PSTVd vorliegt. Die Tatsache, daß die Zugabe von PSTVd-RNA zu einer Konzentration, die tatsächlich 40 % der PKR komplexieren sollte, keine verstärkte Phosphorylierung des Enzyms bewirkt (s. Kapitel 3.4) macht es darüber hinaus unwahrscheinlich, daß die von Hiddinga und Mitarbeitern beobachtete, verstärkte Phosphorylierung der PKR in Extrakten aus infizierten Pflanzen auf eine Wechselwirkung mit dem Viroid zurückzuführen ist.

Als Wirtsfaktor, dessen differentielle Affinität zu den verschiedenen Sequenzvarianten von PSTVd eine unterschiedliche Symptomatik der Wirtspflanzen bedingt, muß die Proteinkinase PKR folglich ausscheiden, obgleich sie die Viroid- wie auch die 7S-RNA erstaunlich gut bindet.

4.2 Weder thermodynamische Instabilität noch eine Biegung der Viroid-RNA korrelieren mit ihrer Pathogenität

Ein erstes Modell zur Erklärung der unterschiedlichen Pathogenitäten verschiedener PSTVd-Sequenzvarianten wurde von der Arbeitsgruppe Sänger entwickelt (Schnölzer *et al.* (1985)). Ein Vergleich von vier verschiedenen Viroidstammen führte zu dem Ergebnis, daß die thermodynamische Stabilität der Viroid-Sekundärstruktur in dem Maße abnahm, wie die Pathogenität des betreffenden Stammes zunahm. Die Allgemeingültigkeit dieser Korrelation wurde jedoch von Owens und Kollegen dadurch widerlegt, daß diese Autoren deutlich mehr Sequenzvarianten des Erregers hinsichtlich ihrer Pathogenität wie ihrer thermodynamischen Stabilität verglichen. Auch die in der vorliegenden Arbeit neu entdeckten Sequenzvarianten zeigen keine Korrelation zwischen diesen Parametern im Sänger'schen Sinne (s. 3.11.1, Abb. 35). Owens und Kollegen postulierten aufgrund der Basenpaarungsmuster in der Virulence Modulating Region der PSTVd-RNA ein alternatives Pathogenitäts-Modell, wonach Mild- und Severe-Stämme in diesem Bereich des Moleküls in entgegengesetzte Richtungen gebogen wären, während eine intermediäre Symptome induzierende Sequenzvariante hier eine gestreckte Konformation einnahme. Die experimentelle Überprüfung dieses Sachverhalts durch den Autor der vorliegenden Arbeit führte tatsächlich zu dem Ergebnis einer zunehmenden Biegung mit zunehmender Pathogenität, wobei allerdings der Sequenzvariante Mild die gestreckte Konformation zugesprochen werden mußte (Schmitz und Riesner (1998)). Diese Ergebnisse wurden an isolierten VM-Regionen der verschiedenen Stämme gewonnen, ohne die Pathogenitaten der letzteren nochmals zu überprüfen.

Sequenzierungen von PSTVd-cDNAs im Rahmen einer im hiesigen Institut angefertigten Diplomarbeit (Steinigk (2003)) offenbarten einen ersten Fehler in der Publikation von Owens und Kollegen (1996): die in der Publikation angegebene Sequenz der PSTVd-Variante Mild entspricht nicht jener der Viroid-RNA, mit der die Pflanzen tatsächlich infiziert wurden. Daher ist fraglich, welche Pathogenität die in der Publikation angegebene Viroidsequenz „Mild“, für welche Schmitz und Riesner das Fehlen einer in allen anderen untersuchten Varianten vorhandenen Biegung diagnostizierten, tatsächlich hat. Bedeutet dieser Fehler also aufgrund ungeklärter Symptomatik nur den Wegfall eines von 6 Meßpunkten in der Arbeit von Schmitz und Riesner, so hat die am Ende der vorliegenden Arbeit gemachte Entdeckung einer intermediären Symptomatik für die vermeintlich lethale Sequenzvariante RG1 noch schwerwiegendere Folgen für die „Biegungshypothese“. Es läßt sich nun sicher feststellen, daß die Biegung der VM-Region nicht mit der Pathogenität des Viroids korreliert, denn die VM-Region von RG1 ist auf jeden Fall besonders stark gebogen - nur resultiert daraus offenbar keine schwere Symptomatik.

Die Frage nach der Ursache der pathogenen Wirkung der Viroid-RNA ist damit wieder gänzlich offen.

4.3 Ein neues Pathogenitätsmodell - Wirkung von Viroidbruchstücken als miRNA

Die am Ende der vorliegenden Arbeit durchgeführten Sequenzvergleiche von PSTVd mit mRNA-Sequenzen legen eine gänzlich andersartige, pathogene Wirkungsweise der Viroid-RNA nahe. Wie in Kapitel 3.11 gezeigt, ist ein etwa 20 Nukleotide langer Bereich der (+)PSTVd-Sequenz komplementär zu Abschnitten verschiedener pflanzlicher mRNAs. Dieser Bereich umfaßt die Nukleotidpositionen 40-60 der PSTVd-RNA und damit den oberen Strang der virulenzmodulierenden Region des Viroids. Tabler und Mitarbeiter (Papaefthimiou (2001)) konnten zeigen, daß in viroidinfizierten Pflanzen 21 bis 23 Nukleotide umfassende RNAs vorliegen, die sich durch Hybridisierung mit PSTVd-Sequenz nachweisen lassen. Aufgrund dieser Tatsache können zwei unterschiedliche Szenarien entworfen werden:

- i) die Viroid-RNA wird von der Pflanze als virale RNA doppelsträngigen Charakters interpretiert und in die für interfering-RNAs (iRNAs) typische Länge von 21-23 Nukleotiden geschnitten. In diesem Fall sollte jeder Bereich der PSTVd-RNA in diesem Pool kurzer RNAs repräsentiert sein.
- ii) die unverzweigte Struktur der PSTVd-RNA ähnelt einem oder mehreren Vorläufern endogener microRNAs (miRNAs) der Pflanze. Diese der Genregulation dienenden miRNAs werden aus ihren Vorläufern, welche unverzweigte Stem-Loop-Strukturen ausbilden, spezifisch herausgeschnitten, haben aber gleichfalls eine Länge von 20-23 Nukleotiden. In diesem Fall wäre zu erwarten, daß nur ein oder wenige Sequenzabschnitte von PSTVd mit einer Länge von 20-23 nt akkumulieren. Papaefthimiou und Kollegen (2001) konnten die kurzen RNAs mit Sonden nachweisen, welche zur rechten, aber auch mit solchen, welche zur linken Hälfte der (+)PSTVd-RNA komplementär sind. Sie konnten nicht entscheiden, ob jeder Abschnitt der PSTVd-Sequenz im „Kurzen-RNA-Pool“ repräsentiert ist, oder ob nur zwei definierte Abschnitte, von denen einer in der rechten, der andere in der linken Hälfte der PSTVd-RNA liegt, in der Pflanze akkumulieren.

In jedem Fall könnten entstehende Bruchstücke der PSTVd-Sequenz, die zu Bereichen pflanzlicher mRNAs komplementär sind, mit dem Metabolismus der Pflanze interferieren, denn sowohl die aus langen dsRNAs entstehenden interfering RNAs als auch die endogen exprimierten microRNAs führen zur Inaktivierung komplementärer mRNAs. Diese Inaktivierung verläuft in Pflanzen entweder durch Degradation der mRNAs (Tang *et al.* (2003), Palatnik *et al.* (2003)) oder durch die Unterdrückung ihrer Translation (Chen (2003)). Als auslösendes Moment der Krankheitssymptome

ist eine solche Wirkungsweise der PSTVd-RNA nicht unwahrscheinlich, weil wie erwähnt speziell der obere Strang der virulenzmodulierenden Region komplementär zu einem Sequenzmotiv ist, welches in vielen mRNAs vorkommt. Es wurde beobachtet, daß der Austausch eines Nukleotids in pflanzlichen miRNAs bereits einen profunden Einfluß auf ihre Wirksamkeit haben kann (Palatnik *et al.* (2003)). Daher ist unmittelbar einleuchtend, daß Sequenzunterschiede zwischen PSTVd-Varianten unterschiedlicher Pathogenität sich mehr oder weniger störend auf den mRNA-Metabolismus der Pflanze auswirken könnten. Perfekte Sequenzkomplementarität scheint für pflanzliche miRNAs eine Ausnahme zu sein. In der Regel werden 1 bis 3 Mismatches zwischen einer miRNA und ihren Target-mRNAs beobachtet (Rhoades *et al.* (2002), Tang *et al.* (2003) und Palatnik *et al.* (2003)) und sind vielleicht sogar notwendig, damit die betreffende mRNA durch die miRNA effizient reguliert werden kann (Tang *et al.* (2003)). Daher läßt sich *a priori* nicht vorhersagen, welche Wirts-mRNA durch pathogene Varianten von PSTVd besonders beeinträchtigt würde. Jedoch können exprimierte Wirtssequenzen benannt werden, die die angesprochene Komplementarität zur oberen VM-Region des Viroids aufweisen (s. Kap. 3.11). Eine solche wäre die mRNA für das abundanteste Speicherprotein der Kartoffelknolle - Patatin. In diesem Fall liegt die zum Viroid komplementäre Sequenz zwar am Rande eines Introns - ist also nicht Bestandteil der reifen mRNA, jedoch wurden solche Komplementaritäten zu Intron-Bereichen auch für pflanzliche miRNAs beschrieben (Llave *et al.* (2002)) und schließen eine regulatorische Funktion für die betreffenden miRNAs nicht aus.

Auch Sequenzaustausche in der unteren VM-Region - welche weit weniger komplementäre mRNA-Treffer im *in silico*-Sequenzvergleich liefert - können einen erheblichen Einfluß auf die Pathogenität des Viroids haben. Dies ließe sich am ehesten mit der oben unter ii) genannten Alternative erklären, daß nämlich die Viroid-RNA von der Pflanze als eigene miRNA-Vorläuferstruktur interpretiert wird. Letztere weisen wie erwähnt Stem-Loop-Strukturen auf, aus deren Stem spezifisch die miRNA-Sequenz herausgeschnitten wird. Daher ist es denkbar, daß auch Sequenzaustausche auf der der späteren miRNA gegenüberliegenden Seite des Stems einen Einfluß auf die Effizienz der Prozessierungsreaktion und damit auf die Abundanz der reifen miRNA - oder im vorliegenden Fall von PSTVd auf die Abundanz der oberen VM-Region als irreguläre miRNA - haben könnten. Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß andere bereits die Idee einer Wirkung von Viroidsequenzen als interfering RNAs geäußert haben (Papaefthimiou *et al.* (2001), Itaya *et al.* (2002)). Die Komplementarität speziell der oberen VM-Region zu vielen mRNA-Sequenzen wurde von diesen Autoren jedoch nicht diskutiert.

Wie könnte die Hypothese einer Wirkung der oberen VM-Region als interfering RNA überprüft

werden? Zum einen sollte untersucht werden, mit welchen viroidspezifischen Oligonukleotiden sich 21-23 nt lange RNAs in infizierten Tomatenpflanzen detektieren lassen. Dies könnte eine Antwort auf die Frage liefern, ob die gesamte Viroid-RNA von der Pflanze in Abschnitte dieser Länge geschnitten wird, oder ob nur wenige, definierte Bereiche von PSTVd in Form der kleinen RNAs akkumulieren. Zum anderen sollte durch weiterführende *in silico*-Analysen eine umfassendere Identifikation möglicher Target-mRNAs erreicht werden. Analog dem Vorgehen von Palatnik und Mitarbeitern (2003) sollte anschließend durch Northern-Blotting und Hybridisierung mit geeigneten Sonden überprüft werden, ob in viroidinfizierten Pflanzen die vorhersagbaren Spaltprodukte der betreffenden mRNAs auftreten. Demselben Zweck sollten parallel durchgeführte RACE-Analysen zur Bestimmung der RNA-Enden dienen. Da alternativ eine Wirkungsweise von Viroidsequenzabschnitten als translationale Repressoren ohne Spaltung der mRNAs denkbar ist (Chen (2003)) könnte mittels Antikörpern gegen u. U. betroffene Proteine die Abundanz der letzteren in infizierten versus gesunden Pflanzen bestimmt werden. Eine gleichfalls aufwendigere Herangehensweise wäre, transgene Pflanzen zu erzeugen, die die obere VM-Region von PSTVd konstitutiv exprimieren. Das Auftreten von Symptomen, die denen einer Viroidinfektion entsprechen, wäre ein überzeugendes Argument für die miRNA-Pathogenitäts-Hypothese.

Die Arbeitsgruppe von Ding (Itaya *et al.* (2002)) verglich die mRNA-Expressionsmuster gesunder mit denen Viroid- bzw. TMV-infizierter Tomatenpflanzen. Sie fanden 52 Gene, deren Expression durch Viroidinfektion induziert und 8 Gene, deren Expression supprimiert wurde. Sie konnten für letztere keine signifikante Sequenzkomplementarität zu PSTVd beobachten, jedoch lagen den Autoren auch nur Teilbereiche der jeweiligen, kodierenden Sequenzen vor, sodaß eine Suppression durch interfering-RNA-Wirkung des Viroids nicht ausgeschlossen werden kann.

4.4 Modifikation der Rubisco in Extrakten aus infizierten Pflanzen

Zwei der von Itaya und Kollegen als in Folge von Viroidinfektion induziert gefundenen mRNAs kodieren für Proteasen. Beide wurden zudem in Pflanzen, welche mit einem pathogenen Stamm von PSTVd infiziert waren, stärker induziert als in solchen, die eine milde Sequenzvariante des Viroids trugen. Es bleibt zu klären, ob eine der beiden Proteasen für die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Modifikation der großen Rubisco-Untereinheit verantwortlich ist (Kap. 3.3). Eine der beiden Proteasen ist Subtilisin-ähnlich und wurde von Tornero und Mitarbeitern (1997) aus der Tomate kloniert. Proteasen dieses Typs spalten Proteinketten allerdings zwischen zwei basischen Aminosäuren. Die große Untereinheit der Rubisco weißt kein solches Sequenzmotiv an Stellen auf,

die die beobachtete Veränderung ihrer elektrophoretischen Mobilität erklären würde. Als Erklärung für dieses Phänomen kommen jedoch auch Modifikationen wie Glykosylierungen oder Phosphorylierungen in Frage. Unter den von Itaya und Mitarbeitern gefundenen, differentiell exprimierten Sequenzen finden sich zwar keine Enzyme, die solche Modifikationen ganz offensichtlich katalysieren, jedoch schließen sie auch mehrere Genprodukte mit unbekannter Funktion ein. Generell ist zu bedenken, daß der Einfluß des Viroids auf das Level der Aktivität, welche die Rubisco *in vitro* modifiziert, durchaus indirekt sein kann. So ist z.B. denkbar, daß die Anwesenheit von PSTVd die Abundanz eines Proteins verändert, welches seinerseits eine translationale Kontrolle auf die Rubisco-modifizierende Aktivität ausübt. Ein solcher indirekter Einfluß wäre folglich durch eine Erforschung des mRNA-Expressionsmusters infizierter Pflanzen - wie von Itaya und Mitarbeitern durchgeführt - nur schwer zu entschlüsseln.

Eine biochemische Fraktionierung der Proteine aus infizierten Pflanzen bleibt somit die vielleicht beste Methode zur Identifikation jener Aktivität, der u. U. eine Schlüsselrolle im Krankheitsverlauf zukommt, da sie auf frappierende Weise mit der Stärke der Krankheitssymptome korreliert ist.

4.5 PSTVd und der Nukleolus

Einem Verständnis der Funktionsweise von Viroid-RNA steht die Überbetonung ihrer pathogenen Wirkung gewissermaßen im Wege. Im Grunde ist vielmehr die Tatsache verwunderlich, daß die allermeisten Wirtspflanzen keinerlei Symptome bei Viroidbefall zeigen, da PSTVd in einem sehr geschäftigen Organell zu einer beachtlichen Menge akkumuliert. Es gibt Hinweise, daß Makromoleküle im Zellkern relativ ungehindert diffundieren können und in einem Teilkompartiment wie dem Nukleolus dann längere Zeit verweilen, wenn sie durch geeignete Wechselwirkungspartner gebunden werden (Phair und Misteli (2000), Politz *et al.* (1999)). Aus diesem Grunde ist es wahrscheinlich, daß die Lokalisation von PSTVd im Nukleolus auf die dortige Anwesenheit eines hochaffinen Bindungspartners zurückzuführen ist. Durch eine solche feste Bindung wäre die freie Konzentration an Viroid-RNA wiederum gering, sodaß störende Wechselwirkungen mit der Vielzahl an RNA-bindenden Faktoren, die die Funktionalität des Organells gewährleisten, vermieden würden. Es liegt nahe, die im Nukleolus besonders abundanten Proteine Fibrillarin und Nukleolin auf ihre Affinität zu PSTVd hin zu untersuchen.

Zwar konnten beide Proteine in der vorliegenden Arbeit rekombinant exprimiert werden, jedoch verblieb nur Nukleolin nach der Aufreinigung in einer löslichen Form. Mittels Verzögerungs-Gelelektrophorese wurde eine Dissoziationskonstante von 4 μM für die Bindung von PSTVd an

dieses Protein bestimmt. Zur Abschätzung der Konzentration von Nukleolin in den Nukleoli müssen Daten herangezogen werden, die an reifen *Xenopus*-Oocyten erhalten wurden, da diese aufgrund ihrer Größe und der Amplifikation von Nukleoli in diesen Zellen besonders gut hinsichtlich verschiedener Aspekte der rRNA-Synthese charakterisiert sind. Roger und Kollegen (2003) bestimmten die Menge an Nukleolin pro Oocyte mittels Immunoblotting auf 20 ng. Da in einer solchen Oocyte die rDNA selektiv amplifiziert ist, weist ihr Zellkern etwa 1000 Nukleoli mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 10 μm auf (Shah *et al.* (1996)). Geht man davon aus, daß sich der Großteil des Nukleolins in diesen Nukleoli befindet, so ergibt sich eine Nukleolinkonzentration von ungefähr 500 μM . Sofern sich dieser Wert auf Pflanzenzellen übertragen läßt, würden 90 - 99 % der PSTVd-RNA im Komplex mit Nukleolin vorliegen - die Konzentration an freiem PSTVd betrüge dann maximal 0.4 μM , minimal 50 nM. Diesen Werten liegt eine Berechnung mit 10^4 PSTVd-Molekülen pro Nukleolus (Schumacher *et al.* (1983²)) zugrunde, die oberen und unteren Grenzen der Angaben ergeben sich bei Berechnungen mit angenommenen Nukleoli-Durchmessern von 1 bzw. 2 μm . Diese Abschätzung belegt, daß eine Wechselwirkung von PSTVd mit Nukleolin eine relativ geringe Konzentration an freier Viroid-RNA gewährleisten würde. Dennoch kann daraus nicht sicher geschlossen werden, daß dieser Wechselwirkung *in vivo* eine Bedeutung zukommt. Es ist durchaus vorstellbar, daß ein anderes Protein PSTVd deutlich fester bindet und eine Wechselwirkung des letzteren mit Nukleolin u.U. weitgehend unterdrückt. Diese Überlegungen verdeutlichen exemplarisch ein allgemeines Problem: es fehlen Daten zur Abundanz der verschiedenen Proteine und zu ihren Affinitäten untereinander sowie zu ihren RNA-Bindungspartnern, um die Abläufe im Nukleolus biophysikalisch besser beschreiben zu können. Ein grundsätzlich Paradoxon läßt sich jedoch benennen: die hohen Konzentrationen von RNAs und Proteinen in diesem Organell sollten einen koordinierten Ablauf der Prozesse eigentlich erschweren, da dadurch die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Wechselwirkungen steigt. In diesem Zusammenhang ist die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung interessant, daß Nukleolin zur 7S-RNA eine recht hohe Affinität aufweist, die allerdings unterhalb derjenigen liegt, mit der das Protein seine Zielstrukturen auf der prä-rRNA erkennt. Sofern dieser Umstand generell auf strukturierte RNA-Bereiche zutrifft, könnte dem Nukleolin gegebenenfalls die Rolle einer „biochemischen Puffersubstanz“ zukommen, die durch eine relativ hohe Affinität viele RNA-Strukturen maskiert und dadurch die Wechselwirkung der letzteren mit unspezifischen Partnern verhindert, jene mit den „richtigen“, spezifischen Proteinen jedoch zuläßt, da es durch diese selbst von der RNA verdrängt wird. Eine solche Funktion ist selbstverständlich auch für andere, abundante Proteine dieses Organells vorstellbar.

4.6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit nahm ihren Ausgang bei der Frage nach der pathogenen Wirkungsweise von Viroid-RNA. Sie führte jedoch schließlich zur Beschäftigung mit dem Phänomen der i.d.R.

komplikationslosen Koexistenz dieses molekularen Parasiten und seiner Wirtspflanze. Dies wiederum lenkte den Blick auf den Ort der Viroid-Akkumulation - den Nukleolus - und die in großen Teilen unverstandenen Prozesse in diesem faszinierenden Organell.

So wurde in dieser Arbeit erstmals ein Vollängen-Nukleolin rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Die Untersuchung dieses Proteins in der Verzögerungsgelelektrophorese zeigte, daß das pflanzliche Homolog von Nukleolin offenbar mehrere, spezifische Bindestellen am Beginn der prä-rRNA und im Bereich der ersten Prozessierungsstelle derselben aufweist. Dies belegt ein hohes Maß an funktioneller Konservierung des Ablaufs der rRNA-Synthese, obwohl die Sequenzen der prä-rRNA wie des Nukleolins zwischen Pflanzen und Tieren erheblich divergieren. Es wird von Interesse sein, die gebundenen Strukturen in pflanzlicher rRNA genauer einzugrenzen und mit denen in tierischer rRNA zu vergleichen, um zu verstehen, warum das letztere für die Erkennung gewisser Elemente vier RNA-Bindemotive benötigt, während das pflanzliche Homolog nurmehr zwei davon aufweist.

Die Synthese verschiedener, nicht-ribosomaler RNAs sollte es ermöglichen, die oben aufgestellte Vermutung einer allgemeinen RNA-Bindeeigenschaft des Proteins zu überprüfen.

Dem Protein kommt eine zentrale Rolle im Prozeß der Ribosomenassemblierung zu (Roger *et al.* (2003), Ginisty *et al.* (2000)), ohne daß seine genaue Wirkungsweise - über die Bindung der rRNA hinaus - bislang verstanden ist. Die Verfügbarkeit des rekombinanten Nukleolins kann die Aufklärung von Wechselwirkungen mit weiteren Komponenten, aber auch die Erforschung bislang unzureichend verstandener Eigenschaften des Proteins selbst - wie eine ungewöhnliche Helikase-Aktivität in der C-terminalen Domäne (Tuteja *et al.* (1995), Tuteja und Tuteja (1998)) - deutlich erleichtern. Die Produktion von Antikörpern gegen das pflanzliche Nukleolin und ihr Einsatz *in situ* könnte erhellen, ob wie für das tierische Homolog eine zweite Lokalisation außerhalb des Nukleolus in der Zellmembran existiert und welche Bedeutung derselben zukommt (Jordan *et al.* (1994) und Hovanessian *et al.* (2000)). Säuger Nukleolin konnte bislang nicht in voller Länge rekombinant produziert werden (Hanakahi *et al.* (1999)). Es ist denkbar, daß dieser Umstand von der Art des Expressionssystems abhängt und das Säuger-Homolog mit dem in dieser Arbeit angewandten IMPACT®-System ebenfalls rekombinant exprimierbar ist. Seine Verfügbarkeit in dieser Form würde auch die Erforschung medizinisch relevanter Eigenschaften des Proteins erleichtern. So gilt Nukleolin als zellulärer Wechselwirkungspartner GC-reicher Oligonukleotide,

die als antiproliferatives Agenz eingesetzt werden (Bates *et al.* (1999), Xu *et al.* (2001)). Auch ist bekannt, daß ihm eine Funktion als Autoantigen bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen zukommt (zur Übersicht: Srivastava und Pollard (1999)).

Um die Relevanz der Wechselwirkung zwischen Viroid-RNA und Nukleolin besser beurteilen zu können, wäre die Klonierung des Proteins aus der PSTVd-Wirtspflanze Tomate wünschenswert. Diese Klonierung sollte durch die mittlerweile bekannte Sequenz aus dem Nachtschattengewächs Tabak erleichtert werden. Noch aufschlußreicher für die Erklärung der nukleolären Lokalisation des Viroids wäre jedoch die Charakterisierung seiner Wechselwirkungen mit weiteren, nukleolären Proteinen; so kann Fibrillarin gegebenenfalls durch eine veränderte Expressionsstrategie - z.B. als N-terminale Intein-Chitinbindedomäne-Fusion, auf rekombinantem Wege produziert und anschließend in löslicher Form aufgereinigt werden.

Schließlich ist jedoch auch vorstellbar, daß PSTVd gar keines proteinösen Wechselwirkungspartners im Nukleolus bedarf, sondern selbst unter den dortigen Bedingungen aggregiert und so seine freie Konzentration senkt. Ein solches Phänomen ist zwar noch für keine Nukleinsäure nachgewiesen worden, jedoch werden diese i.d.R. nicht unter zellulären Salzbedingungen (≥ 100 mM KCl, ≥ 1 mM MgCl₂) und den dort herrschenden Konzentrationsverhältnissen (im Falle von PSTVd im Nukleolus ≥ 500 ng/ μ l) gehandhabt, sodaß ggf. vorhandene Aggregationstendenzen aus diesen Gründen vielleicht unentdeckt geblieben sind.

5. Literatur

Bates PJ, Kahlon JB, Thomas SD, Trent JO und Miller DM (1999), Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding, *J. Biol. Chem.* **274**, 26369-26377.

Baumstark T, Schröder AR und 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.

Bevilacqua PC und Cech TR (1996), Minor-groove recognition of double-stranded RNA by the double-stranded RNA-binding domain from the RNA-activated protein kinase PKR, *Biochemistry* **35**, 9983-9994.

Branch AD und Robertson HD (1984), A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's, *Science* **223**, 450-455.

Caizergues-Ferrer M, Mariottini P, Curie C, Lapeyre B, Gas N, Amalric F und Amaldi F (1989), Nucleolin from *Xenopus laevis*: cDNA cloning and expression during development, *Genes Dev.* **3**, 324-333.

Carrington JC und Ambros V (2003), Role of microRNAs in plant and animal development, *Science* **301**, 336-338.

Cech TR, Zaug AJ und Grabowski PJ (1981), *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence, *Cell* **27**, 487-496.

Chen X (2003), A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development, *Science*, published online 31 July 2003; 10.1126/science.1088060.

Chenchik A, Moqadam F und Siebert PD (1996), A new method for full-length cDNA cloning by PCR, in: *A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis and Synthesis*, Krieg P (Hrsg.), Wiley-Liss, Inc..

Delcasso-Tremousaygue D, Grellet F, Panabieres F, Ananiev ED und Deseny M (1988), Structural and transcriptional characterization of the external spacer of a ribosomal RNA nuclear gene from a higher plant, *Eur. J. Biochem.* **172**, 767-776.

Diener TO (Hrsg.) (1987), The Viroids, *Plenum Publishing Corporation*, New York.

Diener TO und Raymer WB (1967), Potato Spindle Tuber Virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid, *Science* **158**, 378-381.

Doelling JH, Gaudino RJ und Pikaard CS (1993), Functional analysis of *Arabidopsis thaliana* rRNA gene and spacer promoters *in vivo* and by transient expression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 7528-7532.

Doelling JH und Pikaard CS (1995), The minimal ribosomal RNA gene promoter of *Arabidopsis thaliana* includes a critical element at the transcription initiation site, *Plant J.* **8**, 683-692.

Doktycz MJ (1993), Discontinuous electrophoresis of DNA: adjusting DNA mobility by trailing ion net mobility, *Anal. Biochem.* **213**, 400-406.

Dunbar DA, Wormsley S, Lowe TM und Baserga SJ (2000), Fibrillarin-associated Box C/D small nucleolar RNAs in *Trypanosoma brucei*. Sequence conservation and implications for 2'-O-ribose methylation of rRNA, *J. Biol. Chem.* **275**, 14767-14776.

Dundr M, Hoffmann-Rohrer U, Hu Q, Grummt I, Rothblum LI, Phair RD und Misteli T (2002), A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase *in vivo*, *Science* **298**, 1623-1626.

Echeverria M, Penon P und Deseny M (1994), Plant ribosomal DNA external spacer binding factors: a novel protein binds specifically to a sequence close to the primary pre-rRNA processing site, *Mol. Gen. Genet.* **243**, 442-452.

Fatica A und Tollervey D (2002), Making ribosomes, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 313-318.

Gerbi SA, Borovjagin AV und Lange TS (2003), The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 318-325.

Ghisolfi-Nieto L, Joseph G, Puvion-Dutilleul F, Amalric F und Bouvet P (1996), Nucleolin is a sequence-specific RNA-binding protein: characterization of targets on pre-ribosomal RNA, *J. Mol. Biol.* **260**, 34-53.

Ghosh S, Ghosh R, Das P und Chattopadhyay D (2001), Expression and purification of recombinant *Giardia* fibrillarin and its interaction with small nuclear RNAs, *Protein Expr. Purif.* **21**, 40-48.

Ginisty H, Sicard H, Roger B und Bouvet P (1999), Structure and functions of nucleolin, *J. Cell Sci.*, **112**, 761-772.

Ginisty H, Serin G, Ghisolfi-Nieto L, Roger B, Libante V, Amalric F und Bouvet P (2000), Interaction of nucleolin with an evolutionarily conserved pre-ribosomal RNA sequence is required for the assembly of the primary processing complex, *J. Biol. Chem.* **275**, 18845-18850.

González-Melendi P, Wells B, Beven AF und Shaw PJ (2001), Single ribosomal transcription units are linear, compacted Christmas trees in plant nucleoli, *Plant J.* **27**, 223-233.

Grandi P, Rybin V, Bassler J, Petfalski E, Strauss D, Marzioch M, Schafer T, Kuster B, Tschochner H, Tollervey D, Gavin A-C und Hurt E (2002), 90S pre-ribosomes include the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNP, and 40S subunit processing factors but predominantly lack 60S synthesis factors, *Mol. Cell*, **10**, 105-115.

Grewal SIS und Moazed D (2003), Heterochromatin and epigenetic control of gene expression, *Science* **301**, 798-802.

- Gross HJ, Domdey H, Lossow C, Jank P, Raba M, Alberty H und Sanger HL (1978), Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid, *Nature* **273**, 203-208.
- Guerrier Takada C und Altman S (1984), Catalytic activity of an RNA molecule prepared by transcription *in vitro*, *Science* **223**, 285-286.
- Haas B, Klanner A, Ramm K und Sanger HL (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.
- Hammond RW (1992), Analysis of the virulence modulating region of Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) by site-directed mutagenesis, *Virology* **187**, 654-662.
- Hanakahi LA, Sun H und Maizels N (1999), High affinity interactions of nucleolin with G-G-paired rDNA, *J. Biol. Chem.* **274**, 15908-15912.
- Harders J, Lukacs N, Robert-Nicoud M, Jovin TM und 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.
- Harnpicharnchai P, Jakovljevic J, Horsey E, Miles T, Roman J, Rout M, Meagher D, Imai B, Guo Y, Brame CJ, Shabanowitz J, Hunt DF und Woolford JL Jr. (2001), Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates, *Mol. Cell.*, **8**, 505-515.
- Hecker R (1989), Die Struktur der intermediären Ribonukleinsäuren bei der Replikation von Viroiden. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Hiddinga HJ, Crum CJ, Hu J und Roth DA (1988) Viroid-induced phosphorylation of a host protein related to a dsRNA-dependent protein kinase, *Science* **241**, 451-453.
- Hovanessian AG, Puvion-Dutilleul F, Nisole S, Svab J, Perret E, Deng JS und Krust B (2000), The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton, *Exp. Cell Res.* **261**, 312-328.
- Itaya A, Matsuda Y, Gonzales R A, Nelson RS und Ding B (2002), Potato spindle tuber viroid strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato, *Molec. Plant-Microbe Interact.* **15**, 990-999.
- Jammi NV und Beal PA (2001), Phosphorylation of the RNA-dependent protein kinase regulates its RNA-binding activity, *Nucl. Acids Res.* **29**, 3020-3029.
- Jordan P, Heid H, Kinzel V und Kubler D (1994), Major cell surface-located protein substrates of an ecto-protein kinase are homologs of known nuclear proteins, *Biochemistry* **33**, 14696-14706.
- Krishna VM, Janaki N und Ramaiah KVA (1997), Wheat germ initiation factor 2 (WG-eIF2) decreases the inhibition in protein synthesis and eIF2B activity of reticulocyte lysates mediated by eIF2 α phosphorylation, *Arch. Biochem. Biophys.* **346**, 28-36.

- Laemmli UK (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.
- Langland JO, Jin S, Jacobs BL und Roth DA (1995), Identification of a plant-encoded analog of PKR, the mammalian double-stranded RNA-dependent protein kinase, *Plant Physiol.* **108**, 1259-1267.
- Langland JO, Langland LA, Browning KS und Roth DA (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.
- Lapeyre B, Bourbon H und Amalric F (1987), Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1472-1476.
- Lin CH, Huang HM, Hsieh M, Pollard KM und Li C (2002), Arginine methylation of recombinant murine fibrillarin by protein arginine methyltransferase, *J. Protein Chem.* **21**, 447-453.
- Llave C, Kasschau KD, Rector MA und Carrington JC (2002)¹, Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants, *Plant Cell* **14**, 1605-1619.
- Llave C, Xie Z, Kasschau KD und Carrington JC (2002)², Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA, *Science* **297**, 2053-2056.
- Lu C und Fedoroff N (2000), A mutation in the *Arabidopsis* HYL1 gene encoding a dsRNA binding protein affects responses to abscisic acid, auxin, and cytokinin, *Plant Cell* **12**, 2351-2366.
- Manche L, Green SR, Schmedt C und Mathews MB (1992), Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI, *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5238-5248.
- Nenad B, Nissen P, Hansen J, Moore PB und Steitz TA (2000), The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution, *Science* **289**, 905-920.
- Nissen P, Ippolito JA, Ban N, Moore PB und Steitz TA (2001), RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4899-4903.
- Ogle JM, Brodersen DE, Clemons WM Jr., Tarry MJ, Carter AP und Ramakrishnan V (2001), Recognition of Cognate Transfer RNA by the 30S Ribosomal Subunit, *Science* **292**, 897-902.
- Owens RA, Thompson SM und Steger G (1991), Effects of random mutagenesis upon Potato Spindle Tuber Viroid replication and symptom expression, *Virology* **185**, 18-31.
- Owens RA, Steger G, Hu Y, Fels A, Hammond RW und Riesner D (1996), RNA structural features responsible for Potato Spindle Tuber Viroid pathogenicity, *Virology* **222**, 144-158.
- Owens RA, Thompson SM und Kramer M (2003), Identification of neutral mutants surrounding two naturally occurring variants of *Potato spindle tuber viroid*, *J. Gen. Virol.* **84**, 751-756.

- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC und Weigel D (2003), Control of leaf morphogenesis by microRNAs, *Nature* **425**, 257-263.
- Papaefthimiou I, Hamilton AJ, Denti MA, Baulcombe DC, Tsagris M und Tabler M (2001), Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing, *Nucl. Acid Res.* **29**, 2395-2400.
- Pearson DL, Reimonenq RD und Pollard KM (1999), Expression and purification of recombinant mouse fibrillarin, *Protein Expr. Purif.* **17**, 49-56.
- Phair RD und Misteli T (2000), High mobility of proteins in the mamalian cell nucleus, *Nature* **404**, 604-609.
- Politz JC, Tuft RA, Pederson T und Singer RH (1999), Movement of nuclear poly(A) RNA throughout the interchromatin space in living cells, *Curr. Biol.* **9**, 285-291.
- Politz JC, Yarovoi S, Kilroy SM, Gowda K, Zwieb C und Pederson T (2000), Signal recognition particle components in the nucleolus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 55-60.
- Ramos A, Grünert S, Adams J, Micklem DR, Proctor MR, St Johnston D und Varani G (2000), RNA recognition by a Staufen double-stranded RNA-binding domain, *EMBO J.* **19**, 997-1009.
- Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B und Bartel DP (2002), Prediction of plant microRNA targets, *Cell* **110**, 513-520.
- Riesner D, Klaff P, Steger G und Hecker R (1987), Viroids. Subcellular location and structure of replicative intermediates, *Ann NY Acad. Sci.* **503**, 212-237.
- Riesner D und Gross HJ (1985), Viroids, *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 531-564.
- Roger B, Moisand A, Amalric F und Bouvet P (2003), Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly, *Chromosoma* **111**, 399-407.
- Ryter JM und Schultz SC (1998), Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J.* **17**, 7505-7513.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989), *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sapp M, Knippers R und Richter A (1986), DNA binding properties of a 110 kDa nucleolar protein, *Nucl. Acids Res.* **14**, 6803-6820.
- Schindler IM und Mühlbach HP (1992), Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation, *Plant Science* **84**, 221-229.
- Schmedt C, Green SR, Manche L, Taylor DR, Ma Y und Mathews MB (1995), Functional characterization of the RNA-binding domain and motif of the double-stranded RNA-dependent protein kinase DAI (PKR), *J. Mol. Biol.* **249**, 29-44.

- Schmitz A und Riesner D (1998), Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different Potato Spindle Tuber Viroid strains, *RNA* **4**, 1295-1303.
- Schnölzer M, Haas B, Ramm K, Hofmann H und Sanger HL (1985), Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV), *EMBO J.* **4**, 2181-2190.
- Schramke V und Allshire R (2003), Hairpin RNAs and retrotransposon LTRs effect RNAi and chromatin-based gene silencing, *Science* **301**, 1069-1074.
- Schumacher J, Randles JW und Riesner D (1983¹), A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids, *Anal. Biochem.* **135**, 288-295.
- Schumacher J, Sanger HL und Riesner D (1983²), Subcellular localization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue, *EMBO J.* **2**, 1549-1555.
- Schumacher J, Meyer N, Riesner D und Weidemann HL (1986), Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by „Return“-gel electrophoresis, *J. Phytopathology* **115**, 332-343.
- Shah SB, Terry CD, Wells DA und DiMario PJ (1996), Structural changes in oocyte nucleoli of *Xenopus laevis* during oogenesis and meiotic maturation, *Chromosoma* **105**, 111-121.
- Srivastava M und Pollard HB (1999), Molecular dissection of nucleolin´s role in growth and cell proliferation: new insights, *FASEB J.* **13**, 1912-1922.
- Steinigk MS (2003), Stabilität, Pathogenität und Uberwachungsverhalten verschiedener Varianten des Kartoffelspindelknollenviroids (PSTVd), *Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.*
- Steitz TA (1999), RNA Recognition by Proteins, 427-450 in *The RNA World*, Gesteland RF, Cech TR und Atkins JF (Hrsg.), Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP und Zamore PD (2003), A biochemical framework for RNA silencing in plants, *Genes Dev.* **17**, 49-63.
- Terns MP und Terns RM (2002), Small nucleolar RNAs: versatile *trans*-acting molecules of ancient evolutionary origin, *Gene Expr.* **10**, 17-39.
- Tong CG, Reichler S, Blumenthal S, Balk J, Hsieh HL und Roux SJ (1997), Light regulation of the abundance of mRNA encoding a nucleolin-like protein localized in the nucleoli of pea nuclei, *Plant Physiol.* **114**, 643-652.
- Tornero P, Conejero V und Vera P (1997), Identification of a new pathogen-induced member of the Subtilisin-like processing protease family from plants, *J. Biol. Chem.* **272**, 14412-14419.
- Tuteja N, Huang NW, Skopac D, Tuteja R, Hrvatic S, Zhang J, Pongor S, Joseph G, Faucher C, Amalric F und Falaschi A (1995), Human DNA helicase IV is nucleolin, an RNA helicase modulated by phosphorylation, *Gene* **160**, 143-148.

- Tuteja R und Tuteja N (1998), Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 407-436.
- Watson JD und Crick FHC (1953), Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid, *Nature* **171**, 737-738.
- Williams BR (1999), PKR; a sentinel kinase for cellular stress, *Oncogene* **18**, 6112-6120.
- Wimberly BT, Brodersen DE, Clemons WM Jr., Morgan-Warren RJ, Carter AP, Vonnrhein C, Hartsch T und Ramakrishnan V (2000), Structure of the 30 S ribosomal subunit, *Nature* **407**, 327-339.
- Xu X, Hamhouyia F, Thomas SD, Burke TJ, Girvan AC, McGregor WG, Trent JO, Miller DM und Bates PJ (2001), Inhibition of DNA replication and induction of S phase cell cycle arrest by G-rich oligonucleotides, *J. Biol. Chem.* **276**, 43221-43230.
- Yusupov MM, Yusupova GZ, Baucom A, Lieberman K, Earnest TN, Cate JHD und Noller HF (2001), Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution, *Science* **292**, 883-896
- Zuker M (2003), Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction, *Nucl. Acids Res.* **31**, 3406-3415.

6. Anhang

6.1 Neuer Expressed Sequence Tag aus *Lycopersicon esculentum*

Dargestellt ist der längst-translatierbare Open reading frame. Stoppcodons sind als rote Sternchen gekennzeichnet. Der Beginn der Aminosäuresequenz (EYAQKMNYA) wurde im Text (3.6) nicht dargestellt, da er der Bindestelle des verwendeten genspezifischen Primers *GSPA* entspricht und insofern keine bislang unbekannt Sequenz repräsentiert.

```

      E Y A Q K M N Y A I P Q Y E C E R Y D S
1    gagtatgctcagaagatgaattatgcaatcccacaatatgaatgcgagaggtatgactcc 60
      E S K I I S F T C T V D V G G M K Y I G
61   gaaagcaaaattatatcatttacatgtactggtgacgtagggggaatgaaatatattgga 120
      A A A R T K K E A E I K A A R T A L L A
121  gcagcagctagaacgaagaaggaagcagagatcaaagctgctcgaactgcattggtggct 180
      V Q S S G F A P N Y S S Y T V V P M K K
181  gttcagtctagcgggttttgcgcctaattattcttcatacactgtcgttccaatgaagaag 240
      V T D L A I S N Q E S A A A L K P K K H
241  gtcacagatgttgcaatcagcaatcaggaggtgcagcagctctgaaaccaagaacac 300
      R F K K K Q T R N F S D V S Y H V R T K
301  agattcaagaaaaagcagacaaggaatcttcagatgtcagttatcatgtacgcacaaag 360
      I F G D S E V Q M V N Q A K P E M H E N
361  attttgggtgactcgggaagttcagatggtaaatcaagctaaaccagagatgcatgaaaat 420
      A A V M T P G T G S G P A P F A G T M G
421  gctgctgtgatgactccaggtacaggatctggacctgcaccttttgcaggcactatgggt 480
      D L V P S N N L S S D Y G T S N I G I N
481  gatctagttccatccaacaatttgagttctgattatggaacttcaaattggaatcaac 540
      S Q C G G G V T T E G N A V I G V D Y G
541  tctcagtgtgggtggaggagtaacgactgagggaaatgccgttattggagttgattatgga 600
      T S K I G I N S Q C G G G V T T E G N A
601  acttcaaaaattggaatcaactctcagtggtggaggagtaacgactgagggaaatgcc 660
      V I G V E Q V T S E V A P V A W N D N L
661  gttattggattgagcaggttaacttcagaggtggcaccagttgcttggaaacgacaattct 720
      H V Q D L H L L H E N A A V M T Q G T G
721  catgtacaggacctgcaccttttgcattgaaaatgctgctgtgatgactcaaggtacagga 780
      S G P A P F A G T M G D L V P S N N C G
781  tccggacctgcaccttttgcaggcactatgggtgatctagttccatccaacaattgtgggt 840
      S D Y G T S N L G I N S Q C G E G A T T
841  tctgattatggaacttcaaaccttggaaatcaactctcagtggtgaaggagctacaacc 900
      E G N A G I G V E Q V T S E V A P V A C C
901  gagggaaatgccggtattggagttgagcaggttaacttcagaggtggcaccagttgcttgt 960
      N D N L H V L * M Q I K D D I Q T W R Q
961  aacgacaaccttcatgtgctatagatgcagatcaaggacgacatacaaacatggaggcag 1020
      K Y L K T C S F C R I S Y I R W W E G Q
1021  aaatatcttaaacatggttctgttttgcaggattagctatatcagatggtgggaaggacag 1080
      F * I I E N T * A A Q K K I R E L V K L
1081  ttttagattatagagaatacataggccgctcaaaaaaaaaattcgcgagttggttaagctt 1140
      F I G T S R L K E L L T A C F A R V L *
1141  ttcattggaacatccagattgaaagagttggtgacggcgtgtttcgcagagtggtataa 1200
      L L * L L V H A K C V V * L H S L R C M
1201  cttttatagttactagtagcatgccaaatgtgtggtgtagttgcacagctctcaggtgcatg 1260
      N Q S * H Y L V Y F I C L N I * * G N L
1261  aatcagctctgacattacttggtttacttcatttgcattgaacatttgatgaggtaacctg 1320
      F Y D N I * V F M L L F T I G R S N I L
1321  ttctatgacaatatttaagtatttatgctgttatttacaattggaagaagtaacatatta 1380
      A V K A K P A R A A R A L * * V V L G
1381  gcagttaaaaaaaaaacctgcccgggcggcctcgagccctatagtgagtcgtattagga 1440
      W N H * C G R L Q V D H M G X L P T R W
1441  tggaaatcactagtgccggcctgcaggtcgaccatatgggagmgctcccaacgcggttg 1500
      M H S L S I L * C H L N K
1501  atgcatagcttgagtattctatagtgtcacctaataagh 1540

```

6.2 Sequenzen der rekombinant exprimierten Arabidopsis-Proteine

6.2.1 Nukleolin GenBank: cDNA-Acc.-No. AP001303, Protein-Acc.-No. BAB02219

```

M T K P L K K G K R D A E E D L D M Q V
1 atgacaaagccactcaagaaaggaagagagatgacggaagaggatttggacatgcaagtt 60
T K K Q K K E L I D V V Q K E K A E K T
61 acgaagaagcagaagaaagagttgattgatgttggttcagaaggagaaagctgagaaaacg 120
V P K K V E S S S S D A S D S D E E E K
121 gtacctaagaaggtagagagtagcagttctgacgcttctgattctgatgaagaggagaag 180
D E S S S E E E D D S S S D E E I A P A
181 gatgagcttcttctgaagaggaggatgactcttcttcagatgaggaattgcgctgcg 240
K K R P E P I K K A K V E S S S D D D
241 aagaagcagaccagaacctattaagaaggctaaggtagagagcagctcatctgatgat 300
S T S D E E T A P V K K Q P A V L E K A
301 tctacttcagacgaggaactgccctgtgaagaagcaaccagcagtccttgagaaggct 360
K V E S S S S D D D S S S D E E T V P V
361 aaggtagagagcagctcatctgatgatgattcttcttcagacgaggaactgtccctgtg 420
K K Q P A V L E K A K A I E S S S S D D D
421 aagaagcaaccagcagtccttgagaaggctaagatagagagcagctcatctgatgatgat 480
S S S D E E T V P M K K Q T A V L E K A
481 tcttcttcagacgaggaactgtccctatgaagaagcaaacagcagtccttgagaaggct 540
K A E S S S S D D G S S S D E E P T P A
541 aaggcagagagcagttcatccgacgatggatcttcttcggacgaggaacccaccctgca 600
K K E P I V V K K D S S D E S S S D E E
601 aagaagaaccaatcgttgtaagaagacagctcagatgaatcttcttcagatgaggaa 660
T P V V K K K P T T V V K D A K A E S S
661 accccggttggaagaagaagccaacacagttgtaaggatgccaaaggcagaagcagct 720
S S E E E S S S D C D E P T P A K K P T V
721 tcatcagaggaggaatcttcttcggacgatgaaccaacacctgccaaagaagccaacagtt 780
V K N A K P A A K D S S S S E E D S D E
781 gtaagaatgctaaaccagctgaaaagattcatcatcctcagaggaagattctgatgag 840
E E S D D E K P P T K K A K V S S K T S
841 gaggaagtgatgatgaaaaacctcctacgaagaaggctaaagtttcatcaaaaacttct 900
K Q E S S S S D E S S D E S D K E E S K D
901 aaacaagaaagctctagtgaatctagtgaatctgataaggaggagagtaagat 960
E K V T P K K K D S D V E M V D A E Q K
961 gagaaagtgcaccaagaaaaaggattctgatggtgaaatggtggatgcagagcagaaa 1020
S N A K Q P K T P T N Q T Q G G S K T L
1021 tctaatgcaaagcagccgaagacacctaatacagactcagggaggatcaaagacgcta 1080
F A G N L S Y Q I A R S D I E N F F K E
1081 ttgctggaatcttccatcaaattgcgagatctgacatagagaatttcttcaaagaa 1140
A G V V D V R L S S F D D G S F K G Y
1141 gctggtaagttgctgatgtagactttcttcatttgatgatgggagttttaaggat 1200
G H I E F A S P E E A Q K A L E M N G K
1201 gggcatattgaatttgcttctccagaagaagctcagaaggcattggaatgaacggtaaa 1260
L L L G R D V R L D L A N E R G T P R N
1261 ttgttactaggccgcatggtcgtcttgatcttgctaacgagaggggtactccacgaaac 1320
S N P G R K G E G S Q S R T I Y V R G F
1321 agcaatcctggtcgaaaggagaaggaagccaaagtcgaacgatttacgttagaggattc 1380
S S S L G E D E I K K E L R S H F S K C
1381 agttcttctctggcgaagatgaaatcaagaagagttgagaagtcattttagcaagtgt 1440
G E V T R V H V P T D R E T G A S R G F
1441 ggagaggtgacaagggttcatgttccaacagatcgtgagactggtgcttccaggggcttt 1500
A Y I D L T S G F D E A L Q L S G S E I
1501 gcttacatagatttgacgagtgattcgatgagcggttgcaactgagcggaaagtgaatt 1560
G G G N I H V E E S R P R D S D E G R S
1561 ggaggaggaacatacatgtggaagagctagaccaagagatagtgatgagggccgttcc 1620
S N R A P A R G A P R G R H S D R A P R
1621 tcaaacagagcacctgctagaggacacctcgtggccgtcactcagatagagcacctcgt 1680
G G R F S D R A P R G R H S D R G A P R
1681 ggaggacgtttctcggatagagcaccacgtggacgtcactcagatagaggagcacctcgt 1740
G R F S T R G R G P S K P S V M E S S K
1741 ggccgtttcagtagcgtggaagaggaccagcaaccaagtgtaatggaatcatccaaa 1800
G T K T V F N D E E *
1801 gggacgaagacggctctttaatgatgaagagtag 1833

```

6.2.2 Fibrillarlin GenBank: cDNA-Acc.-No. NM_124626, Protein-Acc.-No. NP_568772

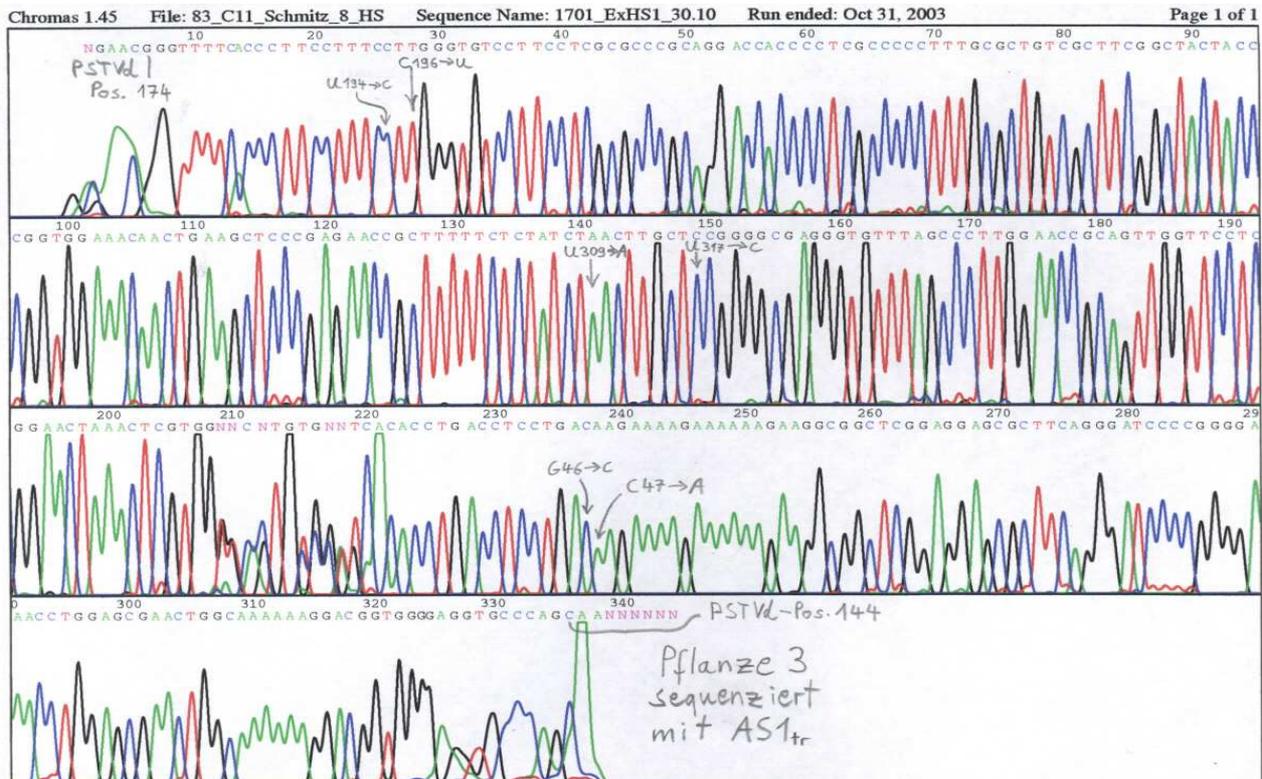
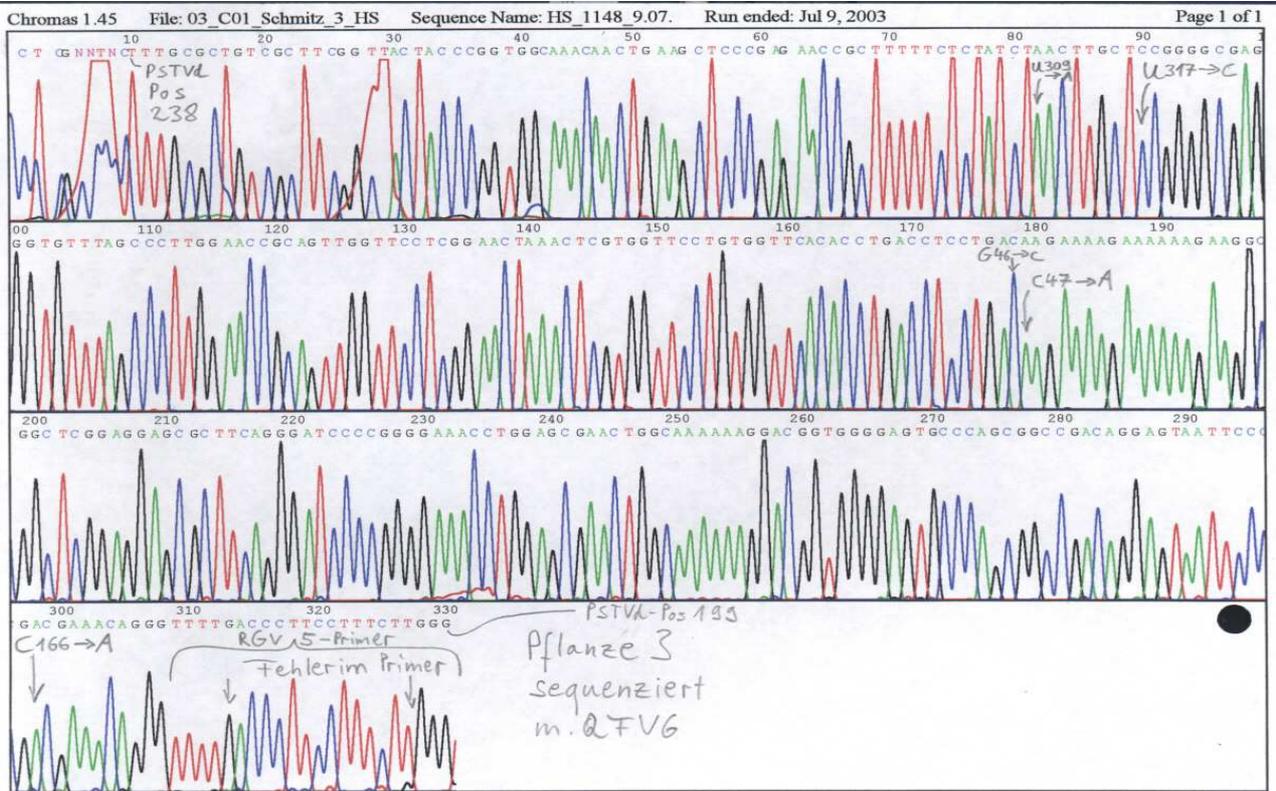
```

M R P P V T G G R G G G G F R G G R D G
1 atgagacccccagttacaggaggacgtggtggtggaggattcagaggtggaagagatggt 60
G G R G F G G G R S F G G G R S G D R G
61 ggtggaagaggttttggaggtggaagaagctttggaggaggccgtagtggtgacagaggc 120
R S G P R G R G R G A P R G R G G P P R
121 cgtagtgggcctcgcggcagaggacgtggtgctgcctcgtggtcgtggaggaccacctcgt 180
G G M K G G S K V I V E P H R H A G V F
181 ggaggaatgaaaggaggaagcaaagtgattggtgagcctcacagacatgcgggagtggtt 240
I A K G K E D A L V T K N L V P G E A V
241 attgctaagggtaaagaagatgctcttgtcactaagaatttggttcctggtgaagctggt 300
Y N E K R I S V Q N E D G T K V E Y R V
301 tacaatgagaagagaatctctgttcagaatgaagatggaactaagggttgaatacagagtt 360
W N P F R S K L A A A I L G G V D N I W
361 tggaatccgtttagatctaagttagctgctgcaattcttggtggtgctcgacaacatttgg 420
I K P G A K V L Y L G A A S G T T V S H
421 atcaaacctggtgccaaagttcttacttgggtgctgcttctgggaccactgtctctcat 480
V S D L V G P E G C V Y A V E F S H R S
481 gtttctgacctcgttggccctgagggatgtgtttatgctggtgagtttctcatagaagt 540
G R D L V N M A K K R T N V I P I I E D
541 ggtagagatttggtgaacatggccaagaagagaactaacgttattccaatcattgaagat 600
A R H P A K Y R M L V G M V D V I F S D
601 gctagacatccggctaagtacagaatgctcgtgggcatggttgatgtcatattctctgat 660
V A Q P D Q A R I L A L N A S F F L K T
661 gttgctcagccagatcaggcaagaatcttggccctgaatgcctcatttttctcaaaact 720
G G H F V I S I K A N C I D S T V A A E
721 ggtggacactttgttatctcaatcaaggccaactgtatcgactctacagttgcagcagaa 780
A V F Q S E V K K L Q Q E Q F K P A E Q
781 gcagtcttcagagcgaggtgaagaagctgcaacaagagcagtttaagccagcagaacag 840
V T L E P F E R D H A C V V G G Y R M P
841 gtgactctcgagccgtttgagcgtgaccatgctgtgttggtggttaccgcatgccg 900
K K Q K T P A S *
901 aagaacaaaagacccccagcctcatag 927

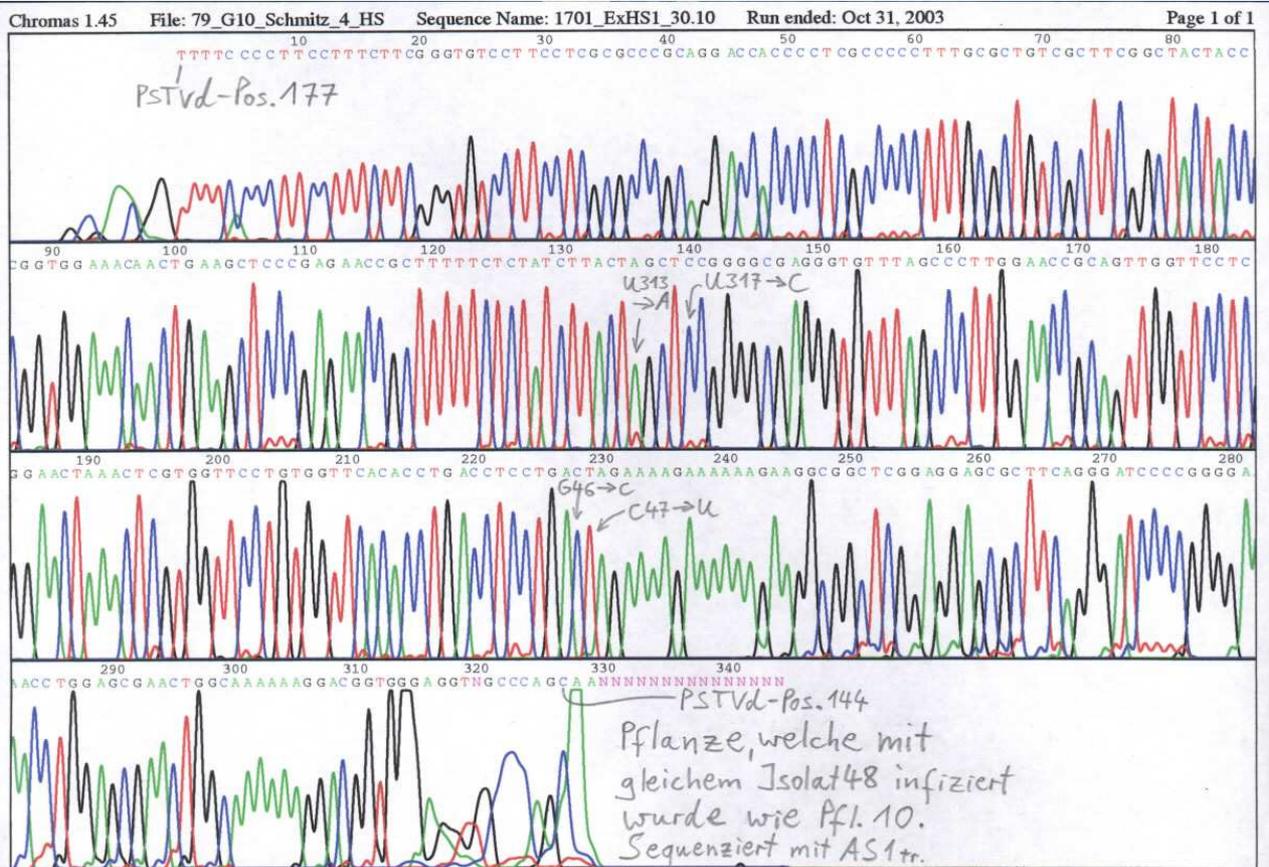
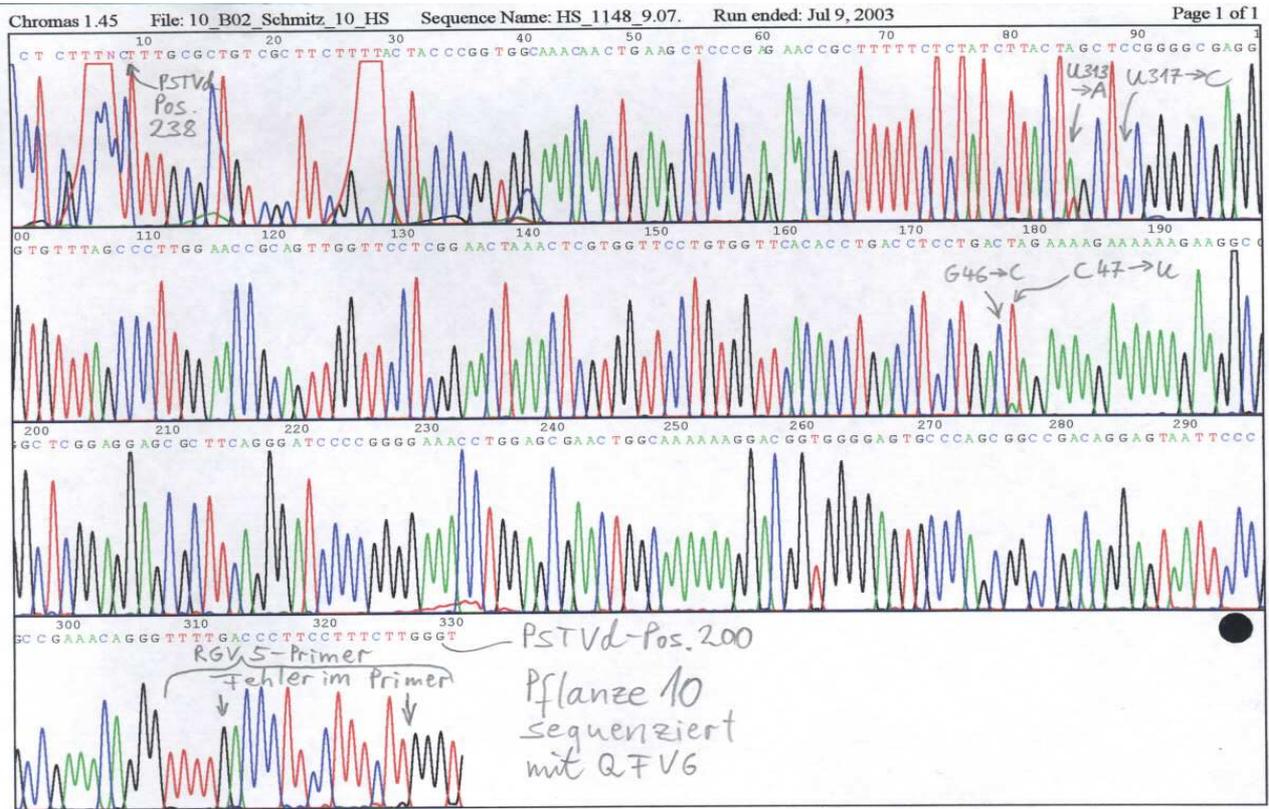
```

6.3 Neue Sequenzvarianten von PSTVd

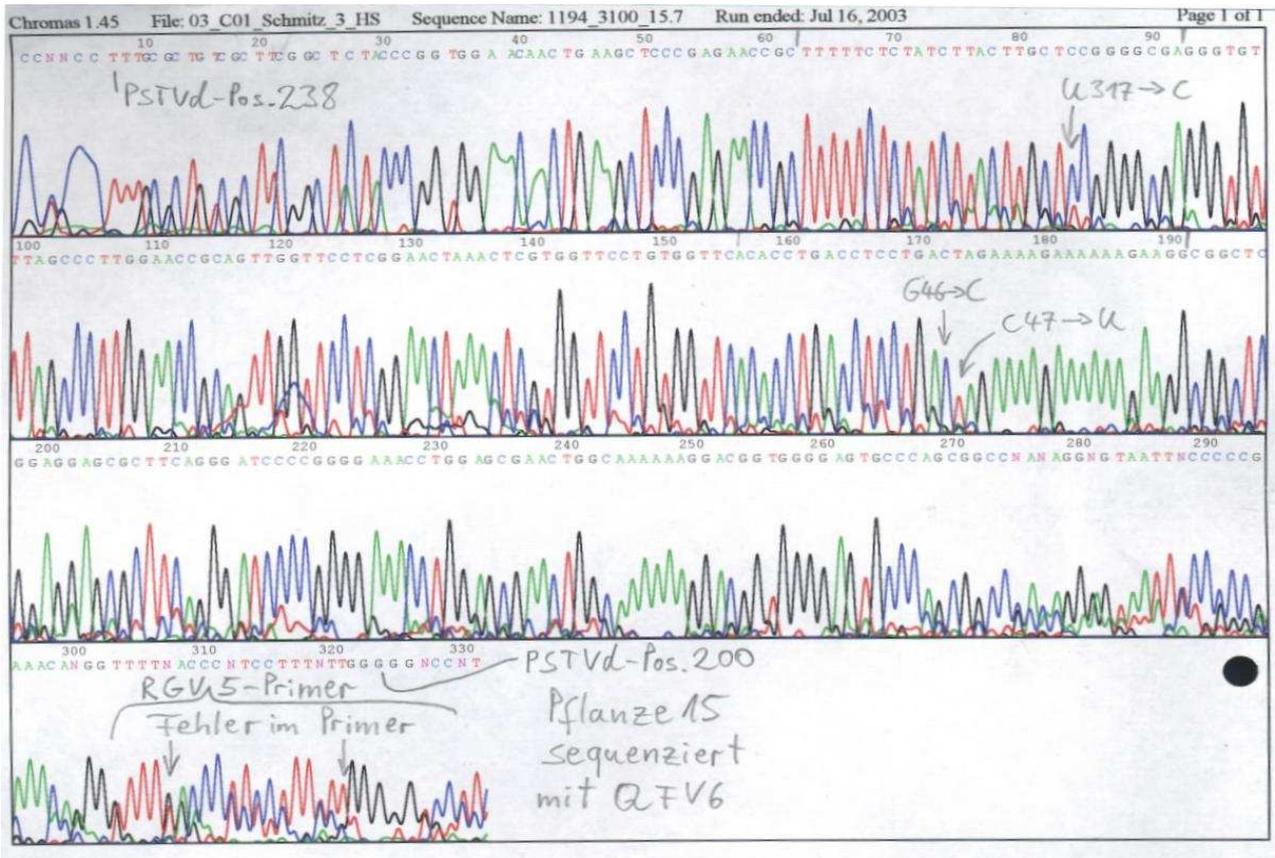
Pflanze 3: G₄₆→C, C₄₇→A, C₁₆₆→A, U₁₉₄→C, C₁₉₆→U, U₃₀₉→A, U₃₁₇→C



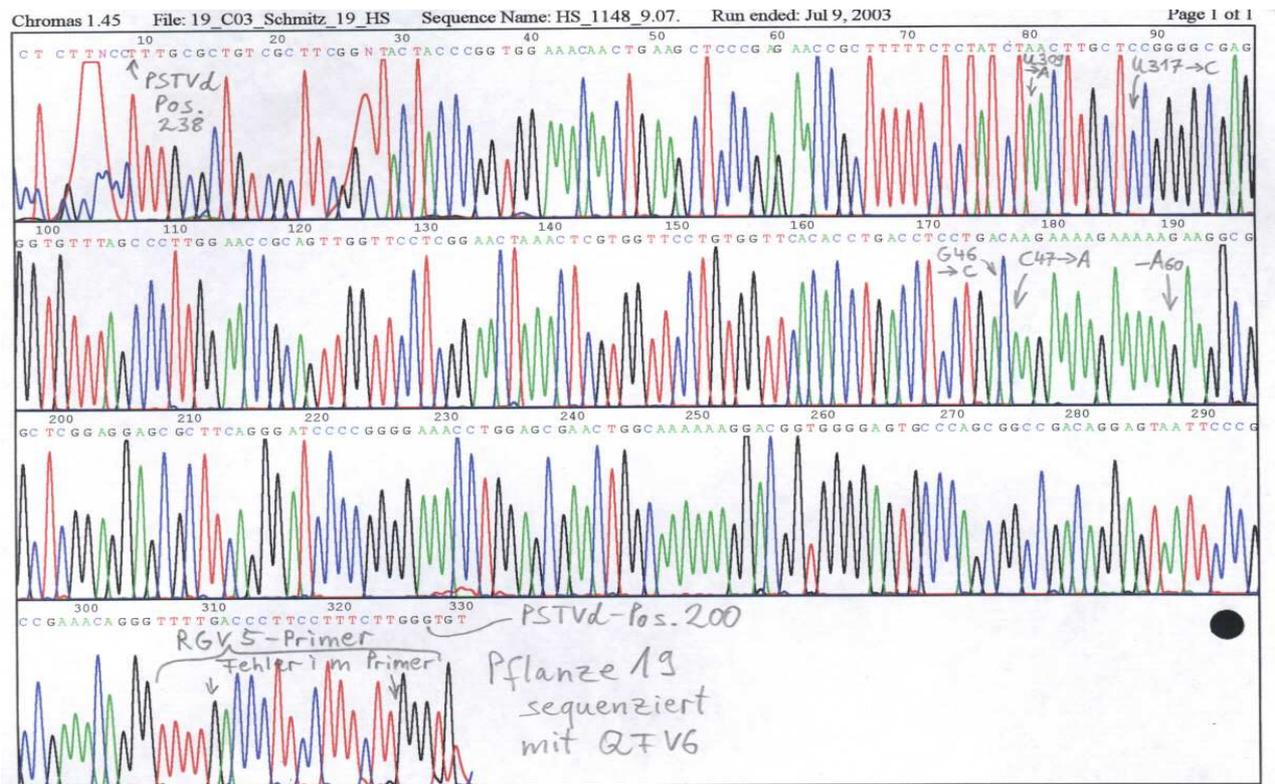
Pflanze 10: G₄₆→C, C₄₇→U, U₃₁₃→A, U₃₁₇→C



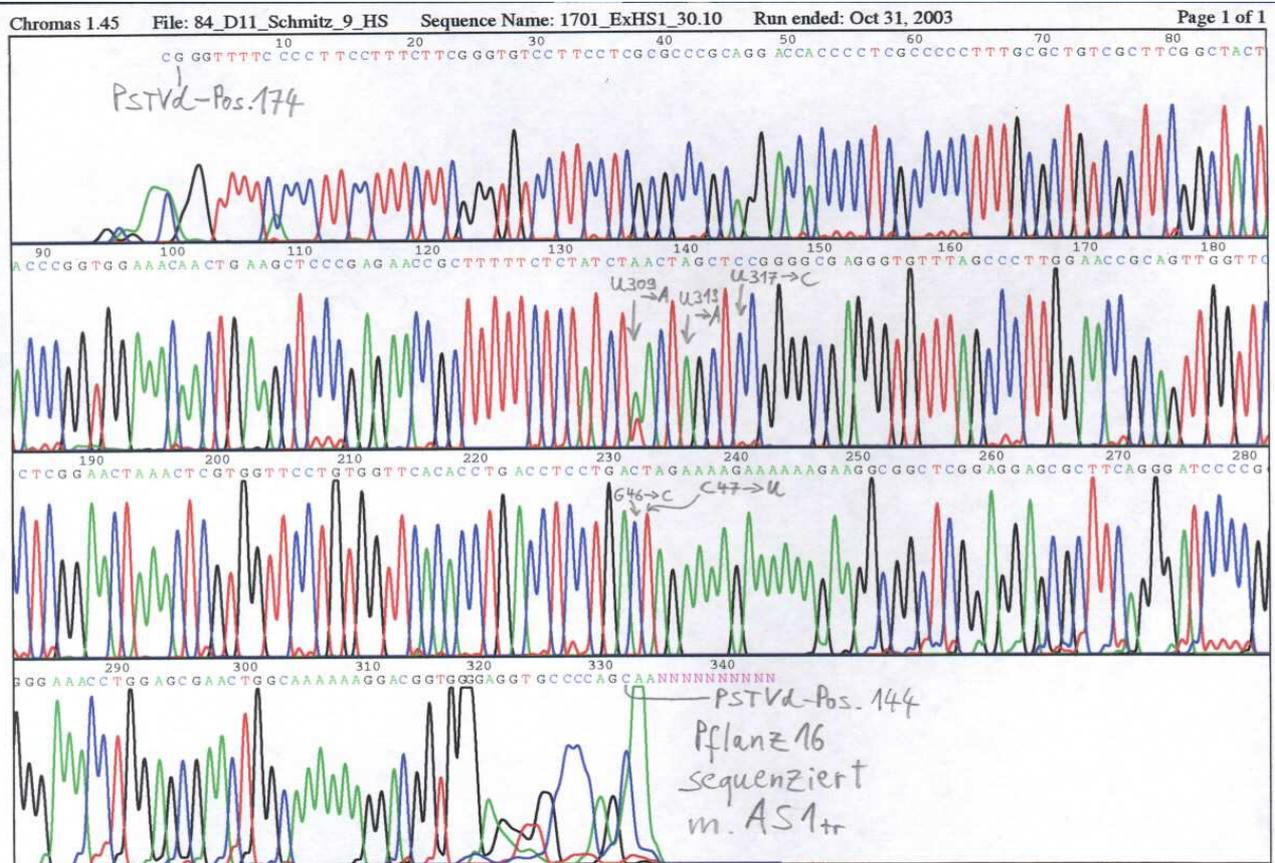
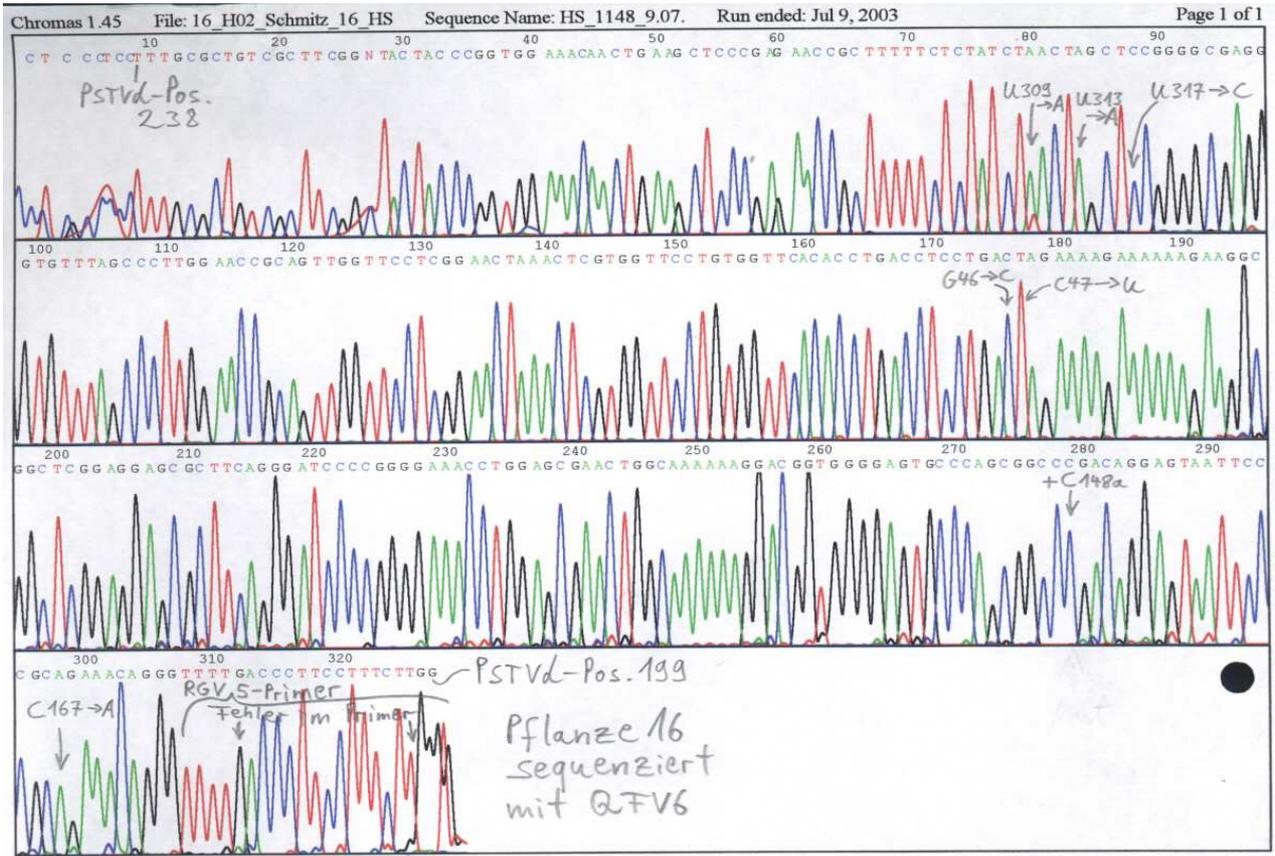
Pflanze 15: G₄₆→C, C₄₇→U, U₃₁₇→C



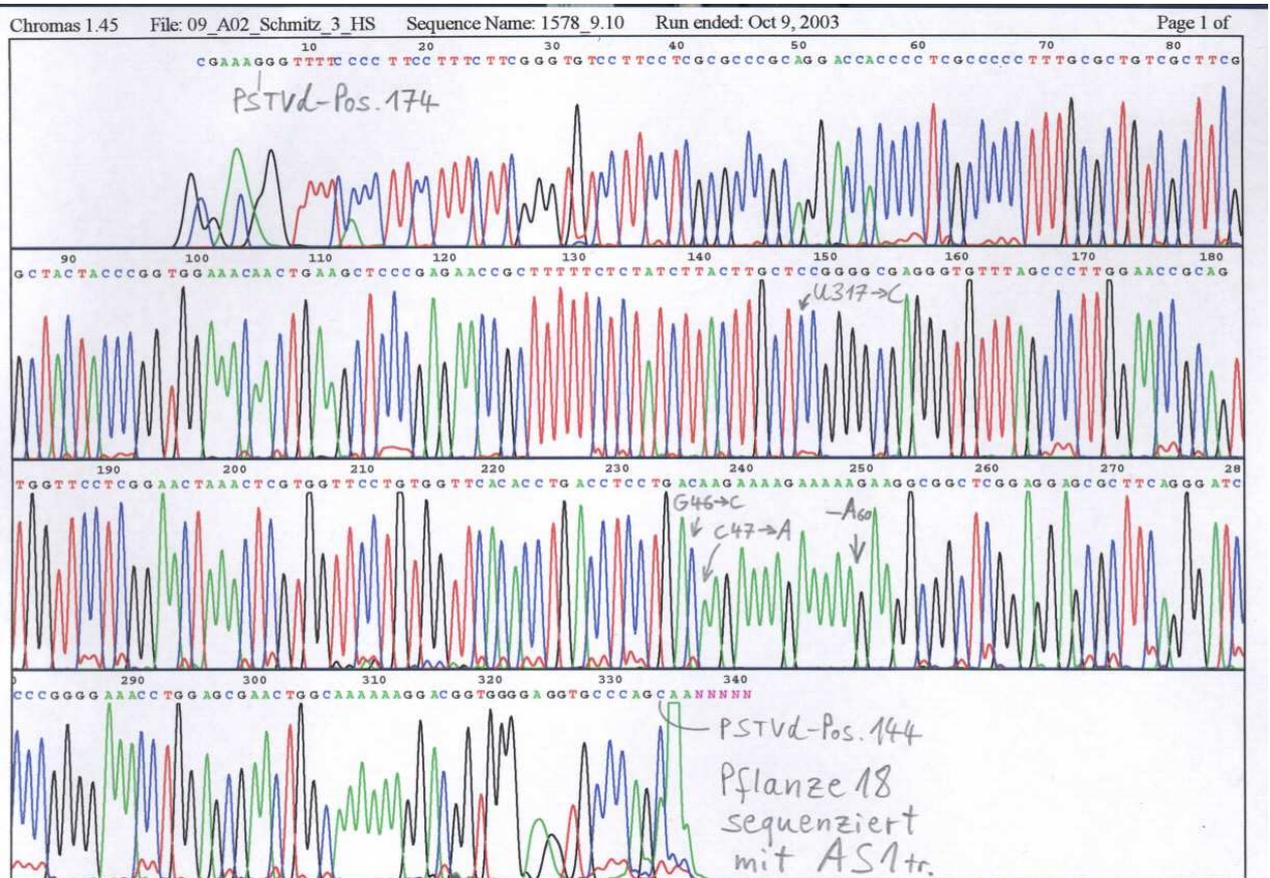
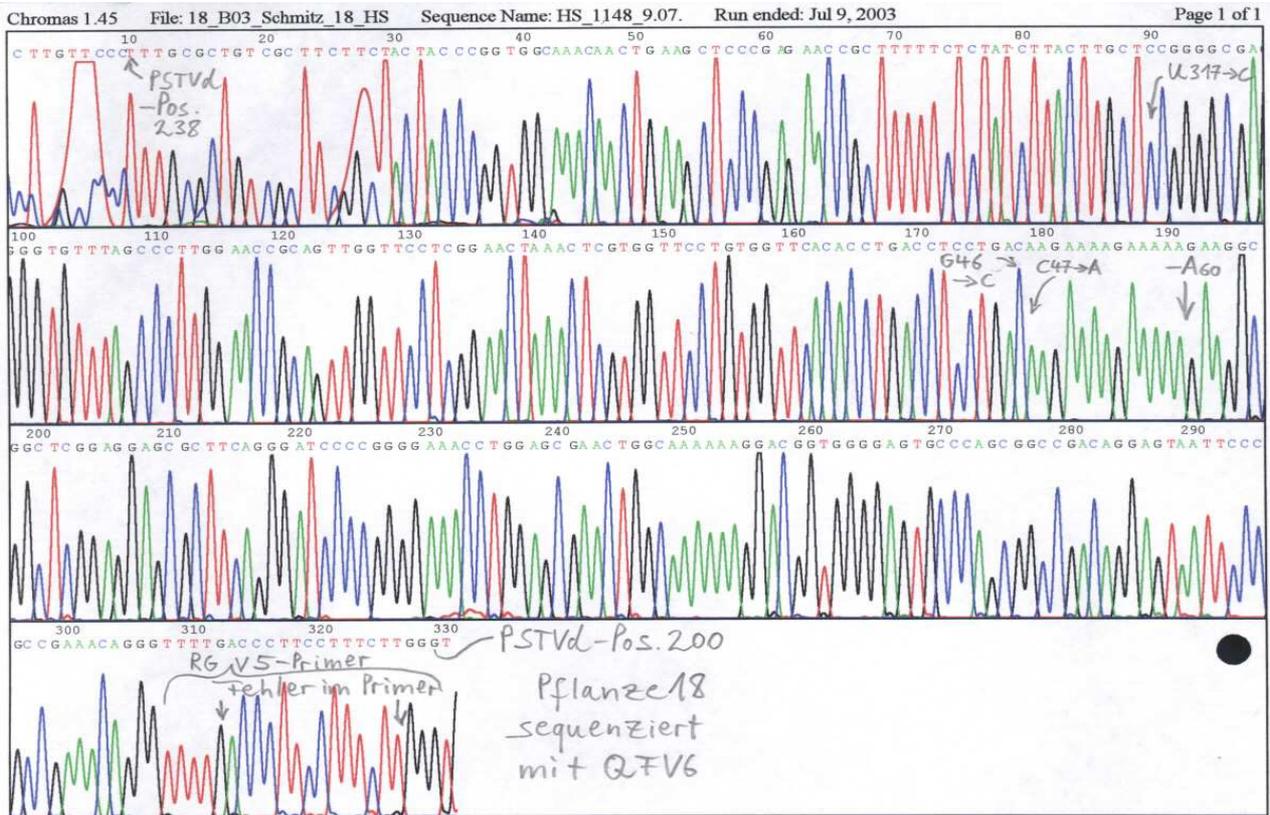
Pflanze 19: G₄₆→C, C₄₇→A, -A₆₀, U₃₀₉→A, U₃₁₇→C



Pflanze 16: G₄₆→C, C₄₇→U, +C_{148a}, C₁₆₇→A, U₃₀₉→A, U₃₁₃→A, U₃₁₇→C



Pflanze 18: G₄₆→C, C₄₇→A, -A₆₀, U₃₁₇→C



7 Zusammenfassung

Viroide sind kleine, nicht kodierende RNA-Moleküle, die in geeigneten Wirtspflanzen zu einem beachtlichen Titer vermehrt werden. Das Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit - das Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) - akkumuliert dabei im Nukleolus des Zellkerns, ohne die meisten Wirte erkennbar zu schädigen. Die Tomatenvarietät Rutgers gehört zu den wenigen Pflanzen, die bei PSTVd-Befall deutliche Krankheitssymptome entwickeln. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei pflanzliche Proteine auf ihre Wechselwirkung mit der Viroid-RNA hin untersucht. Zum einen die RNA-bindende Proteinkinase PKR, für welche eine wichtige Funktion im Krankheitsverlauf angenommen wurde, zum anderen eines der abundantesten Proteine des Nukleolus - Nukleolin. Die Proteinkinase bindet demnach die Viroid-RNA erstaunlich gut, jedoch weist sie diese Affinität auch zu der zellulären 7S-RNA auf und unterscheidet auch nicht zwischen unterschiedlich pathogenen Varianten der PSTVd-RNA. Außerdem ist ihre Aktivität im Gegensatz zu der am Anfang stehenden Hypothese offensichtlich unabhängig von einer Viroidinfektion, sodaß eine ursächliche Bedeutung dieser Wechselwirkung für den Krankheitsverlauf unwahrscheinlich ist.

Das Nukleolin wurde aufgrund der Überlegung ausgewählt, daß eine abundante Komponente des Nukleolus die Viroid-RNA fest bindet und so ihre Akkumulation in diesem hochaktiven Organell ohne schädigende Auswirkungen für die Pflanze erlaubt. Diesem Protein kommt eine entscheidende Rolle bei den ersten Schritten der ribosomalen RNA-Prozessierung zu. In dieser Arbeit gelang erstmals die rekombinante Expression von Nukleolin und in der Folge der Nachweis, daß dieses Protein auch in Pflanzen mehrere Bindestellen am Beginn der prä-rRNA und im Bereich der ersten Prozessierungsstelle dieses Moleküls aufzuweisen scheint. Seine Affinität zur Viroid-RNA ist im Vergleich zu diesen natürlichen Bindemotiven relativ gering, jedoch hoch genug, um rein rechnerisch bis zu 99 % der PSTVd-RNA im Nukleolus zu binden.

Der Versuch, einen weiteren putativen Wechselwirkungspartner des Viroids - das RNA-bindende Protein HYL1 - aus der Tomate zu klonieren, führte zum Erhalt der partiellen Sequenz eines entsprechenden Homologs und zu dem Ergebnis, daß dieses Protein sich zwischen verschiedenen Pflanzen auf hochinteressante Weise unterscheidet.

Außerdem wurden im Verlaufe der Arbeit verschiedene PSTVd-Stämme in unterschiedlichen Pflanzen über relativ große Zeiträume kultiviert. Ihre Sequenzierung führte schließlich neben der Entdeckung verschiedener neuer Sequenzvarianten zu dem Ergebnis, daß eine bislang gültige Theorie, wonach steigende Pathogenität der Viroid-RNA mit einer zunehmenden Krümmung des Moleküls einhergeht, hinfällig ist. Stattdessen offenbarten *in silico*-Sequenzvergleiche, daß der pathogenitätsdeterminierende Abschnitt der PSTVd-RNA komplementär zu Abschnitten verschiedener mRNAs ist und insofern als Interfering-RNA wirken könnte, die den Abbau der betroffenen mRNAs determiniert oder ihre Translation unterdrückt.

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HYL1	Hyponastic Leaves 1
i.d.R.	in der Regel
KCl	Kaliumchlorid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
µl	Mikroliter (10 ⁻⁶ Liter)
µm	Mikrometer ((10 ⁻⁶ Meter)
µM	Mikromolar (10 ⁻⁶ mol/Liter)
mRNA	Messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
ng	Nanogramm (10 ⁻⁹ Gramm)
nM	Nanomolar (10 ⁻⁹ mol/Liter)
nt	Nukleotide
NTP	Nukleotidtriphosphat
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglykol
PKR	Protein Kinase RNA-activated
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluoride
PSTVd	Potato Spindle Tuber Viroid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer-RNA
u.a.	unter anderem
V	Volt
VM	Virulenz-modulierend
z.B.	zum Beispiel

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.

Hilden, den 5.11.2003