

„Isolation und Bestimmung des
5`-Endes
der (-)-Strang-Replikationsintermediären
des potato spindle tuber viroids
(PSTVd)“

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

vorgelegt von
Nadine Kolonko
aus Wuppertal

Düsseldorf 2003

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

Referent: Prof. Dr. D. Riesner

Koreferent: Prof. Dr. W. Alfermann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2003

Meiner Familie

reduce to the maximum

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Riesner bedanke ich mich für das Vertrauen in meine Arbeit und für viele interessante und produktive Diskussionen.

Bei Herrn Prof. Dr. Alfermann bedanke ich mich für das Anfertigen eines Gutachtens und die Unterstützung im Umgang mit pflanzlichen Zellkulturen.

Bei Gerhard Steger möchte ich mich für sein stets offenes Ohr und die interessanten Diskussionen, sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Michael Schmitz danke ich für das Interesse an meiner Arbeit und viele wertvolle und freundlich genuschelte Tipps, sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Thyra Parthen danke ich für eine Superzeit im Labor. Ihre Freundschaft konnte mir auch in dunkelsten Zeiten die Idee vom Licht am Ende des Tunnels vermitteln.

Bei Marc Meißner bedanke ich mich für die vielen lustigen Momente im und außerhalb des Labors, vor allem für seine unerschöpfliche Geduld in den letzten Tagen vor der Prüfung.

Bernd Esters danke ich für die Präparation der Viroidzirkel und für fachliche Tipps im Labor.

Bei Reinhild Wurm möchte ich mich für viele praktische Tipps bedanken und dafür, dass ich durch Sie morgens nie allein im Labor war.

Ich möchte der weltbesten Sekretärin Frau Gruber danken. Ohne ihre Hilfe hätte mich der administrative Dschungel der Universität verschlungen.

Eva Birkmann danke ich für viele gemeinsame Nächte im Institut.

Christian Dumpitak danke ich für viele nette Momente zur rechten Zeit.

Der gesamten Priongruppe ein dickes Dankeschön für viele nette fachliche und nicht-fachliche Begebenheiten.

Der gesamten Rechner-Crew gilt mein ehrlicher Dank für die Mühe, sich auch mit vermeintlich trivialen Problemen ernsthaft auseinanderzusetzen.

Meiner "Viroid-Familie" danke ich herzlich für fachliche Tipps und das Interesse an meiner Arbeit.

Bei meinen Freunden, Sven Korallus, Jürgen Meinhardt, Sandra und Ralf Schäfer und allen, die ich aus Platzgründen hier nicht aufführen kann, bedanke ich mich für die moralische Unterstützung und den Glauben an mich.

Ich danke Ingo Mennigmann - für alles

Vor allem möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken; meiner Oma, Inge Rust, meiner Mutter, Kirsten Kolonko, Roland Layh; meinem Vater, Rolf Kolonko, Edith Kolonko und meinem Lieblingscousin Konrad Striewe für den Rückhalt, den Glauben und das Vertrauen in mich.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Viroide	1
1.2	Struktur der Viroide	2
1.3	Replikation von PSTVd	4
1.4	Transkription mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II	6
1.5	Polymerase II-Promotorelemente von Viroiden, speziell von PSTVd	9
1.6	<i>In-vitro</i> -System zur Analyse der PSTVd-Replikation	10
1.7	Problemstellung	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Bezugsquellenverzeichnis	13
2.2	Allgemeines zu Chemikalien und Puffern	15
2.3	Standardpuffer und Lösungen	16
2.4	DNA Oligonukleotide	16
2.5	Zellkulturen	18
2.5.1	Kultivierung und Pflege	18
2.5.2	Kulturmedium	19
2.6	Präparative Methoden	20
2.6.1	Präparation von hochreinen Zellkernen aus HH 258-Kartoffelzellen	20
2.6.2	Präparation eines transkriptionsaktiven Kernextraktes	23
2.6.3	Herstellung kompetenter Zellen	24
2.6.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	24
2.6.5	Plasmidisolierung im analytischen Maßstab – „Minipräp.“	24
2.6.6	Plasmidisolierung im präparativen Maßstab – „Maxipräp.“	25
2.6.7	Gelelektion von radioaktiven <i>in-vitro</i> -Transkripten	26
2.6.8	Gelelektion von unmarkierten Nukleinsäuren	27
2.7	Allgemeine molekularbiologische Methoden	27
2.7.1	Phenol/Chloroform-Extraktion	27
2.7.2	Nukleinsäure-Fällungen	28
2.7.2.1	Ethanol-Fällung	28
2.7.2.2	Ethanol-Ammoniumacetat-Fällung	28
2.8	Gelelektrophoresen	28
2.8.1	Leistungsgesteuerte, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.8.2	Bidirektionelle Gelelektrophorese	30
2.8.3	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.8.4	Sequenziergele	31
2.8.5	Autoradiographien	31
2.8.6	Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen	31
2.9	UV/VIS-Spektroskopie	32
2.9.1	Spektralphotometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	32
2.9.2	Spektralphotometrische Bestimmung der Konzentration von Proteinen	32
2.10	Northernblot-Analysen	33
2.10.1	Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran	33

2.10.2	Alkalische Denaturierung und Fixierung der Nukleinsäure auf der Membran	33
2.10.3	Hybridisierung von PSTVd-RNA an Nylonmembranen	33
2.11	Enzymatische Reaktionen	34
2.11.1	<i>In-vitro</i> -Transkription mit der T7-Polymerase	34
2.11.2	<i>In-vitro</i> -Transkription von PSTVd-Templates mit dem Kernextrakt	35
2.11.3	Radioaktive 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden	37
2.11.4	Primer-Extension-Analyse (PE)	38
2.11.4.1	Hybridisierung des Primers	38
2.11.4.2	Primer-Extension-Ansatz	38
2.11.5	Sequenzierung von Plasmid-DNA	39
2.11.5.1	Denaturierung des Plasmids	39
2.11.5.2	Hybridisierung des Primers	39
2.11.5.3	Sequenzierungsreaktion	39
2.11.6	Reverse Transkription (RT)	39
2.11.6.1.a	Hybridisierung des Primers	40
2.11.6.2.a	Reverse Transkription	40
2.11.6.3.a	Alkalische Hydrolyse des RNA-Templates	40
2.11.6.1.b	Hybridisierung des Primers	41
2.11.6.2.b	Reverse Transkription	41
2.11.7	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)	41
2.11.8	Restriktions-Endonuklease-Verdauung von Plasmid-DNA	42
2.12	Methoden zur Isolierung <i>de-novo</i> entstandener PSTVd-RNA	43
2.12.1	Generelles zu Dynabeads	43
2.12.2	„Fischen“ von <i>de-novo</i> -PSTVd-RNA	44
2.12.2.1	Aufreinigung der Biotin-markierten Sondenmoleküle an Dynabeads	44
2.12.2.2	Aufreinigung der biotinylierten RT-Produkte an Dynabeads	45
2.12.3	„Fischen“ von neu-entstandener PSTVd-RNA aus dem Kernextrakt-Transkriptionsansatz	47
3	Ergebnisse	48
3.I	Analyse der PSTVd-Transkription: Schritt 2: Transkription von (-)-RNA zu (+)-RNA	48
3.I.1	Genereller Nachweis der Polymerase II-Aktivität	48
3.I.2	RT-PCR-Analysen von <i>de-novo</i> -(+)-PSTVd-RNA nach Transkription im Kernextrakt	51
3.I.2.1	Sequenz- und Temperaturoptimierung (+)-Strang-spezifischer Primer für RT-PCR-Analysen	52
3.I.2.2	Spezifität der Primer NK-2 bis NK-6 für den (+)-Strang-Nachweis	56
3.I.3	Nachweis von neu-entstandener (+)-PSTVd-RNA mit RT-PCR	58
3.I.4	Nachweis von <i>de-novo</i> -(+)-PSTVd-RNA mit Primer-Extension-Analysen	59
3.I.4.1	Überprüfung der Primer-Extension-Analysen von <i>de-novo</i> -(+)-PSTVd-RNA anhand synthetischer <i>in-vitro</i> -Transkripte	59
3.I.4.2	Primer-Extension-Analyse der <i>de-novo</i> -(+)-PSTVd-RNA	60
3.I.5	Nachweis von <i>de-novo</i> -(+)-PSTVd-RNA mittels Northern-Blot-Analysen	62
3.II	Überprüfung der bisherigen Hypothese zur Transkription von cPSTVd zu (-)-PSTVd-RNA	64

3.II.1	Nachweis eines PSTVd-unabhängigen Signals in der Primer-Extension-Reaktion	65
3.II.2	Verifizierung des Signals mit verschiedenen Kernextrakten	67
3.II.3	Versuch der Detektion von „A111“ mit unabhängigen Primern	68
3.II.4	Überprüfung von „A111“ mit unabhängigen Primern in verschiedenen Kernextrakten	70
3.III	Bestimmung der Starstelle(n) auf cPSTVd nach Aufreinigung der (-)-Transkripte Etablierung eines Aufreinigungsverfahrens	70
3.III.1	Elution der „Ziel“-RNA von der Biotin-Sonde	73
3.III.2	Einsatz von Harnstoff zur Trennung von Sonde und „Ziel“-RNA	75
3.III.3	„Fischen“ der „Ziel“-RNA in Gegenwart von endogenen Nukleinsäuren aus dem Kernextrakt	76
3.III.4	Nachweis der Hybrid-Trennung mittels Northern-Blot-Analyse/ Auflösung von „unerwünschten“ Hybriden durch Zusatz von 8 M Harnstoff	77
3.III.5	„prä“-Aufreinigung der Biotin-markierten Sondenmoleküle	78
3.III.6	Auflösung „falscher“ Hybride durch 8 M Harnstoff	79
3.III.7	Überprüfung der Aufreinigung von <i>de-novo</i> -(-)-PSTVd-RNA mit synthetischen <i>in-vitro</i> -PSTVd-Transkripten	82
3.III.8	Nachweis neu-entstandener (-)-PSTVd-RNA	84
3.IV	Bestimmung des 5'-Endes der <i>de-novo</i>-(-)-PSTVd-RNA	88
3.IV.1	Unabhängige Reproduktion in einem zweiten Kernextrakt	92
3.IV.2	Nachweis des 5'-Endes mit einem zweiten, unabhängigen Primer	93
4	Diskussion	95
4.1	Methodische Aspekte	96
4.1.1	Generelle Aktivität der Pol II	96
4.2	Schritt 2 der PSTVd-Replikation: Transkription von (-) nach (+)	97
4.3	Schritt 1 der PSTVd-Replikation: Transkription von (+) nach (-): Unreproduzierbarkeit der früher publizierten Startstellen	99
4.4	Etablierung eines Aufreinigungsverfahrens von <i>de-novo</i> -(-)-PSTVd-RNA	101
4.5	Startstellen der PSTVd-Replikation	102
4.5.1	Identität des 5'-Endes der <i>de-novo</i> -(-)-PSTVd-RNA	102
4.5.2	Stäbchenstruktur mit endständigem Hairpin als Erkennungsmotiv für die Pol II	103
4.6	Ausblick	108
5	Zusammenfassung	109
6	Literaturverzeichnis	110

Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
B&W	Binde- und Waschpuffer
bzw.	beziehungsweise
Ci	Curie
cm	Zentimeter
cpm	<i>counts per minute</i>
cPSTVd	zirkuläres PSTVd
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>et al.</i>	<i>et alteri (lat.)</i> und Andere
FA-ÜS	Eluat nach Elution mit Formamid
fmol	Femtomol
g	Gramm
h	Stunde
ivT	<i>in vitro</i> Transkript(ion)
KE	Kernextrakt
l	Liter
M	Molar (mol/l)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
„MM“	Mastermix: Eluat nach Inkubation mit 8 M Urea
nm	Nanometer
Nt	Nukleotid
NTP	Nucleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PE	Primer Extension
pmol	Picomol
Pol	Polymerase
PSTVd	Potato spindle tuber viroid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
s	Sekunde
s.	siehe
T _{ann}	Temperatur beim <i>annealing</i>
TF	Transkriptionsfaktor
T _M	Schmelztemperatur
T _{RT}	Temperatur bei der reversen Transkription
ü. N.	über Nacht
u.U.	unter Umständen
V	Volt
vgl.	vergleiche
W	Watt

1. Einleitung

1.1 Viroide

Mit Viroiden werden subvirale Erreger von Pflanzenkrankheiten bezeichnet, die Anfang der siebziger Jahre von verschiedenen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander beschrieben wurden. Viroid bedeutet virus-ähnlich und beschreibt, dass Viroide zwar Infektionen hervorrufen können, die denen einer Virusinfektion entsprechen, aber in einigen Merkmalen deutlich von dem Charakter eines Virus abweichen. Viroide bestehen aus einer einzelsträngigen, zirkulär geschlossenen RNA von 246-399 Nt Länge je nach Viroidspezies (zur Übersicht siehe Steger und Riesner, 2003; Flores *et al.*, 1997, 2000). Sie sind nicht von einer Hülle umgeben und kodieren für kein Protein (Davies *et al.*, 1974; Semancik *et al.*, 1977), weswegen sie für sämtliche Funktionen, wie z.B. Replikation, Transport oder Pathogenese, vollständig auf Proteine und Faktoren des Wirts angewiesen sind. Die Viroid-RNA besitzt einen hohen Grad an Selbstkomplementarität, was nativ zur Ausbildung der charakteristischen Stäbchenstruktur führt (s. Abb. 1.1). Innerhalb der Sekundärstruktur konnten charakteristische Motive identifiziert werden, von denen drei näher betrachtet werden sollen: 1) die zentrale konservierte Region (central conserved region, CCR), 2) die terminale konservierte Region (terminal conserved region, TCR), die sich im oberen Strang der linken terminalen Domäne befindet, und 3) der terminal konservierte Hairpin (terminal conserved hairpin, TCH), der ebenfalls am Ende der linken terminalen Domäne lokalisiert ist und dessen Konserviertheit sich nicht nur auf die Sequenz, sondern auch auf die Sekundärstruktur bezieht (Flores, 2001). Die An- oder Abwesenheit der TCR oder TCH-Motive, vor allem aber die Sequenz der CCR führt zur Unterteilung der Viroide in zwei Familien, die *Pospiviroidae* mit dem Viroid der Kartoffelspindelknollensucht (Potato Spindle Tuber Viroid, PSTVd) als namensgebendem Vertreter und die *Avsunviroidae* mit dem Avocado Sunblotch Viroid (ASBVd) als namensgebendem Vertreter. Im Gegensatz zu den *Pospiviroidae* verfügen die *Avsunviroidae* nicht über die beschriebenen konservierten Motive. Darüber hinaus weisen bei den *Avsunviroidae* die RNA-Stränge beider Polaritäten ((+) und (-)) eine Ribozymaktivität auf, d.h. sie besitzen eine Hammerhead-Ribozym-Domäne, über welche sich die Replikationsintermediären dieser Viroide im Replikationszyklus selbst schneiden können. Außerdem variiert die typische Sekundärstruktur der *Avsunviroidae*, indem sie im Gegensatz zu den *Pospiviroidae* *in-vitro* und wahrscheinlich auch *in-vivo* eher eine verzweigte Struktur als eine Stäbchenstruktur darstellt (Flores, 2001).

Viroide treten bevorzugt in den tropischen und subtropischen Klimazonen auf, da sowohl hohe Temperatur, als auch starke Lichtintensität die Viroidreplikation und Symptomausprägung favorisieren (Flores, 2001). Es werden mit Ausnahme eines einzigen Viroids, des Coconut Cadang Cadang Viroids (CCCVd), dessen Wirt die monokotyle Kokospalme ist, ausschließlich dikotyle Pflanzen wie z.B. Tomate, Kartoffel, Hopfen, Avocado, Chrysantheme, Gurke und Zitrone befallen. Generell auftretende Krankheitssymptome sind Internodienstauchung, Blattmissbildung, Chlorosen und in seltenen Fällen Nekrosen (z. Ü. s. Riesner und Gross, 1985; Diener, 1987; Symons, 1990), wobei eine Infektion der Kokospalme mit dem CCCVd sogar zum Absterben des Wirts führen kann. Das in dieser Arbeit untersuchte PSTVd bewirkt nach Infektion der Wirtspflanze charakteristische Symptome wie gestauchte Sprossachsen, sowie spindelförmige, gewichtsreduzierte Knollen. Die Infektion mit Viroiden verläuft systemisch. Bei PSTVd z.B. ist das Viroid nach der mechanischen Inokulation von Tomatenpflanzen zunächst nur in Blättern oberhalb der Inokulationsstelle nachzuweisen. Erst später ist der Nachweis des Pathogens in weiter

unterhalb liegenden Blättern und schließlich der Wurzel möglich. Der betrachtete Transportweg entspricht demjenigen, der von Photosyntheseprodukten über das Phloem genutzt wird. Stark-Lorenzen und Kollegen wiesen 1997 mit „tissue print“-Hybridisierungs-Experimenten PSTVd-Moleküle im vaskulären System nach (Stark-Lorenzen *et al.*, 1997). Neueren Experimenten zufolge ist der systemische Transport von der Wechselwirkung zwischen einem konservierten Motiv („71-Nukleotid bulged hairpin“) mit dem Wirtspotein VirP1 abhängig (Maniataki *et al.*, 2003). Neben dem Phloemgewebe ist PSTVd noch in den Mesophyllzellen infizierter Tomatenpflanzen nachweisbar. Hier akkumuliert es zu einer Dichte von bis zu 50000 Molekülen pro Zelle.

1.2 Struktur der Viroide

Viroide sind insgesamt sowohl für den Transport und die Replikation, als auch für die einzelnen Schritte während der Replikation auf die Enzyme und Proteine des Wirtsorganismus angewiesen. Um diese nutzen zu können, verwenden Viroide ihre Sekundärstruktur, um solche Struktur motive auszubilden, die eine Erkennung durch die Wirtspoteine und damit eine Nutzung der Wirtsmaschinerie ermöglichen. Diese Eigenschaft der Viroide könnte man als „strukturelle Mimikry“ bezeichnen, da die Viroid-RNA aufgrund der simulierten Ähnlichkeit zu wirtseigenen Nukleinsäuren als Template für eine Vielzahl von Reaktionen akzeptiert wird und so ihr Überleben im fremden Organismus gesichert ist. Die Viroide der Familie *Pospiviroidae* nehmen im nativen Zustand auf Grund der extrem hohen Selbstkomplementarität der Viroidsequenz eine Stäbchenstruktur ein (s. Abb. 1.1). Sie beinhaltet kurze Helices mit bis zu neun Basenpaaren sowie ungepaarte Regionen. Die extrem kurzen Helixbereiche, die eine Länge von neun Basenpaaren nicht überschreiten, werden diskutiert als eine Art „Schutzmechanismus“ der Viroide vor wirtseigenen Nukleasen, die eben diese Helices aufgrund der extrem kurzen Länge nicht erkennen und somit die Viroid-RNA nicht degradieren können. Die alternierend gepaarten und ungepaarten Bereiche ver-

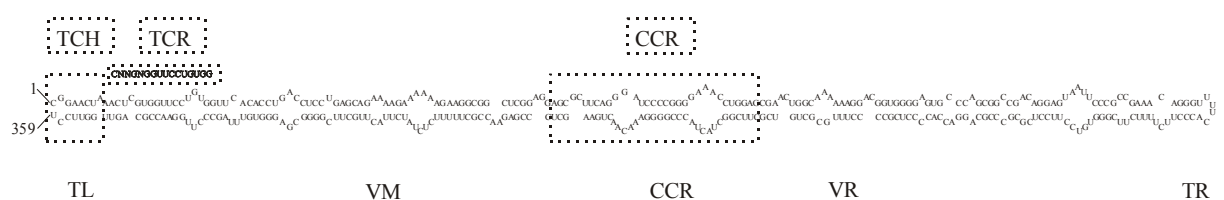


Abb. 1.1
Native PSTVd-Sekundärstruktur

Die Nummerierung der Nukleotide folgt der Nomenklatur von Groß *et al.* (1978). Einteilung der Stäbchenstruktur für die *Pospiviroidae* in funktionelle Domänen nach Keese und Symons (1985). TL: linke Terminale-Domäne, TR: rechte Terminale-Domäne, VM: Virulenz-modulierende Region, CCR: „Central Conserved Region“ VR: Variable Region. Gestrichelt umrandete Bereiche sind in Anlehnung an Flores (2001) bezeichnet. TCH: terminal conserved hairpin (Sequenz und Position; *Hostu-* und *Cocadviroidae*; TCR: terminal conserved region (*Pospivi-* und *Avsunviroidae* und in *CbVd 2* und *CbVd 3*), CCR; s. o.

zweigen nicht und bilden auch keinerlei übergeordnete Tertiärstruktur aus (z. Ü. s. Flores, 2001; Steger und Riesner, 2003). Sowohl die Zirkularität, als auch die hohe Selbstkomplementarität verleihen den Viroiden hohe thermodynamische Stabilität und Resistenz gegen Nukleasen (Sänger *et al.*, 1976; Domdey *et al.*, 1978; Henco *et al.*, 1979; Wild *et al.*, 1980; Rokohl, 1982). In Abb. 1.1 sind die funktionellen Bereiche für die *Pospiviroidae* eingezeichnet (nach Keese und Symons, 1985). Die zentrale konservierte Region (CCR) besteht aus einem Abschnitt der oberen und unteren Hälfte der PSTVd-RNA. Das zentrale Element der CCR ist ein GC-Palindrom. Im Bereich der CCR findet die Strukturumwandlung bei der Prozessierung statt; außerdem liegen hier die Schnittstellen für die Prozessierung (Baumstark *et al.*, 1997). In der linken Hälfte der Stäbchenstruktur liegt die sogenannte Virulenz-modulierende Region (VM-Region). Mutationen in diesem Bereich führen zu Viroidstämmen mit sehr unterschiedlicher Pathogenität. Als Ursache hierfür wird die unterschiedliche Biegung der Nukleinsäure innerhalb dieser Region diskutiert. Experimente lieferten Hinweise darauf, dass der Grad der Biegung mit der Stärke der Pathogenität korreliert (Schmitz und Riesner, 1998). Im rechten Bereich der nativen Viroidstruktur befindet sich die sogenannte variable Region (VR). Sie weist weniger als 50 % Homologie zwischen den verschiedenen Viroiden auf und ist somit der Bereich, der die meisten Sequenzvariationen enthält (Sänger und Haas, 1987).

Die thermische Denaturierung der nativen Stäbchenstruktur des PSTVd geschieht in einem hochkooperativen Prozess, bei dem definierte Strukturzustände durchlaufen werden (zur Übersicht siehe Riesner, 1990) (s. Abb. 1.2). Die Denaturierung, die in der linken Stäbchenhälfte beginnt, generiert einzelsträngige Sequenzabschnitte, die nun mit Sequenzbereichen der rechten PSTVd-Hälfte Basenpaare ausbilden können, was zur Destabilisierung der rechten Hälfte führt und in einem hochkooperativen Übergang endet, bei dem alle Basenpaare aufgelöst werden und das PSTVd eine Struktur einnimmt, die drei stabile Haarnadelstrukturen aufweist. Diese während des Denaturierungsvorgangs gebildeten, definierten, stabilen Haarnadelstrukturen (Hairpins HP I bis HP III), werden bei weiterer De-

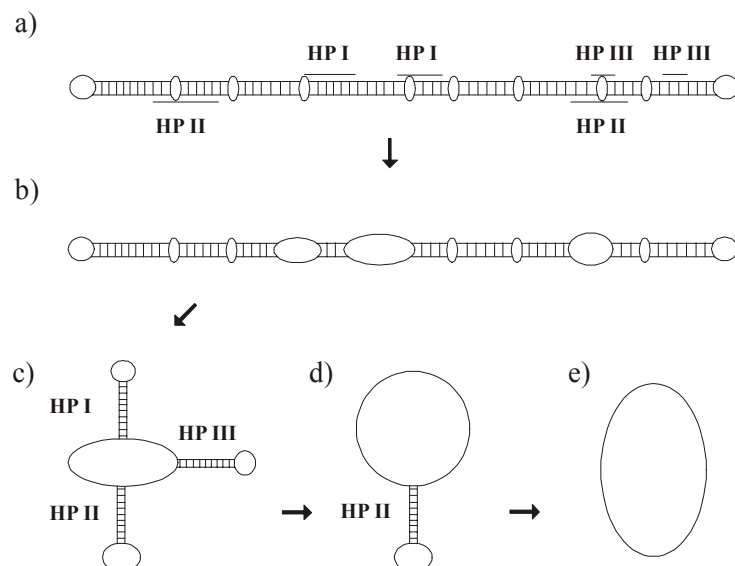


Abb. 1.2

Denaturierungsmechanismus des PSTVd

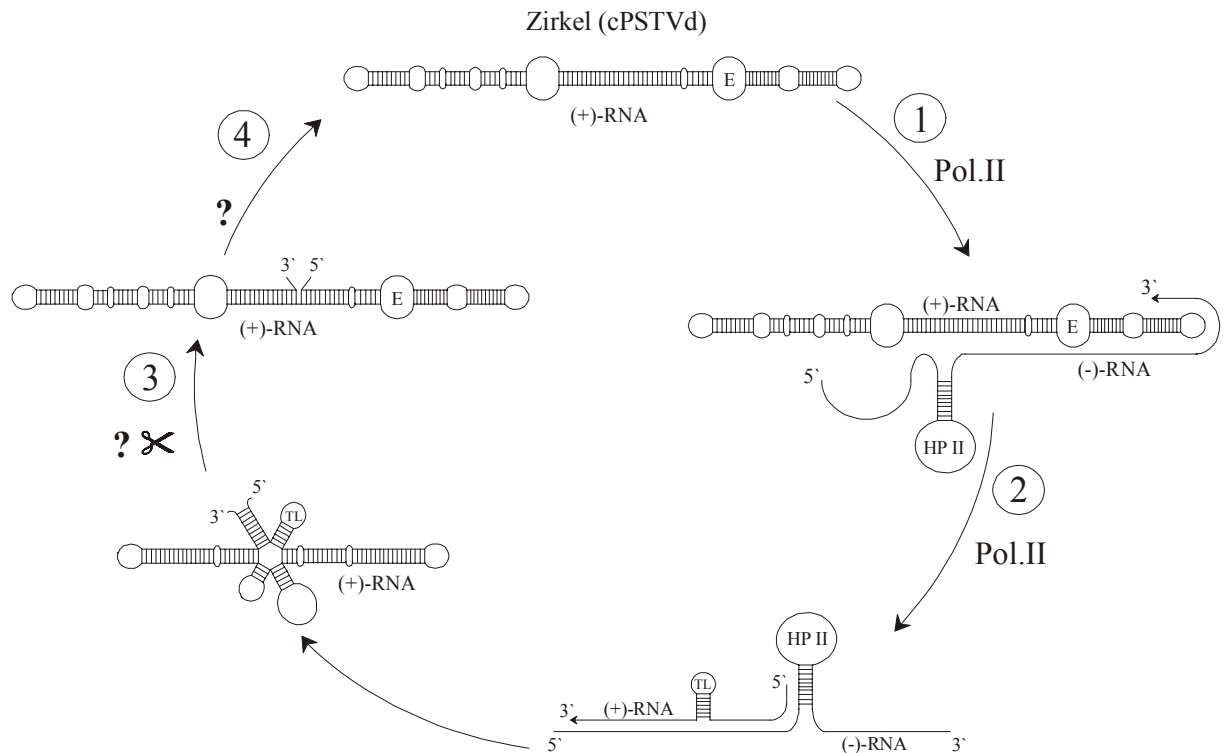
Schematische Darstellungen der Basenpaardissoziation; mit zunehmender Temperatur werden die Zustände a) bis e) durchlaufen. HP: Hairpin

naturierung zugunsten des offenen Zirkels wieder aufgelöst (Henco *et al.*, 1979; Riesner *et al.*, 1979). Die gebildeten HP-Strukturen sind nicht in allen Viroiden zu finden; so ist HP III ausschließlich auf das PSTVd beschränkt, während HP I und HP II von allen Pospiviroiden ausgebildet werden können. Bei den gebildeten HP-Strukturen handelt es sich um Merkmale metastabiler Strukturen (Riesner *et al.*, 1992). Typisch für metastabile Strukturen ist, dass sie zwar für längere Zeiten stabil sind, aber nicht Strukturen niedrigster Energie darstellen und dass ein Gleichgewicht zwischen den Strukturen durch eine hohe Aktivierungsbarriere verhindert wird. Die Lage der transienten Strukturelemente HP I und HP II ist innerhalb der *Pospiviroidae* konserviert (Gross *et al.*, 1982; Steger *et al.*, 1984). Auf Grund dieser Konserviertheit und ausführlicher site directed-mutagenesis-Experimente (Loss *et al.*, 1991; Qu *et al.*, 1993) konnte HP II eine funktionelle Relevanz im Hinblick auf die Transkription zugeordnet werden.

1.3 Replikation von PSTVd

Da Viroide selbst nicht für Proteine kodieren, somit auch nicht für eine Polymerase, welche die Replikation ihres RNA-Genoms garantiert, sind sie auch bei der Replikation ausschließlich auf die zelluläre Maschinerie des Wirtes angewiesen. Die Replikation und Akkumulation von PSTVd erfolgt im Nukleus, während das Avocado Sunblotch Viroid (ASBVd), der namensgebende Vertreter der zweiten Viroidfamilie – der *Avsunviroidae* – im Chloroplasten repliziert und akkumuliert (Schumacher *et al.*, 1983a; Harders *et al.*, 1989; Schindler und Mühlbach, 1992; Bonfiglioli *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994). Hybridisierungsexperimente ergaben, dass Viroide nicht ins Wirtsgenom integrieren (Branch und Dickson, 1980; Zaitlin *et al.*, 1980). Da für die Replikation der Viroide RNA-Stränge beider Polaritäten nachgewiesen und diese als Replikationsintermediate interpretiert wurden, konnte in Anlehnung an ein bereits bekanntes Replikationsschema viraler DNAs das Modell des „rolling-circles“ entwickelt werden (Branch und Robertson, 1984). Die beiden Viroidfamilien (*Pospiviroidae* und *Avsunviroidae*) replizieren nach unterschiedlichen rolling-circle-Mechanismen, die je nach Verlauf als symmetrisch oder asymmetrisch bezeichnet werden. Das hier betrachtete PSTVd repliziert nach einem asymmetrischen rolling-circle-Mechanismus (Branch *et al.*, 1988; Feldstein *et al.*, 1998) (s. Abb. 1.3).

Nach Inokulation, die definitionsgemäß mit dem zirkulären (+)-Strang erfolgt, werden in einem ersten Schritt ausgehend von dem zirkulären, monomeren Template oligomere (-)-Stränge synthetisiert. Diese oligomeren (-)-RNA-Stränge dienen in einer anschließenden Transkriptionsreaktion als Matritze zur Neusynthese oligomerer (+)-Stränge. Beide Transkriptionsreaktionen (sowohl von (+) nach (-), als auch umgekehrt) werden von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II (Pol II) katalysiert, was durch die Hemmung der Transkription in Gegenwart geringer Mengen des Pol II-spezifischen Inhibitors α -Amanitin nachgewiesen wurde (Mühlbach und Sanger, 1979; Spiesmacher *et al.*, 1985; Schindler und Mühlbach, 1992). Darüber hinaus konnte in Experimenten mit einem monoklonalen Antikörper gegen eine konservierte Domäne der großen Untereinheit der Pol II eben diese Untereinheit zusammen mit Viroid-RNA beider Polaritäten co-präzipitiert werden (Warrilow und Symons, 1999). Weiterhin konnte die Bindung von aufgereinigter Pol II aus Weizenkeimen an PSTVd sowohl elektronenmikroskopisch, als auch über analytische Ultrazentrifugation nachgewiesen werden (Goodman *et al.*, 1984). Für den ersten Schritt der PSTVd-Replikation – der Transkription von (+) nach (-) – wurden zwei definierte Initiationsstellen für die Polymerase II bestimmt. Es handelt sich hierbei um die Nukleotide A 111 und A 325 auf dem zirkulären (+)-Strang, welche die Initiation des ersten Transkriptionsschrittes determinieren (Fels *et al.*, 2001). Folgende Arbeiten zeigten die

**Abb. 1.3**

Der asymmetrische „rolling-circle“-Mechanismus für die Replikation der *Pospiviroidae* (Branch und Robertson, 1984) als Kreislauf funktionaler Strukturen (Riesner *et al.*, 1988)

Ausgehend vom zirkulären (+)-Strang wird die oligomere (-)-Strang-PSTVd-RNA synthetisiert. Die (-)-Strang-RNA dient als Template für die Synthese oligomerer (+)-Strang-PSTVd-RNA. Diese wird auf Einheitslänge geschnitten und zu Zirkeln ligiert. Die für die Erkennung durch die Wirtsfaktoren notwendigen PSTVd-Struktur motive sind wiedergegeben. Pol II: DNA-abhängige RNA-Polymerase II, HP II: Hairpin II, TL: Tetraloop, E: Loop E.

beiden Nukleotide, einschließlich der davor liegenden GC-Boxen, als relevant für die Replikation des PSTVd *in vivo* (Hu, 2000; Bannach, 2001). Das daraus resultierende Modell für die Initiation der Pol II an den Startnukleotiden A111 und A325 ist in Abb. 1.4 auf der nächsten Seite dargestellt.

Die Interpretation, dass die beiden angegebenen Nukleotide A111 und A325 tatsächlich den Transkriptions-Initiationsstellen der Pol. II entsprechen, wird im Verlauf der vorliegenden Arbeit revidiert werden.

Die im weiteren Verlauf des rolling-circle-Mechanismus (s. Abb. 1.3) als Prozessierung bezeichneten Schritte 3 und 4, Schnitt der oligomeren (+)-RNA in exakte Monomere und Ligation der monomeren (+)-RNA zu exakten Zirkeln, benötigen Sekundärstrukturen, die nicht der thermodynamisch stabilsten Struktur entsprechen, sondern metastabile Strukturen repräsentieren (Baumstark und Riesner, 1995). Im Anschluss an die Transkription zu multimeren (+)-RNA-Molekülen werden diese durch zwei bisher nicht näher identifizierte Enzymaktivitäten zu RNA-Molekülen exakter Monomerlänge geschnitten und deren Enden zu vollständigen Zirkeln ligiert (Baumstark *et al.*, 1997; Klümper, 2002), die dann erneut den rolling-circle-Mechanismus durchlaufen. Die Akzeptanz des Viroids als Substrat durch die wirtseigene RNase-(Aktivität) wird hierbei wahrscheinlich durch die definierte Konformation der oligomeren Viroid-RNA bestimmt (Baumstark *et al.*, 1997). Erste Hinweise auf die beteiligte RNase deuteten auf eine aminoacyl-tRNA-Synthetase als potentielle Enzymaktivität hin (Klümper, 2002).

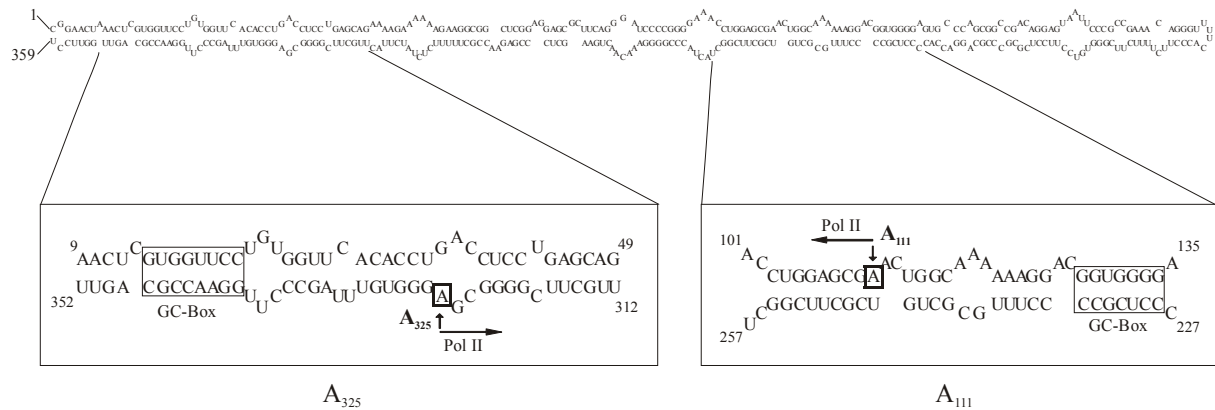


Abb. 1.4
Sekundärstruktur und Basensequenz der beiden Transkriptionsstartstellen A111 und A325 des cPSTVd-Moleküls (nach Fels *et al.*, 2001)

Die Syntheserichtung der Polymerase II ist durch einen Pfeil angegeben. Die zwei GC-Boxen, die als Promotorelement diskutiert werden sind umrandet

Dem gegenüber stehen Daten aus Experimenten mit dem Coconut Cadang-Cadang Viroid (CCCVd), die von einer autokatalytischen Schnittreaktion ausgehen (Liu und Symons, 1998). Die Replikation über einen symmetrischen rolling-circle-Mechanismus, wie er für die Viroide der Avsunviroid-Familie beschrieben ist, verläuft ähnlich dem der *Pospiviroidae*, allerdings werden hier die multimeren (-)-RNA-Produkte zunächst durch die endogene Ribozymaktivität zu exakten Monomeren geschnitten und dann zu (-)-Zirkeln ligiert. Diese müssen wiederum den rolling-circle-Mechanismus ein zweites Mal durchlaufen, um wieder monomere Zirkel mit (+)-Polarität zu generieren (Bonfiglioli *et al.*, 1994; Lima *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu den Pospiviroiden wird die Replikation der Avsunviroide nicht über die DNA-abhängige RNA-Polymerase II vermittelt, sondern es wird eine sogenannte „nuclear encoded chloroplastic Polymerase“ (NEP) als verantwortliches Enzym diskutiert (Navarro *et al.*, 2000). Die Transkription beider Polaritäten der ASBVd-RNA initiiert an spezifische Stellen im terminalen Ende der „quasi“-Stäbchenstruktur, weswegen es auch bei den Avsunviroiden definierte Bereiche gibt (wobei diese Bereiche eher durch die Sekundärstruktur der RNA als durch die Sequenz determiniert werden), an denen die Transkription startet (Navarro und Flores, 2000; Pelchat *et al.*, 2001; Pelchat *et al.*, 2002).

1.4 Transkription mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II

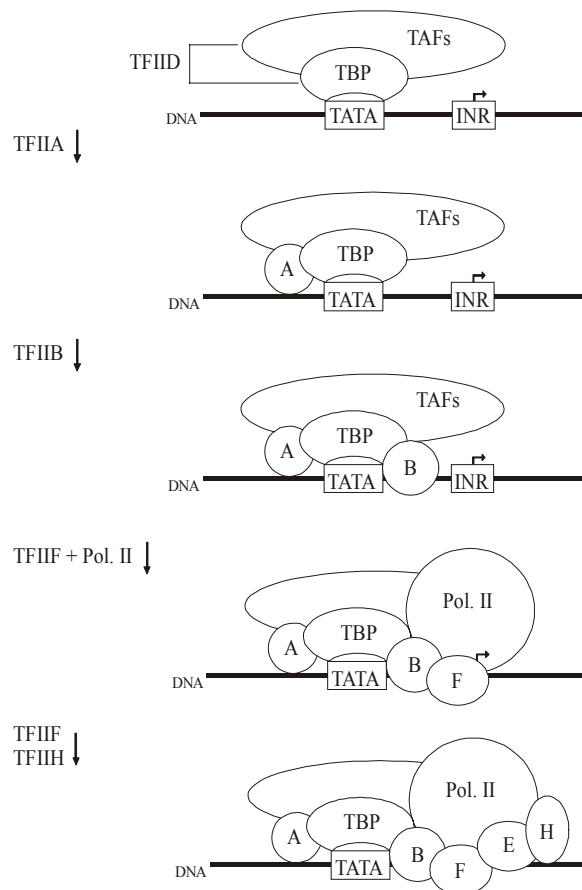
Die RNA-Polymerasen I, II und III sind im Nukleus eukaryotischer Zellen lokalisiert. Obwohl sie alle im gleichen Zellkompartiment lokalisiert sind, transkribieren sie verschiedene RNA-Spezies. Während die Polymerase I für die Transkription der rRNA verantwortlich ist, transkribiert die Polymerase II die mRNA und die meisten small nuclear (sn)-RNAs. Die tRNAs, sowie die 5S RNA und U6 snRNA werden von der Polymerase III transkribiert. Da für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente die Polymerase II (Pol II) von Bedeutung ist, soll diese im Folgenden näher betrachtet werden. Die RNA-Polymerase II besteht aus mehreren Untereinheiten (bis zu 14) mit Molekulargewichten 14 und 220 kDa (zur Übersicht

siehe Duda, 1976; Guilfoyle, 1981; Sentenac, 1985, Martinez, 2001). Das Gesamtgewicht des Enzyms beträgt etwa 0,5 MDa. Die aufgereinigte Pol II alleine initiiert die Transkription unspezifisch, d.h. sie erkennt *in-vitro* keinerlei Initiationssignale, was sowohl zur Initiation an Doppel-, wie auch an Einzelsträngen führt (Lewis und Burgess, 1980; Matsui *et al.*, 1980). Da die Erkennung einer spezifischen Startdomäne durch die Polymerase alleine offensichtlich nicht vermittelt wird, kann postuliert werden, dass *in vivo* weitere Faktoren und/oder Proteine zur Verfügung stehen, die eben diese Spezifität der Initiation der Transkription vermitteln. Hierbei kann zwischen zwei verschiedenen „Qualitäten“ der Transkription unterschieden werden. Zum einen spricht man von der sogenannten basalen Transkription, die unabhängig von Aktivatoren oder Repressoren stattfindet, und zum anderen von der sogenannten aktivierten Transkription, bei der zusätzliche regulatorische Elemente eine Rolle spielen. Da die Viroid-RNA nicht das natürliche Template der Pol II ist, wird davon ausgegangen, dass ihre Replikation auf dem Level einer basalen Transkription stattfindet, weswegen im Folgenden der Schwerpunkt auf den Mechanismus der basalen Transkription gelegt wird und nur peripher auf aktivierende oder reprimierende Elemente eingegangen wird. Die Initiation der Transkription durch die Pol II ist in vielen Übersichtsartikeln beschrieben (Roeder, 1996; Hampsey, 1998; Kadonaga, 2002; Martinez, 2002).

Für die Transkription mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II (Pol II) werden hauptsächlich zwei verschiedene Sequenzelemente diskutiert, die für die Assemblierung des transkriptionsaktiven Komplexes essentiell sind. Neuere Untersuchungen zeigten noch ein weiteres Element als entscheidend – das sogenannte „downstream promoter element“ (DPE), auf das jedoch hier nicht näher eingegangen werden soll (Kadonaga, 2002). Eines der basalen Promotorelemente ist die sogenannte TATA-Box, eine AT-reiche Konsensussequenz [TATAA/tAa/t], die ~30 Nukleotide oberhalb („upstream“) des eigentlichen Startnukleotids (+1) liegt. Das zweite relevante Sequenzelement ist die sogenannte Initiatorsequenz (INR) mit der Konsensussequenz [YY(C)A₊₁NT/AYY] bei tierischen Promotoren (Corden *et al.*, 1980; Butcher, 1990; Javahery *et al.*, 1994; Lo und Smale, 1996; Smale *et al.*, 1998) und [TCA₊₁G/TTC/T] bei *Drosophila* (Hultmark *et al.*, 1986; Purnell *et al.*, 1994; Arkhipova, 1995; Kutach und Kadonaga, 2000). Das INR-Element schließt die Initiationsstelle ein. Die INR war zunächst für Säugetiere, *Drosophila* und Hefe beschrieben (z.B. Corden *et al.*, 1980; Breathnach und Chambon, 1981; Hultmark *et al.*, 1986; Struhl, 1987) und wurde später als diskretes funktionelles Element definiert (Smale und Baltimore, 1989; Smale, 1994, 1997).

Bei Pflanzen kann der Abstand der TATA-Box von der Initiationsstelle (+1) stark variieren – es sind Abstände von 23 bzw. 54 Nukleotide beschrieben (Waugh *et al.*, 1991; Martini *et al.*, 1993). Darüber hinaus ist auch das Promotorelement INR bei den Pflanzen verschieden von der tierischen Initiatorsequenz. Hier ist eine definierte Konsensussequenz der INR nicht beschrieben, sondern als entsprechender Bereich gilt hier ein A,C,T-reicher Sequenzabschnitt (Schweizer, 1994).

Allgemein sind für die promotorspezifische Initiation neben der Polymerase noch eine Vielzahl von Proteinen und Faktoren essentiell. Man unterscheidet hier zwischen sechs verschiedenen Transkriptionsfaktoren (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF und TFIIH), sowie dem TATA-binding protein (TBP) und den TBP-associated factors (TAFs). Die Bildung des Präinitiationskomplexes (PIC), der initiativ für den Start der Transkription verantwortlich ist, gliedert sich in mehrere diskrete Schritte (s. Abb. 1.5, nächste Seite). Der erste Schritt ist die Bindung des TFIID an den Kernpromotor. Der humane TFIID ist ein stabiler Komplex und besteht aus dem TATA-binding protein und 14 unterschiedlichen TBP-associated factors, die phylogenetisch konserviert sind (zur Übersicht: Burley und Roeder, 1996; Green, 2000). Die TBP-Untereinheit des TFIID bindet an die kleine Grube der TATA-Box (bei ~-30), was zu einer erheblichen Krümmung der Promotor-DNA führt, während eini-

**Abb. 1.5****Modell der schrittweisen Assemblierung des Präinitiationskomplexes (PIC) (in Anlehnung an Martinez, 2002)**

Die Assemblierung bei Klasse II-Promotoren mit TATA-Element beginnt mit der Bindung des „TATA-binding protein“ (TBP) an die TATA-Box, sowie der Wechselwirkung der „TBP-associated factors“ (TAFs) an die Initiatorsequenz (INR) oder an „downstream“ gelegene Promotorelemente. Die Stabilisierung dieser Wechselwirkungen wird durch TFIIA vermittelt. TFIIB stabilisiert den TBP-TATA-Komplex und erlaubt die Rekrutierung der weiteren Transkriptionsfaktoren einschließlich der Polymerase II. Das Aufschmelzen des Promotorbereichs ist ATP-abhängig und wird durch die Helikase-Aktivität von TFIIH vermittelt. So geht der geschlossene Komplex in den offenen Komplex über, was die anschließende Transkription ermöglicht.

ge der TAFs mit der Initiatorsequenz (INR, im Bereich der Startstelle +1) und zusätzlichen „downstream“ gelegenen DNA-Sequenzen (bis zu +35), einschließlich des DPE-Elements in einigen Genen wechselwirken (Burley und Roeder, 1996; Oelschläger *et al.*, 1996; Verrijzer und Tjian, 1996; Burke und Kadonaga, 1997; Chalkley und Verrijzer, 1999; Wu *et al.*, 2001). Die Bindung von TFIID an den Kernpromotorbereich wird durch die Transkriptionsfaktoren TFIIA und TFIIB stabilisiert. Die Stabilisierung durch die beiden Faktoren ist unterschiedlich, so stabilisiert z.B. TFIIB den TBP-TATA-Komplex über Kontakte sowohl zum TBP, als auch zu DNA-Bereichen, die das gebundene TATA-Element flankieren (Nikolov *et al.*, 1995; Tsai und Sigler, 2000). TFIIB ist generell für die basale Transkription entscheidend, die entweder durch TBP oder TFIID vermittelt wird. Im Gegensatz dazu ist TFIIA in aufgereinigten Systemen für die TBP-vermittelte basale Transkription entbehrlich (Orphanides *et al.*, 1996; Roeder, 1996), obwohl es ebenfalls die TBP-TATA-Wechselwirkung stabilisiert, indem es sowohl an TBP, als auch an die DNA „upstream“ des TATA-Elements bindet (Geiger *et al.*,

1996; Tan *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu TFIIB hat der Transkriptionsfaktor IIA einen stimulierenden Effekt auf die basale TFIID-abhängige Transkription. Darüber hinaus ist TFIIA essentiell für die basale Transkription von solchen Promotoren, denen das TATA-Element fehlt, die aber über eine INR verfügen (Martinez *et al.*, 1998a). Die Bildung des TFIID-IIA-IIB-DNA-Komplexes erlaubt die Rekrutierung von TFIIF zusammen mit der Polymerase II. Auch der sogenannte „Minimal-Komplex“, bestehend aus TBP, TFIIB und DNA kann TFIIF zusammen mit der Pol II rekrutieren und ist anschließend in der Lage, Transkription sowohl von superhelicalen DNA-Plasmiden, als auch vorgeschmolzenen (pre-melted) Promotor-Templates *in-vitro* zu initiieren. Der zusätzliche Einbau der Faktoren TFIIE und TFIIF in den Komplex ist essentiell für das Aufschmelzen des Promotors und somit die Bildung des offenen Transkriptionskomplexes, an dem anschließend die eigentliche Transkription beginnen kann. Der Transkriptionsfaktor IIE dient hierbei „lediglich“ der Rekrutierung und Aktivierung des folgenden Faktors TFIIF, der über mehrere essentielle Aktivitäten verfügt. Zum einen enthält er zwei DNA-Helikasen, die an dem ATP-abhängigen Aufschmelzvorgang des Promotors an der Startstelle (+1) beteiligt sind, d.h. den offenen PIC generieren, sowie die Pol II-Clearance vom Promotor ermöglichen (Review: Dvir *et al.*, 2001). Zum anderen phosphoryliert TFIIF die Carboxy-terminale Domäne (CTD) der großen Untereinheit der Pol II, was ebenfalls die Promotor-Clearance erleichtert. Das zentrale Element der CTD ist ein repetitives Heptapeptid (bei Arabidopsis 41 x, Konsensussequenz: YSPTSPS; zur Übersicht: Bako *et al.*, 1994). Durch Hyperphosphorylierung der CTD, d.h. durch die Bildung des offenen Komplexes beginnt die RNA-Synthese. Die Elongation der naszierenden RNA geschieht mit einer Rate von ~1500 bis 2000 Nukleotiden pro Minute (Aso *et al.*, 1995).

Die beschriebene Bildung des PIC ist bestimmt durch die initiale Bindung von TBP/TFIID an die TATA-Box. Viele Gene verfügen jedoch nicht über ein solches TATA-Element und trotzdem können diese Promotoren, die zwar kein TATA-Element aber eine INR besitzen, die Transkription, sowohl *in vivo* als auch in zellfreien Systemen und zwar von einer einzigen Startstelle innerhalb der INR aus, korrekt initiieren (Review: Smale, 1997). Die hierfür notwendigen Faktoren und Mechanismen sind allerdings noch wenig charakterisiert, jedoch ist bekannt, dass auch TATA-lose (TATA-less) Promotoren TFIID benötigen (Pugh und Tjian, 1991; Zhou *et al.*, 1992). Im Gegensatz zu TATA-haltigen Promotoren benötigen TATA-lose Promotoren TAFs innerhalb des TFIID-Komplexes und TFIIA für die basale Transkription (Martinez *et al.*, 1994, 1998a; Review: Smale, 1997; Roeder, 1998). Es existieren also alternative „Kernpromotor-selektive“ Wege zur Rekrutierung von TFIID (zur Übersicht siehe Roeder, 1996, 1998; Verrijzer und Tjian, 1996). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass humane TAFs (TAF250 und TAF150) zwar schwach, aber direkt sequenzspezifisch an die INR binden (Chalkley und Verrijzer, 1999) und in Drosophila binden TAFs mit Histon H3/H4-ähnlicher Struktur an die DPE (downstream promotor element)-Sequenz, die circa bei +30 downstream der INR in einigen TATA-haltigen und TATA-losen Genen liegt. All diese Faktoren, die unterschiedlich relevant in verschiedenen Organismen sind, repräsentieren die Komplexität der Klasse-II-basalen Transkriptionsmaschinerie.

1.5 Modelle von Polymerase II-Promotorelementen für Viroide, speziell für PSTVd

Für das PSTVd sowie für die meisten Viroide scheidet die TATA-Box als Promotorelement für die Pol II aus, da Viroide weder über eine TATA-Box noch über eine Initiatorsequenz (INR) verfügen. Das PSTVd verfügt noch nicht einmal über ein TATA-ähnliches

Sequenzmotiv, weswegen zu postulieren ist, dass die Struktur des PSTVd selbst (Stäbchen als native Struktur der (+)-Polarität und die sogenannte multi-hairpin-Struktur der (-)-RNA) einen Sequenz- und/oder Strukturbereich repräsentiert, der für die Pol II als Promotorregion dient und von dieser erkannt und akzeptiert wird. Für den (-)-Strang von PSTVd zeigten Mutationsanalysen, dass der HP II, der sich während der sequenziellen Faltung als Folge der Transkription von (+) nach (-) als Teil einer multi-hairpin-Struktur bildet (Hecker *et al.*, 1988), ein entscheidendes Element für die Infektiosität des Viroids ist (Loss *et al.*, 1991). Solche Mutationen, die zu einer Fehlpaarung im Helixbereich des HP II des (-)-Strangs führten, revertierten in der Pflanze zur Wildtypsequenz oder es traten solche kompensatorischen Mutationen auf, die HP II im (-)-Strang wieder herstellten (Loss *et al.*, 1991; Qu *et al.*, 1993). Es ist nicht geklärt, ob der HP II von der Polymerase selbst oder spezifischen Transkriptionsfaktoren erkannt wird, oder ob es die Helix mit dem hohen GC-Gehalt ist, die starke Homologie zu derjenigen GC-Box zeigt, die als Bindestelle von Transkriptionsfaktoren, z.B. dem Transkriptionsfaktor SP1 konstitutiv exprimierter Gene diskutiert wird. SP1 gehört zu einer Gruppe von Faktoren, die für die Transkription sogenannter „house-keeping“-Gene essentiell sind (Gidoni *et al.*, 1984; Watson *et al.*, 1987). Solche Transkriptionsfaktoren binden entweder an den TFIID oder ersetzen den TFIID und können direkt den Initiationskomplex rekrutieren (Aso *et al.*, 1994; Gerber, 1995; Goodrich *et al.*, 1996). Das Strukturmotiv HP II kann also prinzipiell ein Promotorelement für die Pol II repräsentieren, an den ein entsprechender Transkriptionsfaktor bindet und so die Initiation der Pol II vermittelten Transkription ermöglicht. Darüber hinaus ist bekannt, dass kurze GC-reiche Helices eine Helixstruktur ausbilden, die eher einer für RNA typischen A-Form entspricht, als einer DNA-typischen B-Helix (Heinemann *et al.*, 1987).

Für die Transkription des zirkulären PSTVd ist bisher keine eindeutige Promotorregion definiert, obwohl es Hinweise darauf gibt, dass GC-reiche Sequenzdomänen innerhalb der Stäbchenstruktur ebenfalls als potentielle Bindestelle von Transkriptionsfaktoren dienen können (Hu, 2000; Bannach, 2001; Fels *et al.*, 2001). Vergleiche mit anderen Viroidspezies weisen darauf hin, dass es die terminalen stem-loop-Strukturen sind, die für eine solche Promotorfunktion in Betracht kommen. So ist sowohl für das Avocado Sunblotch Viroid (ASBVd), als auch für das Peach Latent Mosaic Viroid (PLMVd) eine solche Domäne als Erkennungsregion für die Pol II beschrieben (Navarro und Flores, 2000; Pelchat *et al.*, 2001; Pelchat *et al.*, 2002). Auch die RNA des Humanpathogens Hepatitis Delta Virus (HDV), ein Satelliten-Virus des Hepatitis B-Virus, das eine hohe Ähnlichkeit zur Viroid-RNA aufweist, bildet in demjenigen Bereich, der als Startbereich der Transkription diskutiert wird, eine Haarnadelstruktur aus, deren Disruption zum Verlust der Transkription führt, weswegen auch hier die stem-loop-Struktur als Promotorelement für die Pol II wahrscheinlich ist (Beard *et al.*, 1996; Filipovska und Konarska, 2000; Macnaughton *et al.*, 2002).

1.6 *In-vitro*-System zur Analyse der PSTVd-Replikation

Die detaillierte Analyse der PSTVd-Replikation erforderte ein *in-vitro*-System, das die spezielle Betrachtung eines isolierten Transkriptionsschrittes erlaubte. Da die Replikation von PSTVd sich in mehrere Schritte gliedert (s. auch 1.2), war es notwendig die Trennung der einzelnen Transkriptionsereignisse sicherzustellen. Eine nicht vollständige Trennung der einzelnen Transkriptionsschritte würde die Untersuchung der entstehenden Replikationsintermediate unmöglich machen. Dies gilt für die Transkription beider Polaritäten. Sowohl die der Transkription von (+) nach (-) nachfolgende Transkription von (-) nach (+), als auch die an diesen Schritt anschließende Prozessierung der entstandenen (+)-Transkripte würde die Untersuchungen der jeweils betrachteten Produkte beeinträchtigen. Zu diesem Zweck wurden

die Transkriptionsexperimente in einem Kernextrakt einer gesunden (nicht PSTVd-infizierten) Kartoffelzellkultur – *Solanum tuberosum*, HH258 – durchgeführt, welche die eben beschriebene Betrachtung eines einzelnen Replikationsschrittes erlaubte. Generell sind pflanzliche *in-vitro*-Transkriptionssysteme schwieriger zu etablieren und durchzuführen als vergleichbare Transkriptionssysteme in HeLa- oder anderen Vertebraten-Zellen. Dies liegt daran, dass pflanzliche Zellen eine weitaus höhere Protease- und Nukleaseaktivität aufweisen als z.B. tierische Zellen. Darüber hinaus sind die sekundären Pflanzenstoffe der Vakuolen störend, da sie inhibierend auf die Transkription wirken können (zur Übersicht: Schweizer, 1994).

Bei der Analyse der PSTVd-Replikation, bzw. generell der Viroidreplikation, existieren zusätzliche Schwierigkeiten. Da die Viroid-RNA zwar von der Pol II transkribiert wird, jedoch nicht das natürliche Template ist, muss mit einer verminderten Transkriptionsaktivität der Polymerase bezüglich des PSTVd-Templates gerechnet werden, so dass allein der Nachweis der entstandenen Transkriptionsprodukte einen nicht unerheblichen Teil der kompletten Analyse darstellt. Erste Analysen erfolgten deswegen zunächst mit aufgereinigter Pol II aus Weizenkeimen (Rackwitz *et al.*, 1981). Darauf folgten Analysen der Replikation in Systemen, welche die *in-vivo*-Situation besser repräsentierten, wie z.B. die Untersuchungen an Protoplasten (mit PSTVd Mühlbach und Säger, 1981; Faustmann *et al.*, 1986; Schindler und Mühlbach, 1992; mit *Hop Stunt Viroid* (HSVd): Yoshikawa und Takahashi, 1986). Auch wurden Untersuchungen an Zell- und Zellkernextrakten sowie Zellkernfraktionen durchgeführt (*Citrus Exocortis Viroid* (CEVd): Flores und Semancik, 1982; Rivera-Bustamante und Semancik, 1982; Semancik und Harper, 1984; Flores, 1989; ASBVd: Marcos und Flores, 1992; Navarro und Flores, 2000). Neuere Experimente basieren ebenfalls auf der Transkription mittels einer aufgereinigten Polymerase, wie z.B. die Transkriptionsanalysen des *Peach Latent Mosaic Viroids* (PLMVd; Pelchat *et al.*, 2002). Im Unterschied zu solchen *in-vitro*-Systemen, die auf der Analyse von Kernextrakten und anderen beschriebenen Fraktionen aus infizierten Zellkulturen und /oder Pflanzen beruhen, wurden in dieser Arbeit Zellkernextrakte aus nicht-infizierten Kulturen verwendet. Nur so konnte garantiert werden, dass sowohl die Kontrolle über die Menge an zugegebenem Template gegeben, als auch die Identität des entstandenen Transkripts eindeutig bekannt ist. Das verwendete Präparationsprotokoll entsprach dem von Fels (1997) modifizierten Verfahren von Nagel-Steger (1990). Die nach diesem Protokoll präparierten Kernextrakte enthielten eine transkriptionsaktive Pol II, deren Aktivität durch Filterbindungsassays nachgewiesen werden konnte (Nagel-Steger, 1990), sowie bei erfolgreicher Präparation alle für PSTVd-Replikation notwendigen Faktoren.

1.7 Problemstellung

Bei der Replikation des PSTVd werden beide Transkriptionsschritte durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II vermittelt. Sowohl zirkuläre (+)-PSTVd-RNA, als auch die multimeren (-)-PSTVd-Moleküle dienen hierbei als Template. Ziel der Arbeit war die Detektion derjenigen Startstelle(n), die auf dem multimeren (-)-Strang lokalisiert sind und den Beginn der Transkription von (-) nach (+) determinieren. Da, wie unter 1.5 diskutiert, das PSTVd weder TATA- noch INR-Element aufweist, in der Sekundärstruktur des multimeren (-)-PSTVd-Strangs aber ein Strukturelement auftritt (HP II), das als Promotorelement fungieren kann, sollte untersucht werden, ob die Initiation der PSTVd-Transkription von (-) nach (+) tatsächlich im Bereich des HP II beginnt, oder ob es andere Initiationsstellen gibt, an denen die Polymerase II mit der Synthese des oligomeren (+)-Stranges beginnt, oder ob sie möglicherweise überhaupt kein definiertes Initiationsnukleotid erkennt und wahllos an jedem

beliebigen Nukleotid mit der Transkription beginnt. Sollte es eine definierte Initiationsstelle geben, so sollte diese bestimmt und anhand dieser Initiationsstelle mögliche Promotorelemente auf dem (-)-Strang des PSTVd diskutiert werden.

Im Zusammenhang mit der Detektion und Charakterisierung der Initiationsstelle(n) auf der (-)-PSTVd-RNA sollten die beiden in einer vorausgegangenen Arbeit bestimmten Initiationsnukleotide auf dem zirkulären (+)-Strang des PSTVd verifiziert werden. Es handelte sich hierbei um die Nukleotide A111 und A325 (s. Abb. 1.4). Durch die Arbeit von Fels, aber auch durch ergänzende site-directed mutagenesis-Daten (Hu, 2000) galt die Initiation der Transkription auf dem (+)-PSTVd als geklärt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Verifizierung der beiden Transkriptionsstartstellen ergaben jedoch widersprüchliche Daten, die Anlass zum Zweifel an der Identität, bzw. der Funktion der beiden Nukleotide gaben. Aus diesem Grund wurde der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit erneut auf den ersten Schritt der PSTVd-Replikation – der Transkription von cPSTVd (+) zu (-)-PSTVd-RNA – gelegt. Zur Untersuchung der Transkriptionsreaktion wurde ein *in-vitro*-System, bestehend aus Zellkernextrakten von nicht-infizierten Kartoffelzellkulturen verwendet. Im Gegensatz zur Arbeit von Fels (1997), der unmittelbar im Anschluss an die Transkriptionsreaktion im Extrakt die Primer-Extension-Analyse zur Bestimmung des 5'-Endes der *de-novo*-RNA durchführte, sollte in dieser Arbeit die neu-synthetisierte PSTVd-RNA aufgereinigt und anschließend von der reinen *de-novo*-RNA das 5'-Ende bestimmt werden. Hierzu sollte ein Aufreinigungsverfahren etabliert werden, das es erlaubt, die *de-novo*-synthetisierte PSTVd-RNA von den anderen Nukleinsäuren des Transkriptionsansatzes zu trennen und sie so weiteren molekularbiologischen Untersuchungen zugänglich zu machen. Als geeignetes Verfahren konnte hier die Biotin-Streptavidin-vermittelte Affinitätschromatographie in Form einer hochspezifischen Hybridisierung eingesetzt und hinsichtlich der Fragestellung optimiert werden. Eine „falsche“, unspezifische Bindung des Primers in der anschließenden Primer-Extension-Reaktion, die in der vorausgegangenen Arbeit zu dem irreführenden Signal geführt hat, sollte hier auf Grund der vorgeschalteten Aufreinigung ausgeschlossen werden können, da nun die *de-novo*-PSTVd(-)-RNA das einzige Template in der Primer-Extension-Analyse ist.

2. Material und Methoden

2.1 Bezugsquellenverzeichnis

α -Amanitin	SIGMA, St. Louis, MO, USA
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Ammoniumsulfat)	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
2,4-Dichlorphenoxy Essigsäure	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Acrylamid, 2 x kristallisiert	SERVA FEINBIOCHEMICA
Agar	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Agarose	SIGMA, St. Louis, MO, USA / Seakem bestellt über Biozym Diagnostik GmbH, Deutschland
Amberlite Mischbettionenaustauscher	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumacetat	UCB, Leuven, Belgien
APS (Ammoniumperoxosulfat)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Blocking Reagenz	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
Borsäure	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Bradford Enzymassay	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Brij 35	Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	JANSSEN CHIMICA, Beerse, Belgien
BSA (Bovine Serum Albumine)	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
B-UTP (Biotin-16-uridine-5'-triphosphate)	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
CaCl ₂	ACROS ORGANICS, Geel, Belgien
Cellulase „Onozuka R-10“	SERVA FEINBIOCHEMICA GmbH&Co.KG, Heidelberg, Deutschland
Chloroform	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
CoCl ₂	SIGMA, St. Louis, MO, USA
CuSO ₄	SIGMA, St. Louis, MO, USA
DE-81-Papier	Whatman International Ltd., Maidstone, England
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Fluka Biochemika, Neu Ulm, Deutschland
DNaseI/ RNase-free	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
dNTPs	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
DTT (Dithithreitol)	ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA
Dynabeads M-280 Streptavidine	Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, Deutschland
EDTA (Titriplex)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim,
FeSO ₄	HOPKIN&WILLIAMS CHADWELL HEATH Essex, England

Ficoll 400	Amersham Pharmacia Biotech. AB, Uppsala, Schweden
Formaldehyd (37%)	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland
Formamid	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Gelbond-Folie	SERVA FEINBIOCHEMICA GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland
Glukose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Harnstoff	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland
HCl (1M)	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Hefeextrakt	DIFCO, geliefert durch OTTO NORDWALD, Hamburg, Deutschland
HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethan Sulfonsäure)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isoamylalkohol	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland
Kaliumcitrat	GRÜSSING GmbH, Filsum, Deutschland
KCl	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
KNO ₃	Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland
KOAc	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
KOH	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Leupeptin	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Lysozymchlorid	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Mazerozym	SERVA FEINBIOCHEMICA GmbH&Co.KG, Heidelberg, Deutschland
Mannit	Merck, Darmstadt, Deutschland
Masteramp TM RT-PCR-Kit	Epicentre Technologies, Madison, Wi, USA, bestellt über Biozym Diagnostik GmbH, Deutschland
MES (2-[N-Morpholino]-ethan Sulfonsäure)	SIGMA, St. Louis, MO, USA
MgCl ₂	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
MgOAc	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
MgSO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
MnSO ₄	Fluka Biochemika, Neu Ulm, Deutschland
myo-Inositol	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Na ₂ MoO ₄	FERAK, Berlin, Deutschland
NaBH ₄ (Natriumborhydrid)	SIGMA, St. Louis, MO, USA
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na-Deoxycholat	SIGMA, St. Louis, MO, USA
NaF	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
NaH ₂ PO ₄	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
NaOAc	ACROS ORGANICS, Geel, Belgien
Natriumhydrogencarbonat	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
NH ₄ NO ₃	ACROS ORGANICS, Geel, Belgien
Nikotinsäure	SIGMA, St. Louis, MO, USA
N-Laurylsarcosin	Fluka Biochemika, Neu Ulm, Deutschland
Nonidet P-40	Fluka Biochemika, Neu Ulm, Deutschland
Nylonmembran Biodyne A	Pall Gelman Laboratory, Dreieich, Deutschland
PEG 6000	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland

Pepstatin	SIGMA, St. Louis, MO, USA
PERCOLL	Amersham Pharmacia Biotech. AB, Uppsala, Schweden
Phenol	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Polynukleotidkinase (PNK)	NEW ENGLAND Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Pyridoxal Hydrochlorid	SIGMA, St. Louis, MO, USA
RNase A	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
RNasin	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
rNTPs	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
Röntgenfilme (Kodak-X-Omat TM)	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Saccharose	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Schwimmfilter (0,02 µm)	Millipore GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Screens (Verstärkerfolien Typ Extrarapid; Empfindlichkeit 200, Calcium-Wolframat, blauemittierend)	Gerlinde Kisker, Süddeutschland
SDS (Sodium dodecyl sulfat)	SERVA FEINBIOCHEMICA GmbH&Co.KG, Heidelberg, Deutschland
Silbernitrat (AgNO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Spermidin	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Spermin	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Superscript	GIBCO BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
TEMED (N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Thiamin-Dichlorid	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Trinatriumcitrat- Dihydrat	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
TRIS (TRIZMA BASE)	Sigma-Aldrich Steinheim, Deutschland
tRNA	Roche Diagnostik GmbH, Mannheim, Deutschland
Trypton	DIFCO, geliefert durch OTTO NORDWALD, Hamburg, Deutschland
Whatman-Papier	Whatman International Ltd., Maidstone, England
Xylencyanol FF	Fluka Biochemika, Neu Ulm, Deutschland
Zitronensäure	J. T. Baker, Deventer, Niederlande

2.2 Allgemeines zu Chemikalien und Puffern

Alle nicht anders gekennzeichneten Lösungen wurden von gängigen Herstellern bezogen und mit dem Reinheitsgrad *p.a.* verwendet. Die Herstellung wässriger Lösungen erfolgte mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Milli Q Water Purification System). Autoklavierbare Lösungen wurden für 20 Minuten bei 120°C und 2,4 bar autoklaviert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch eine 0,2 µm Membran sterilfiltriert (0,2 µm Porengröße, Schleicher und Schuell, Dassel). Verwendetes Phenol wurde mit 100 mM TRIS-HCl, pH 8,0 gesättigt und

mit 0,1 % 8-Hydroxychinolin versetzt (Maniatis *et al.*, 1982). Prozentangaben im Text beziehen sich auf Gewicht pro Volumen, wenn es nicht anders vermerkt ist. Die Zusammensetzung häufig verwendeter Puffer wird an dieser Stelle angegeben, die anderen werden an entsprechender Stelle vorgestellt.

2.3 Standardpuffer und Lösungen

10 x TBE	890 mM Tris, pH 8,0 890 mM Borsäure 25 mM EDTA
1 x TE	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
10 x TNE	500 mM TRIS-HCl, pH 8,0 1 M NaCl 10 mM EDTA
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Trinatriumcitrat-Dihydrat pH 7,0 mit HCl einstellen
Auftragspuffer	4 M Harnstoff 45 % Formamid 5 mM EDTA 0,1 % Bromphenolblau/ Xylencyanol FF 0,2 x TBE

2.4 DNA Oligonukleotide

Die im Folgenden beschriebenen DNA-Oligonukleotide wurden als Primer für die RT- und PCR-, sowie für die Sequenzier- und Primer-Extension-Analysen verwendet. Die in Klammern angegebene Bezeichnung (+) oder (-) gibt an, welche Polarität das entsprechende Oligonukleotid hat. (+) bedeutet, dass es der cPSTVd-Sequenz entspricht und gegen (-)-Polarität hybridisiert. Demzufolge bezeichnet (-) diejenigen Oligonukleotide, deren Sequenz komplementär zum cPSTVd ist und gegen (+)-Polarität hybridisiert. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle DNA-Oligonukleotide von Thermo Hybaid, Ulm bestellt. Die T_M -Werte wurden z.T. von Fels (1997) übernommen und mit dem POLAND-Programm für eine Reaktion zweiter Ordnung berechnet (Steger, 1994).

Folgende Parameter wurden für die Berechnung der Oligonukleotide festgelegt:

Ionenstärke:	100 mM NaCl, nach Klump (1987)
Dissoziationskonstante β :	1×10^{-3} M
Primer-Konzentration:	2×10^{-8} M

Primer AF 6 (+), nach Fels (1997)

Sequenz (5' → 3')	GGA AAC AAC TGA AGC TCC CGA GAA C
Pos. im cPSTVd	268-292
Länge (Nt)	25
T _M -Wert	58,0-62,0°C

Primer AF 9 (+), nach Fels (1997)

Sequenz (5' → 3')	TCA CCC TTC CTT TCT TCG GGT GTC CTT C
Pos. im cPSTVd	181-209
Länge (Nt)	28
T _M -Wert	57,0-65,0°C

Primer AF 15 (+), nach Fels (1997)

Sequenz (5' → 3')	AAC CTG GAG CGA ACT GGC AAA
Pos. im cPSTVd	100-121
Länge (Nt)	21
T _M -Wert	54,0-65,0°C

Primer AF 16 (+), nach Fels (1997)

Sequenz (5' → 3')	GAG GGT GTT TAG CCC TTG GAA
Pos. im cPSTVd	324-344
Länge (Nt)	21
T _M -Wert	53,0-60,0°C

Primer AF 17 (+), nach Fels (1997)

Sequenz (5' → 3')	GAA GGC GGC TCG GA
Pos. im cPSTVd	61-74
Länge (Nt)	14
T _M -Wert	57,0°C

Primer AF 21 (+), nach Fels (1997)

Sequenz (5' → 3')	CGG AAC TAA ACT CGT GGT TC
Pos. im cPSTVd	1-20
Länge (Nt)	20
T _M -Wert	56,0°C

Primer XC 1 (+), nach Chen *et al.* (1995)

Sequenz (5' → 3')	GGA CGG TGG GGA GTG C
Pos. im cPSTVd	124-139
Länge (Nt)	16
T _M -Wert	57,0-59,0°C

Primer RGV 1 (-), nach Gruner (1992)

Sequenz (5 → 3')	CCT GAA GCG CTC CTC CGA G
Pos. kompl. zu cPSTVd	87-69
Länge (Nt)	19
T _M -Wert	61,7°C

Primer RGV 5 (-), nach Gruner (1992)

Sequenz (5' → 3')	GGA AGG ACA CCC AAG AAA GGA AGG GTG AAA A
Pos. kompl. zu cPSTVd	208-178
Länge (Nt)	31
T _M -Wert	48,4-66,0°C

Primer NK 1 (-)

Sequenz (5' → 3')	TTC CAA GGG CTA A
Pos. kompl. zu cPSTVd	344-332
Länge (Nt)	13
T _M -Wert	54,3°C

Primer NK 2 (-)

Sequenz (5' → 3')	GGA AGG ACA CCC GAA GAA AGG AAG GGT G
Pos. kompl. zu cPSTVd	208-181
Länge (Nt)	28
T _M -Wert	68,7°C

Primer NK 3 (-)

Sequenz (5' → 3')	TTT CGG CGG GAA TTA CTC CT
Pos. kompl. zu cPSTVd	171-152
Länge (Nt)	20
T _M -Wert	67,6°C

Primer NK 4 (-)

Sequenz (5' → 3')	CCT GAA GCG CTC CTC CG
Pos. kompl. zu cPSTVd	87-71
Länge (Nt)	17
T _M -Wert	65,0°C

Primer NK 5 (-)

Sequenz (5' → 3')	GAG GTC AGG TGT GAA C
Pos. kompl. zu cPSTVd	41-26
Länge (Nt)	16
T _M -Wert	64,8°C

Primer NK 6 (-)

Sequenz (5' → 3')	ATC CCT GAA GCG CTC C
Pos. kompl. zu cPSTVd	90-75
Länge (Nt)	16
T _M -Wert	64,8°C

2.5 Zellkulturen

2.5.1 Kultivierung und Pflege

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (Clean Air, Typ DLF BSS6, Woerden) durchgeführt. Verwendete Glasgeräte wurden über Nacht bei 200°C ausgeheizt; Silikosestopfen zum Verschließen der Erlenmeyerkolben wurden autoklaviert. Die Kultivierung der Kalluskultur erfolgte auf Kallusmedium (vgl. 2.5.2) im Dunkeln bei 24°C in

zylindrischen Polycarbonat-Dosen (Durchmesser: 6 cm; Höhe: 6,5 cm; Greiner Labortechnik, Solingen-Gräfrath). Alle vier Wochen wurde zur Erhaltung der Kalluskultur eine Kallusmenge von etwa 1 cm Durchmesser abgenommen und auf frisches Kulturmedium umgesetzt. Hierbei wird die Zellmasse gut auf dem neuen Medium verstrichen, um ein optimales Wachstum der Zellen zu ermöglichen. Ausgehend von der Kalluskultur wurde eine Suspensionskultur angelegt. Hierzu wurde eine ähnlich große Kallusmenge in einen 20 ml-Erlenmeyerkolben mit ca. 5 ml Kulturmedium überführt (Angaben waren mündliche Mitteilungen der DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen - GmbH, Braunschweig). Die Suspensionskultur wurde bei 24°C und 140 rpm im Dunkeln in einem temperierbaren Zellkulturschüttler (Neu Brunswick, innova 4330) kultiviert. Nach einer Anlaufphase von etwa zwei Wochen, in der sich die Zellzahl nur sehr langsam erhöhte, erreichte die Kultur ein Verdopplungsintervall von einer Woche, und konnte alle sieben Tage im Verhältnis eins zu eins mit frischem Kulturmedium verdünnt werden, bis eine Kulturgröße von 200 ml in einem 1 l-Erlenmeyerkolben erreicht war. Auf dieser Kulturgröße wurde die Suspensionskultur stabil kultiviert, indem jede Woche auf Grund der hohen Wachstumsrate 170 ml des Kulturvolumens pro Kolben abgegossen und durch frisches Medium ersetzt wurden. Für eine Zellkernpräparation wurde die Kultur auf vier 1 l-Erlenmeyerkolben mit je 200 ml Kultur hochgesetzt. Der gesamte Inhalt aus zwei der vier 1 l-Kolben (ca. 30-40 g Kartoffelzellen) wurde für die Zellkernpräparation verwendet. Die verbleibenden zwei 1 l-Kolben dienten dem Erhalt der Suspensionskultur.

2.5.2 Kulturmedium

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Medium (modifiziert) von Murashige und Skoog (1962; s. nachfolgende Tabelle).

Kulturmedium der *Solanum tuberosum*- Kulturen HH 258 und PC 1135 cv. Desiree

Komponente	mg/l (einfache Konz.)	Stammlösung (n-fach konz.)
NH ₄ NO ₃	1650	100 x
KNO ₃	1900	100 x
MgSO ₄	370	100 x
KH ₂ PO ₄	170	100 x
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	440	200 x
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	41,3	200 x
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	27,8	
H ₃ BO ₃	6,2	2000 x
MnSO ₄ x 4 H ₂ O	22,3	2000 x
ZnSO ₄ x 4 H ₂ O	8,6	2000 x
KJ	0,83	10000 x
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,25	10000 x
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,03	10000 x
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,03	20000 x
Nicotinic acid	0,5	100 x (in "100 x Mix 1")
Thiamine dichloride	0,1	1000 x (in "1000 x Mix 2")

Komponente	mg/l (einfache Konz.)	Stammlösung (n-fach konz.)
Pyridoxal hydrochloride	0,5	100 x (in "100 x Mix 1")
myo-Inositol	100	100 x (in "100 x Mix 1")
Hormon: 2,4-Dichlorphenoxy essigsäure	0,442	1000 x (in "1000 x Mix 2")
Glycin	2	100 x (in "100 x Mix 1")
Saccharose	20000	
Agar (optional)	8000	

Alle Komponenten der Lösungen "Mix 1" und "Mix 2" werden nach dem Ansetzen als 100-fache Stammlösung in eine autoklavierte Glasflasche sterilfiltriert, da sie nicht autoklaviert werden können. Beide "Mixe" werden bei 4°C gelagert. Das Flüssigmedium wird ohne die beiden "Mixe" angesetzt, der pH-Wert mit KOH auf 5,8 eingestellt und das Medium autoklaviert. Anschließend werden die beiden "Mixe" unter der Sterilbank durch einen Einmal-Sterilfilter (0,2 µm Porengröße, Schleicher und Schuell, Dassel) zugegeben. Das fertige Kulturmedium wurde bei 4°C gelagert und vor Zugabe zu der Suspensionskultur auf Raumtemperatur erwärmt. Für Kalluskulturen wurden dem Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 8 g Agar hinzugefügt. Nach dem Autoklavieren wurden dem ca. 60°C heißen Medium die sterilfiltrierten "Mixe 1 und 2" zugegeben und anschließend das Kallusmedium ca. 2 cm hoch in die Polycarbonat-Dosen gegossen. Die fertigen Kallus-Dosen wurden bei 4°C gelagert.

2.6 Präparative Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zellkultur der Linie *Solanum tuberosum* HH 258 wurde mir freundlicherweise in Form von Kalluskultur von Frau Dr. Lieselotte Schilde (Institut für Pflanzenbiochemie, Universität Tübingen) übergeben und konnte im Verlauf dieser Arbeit stabil als Flüssigkultur etabliert werden. Zur Sicherheit wurde eine zweite Zelllinie in Kultur genommen, die kommerziell von der DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Deutschland – erworben wurde (*Solanum tuberosum* cv. Desiree, PC 1135). Dies geschah ebenfalls in Form einer Kalluskultur, die dann stabil als Suspensionskultur etabliert wurde.

2.6.1 Präparation von hochreinen Zellkernen aus HH 258 Kartoffelzellen

Aus zwei 1-l-Erlenmeyerkolben mit je 200 ml Flüssigkultur der nicht-infizierten *Solanum tuberosum* HH 258-Flüssigkultur wurden hochreine Zellkerne isoliert, um einen transkriptionsaktiven Zellkernextrakt präparieren zu können. (Dies geschieht im Hinblick auf die Analyse der PSTVd-Transkription durch die RNA Polymerase II). Die Präparation erfolgte weitgehend nach einem von Fels (1997) modifizierten Protokoll von Roberts und Okita (1991). Die Zellkernpräparation geht hierbei von HH 258-Protoplasten aus, die mit deutlich geringerem mechanischen Aufwand aufgebrochen werden können als intakte Zellen und somit eine schonendere Isolation der Zellkerne erlaubt. Zudem erfolgte die Präparation

mit Puffern, die durch Zugabe von NaF eine Dephosphorylierung von Phosphoproteinen und den dadurch bedingten Verlust an Transkriptionsaktivität verhinderten. Für pflanzliche Transkriptionssysteme (Bohne: Arias *et al.*, 1993; Tabak: Fan und Sugiura, 1995) konnte gezeigt werden, dass NaF die Phosphatasen inhibiert. Zur Zellwandverdauung wurde ein Gemisch aus Pectolyase, Cellulase und Hemicellulase (= Mazerozym) verwendet. Aus den präparierten Zellkernen konnte ein transkriptionsaktiver Kernextrakt gewonnen werden.

Das Präparationsprotokoll gliedert sich in mehrere Schritte, die alle, soweit nicht anders vermerkt, bei 4°C durchgeführt wurden.

Verwendete Lösungen zur Kernextraktion:

Plasmolytikum

0,4 M Mannit
0,05 M Kaliumcitrat
pH 5,8 mit Zitronensäure einstellen

Enzymlösung

1 % Cellulase „Onozuka R-10“ (10 u/ml)
1 % Mazerozym (0,5 u/ml Pectolyase und 0,2 u/ml Hemicellulase)
1 x Plasmolytikum

Lysispuffer (5 x L)

100 mM MES-KOH, pH 5,8
750 µM Spermin
2,5 mM Spermidin
50 mM β-Mercaptoethanol
100 mM KCl
pH 5,8 mit KOH einstellen

Waschpuffer (1 x L⁺)

1 x L
1 mM PMSF
0,7 µM Leupeptin
0,15 µM Pepstatin
10 mM NaF

L¹⁵, bzw. L¹⁸

1 x L⁺
15 % (L¹⁵), bzw.
18 % (L¹⁸) Ficoll 400 (w/v)

Kissenpuffer (E)

87,6 % (w/v) Percoll
0,62 x L

Kissenpuffer frisch (E⁺)

1 x	E
500 µM	PMSF
10 mM	NaF

Kern-Suspensionspuffer (NRB)

1 x	L
30 % (v/v)	Glycerin
0,12 % (v/v)	Nonidet P-40

Kern-Suspensionspuffer frisch (NRB⁺)

500 µM	PMSF
10 mM	NaF

Alle Lösungen wurden nach dem Ansetzen in autoklavierte Glasflaschen sterilfiltriert (0,2 µM) und sind bei 4°C gelagert für mehrere Monate verwendbar. Die Enzymlösung, sowie L¹⁵, L¹⁸, L⁺, E⁺ und NRB⁺ wurden für jede Kernpräparation frisch angesetzt.

Zunächst werden die 2 x 200 ml Suspensionskultur durch einen Faltenfilter filtriert und die Zellmasse mit 150 ml Plasmolytikum gewaschen. Die eigentliche Protoplastisierung der Zellen erfolgte durch Rotation der Lösung in 200 ml Plasmolytikum für 1 h bei 25°C und 140 rpm im Zellkulturschüttler. Die Zellen wurden anschließend erneut durch einen Faltenfilter filtriert und für 1 bis 2 h mit 150 ml Enzymlösung bei 25°C und 140 rpm im Zellkulturschüttler inkubiert. Es wurden Stichproben genommen und unter dem Mikroskop auf Effizienz der Zellwandverdauung kontrolliert. Im Anschluss wurden die Protoplasten für 5 Minuten bei 1500 rpm, 4°C (Heraeus Sepatech Minifuge RF) sanft abzentrifugiert und das Pellet insgesamt 3 x mit je 25 ml Plasmolytikum (4°C) gewaschen. Anschließend wurden die Protoplasten in 50 ml eiskaltem L¹⁵ aufgenommen und in einen Glashomogenisator überführt. Die Protoplasten wurden auf Eis durch ca. 10-15 x „Douncen“ mechanisch aufgebrochen; unter dem Mikroskop konnten mehr als 80 % freie Kerne detektiert werden.

Die Isolierung der Zellkerne geschieht mittels Filtration durch zwei Edelstahlsiebe (140 µm und 40 µm Maschenweite) mit einer typischen Ausbeute von etwa 40-45 ml Filtrat. Hiermit wird ein Ficoll-Stufengradient überschichtet (10 ml Puffer E⁺ [Boden] und 25 ml L¹⁸) und für 1,5 h bei 5000 rpm (Heraeus Sepatech Minifuge RF) bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss an die Zentrifugation befinden sich die Zellkerne in der Interphase zwischen E⁺-Puffer und L¹⁸ und konnten mit einer Glaspipette abgenommen werden. Die gewonnenen Zellkerne wurden in frische Corex-Röhrchen überführt, mit 15 ml L⁺-Puffer versetzt und erneut für 20 Minuten bei 3850 rpm (Heraeus Sepatech Minifuge RF) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den darin enthaltenen Zelltrümmern wurde verworfen und die pelletierten Kerne in 2 ml NRB⁺-Puffer vorsichtig durch sanftes Schwenken resuspendiert, um die Zellkerne nicht zu beschädigen. Es wurde ein Aliquot von 5 µl abgenommen, mit Karminessigsäure angefärbt und unter dem Mikroskop in einer Thomae-Zählkammer die Anzahl der Zellkerne bestimmt. Typischerweise lieferte eine Präparation ca. 1-2 x 10⁸ Kerne pro 30 mg Nassgewicht. Die verbliebenen Kerne wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.6.2 Präparation eines transkriptionsaktiven Kernextraktes

Zur Präparation des Kernextraktes wurden die bei -70°C gelagerten Zellkerne auf Eis aufgetaut und für 5 Minuten bei 10000 rpm (Heraeus Sepatech Minifuge RF) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die sedimentierten Kerne in 2 ml X^+ resuspendiert und in einen Glashomogenisator (5 ml) überführt. Die Kerne wurden mit 5-10 Stempelstößen auf Eis mechanisch aufgebrochen und die entstandene Suspension wurde für 1 Stunde bei 600 rpm auf Eis gerührt. Anschließend diente eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 14500 rpm (Beckman J2-21, Rotor: JA 20.1) bei 4°C der Trennung von hochmolekularer, genomischer DNA und Zellmembranresten von dem Proteinextrakt. Der Überstand wurde abgenommen und zunächst für 5 Stunden und nach Erneuerung des Dialysepuffers über Nacht gegen 200 ml Y^+ dialysiert. Der Extrakt konnte anschließend aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C für ca. 3 Monate gelagert werden, ohne nennenswert an Transkriptionsaktivität zu verlieren. Im Anschluss an die Präparation wurde der Proteingehalt nach dem Protokoll von Bradford (1976) bestimmt. Die Proteinausbeute war von der jeweiligen Präparation abhängig und variierte zwischen 3-15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Extrakt.

Verwendete Lösungen zur Kernextrakt-Präparation:

Extraktionspuffer (X)

20 mM	HEPES-KOH, pH 7,9
600 mM	NaCl
1,5 mM	MgCl ₂
25 %	Glycerin

Extraktionspuffer frisch (X^+)

1 x	Puffer X
1 mM	PMSF
10 mM	DTT
10 mM	NaF

Dialysepuffer (Y)

20 mM	HEPES-KOH, pH 7,9
100 mM	KCl
20 %	Glycerin

Dialysepuffer frisch (Y^+)

1 x	Puffer Y
1 mM	PMSF
0,2 mM	EDTA
1 mM	DTT

2.6.3 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte nach Dagert und Ehrlich (1979). Hierzu wurden 100 ml YT-Medium mit 1 ml einer „über-Nacht“-Kultur des gewünschten *E. coli*-Stamms angeimpft und auf einem Rundschüttler (New Brunswick Scientific Gio Gyrotory) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,5-0,6 angezogen. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C und mit vorgekühlten Geräten durchgeführt. Die Kulturen wurden in sterile 50 ml Corex-Röhrchen gefüllt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie bei 4000 rpm und 4°C für 5 Minuten im Ausschwingrotor zentrifugiert (Heraeus Christ Megafuge 1.0 R). Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 0,5 Volumen 0,1 M CaCl₂ sanft durch Schwenken resuspendiert, erneut für 1 h auf Eis inkubiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 1/25 Volumen 0,085 M CaCl₂ mit 15 % Glycerin sanft resuspendiert und in sterile Eppendorfgefäße à 200 µl aliquotiert. Diese wurden 1-24 h zur Glycerinaufnahme bei 4°C gelagert, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und konnten bei -70°C gelagert werden.

YT-Medium	8 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	5 g/l	NaCl
	in H ₂ O _{dest.} pH 7,4 mit NaOH	

2.6.4 Transformation kompetenter *E. coli* Zellen

Für den Restriktionsverdau des betrachteten Plasmids musste dieses aus einem *dam*-sensitiven Stamm in einen *dam*(-)-Stamm umtransformiert werden. Das bedeutet, das Plasmid musste aus den Bakterienzellen vom Typ DH5α in einen anderen Bakterienstamm vom Typ GM 2199 gebracht werden. Dieser wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Rolf Wagner (Uni Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Zur Transformation kompetenter *E. coli* Zellen wurde die Methode nach Hanahan (1985) angewendet. 200 µl auf Eis aufgetaute GM 2199-Zellen wurden mit 10 ng bzw. 50 ng Plasmid in einem Volumen von 20 µl versetzt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 3 min bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt und mit 800 µl auf 37°C vorgewärmtem YT-Medium versetzt und für 60-90 Minuten bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden 100 oder 200 µl auf selektive YT-Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert. Die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen pro µg DNA konnte nach einer „über Nacht“-Inkubation bei 37°C durch Auszählen der Kolonien unter Berücksichtigung der eingesetzten DNA-Menge und des ausplattierten Volumens errechnet werden.

2.6.5 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab- „Minipräp.“

Die „Minipräparation“ wurde nach dem Protokoll von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Hierzu wurden 2 ml einer „über Nacht“-Kultur in 2 Schritten in einem Eppendorfgefäß für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl Lysislösung I resuspendiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde frisch angesetzte Lysislösung II zugegeben, das Gemisch kurz gevortext und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 150 µl 3 M KOAc, pH 4,8

zugesetzt und 5 min auf Eis inkubiert, wodurch chromosomale DNA, sowie Zelltrümmer ausgefällt wurden. Die folgende Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm (Hettich Mikro 22) diente dem Abtrennen der Komponenten, wobei das Plasmid im Überstand verblieb. Dieser wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 30 ml H₂O_{auto} resuspendiert. Für eine Restriktionsanalyse wurden 5 µl eingesetzt, mit 20 µg/ml RNase A hydrolysiert (30 Minuten bei 37°C) und auf einem Agarosegel analysiert.

Verwendete Lösungen

Lysislösung I

25 mM	TRIS-HCl, pH 8,0
50 mM	Glucose
10 mM	EDTA, pH 8,0
3 mg/ml	Lysozymchlorid

Lysislösung II

0,2 N	NaOH
1 % (w/v)	SDS

2.6.6 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab- „Maxipräp.“

Die „Maxipräparation“ von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll von Hillen *et al.* (1981). Hierzu wurde eine „über Nacht“-Kultur mit einer Einzelkolonie angeimpft. Am nächsten Tag wurde eine Vorkultur (25 ml) 1:100 angeimpft und bei 37°C für mehrere Stunden geschüttelt (New Brunswick Gio Gyrotory). Mit dieser Vorkultur wurde schließlich am Abend eine Hauptkultur von 800 ml in einem 2 l-Erlenmeyerkolben angesetzt (1:100 verdünnt) und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Alle Kulturen wurden in YT-Medium mit Ampicilin kultiviert. Im Anschluss wurde die Hauptkultur für 5 Minuten bei 8000 rpm und 4°C (Beckmann Zentrifuge J2-21, Rotor: JA10) zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 8 ml Saccharose-Puffer resuspendiert und in ein Ti 55.2-Polycarbonatröhrchen (Beckmann) überführt. Es wurden 3 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0, sowie 3 ml Lysozymlösung zugegeben, die Suspension durchmischt und anschließend für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Hiernach wurden 2 ml Brij-Doc-Lösung zugesetzt, für weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss für 30 Minuten bei 44000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckmann L8-55 Ultrazentrifuge, Rotor: Ti 55.2). Der klare Überstand wurde in einen Messbecher dekantiert und für 30 Minuten bei 37°C mit 50 µg RNase A/ml inkubiert. Danach wurden 50 µg Proteinase K/ml zugegeben und nochmals für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,5 Volumen PEG-Lösung für 30 Minuten bei -20°C gefällt und anschließend für 30 Minuten bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckmann Zentrifuge J2-21, Rotor: JA14). Das Pellet wurde in 5 ml TE-Puffer auf Eis resuspendiert, 2 x mit 5 ml Phenol/Chloroform und 1 x mit 5 ml reinem Chloroform extrahiert. Eine anschließende Ethanol-fällung diente der Präzipitation der DNA, die im Anschluss in 1 ml TE-Puffer resuspendiert und für 1 bis 2 Stunden gegen TE-Puffer dialysiert wurde. Die Konzentration, sowie die Reinheit konnte spektralphotometrisch, sowie in einem Agarosegel untersucht werden.

Verwendete Lösungen

Saccharose-Puffer

25 % (w/v) Saccharose
50 mM TRIS-HCl, pH 8,0

Lysozym-Lösung

20 mg/ml Lysozymchlorid
50 mM TRIS-HCl, pH 8,0
immer frisch angesetzt

Brij-Doc-Lösung

2 Volumenanteile 10 % (w/v) Brij 35
1 Volumenanteil 10 % (w/v) Na-Deoxycholat
in H₂O_{dest}, pH 8,0 mit NaOH eingestellt
Lösung erfolgte nach NaOH-Zugabe

RNase A

200 µg/ml RNase A in 10 mM TRIS-HCl, pH 8,0
(die RNase wurde vor Verwendung nach Maniatis *et al.* (1982)
durch Kochen von DNase-Aktivität gereinigt)

Proteinase K

20 mg/ml in H₂O_{dest}

PEG-Lösung

30 % (w/v) PEG₆₀₀₀ in 1,5 M NaCl

2.6.7 Gelelution von radioaktiven *in-vitro*-Transkripten

Auf Grund der teils fehlerhaften Transkriptionsprodukte durch die T7-Polymerase, die entweder „mehr-als-Einheitslängen“-Transkripte darstellen, oder zu kurze Transkripte auf Grund von Abbrüchen während der Transkription, wird eine Gelelution angeschlossen. Hierbei wird der komplette Transkriptionsansatz in einem denaturierenden PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und nur das korrekte Produkt mit Hilfe eines Skalpell aus geschnitten. Zur Trennung der Transkriptionsprodukte mit einer Länge von 359 Nt, bzw. 727 Nt wurde ein denaturierendes 6 % PAA-Gel (30 %, 30:1) gewählt. Um Produkt-Dimere auszuschließen, wurden die Proben vor dem Auftragen denaturiert. Auch hier sollten sie während der Elektrophorese denaturiert bleiben. Anschließend wurde das Gel kurz (ca. 10-20 s) gegen einen Röntgenfilm exponiert, um die strahlenden Banden sichtbar zu machen. Die Position des Films auf dem in Frischhaltefolie eingeschlagenen Gel wurde mit einem wasserfesten Lackstift markiert, um später, nach Entwicklung des Films, diesen als Schablone zum Ausschneiden der Banden aus der Gelmatrix verwenden zu können. Die Autoradiographie wurde so

unter das Gel gelegt, dass die vorher markierten Bereiche aneinander anschlossen. An der Stelle, wo der Film geschwärzt war, konnte man Transkriptionsprodukte erwarten. Ausgeschnitten wurden ausschließlich die Fragmente der korrekten Länge. Die ausgeschnittenen Gelstückchen wurden in Eppendorfgeläße überführt, die 300 µl Elutionspuffer enthielten.

Elutionspuffer

0,3 M NaOAc, pH 6,0
1 mM EDTA
0,2 % SDS
ad 300 µl H₂O_{auto}

Die Eppendorfgeläße mit den Gelstückchen wurden über Nacht bei 4°C geschüttelt (Eppendorf Mixer 5432), um die Nukleinsäure aus dem Gel in den Puffer zu überführen. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, in ein frisches ReaktionsgefäÙ überführt und die darin enthaltene Nukleinsäure mittels Ethanolfällung präzipitiert. Die Pellets wurden in der Regel in 1 x TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.6.8 Gelelution von unmarkierten Nukleinsäuren

Die Elution von nicht-radioaktiv markierten Nukleinsäuren erfolgte weitestgehend analog dem bereits beschriebenen Verfahren für radioaktiv markierte Nukleinsäuren (s. 2.5.8). Nach der denaturierenden PAA-Gelelektrophorese wurde das Gel in eine Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) gelegt und für 15 Minuten sanft geschwenkt. Hierbei interkalieren die Ethidiumbromidmoleküle zwischen die Basen des Einzelstranges und können mittels UV-Licht detektiert werden. Die zu eluierende Nukleinsäure wurde mit Hilfe eines Skalpells präzise herausgeschnitten, zerkleinert und in ein ReaktionsgefäÙ mit 300 µl Elutionspuffer überführt. Anschließend wurden die ReaktionsgefäÙe 2 x in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben über Nacht bei 4°C geschüttelt. Das Schockfrieren in Stickstoff sollte hierbei das Aufbrechen der PAA-Gelmatrix bewirken und so den Austritt der Nukleinsäure aus dem Gel erleichtern. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und durch autoklavierte Glaswolle zentrifugiert. Dies erlaubt eine Abtrennung eventuell noch vorhandener kleiner PAA-Stückchen. Der so gereinigte Elutionsüberstand wurde nach dem üblichen Protokoll mit Ethanol gefällt und das Pellet in der Regel in 1 x TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.7 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.7.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Zur Trennung von Proteinen und Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde die Phenol/Chloroform-Extraktion verwendet. Hierzu wurde die wässrige Lösung zunächst mit einem Volumen reinem Phenol versetzt, gründlich gemischt und anschließend zur Phasentrennung für 2 Minuten bei Raumtemperatur und 13000 rpm (Hettich EBA 12) zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde vorsichtig – ohne Bereiche der Interphase – abgenommen und in ein frisches ReaktionsgefäÙ überführt. Es wurde 1 Volumen eines Phenol/Chloroform-Gemisches (Verhältnis 1:1) zugegeben, gut durchmischt und erneut wie

bereits beschrieben zentrifugiert. Wiederum wurde der wässrige Überstand abgenommen, mit 1 Volumen reinem Chloroform versetzt und verfahren wie beschrieben. Die Extraktion mit reinem Chloroform dient der Entfernung eventuell mitüberführter Phenolreste, welche die anschließende enzymatische Reaktionen negativ beeinflussen. Der zuletzt gewonnene, wässrige Überstand wurde in der Regel mit Ethanol gefällt, das Pellet in einem geeigneten Volumen eines geeigneten Puffers resuspendiert und bei -20°C gelagert.

2.7.2 Nukleinsäure-Fällungen

2.7.2.1 Ethanol-Fällung

Zur Fällung von Nukleinsäuren aus Reaktionsansätzen wird standardmäßig die wässrige Lösung auf 300 mM Natriumacetat eingestellt. Die anschließende Zugabe von 2,5-fachem Volumen an -20°C kaltem, 96 %-igem Ethanol, sowie einer 1-stündigen Inkubation auf Eis führt zur Präzipitation der Nukleinsäure. Eine folgende Zentrifugation für mindestens 60 Minuten bei 4 °C und 12000 rpm (Hettich EBA 12 R) dient dem Pelletieren. Der Überstand wird verworfen und das Pellet zur Entfernung eventuell mitgefallener Salze mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Es schließt sich eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 12000 rpm für ca. 30 Minuten an. Der Überstand wird ebenfalls verworfen und das Pellet für 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die erhaltene Nukleinsäure wird in geeignetem Volumen eines geeigneten Puffers resuspendiert. Für besonders große zu fällende Volumina (>1 ml) wurde die Inkubation der Nukleinsäure in der Regel bei -20°C und über Nacht durchgeführt. Die anschließende Zentrifugationsdauer betrug zwischen 1,5 h und 3 h. Beides diente der Erhöhung der Ausbeute.

2.7.2.2 Ethanol-Ammoniumacetat-Fällung

Bei der Fällung sowohl von radioaktiv markierten *in-vitro*-Transkripten, als auch von 5'γ-endmarkierten Oligonukleotiden wurde der Ethanol-fällung ein zusätzlicher Schritt vorrausgestellt. Die wässrige Lösung wurde zunächst auf 2,5 M Ammoniumacetat eingestellt und mit 2,5-fachem Volumen von 96 %-igem, -20°C-kaltem Ethanol versetzt. Die anschließende Zentrifugation, sowie das Waschen der Nukleinsäure entspricht der oben beschriebenen Ethanol-fällung. Das Pellet wird in 50 µl 1 x TE-Puffer resuspendiert und erneut mit Ethanol gefällt. Die vorgeschaltete Ammoniumacetat-Fällung dient der Abtrennung von Mononukleotiden, da diese wesentlich schlechter zu fällen sind. Das bedeutet, dass radioaktiv markierte Nukleotide, die während einer *in-vitro*-Transkription oder 5'γ- Endmarkierung nicht eingebaut wurden, nicht zusammen mit der Nukleinsäure präzipitiert werden und somit die anschließende Messung der tatsächlichen Radioaktivität der Probe nicht verfälschen.

2.8 Gelelektrophoresen

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Gelelektrophoresen wurden Polyacrylamidmatritzen verwendet, deren Trennbereich sich nach der Prozentigkeit und dem Vernetzungsgrad richtet. Es wurden Polyacrylamid (PAA)-Stammlösungen verwendet, die sowohl aus 30 % PAA mit

einem Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid von 30:1 bestanden, als auch 40 % PAA mit einem Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylenbisacrylamid von 19:1. Der sogenannte Vernetzungsgrad bezeichnet das eben beschriebene Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid, wobei ein höherer Anteil an Bisacrylamid zu einer stärkeren Vernetzung führt. Um eventuelle Verunreinigungen in der Gellösung zu vermeiden, wird die Lösung nach dem Ansetzen für ca. 1 h mit einem Ionenaustauscher versetzt (Amberlite MB-3) und anschließend filtriert. Die Polymerisation der PAA-Lösung wird durch Zugabe von 10 % Ammoniumperoxosulfat (APS) gestartet. Zum Abfangen der entstehenden Radikale werden dem Ansatz 0,1 % N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) zugesetzt.

2.8.1 Leistungsgesteuerte, denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelanalyse von PCR-Produkten, *in-vitro*-Transkripten, cPSTVd, sowie die standardisierte Längenkontrolle von Nukleinsäuren erfolgte mittels der leistungsgesteuerten, denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die hierbei beabsichtigte, thermische Denaturierung der Nukleinsäure erfolgt nicht durch die Verwendung eines Wasserbads oder einer temperierbaren Gelkammer, sondern die erforderliche Wärme wird direkt im Gel durch den Stromfluss erzeugt. Um eine gute und gleichmäßige Temperaturverteilung über das gesamte Gel, bzw. über die gesamte Glasplatte zu gewährleisten, wird zusätzlich eine Aluminiumplatte vor die dem Pufferbad abgewandte Glasplatte gespannt. Zur erleichterten Handhabung wurden die Gele auf die hydrophile Seite einer Gelbond-Folie (SERVA FEINBIOCHEMICA GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland) gegossen, auf die sie dann aufpolymerisieren. Um die Denaturierung der Proben von Beginn der Elektrophorese an zu gewährleisten, wird das Gel vor dem Auftragen der Proben für ca. 20 Minuten bei 50 W vorgeheizt, um zum Zeitpunkt des Probenauftrags auf etwa 50-60°C temperiert zu sein. Während der eigentlichen Elektrophorese wird eine Leistung von ca. 30 W am Gel aufrechterhalten. Diese Temperatur und der dem Gel zugesetzte Harnstoff reichen aus, um die Proben in einem denaturierten Zustand zu halten. Zusätzlich zu den Gelbedingungen werden die Proben vor dem Auftragen denaturiert, indem sie in einem Auftragspuffer (s. 2.2) für ca. 3 Minuten (je nach Probenvolumen) über 90°C erhitzt und anschließend schnell auf Eis abgekühlt werden. Die jeweilige PAA-Konzentration, bzw. die Prozentigkeit des Gels, wird je nach Länge der zu trennenden Nukleinsäure-Fragmente gewählt. Für die RT-PCR-Produkte mit einer Länge von 85 Nt bis 105 Nt, sowie *in-vitro*-Transkripte mit einer Länge von 368 Nt bis 731 Nt wurde ein 12 %-iges, bzw. 8 %-iges PAA-Gel (30 %; 30:1) verwendet. Der PAA-Matrix wurden neben der jeweiligen Polyacrylamidkonzentration zusätzlich Harnstoff und TBE-Puffer zugesetzt, so dass sich eine Endkonzentration von

X % PAA
8 M Harnstoff
1 x TBE

ergab. Die Gellösung wurde anschließend auf 0,1 % TEMED und 10 % APS eingestellt. Für solche Gele, in denen radioaktiv markierte Nukleinsäuren getrennt wurden, wird zum Schutz des Laufpuffers vor Kontamination DE-81-Papier (Ion-Exchange Chromatography-Papier, Whatman) unter den unteren Rand der beiden Glasplatten gelegt. So können eventuell auslaufende, radioaktive Mononukleotide oder sehr kurze Fragmente an das Papier gebunden werden, wenn sie aus dem Gel austreten und gelangen nicht ins untere Pufferbad, wodurch eine Kontamination verhindert wird. Die Dauer der Elektrophorese variierte je nach

Experiment und wird bei der Beschreibung des jeweiligen Experiments angegeben. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele entsprechend der aufgetragenen Proben entweder silbergefärbt oder bei -70°C gegen Röntgenfilme (Kodak-X-OMATTM, Sigma, St. Louis, USA) exponiert.

2.8.2 Bidirektionelle Gelelektrophorese

Die Elution von zirkulärem PSTVd aus vorfraktionierten, pflanzlichen Rohextrakten, die von Herrn Bernd Esters präpariert wurden, geschah mittels bidirektioneller Gelelektrophorese (Schumacher *et al.*, 1983). Sie bietet eine besonders einfache, sowie effiziente Möglichkeit, cPSTVd von anderen pflanzlichen Nukleinsäuren innerhalb des Rohextraktes zu trennen. Die Separation der Viroidmoleküle erfolgt nach folgendem Prinzip: In der ersten Dimension werden unter nativen Bedingungen die pflanzlichen Nukleinsäuren von der Viroid-RNA durch das charakteristische Laufverhalten der beteiligten Nukleinsäuren getrennt. Die kleinen Nukleinsäuren haben nach einer gewissen Elektrophoresedauer die Gelmatrix bereits verlassen. Das Viroid ist auf Grund seiner nativen Stäbchenstruktur relativ weit im Gel gelaufen und die größeren pflanzlichen Nukleinsäuren befinden sich weiter „oberhalb“ in der Gelmatrix. Die Elektrophorese der ersten Dimension wird gestoppt, wenn sich das Viroid etwa 1 cm oberhalb des unteren Gelrands befindet (gut zu erkennen, da einer der Blaumarker, Xylencyanol, in etwa auf Höhe der nativen Viroid-RNA läuft). In der zweiten Dimension werden denaturierende Bedingungen gewählt (Temperaturerhöhung) und die Pufferbäder umgepolt. Als Konsequenz denaturiert das Stäbchen und wird im Gel extrem verzögert, so dass die verbliebenen pflanzlichen Nukleinsäuren die Gelmatrix verlassen und nahezu ausschließlich die Viroid-RNA im Gel zurückbleibt, die nun problemlos eluiert werden kann. Die hierfür gewählten Bedingungen sind wie folgt:

Vernetzungsgrad von 5 %	PAA (43:1),
4 M	Harnstoff,
0,4 x	TBE als Gel- und Laufpuffer

In der ersten Dimension lief das Gel spannungsgesteuert (800 V) für 75 Minuten bei 15°C . In der zweiten Dimension wurde das Gel auf 40°C erwärmt und die Elektrophoresezeit nach Umpolung der Pufferbäder betrug 45 Minuten bei 800 V. Die Einstellung der Temperaturen erfolgte über Wasserbäder.

2.8.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur analytischen und präparativen Auftrennung doppelsträngiger DNA (Plasmid-DNA, Restriktionsfragmente) wurden horizontale Agarosegele mit 0,8-2,5 % (w/v) Agarose verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Die jeweilige Agarosemenge wird in 80-100 ml 1 x TAE-Puffer aufgekocht, nach dem Abkühlen auf ca. 60°C mit $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Ethidiumbromid versetzt und als Flachbettgel (14 x 11 cm) gegossen. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1 x TAE-Puffer, der mit $0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Ethidiumbromid versetzt war. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf 1 x TAE-Puffer eingestellt und bei einer konstanten Spannung von 90-120 V aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese wurde die DNA im Gel über die Fluoreszenz der in den Doppelstrang interkalierten Ethidiumbromidmoleküle bei Bestrahlung mit langwelligem UV-Licht (302 nm) auf einem UV-Transilluminator (Appligene oncor) sichtbar gemacht.

2.8.4 Sequenziergele

Sequenziergele wurden zur Analyse von Primer-Extension-Reaktionen eingesetzt. Um eine nukleotidgenaue Auftrennung zu garantieren, verfügen die Sequenziergele über eine längere Trennstrecke, sowie eine erweiterte Breite, die eine Auftragung sehr vieler Proben ermöglicht (Abmessung der Sequenziergele 350 x 430 x 0,4 mm). Die Gelelektrophorese für Sequenzanalysen wurde in einer senkrechten Gelkammer (Electrophoresis Apparatus, Modell S2, GibcoBRL Life Technologies, Gaithersburg, USA) durchgeführt. In die Gelkammer integriert ist eine Aluminiumplatte, die der Größe des Gels entspricht. Hiervor werden nun die Glasplatten mit dem dazwischengegossenen Gel gespannt. Ein Sequenziergel hat die Zusammensetzung:

8 %	PAA-Endkonzentration (40 % PAA-Stammlösung, 19:1)
1 x	TBE
8 M	Harnstoff
0,1 %	TEMED
	ad 80 ml H ₂ O _{auto}

Die Gellösung wird für ca. 5 Minuten entgast, anschließend mit APS versetzt und damit das Gel gegossen. Die Polymerisation erfolgte für mindestens 2 h. Der Elektrophoresepuffer war 1 x TBE. Das Gel wurde bei 100 W für ca. 30 Minuten vorgeheizt. Anschließend wurden die denaturierten Proben aufgetragen und die Elektrophorese wurde für mehrere Stunden durchgeführt. Auch hier richtete sich die Elektrophoresedauer nach der Länge der entsprechenden Nukleinsäure. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf Whatman-Papier (Whatman Chromatography paper 3 MM Chr) aufgezogen und bei -70°C gegen Röntgenfilme (Kodak-X-OMATTM, Sigma, St. Louis, USA) exponiert.

2.8.5 Autoradiographien

Zum Nachweis radioaktiver Nukleinsäuren werden auf die entsprechenden Gele Röntgenfilme gelegt, die bei -70°C mit Verstärkerfolie (Typ Extrarapid; Empfindlichkeit 200, Calcium-Wolframat, blauemittierend; Gerlinde Kisker, Süddeutschland) exponiert werden. Die Expositionsdauer in dieser Arbeit variierte in der Regel zwischen 1 und 14 Tagen.

2.8.6 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Anfärbung der Nukleinsäure, die nicht radioaktiv markiert war, geschah mit Hilfe der Silberfärbung. Angewendet wird hierzu eine nach Schumacher *et al.* (1983) veränderte Silberfärbung für Proteingele (Sammons *et al.*, 1981). Die Dauer der einzelnen Schritte wurde nach Baumstark (1989) modifiziert. Mit Hilfe der Silberfärbung kann noch 1 ng Nukleinsäure nachgewiesen werden.

	Lösung	Dauer
Fixieren	10 % (v/v) Ethanol 0,5 % (v/v) Essigsäure	10 min
Färben	0,19 % AgNO ₃	15 min
Waschen	H ₂ O _{dest}	3 x 15 s
Entwickeln	15 g/l NaOH 90 mg/l NaBH ₄ 3,75 ml/l Formaldehyd 37%	15 min
Neutralisieren	0,75 % NaHCO ₃	15 min

2.9 UV/VIS-Spektroskopie

2.9.1 Spektralphotometrische Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

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

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

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

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

$$\text{PSTVd: } 1 A_{260} = 43 \mu\text{g/ml}$$

2.9.2 Spektralphotometrische Bestimmung der Konzentration von Proteinen

Zur Bestimmung der Konzentration des Proteingehalts in präparierten Kernextrakten wurde ein Bradford-Microassay (Bio-Rad) verwendet. Die Konzentrationsbestimmung nach Bradford beruht auf der Anfärbung von Proteinen mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blue, die einen Anstieg der Absorption bei 595 nm bewirkt. Zunächst wurde eine Eichgerade mit bekannten Proteinkonzentrationen erstellt. Hierzu wurde als Referenzprotein BSA verwendet. Anhand der Eichgerade konnte die unbekannte Proteinkonzentration ermittelt werden. Entsprechend den Hersteller-Angaben wurden 800 μl Proteinlösung mit 200 μl Dye-Reagenz vermischt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Spektralphotometer (Beckmann, Modell 640) vermessen.

2.10 Northernblot-Analysen

2.10.1 Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran

Zum spezifischen Nachweis einer Nukleinsäure mit PSTVd-Sequenz wurde ein Sequenzspezifischer Northernblot durchgeführt. Er erfolgte im Anschluss an eine denaturierende PAA-Gelelektrophorese. Zunächst müssen die im Gel aufgetrennten Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Biodyne A, Pall Europe Ltd., Portsmouth, England) transferiert werden. Dieser Transfer erfolgte in einer „semi dry“-Kammer (Modell TransBlot SD, Biorad, München). Auf die in der Apparatur enthaltenen Elektroden werden je vier Lagen, in 1 x TBE getränktes Whatman-Papier (Whatman International Ltd., Maidstone, England) gelegt. Das Gel sowie die Membran werden so dazwischen gebettet, dass die Nukleinsäure durch den Stromfluss aus der Gelmatrix auf die Membran fließt. Der Nukleinsäuretransfer erfolgte für ca. 1 h bei 400 mA und maximal 15 V.

2.10.2 Alkalische Denaturierung und Fixierung der Nukleinsäure auf der Membran

Der Elektrotransfer von RNA auf eine Nylonmembran erfolgte nicht unter denaturierenden Bedingungen, sondern die RNA wurde erst nach dem Transfer auf der Membran denaturiert. Die Denaturierung war notwendig, da Vorversuche gezeigt hatten, dass dadurch die Nachweisempfindlichkeit deutlich gesteigert werden konnte. Speziell die RNA von PSTVd muss auf Grund ihres hohen Grades an Selbstkomplementarität denaturiert und denaturiert auf der Membran fixiert werden. So sind für spätere Sondenmoleküle die komplementären Bereiche frei und nicht durch selbstkomplementäre Paarungen unzugänglich, so dass eine Bindung an diese erfolgen kann. Die Denaturierung der RNA wurde durch Inkubation der Membran für 15 Minuten in 50 mM NaOH bei Raumtemperatur erreicht. Dabei wurde die Membran nicht mit NaOH überspült um ein Abwaschen der RNA von der Membran zu verhindern, sondern auf mit 50 mM NaOH getränktes Whatmanpapier gelegt. Die Natronlauge saugte sich durch die Membran und denaturierte auf der Oberfläche die transferierte RNA. Anschließend erfolgte, ebenfalls bei Raumtemperatur, nach dem gleichen Prinzip eine Neutralisierung mit 20 x SSC. Die für die Hybridisierung notwendige kovalente Fixierung der RNA auf der Nylonmembran erreichte man durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm. Hierfür wurde eine UV-Crosslink-Apparatur, Modell Stratalinker der Firma Stratagene (La Jolla, USA, Funktion „Auto Crosslink“) verwendet. Die so auf der Membran fixierte RNA konnte nun in die Hybridisierung eingesetzt werden.

2.10.3 Hybridisierung von PSTVd-RNA an Nylonmembranen

Die kovalent an der Membran fixierte RNA wurde durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten *in-vitro*-Transkripten nachgewiesen. Hierzu wurde die Membran zusammengerollt in Hybridisierungsröhrchen überführt und zunächst mit 25 ml Prähybridisierungslösung bei 60°C für mindestens 2 h in einem Hybridisierungsofen (Modell OV 2, Biometra, Göttingen) rotiert. Die Prähybridisierungslösung wurde anschließend entfernt und durch 15 ml frische

Hybridisierungslösung ersetzt, die nun die radioaktiv markierte Sonde enthält. Die Inkubation erfolgte für PSTVd-spezifische Nachweisreaktionen bei 65-70°C über Nacht.

Prähybridisierungslösung:

5 %	Blocking-Reagenz (Roche, Mannheim)
5 x	SSC
0,1 %	N-Laurylsarcosin, Na-Salz
0,02 %	Natriumdodecylsulfat (SDS)
50 %	Formamid

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

Hybridisierungslösung:

5 %	Blocking-Reagenz (Roche, Mannheim)
5 x	SSC
0,1 %	N-Laurylsarcosin, Na-Salz
0,02 %	Natriumdodecylsulfat (SDS)
50 %	Formamid
~100000 cpm	radioaktiv markiertes <i>in-vitro</i> -Transkript, das zuvor 3 min > 90°C denaturiert und rasch auf Eis abgekühlt wurde

die Lösung wurde in der Regel nur einfach verwendet

Um ungebundene Sondenmoleküle zu entfernen, bzw. um Spezifität zu gewährleisten, wurde die Membran mehreren Waschschritten unterzogen. Zunächst wurde sie für 5 min bei 60°C mit Lösung I (2 x SSC; 0,1 % SDS) und anschließend 2 x für 30 min bei 75°C mit Lösung II (0,1 x SSC; 0,1 % SDS) gewaschen (Temperaturen nach Aschermann, 2001). Die so behandelte Membran wurde in Polyethylenfolie eingeschweißt und bei -70°C gegen einen Röntgenfilm exponiert.

2.11 Enzymatische Reaktionen

2.11.1 *in-vitro*-Transkription mit der T7-RNA-Polymerase

Alle *in-vitro*-Transkriptionen wurden mit der T7-RNA-Polymerase durchgeführt, die in unserem Institut von Michael Schmitz präpariert und zur Verfügung gestellt wurde. Die T7-Polymerase erkennt außer „normalen“, unmodifizierten NTPs sowohl radioaktive Nukleotide (α [^{32}P]-UTP [Hartmann Analytik]), als auch Biotin-markierte Nukleotide (Biotin-16-Uridin-5'-triphosphat [Roche, Mannheim]) und ermöglicht ihren Einbau während der Transkription. Für die Transkription von PSTVd-Sequenzen wurde folgende Plasmide verwendet:

Plasmid	Orientierung und Länge	Sequenzbereich (5'→3')	PSTVd-Stamm
pRH 715	(+)-Monomer (368 Nt)	146-359/1-145	intermediate
pRH 716	(-)-Monomer (368 Nt)	146-1/359-147	intermediate
pRH 717	(+)-Monomer (368 Nt)	282-359/1-359/1-281	intermediate
pSH 3	(-)-Dimer (731 Nt)	337-1/359-1/359-338	intermediate

Die Plasmide verfügen alle über einen T7-Promotor, der eine *in-vitro*-Transkription mit der T7-Polymerase ermöglicht. Die hier verwendeten Vektoren enthalten Sequenzen, die dem PSTVd-Stamm „intermediate Di“ entsprechen. Nach *EcoRI* Linearisierung der pRH 7XX-Vektoren und anschließender *in-vitro*-Transkription erhält man Transkripte, die zusätzlich zwei vektorbedingte Nukleotide am 5'-Ende (GG) und sieben vektorbedingte Nukleotide (GGGAAUU) am 3'-Ende aufweisen. *In-vitro*-Transkripte von pSH 3 weisen sechs vektorbedingte Nukleotide am 5'-Ende (GGCAAG) und sieben vektorbedingte Nukleotide (GGGAAUU) am 3'-Ende auf.

Sowohl für die *in-vitro*-Transkription ohne Markierung, als auch für die Transkriptionsansätze, die den Einbau von radioaktiven Nukleotiden, bzw. Biotin-markierten Nukleotiden zum Ziel hatten, wurde der Ansatz nach Hecker (1989) gewählt. Der Transkriptionsansatz enthielt folgende Komponenten. Die optional zugesetzten Komponenten (je nach gewünschter Markierung) sind kursiv dargestellt:

Reaktionsansatz:	2 µg	<i>EcoRI</i> -linearisiertes Plasmid
	4 µl	IVT-A (100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,7 50 mM DTT)
	4 µl	IVT-B (40 mM MgCl ₂ 20 mM Spermidin-HCl, pH 7,7)
	0,5 µl	RNasin (40 u/µl; Promega, Mannheim)
alternativ	2 µl	rNTPs (10 mM)
oder	1 µl	<i>rNTP-UTP-Mix</i> (250 µM UTP 5 mM ATP 5 mM GTP 5 mM CTP)
und	0,4 µl	<i>Biotin</i> (<i>Biotin-16-Uridin-5'-triphosphat</i> [Roche, Mannheim])
bzw.	5 µl	<i>α</i> [³² P]-UTP (3000 Ci/mmol)
	1 µl	T7-Polymerase (250-300 u/µl)
	ad 20 µl	H ₂ O _{auto}

Die eingesetzte Menge an Biotin-markiertem UTP entspricht einem Anteil an Gesamt-UTP von 20 %, weswegen davon auszugehen war, dass die entstandenen Transkriptionsprodukte ebenfalls einen Biotinylierungsgrad von 20 % aufweisen.

Die Proben wurden insgesamt für 3 h bei 37°C inkubiert, wobei nach 1 h 30 min erneut 1 µl Enzym zugegeben wurde. Um die Transkripte aus dem Reaktionsansatz zu gewinnen, wurden sie einmal mit 2,5 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen Ethanol gefällt. Die Fällung mit Ammoniumacetat diente, wie in 2.7.2.2 beschrieben, der Abtrennung nicht eingebauter Mononukleotide. Anschließend wurde eine „normale“ Ethanolfällung durchgeführt. Die gefällte Nukleinsäure wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in der Regel in 1 x TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Ein Aliquot wurde in einer denaturierenden PAA-Gelelektrophorese auf ihren Reinheitsgrad hin überprüft.

2.11.2 *in-vitro*-Transkription von PSTVd-Templates mit dem Kernextrakt

Die *in-vitro*-Transkriptionsanalysen wurden sowohl nach einem von Fels (1997) modifizierten Protokoll von Nagel-Steger (1990), als auch nach dem Protokoll von Roberts und Okita (1991) durchgeführt. Weitere Modifikationen, die während dieser Arbeit eingeführt

wurden, sind an entsprechender Stelle erwähnt. Alle Angaben, die sich auf die nach Fels durchgeführte Transkription beziehen sind mit „a“ beschrieben, alle nach Roberts und Okita durchgeführten Schritte sind mit „b“ markiert. Zunächst wurde der Transkriptionsansatz anstatt 10 Minuten (Fels) lediglich für 5 Minuten präinkubiert, da diese Zeit reichen sollte um die Ausbildung von Polymerase II-Initiationskomplexen zu ermöglichen (Wagner, pers. Mitteilung). Der Transkriptionsansatz nach Roberts und Okita verlangte generell eine „Präinkubationszeit“ von lediglich 5 Minuten. RNase-freie DNase sollte die Ausbeute an *de-novo*-PSTVd-RNA steigern. Bei Analysen an zugegebenem DNA-Template wurde natürlich auf die Zugabe von DNase verzichtet. Die Transkriptionsreaktion wurde durch Zugabe von rNTPs gestartet. Im Ansatz mit 10^{-6} M α -Amanitin sollte die Polymerase II-Abhängigkeit der untersuchten Transkriptionsaktivität kontrolliert werden. Als Nullkontrolle diente ein Ansatz ohne Template. Die verwendeten Templates waren geeluliertes cPSTVd, geelulierte pSH 3-intermediate(-)-Dimer-*in-vitro*-Transkripte, sowie geelulierte pRH 718-intermediate(-)-Dimer-*in-vitro*-Transkripte.

Verwendete Lösungen

Transkriptionspuffer (5 x) (nach Fels, 1997) (a)

250 mM	TRIS-HCl, pH 7,9
300 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
25 mM	MgCl ₂

STOPP-Lösung (verändert nach Fels, 1997) (a)

20 mM	EDTA, pH 8,0
200 mM	NaCl
1 %	SDS
<i>kein</i>	Glycogen (vgl. mit Fels)

STOPP-Lösung (nach Roberts und Okita, 1991) (b)

20 mM	TRIS-HCl, pH 7,5
0,4 M	NaOAc
5 mM	EDTA, pH 8,0
0,1 %	SDS

Transkriptionsansatz (a)

0,1-5 µg	cPSTVd oder
0,1-5 µg	pSH 3
6 µl	5 x Transkriptionspuffer
40 u	RNasin
20 µg	BSA (molekularbiologische Qualität)
20 u	DNase I (RNase frei)
3 µl	10^{-5} M α -Amanitin
5-15 µg	Protein (aus Kernextrakt)
ad 28,2 µl	H ₂ O _{auto}

Transkriptionsansatz (b)

0,1-5 µg	pSH 3 oder
0,1-5 µg	cPSTVd oder
0-4 µg	pRT 103-GUS/ <i>Eco</i> RV-restringiert
20 mM	HEPES-KOH, pH 7,9
10 mM	MgOAc
2 mM	Spermidin
0,4 u/µl	“pancreatic ribonuclease inhibitor” (= RNasin)
10 mM	β-Mercaptoethanol
100 mM	KOAc
~33 µg	Protein (aus Kernextrakt)
ad 25 µl	H ₂ O _{auto}

Der Ansatz wurde zunächst für 5 Minuten ohne Template und ohne NTPs bei 28°C im Heatblock inkubiert, um die gesamte Lösung gleichmäßig auf 28°C zu erhitzen. Anschließend wurde das Template zugegeben und für weitere 5 Minuten bei 28°C inkubiert. Der eigentliche Start der Transkription erfolgte durch die Zugabe von 1,8 µl 10 mM NTP-Lösung (c_{end} : 600 µM (a und b), bzw. 1,8 µl NTP-UTP (a), 1,8 µl NTP-ATP (b) + 10 µCi α ³²P-UTP (a), 10 µCi α ³²P-ATP (b)).

Die Transkriptionsreaktion erfolgte für 30 Minuten bei 28°C und wurde durch die Zugabe von 70 µl der jeweiligen STOPP-Lösung abgebrochen. Der Ansatz wurde 2 x mit reinem Phenol, 1 x mit Phenol/Chloroform und 1 x mit reinem Chloroform extrahiert, um Proteine aus dem Ansatz zu entfernen. Anschließend wurde die Nukleinsäure mit Ethanol gefällt und die resuspendierten Pellets optional für 30 Minuten gegen 1 x TE-Puffer dialysiert (a) (4°C, Schwimmfilter [0,02 µm, Millipore GmbH, Neu-Isenburg]). Bei der später entwickelten, anschließenden Aufreinigungsmethode konnte auf eine Dialyse verzichtet werden. Die resuspendierten Pellets wurden je nach anschließendem Experiment unterschiedlich weiterverwendet.

2.11.3 Radioaktive 5'-Endmarkierung von Oligonukleotiden

5'-markierte DNA-Oligonukleotide wurden für die Primer-Extension-Analysen benötigt. Die Markierung erfolgte mit der Polynukleotidkinase (PNK) durch den Transfer der radioaktiven γ -Phosphatgruppe des γ [³²P]-ATP auf das 5'-OH-Ende des Oligonukleotids.

Markierungsansatz:	5 pmol	Oligonukleotid
	1 µl	10 x PNK-Reaktionspuffer (Roche, Mannheim)
	10 U	T4-Polynukleotidkinase (Roche, Mannheim)
	5 µl	γ [³² P]-ATP (5000 Ci/mmol)
	ad 10 µl	H ₂ O _{auto}

Die Inkubation erfolgte über Nacht auf Eis. Anschließend wurde der Markierungsansatz mit Ammoniumacetat und Ethanol gefällt. Das getrocknete Pellet wurde in 10 µl 1 x TE-Puffer resuspendiert und durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Eine anschließende Messung der Proben im Scintillationszähler (Modell LS 5000 TD, Beckman Coulter, München) gab die Effizienz der Markierung bzw. die Gesamtradioaktivität der Probe an.

2.11.4 Primer-Extension-Analyse (PE)

Die Primer-Extension-Analyse wird zur Bestimmung des 5'-Endes der untersuchten RNA eingesetzt. Als Reverse Transkriptase wurde die Superscript II RNase H⁻ (Gibco BRL, Karlsruhe) verwendet. Der RT-Reaktionspuffer (5 x RT-Puffer) wurde vom Hersteller mitgeliefert. Die Temperatur, bei der die Primer-Extension-Reaktion durchgeführt wurde, hing vom jeweiligen Primer und dessen T_M-Wert ab, und wird an entsprechender Stelle angegeben. Die Primer-Extension-Reaktion erfolgte nach folgendem Protokoll:

2.11.4.1 Hybridisierung des Primers:

1-5 µl	IVT-Ansatz / gesamtes Pellet nach DB- Aufreinigung / 1-100 pg T7- <i>in-vitro</i> -Transkript
2 µl	10 x TN-Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 8,0 1 M NaCl)
5 µg	tRNA
1000000 cpm	5'-γ[³² P]-ATP-markierter Primer
ad 20 µl	H ₂ O _{auto}

Der Reaktionsansatz wurde für 1 Minute bei 85°C denaturiert und kühlte im Heatblock in ca. 3 h auf ~35°C ab. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mit Ethanol gefällt, wobei auf die Zugabe von Salz verzichtet werden konnte, da der Ansatz durch den TN-Puffer über genug Salz verfügte. Auch hier richtete sich die Inkubationszeit auf Eis bzw. bei -20°C nach der abgeschätzten Menge des zu fällenden Produkts. Die Inkubationszeit variierte zwischen 1 h und „über Nacht“. Nach dem Pelletieren der Nukleinsäure durch 1-stündiges Zentrifugieren bei 4°C und 12000 rpm, sowie anschließendem Waschen des Pellets, wurde die Nukleinsäure in 20 µl Primer-Extension-Lösung resuspendiert.

2.11.4.2 Primer-Extension-Ansatz:

4 µl	5 x RT-Puffer (Gibco BRL)
2 µl	0,1 M DTT (Gibco BRL)
1 µl	10 mM dNTPs
40 u	RNasin
1 µl	Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco BRL)
ad 20 µl	H ₂ O _{auto}

Der Ansatz wurde für 1 h bei der Hybridisierungs-Temperatur des verwendeten Primers im Heatblock inkubiert und anschließend mit Ethanol gefällt. Die RT-Temperaturen (s. 2.11.6) sind an entsprechender Stelle angegeben. Nach Zentrifugation des gefällten PE-Ansatzes, wurde das komplette Pellet in 10 µl Auftragspuffer resuspendiert und zur Analyse vollständig auf ein in Abschnitt 2.8.4 beschriebenes Sequenziergel aufgetragen.

2.11.5 Sequenzierung von Plasmid DNA

Parallel zur Primer-Extension-Analyse wurden Sequenzierungsreaktionen durchgeführt. Diese erlaubten die Zuordnung einzelner Abbruchsignale der Primer-Extension-Reaktion zu definierten Nukleotiden innerhalb der PSTVd-Sequenz. Die Reaktion erfolgte nach Sanger *et al.* (1977) mit dem „Sequenase II“-Kit (USB, Cleveland, Ohio, USA) anhand der vom Hersteller mitgelieferten Anleitung.

2.11.5.1 Denaturierung des Plasmids

4 µg	Plasmid-DNA (in 1 x TE)
1 µl	4 M NaOH
ad 10 µl	1 x TE

Die Denaturierung erfolgte für 30 Minuten bei 37°C und wurde durch Zugabe von 3 µl 3 M NaOAc, pH 4,5 und 7 µl H₂O_{auto} gestoppt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit Ethanol gefällt und das gewaschene Pellet konnte direkt für die Hybridisierungsreaktion verwendet werden.

2.11.5.2 Hybridisierung des Primers

Die Primerhybridisierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers; es wurden 5 pmol Primer und das komplette denaturierte Plasmid verwendet.

2.11.5.3 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach Hersteller-Angaben. Die Verlängerungs- und die Terminationsreaktion dauerten jeweils 5 min. Die Sequenzierungsreaktion wurde durch Zugabe von 20 µl Auftragspuffer gestoppt. Ein Aliquot der Reaktion wurde in einem Sequenziergel analysiert. Die Sequenzierungsproben konnten bei -20°C für ca. 2 Wochen aufbewahrt und für mehrere Sequenziergele verwendet werden.

2.11.6 Reverse Transkription (RT)

Die Reverse Transkription von PSTVd-RNA-Templates war der erste Schritt, um durch kombinierte RT-PCR-Analysen die im Kernextrakt neu entstandene *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA nachzuweisen. Die RT-Bedingungen sind weitgehend angelehnt an die von Fels (1997) etablierten Bedingungen und sind an abweichenden Stellen kenntlich gemacht. Als Reverse Transkriptase wurden zwei verschiedene Enzyme verwendet; zum einen die „Superscript II RNase H“ (Gibco BRL, Karlsruhe), da diese besonders geeignet ist auch geringe Konzentrationen an RNA-Template in DNA umzuschreiben (Hersteller-Angaben); zum anderen die „Retro-Amp-DNA-Polymerase“ (Biozym). Als Reaktionspuffer wurden die vom Hersteller mitgelieferten Puffer, sowohl der „First Strand“-Puffer (Gibco BRL, Karlsruhe), als auch der 20 x RT-Puffer (Biozym) verwendet. Die RT wurde nach den folgenden Protokollen durchgeführt: Die Ansätze mit „Superscript“ (Gibco BRL) werden im Folgenden mit a, die Ansätze mit „Retro-Amp-DNA-Polymerase“ (Biozym) mit b bezeichnet.

2.11.6.1.a Hybridisierung des Primers

1-3 µl	IVT-Ansatz / gesamtes Pellet nach DB- Aufreinigung /
	1-100 pg T7- <i>in-vitro</i> -Transkript
1 µl	5 x RT-Puffer (Gibco BRL)
20 pmol	Primer
ad 6 µl	H ₂ O _{auto}

Der Ansatz wurde für 1 Minute bei 94°C denaturiert, rasch auf Eis abgekühlt und 2 Minuten bei Raumtemperatur und 5000 g zentrifugiert.

2.11.6.2.a Reverse Transkription

Zum Hybridisierungsansatz wurden 12 µl RT-Reaktionslösung pipettiert:

RT-Reaktionslösung:	3 µl	5 x RT-Puffer (Gibco BRL)
	2 µl	0,1 M DTT (Gibco BRL)
	1 µl	10 mM dNTP
	6 µl	H ₂ O _{auto}

Der Reaktionsansatz wurde für 10 Minuten bei der jeweiligen RT-Temperatur des Primers im Heatblock inkubiert, wobei ein weiterer vorgeheizter Heatblockeinsatz auf die Deckel der Reaktionsgefäße gestellt wurde, sowie der Heatblock mit Styropor isoliert, um Evaporation der Proben zu vermeiden. Nach 10 min wurden dem Ansatz 2 µl der Reversen Transkriptase (RT)-Lösung zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren mit der Lösung vermischt, wobei das Reaktionsgefäß im Heatblock verblieb, um eine konstante Temperatur zu gewährleisten.

RT-Lösung:

0,4 µl	Reverse Transkriptase (200 U/µl)
1,6 µl	H ₂ O _{auto}

Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten bei der jeweiligen RT-Temperatur inkubiert. Die Temperaturen sind im Ergebnisteil an entsprechender Stelle angegeben. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch Kochen des Ansatzes für 5 Minuten inaktiviert und der Reaktionsansatz auf Eis abgekühlt. Durch Zentrifugation für 2 Minuten bei Raumtemperatur und 5000 g wurde eventuell evaporierte Probe vom Deckel des Reaktionsgefäßes entfernt und dem Gesamtansatz wieder zugeführt.

2.11.6.3.a Alkalische Hydrolyse des RNA-Templates

Die alkalische Hydrolyse dient der Degradation der noch im Ansatz enthaltenen RNA. Zu diesem Zweck wird der RT-Ansatz auf 105 mM NaOH eingestellt und für 1 Stunde bei 90°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird die Probe kurz zentrifugiert und der Ansatz durch Zugabe eines entsprechenden Volumens 1,0 M HCl neutralisiert.

2.11.6.1.b Hybridisierung des Primers

Prämix 1:

1-100 pg	T7- <i>in-vitro</i> -Transkript
2,5 µl	20 x RT-Puffer (Biozym)
6 µl	25 mM MgCl ₂ (Biozym)
1 µl	25 mM MnSO ₄ (Biozym)
13,5 µl	H ₂ O _{steril} (Biozym)

Prämix 2:

12,5 pmol	(biotinylierte) Primer
8 µl	2,5 mM dNTP-Mix (Biozym)
14,75 µl	H ₂ O _{steril} (Biozym)

Die Prämixe 1 und 2 wurden auf Eis zusammen pipettiert und für 10 Minuten bei der jeweiligen T_{RT} im Heatblock inkubiert.

2.11.6.2.b Reverse Transkription

Zum Hybridisierungsansatz wurden 2 µl RT-Lösung pipettiert:

RT-Lösung:	0,5 µl	Retro Amp DNA-Polymerase (Biozym)
	1,5 µl	H ₂ O _{steril} (Biozym)

Der Reaktionsansatz wurde für weitere 30 Minuten im Heatblock bei der RT-Temperatur inkubiert. Die Temperaturen sind an entsprechender Stelle angegeben. Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz für 5 Minuten größer 90°C erhitzt, rasch auf Eis abgekühlt und die am Deckel des Reaktionsgefäßes kondensierten Tröpfchen wurden durch kurze Zentrifugation (2 Minuten bei 5000 g) in den Gesamtansatz zurückgeführt. Anschließend wurden zur Volumenvergrößerung 50 µl H₂O_{auto} zugegeben, die Nukleinsäure mittels Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend mit Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in 50 µl H₂O_{auto} resuspendiert und direkt in die „Dynabead“-Aufreinigung (s. 2.12.2.2) eingesetzt. Da die hier verwendeten Primer ausnahmslos Biotin-markiert waren musste auf eine alkalische Hydrolyse verzichtet werden, da die Biotinylierung eine Inkubation in 105 mM NaOH für 1 Stunde bei 90°C nicht toleriert.

2.11.7 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Im Anschluss an die RT wurde die neusynthetisierte PSTVd-cDNA mittels PCR vervielfältigt. Die PCR-Bedingungen sind weitgehend an die von Fels (1997) etablierten Bedingungen angelehnt. Abweichende Bedingungen sind an entsprechender Stelle gekennzeichnet. Als Reaktionspuffer wurde der vom Hersteller mitgelieferte 10 x PCR-Puffer (Promega) verwendet. Da in dieser Arbeit ausschließlich radioaktive PCR-Reaktionen durchgeführt wurden, wird statt eines „normalen“ dNTP-Mixes ein dNTP-dCTP-Mix verwendet. Um die PCR-Produkte radioaktiv zu markieren, wurde dem Reaktionsansatz α[³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol) zugesetzt.

PCR-Reaktionsansatz:

7,5 µl	RT-Ansatz
20 pmol	PCR-forward-Primer
20 pmol	PCR-backward-Primer
5 µl	10 x PCR-Puffer (Promega)
3 µl	25 mM MgCl ₂ (Promega)
0,5 µl	10 mM dNTP-dCTP-Mix (10 mM dATP 10 mM dGTP 10 mM dTTP 2,5 mM dCTP)
3 µl	α[³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol)
0,3 µl	Taq-Polymerase (Promega; 5 U/µl)
ad 50 µl	H ₂ O _{auto}

Der PCR-Ansatz wurde mit 50 µl Paraffinöl überschichtet, um ein Verdunsten der Proben während der Reaktion zu verhindern. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler (Modell Varius V45, Landgraf, Langenhagen), dessen Zeitsteuerung so eingestellt wurde, dass die Zeitmessung jeweils erst bei Erreichen der Solltemperatur begann. Die Proben wurden im ersten Zyklus bei 94°C für 240 s denaturiert. Anschließend wurden bei entsprechender Temperatur die PCR-Primer angelagert (annealt), und im letzten Schritt die partiellen Doppelstränge verlängert. Die Annealingtemperaturen (T_{ann}) variierten je nach eingesetztem Primer und sind an entsprechender Stelle angegeben. Zur Vervielfältigung wurde eine Zyklenzahl von 25 gewählt. Das reicht erfahrungsgemäß für radioaktive PCR-Analysen aus. Die PCR-Temperaturzyklen sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Anzahl der Zyklen	1 x	25 x	1 x
Denaturierung	94°C/ 240 s	94°C/ 60 s	-----
Hybridisierung	-----	T_{ann} °C/ 60 s	-----
Polymerisation	-----	72°C/ 60 s	72°C/ 600 s

Im Anschluss an die PCR wurde die wässrige Phase unter dem Paraffinöl entnommen und ein Aliquot (2-4 µl) mittels denaturierender PAA-Gelelektrophorese analysiert.

2.11.8 Restriktionsendonuklease-Verdauung von Plasmid-DNA

Zur Synthese von „run off“ *in-vitro*-Transkripten war es notwendig, die verwendeten Plasmide (pRH-X und pSH-X) mit *EcoRI* zu linearisieren. Die *EcoRI*-Verdauung erfolgte gemäß den Hersteller-Angaben im mitgelieferten Reaktionspuffer. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde mit Ethanol präzipitiert, das Pellet in 1 x TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt. Zur Überprüfung der Qualität der Verdauung wurde eine native Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. War das Ergebnis befriedigend, konnte das verdaute Plasmid direkt als Template in die *in-vitro*-Transkription eingesetzt werden. Darüber hinaus wurde das zum Pol II-Aktivitätsnachweis verwendete Plasmid pRT 103-GUS mit *EcoRV* verdaut. Auch hier erfolgte die Restriktion gemäß den Herstellerangaben im mitgelieferten Reaktionspuffer.

2.12 Methoden zur Isolierung *de-novo* entstandener PSTVd-RNA

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass im Anschluss an die Transkription von PSTVd mit dem Kernextrakt eine Isolierung des neu entstandenen Transkripts unbedingt erforderlich war, um in einer anschließenden Primer-Extension Reaktion unspezifische Signale, die von endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes herrühren zu vermeiden. In Anlehnung an die Arbeit von Aschermann (2001) wurde in diesem Zusammenhang ein Aufreinigungsverfahren etabliert, welches es erlaubt, das entstandene Transkript von anderen Nukleinsäuren zu trennen.

Die Aufreinigung von *de-novo*-PSTVd-RNA konnte mit Hilfe paramagnetischer Streptavidin-Partikel (Dynabeads) erreicht werden. Hierzu wurden Biotin-haltige komplementäre PSTVd-Sequenzen („B-Sonden“) spezifisch an das entstandene Transkript hybridisiert. Diese Hybride wurden anschließend an Dynabeads gebunden und konnten in einem Magnetständer (DynaL MPC-L, Magnetic Particle Concentrator) immobilisiert werden. So konnten gebundene von nicht gebundenen Nukleinsäuren sequenzspezifisch getrennt werden. Eine anschließende Elution der isolierten Nukleinsäure von den Dynabeads erlaubte weitere Analysen mit einem einheitlichen Ausgangsprodukt.

2.12.1 Generelles zu Dynabeads

Die Immobilisierung von Biotin-markierten Sondenmolekülen erfolgte an paramagnetischen Streptavidin-Partikeln der Firma Dynal (Dynabeads). Da Streptavidin aus vier identischen Untereinheiten besteht, von denen jede ein Biotin-Molekül binden kann, bindet 1 Mol Streptavidin 4 Mol Biotin mit einer Bindekonstanten von 10^{15} M^{-1} . Dies ist eine der größten Bindekonstanten, die für nicht kovalente Bindungen bekannt ist. Streptavidin eignet sich besonders gut für die Aufreinigung von Nukleinsäuren, da es wegen seines schwach sauren Charakters in physiologischen pH-Bereichen nicht an diese bindet. Da die Dynabeads nicht in RNase-freiem Zustand geliefert werden, empfiehlt der Hersteller die Partikel bei Anwendung mit RNA entsprechend vorzubehandeln. Daher ging jeder Inkubation von RNA mit Dynabeads eine „anti-RNase-Behandlung“ voraus. Diese bestand in der zweimaligen Inkubation der Partikel für 2 Minuten in einem Volumen Lösung A, sowie in einer einmaligen Inkubation für 2 Minuten in 1 Volumen Lösung B. Beide Inkubationen fanden bei Raumtemperatur statt. Nach jeder Inkubation wurden die Reaktionsgefäße (mit den darin enthaltenen Dynabeads) für 1 min in einen Magnetständer gestellt und die gebrauchte Lösung entfernt. Die so vorbereiteten Dynabeads konnten anschließend ohne Bedenken zur Immobilisierung von RNA verwendet werden. Alle Bindungs-Experimente fanden gemäß den Hersteller-Angaben in dem vierfachen Volumen des eingesetzten Dynabeads-Volumens statt.

Verwendete Lösungen:

Lösung A

100 mM	NaOH
50 mM	NaCl
0,1 %	DEPC

Lösung B

100 mM NaCl
0,1 % DEPC

2 x „B & W“-Puffer

10 mM TRIS-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA, pH 8,0
2 M NaCl

Formamid (FA)-Lösung

95 % Formamid
10 mM EDTA, pH 8,2

Diese Lösung wurde immer frisch angesetzt

2.12.2 „Fischen“ von *de-novo*-PSTVd-RNA

Mit dem Begriff „Fischen“ soll in dieser Arbeit die spezifische Hybridisierung von biotinylierten *in-vitro*-Transkripten, die mit Hilfe der T7-Polymerase hergestellt wurden (vgl. 2.11.1) an neu entstandene PSTVd-RNA durch Transkription mit der im Kernextrakt enthaltenen DNA-abhängigen Polymerase II bezeichnet werden. Die sequenzspezifische Hybridisierung der Biotin-markierten Sonden-Moleküle erlaubt die spätere Bindung an paramagnetische Streptavidin-Partikel (Dynabeads, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg) und somit die Isolierung der gewünschten RNA aus der Gesamtmenge an Nukleinsäuren. Es wurden je nach „Ziel-RNA“ zwei verschiedene Biotin-Sonden verwendet: Zum einen Biotin-markiertes Transkript von dem *Eco*RI-linearisierten Plasmid pSH 3, das einem PSTVd-Dimer mit (-)-Polarität entspricht und zu 20 % biotinyliert ist; zum anderen Biotin-markiertes Transkript von dem *Eco*RI-linearisierten Plasmid pRH 717, das einem PSTVd-Dimer mit (+)-Polarität entspricht und ebenfalls zu 20 % biotinyliert ist. Beide Sonden wurden in der jeweiligen Hybridisierungsreaktion im Überschuss eingesetzt, wobei z.T. über die Höhe des Überschusses keine Aussage getroffen werden kann, da keine Information über die Menge an entstandener *de-novo*-PSTVd-RNA nach Transkription mit dem Kernextrakt vorliegt. Um eine optimale Ausbeute an „gefischtem“ Produkt zu erhalten, waren einige zusätzliche Etablierungsschritte nötig, die im Folgenden beschrieben werden.

2.12.2.1 Aufreinigung der Biotin-markierten Sonden-Moleküle an Dynabeads

Da während der Markierung der Sondenmoleküle während ihrer *in-vitro*-Transkription durch die T7-Polymerase zwar eine Biotinylierung von ~20 % angenommen werden kann, aber nicht garantiert ist, dass auch jedes der Moleküle wenigstens ein Biotin trägt, war eine vorangestellte Aufreinigung der Sondenmoleküle an Dynabeads notwendig. Diese sollte garantieren, dass nach der Aufreinigung ausschließlich solche Sonden zum „Fischen“ von neu-synthetisierter RNA eingesetzt werden, die auch biotinyliert sind. Hierzu wurden für die entscheidenden Experimente 3, bzw. 15 µg 20 %-Biotin-markierte SH 3 (-)-Sonde, sowie 3 µg 20 %-Biotin-markierte RH 717 (+)-Sonde an 1, bzw. 5 mg Dynabeads aufgereinigt. Die Mengenverhältnisse ergaben sich aus der Tatsache, dass laut mitgeliefertem Handbuch 1 µg

Dynabeads etwa 1-3 ng Vollängen-Transkript binden. Nach „anti-RNase-Vorbehandlung“ der Dynabeads (s. 2.12.1) erfolgte die Bindung der biotinylierten Sondenmoleküle in folgendem Reaktionsansatz:

5 mg Dynabeads (aufgereinigt)
 15 µg 20 % Biotin-markierte SH 3-Sonde (gel-eluiert)
 10 ml 2 x „B & W“-Puffer
 ad 20 ml H₂O_{auto}

bzw.

1 mg Dynabeads (aufgereinigt)
 3 µg 20 % Biotin-markierte SH 3-Sonde oder RH 717-Sonde (gel-eluiert)
 2 ml 2 x „B & W“-Puffer
 ad 4 ml H₂O_{auto}

Die Inkubation erfolgte auf vier 12-ml-Röhrchen (Greiner) verteilt bei Raumtemperatur für 40 Minuten, wobei die Reaktionsgefäße sanft von Hand rotiert wurden, um ein Sedimentieren der Streptavidin-Partikel auf Grund ihres Eigengewichts zu verhindern. Nach der Bindung der Biotinmoleküle an die Dynabeads wurden die Reaktionsgefäße für 1 Minute in einen Magnetständer (DynaL MPC-L, Magnetic Particle Concentrator) überführt. Die magnetischen Partikel einschließlich der an ihnen gebundenen Sondenmoleküle sammelten sich direkt an der Rückwand des Magnetständers, und der Überstand, (der alle nicht gebundenen Nucleinsäuren enthält) konnte abgenommen werden. Anschließend wurden die Partikel typischerweise wie folgt „gewaschen“:

+ 0,1 x	SSC	→ 3 min	RT	→ 1 min Magnet
+ 0,1 x	SSC	→ 4 min	70 °C	→ 30 s Magnet
(+ 1 x	TNE	→ 2 min	85 °C	→ 30 s Magnet) optional
+	FA-Lsg.	→ 4 min	70 °C	→ 30 s Magnet

Die Inkubation mit 0,1 x SSC führt zur Abtrennung unspezifisch gebundener Nucleinsäuren; die Temperaturerhöhung diente der Stringenz der Waschschrte. Die FA-Lsg. führt bei 70°C zur Auflösung der Biotin-Streptavidin-Bindung und die gebundene Nucleinsäure kann so von den Dynabeads freigesetzt werden. In diesem Eluat befinden sich nun ausschließlich solche Sondenmoleküle, die tatsächlich mindestens 1 Biotin-Molekül tragen und somit zum „Fischen“ der jeweiligen „Ziel“-RNA geeignet sind. Die FA-Fraktion wurde mit Ethanol gefällt und in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt (genereller Ablauf der einzelnen Waschschrte s. Abb. 2.1).

2.12.2.2 Aufreinigung der biotinylierten RT-Produkte an Dynabeads

Da die Aufreinigung der entstandenen biotinylierten RT-Produkte die Aufreinigung von DNA bedeutet, konnte auf die „anti-RNase-Behandlung“ der Dynabeads verzichtet werden. Zur Aufreinigung der in 50 µl resuspendierten Nucleinsäure nach der RT wurden 25 µg Dynabeads verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach folgendem Reaktionsansatz:

25 µg Dynabeads
 50 µl in H₂O_{auto} resuspendierte RT-Probe
 50 µl 2 x „B & W“-Puffer

Die Inkubation erfolgte in Eppendorfgefäßen bei Raumtemperatur für 10 Minuten, wobei die Reaktionsgefäße sanft von Hand rotiert wurden, um ein Sedimentieren der Streptavidin-Partikel auf Grund ihres Eigengewichts zu verhindern. Nach der Bindung der Biotinmoleküle an die Dynabeads wurden die Reaktionsgefäße für 1 Minute in einen Magnetständer überführt. Die magnetischen Dynabeads einschließlich der an ihnen gebundenen RT-Produkte sammelten sich direkt an der Rückwand des Magnetständers, und der Überstand, der alle nicht gebundenen Nukleinsäuren enthält, konnte abgenommen werden. Anschließend wurden die Partikel typischerweise wie folgt „gewaschen“:

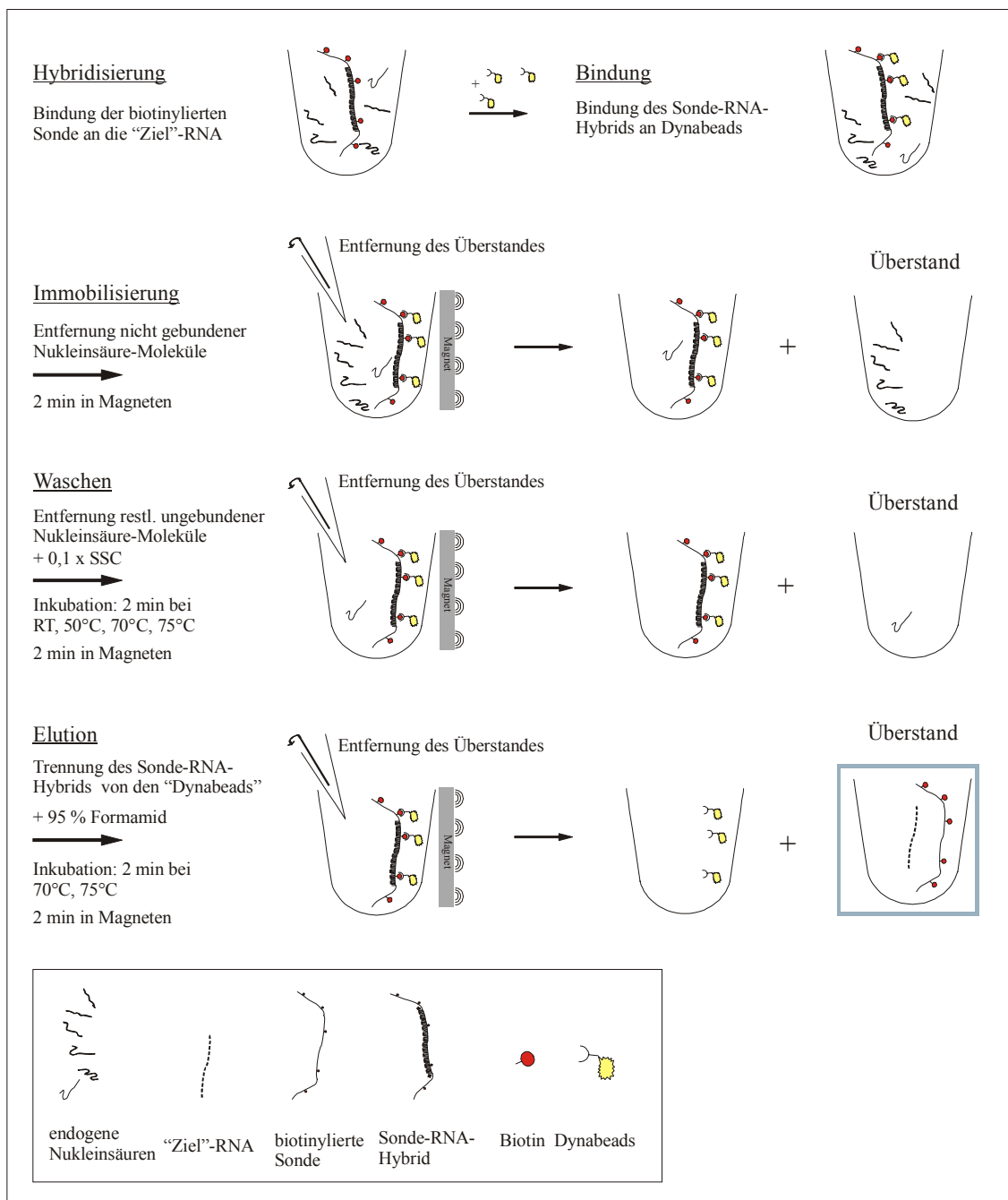


Abb. 2.1

Schematische Darstellung der einzelnen Waschschrte während der Dynabeads-Aufreinigung.
Die einzelnen Schritte sind nebenstehend erläutert.

+ 50 µl	0,1 x	SSC	→2 min	70°C	→30 s	Magnet
+ 50 µl	0,1 x	SSC	→2 min	70°C	→30 s	Magnet
+ 5 µl		FA-Lsg.	→4 min	70°C	→30 s	Magnet

Die FA-Fraktion wurde direkt in die anschließende PCR-Reaktion eingesetzt.

2.12.3 „Fischen“ von neu-entstandener PSTVd-RNA aus dem Kernextrakt-Ansatz

Um die *de-novo*-RNA aus dem Kernextraktansatz zu isolieren und sie somit von den anderen Nukleinsäuren zu trennen, wurden Biotin-markierte Sonden gegen die Ziel-RNA hybridisiert. Auf Grund der Biotinylierung war es möglich, die entstandenen Nukleinsäure-Hybride mittels Dynabeads dem Ansatz zu entziehen. Verwendet wurden sowohl für die Isolierung des zirkulären PSTVd-Templates mit (+)-Polarität als auch für die eigentliche „Ziel“-RNA mit (-)-Polarität jeweils biotinylierte PSTVd-Dimer-Sonden. Diese besitzen die doppelte PSTVd-Sequenz. Das ist wichtig, da die tatsächliche Sequenz des neu-entstandenen Transkripts unbekannt war und eine optimale Hybridisierung ermöglicht werden sollte. Das „Fischen“ erfolgte in folgendem Ansatz:

			Pellet aus Transkriptionsansatz
			Pellet aus Aufreinigung der Sondenmoleküle
1 x			TNE
V _{end}			20 µl

Der Ansatz wurde für 1,5 Minuten auf 85°C erhitzt und zunächst 1 h in Styropor und im Anschluss eine weitere Stunde auf der Laborbank ohne Styropor abgekühlt. Es wurde hierbei eine typische Endtemperatur von 35-37°C erreicht. Mit dem Erreichen der Endtemperatur wurden die Ansätze auf Eis gestellt und an Dynabeads aufgereinigt (analog zu 2.12.2.1). Das Waschen der Dynabeads erfolgte nach folgendem Protokoll:

(1)	+ 1,3 ml	0,1 x	SSC	→5 min	RT	→1 min	Magnet
(2)	+ 1,3 ml	0,1 x	SSC	→5 min, 30s	70°C	→30 s	Magnet
(3)	+ 750 µl		FA-Lsg.	→5 min, 30s	70°C	→30 s	Magnet

Die Überstände der Waschschritte (1) und (2), welche die *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA enthalten, werden mit Ethanol präzipitiert und sowohl diese Pellets, als auch das Pellet der prä-aufgereinigten biotinylierten (-)-Sonde werden in 20 µl 1 x TNE resuspendiert. Die zweite Hybridisierung wurde in Anwesenheit von 8 M Harnstoff durchgeführt und die Hybride wie oben beschrieben aufgereinigt. Erneut wurden die Fraktionen, welche die *de-novo*-(-)-RNA enthalten, (1) und (2), gefällt und im letzten Schritt gegen prä-aufgereinigte biotinylierte (+)-Sonde hybridisiert. Der letzte Hybridisierungsschritt fand ohne Harnstoff statt und die Hybride wurden wie beschrieben über den Magneten separiert. Als zusätzlichen Wasch-/Elutions-schritt wurde bei 75 °C mit 8 M Harnstoff gewaschen, um Hybride zwischen *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA und der Biotinsonde zu zerstören und so die neu-entstandenen (-)-RNA freizusetzen.

(1) + (2)	siehe oben						
(3)	+ 260 µl	8 M	Harnstoff	→4 min	75°C	→30 s	Magnet
(4)	+ 150 µl		FA-Lsg.	→4 min	70°C	→30 s	Magnet

Die Fraktionen (3) mit der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA und (4), die möglicherweise nicht vollständig von der Sonde gelöste *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA enthält, wurden mit Ethanol gefällt und direkt in die anschließende Primer-Extension-Reaktion eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der PSTVd-Transkription: Schritt 2: Transkription von (-)-RNA zu (+)-RNA

3.1.1 Genereller Nachweis der Polymerase II-Aktivität

Grundlage für die Untersuchungen bildete ein *in-vitro*-Transkriptionssystem aus Kernextrakten nicht-infizierter Kartoffelzellkulturen (s. auch 2.5). Die in diesen Zellkernextrakten aktive DNA-abhängige RNA-Polymerase II (Pol II) synthetisiert ausgehend von exogen zugesetztem (-)-PSTVd-Template *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA.

Zunächst sollte untersucht werden, ob sich im Kernextrakt generell die Aktivität der DNA-abhängigen RNA Polymerase II (Pol II) nachweisen lässt, um zu garantieren, dass die präparierten Kernextrakte über eine transkriptionsaktive Pol II verfügen, welche die Grundlage der folgenden Transkriptionsexperimente war. Daher war ihre Funktionalität zu überprüfen. Dies geschah ebenfalls über die Zugabe eines exogenen Templates in den Kernextrakt einer nicht-infizierten Kartoffelzellkultur und die anschließende Detektion von neu-entstandenem Transkriptionsprodukt. Zum generellen Nachweis der Pol II-Aktivität in den präparierten Kernextrakten war cPSTVd als exogenes Template nicht geeignet, da es nicht das natürliche Template der Pol II ist und somit ohnehin von einer reduzierten Transkription des „fremden“ Templates auszugehen war. Das Ausbleiben eines detektierbaren Transkriptionsproduktes hätte nicht unmittelbar eine inaktive Pol II bedeutet, sondern hätte auch auf einer unterdrückten Transkriptionsaktivität auf Grund des artifiziellen Templates beruhen können. Daher wurde zum Nachweis der Transkriptionsaktivität der Pol II ein Template verwendet, das dafür bekannt ist, einen der stärksten Pol II-Promotoren zu besitzen, der in der Literatur beschrieben ist. Es handelt sich hierbei um den 35S-Promotor aus dem *cauliflower-mosaic virus*, (Bhattacharyya *et al.*, 2002), der in den meisten veröffentlichten Untersuchungen zur Pol II-Aktivität als Template verwendet wird (Roberts und Okita, 1991; Fan und Sugiura, 1995). Mit freundlicher Unterstützung von Eric Richly (Max-Planck-Institut, Köln) wurde ein Plasmid zur Verfügung gestellt, das über den 35S-Promotor verfügte. Bei diesem Plasmid handelte es sich um das sog. „pRT 103, GUS“, in das sowohl der 35S-Promotor (~ 460 Basenpaare) als auch unmittelbar dahinter das Gen für die β -Glucuronidase „GUS“ (~ 1900 Basenpaare) einkloniert waren. Bei einem positiven Aktivitätsnachweis der Pol II würde diese den 35S-Promotor erkennen, an ihn binden und die messenger RNA (mRNA) des danach einklonierten Gens für die β -Glucuronidase transkribieren. Da die Transkription in Anwesenheit von α -³²P-UTP stattfinden sollte, wären die neu-entstandenen Transkripte radioaktiv markiert und das betreffende Transkript könnte auf Grund seiner Länge der Pol II-spezifischen Transkription zugeordnet werden. Die ersten Transkriptionsanalysen erfolgten mit linearisiertem Plasmid als exogenem Template. Hierzu wurde das „supercoiled“ vorliegende Plasmid mit *Pst*I linearisiert. Die anschließende Transkriptionsanalyse lieferte kein befriedigendes Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Zwar waren Signale zu detektieren, die jedoch nicht eindeutig identifiziert werden konnten. Das liegt wahrscheinlich daran, dass das gesamte GUS mit 1900 Basenpaaren sehr groß ist, d.h., dass die Pol II aus dem jeweiligen präparierten Kernextrakt nicht in der Lage ist ein Produkt dieser Größe zu transkribieren. In diesem Zusammenhang war es also notwendig, das Plasmid so zu restringieren, dass ein kürzeres Fragment als Transkriptionsprodukt entsteht. Hierzu wurde pRT 103-GUS mit *EcoRV* restringiert. Die entsprechenden Restriktionsschnittstellen sind in Abb. 3.1.1 dargestellt.

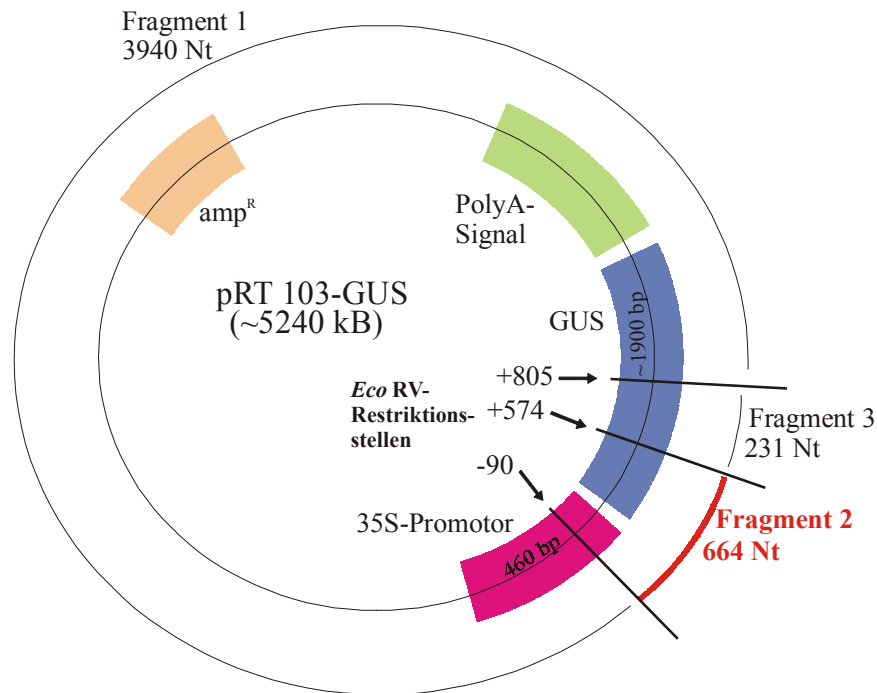


Abb. 3.I.1
Schematische Darstellung des Plasmids pRT 103-GUS.

Farbig markiert sind die relevanten Bereiche. sandfarben: Ampicillin-Resistenz des Plasmids; grün: poly-A-Signal (determiniert das Ende der mRNA); blau: Gen, das für die β -Glucuronidase kodiert (GUS); rosa: 35S-Promotor des *cauliflower-mosaic virus*. Die Pfeile geben die Restriktionsschnittstellen des Enzyms *EcoRV* an; an den nebenständig skizzierten äußeren Kreisabschnitten sind die resultierenden Fragmentgrößen angegeben. Die Nukleotidangabe in den farbigen Bereichen repräsentiert die Größe des jeweiligen Elements. Fragment 2 (rot) ist das eigentliche Template der späteren Transkriptionsexperimente, da es sowohl den relevanten Promotorbereich, als auch einen Teil der nachfolgenden (und zu transkribierenden) GUS-Sequenz enthält.

EcoRV schneidet insgesamt 3 x im Plasmid, wobei einer der Schnitte innerhalb der 35S-Promotorsequenz (-90) liegt. Dies sollte auf die Transkription durch die Pol II keinen Effekt haben, da alle essentiellen Elemente für eine „reine“ Transkription innerhalb des Bereiches -90 bis +1 liegen sollten (Wagner, mündl. Mitteilung). Weiter „upstream“ auf der Promotorsequenz liegen lediglich solche Elemente, die einen regulatorischen Einfluss auf die Transkription ausüben und somit die betrachtete „reine“ Transkription im Kernextrakt nicht beeinflussen sollten. Darüber hinaus wird die Restriktion innerhalb des 35S-Promotors mit *EcoRV* standardmäßig in Transkriptionsexperimenten der Pol II angegeben (Roberts und Okita, 1991) und scheint die Analysen nicht zu beeinträchtigen. Das Plasmid (pRT 103-GUS) wurde also zunächst im analytischen und später im präparativen Maßstab mit *EcoRV* verdaut und dasjenige Fragment, das sowohl über den entsprechenden Promotorabschnitt als auch über den dahinterliegenden Sequenzbereich von GUS verfügt (Fragment 2), über Gelelektion isoliert, anschließend mit Phenol-Chloroform aufgereinigt und als exogenes Template zur Transkriptionsanalyse der Aktivität der Pol II in den jeweiligen Kernextrakt eingesetzt. Bei erfolgreicher Transkription sollte das entstehende Transkript eine Länge von 574 Nt aufweisen. Die Transkriptionsexperimente wurden in verschiedenen, unabhängig voneinander präparierten Kernextrakten durchgeführt. Es wurde nach zwei verschiedenen Transkriptions-

protokollen gearbeitet (Fels, 1997 und Roberts und Okita, 1991; s. auch 2.11.2). Die Ergebnisse der Analysen sind in Abb. 3.I.2 dargestellt.

Die Analyse der Transkriptionsaktivität der Pol II im Kernextrakt lieferte zwar ein Signal (Spur 1), allerdings war eine Zuordnung auf Grund des fehlenden Längenstandards nicht möglich. Darüber hinaus trat das Signal nur in einem aller eingesetzten Kernextrakte auf, was die Vermutung nahe legt, dass lediglich eine sehr geringe Menge an Transkriptionsprodukt vorliegt, welches selbst mit der sensitiven Methode, nämlich dem Einbau von radioaktiven Nukleotiden nicht oder nur schwach nachgewiesen werden kann. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine extrem schwache Transkriptionsaktivität der Pol II oder eine schnelle Degradation des Templates während der Transkription. Insgesamt war die Transkriptionsaktivität der Pol II mit den durchgeführten Experimenten nicht eindeutig zu klären, wobei jedoch Vergleiche mit publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen ähnlich schwache und uneindeutige Ergebnisse zeigen (Roberts und Okita, 1991). Das lässt darauf schließen, dass die *in-vitro*-Analyse der Pol II-Transkriptionsaktivität generell experimentell schwierig ist und es hierfür noch keine optimale Nachweismöglichkeit gibt.

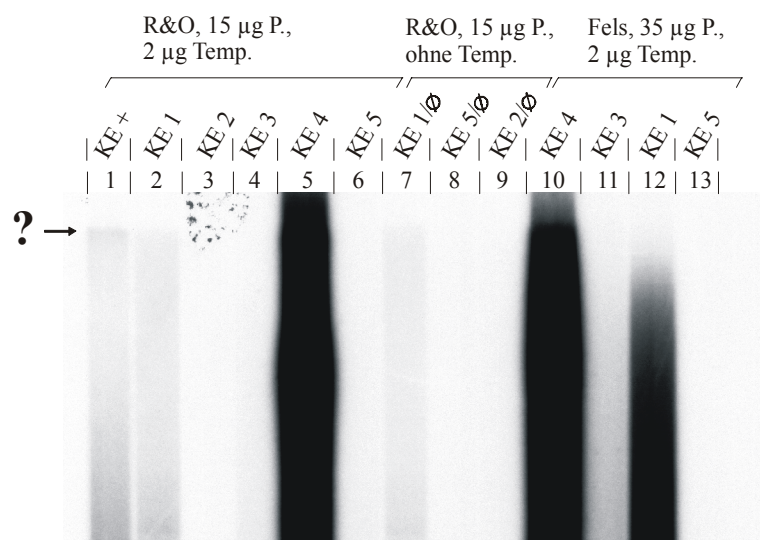


Abb. 3.I.2

Nachweis der Pol II-Aktivität durch radioaktive *in-vitro*-Transkription mit verschiedenen Kernextrakten.

Als Template wurden in allen Transkriptionsansätzen 2 µg des restringierten Plasmids pRT 103-GUS, das den 35 S-Promotor enthält, eingesetzt. Die verwendete Proteinkonzentration in den präparierten Kernextrakten betrug 15 µg bzw. 35 µg. Als Nullkontrolle dienten ausgewählte Kernextrakte, die ohne exogenes Template inkubiert wurden. Es wurden zwei verschiedene Transkriptionsprotokolle untersucht: 1) nach Roberts und Okita (1991) und 2) nach Fels (1997). Die Transkription wurde in Anwesenheit von α - 32 P-UTP durchgeführt; neu-entstandene Transkripte sind radioaktiv markiert. Der gesamte Transkriptionsansatz wurde mit Ethanol gefällt, komplett auf ein 5 %-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und das Gel gegen einen Röntgenfilm exponiert. Spuren 1-6: Transkriptionsansätze in 6 unabhängigen Kernextrakten K+ bis K5; Transkriptionsprotokoll nach Roberts und Okita; 2 µg exogenes Template; 15 µg Protein aus dem Kernextrakt; Spuren 7-9: Transkriptionsansätze ohne exogenes Template (Nullkontrollen); Transkriptionsprotokoll nach Roberts und Okita; 15 µg Protein aus dem Kernextrakt; Spuren 10-13: Transkriptionsansätze in 4 unabhängigen Kernextrakten K1, K3, K4, K5; Transkriptionsprotokoll nach Fels; 2 µg exogenes Template; 35 µg Protein aus dem Kernextrakt; Exposition: 14 d bei -70°C , mit Verstärkerfolie. In dem Ansatz mit K1 ist ein Transkriptionssignal zu detektieren (Spur 1).

3.1.2 RT-PCR-Analysen von *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA nach Transkription im Kernextrakt

Zu untersuchen war, ob exogen zugegebenes dimeres (-)-PSTVd-Template von der Pol II im Kernextrakt transkribiert wird. Hierzu sollte *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA als Produkt nachgewiesen werden. Als Nachweismethoden dienten zunächst RT-PCR-Analysen, später auch die spezifische Isolation von *de-novo*-(+)-RNA mittels der in dieser Arbeit etablierten Aufreinigungsmethode. Zunächst wurde die Kombination aus Reverser Transkription (RT) und Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) gewählt, da von einer geringen Ausbeute an *de-novo*-(+)-RNA als Transkriptionsprodukt ausgegangen werden musste. Das liegt daran, dass das PSTVd *per se* nicht das natürliche Substrat der Pol II ist, Experimente mit aufgereinigtem Enzym aber gezeigt hatten, dass es trotzdem von der Pol II transkribiert wird (Rackwitz *et al.*, 1981). In der vorliegenden Arbeit wurden zur Analyse der Transkriptionsreaktionen, und vor allem zur Analyse der entstandenen Produkte nicht-infizierte Zellkernextrakte als *in-vitro*-System verwendet. Hierbei spielen die endogenen Komponenten des Kernextraktes eine entscheidende Rolle, insbesondere die RNA-degradierenden Nukleasen, die RNasen. Folgende Gründe machen deutlich, wie kritisch, bzw. schwierig der Nachweis von *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA, ausgehend von linearem (-)-PSTVd-Template ist:

- die basale Transkription im Kernextrakt durch die Pol II ist *per se* gering
- die *de-novo*-(+)-PSTVd-Transkripte weisen u. U. kein einheitliches 5'-Ende auf
- keine konkreten Hinweise zur notwendigen Menge an exogenem Template für die Transkriptionsreaktion; es entsteht u. U. zu wenig Produkt, das dann auf Grund der Nachweisgrenze nicht detektiert werden kann
- keine einheitliche Länge der entstehenden Transkripte
- durch die unterschiedliche Länge der entstehenden Transkripte wird möglicherweise die Bindung des Primers verhindert, da die komplementären Bereiche des Transkripts fehlen

Betrachtet man (-)-PSTVd-RNA als exogenes Template, so ist die Inkubation des (-)-Templates im Kernextrakt kritisch. Im Gegensatz zum cPSTVd, das unter den experimentellen Bedingungen weitgehend als Doppelstrang vorliegt, ist ein zugegebenes (-)-strängiges PSTVd-RNA-Template linear, d.h. weitestgehend einzelsträngig. Das macht die RNA generell viel instabiler gegenüber den im Kernextrakt vorhandenen RNasen, d.h. die Degradation während der Transkriptionsreaktion kann unter Umständen sogar so schnell sein, dass das Template (die (-)-Strang-PSTVd-RNA) vollständig verdaut ist, bevor sie transkribiert werden konnte. Dies war einer der Gründe, wieso von einer sehr geringen Menge an Transkriptionsprodukt ausgegangen werden musste. Ein weiterer Punkt ist die Sekundärstruktur der Nukleinsäure. Ein diskutiertes Erkennungsmerkmal für die Pol II ist der sogenannte Hairpin II (HP II), ein Strukturmerkmal das während der sequentiellen Faltung *in silico* beobachtet werden kann (Loss *et al.*, 1991). Wenn also die Ausbildung des HP II tatsächlich entscheidend ist für die Transkription des PSTVd von (-) nach (+), muss dieser bereits vor der Inkubation der (-)-RNA mit dem Kernextrakt strukturell eingestellt werden, da das betrachtete Experiment sich ausschließlich mit der Transkription von (-) nach (+) befasst und HP II sich also nicht im vorhergehenden Schritt sequenziell bilden kann. Dass eine prinzipielle „Einstellung“ des HP II unter definierten Versuchs- bzw. Pufferbedingungen möglich ist, konnte in vorausgegangenen Arbeiten gezeigt werden (Baumstark, 1997; Schröder, 1998). Das Problem der Transkriptionsanalysen ist jedoch die Stabilität der „eingestellten“ RNA-Struktur während der Transkriptionsreaktion. Ein sofortiger struktureller „Shift“ bei dem Wechsel von dem zur Einstellung verwendeten Puffer in den Kernextrakt

würde die Auflösung der „transkriptionsaktiven“ Struktur zur Folge haben und somit die Neusynthese von (+)-RNA verhindern. Auf Grund der beschriebenen ungewissen Parameter war davon auszugehen, dass nach einer Transkription mit linearer dimerer (-)-PSTVd-RNA als exogenem Template eine deutlich geringere Menge an Transkriptionsprodukt zu erwarten war, als bei der Verwendung von zirkulärer (+)-PSTVd-RNA als Template. In diesem Zusammenhang schien für den Nachweis potentiell neu-entstandener (+)-PSTVd-RNA ein Verfahren notwendig, das auch die Detektion geringster Mengen an Transkriptionsprodukt erlaubt, weshalb die ersten Analysen von *de-novo*-entstandener (+)-RNA mit Hilfe der RT-PCR durchgeführt wurden.

3.I.2.1 Sequenz- und Temperaturoptimierung (+)-Strang-spezifischer Primer für RT-PCR-Analysen

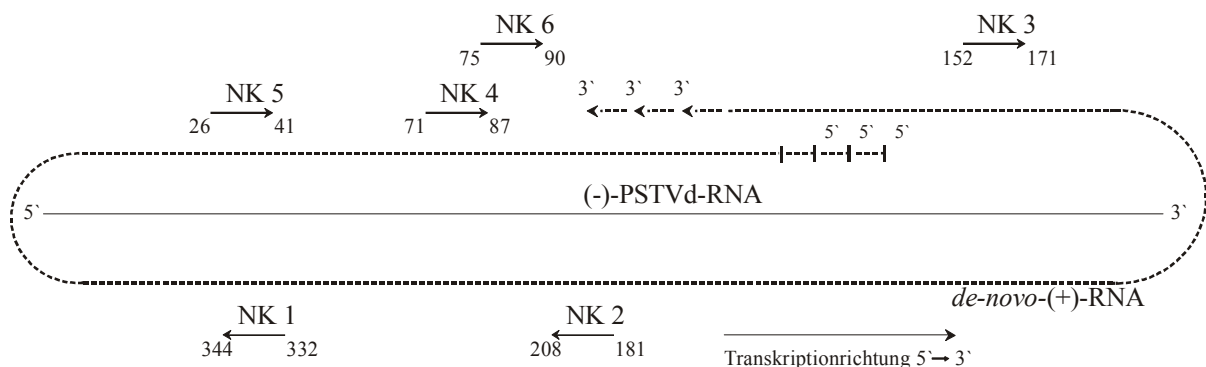
Um *de-novo*-entstandene (+)-RNA nachzuweisen, wurden zunächst RT-PCR-Analysen durchgeführt. Der Vorteil der RT-PCR-Methode liegt in der Amplifikation eines schwachen Signals, so dass auch geringste Mengen an Produkt nachgewiesen werden können. Hierzu mussten Primer etabliert werden, die nicht nur zwischen PSTVd-RNA und den endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes diskriminieren, sondern vor allem zwischen PSTVd-Sequenz mit (+)- und (-)-Polarität. Die extreme Selbstkomplementarität des PSTVd war hier eine besondere Schwierigkeit. Zum Design spezifischer Primer wurden *in silico* Berechnungen mit dem Programm „matcher“ aus dem Programmpaket EMBOSS (Rice *et al.*, 2000) durchgeführt. Anhand bereits existierender Primer, die als (+)-Strang-spezifisch ausgewiesen waren, deren (+)-Strang-Spezifität allerdings für die hier durchgeführten Analysen nicht ausreichte, wurde *in silico* getestet, inwieweit eine Verkürzung der betreffenden Oligonukleotide am 5' - und/oder am 3'-Ende zu einer Erhöhung der (+)-Spezifität führte, wenn man davon ausgeht, dass durch die Verkürzung der Sequenz unspezifische Bindungen stärker abgeschwächt werden als spezifische Bindungen. Mit Hilfe des verwendeten Programms konnte berechnet werden, inwieweit der Primer mit seinem 3'-Ende, das für die Verlängerung entscheidend ist, auf dem „falschen“ (-)-Strang paaren kann. So konnte die Möglichkeit der „Falschpaarung“ ausgeschlossen oder auf ein Mindestmaß reduziert werden. Mit Hilfe eines weiteren Programms (POLAND, Steger, 1994) wurden die T_M -Werte der Primer bestimmt. Verwendet wurden solche Primer, die mit dem 3'-Ende nicht auf dem (-)-Strang paaren können, oder solche, die zwar trotz einiger Fehlpaarungen binden könnten, deren Bindung ans „falsche“ Template aber auf Grund der Annealingtemperatur experimentell ausgeschlossen werden konnte. Hierzu wurden diejenigen T_M -Werte berechnet, die für die Bindung ans „falsche“ Template galten, um später durch die entsprechende Hybridisierungstemperatur diese zu unterbinden. Primer mit nicht optimal komplementärer Sequenz können die Basenpaarungen ab einer gewissen Temperatur nicht mehr stabil halten und lösen sich wieder, wohingegen bei optimalen, komplementären Sequenzen mit entsprechendem GC-Gehalt relativ hohe Temperaturen aufgebracht werden müssen, um die Nukleinsäurestränge wieder voneinander zu lösen. Deswegen war darauf zu achten, dass der T_M -Wert des Primers, wenn er ans „richtige“ Template gebunden war, sich deutlich von dem unterschied, wenn er an die „falsche“ Sequenz gebunden hatte. Nur solche Primer mit einer deutlichen Differenz der T_M -Werte wurden zur Analyse *de-novo*-entstandener (+)-PSTVd-RNA in die Reverse Transkription eingesetzt. Es konnten sechs potentiell geeignete Primer mit ausreichender (+)-Strangspezifität ermittelt werden. Sowohl ihre Sequenz als auch ihre berechneten T_M -Werte sind im Folgenden tabellarisch aufgeführt (Tab. 3.I.1, s. nächste Seite). Ihre Position innerhalb der cPSTVd-Sequenz ist in Abb. 3.I.3 auf der folgenden Seite dargestellt.

Tab. 3.I.1**Beschreibung der verwendeten (+)-Strang-spezifischen Primer NK-1 bis NK-6.**

Eingetragen sind sowohl ihre jeweilige Sequenz, als auch die mit dem POLAND-Programm berechneten T_M -Werte

Primer	Sequenz (5' → 3')	T_M -Wert (Poland)
NK-1	TTC CAA GGG CTA A	54,3°C
NK-2	GGA AGG ACA CCC GAA GAA AGG AAG GGT G	68,7°C
NK-3	TTT CGG CGG GAA TTA CTC CT	67,6°C
NK-4	CCT GAA GCG CTC CTC CG	65°C
NK-5	GAG GTC AGG TGT GAA C	64,8°C
NK-6	ATC CCT GAA GCG CTC C	64,8°C

Da in den späteren Transkriptionsanalysen dimere (-)-strängige PSTVd-RNA als exogenes Template eingesetzt werden soll, wurde zunächst in einem Vorversuch getestet, ob (+)-PSTVd RNA von dimerer (-)-PSTVd-RNA spezifisch mittels RT-PCR diskriminiert werden kann. Es wurden verschiedene Konzentrationen an (+)- sowie (-)-PSTVd-RNA in die RT-PCR-Reaktion eingesetzt und die Produkte anschließend in einem PAA-Gel analysiert. Bei der RT-PCR ist die Reverse Transkription der eigentlich kritische Schritt, da allein die Bindung des RT-Primers über die Spezifität und somit über die Diskriminierung zwischen (+) und (-) entscheidet. Im Anschluss an die RT wird das RNA-Template abgedaut und anschließend das Produkt der Reversen Transkription in die anschließende PCR eingesetzt, d.h. eine spätere unspezifische Bindung des PCR-Primers an das ursprüngliche RNA-Template kann ausgeschlossen werden. Bei spezifischer Detektion des (+)-Stranges sollte nach erfolgreicher RT-PCR-Analyse ausschließlich ein Signal in den Ansätzen mit (+)-PSTVd-RNA zu detektieren sein. In den Ansätzen in denen (-)-strängige, dimere PSTVd-Sequenz als RT-Template eingesetzt wurde, sollte es zu keiner Amplifikation kommen. Erste Vorversuche zeigten allerdings, dass es selbst bei hohen Temperaturen während der RT nahe des T_M -Wertes des Primers auch in den Ansätzen mit dem „falschen“ Template ((-)-PSTVd-RNA) zu einer Amplifikation kam (Daten nicht gezeigt). Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich der lineare, dimere Charakter des Templates. Dieses hat die Möglichkeit zurückzufalten, d.h. mit

**Abb. 3.I.3****Position der betrachteten RT-Primer NK-1 bis NK-6, die zum Nachweis *de-novo*-synthetisierter (+)-PSTVd-RNA verwendet wurden.**

Die RT-Primer sind gegen (+)-Polarität gerichtet, haben also selber (-)-PSTVd-Sequenz. Ihre Nukleotidangaben beziehen sich aber auf das cPSTVd-Molekül.

Sequenzbereichen des eigenen Moleküls Basenpaare auszubilden und sich somit „selbst zu primen“. Hiermit würde für die Reverse Transkriptase ebenfalls ein partieller Doppelstrang zur Verfügung stehen – als wäre ein Primer gebunden –, den sie innerhalb der RT-Reaktion verlängert. Dieser partielle Doppelstrang wäre unabhängig von einer Primerbindung, würde aber im Folgenden das gleiche Resultat liefern. Durch die Verlängerung des durch Selbstprimen entstandenen Doppelstranges würde auch dieses RT-Produkt nach Verdauung des eigentlichen RNA-Templates in die PCR-Reaktion als Template eingesetzt und ein entsprechendes Signal liefern (s. Abb. 3.I.4).

Da eine Rückfaltung des linearen, dimeren (-)-Transkripts nicht ausgeschlossen werden konnte, musste eine Möglichkeit gefunden werden, die revers transkribierten Produkte, die durch Primerbindung entstanden sind, von solchen zu unterscheiden, die durch „selbstprimen“, d.h. durch Rückfaltung der RNA, entstanden sind. Zu diesem Zweck wurden im Folgenden Primer verwendet, die an ihrem 5'-Ende ein Biotinmolekül tragen. Durch Verlängerung der Primer durch die Reverse Transkriptase trägt das entstandene RT-Produkt an seinem 5'-Ende ebenfalls das entsprechende Biotinmolekül und kann im Anschluss über Dynabeads aus dem Ansatz entfernt werden (s. 2.12.2.2). Diejenigen RT-Produkte, die durch Rückfaltung des RNA-Templates entstanden sind, tragen kein Biotin und verbleiben somit im Reaktionsansatz. Nach der Isolierung der biotinylierten RT-Produkte wurden diese in die anschließende PCR eingesetzt. Bei der Verwendung von 5'-Biotin-markierten Primern in der RT-Reaktion ist darauf zu achten, dass im Anschluss an die RT auf die alkalische Hydrolyse des RNA-Templates der Reversen Transkription verzichtet wird, da die Biotin-Markierung eine 1-stündige Inkubation in 105 mM NaOH bei 90°C nicht toleriert und eine anschließende

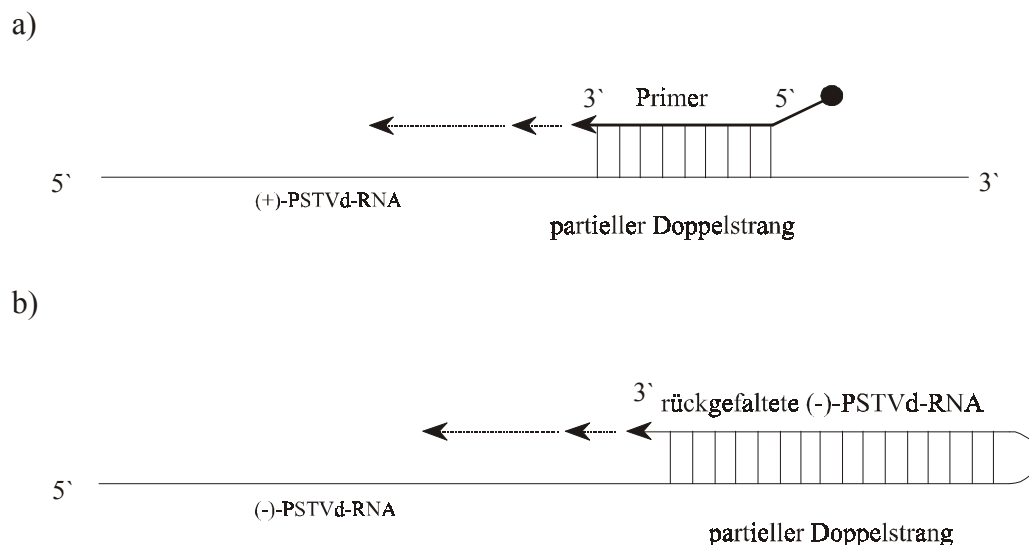


Abb. 3.I.4

Schematische Darstellung der Rückfaltung des RT-Templates.

Der lineare Charakter des (-)-Strang-PSTVd-Templates in der RT erlaubt die Basenpaarung zwischen Nukleotiden des identischen Moleküls und somit die Ausbildung eines intramolekularen, partiellen Doppelstrangbereiches (b). Die Reverse Transkriptase kann nicht zwischen intra- und intermolekularen Doppelsträngen diskriminieren; sie erkennt lediglich einen doppelsträngigen Bereich, den sie in 3'-Richtung verlängert. Dadurch können sowohl „richtige“ Templates (Doppelstrangbildung durch Bindung eines Primers an die einzelsträngige RNA, a), als auch „falsche“ Templates (Doppelstrangbildung durch Rückfaltung der RNA, b) in der RT-Reaktion erkannt und zu vollständigen Doppelsträngen verlängert werden.

Separation der biotinylierten RT-Produkte unmöglich machen würde. Daher wurde statt durch alkalische Hydrolyse durch Aufreinigung der Biotin-markierten RT-Produkte über Dynabeads und Denaturierung des Hybrids das RT-Produkt von dem RNA-Template getrennt. So konnte durch die Isolation der biotinylierten RT-Produkte über die Dynabeads-Aufreinigung diskriminiert werden zwischen solchen Signalen, die durch Rückfaltung des Templates kommen, und solchen, die durch Primerbindung und -verlängerung entstanden sind. Nun konnten Aussagen bezüglich der Spezifität der Primer getroffen werden, da jedes RT-PCR-Signal auf Grund von Primerbindung und -verlängerung entstanden sein musste. Auf dieser Basis sollte nun die Spezifität der ausgewählten Primer getestet werden. In verschiedenen

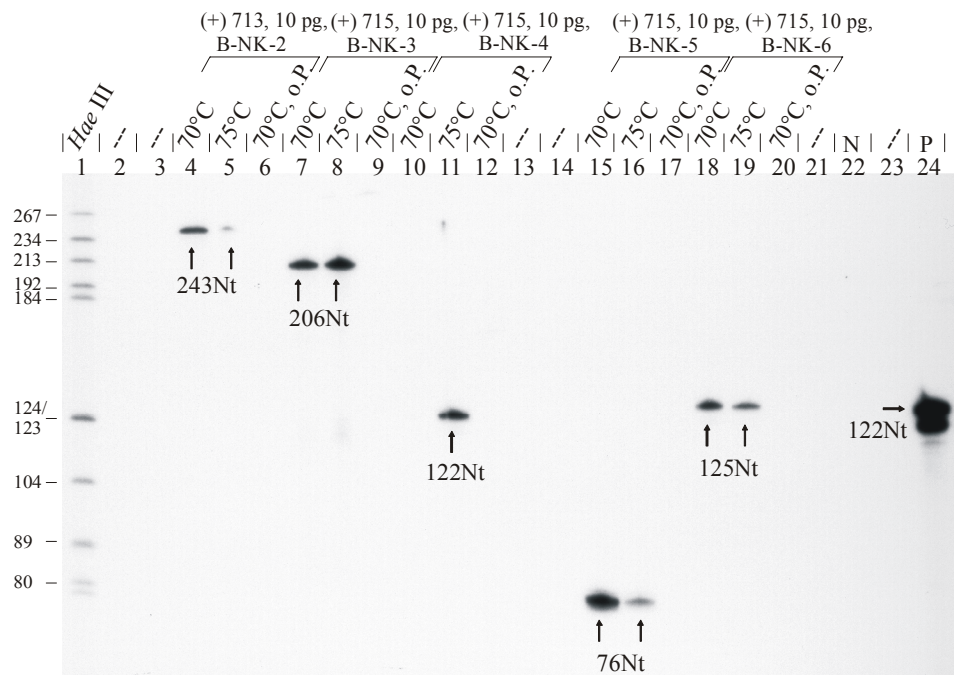


Abb. 3.I.5

Autoradiographie zur Analyse der Temperatur-Toleranz der biotinylierten Primer in der RT-Reaktion (T_{RT}).

Alle Primer (NK-2 bis NK-6) wurden in der RT-Reaktion bei 70°C, bzw. 75°C gegen ihr spezifisches Template hybridisiert. Entsprechend ihrer Bindestelle auf der Viroidsequenz wurden je 10 pg entweder des monomeren (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkripts pRH 713 (*Alu* I-Klon), oder pRH 715 (*Hae* III-Klon) eingesetzt. Als Kontrolle sowohl zum Ausschluss eines Signals in der RT-PCR durch Rückfaltung des Templates, als auch zur Spezifität der Dynabeads-Aufreinigung wurde für jeden der betrachteten Primer ein Ansatz bei 70°C ohne Primer untersucht. Es wurde für die RT-Reaktion 12,5 pmol 5' Biotin-markierte Primer eingesetzt. Enzym: „Retro-Amp-DNA-Polymerase“ (Biozym). Die anschließende PCR erfolgte bei einer Annealingtemperatur (T_{ann}) von 55°C (T_M von AF16). Die in der PCR verwendeten Primerpaare waren jeweils 20 pmol NK-X und AF16. Die Primerpaarung der Null-, bzw. der Positivkontrolle der PCR war NK-4 und AF16. Verwendetes Template hier: Wasser (Nullkontrolle), bzw. 50 pg Plasmid (pRH 715). Je 3 μ l pro PCR-Ansatz wurden auf ein 8 % Polyacrylamid-Gel aufgetragen. RT-Bedingungen: hot-start-RT (Temperaturen s. Auftragstaschen), keine alkalische Hydrolyse, anschl. Aufreinigung der biotinylierten RT-Produkte über Dynabeads. PCR-Bedingungen: radioaktive PCR, 25 Zyklen, T_{ann} : 55°C. Exposition: über Nacht bei -70°C, mit Verstärkerfolie; Alle Primer tolerieren eine T_{RT} von 70°C, bzw. 75°C (Spuren 4, 5, 7, 8, 10, 11, 15, 16, 18, 19); keine unspezifischen Signale durch Rückfaltung des Templates (Spuren 6, 9, 12, 17, 20); Spur 1: Längensstandard pBR 322, *Hae* III-restringiert.

Optimierungsschritten wurden monomere (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkripte, die mittels T7-Polymerase synthetisiert wurden (pRH 715 und pRH 713), stellvertretend für die später zu untersuchende *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA verwendet. Sowohl die RT-Temperatur der Primer, als auch die PCR-Temperaturen der verwendeten Primerkombinationen (forward- und backward-Primer) wurden optimiert (Daten nicht gezeigt). Hierzu wurden pro getestetem Primer die folgenden 3 Ansätze untersucht.

- 3 pg monomere (+)-RNA (713-, bzw. 715-IVT), $T_{RT}= 70^{\circ}\text{C}$; 12,5 pmol Primer NK-X
- 3 pg monomere (+)-RNA (713-, bzw. 715-IVT), $T_{RT}= 75^{\circ}\text{C}$, 12,5 pmol Primer NK-X
- 3 pg monomere (+)-RNA (713-, bzw. 715-IVT), $T_{RT}= 70^{\circ}\text{C}$, ohne Primer

Der Ansatz ohne Primer diente der Kontrolle zur Rückfaltung des RNA-Templates. Im Anschluss an die RT wurde mit den in der Legende von Abb. 3.I.5 angegebenen Primerkombinationen sowie PCR-Temperaturen die PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der letztlich getesteten RT-Temperaturen von 70°C bzw. 75°C sind in Abb. 3.I.5 auf der vorherigen Seite dargestellt.

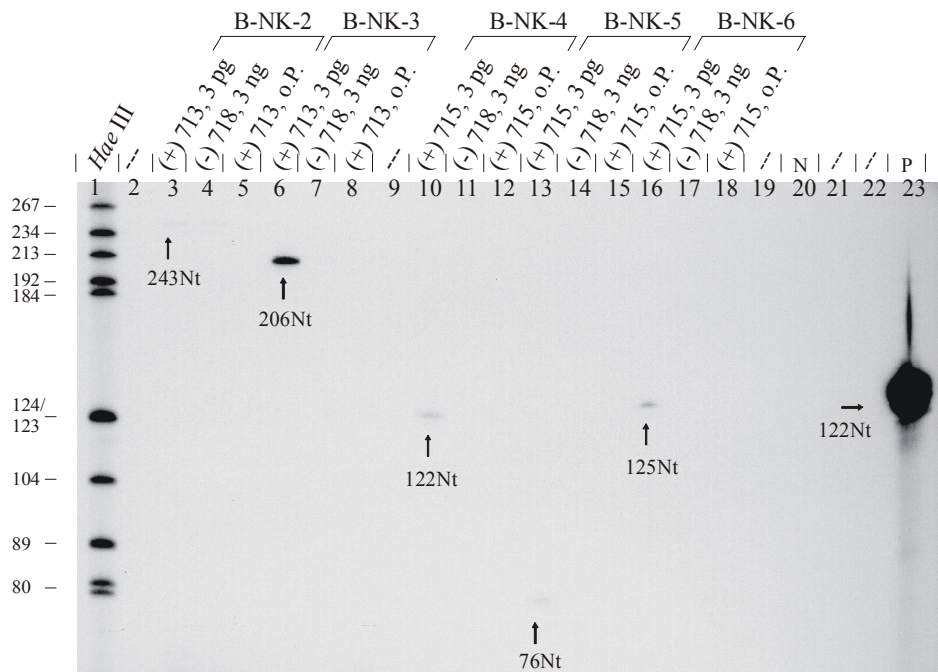
Die Exposition zeigt, dass für die betrachteten Primer NK-2 bis NK-6 sowohl bei 70°C , als auch bei 75°C die Reverse Transkription erfolgreich gewesen sein muss, da für alle die anschließende PCR ein entsprechendes Produkt lieferte. (vgl. Spuren 4, 5, 7, 8, 10, 11, 15, 16, 18, 19). Die Ansätze ohne Primer zeigten kein entsprechendes Signal (Spuren 6, 9, 12, 17, 20), was bedeutet, dass sowohl ein falsches Signal durch Rückfaltung des RNA-Templates, als auch eine unvollständige, nicht ausreichend spezifische Dynabeads-Aufreinigung, bei der geringe Mengen des RT-Templates fälschlicherweise mit aufgereinigt werden, ausgeschlossen werden konnten. Die tolerierte RT-Temperatur (T_{RT}) für die Primer NK-2 bis NK-6 von 70°C bzw. 75°C zeigt, dass die betrachteten Primer auch bei extrem hoher Annealingtemperatur an ihr Template binden und somit eine hohe RT-Temperatur erlauben, die eine spezifische Diskriminierung von (+)- und (-)-PSTVd-RNA ermöglichen sollte.

3.I.2.2 Spezifität der Primer NK-2 bis NK-6 für den (+)-Strang-Nachweis

Im Folgenden musste überprüft werden, ob die Primer geeignet waren, zwischen dem „richtigen“ Template (+) und dem „falschen“ Template (-) zu unterscheiden. Nur diejenigen Oligonukleotide, die spezifisch an die entsprechende Sequenz binden, sind geeignet. Pro Primer wurden 3 Ansätze untersucht

- 3 pg monomere (+)-RNA (713- bzw. 715-IVT), $T_{RT}= 75^{\circ}\text{C}$; 12,5 pmol Primer NK-X
- 3 ng dimere (-)-RNA (718-IVT), $T_{RT}= 75^{\circ}\text{C}$, 12,5 pmol Primer NK X
- 3 pg monomere (+)-RNA (713- bzw. 715-IVT), $T_{RT}= 75^{\circ}\text{C}$, ohne Primer

Sowohl die RT-, als auch die PCR-Reaktion wurden standardmäßig durchgeführt (s. 2.11.6 und 2.11.7). Die anschließende Analyse der Produkte erfolgte in einem 8 %-igen, denaturierenden Polyacrylamid-Gel. Das Ergebnis zeigt die Exposition in Abb. 3.I.6 auf der nächsten Seite.

**Abb. 3.I.6****Autoradiographie zur Analyse der (+)-Strang-Spezifität der biotinylierten Primer NK-2 bis NK-6 in der RT-Reaktion.**

T_{RT} : Temperatur der Reversen Transkription. Hybridisierung der Primer (NK-2 bis NK-6) in der RT-Reaktion bei 75°C gegen ihr spezifisches Template, bzw. gegen ein *in-vitro*-PSTVd-Transkript mit identischer Polarität („falsches“ Template). „Falsches“ Template: dimeres PSTVd *in-vitro*-Transkript mit (-)-Polarität (pRH 718). Die Konzentration des „falschen“ Templates in der RT-Reaktion war um den Faktor 1000 höher, als die des eigentlichen Templates mit (+)-Polarität. Entsprechend ihrer Bindestelle auf der Viroidsequenz wurden je 3 pg entweder des monomeren (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkripts pRH 713 (*Alu* I-Klon) oder pRH 715 (*Hae* III-Klon) eingesetzt. Kontrolle zum Ausschluss eines Signals in der RT-PCR durch Rückfaltung des Templates: Pro RT je ein Ansatz bei 75°C ohne Primer. Es wurden für die RT-Reaktion 12,5 pmol 5' Biotin-markierte Primer eingesetzt. Enzym: „Retro-Amp-DNA-Polymerase“ (Biozym). Die anschließende PCR erfolgte bei einer Annealingtemperatur (T_{ann}) von 55°C (T_M von AF16). Die in der PCR verwendeten Primerpaare waren jeweils 20 pmol NK-X und AF16. Die Primerpaarung der Null- bzw. der Positivkontrolle der PCR war NK-4 und AF16. Verwendetes Template: Wasser (Nullkontrolle) bzw. 50 pg Plasmid (pRH 715). Je 3 µl pro PCR-Ansatz wurden auf ein 8 % PAA-Gel aufgetragen. RT-Bedingungen: hot-start-RT, keine alkalische Hydrolyse, anschl. Aufreinigung der biotinylierten RT-Produkte über Dynabeads. PCR-Bedingungen: radioaktive PCR, 25 Zyklen, T_{ann} : 55°C; Exposition: über Nacht bei -70°C, mit Verstärkerfolie; Alle Primer sind unter den gewählten Bedingungen spezifisch, und tolerieren einen 1000-fachen Überschuss an „falschem“ Template (Spuren 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 14, 16, 17); keine unspezifischen Signale durch Rückfaltung des Templates (Spuren 5, 8, 12, 15, 18); Spur 1: Längenstandard pBR 322, *Hae* III-restringiert.

Aus Abb. 3.I.6 ist deutlich zu erkennen, dass mit allen verwendeten Primern, NK-2 bis NK-6 spezifisch (+)-RNA detektiert werden kann (Spuren 3, 6, 11, 14, 17). In allen Ansätzen, in denen dimere (-)-PSTVd-RNA als RT-Template eingesetzt wurde, lieferte die im Anschluss an die Dynabeads-Aufreinigung durchgeführte PCR kein entsprechendes Signal (Spuren 4, 7, 12, 18). Auch in den Ansätzen ohne Primer ist kein Signal zu detektieren, was bedeutet das auch hier ein Signal auf Grund von Rückfaltung des RT-Templates ausgeschlossen werden kann. Darüber hinaus konnte hier gezeigt werden, dass die verwendeten Primer einen 1000-fachen Überschuss an „falschem“ Template tolerieren, d.h., die „richtige“ RNA auch in 1000-

fachem Unterschuss noch spezifisch detektiert werden kann. Das war speziell im Hinblick auf die späteren Untersuchungen im Kernextrakt essentiell, da auch hier davon ausgegangen werden musste, dass das entstandene *de-novo*-Produkt in deutlichem Unterschuss gegenüber dem Template vorliegt.

3.I.3 Nachweis von neu-entstandener (+)-PSTVd-RNA mit RT-PCR

Zur Detektion *de-novo*-entstandener (+)-PSTVd-RNA durch Transkription von dimerem (-)-PSTVd-Template wurden Kernextrakte nicht-infizierter Kartoffelzellkulturen als *in-vitro*-System verwendet. Die Transkriptionsreaktion, einschließlich der anschließenden RT-PCR-Analyse erfolgte weitestgehend nach dem Protokoll von Fels (Fels *et al.*, 2001). Der Unterschied war der Einsatz von Biotin-markierten Primern in der RT-Reaktion, sowie die daran anschließende Aufreinigung über Dynabeads (s. 2.12.2.2). Das so erhaltene reverse Transkript der *de-novo*-(+)-RNA wurde anschließend als Template in die PCR eingesetzt. Für den erfolgreichen Nachweis von neu-entstandener (+)-RNA gelten folgende Kriterien. In den Ansätzen mit (-)-PSTVd als exogenem Template sollte ein Signal zu detektieren sein, im Ansatz mit Pol II-Inhibitor α -Amanitin kein oder nur ein sehr schwaches, und im Ansatz ohne Template sollte keinerlei Signal auftreten. Folgende Templates wurden in die Reverse Transkription (RT) eingesetzt:

- alle Nukleinsäuren aus den Transkriptionsansätzen, mit RT-Primer
- 1 pg monomere (+)-RNA (713-, bzw. 715-IVT), ohne RT-Primer
- 1 pg monomere (+)-RNA (713-, bzw. 715-IVT), mit RT-Primer
- 1 ng dimere (-)-RNA (718-IVT), mit RT-Primer

Neben den eingesetzten Transkriptionsansätzen, die der Detektion von *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA dienten, wurden weitere Kontrollansätze betrachtet. Der Ansatz mit monomerer (+)-PSTVd-RNA ohne Primer diente dem Nachweis einer kontaminationsfreien Durchführung der RT und sollte kein Signal liefern. Der Ansatz mit (+)-monomerer RNA als Template inklusive RT-Primer diente als Positivkontrolle der RT-Reaktion. Hier sollte ein Signal detektierbar sein. Schließlich diente der Ansatz mit 1ng dimerer (-)-PSTVd-RNA als Template inklusive RT-Primer der Spezifitätskontrolle der Reversen Transkription und sollte kein Signal liefern, da die verwendeten Primer (+)-spezifisch sein sollten. Die im Anschluss durchgeführte PCR diente der Amplifizierung des Signals. Die erzielten Ergebnisse der RT-PCR-Analysen lieferten keine eindeutigen Signale (Daten nicht gezeigt). Entweder konnte kein Signal in den entsprechenden Ansätzen mit exogenem Template detektiert werden, oder es war zwar ein Signal zu sehen, jedoch trat dieses in demjenigen Transkriptionsansatz auf, der mit dem Pol II-Inhibitor (α -Amanitin) inkubiert worden war und kein Signal liefern sollte, da eine Transkription durch die Pol II unterdrückt sein sollte. Da aber eben in diesem Ansatz ein Signal auftrat, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die detektierten Signale auf unspezifische Primerbindung an endogene Nukleinsäuren zurückzuführen waren. Zusammenfassend konnte die Methode der RT-PCR als Nachweissystem für *de-novo*-(+)-RNA nicht verwendet werden, da die gewonnenen Daten zu widersprüchlich waren und eine eindeutige Aussage nicht zuließen.

3.I.4 Nachweis von *de-novo*(+)-PSTVd-RNA mit Primer-Extension-Analysen

3.I.4.1 Überprüfung der Primer-Extension-Analysen von *de-novo*(+)-PSTVd-RNA anhand synthetischer *in-vitro*-PSTVd-Transkripte

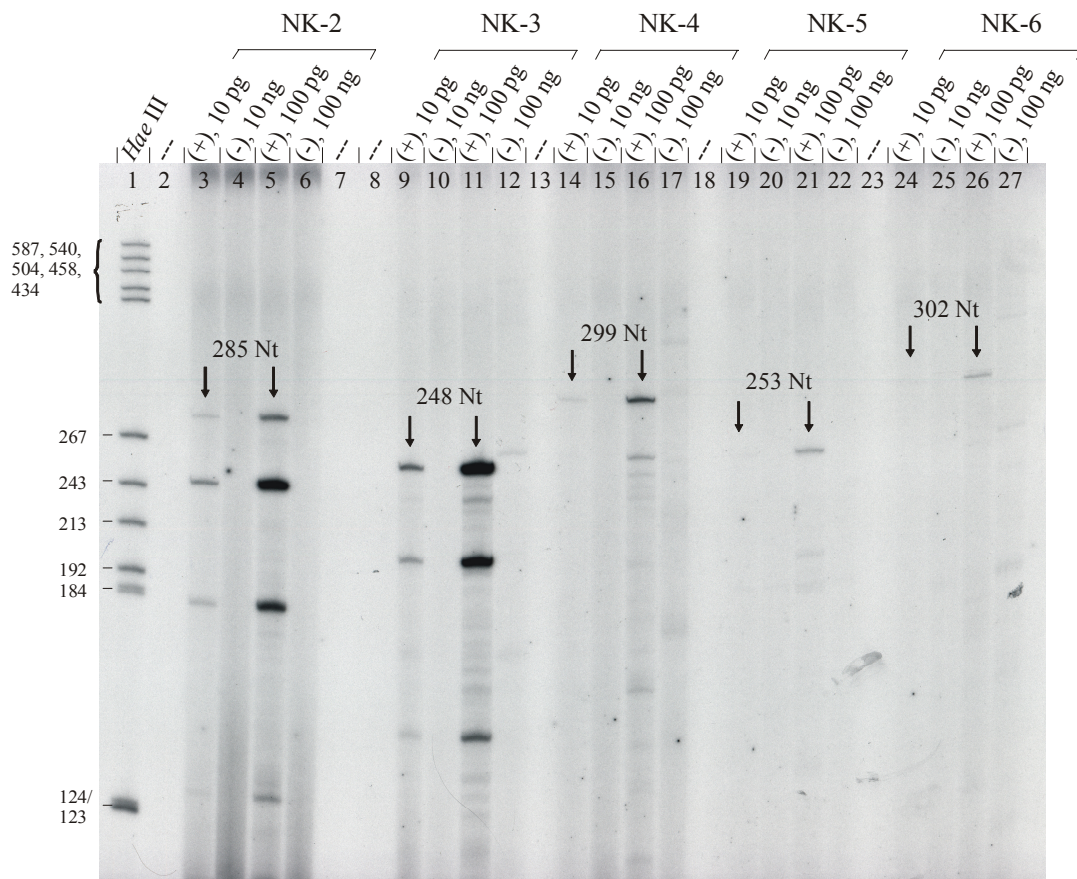


Abb. 3.I.7

Nachweis der (+)-Strang-Spezifität der Primer NK-2 bis NK-6 in der Primer-Extension-Reaktion.

Primer-Extension-Analyse bekannter Templates mit NK-2 bis NK-6. Alle betrachteten Primer wurden in der PE-Reaktion bei 75°C gegen ihr jeweiliges spezifisches Template hybridisiert. Entsprechend der Bindestellen der betrachteten Primer auf der Viroidsequenz wurden je 10 pg bzw. 100 pg entweder des monomeren (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkripts pRH 713 (*Alu* I-Klon) oder pRH 715 (*Hae* III-Klon) als Template eingesetzt. Als „falsches“ Template (an das die Primer nicht binden sollen) dienten 10 ng bzw. 100 pg eines dimeren PSTVd-*in-vitro*-Transkripts mit (-)-Polarität (pRH 718). Die Primer-Extension-Reaktion erfolgte unter Standardbedingungen; der gesamte PE-Ansatz wurde mit Ethanol gefällt und auf ein 6 % Polyacrylamid-Gel (30 %, 30:1, 1 x TBE, 8 M Harnstoff) aufgetragen. Abgebildet ist die entsprechende Autoradiographie: Spur 1: Längenstandard pBR 322, *Hae* III-restringiert; Spuren 3-6: PE mit NK-2; Spuren 9-12: PE mit NK-3; Spuren 14-17: PE mit NK-4; Spuren 19-22: PE mit NK-5; Spuren 24-27: PE mit NK-6; das jeweilige Template für die PE, sowie die eingesetzten Mengen sind an den Auftragstaschen angegeben; Exposition: 14 d bei -70°C, mit Verstärkerfolie. Alle Primer sind in der PE-Reaktion spezifisch für den Nachweis von PSTVd-(+)-RNA und tolerieren einen 1000-fachen Überschuss an „falschem“ Template, ohne diese zu detektieren.

Eine alternative Methode, neu-entstandene (+)-RNA im Kernextrakt nachzuweisen, war die direkte Primer-Extension-Analyse nach der Transkriptionsreaktion. Hierzu wurden die bisher als RT-Primer verwendeten Oligonukleotide (NK-2 bis NK-6) zunächst in einer Primer-Extension (PE) Reaktion getestet, in der monomere (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkripte, die mittels T7-Polymerase synthetisiert wurden, als Template verwendet wurden. Die PE wurde mit den Primern NK-2 bis NK-6 durchgeführt und erfolgte unter Standardbedingungen (s. 2.11.4). Die entsprechenden PE-Temperaturen sind der Legende von Abb. 3.I.7 zu entnehmen. Zur Kontrolle der Spezifität wurden ebenfalls dimere (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkripte als Template angeboten, die aber bei Spezifität der Primer nicht verlängert werden sollten. Eine erneute Kontrolle der Primerspezifität war notwendig, da die zuvor durchgeführten RT-Reaktionen und die im Folgenden zur Analyse eingesetzten Primer-Extension-Reaktionen sowohl von unterschiedlichen Enzymen katalysiert werden, als auch in unterschiedlichen Reaktionspuffern stattfinden, deren Einfluss auf die Primerbindung an ein potentiell falsches Template nicht eindeutig abgeschätzt werden kann. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.I.7 auf der vorherigen Seite dargestellt.

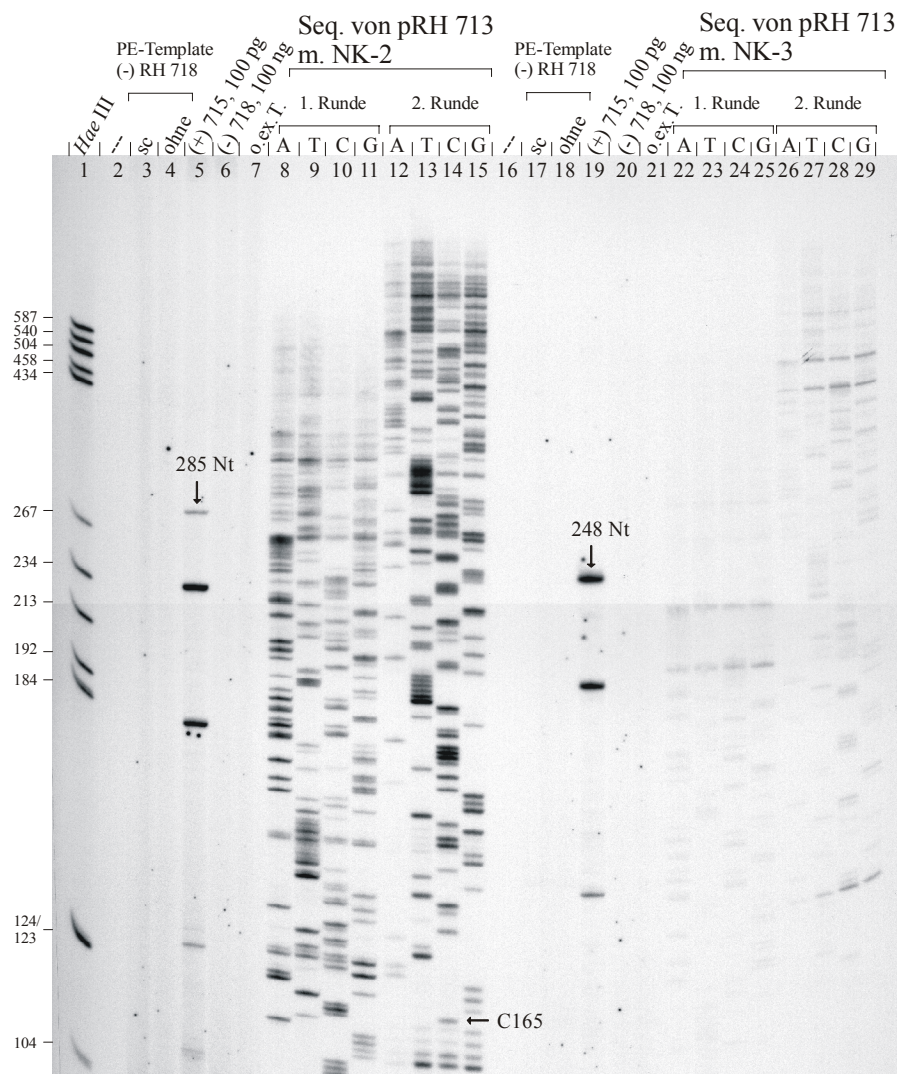
Es ist deutlich zu erkennen, dass mit allen betrachteten Primern in der PE-Reaktion ein Produkt zu detektieren ist, d.h. alle Primer binden unter den experimentellen Bedingungen an das Template und werden entsprechend verlängert. Der nebenan aufgetragene Längenstandard identifiziert die Fragmente als exakt die zu erwartenden Längen. Darüber hinaus zeigen alle Primer die erforderliche Spezifität, da in keinem der Ansätze mit (-)-PSTVd-RNA als Template ein entsprechendes Signal zu detektieren ist.

3.I.4.2 Primer-Extension-Analyse der *de-novo*(+)-PSTVd-RNA

Auf Grund der gezeigten (+)-Strang-Spezifität der Oligonukleotide wurden sie als Primer in die Primer-Extension-Reaktion eingesetzt. Zur Analyse von neu-entstandener (+)-PSTVd-RNA durch Transkription im Kernextrakt mit der Pol II wurden auch hier 3 verschiedene Transkriptionsansätze betrachtet.

- 1) Transkriptionsansatz mit dimerer (-)-PSTVd-RNA als exogenem Template
- 2) Transkriptionsansatz mit dimerer (-)-PSTVd-RNA als exogenem Template sowie 10^{-5} M α -Amanitin
- 3) Transkriptionsansatz ohne exogenes Template (bzw. mit Wasser).

Die Transkriptionsreaktion erfolgte wie unter 2.11.2 beschrieben. Zusätzlich wurde noch ein Ansatz durchgeführt, in welchem die exogene (-)-RNA vorher so inkubiert wurde, dass sich die als für die Transkription essentiell diskutierte Hairpin II-Struktur ausbilden sollte. Im Anschluss an die Transkription wurde die Nukleinsäure über Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt und mit Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde in 1 x TE-Puffer resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis gegen 1 x TE-Puffer dialysiert. Die Dialyse diente der Entfernung evtl. aus dem Transkriptionsansatz mitgefallener Salze, die später die Primerverlängerung negativ beeinflussen können. Die anschließende Primer-Extension wurde unter den 2.11.2 angegebenen Bedingungen durchgeführt, die Proben anschließend mit Ethanol gefällt und in einem Sequenzigel (s. 2.8.4) analysiert. Insgesamt wurden 5 x 4 Transkriptionsreaktionen durchgeführt (für die Analyse mit jedem der Primer NK-2 bis NK-6) und anschließend mittels Primer-Extension analysiert. Die Analyse mit allen (+)-spezifischen Primern war notwendig, da keinerlei Information bezüglich des 5' -Endes der neu-entstandenen (+)-PSTVd-RNA vorlag, aber der gesamte Bereich der *de-novo*(+)-RNA erfasst werden sollte. Als Kontrollen wurde sowohl monomeres (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript, als auch dimeres (-)-PSTVd-*in-*

**Abb. 3.I.8****Bestimmung des 5' -Endes der *de-novo*(+)-PSTVd-RNA.**

Primer-Extension-Analyse der *in-vitro*-Transkriptionsansätze. Als exogenes Template wurden 100 ng dimeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pRH 718-IVT) verwendet. Zum Teil wurde die exogene (-)-RNA struktureingestellt. Die Transkription erfolgte mit 10 µg Protein aus dem präparierten Kernextrakt einer nicht-infizierten Kartoffelzellkultur unter Standardbedingungen. Verwendete Primer in der Primer-Extension (PE): NK-2, T_{PE} : 75°C; NK-3, T_{PE} : 75°C. Aufgetragen wurde der gesamte Primer-Extension-Ansatz. Autoradiographie des dazugehörigen Sequenziergels (8 % PAA, 40 %, 19:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE). Spur 1: Längenstandard pBR 322, *Hae* III-restringiert; Spuren 3, 4; pRH 718-IVT als exogenes Template; sc: struktureingestellt (snap cooling); Spur 5: 100 pg monomeres (+)-PSTVd-*in vitro*-Transkript (pRH 715), als Positivkontrolle für die PE; Spur 6: 100 ng dimeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pRH 718), als Kontrolle für die Spezifität des Primers; Spur 7: Transkriptionsansatz ohne exogenes Template (Nullkontrolle); Spuren 8-15 . Sequenzierung: pRH 713 mit N-2; erstes lesbares Nukleotid: C 165. Spuren 17, 18: pRH 718-IVT als exogenes Template; sc: struktureingestellt (snap cooling); Spur 19: 100 pg monomeres (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pRH 715), als Positivkontrolle für die PE; Spur 20: 100 ng dimeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pRH 718), als Kontrolle für die Spezifität des Primers; Spur 21: Transkriptionsansatz ohne exogenes Template (Nullkontrolle); Spuren 22-29: Sequenzierung: pRH 713 mit N-3; Die PE-Analysen der Spuren 3-7 wurden mit ~1000000 cpm radioaktiv markiertem Primer N-2 durchgeführt - Die PE-Analysen der Spuren 17-21 wurden mit ~1000000 cpm radioaktiv markiertem Primer N-3 durchgeführt. In keinem der Ansätze mit dimerer (-)-PSTVd-RNA als exogenem zugegebenem Template konnte *de-novo*(+)-PSTVd-RNA detektiert werden (Spuren 3, 4, 17, 18). Ein generelles Versagen der Primer-Extension kann jedoch ausgeschlossen werden (Spuren 5, 19).

in vitro-Transkript parallel analysiert. Hiermit sollte nicht nur die Spezifität der Primer kontrolliert, sondern auch ein generelles Versagen der Methode ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse der Primer-Extension-Analysen ist in Abb. 3.I.8 dargestellt. Da alle Analysen das gleiche Ergebnis lieferten, wird hier stellvertretend nur die Primer-Extension-Analyse mit den beiden Primern NK-2 und NK-3 betrachtet.

In keiner der Analysen war ein spezifisches Signal im Ansatz mit (-)-PSTVd-RNA als exogenem Template zu detektieren (Spuren 3, 4, 17, 18). Ein generelles Versagen der Primer-Extension-Reaktion kann auf Grund der Positivkontrolle ausgeschlossen werden (Spuren 5, 19), was bedeutet, dass keine neu-synthetisierte (+)-PSTVd-RNA über die direkte Primer-Extension-Analyse nachzuweisen war. Somit war die direkte Analyse an neu-entstandener (+)-PSTVd-RNA mit der PE-Methode auch hier nicht geeignet. Im Folgenden wurde untersucht, ob ein genereller Nachweis an neu-entstandener (+)-RNA durch (+)-Strang-spezifische Northern-Blot-Analysen möglich ist.

3.I.5 Nachweis von *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA mittels Northern-Blot-Analysen

Zum Nachweis von neu-entstandener (+)-PSTVd-RNA nach Transkription im Kernextrakt wurden im Folgenden (+)-Strang-spezifische Northern-Blot-Analysen durchgeführt. Der Nachweis der *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA durch Northern-Blot-Analysen sollte klären, ob die bis hierhin erfolglosen Versuche des Nachweises an Transkriptionsprodukt daran lagen, dass entweder

- generell keine Transkription von (-) nach (+) im Kernextrakt stattfindet;
- die Menge an entstandenem Transkriptionsprodukt zu gering ist;
- die entstandenen Transkripte zu uneinheitlich sind,

so dass jede der bisher verwendeten Methoden unter die Nachweisgrenze rückt.

Der Vorteil der Northern-Blot-Analyse ist, dass alle neu-entstandenen Transkripte des Kernextraktes erfasst werden. Sowohl diejenigen Transkripte, die auf Grund von endogener RNase-Aktivität z.T. degradiert sind, als auch solche mit unterschiedlicher Länge. Dieses sind eben diejenigen Transkriptionsprodukte, die sowohl mit der Primer-Extension (PE) als auch mit der sensitiven RT-PCR nicht detektiert werden können, da die PE mit einer Nachweisgrenze von ca. 1-10 pmol nur dann ein Signal liefert, wenn diese 1-10 pmol alles Moleküle sind, die sowohl vollständig über die komplementäre Primersequenz verfügen, damit dieser binden kann, als auch über ein einheitliches 5' -Ende der Nukleinsäure. Verteilen sich die 1-10 pmol auf solche Moleküle, die auf Grund von Degradation z.B. nicht mehr alle über die Primerbindestelle verfügen, oder die auf Grund der Tatsache, dass die Pol II vielleicht auf dem (-)-PSTVd-Strang keine definierte Startstelle besitzt, kein einheitliches 5' -Ende aufweisen, rückt die Methode der PE unter ihre Nachweisgrenze und liefert kein Signal. Ähnlich verhält es sich bei der RT-PCR. Hier ist zwar die Nachweisgrenze im fmol-Bereich deutlich niedriger als bei der PE, aber auch hier können nur diejenigen Moleküle nachgewiesen werden, die zum einen die komplementäre Sequenz zu der des Primers (Primerbindestelle) aufweisen, als auch die, die lang genug sind, dass ihr reverses Transkript dann wiederum die Bindestelle für den PCR-Primer aufweist. Da die *de-novo*-Transkripte während der reversen Transkription lediglich bis zu ihrem 5' -Ende in cDNA umgewandelt werden, sind „zu kurze“ Transkripte kritisch. Wenn nämlich innerhalb der entstandenen cDNA noch nicht die Sequenz enthalten ist, die für die Bindung des PCR-Primers essentiell ist, bleibt das RT-Produkt unentdeckt, da die anschließende PCR kein Signal amplifizieren kann. Somit ist

die RT-PCR zwar eine sehr sensitive Methode, jedoch nur wenn die beiden genannten Kriterien erfüllt sind. Deswegen sollte im Folgenden der Northern-Blot als Nachweismethode verwendet werden, da er den Nachweis aller entstandenen *de-novo*-Transkripte erlaubt, unabhängig von ihrer Länge. Da eine geringe Menge an *de-novo*(+)-RNA zu erwarten war (s. auch 3.I.2), wurde die Templatmenge, die den Transkriptionsansätzen zugegeben wurde, variiert. Es wurden 100 ng, 500 ng, 1 µg, und 10 µg zugegeben. Als Nullkontrolle diente ein Ansatz ohne exogenes Template. Auf Grund der diskutierten Rolle des Hairpin II (HP II) als essentielles Erkennungsmerkmal für die Pol II wurde in einem Ansatz als exogenes Template ein *in-vitro*-Transkript verwendet, das durch Transkription eines Sty-PSTVd-Klons entsteht und für das in früheren Untersuchungen die Ausbildung des HP II nachgewiesen werden konnte. Bereits während der *in-vitro*-Transkription des Plasmids pSH 3 mit der T7-Polymerase tritt das Strukturmotiv HP II bevorzugt auf. Die Transkriptionsanalysen der dimeren (-)-PSTVd-RNA als exogenes Template im Kernextrakt erfolgte unter den – leicht variierten – Standardbedingungen (s. 3.I.6). Anschließend wurde die Nukleinsäure mittels Phenol/Chloroform aus dem Gesamtansatz extrahiert und mit Ethanol präzipitiert. Die Pellets wurden direkt in Auftragspuffer resuspendiert und auf ein 8 % Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Im Anschluss an die Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran wie unter 2.10.1 beschrieben. Die Detektion der eigentlichen „Ziel“-RNA, nämlich der *de-novo*(+)-PSTVd-RNA erfolgte durch Hybridisierung eines radioaktiven *in-vitro*-Transkripts mit

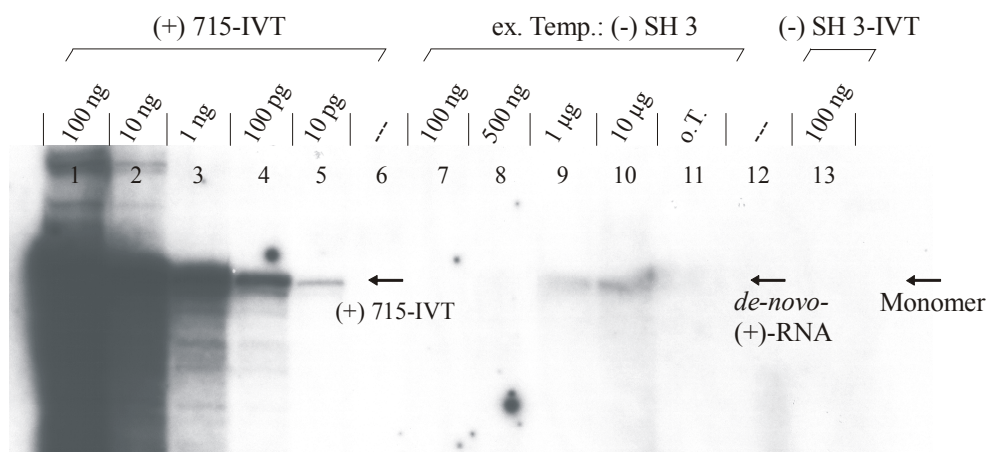


Abb. 3.I.9

Nachweis neu-entstandener (+)-PSTVd-RNA mit (+)-spezifischer Northern-Blot-Analyse.

Die Transkriptionsreaktion im Kernextrakt erfolgte mit 12,5 µg Protein aus dem präparierten Kernextrakt einer nicht infizierten Kartoffelzellkultur unter Standardbedingungen. Als exogenes Template wurden 100 ng, 500 ng, 1 µg, 10 µg dimeres (-)-PSTVd-Transkript (pSH 3) verwendet. Die Nukleinsäure wurde mit Phenol/Chloroform aus dem Transkriptionsansatz extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und auf ein 8 % Polyacrylamid-Gel (30 %, 30:1, 1 x TBE, 8 M Harnstoff) aufgetragen. Anschließend wurde die Nukleinsäure auf eine Nylonmembran transferiert. Der (+)-spezifische Nachweis erfolgte durch Hybridisierung von radioaktiv markierten *in-vitro*-Transkripten mit (-)-Polarität (pRH 716). Exposition: über Nacht bei -70°C mit Verstärkerfolie. Spuren 1-5: monomeres (+)-*in-vitro*-Transkript (368 Nt; Längenstandard und Spezifitätskontrolle; Konzentrationen sind an den Auftragstaschen angegeben); Spuren 7-10: Transkriptionsansätze mit steigender Konzentration an exogen zugegebenem Template (Konzentrationen sind an den Auftragstaschen angegeben); Spur 11: Transkriptionsansatz ohne exogenes Template (Nullkontrolle); Spur 13: 100 ng dimeres (-)-*in-vitro*-Transkript (731 Nt) als Spezifitätskontrolle für die Sonde.

(-)-Polarität (pRH 716-IVT). Dieses sollte entsprechend seiner Polarität spezifisch gegen PSTVd-RNA mit (+)-Sequenz hybridisieren. Anschließend wurden unspezifische gebundenen Sondenmoleküle von der Membran entfernt (s. 2.10.3) und die Membran gegen einen Röntgenfilm exponiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.I.9 dargestellt.

In Abb. 3.I.9 auf der vorherigen Seite ist zu erkennen, dass eine Erhöhung an (-)-PSTVd-RNA als exogenes Template eine Zunahme an *de-novo*(+)-PSTVd-RNA zur Folge hat (Spuren 7-10). Betrachtet man die eingesetzten Template-Konzentrationen, so fällt auf, dass erst bei einer Konzentration an exogenem (-)-Template von 1 µg der Nachweis von neu-entstandener RNA möglich ist. Eine weitere Erhöhung der Templatemenge auf 10 µg führt zu einer gesteigerten Transkriptaubeute (Spur 9), während in den Spuren mit 100 ng bzw. 500 ng kein Signal zu detektieren ist. Im Ansatz ohne zugesetztem Template ist erwartungsgemäß kein Signal zu detektieren, was den Nachweis einer endogenen, „nicht-PSTVd“-RNA ausschließt. Wären die detektierten Signale auf eine endogene Nukleinsäure des Kernextraktes zurückzuführen, müsste dieses Signal auch im Ansatz ohne exogenem Template auftreten. Da dies nicht der Fall ist, kann von spezifisch nachgewiesener PSTVd-RNA ausgegangen werden. Die Menge an entstandenem Transkript kann jedoch nicht genau angegeben werden, da der aufgetragene Standard (monomere (+)-RNA, Spuren 1-5) lediglich eine vorsichtige Abschätzung erlaubt, wonach bei einer eingesetzten Menge an exogenem Template von 1 µg etwa 1 pg *de-novo*(+)-RNA entstünde. Hierbei handelt es sich jedoch nur um eine Schätzung, die nicht durch Quantifizierungen belegt ist. Dass es sich in der Tat um *de-novo*(+)-PSTVd-RNA handelt und nicht um nachgewiesenes (-)-RNA-Template, lässt sich mit der Länge des nachgewiesenen Fragmentes belegen. Da als Template dimere (-)-PSTVd-RNA eingesetzt wurde, das Signal aber auf Höhe eines Monomers erscheint (vgl. mit den Spuren 1-5: monomere (+)-RNA), kann es sich nicht um das eingesetzte Ausgangstemplate handeln. Eine denkbare Degradation des Templates auf exakte Monomerlänge erscheint nicht wahrscheinlich. Zusätzlich zeigte die entsprechende Kontrolle mit 100 ng (-)-PSTVd-RNA ebenfalls kein Signal. Vergleicht man die 100 ng (-)-RNA, die kein Signal liefert (Spur 12), mit den 10 pg (+)-RNA, die ein deutliches Signal liefern, zeigt das eine SONDENSPEZIFITÄT von einem Faktor von 10000. Es konnte also durch Erhöhung der Templatekonzentration von 100 ng auf 1 µg bzw. 10 µg (Faktor 10, bzw. 100) mittels Northern-Blot-Analyse *de-novo*(+)-PSTVd-RNA nachgewiesen werden.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit galt der erste Schritt der PSTVd-Replikation, nämlich die Transkription ausgehend von (+) nach (-) als gelöst. In diesem Zusammenhang galten zwei Nukleotide als Startstellen, an denen die Polymerase II mit der Transkription des zirkulären (+)-PSTVds beginnt. Im Verlauf der Experimente zur Bestimmung der Transkriptions-Initiationsstellen auf dem PSTVd(-)-Strang, bei denen auch immer wieder parallel Kontrollen mit (+)-cPSTVd als Transkriptionstemplate durchgeführt wurden, relativierte sich die Interpretation der beiden ursprünglich als Startstellen gedeuteten Nukleotide. So wurde der Schwerpunkt der Arbeit erneut auf die Untersuchung des ersten PSTVd-Replikationsschrittes – der Transkription von (+) nach (-) – gelegt.

3.II Überprüfung der bisherigen Hypothese zur Transkription von cPSTVd (+) zu (-)-PSTVd-RNA

Ursprüngliches Ziel dieser Arbeit sollte die Analyse der Startstelle(n) der PSTVd-Replikation auf dem (-)-Strang sein. Die experimentellen Grundlagen waren in einer früheren Arbeit (Fels, 1997) geschaffen worden, in der wohl definierte Startstellen auf dem (+)-Strang des cPSTVd, d.h. bei A111 und A325 bestimmt wurden. Der Nachweis der beiden Startstellen –

A111 und A325 – sollte reproduziert und als experimentelle Grundlage für den Nachweis der Startstelle(n) auf dem linearen (-)-Strang dienen. Im Zuge der Reproduktion ergab eine zusätzlich durchgeführte Kontrolle Anlass zum Zweifel, ob es sich bei den damals detektierten Signalen tatsächlich um nachgewiesene *de-novo*-Viroid-RNA handelte. Vielmehr trat das entsprechende Signal auch in den Kontroll-Ansätzen auf, die zu keiner Zeit mit PSTVd in Kontakt gekommen waren. Es handelte sich also um ein Signal, das offensichtlich unabhängig von einer Inkubation mit PSTVd auftrat und somit nicht die Initiationsstelle der Transkription repräsentieren konnte. Vielmehr beruhte das irreführende Signal auf einer unspezifischen Wechselwirkung mit einer Nukleinsäure des verwendeten *in-vitro*-Transkriptionssystems. Um unspezifische Wechselwirkungen für zukünftige Experimente ausschließen zu können, musste ein System etabliert werden, das ein PSTVd-abhängiges Signal von einem solchen, das auf Grund einer anderen, nicht näher identifizierten endogenen Nukleinsäure des verwendeten Kernextraktes beruhte, diskriminieren kann.

Die Anforderungen an das zu etablierende Aufreinigungsverfahren waren sowohl ein hohes Maß an Spezifität, als auch den Verlust während der Aufreinigung so minimal wie möglich zu halten. Im Folgenden wird eine Aufreinigungsmethode vorgestellt, die es erlaubt, spezifisch neu-entstandene PSTVd-RNA zu isolieren und sie weiteren molekularbiologischen Untersuchungen zugänglich zu machen. Aufbauend auf dieser Methode wird eine neue potentielle Startstelle für die Polymerase II auf dem zirkulären PSTVd vorgestellt.

3.II.1 Nachweis eines PSTVd-unabhängigen Signals in der Primer-Extension-Reaktion

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Startstelle(n) auf dem linearen (-)-Strang von PSTVd nachgewiesen werden. Parallel zur Analyse der *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA, die als Produkt der Transkription von (-) nach (+) entsteht, sollte der Nachweis der beiden Startstellen auf dem zirkulären (+)-Strang, A111 und A325 (Fels, 1997), reproduziert werden. Auch zur Analyse dieses Transkriptionsschrittes wurden Kernextrakte nicht-infizierter Kartoffelzellkulturen als *in-vitro*-Transkriptionssystem verwendet. Hier sollte nun die aktive Pol II ausgehend von einem exogen zugesetzten cPSTVd-Template *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA synthetisieren. Anschließend wurde das 5'-Ende der neu-entstandenen (-)-RNA mittels Primer-Extension-Analyse untersucht. Das 5'-Ende der untersuchten RNA entspräche dann der Startstelle auf dem Matrizenstrang, also auf dem zirkulären PSTVd. Um die Abhängigkeit des Signals von der Pol II-Aktivität zu zeigen wurde – entsprechend den Ansätzen von Fels (1997) – sowohl ein Ansatz mit cPSTVd als exogenem Template, als auch ein Ansatz mit cPSTVd als exogenem Template und α -Amanitin (einem spezifischen Pol II-Inhibitor) untersucht, sowie ein Ansatz komplett ohne cPSTVd. Auf die Kontrolle vollständig ohne cPSTVd als exogenes Template war in der vorausgegangenen Arbeit unglücklicherweise verzichtet worden. Die Gründe hierfür werden in der Diskussion ausführlich besprochen. Um einen schnelleren Nachweis des radioaktiven Signals auf der Exposition zu erreichen, wurde auf eine Verdünnung der Proben vor der Primer-Extension-Reaktion (Fels, 1997) verzichtet. Abbildung 3.II.1 zeigt das Ergebnis der Primer-Extension-Analyse.

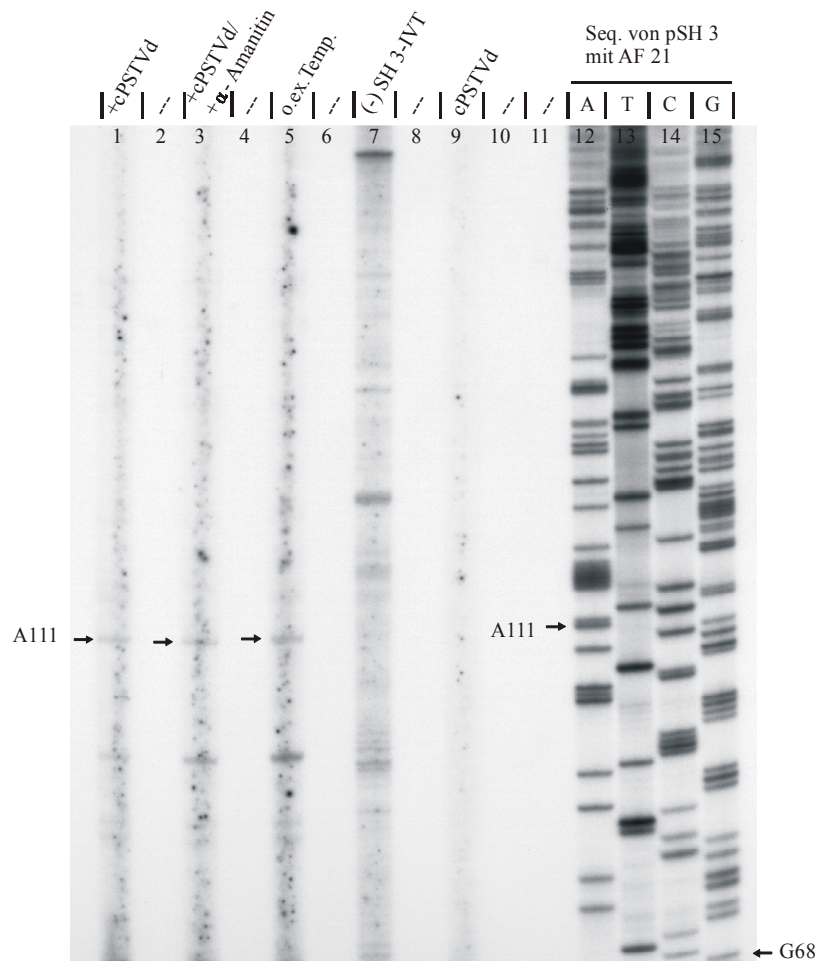


Abb. 3.II.1

Versuch der Reproduktion der Bestimmung des 5' -Endes der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA bei Nukleotid A 111.

Primer-Extension (PE)-Analyse des *in-vitro*-Transkriptionsansatzes nach Aufreinigung der Nukleinsäure über Phenol/Chloroform-Extraktion. Die Transkription erfolgte mit 10 µg Protein aus dem präparierten Kernextrakt einer nicht-infizierten Kartoffelzellkultur unter Standardbedingungen. In der PE verwendeter Primer: AF21, T_{PE} : 53°C. Aufgetragen wurde der gesamte Primer-Extension-Ansatz. Autoradiographie des entsprechenden Sequenziergels (8 % PAA, 40 %, 19:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE). Spuren 1, 3, 5: Analyse nach Transkription von cPSTVd im Kernextrakt; ex.Temp. = exogenes Template Spur 7: 100 pg dimeres (-)-PSTVd *in-vitro*-Transkript (pSH 3) als Positivkontrolle für die PE; Spur 9: 100 pg cPSTVd als Negativkontrolle für die Spezifität des Primers; Spuren 12-15: Sequenzierung: pSH 3 mit AF21; erstes lesbares Nukleotid: G 68. Exposition: 3 d bei -70°C, mit Verstärkerfolie. In allen Ansätzen (Spuren 1, 3, 5) ist ein Signal bei „A 111“ zu detektieren.

In allen Ansätzen ist ein Signal zu sehen, das auf Grund der nebenan aufgetragenen Sequenzierung als Nukleotid A 111 identifiziert werden konnte. Dieses Signal trat erwartungsgemäß im Ansatz mit cPSTVd/ ohne α -Amanitin auf. Entgegen der Erwartungen trat dasselbe Signal ebenfalls in dem Ansatz auf, der mit cPSTVd und α -Amanitin inkubiert worden war und somit kein oder nur ein schwaches Transkriptionssignal liefern sollte. Auch im Kontrollansatz ohne exogenes Template trat ein A111-entsprechendes Signal auf. Dieses Signal war von besonderer Relevanz, da es einen Hinweis darauf lieferte, dass die damals

detektierte „Startstelle A 111“ möglicherweise ein Irrtum war auf Grund eines Signals, das eher vom Kernextrakt herrührte als von neu-entstandener (-)-PSTVd-RNA.

3.II.2 Verifizierung des Signals mit verschiedenen Kernextrakten

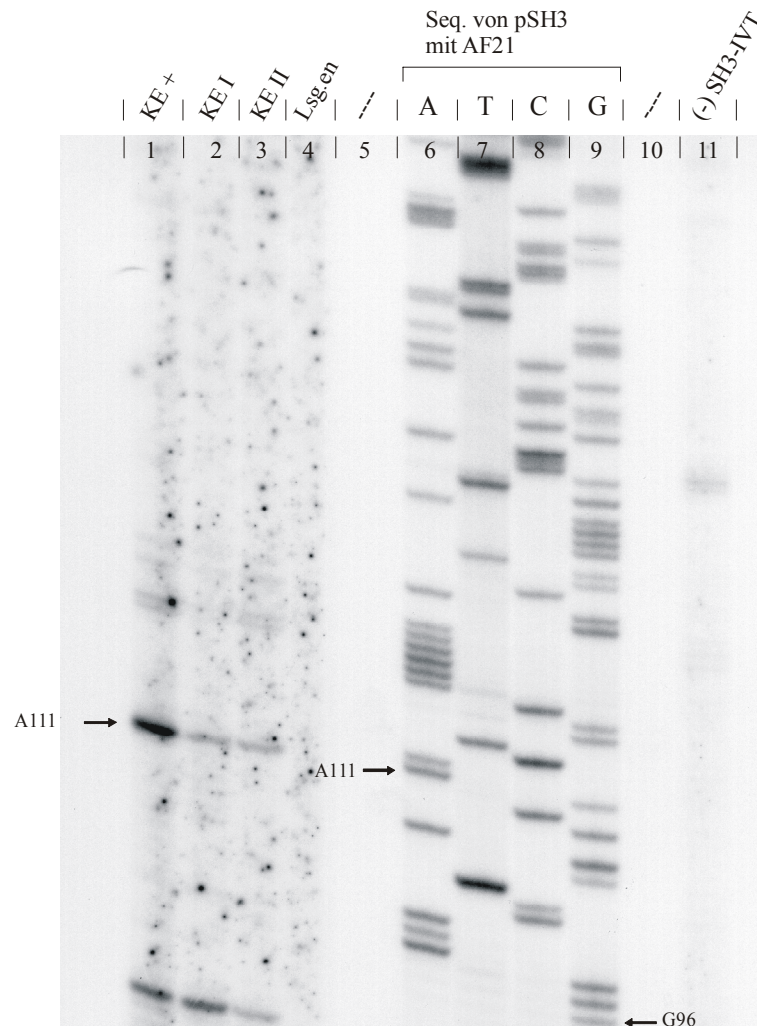


Abb. 3.II.2

Analyse der Spezifität des Signals A 111 und Kontaminationskontrolle der verwendeten Lösungen.

Primer-Extension-Analyse des *in-vitro*-Transkriptionsansatzes nach Aufreinigung der Nukleinsäure über Phenol/Chloroform-Extraktion. Die Transkription erfolgte mit 10 µg Protein dreier unabhängig voneinander präparierter Kernextrakte einer nicht-infizierten Kartoffelzellkultur unter Standardbedingungen. In der PE verwendeter Primer: AF21, T_{PE} : 53°C. Aufgetragen wurde der gesamte Primer-Extension-Ansatz. Autoradiographie des entsprechenden Sequenziergels (8 % PAA, 40 %, 19:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE); Spuren 1-3: Analyse nach Transkription von cPSTVd in verschiedenen Kernextrakten; Spur 4: PE-Analyse der reinen verwendeten Lösungen (Kontaminationskontrolle); Spuren 6-9: Sequenzierung: pSH 3 mit AF21; erstes lesbares Nukleotid: G 96. Spur 11: 100 pg dimeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pSH 3) als Positivkontrolle für die PE; Exposition: 3 d bei -70°C, mit Verstärkerfolie. In allen Ansätzen (Spuren 1-3) ist ein Signal bei „A 111“ zu detektieren; keine Kontamination der Lösungen (Spur 4).

Um zu überprüfen, ob das Signal in der Nullkontrolle tatsächlich ein „echtes“ Signal ist, oder möglicherweise eine Kontamination des Zellkernextraktes, oder einer der verwendeten Lösungen mit PSTVd, wurde das Experiment mit frisch angesetzten Lösungen und drei voneinander unabhängig präparierten Kernextrakten wiederholt. Auf die Kontrolle der Pol II-Abhängigkeit des Signals konnte hierbei verzichtet werden, da im Wesentlichen im Vordergrund stand, ob das Signal tatsächlich in einem Reaktionsansatz auftrat, der nicht mit cPSTVd inkubiert worden war. In diesem Fall würde es sich nicht um ein viroidspezifisches Signal – also nicht um das 5' -Ende einer neu-entstandenen (-)-PSTVd-RNA – sondern um ein unspezifisches Signal handeln.

Abbildung 3.II.2 auf der vorherigen Seite zeigt das Ergebnis des Kontrollexperiments. Auch hier tritt in allen Spuren, ausgenommen Spur 4, ein entsprechendes Signal auf, das laut nebenan aufgetragener Sequenzierung als „A 111“ identifiziert werden konnte. Da eine gleichmäßige Kontamination aller präparierten Kernextrakte mit PSTVd unwahrscheinlich ist und eine separat durchgeführte Kontrolle eine generelle Kontamination der Zellkultur ausschließen konnte (Daten nicht gezeigt), ist es sehr wahrscheinlich, dass das beobachtete Primer-Extension-Signal keine viroidspezifische Abbruchbande repräsentiert, sondern es sich in der Tat um ein Signal handeln muss, welches der Kernextrakt selbst – unabhängig von der Transkription von cPSTVd – liefert. Spur 4 bestätigt diese Vermutung, da hier ein entsprechendes Signal fehlt, und somit eine Kontamination der verwendeten Lösungen ausgeschlossen werden konnte.

Eine direkte Sequenzierung derjenigen Nukleinsäure, die das „falsche A 111“-Signal liefert, blieb erfolglos (Daten nicht gezeigt).

3.II.3 Versuch der Detektion von „A 111“ mit unabhängigen Primern

Die in der vorausgegangenen Arbeit durchgeführten Primer-Extension-Analysen wurden ausschließlich mit einem Primer (AF21) durchgeführt, der in einem Abstand von 111 Nukleotiden von der angeblichen Startstelle bindet. Um zu überprüfen, ob das nachgewiesene Signal bei Nukleotid A 111 ein viroidspezifisches Signal ist, wurden die Primer-Extension-Experimente mit anderen Primern – AF16 und AF17 – wiederholt, die auf Grund der Sequenz und Position komplementär zum cPSTVd das identische Signal liefern sollten. Die Positionen der betrachteten Primer sind in Abbildung 3.II.3 dargestellt.

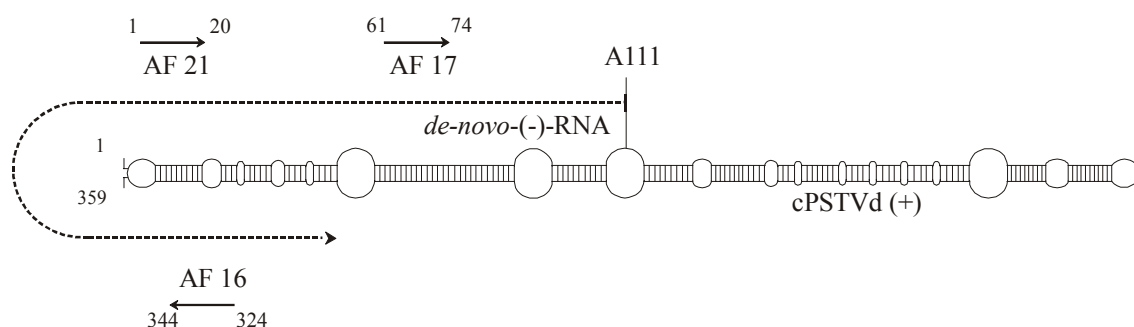


Abb. 3.II.3

Position der betrachteten PE-Primer AF16, AF17 und AF21, die zum Nachweis *de-novo*-synthetisierter (-)-PSTVd-RNA verwendet wurden.

Die Primer sind gegen (-)-Polarität, haben also selber (+)-PSTVd-Sequenz. Ihre Nukleotidangaben beziehen sich auf das cPSTVd-Molekül.

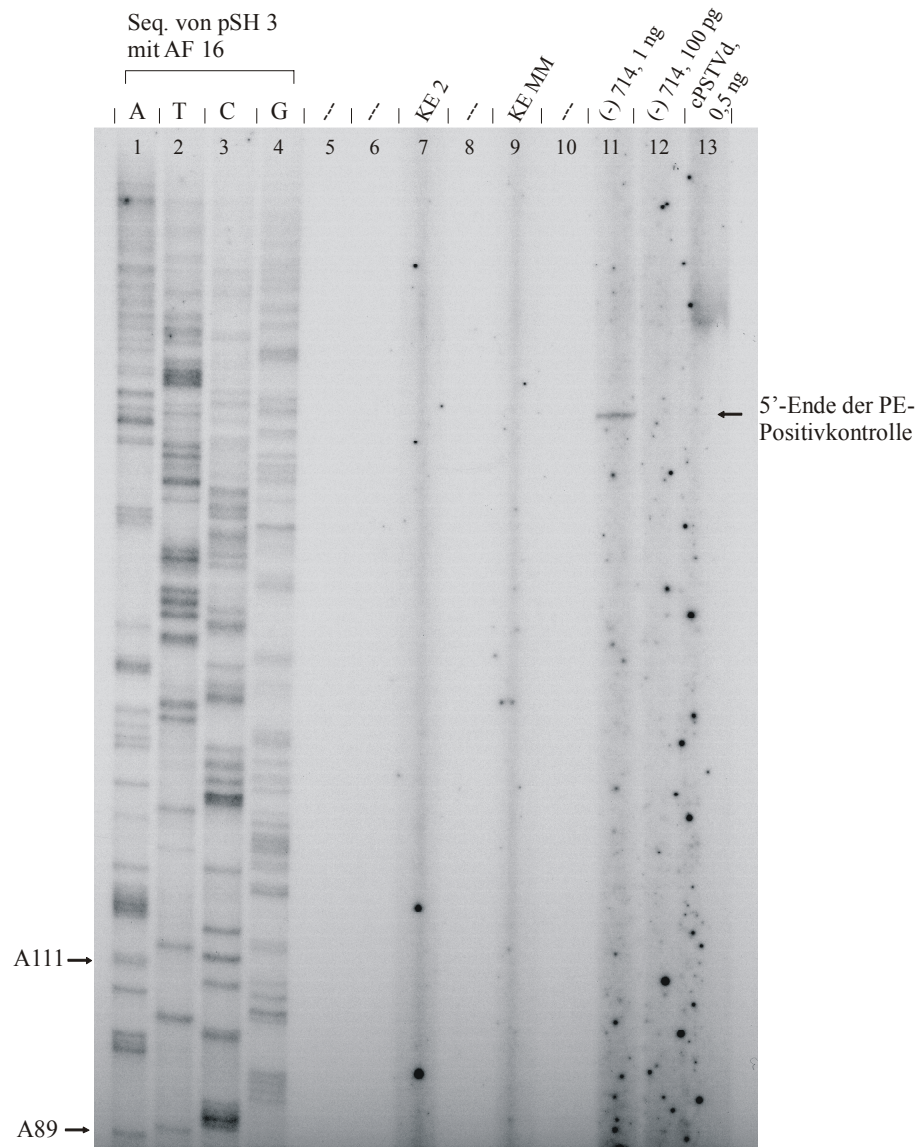


Abb. 3.II.4

Analyse des Signals A 111 mit einem zweiten, unabhängigen Primer (AF16) in zwei verschiedenen, voneinander unabhängig präparierten Kernextrakten.

Primer-Extension-Analyse des *in-vitro*-Transkriptionsansatzes nach Aufreinigung der Nukleinsäure über Phenol/Chloroform-Extraktion. Die Transkription erfolgte mit 12 µg Protein der zwei präparierten Kernextrakte einer nicht-infizierten Kartoffelzellkultur unter Standardbedingungen. In der PE verwendeter Primer: AF16, T_{PE} : 53°C. Aufgetragen wurde der gesamte Primer-Extension-Ansatz. Autoradiographie des entsprechenden Sequenziergels (8 % PAA, 40 %, 19:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE); Spuren 1-4: Sequenzierung: pSH 3 mit AF16; erstes lesbares Nukleotid: A 89. Spuren 7, 9: Analyse nach Transkription von cPSTVd in den beiden verschiedenen Kernextrakten; Spuren 11, 12: 1 ng bzw. 100 pg monomeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pRH 714) als Positivkontrolle für die PE; Spur 13: 0,5 ng cPSTVd als Negativkontrolle für die Spezifität des Primers; Exposition: über Nacht bei -70°C, mit Verstärkerfolie. In keinem der Transkriptionsansätze (Spuren 7, 9) ist ein Signal bei A 111 zu detektieren.

In den anschließenden Primer-Extension-Reaktionen sollten sowohl mit Primer AF16 als auch mit AF17 ebenfalls das Signal der A 111 detektierbar sein, wenn es sich um ein viroidspezifisches Signal handelt. Zunächst wurden separat für jeden Primer zwei *in-vitro*-

Transkriptionen im Kernextrakt mit jeweils 100 ng cPSTVd als exogenem Template durchgeführt. Zur Sicherheit wurden zwei verschiedene, voneinander unabhängig präparierte Kernextrakte verwendet. Die im Anschluss durchgeführte Bestimmung des 5' -Endes einer potentiellen neu-entstandenen PSTVd(-)-RNA mittels Primer-Extension lieferte für Primer AF16 das in Abbildung 3.II.4 auf der vorigen Seite dargestellte Ergebnis, mit Primer AF17 wurde ein entsprechendes Ergebnis erzielt.

In keinem der *in-vitro*-Transkriptionsansätze konnte *de-novo*-PSTVd-RNA nachgewiesen werden. Selbst nach 14 d Expositionszeit war kein Signal auf Höhe von A 111 nachzuweisen. Ein generelles Versagen der Primer-Extension-Reaktion konnte jedoch auf Grund der Positivkontrolle (Spur 11 und 12) ausgeschlossen werden.

3.II.4 Überprüfung von „A 111“ mit unabhängigen Primern in verschiedenen Kernextrakten

Zur Verifizierung der gewonnenen Ergebnisse wurden weitere Primer-Extension-Analysen mit insgesamt vier verschiedenen Kernextrakten und drei verschiedenen Primern (AF21, AF16, AF17) durchgeführt, die alle ein identisches Ergebnis lieferten, nämlich, dass das detektierte Signal bei A 111 unabhängig von der PSTVd-Transkription auftritt und sich mit keinem weiteren viroidspezifischen Primer außer AF21 nachweisen lässt (Daten nicht gezeigt). Dies war der endgültige Beweis dafür, dass das Nukleotid A 111 nicht als Startstelle angesehen werden kann, und es sich bei Fels um eine Fehlinterpretation handelt.

3.III Bestimmung der Startstelle(n) auf cPSTVd nach Aufreinigung der (-)-Transkripte

Etablierung eines Aufreinigungsverfahrens

Im Zusammenhang mit der Fehlinterpretation des Signals „A111“ durch Fels wurde der Schwerpunkt dieser Arbeit zunächst auf die Etablierung eines Aufreinigungsverfahrens gelegt, das es ermöglicht, Kernextrakt-eigene (endogene) Nukleinsäuren von *de-novo*-entstandener Viroid-RNA zu trennen. Eine unspezifische Bindung des Primers während der Primer-Extension-Reaktion wäre somit nicht mehr möglich und die Detektion eines „falschen“ Signals ausgeschlossen. In Anlehnung an die Arbeit von Aschermann (2001) bot sich ein Affinitätschromatographisches Verfahren an, das die Separation von Nukleinsäuren über die Bindung an Biotin-markierte Moleküle und anschließende Immobilisierung über paramagnetische Streptavidinpartikel erlaubt (s. Abb. 3.III.5). So kann die „Ziel“-Nukleinsäure aus einem Gesamtansatz isoliert werden und in späteren molekularbiologischen Untersuchungen als reines Template ohne fremde Nukleinsäuren eingesetzt werden.

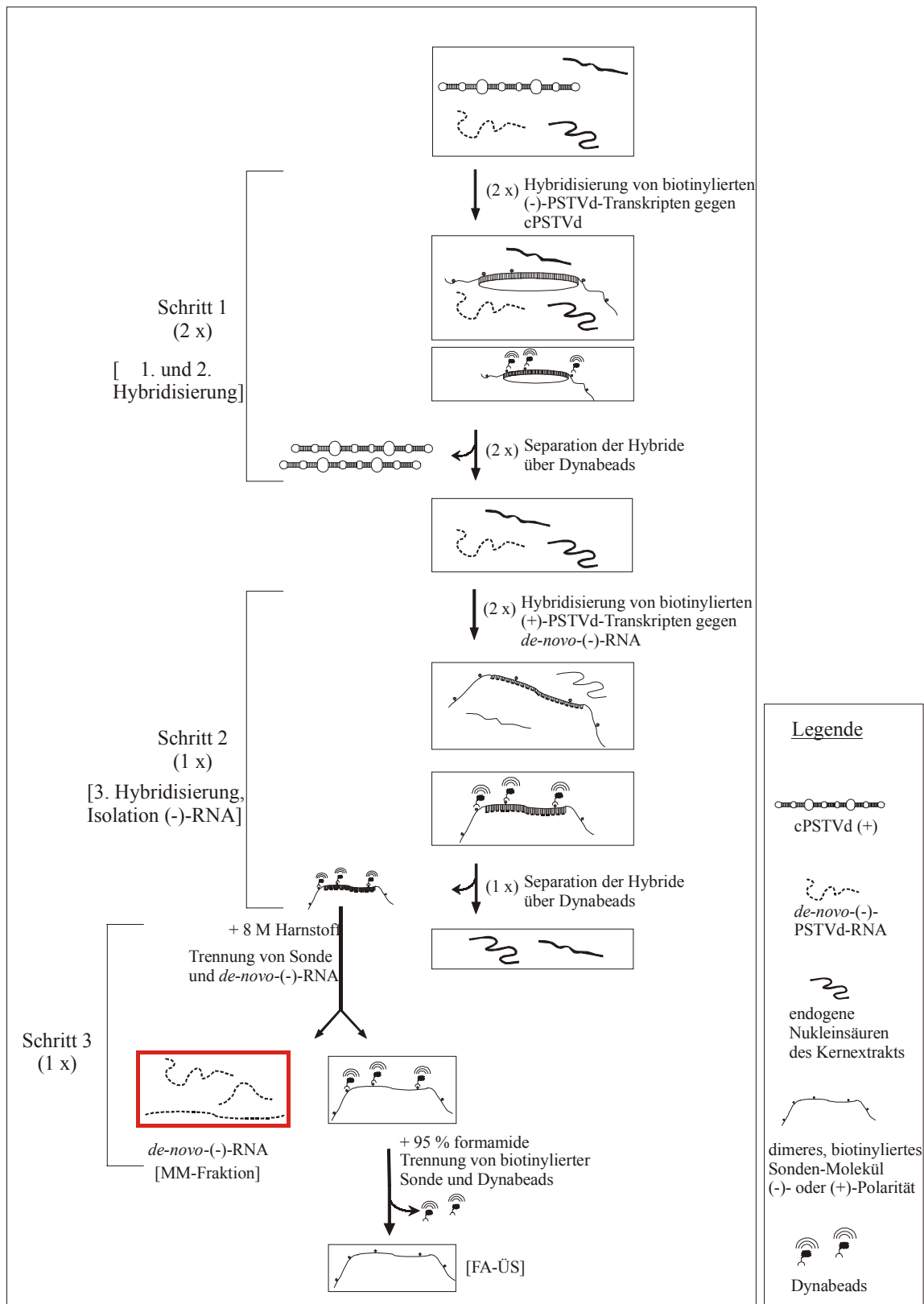


Abb. 3.III.5
Schematische Darstellung der Isolation von *de-novo*(-)-PSTVd-RNA nach Transkription im Kernextrakt.
 Die einzelnen Schritte der Aufreinigung sind im Text erläutert.

Die Aufreinigung gliederte sich in drei Schritte, von denen der erste der Entfernung des Transkriptionstemplates (cPSTVd) diente. Der zweite Schritt diente der Separation eventuell verbliebener Zirkel, sowie endogener Nukleinsäuren des Kernextraktes. Im dritten Schritt der Aufreinigung wurde schließlich *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA isoliert, die nun als ausschließliches Produkt in weiterführenden molekularbiologischen Experimenten untersucht werden konnte. Die zur Etablierung des Aufreinigungsprotokolls erforderlichen Kontroll- und Optimierungsschritte sind in den folgenden Kapiteln erläutert.

Zunächst wurde in Vorversuchen kontrolliert, ob eine generelle Bindung von Biotin-markierten Sondenmolekülen an die entsprechend komplementäre Nukleinsäuresequenz möglich war (Schritt 1, bzw. 2). Hierzu wurden monomere *in-vitro*-Transkripte mit (+)-Polarität, die mit Hilfe der T7-Polymerase synthetisiert wurden, als „zu fischendes“ Substrat verwendet. Als Sonde wurden biotinylierte, dimere *in-vitro*-Transkripte mit (-)-Polarität eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte durch Erhitzen des Reaktionsansatzes und anschließendes Abkühlen (s. 2.12.3). Durch diese Hybridisierung sollten alle möglichen Sekundärstrukturen der beteiligten Nukleinsäuren aufgehoben werden und eine optimale Hybridisierung der komplementären Sequenzbereiche gewährleistet sein. Die Aufreinigung der Hybride erfolgte über paramagnetische Streptavidinpartikel (Dynabeads), indem die Hybride mit den Dynabeads für einen geeigneten Zeitraum inkubiert wurden (s. 2.12.2.1). Anschließend erfolgten mehrere Waschschrte, die zur Entfernung unspezifisch gebundener

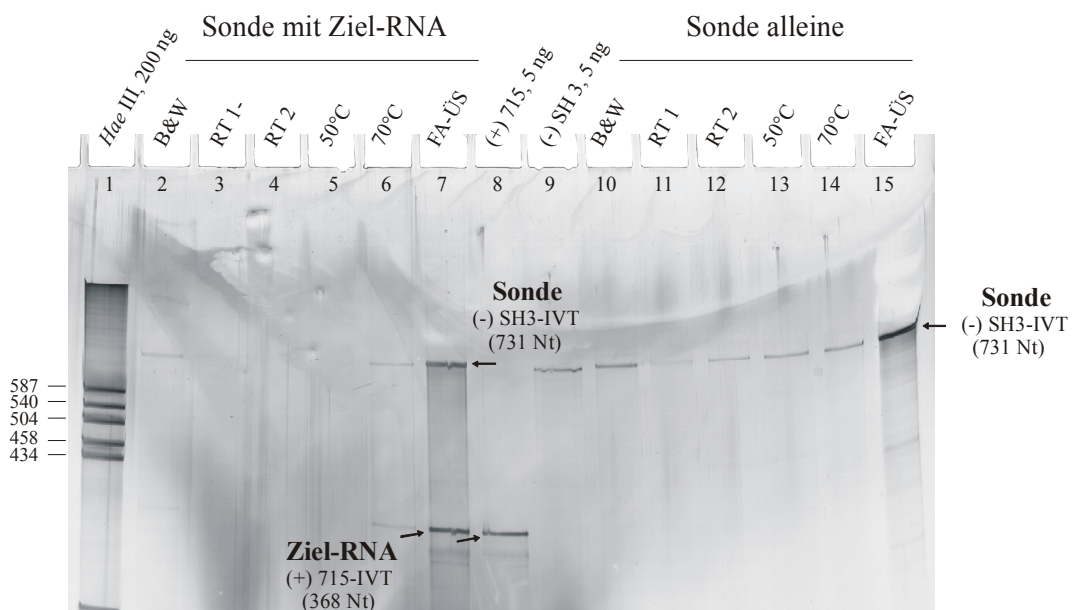


Abb. 3.III.6

Dynabeads-Aufreinigung von *in-vitro*-Transkripten.

50 ng monomeres (+)-PSTVd-Transkript (pRH 715) wurde an 50 ng Biotin-markierte, dimere (-)-PSTVd-Sonde (pSH 3) hybridisiert und über 33 µg Dynabeads aufgereinigt. Die Überstände der einzelnen Waschschrte (Elutionstemperaturen sind an den Auftragstaschen angegeben) wurden präzipitiert, auf ein 4 % Polyacrylamid-Gel (30 %, 30:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE) aufgetragen, und das Gel anschließend mit Silber gefärbt. B&W: Binde- und Waschpuffer; RT: Raumtemperatur; RT1, RT2, 50 °C, 70 °C: Waschschrte bei den angegebenen Temperaturen. FA-ÜS: Überstand nach Elution mit Formamid; Spur 1: Längenstandard pBR 322, *Hae* III-restringiert – Spuren 2-7 und 10-15: Einzelne Fraktionen der Dynabeads-Aufreinigung – Spur 8: monomeres (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (Längenstandard, 368 Nt) - Spur 9: dimeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (Längenstandard, 731Nt).

Nukleinsäuren an die biotinylierte Sonde dienten (s. Abb. 2.1). Das Waschen erfolgte, soweit nicht anders erwähnt, mit 0,1 x SSC bei Raumtemperatur bzw. 50°C-70°C (s. 2.12.2.1). Im letzten Schritt wurde die Sonde durch Zugabe von Formamid bei 75°C von den Dynabeads eluiert, da Formamid zur Auflösung der Biotin-Streptavidin-Bindung führt. Die Nukleinsäure der einzelnen Fraktionen der Wasch- bzw. Elutionsschritte wurde mit Ethanol gefällt und in einem Polyacrylamid-Gel analysiert (s. Abb. 3.III.6, vorige Seite).

Wie in Abb. 3.III.6 dargestellt war sowohl die Hybridisierung der biotinylierten Sonde mit der „Ziel“-Nukleinsäure der komplementären Sequenz, als auch die Bindung an die Streptavidinpartikel (Dynabeads) erfolgreich. In den Spuren 1-4 ist kein Signal zu erkennen. Das heißt, in diesen Fraktionen ist keinerlei Ziel-Nukleinsäure eluiert worden. Lediglich in Spur 6 bei einer Waschtemperatur von 70°C ist eine geringe Menge an Nukleinsäure nachweisbar. Der Hauptanteil jedoch ist wie erwartet in Spur 7 zu sehen, wo die Zugabe von Formamid-Lösung eine Zerstörung der Biotin-Streptavidin-Bindung bewirkt und somit die Sonde von den Streptavidin-Partikeln gelöst wird. Darüber hinaus werden ebenfalls die Basenpaare zwischen der Sonde und der gebundenen „Ziel“-RNA gelöst, so dass im Silbergel zwei Signale zu detektieren sind, zum einen die biotinylierte Sonde mit einer Länge von 731 Nt und zum anderen die „Ziel“-RNA mit einer Länge von 368 Nt. Es war somit erwiesen, dass die Aufreinigung nicht nur prinzipiell, sondern vor allem auch ohne nennenswerte Verluste während der anschließenden Waschschrte erfolgreich ist. Eine Trennung von Sonde und Ziel-RNA wurde hier allerdings nicht erreicht. Die Spuren in der rechten Gelhälfte spiegeln lediglich einen zusätzlichen Kontrollansatz wider, in dem nur die biotinylierte Sonde über Dynabeads gefischt wurde, ohne jedoch vorher an ein Substrat gebunden zu haben.

3.III.1 Elution der „Ziel“-RNA von der Biotin-Sonde

Wie gezeigt, konnte unter den gewählten experimentellen Bedingungen die „Ziel“-RNA an eine biotinylierte Sonde gebunden und über Dynabeads isoliert („gefischt“) werden. Für die nachfolgenden Untersuchungen von potentiell neu-entstandener PSTVd-RNA nach Transkription mit dem Kernextrakt würde es allerdings nicht ausreichen, die isolierte „Ziel“-RNA an die Sonde gebunden aus dem Nukleinsäuregemisch zu separieren, sondern die betreffende RNA muss von der Sonde getrennt werden, um sie späteren Primer-Extension-Analysen als einziges Ausgangsprodukt zugänglich zu machen. Die Anwesenheit der Biotin-Sonde bei Primer-Extension-Analysen könnte auf Grund der extrem hohen Selbstkomplementarität des PSTVd ein „falsches“ Signal liefern. Darüber hinaus könnte sie die Bindung des Primers durch konkurrierende Bindung an die Template-RNA negativ beeinflussen und sollte deswegen generell vorher entfernt werden. Es wurde also nach Bedingungen gesucht, unter denen die gebundene RNA von der Sonde getrennt werden kann, so dass beide Nukleinsäuren in deutlich unterschiedlichen Fraktionen der Aufreinigung zu finden sind. Im Folgenden wird exemplarisch einer von zahlreichen Optimierungsschritten beschrieben. Zunächst wurden die beiden *in-vitro*-RNAs (die dimere (-)-Biotin-Sonde und das (+)-Monomer) zur Optimierung des Aufreinigungsverfahrens unter den bereits beschriebenen Bedingungen aneinander hybridisiert. Während der anschließenden Waschschrte wurden Bedingungen gesucht, unter denen die beiden RNAs voneinander zu trennen sind (Abb. 3.III.5, Schritt 3). Die erste Annahme war, dass eine Temperaturerhöhung während der Waschschrte in 0,1 x SSC die Basenpaarung zwischen den Nukleinsäuren lösen kann, ohne die Biotin-Streptavidin-Bindung zu beeinflussen, so dass die monomere (+)-RNA in einer der Waschfraktionen zu detektieren sein müsste, während die Biotin-markierte Sonde bis zum letzten Schritt (dem Zusatz von Formaldehyd) an die Streptavidin-Partikel gebunden bleibt. Hierzu wurden Elutionstemperaturen von 70°C, 73°C, 77°C und 80°C gewählt, sowie

zusätzlich ein Ansatz bei 80°C mit reinem Wasser, in dem keinerlei Salz zur Stabilisierung der Basenpaare beitragen kann. Die Nukleinsäure der jeweiligen Fraktionen wurden wieder getrennt gesammelt, mit Ethanol präzipitiert und in einem PAA-Gel analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.III.7 zusammengefasst.

Es ist deutlich zu erkennen, dass in keiner der Fraktionen ausschließlich die monomere (+)-„Ziel“-RNA eluiert werden konnte. Die steigende Temperatur führt lediglich zu einer allgemeinen Elution der Sonde (einschließlich der daran gebundenen „Ziel“-RNA) von den Dynabeads, so dass davon ausgegangen werden muss, dass eine Erhöhung der Elutionstemperatur die Bindung der Biotin-markierten Sonde an die Streptavidin-Partikel schwächt, nicht aber die alleinige Trennung der betrachteten Nukleinsäuren erlaubt. Selbst in dem Ansatz mit reinem Wasser als Elutionsmittel ist keine Trennung von monomerer „Ziel“-RNA und dimerer Sonde zu erkennen. Diese Art der Behandlung der Hybride führte also nicht zum Ziel, da sich das „gefischte“ (+)-Transkript trotz hoher Temperaturen sowie geringer Salzkonzentration nicht von der Sonde eluieren ließ.

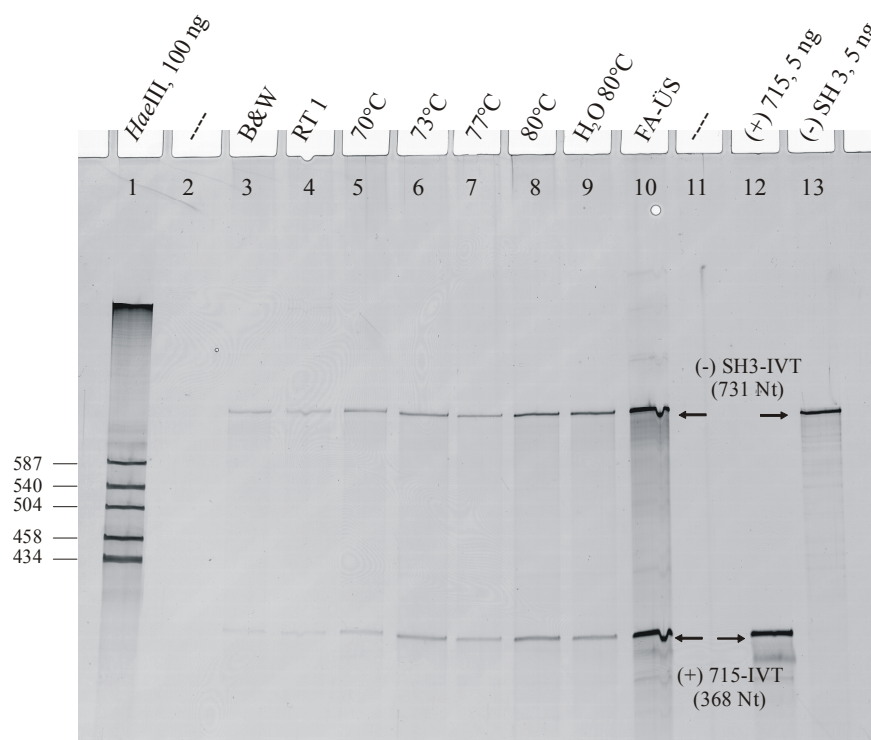


Abb. 3.III.7

Versuch der Elution der „Ziel“-RNA von der biotinylierten Sonde.

50 ng monomeres (+)-PSTVd-Transkript (pRH 715) wurde an 50 ng Biotin-markierte, dimere (-)-PSTVd-Sonde (pSH 3) hybridisiert und über 33 µg Dynabeads aufgereinigt. Die Überstände der einzelnen Waschschrte (Elutionstemperaturen sind an den Auftragstaschen angegeben) wurden präzipitiert, auf ein 4 % Polyacrylamid-Gel (30 %, 30:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE) aufgetragen, und das Gel anschließend mit Silber gefärbt. Spur 1: Längenstandard pBR 322, *Hae* III-restringiert; Spuren 3-10: einzelne Fraktionen der Dynabeads-Aufreinigung; Spur 12: monomeres (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (Längenstandard, 368Nt) - Spur 13: dimeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (Längenstandard, 731Nt)

3.III.2 Einsatz von Harnstoff zur Trennung von Sonde und „Ziel“-RNA

Da bei der denaturierenden Gelelektrophorese der Effekt von Harnstoff zur Auflösung von doppelsträngiger Nukleinsäure, also der Auflösung von Basenpaaren ausgenutzt wird und Kap. 3.III.1 zeigte, dass die reine Erhöhung der Elutionstemperatur nicht zur Trennung von Sonde und „Ziel“-RNA reichte, wurde getestet, ob möglicherweise durch den Zusatz von Harnstoff während der Waschschriffe der Dynabeads-Aufreinigung eine entsprechende Trennung der beiden Nukleinsäuren erreicht werden kann. Es wurden zunächst wieder Hybride eingestellt und im Anschluss folgende Kombinationen von Harnstoffkonzentration und Temperatur hinsichtlich ihres Potentials, die „Ziel“-RNA von der Sonde zu eluieren, getestet. Nach einem Standard-Waschschritt in 0,1 x SSC bei 70°C wurde

- 1 x mit 4 M Harnstoff/ 0,1 x SSC/ 70°C
- 1 x mit 8 M Harnstoff/ 0,1 x SSC/ 70°C
- 1 x mit 4 M Harnstoff/ 0,1 x SSC/ 75°C
- 1 x mit 8 M Harnstoff/ 0,1 x SSC/ 75°C

eluiert. Der letzte Elutionsschritt war auch hier wieder die Abtrennung der Sonde durch die Zugabe von Formamid bei 75°C, was zur Auflösung der Biotin-Streptavidin-Bindung führt. Das Ergebnis zeigt Abb. 3.III.8

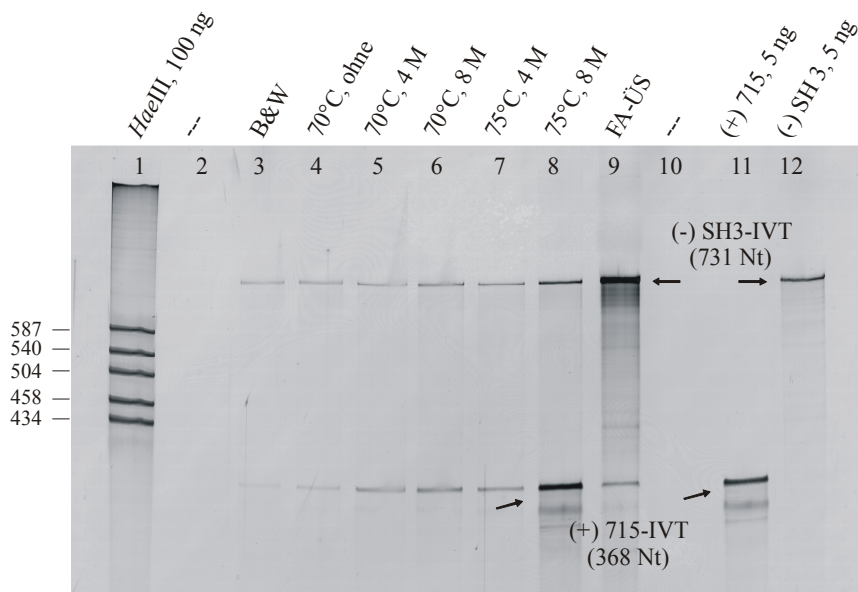


Abb. 3.III.8

Versuch der Elution der „Ziel“-RNA von der biotinylierten Sonde durch Inkubation mit 8 M Harnstoff.

50 ng monomeres (+)-PSTVd-Transkript (pRH 715) wurde an 50 ng Biotin-markierte, dimere (-)-PSTVd-Sonde (pSH 3) hybridisiert und über 33 µg Dynabeads aufgereinigt. Die Überstände der einzelnen Waschschriffe (Elutionstemperatur und Harnstoffkonzentration sind an den Auftragstaschen angegeben) wurden präzipitiert, auf ein 4 % Polyacrylamid-Gel (30 %, 30:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE) aufgetragen, und das Gel anschließend mit Silber gefärbt. Spur 1: Längenstandard pBR 322, *Hae* III-restringiert – Spuren 3-9: Einzelne Fraktionen der Dynabeads-Aufreinigung – Spur 11: monomeres (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (Längenstandard, 368 Nt) - Spur 12: dimeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (Längenstandard, 731Nt) – Bei einer Harnstoffkonzentration von 8 M und einer Elutionstemperatur von 75°C lassen sich „Ziel“-RNA und Sonde trennen (Spuren 8, 9)

Wie deutlich zu erkennen ist, zeigen die Spuren 1-5 zwar eine Zunahme an eluierter RNA, jedoch zu gleichen Teilen die dimere Sonde wie auch die monomere „Ziel“-RNA, so dass man hier von keiner Trennung der beiden Nukleinsäuren sprechen kann. Betrachtet man hingegen die nachfolgenden Spuren 8 und 9, so sieht man deutlich, dass in Spur 8 vorwiegend das Signal der monomeren „Ziel“-RNA auftritt, wohingegen die dimere Biotin-Sonde erst in der nachfolgenden Waschfraktion, also erst in Spur 9 eluiert wird. Es lässt sich also bei einer Harnstoffkonzentration von 8 M und einer Elutionstemperatur von 75°C die „gefischte“ „Ziel“-RNA von der biotinylierten Sonde separieren, ohne dass diese sich von den Dynabeads löst. Hiermit war ein wichtiger Schritt der Aufreinigung realisiert, der es später ermöglichen sollte, die unbekannt *de-novo*-PSTVd-RNA von der zur Separation verwendeten Sonde abzutrennen und sie als alleiniges Substrat in weiterführende Experimente einzusetzen. Im Folgenden wurde nach den Waschschrritten in 0,1 x SSC der zusätzliche Elutionsschritt bei 75°C mit 8 M Harnstoff angeschlossen.

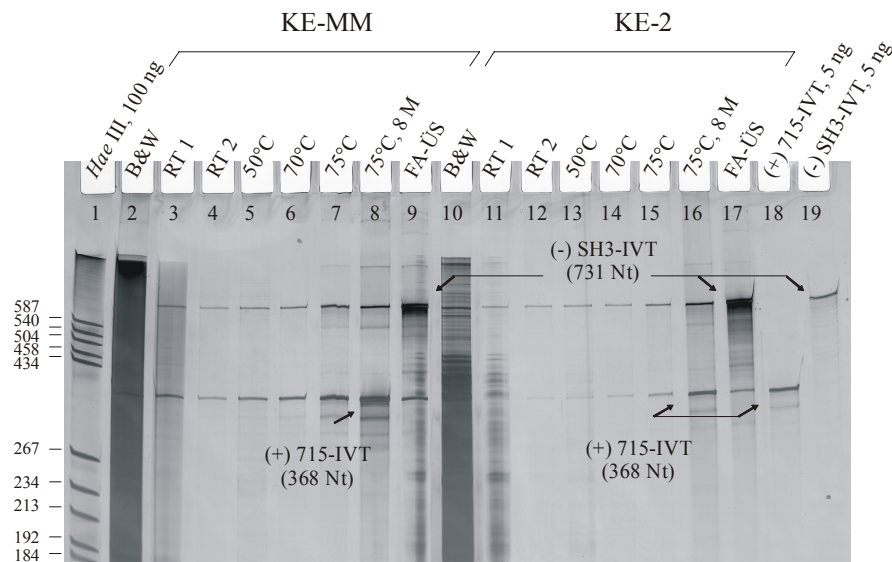
3.III.3 „Fischen“ der „Ziel“-RNA in Gegenwart von endogenen Nukleinsäuren aus dem Kernextrakt

Die spätere Isolierung von *de-novo*-PSTVd-RNA musste nicht nur die Bedingungen von Bindung an die Biotin-Sonde sowie die Ablösung von dieser erfüllen, sondern es musste gewährleistet sein, dass auch in Anwesenheit des gesamten „pools“ an endogenen Nukleinsäuren aus dem Kernextrakt (s. auch Abb. 3.III.5, Schritt 1)

- 1) die biotinylierte Sonde spezifisch, d.h. ausschließlich die gewünschte RNA bindet und
- 2) die Bindung nahezu vollständig erfolgt, d.h., dass es zu keiner Inhibierung bei der Hybridisierung durch die endogenen Nukleinsäuren kommt.

Um dies zu testen, wurden die Hybridisierungsansätze zunächst wie unter 2.11.3 beschrieben eingestellt. Zusätzlich wurden je 5 µl zweier verschiedener, voneinander unabhängig präparierter Kernextrakte zugegeben. Diese Hybridisierungsansätze enthielten also sowohl die biotinylierte Sonde und die „Ziel“-RNA, als auch endogene Nukleinsäuren aus den entsprechenden Kernextrakten. Die Hybridisierung sowie die anschließende Aufreinigung erfolgten unter den zuvor etablierten Bedingungen. Die Elution der „Ziel“-RNA von der Biotin-Sonde erfolgte auch hier durch Zugabe von 8 M Harnstoff. Die Nukleinsäure aller Waschfraktionen wurde mit Ethanol präzipitiert und anschließend in einem PAA-Gel analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.III.9 auf der folgenden Seite dargestellt.

Die Spuren 2-9 stellen das Aufreinigungsergebnis vor dem Hintergrund der Nukleinsäuren des ersten Kernextraktes, die Spuren 10-17 das Ergebnis der Analysen des zweiten Kernextraktes dar. Betrachtet man Spur 2, so sieht man deutlich, dass man nahezu alle endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes in der ersten Fraktion eluiert. Das bedeutet, dass sie nicht an die Biotin-markierte Sonde binden, also keine unspezifische Hybridisierung der Sonde an eine endogene Nukleinsäure erfolgt. Die Spuren 3-9 zeigen im Wesentlichen ein identisches Bild wie in Abb. 3.III.7 bereits beschrieben. Zwar ist ein geringer Anteil an eluierter Nukleinsäure bereits in frühen Elutionsfraktionen zu detektieren, aber der größte Teil der betrachteten RNA wird in den Fraktionen 7 und 8 eluiert. Auch hier gelingt die Trennung von „Ziel“-RNA und Sonde, da auch hier die monomere (+)-RNA nach Behandlung mit Harnstoff in Spur 8 den deutlich größeren Anteil an eluierter Nukleinsäure ausmacht, während die Sonde erst nach Elution mit Formamid von den Dynabeads abgetrennt wird (Spur 9).

**Abb. 3.III.9****Isolation der „Ziel“-RNA aus dem „pool“ an endogenen Nukleinsäuren zweier verschiedener Kernextrakte.**

50 ng monomeres (+)-PSTVd-Transkript (pRH 715) wurden in 5 µl Kernextrakt (enthaltene Menge an endogenen Nukleinsäuren unbekannt) gegeben und es wurde versucht, die monomeren (+)-Transkripte mit 50 ng Biotin-markierter, dimerer (-)-PSTVd-Sonde (pSH 3) zu „fischen“. Anschließend wurde mit 33 µg Dynabeads aufgereinigt. Es wurden zwei unabhängige Kernextrakte (KE) betrachtet. Die Überstände der einzelnen Waschschriffe (Elutionstemperaturen sind an den Auftragstaschen angegeben) wurden präzipitiert, auf ein 5 % Polyacrylamid-Gel (30 %, 30:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE) aufgetragen und das Gel anschließend mit Silber gefärbt. Zur Trennung von Sonde und „Ziel“-RNA wurde bei 75°C mit 8 M Harnstoff eluiert. - Spur 1: Längenstandard pBR 322, *Hae* III-restringiert; Spuren 2-9 und 10-17: Einzelne Fraktionen der Dynabeads-Aufreinigung; Spur 18: monomeres (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (Längenstandard, 368Nt); Spur 19: dimeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (Längenstandard, 731Nt) Die Aufreinigungsmethode erlaubt die Isolierung der „Ziel“-RNA auch vor dem Hintergrund an endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes (Spuren 8, 16).

Analysen in Anwesenheit der Nukleinsäuren des zweiten Kernextraktes zeigen ein identisches Elutionsprofil. Auch hier gelingt sowohl das „Fischen“ der „Ziel“-RNA vor dem Hintergrund kerneigener Nukleinsäuren, als auch die Trennung der beiden RNAs durch die Verwendung von 8 M Harnstoff.

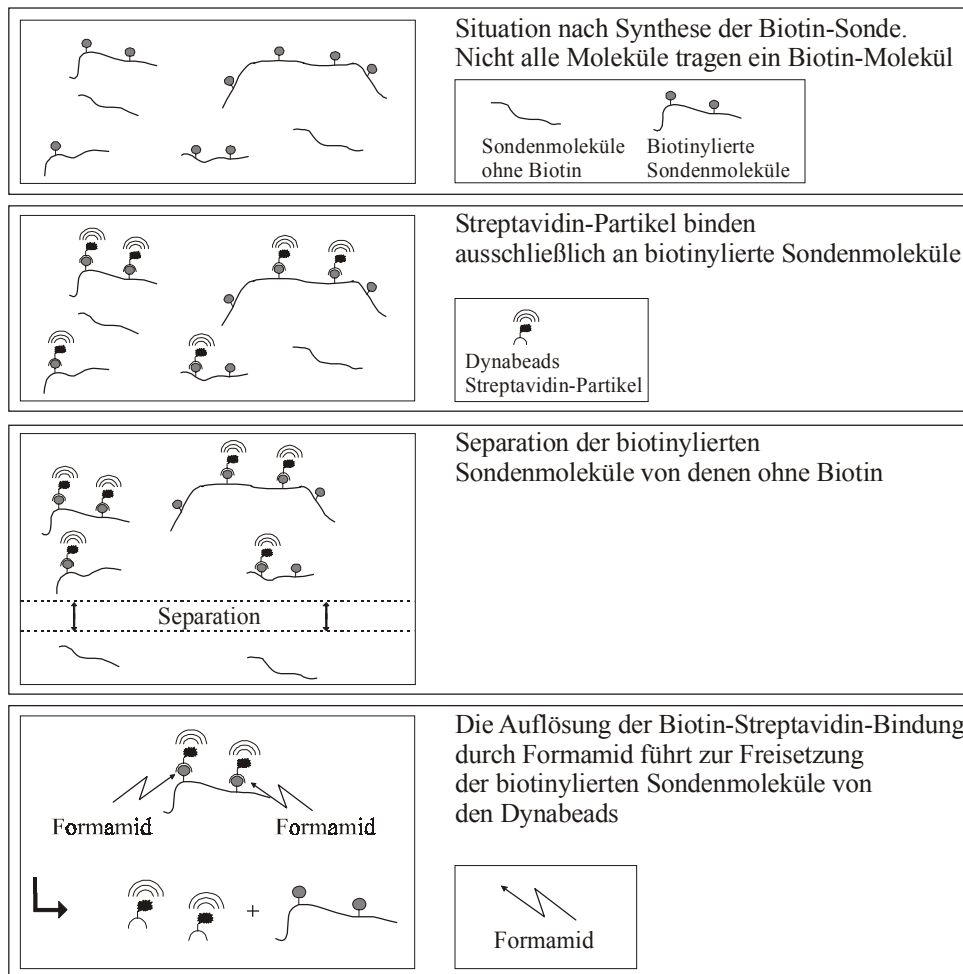
3.III.4 Nachweis der Hybrid-Trennung mittels Northern-Blot-Analyse - Auflösung von „unerwünschten“ Hybriden durch Zusatz von 8 M Harnstoff

Die bisherige Bildung von Hybriden und deren Trennung geschah im Hinblick auf den Nachweis einer (oder mehrer) Startstelle(n) auf dem PSTVd(-)-Strang. Das bedeutet, bislang war mit „Ziel“-RNA oder „zu fischender“-RNA immer ein monomeres Transkript mit (+)-Polarität bezeichnet. Der Wechsel vom (-)- zum (+)-Strang als Untersuchungsgegenstand, der sich im Verlauf dieser Arbeit ergeben hatte, bedeutet, dass im Folgenden mit „Ziel“-RNA

diejenige RNA bezeichnet wird, die als Transkriptionsprodukt durch die Pol II bei der Transkription von (+)-cPSTVd im Kernextrakt entsteht, also (-)-Polarität aufweist. Für die bisher gewonnenen Daten dieser Arbeit bedeutet der Wechsel des Untersuchungsgegenstandes keinen Unterschied, da die bisherigen Untersuchungen sich auf die Hybridisierung und Trennung von Hybriden zwischen komplementären RNAs mit (+)- und (-)-Polarität bezogen. Im Hinblick auf die spätere Analyse tatsächlich im Kernextrakt transkribierter Nukleinsäure war die erwartete geringe Ausbeute an *de-novo*-RNA problematisch. Aus vorausgegangenen Arbeiten (Fels, 1997; Nagel-Steger, 1990; Hu, 2000) war bekannt, dass die Transkriptionsaktivität der Pol II im Kernextrakt eher schwach ist, so dass mit einer geringen Menge an *de-novo*-RNA gerechnet werden musste. Deswegen wurde im Folgenden das Nachweissystem der Nukleinsäuren von der relativ insensitiven Silberfärbung (1 ng) auf den radioaktiven Nachweis (1-10 pg) umgestellt und somit die Nachweisgrenze um den Faktor 100-1000 gesenkt, bzw. die Sensitivität erhöht. Der radioaktive Nachweis geschah mittels Northern-Blot-Analysen (s. 2.10), bei der zur Detektion der betreffenden Nukleinsäure radioaktiv markierte *in-vitro*-Transkripte als Sonden verwendet wurden, die entsprechend ihrer Polarität gegen die jeweils komplementäre Sequenz hybridisieren.

3.III.5 „prä-Aufreinigung“ der Biotin-markierten Sondenmoleküle

Gerade hinsichtlich der zu erwartenden geringen Menge an *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA war die vollständige Isolierung dieser aus dem Gesamtansatz von essentieller Bedeutung. Um ein möglichst vollständiges „Fischen“ der „Ziel“-RNA aus dem Nukleinsäuregemisch zu garantieren wurde im Folgenden der Hybridisierung von Sonde und Substrat ein weiterer Schritt vorausgestellt. Da die Synthese der biotinylierten Sondenmoleküle per *in-vitro*-Transkription mit der T7-Polymerase in Anwesenheit von Biotin-16-UTP erfolgt, das von dem Enzym erkannt und in das entstehende Transkript eingebaut wird, waren die Bedingungen so gewählt, dass insgesamt eine 20 %-ige Biotinylierung des Transkripts erreicht wurde. Auf Grund der Tatsache, dass es sich hierbei um eine gemittelte 20 %-ige Biotinylierung handelt, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass auch solche Transkripte entstehen, die kein Biotin enthalten. Diese würden zwar mit der „Ziel“-RNA hybridisieren, könnten aber dem Ansatz nicht über Dynabeads entzogen werden, da sie kein Biotin tragen, um an das Streptavidin zu binden. Solche Sondenmoleküle wären nicht geeignet, um in der Aufreinigung eingesetzt zu werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Transkript über keinerlei Biotin-Markierung verfügt, ist jedoch gering. Auf Grund der Annahme, dass 20 % aller Uridintriphosphate Biotin tragen, und der Tatsache, dass etwa 20 % der PSTVd-RNA aus UTP bestehen, ergeben sich circa 14 biotinylierte Uridine pro Molekül. Es ist deswegen wenig wahrscheinlich, dass Transkripte entstehen, die keine Biotin-Markierung tragen. Da dies aber nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte, und jedes nicht-biotinylierte Sondenmolekül in der Aufreinigung vermieden werden musste, war die „prä-Aufreinigung“ der Biotin-markierten Sonden essentiell. Deswegen wurden zunächst nur die Sondenmoleküle – bevor sie zur Hybridisierung verwendet wurden – an Dynabeads gebunden, gewaschen und im Anschluss mit Formamid wieder von den Streptavidinkügelchen gelöst. Allein diejenigen Sondenmoleküle, die in der „Formamid“-Fraktion eluiert wurden, werden zur Hybridisierung verwendet, da sie vor der Elution mit Formamid an die Dynabeads gebunden waren, was bedeutet, dass sie auf jeden Fall mindestens ein Biotinmolekül tragen und somit zum „Fischen“ geeignet sind (s. Abb. 3.III.10, folgende Seite).

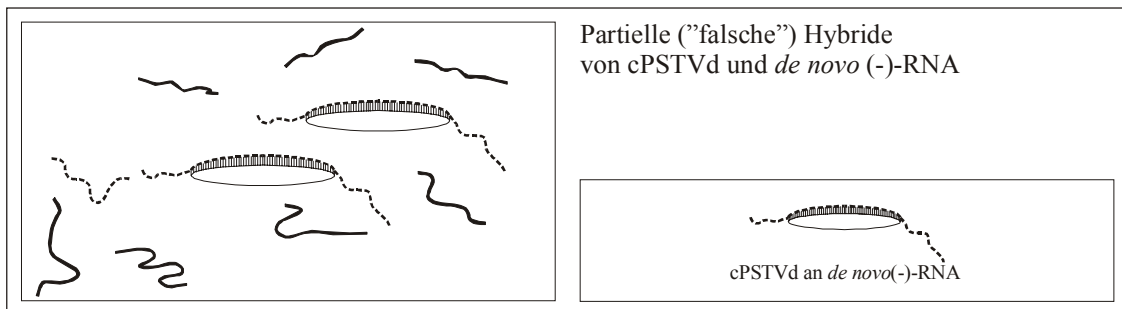
**Abb. 3.III.10**

Schematische Darstellung der Aufreinigung der zur Isolation von entsprechender PSTVd-RNA verwendeten biotinylierten Sondenmoleküle.

Die einzelnen Schritte der Aufreinigung sind nebenstehend erläutert.

3.III.6 Auflösung „falscher“ Hybride durch 8 M Harnstoff

Im Hinblick auf die spätere Analyse von *de-novo*-PSTVd(-)-RNA, die durch die Transkription von Zirkeln durch die Pol II entstanden ist, ergab sich ein weiteres Problem. Schritt 1 der Aufreinigung muss das Entfernen des zirkulären PSTVd sein (s. auch Abb. 3.III.5), da dies im großen Überschuss im Ansatz vorliegt. Die Entfernung des cPSTVd erfolgt durch Hybridisierung einer Biotin-markierten, dimeren (-)-Sonde, die entsprechend ihrer Polarität an das (+)-cPSTVd bindet und über Dynabeads dem Gemisch entzogen werden kann. Diese biotinylierte (-)-Sonde ist aber nicht das einzige Molekül mit (-)-Polarität im Ansatz, sondern die durch Transkription mit der Pol II neu-entstandene PSTVd-RNA ist ebenfalls ein (-)-Strang. Das bedeutet, dass auch solche Hybride denkbar sind, die aus cPSTVd und *de-novo*-(-)-RNA bestehen (s. Abb. 3.II.11, folgende Seite).

**Abb. 3.III.11**

Darstellung sogenannter „falscher“ Hybride zwischen cPSTVd (+)-Strang und *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA

Diese Zirkel würden dann im Ansatz verbleiben, da sie kein biotinyliertes Sondenmolekül als Hybridpartner haben und somit keine Biotin-Streptavidin-Bindung mit den Dynabeads eingehen können. Da darüber hinaus die *de-novo*-(-)-RNA die eigentliche „Ziel“-RNA ist und diese in einem zweiten Schritt aus dem verbleibenden Nukleinsäuregemisch, bestehend aus 1) endogenen Nukleinsäuren und 2) restlichem cPSTVd, entfernt werden muss, was ebenfalls über Hybridisierung mit einer biotinylierten Sonde der entsprechend komplementären Sequenz (also mit einer (+)-Sonde) geschieht, müssen die „falschen“ Hybride wieder getrennt werden. Um zu garantieren, dass die „falschen“ Hybride zwischen cPSTVd und *de-novo*-(-)-RNA sich bei der zweiten Hybridisierung auch wieder trennen, wurden dem zweiten Hybridisierungsansatz (wie später zur Trennung von Sonde und „Ziel“-RNA) 8 M Harnstoff zugesetzt. Dieser sollte bewirken, dass sich die „falschen“ Hybride trennen und so die im Überschuss zugegebene biotinylierte Sonde an ihre nun wieder frei zugängliche, komplementäre Sequenz binden kann. In einem Vorversuch wurde zunächst getestet, ob voreingestellte Hybride zwischen (+) und (-)-Monomeren durch Zugabe von 8 M Harnstoff während einer Hybridisierungsreaktion getrennt werden können und mit der biotinylierten (+)-Sonde das nun freigesetzte (-)-Monomer „gefischt“ werden kann.

Es wurde ein Hybridisierungsansatz gewählt, der folgende Komponenten enthielt:

- aufgereinigte biotinylierte Sondenmoleküle mit (+)-Polarität (300 ng)
- voreingestellt Hybride aus äquimolaren Mengen (+)- und (-)-Monomeren (30 ng)
- 1 x TNE, 8 M Harnstoff

Die Hybridisierung erfolgte unter Standardbedingungen mit Ausnahme des Zusatzes von 8 M Harnstoff. Auch die anschließende Aufreinigung über Dynabeads erfolgte unter Standard-Bedingungen (s. 2.12.2.1). Die Nukleinsäure der eluierten Fraktionen wurde mit Ethanol gefällt und auf ein PAA-Gel aufgetragen. Der Nachweis erfolgte jedoch nicht mit Silbernitrat, sondern die Nukleinsäure wurde mit Hilfe einer Blot-Apparatur auf eine Nylonmembran transferiert und dort fixiert. Zur Detektion der monomeren „Ziel“-RNA mit (-)-Polarität wurde ein radioaktiv markiertes (+)-*in-vitro*-PSTVd-Transkript gegen die Membran hybridisiert (s. 2.10.3). Dieses radioaktiv markierte Transkript sollte ausschließlich an die komplementäre Sequenz, also an (-), binden und so die Detektion des (-)-Monomers ermöglichen. Das Ergebnis ist in Abb. 3.III.12 dargestellt.

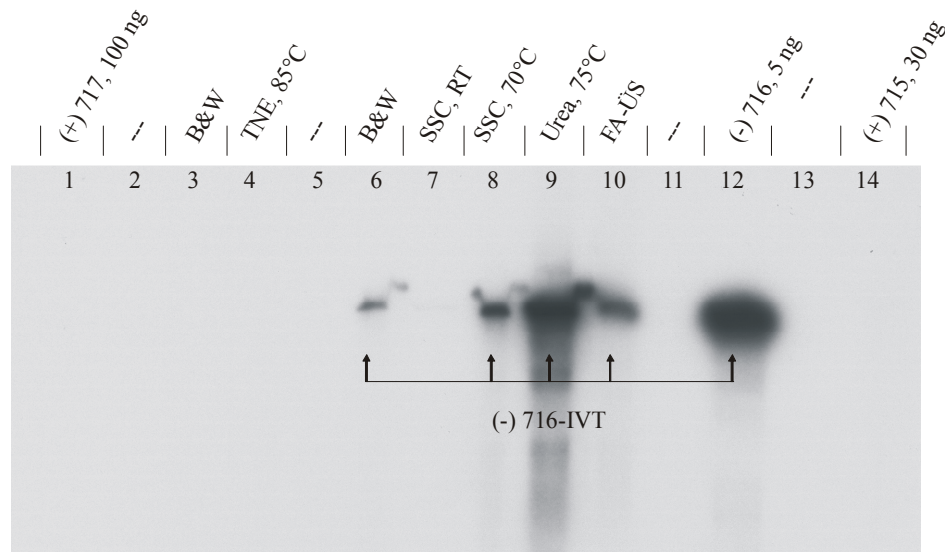


Abb. 3.III.12

(-)-PSTVd-spezifische Northern-Blot-Analyse von freigesetzter (-)-PSTVd-„Ziel“-RNA, die zunächst in „falschen“ Komplexen gebunden war.

Die Isolation der „Ziel“-RNA aus den „falschen“ Hybriden erfolgte über Dynabeads. 30 ng monomeres (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pRH 715) wurde an 30 ng monomeres (-) PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pRH 716) hybridisiert, die Hybride mit 8 M Harnstoff „gesprengt“ und die freigesetzte (-)-PSTVd-RNA durch Hybridisierung an 300 ng Biotin-markierte, dimere (+)-PSTVd-Sonde (pRH 717) gebunden. Anschließend wurde mit 100 µg Dynabeads aufgereinigt; zur Trennung von Sonde und „Ziel“-RNA wurde bei 75°C mit 8 M Harnstoff eluiert. Die Überstände der einzelnen Waschschritte wurden präzipitiert, auf ein 5 % Polyacrylamid-Gel (30 %, 30:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE) aufgetragen, und die Nukleinsäure anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Der (-)-PSTVd-spezifische Nachweis erfolgte durch Hybridisierung von radioaktiv markierten *in-vitro*-Transkripten mit (+)-Polarität (pRH 715). Exposition: über Nacht bei -70°C, mit Verstärkerfolie; Spur 1: dimeres (+)-*in-vitro*-Transkript (731 Nt) als Spezifitätskontrolle der Sonde; Spuren 3, 4: Fraktionen aus der „prä“-Aufreinigung der biotinylierten Sonde (pRH 717); Spuren 6-10: Einzelne Fraktionen der Dynabeads-Aufreinigung; Spur 12: monomeres (-)-*in-vitro*-Transkript (368 Nt), als Längenstandard und Positivkontrolle der Northern-Blot-Hybridisierung; Spur 14: monomeres (+)-*in-vitro*-Transkript (368 Nt) als Spezifitätskontrolle der Sonde.

Die Spuren 6-10 repräsentieren die Isolation (das „Fischen“) von (-)-RNA, die zunächst in einem „falschen“ Hybrid gebunden war. Das geringe Signal in Spur 6 könnte zu einem bedeuten, dass das „falsche“ Hybrid nicht vollständig aufgelöst wurde und somit nicht die komplette (-)-RNA zur Hybridisierung mit der Biotinsonde zur Verfügung stand, oder aber dass ein geringer Teil einfach nicht von der biotinylierten Sonde gebunden wurde. In den folgenden Spuren entspricht das Elutionsprofil weitgehend dem, das aus den silbergefärbten Gelen bereits bekannt ist. Auch hier taucht die Nukleinsäure zum Teil schon in geringer Menge bei dem Waschschritt bei 70°C auf (Spur 8), sowie in der Formamid-Fraktion (Spur 10). In den Silbergelen verhält es sich identisch, wobei man dort auch die biotinylierte Sonde als Bande im Gel sehen kann. Das ist hier nicht der Fall, da mit einem sequenzspezifischen radioaktiven (+)-Transkript gegen Nukleinsäuren mit (-)-Polarität hybridisiert wird, das auf Grund seiner (+)-Polarität natürlich die Sonde (ebenfalls (+)) nicht detektieren sollte. Der Hauptanteil an „Ziel“-(-)-RNA ist jedoch wieder in der gewünschten Fraktion, wo die Elution in Anwesenheit von 8 M Harnstoff durchgeführt wurde (Spur 9). In den Spuren 3 und 4 sind die Waschfraktionen der Aufreinigung der Sonde alleine aufgetragen. Es ist kein Signal zu

sehen, was auch nicht verwundert, da die Polarität der (+)-Sonde eine Hybridisierung des radioaktiven (+)-Transkripts ausschließt. Als Ergebnisse dieses Experiments, das viele Parameter gleichzeitig beleuchtete, bleibt festzuhalten:

- 1) „prä-aufgereinigte“ Biotin-Sonde ist in ihrer Bindeeigenschaft nicht beeinträchtigt
- 2) „falsche“ Hybride können mit 8 M Harnstoff während der Hybridisierung der Sonde „gesprengt“ werden
- 3) „Ziel“-RNA, die zunächst in „falschen“ Hybriden gebunden war, kann „gefischt“ werden
- 4) radioaktiv markiertes Transkript bindet spezifisch nur an die komplementäre Sequenz (vgl. auch Spuren 1 und 14, kein Signal bei (+)-RNA)
- 5) Northern-Blot-Analysen bestätigen die bisherigen Ergebnisse der Silberfärbung - sind aber viel sensitiver

Gleichzeitig konnte hier in Bezug auf die Schwerpunktverlagerung der Arbeit gezeigt werden, dass der Wechsel der Polaritäten ((-) und (+)) der Sonden sowie der „Ziel“-RNA-Moleküle tatsächlich keinen Einfluss auf die bisherigen Ergebnisse hat.

3.III.7 Überprüfung der Aufreinigung von *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA mit synthetischen *in-vitro*-PSTVd-Transkripten

Im Rahmen der geplanten Aufreinigungsstrategie der durch Transkription mit der Polymerase II neu-entstandenen (-)-PSTVd-RNA aus dem Kernextrakt gab es mehrere Schritte, die im Folgenden auf ihre Durchführbarkeit überprüft werden sollten. Die gesamte Aufreinigung gliedert sich in 3 Schritte:

- 1. Hybridisierung („1.Fischen“) des zirkulären (+)-PSTVd-Templates
- 2. Hybridisierung („2.Fischen“) von evtl. im Ansatz verbliebenen Zirkeln
- 3. Hybridisierung („3.Fischen“) der eigentlichen *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA

Diese Schritte wurden zunächst mit *in-vitro*-Transkripten nachgestellt:

- statt cPSTVd diene zunächst ein monomeres (+)-Transkript;
- als „Ziel“-RNA diene ein monomeres (-)-Transkript;
- als biotinylierte Sonde zum „Fischen“ der (+)-RNA wurden pSH 3 dimere (-)-Transkripte mit einem Biotinylierungsgrad von 20 % verwendet;
- als biotinylierte Sonde zum „Fischen“ der (-)-RNA wurden pRH 717, dimere (+)-Transkripte mit einem Biotinylierungsgrad von 20 % verwendet;
- um den späteren Überschuss von cPSTVd zu simulieren, wurde ein Verhältnis von (+) zu (-) Monomer von 20:1 (200 ng zu 10 ng) gewählt;
- die Menge an eingesetzter Biotin-(-)-Sonde betrug 2 x 300 ng
- die Menge an eingesetzter Biotin-(+)-Sonde betrug 1 x 300 ng

Zunächst wurden alle beteiligten Sondenmoleküle an Dynabeads prä-aufgereinigt, um den Anteil an nicht-biotinylierten Molekülen zu entfernen. Anschließend wurde in der 1. Hybridisierung die monomere (+)-RNA aus dem Ansatz entfernt. Die Hybridisierung an die dimere (-)-Biotinsonde erfolgte unter Standardbedingungen und nicht in Anwesenheit von Harnstoff. Die eluierten Fraktionen „B&W“, „SSC, RT“ und „SSC, 70°C“ enthalten nach dem ersten „Fischen“ die (-)-RNA, sowie evtl. noch Reste von monomerer (+)-RNA. Der Hauptteil an

monomerer (+)-RNA sollte über die Sonde entfernt worden sein. Die Fraktion, in der mit 8 M Harnstoff eluiert wurde und die im Folgenden mit „MM“ bezeichnet wird, sollte vorwiegend die entfernte monomere (+)-RNA enthalten. Die „FA“-Fraktion hingegen sollte vorwiegend die von den Dynabeads abgetrennte dimere (-)-Sonde enthalten. Beide Fraktionen („MM“ und „FA“) werden für die weitere Aufreinigung nicht mehr benötigt, aber auf Grund der Vollständigkeit des Experimentes bei -20°C aufbewahrt. Deswegen werden alle 5 Fraktionen

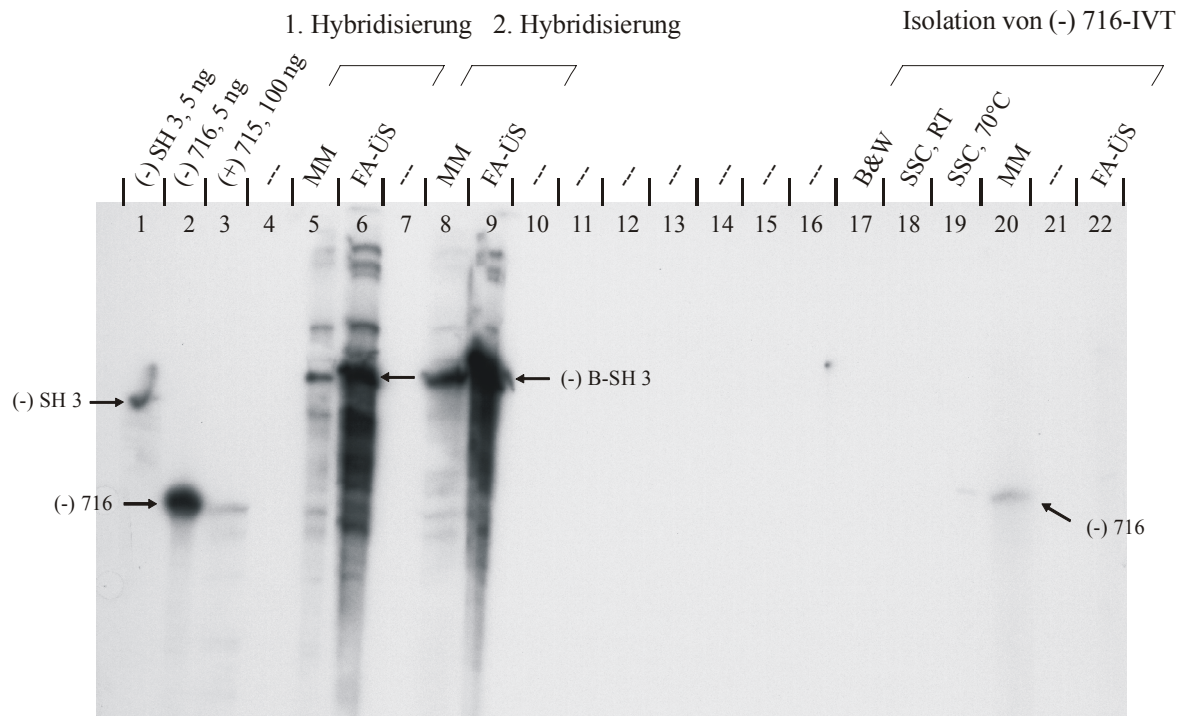


Abb. 3.III.13

(-)-PSTVd- spezifische Northern-Blot-Analyse der simulierten Aufreinigung von *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA mit synthetischen *in-vitro*-PSTVd-Transkripten.

Alle drei Hybridisierungen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Isolation der jeweiligen „Ziel“-RNA erfolgte über Dynabeads. Alle verwendeten Biotin-Sondenmoleküle wurden in einem vorgelagerten Schritt „prä“-aufgereinigt. Zur Simulation von cPSTVd wurden 200 ng monomeres (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pRH 715) verwendet, das über zwei Hybridisierungsschritte an 2 x 300 ng Biotin-markierte, dimere (-)-PSTVd-Sonde (pSH 3) gebunden aus dem Ansatz entfernt wurde. Die zur Simulation neu-entstandener (-)-PSTVd-RNA verwendeten 10 ng monomeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pRH 716) wurden durch Hybridisierung an 300 ng Biotin-markierter, dimerer (+)-PSTVd-Sonde (pRH 717) aus dem Ansatz entfernt. Die Isolation erfolgte über die Aufreinigung mit je 100 μg Dynabeads. Die Überstände der einzelnen Waschschrte wurden präzipitiert, auf ein 5 % Polyacrylamid-Gel (30 %, 30:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE) aufgetragen, und die Nukleinsäure anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Der (-)-PSTVd-spezifische Nachweis erfolgte durch Hybridisierung von radioaktiv markierten *in-vitro*-Transkripten mit (+)-Polarität (pRH 715). Exposition: über Nacht bei -70°C , mit Verstärkerfolie - Zur Trennung von Sonde und „Ziel“-RNA wurde bei 75°C mit 8 M Harnstoff eluiert. Spur 1: dimeres (-)-*in-vitro*-Transkript (731 Nt) als Längenstandard; Spur 2: monomeres (-)-*in-vitro*-Transkript (368 Nt) als Längenstandard; Spur 3: monomeres (+)-*in-vitro*-Transkript (368 Nt) als Spezifitätskontrolle der Sonde; Spuren 5, 6: Fraktionen der 1. Hybridisierung (Entfernen der (+)-PSTVd-RNA); Spuren 8, 9: Fraktionen der 2. Hybridisierung (Entfernen der (+)-PSTVd-RNA); Spuren 17-22: Einzelne Fraktionen der 3. Hybridisierung (Isolation der (-)-PSTVd-RNA).

mit Ethanol präzipitiert, jedoch nur die Fraktionen 1-3 gepoolt. Das Pellet der gepoolten Fraktionen wird komplett im 2. Hybridisierungsansatz resuspendiert („2. Fischen“). Hier sollen die restlichen Anteile an monomerer (+)-RNA entfernt werden. Die zweite Hybridisierung findet unter Standardbedingungen statt, allerdings in Anwesenheit von 8 M Harnstoff, um „falsche“ Hybride, die sich während des „1. Fischens“ gebildet haben, aufzulösen und die daraus freigesetzte monomere (+)-RNA mit der Biotinsonde zu isolieren. Auch hier werden alle Fraktionen mit Ethanol gefällt, wobei die Fraktionen „B&W“, „SSC, RT“ und „SSC, 70°C“, gepoolt gefällt werden. Sie sollten jetzt ausschließlich monomere (-)-RNA enthalten. (Auch hier werden die Fraktionen „MM“ und „FA“ aufbewahrt, sind aber für die weitere Isolation der (-)-RNA irrelevant.) Das anschließende „3. Fischen“ dient der Bindung der eigentlichen „Ziel“-RNA, – der (-)-RNA –, an die nun verwendete (+)-Biotinsonde im Hinblick auf die spätere Isolation der (-)-RNA aus dem Nukleinsäuregemisch des Kernextraktes. Die Hybridisierung erfolgt unter Standardbedingungen ohne Zusatz von Harnstoff. Alle Fraktionen der Aufreinigung werden getrennt gesammelt und mit Ethanol gefällt. Hier sind nun die Fraktionen „MM“ und „FA“ von entscheidender Bedeutung, da bei erfolgreicher Aufreinigung die monomere (-)-RNA in der „MM“-Fraktion zu erwarten ist, weil dort das „gefischte“ Produkt von der Biotin-Sonde gelöst wird. Die Nukleinsäuren werden wieder in einem PAA-Gel aufgetrennt und mittels Northern-Blot analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.III.13 auf der vorherigen Seite dargestellt.

Die Spuren 5-9 zeigen die „MM“- und „FA“-Fraktionen der ersten beiden Aufreinigungsschritte. Erwartungsgemäß wird hier die biotinylierte, dimere (-)-Sonde detektiert, da das zum Nachweis eingesetzte radioaktive *in-vitro*-Transkript (+)-Polarität aufweist. Auch hier ist zu beobachten, dass der Hauptanteil der Sonde erst in der „FA“-Fraktion (Spuren 2 und 5) eluiert wird, also erst nach Auflösung der Biotin-Streptavidin-Bindung. Geringere Mengen an (-)-Sonde sind – ähnlich den Ergebnissen der Silberfärbung – auch in der „MM“-Fraktion zu detektieren, was nicht verwundert, da auch Harnstoff ein Denaturierungsmittel ist und bei einer Elutionstemperatur von 75°C möglicherweise einen Effekt auf die Biotin-Streptavidin-Bindung hat. Die Spuren 7-12 zeigen die Fraktionen des „3. Fischens“, d.h. die Separation der eigentlichen „Ziel“-RNA. Bei erfolgreicher Aufreinigung sollte die monomere (-)-RNA in der „MM“-Fraktion eluiert werden. Den Erfolg zeigt Spur 20, da dort ein entsprechendes Signal auftritt. Somit konnte gezeigt werden, dass die getestete Aufreinigungsstrategie (2x „Fischen“ der (+)-RNA und anschließendes „Fischen“ der (-)-RNA) erfolgreich ist und zur Isolation von neu-entstandenem (-)-Transkript im Kernextrakt eingesetzt werden kann. Im Folgenden soll die „echte“ *de-novo*-RNA, die durch Transkription im Kernextrakt mit der Polymerase II entstanden ist, aufgereinigt und nachgewiesen werden.

3.III.8 Nachweis neu-entstandener (-)-PSTVd-RNA

Das bisher etablierte Verfahren liefert die Möglichkeit PSTVd-Sequenzen mit (-)-Polarität aus einem Gemisch von Nukleinsäuren zu isolieren. Nun war es von Interesse zu untersuchen,

- 1) ob Kernextrakte präpariert werden konnten, in denen die Pol II transkriptionsaktiv ist und die Transkription von cPSTVd als exogenem Template vermittelt, und
- 2) ob die Isolation neu-entstandener Transkripte über das etablierte Verfahren aus dem Ansatz gelingt.

Im Folgenden wurden zwei verschiedene Transkriptionsansätze untersucht. Ein Ansatz enthielt 500 ng cPSTVd als exogenes Template; der zweite Ansatz diente als Nullkontrolle und enthielt statt cPSTVd Wasser. Die Transkription wurde nach dem von Fels modifizierten

Protokoll von Nagel-Steger durchgeführt (s. 2.11.2). Im Anschluss an die eigentliche Transkriptionsreaktion, in der die kernextrakteigene Pol II ausgehend von dem (+)-cPSTVd-Template eine (-)-PSTVd-RNA synthetisiert haben sollte, wurde die Transkription durch Zugabe von STOPP-Lösung arretiert und die Nukleinsäure über Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Diese wurde mit Ethanol präzipitiert und das Pellet direkt in die erste Hybridisierung („1. Fischen“) eingesetzt.

Der 1. Hybridisierungsansatz enthielt folgende Nukleinsäure-Komponenten:

- 500 ng an zu entfernendem cPSTVd (eingesetzte Menge Template)
- eine unbekannte Menge an *de-novo*-entstandenem (-)-Transkript („Ziel“-RNA)
- eine unbekannte Menge an endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes
- 750 ng dimeres (-)-Transkript (pSH 3), mit einem Biotinylierungsgrad von 20 % als biotinylierte Sonde zum „Fischen“ des cPSTVd

Die anschließende Aufreinigung wurde entsprechend den unter 2.12.2.1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Auch hier wurden zunächst alle beteiligten Sondenmoleküle an Dynabeads aufgereinigt („prä-aufgereinigt“), um den Anteil an nicht-biotinylierten Molekülen zu entfernen. Die erste Hybridisierung diente der Entfernung des cPSTVd durch Hybridisierung an die dimere (-)-Biotinsonde mit anschließender Separation über Dynabeads. Die Hybridisierung erfolgte unter Standardbedingungen und nicht in Anwesenheit von Harnstoff. Zurück im Ansatz verbleiben

- die endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes
- *de-novo*-entstandenes (-)-Transkript („Ziel“-RNA)
- evtl. „falsche“ Hybride aus cPSTVd und *de-novo* (-)-PSTVd-RNA

Die (-)-RNA-enthaltenden Fraktionen (s. 3.III.6) wurden gepoolt und die Nukleinsäure mit Ethanol präzipitiert. Das Pellet wurde direkt in die 2. Hybridisierung eingesetzt. Die im Anschluss durchgeführte zweite Hybridisierung diente der Entfernung aller restlichen cPSTVd-Moleküle, die sich möglicherweise in sogenannten „falschen“ Hybriden befinden. Zu diesem Zweck findet das zweite „Fischen“ in Anwesenheit von 8 M Harnstoff statt, um diese Hybride zu „sprengen“ und die Hybridisierung der Biotin-Sonde an die aus den „falschen“ Hybriden freigesetzten (+)-cPSTVd-Moleküle zu ermöglichen.

Der 2. Hybridisierungsansatz enthielt folgende Nukleinsäure-Komponenten

- eine unbekannte Menge an endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes
- eine unbekannte Menge an *de-novo*-entstandenem (-)-Transkript („Ziel“-RNA)
- eine unbekannte Menge an evtl. verbliebenem cPSTVd (gebunden in sog. „falschen“ Hybriden)
- 750 ng dimeres (-)-Transkript (pSH 3), mit einem Biotinylierungsgrad von 20 % als biotinylierte Sonde zum „Fischen“ des cPSTVd

Nach der 2. Hybridisierung, die entsprechend den unter 2.12.3 angegebenen Bedingungen durchgeführt wurde, war von einer vollständigen Entfernung des cPSTVd aus dem Ansatz auszugehen. Die nun anschließende 3. Hybridisierung erfolgte ebenfalls unter Standardbedingungen ohne Harnstoff und diente der Separation der „Ziel“-RNA, nämlich der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA von den verbliebenen endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes. Demzufolge enthielt der 3. Hybridisierungsansatz folgende Nukleinsäure-Komponenten:

- eine unbekannte Menge an endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes
- eine unbekannte Menge an *de-novo*-entstandenem (-)-Transkript („Ziel“-RNA)
- 300 ng dimeres (+)-Transkript (pRH 717), mit einem Biotinylierungsgrad von 20 % als biotinylierte Sonde zum „Fischen“ der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA

Bei der anschließenden Dynabeads-Aufreinigung wurde jede Fraktion gesammelt, die enthaltene Nukleinsäure mit Ethanol präzipitiert, das Pellet in Auftragspuffer resuspendiert und bei -20°C zur späteren Analyse gelagert. Es wurden anschließend die Fraktionen „MM“ und „FA“ der ersten beiden Hybridisierungen, sowie alle Fraktionen der dritten Hybridisierung in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mittels Northern-Blot analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.III.14 auf der folgenden Seite dargestellt.

Abb. 3.III.14 zeigt, dass mit Hilfe des etablierten Aufreinigungsverfahrens *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA aufgereinigt werden konnte. Betrachtet man die Spuren 7-10, sieht man deutlich ein sehr starkes Signal auf Höhe des Dimers (vgl. mit Spur 1). Das entspricht den Erwartungen, da für die beiden ersten Hybridisierungen sowohl die „MM“- , als auch die „FA“-Fraktionen aufgetragen wurden. In diesen beiden Fraktionen wird während der Aufreinigung die dimere, biotinylierte (-)-Sonde eluiert, d.h. in der „MM“-Fraktion wird sie wahrscheinlich zu einem Teil durch den eingesetzten Harnstoff von den Dynabeads gelöst, während das Formamid eigens dazu verwendet wird, die Sonde von den Streptavidinpartikeln zu lösen. Die Spuren 11-15 zeigen alle Fraktionen der 3. Hybridisierung, die der Isolation der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA diente. Man sieht in den Spuren 11-13 keinerlei Signal, was bedeutet, dass hier keine Nukleinsäure von der Sonde eluiert wird. Erst in der „MM“- , und der „FA“-Fraktion treten Signale auf. Bei erfolgreicher Aufreinigung sollte die „Ziel“-RNA, also die neu-entstandene (-)-PSTVd-RNA in der „MM“-Fraktion eluiert werden, da das der Schritt ist, wo „Substrat“ und Sonde getrennt werden. Dass sowohl die Isolation aus dem Gesamt-Transkriptions-Ansatz, als auch die Elution der (-)-RNA von der zur Separation verwendeten Biotin-Sonde gelungen ist, zeigt das deutliche Signal von detektierter PSTVd-(-)-RNA (Spur 14). Zusätzlich ist ein entsprechendes, wenn auch deutlich schwächeres Signal in der „FA“-Fraktion zu beobachten, das wahrscheinlich auf eine unvollständige Ablösung der (-)-RNA von der Sonde zurückzuführen ist (Spur 15). Im Ansatz ohne cPSTVd als exogenes Template ist kein Hybridisierungssignal zu erkennen, was bedeutet, dass es sich bei den Signalen in den Spuren 14 und 15 tatsächlich um durch Transkription neu-entstandene (-)-PSTVd-RNA handelt und nicht um ein unspezifisches Signal durch das radioaktive Transkript. Läge eine unspezifische Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonde an eine „falsche“ Nukleinsäure vor, so müsste dieses Signal auch im Ansatz ohne exogenes Template zu detektieren sein. Betrachtungen des „Signals“ in den Spuren 14 und 15 zeigen, dass es sich hier weniger um eine distinkte Bande handelt, sondern vielmehr um einen „Schmier“, der sich fast über die gesamte Spur zieht. Das kann mehrere Gründe haben. Zum einen kann es sich hierbei um Degradationsfragmente handeln, die durch die im Kernextrakt vorhandenen, aktiven Nukleasen verursacht werden; zum anderen können es neu-entstandene Transkripte sein, die auf Grund unterschiedlich terminierter Transkription der Pol II keine einheitliche Länge besitzen. Zusammenfassend konnte jedoch gezeigt werden, dass sich Viroid-RNA mit (-)-Polarität aus dem Transkriptionsansatz aufreinigen lässt, der mit cPSTVd inkubiert worden war, was bedeutet, dass es sich tatsächlich um ein Transkriptionsprodukt handeln muss.

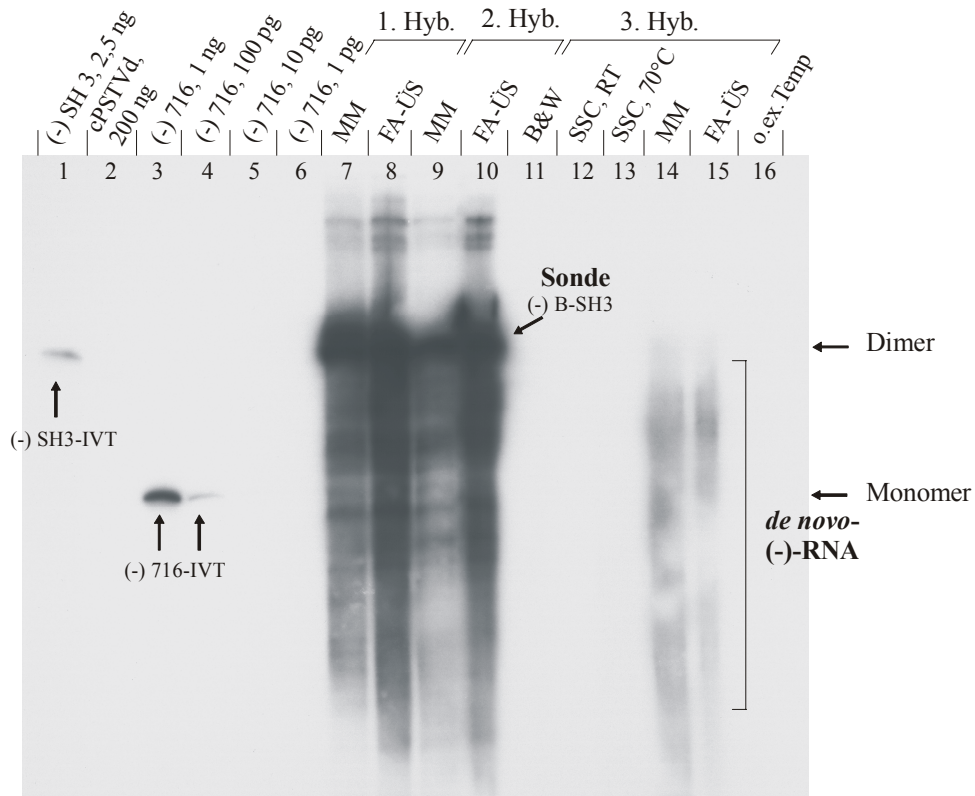


Abb. 3.III.14

Nachweis neu-entstandener (-)PSTVd-RNA mit (-)PSTVd-spezifischer Northern-Blot-Analyse.

Alle drei Hybridisierungen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Isolation der jeweiligen „Ziel“-RNA erfolgte über Dynabeads. Alle verwendeten Biotin-Sondenmoleküle wurden in einem vorgelagerten Schritt „prä“-aufgereinigt. Als exogenes Template wurden 500 ng cPSTVd verwendet. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen und mit 15 µg Protein aus dem präparierten Zellkernextrakt einer nicht-infizierten Kartoffelzellkultur. Das cPSTVd ((+)-Polarität) wurde über zwei Hybridisierungsschritte an 2 x 750 ng Biotin-markierte, dimere (-)PSTVd-Sonde (pSH 3) gebunden aus dem Ansatz entfernt. Die *de-novo*-(-)PSTVd-RNA wurde durch Hybridisierung an 300 ng Biotin-markierte, dimere (+)PSTVd-Sonde (pRH 717) aus dem Ansatz entfernt. Die Isolation erfolgte über die Aufreinigung mit 2 x 50 µg Dynabeads („Fischen“ des cPSTVd) bzw. 1 x 100 µg Dynabeads („Fischen“ der *de-novo*-(-)PSTVd-RNA). Die Überstände der einzelnen Waschschriffe wurden präzipitiert, auf ein 5 % Polyacrylamid-Gel (30 %, 30:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE) aufgetragen und die Nukleinsäure anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Der Nachweis von (-)PSTVd-RNA erfolgte über Hybridisierung einer radioaktiven Sonde mit (+)-Polarität. Exposition: über Nacht bei -70°C, mit Verstärkerfolie - Zur Trennung von Sonde und „Ziel“-RNA wurde bei 75°C mit 8 M Harnstoff eluiert. Spur 1: dimeres (-)*in-vitro*-Transkript (731 Nt, Längenstandard); Spur 2: cPSTVd (359 Nt), als Spezifitätskontrolle der Sonde; Spuren 3-6: monomeres (-)PSTVd-*in-vitro*-Transkript (368 Nt), als Längenstandard und zur Bestimmung der Nachweisgrenze; Spuren 7, 8: Fraktionen der 1. Hybridisierung (Entfernen des cPSTVd); Spuren 9, 10: Fraktionen der 2. Hybridisierung (Entfernen des evtl. verbliebenen cPSTVd); Spuren 11-15: Einzelne Fraktionen der 3. Hybridisierung (Isolation der *de-novo*-(-)PSTVd-RNA); Spur 16: Ansatz ohne cPSTVd als exogenes Template

3.IV Bestimmung des 5' -Endes der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA

Mit Hilfe des etablierten Aufreinigungsverfahrens konnte neu-synthetisierte (-)-Strang-PSTVd-RNA aus dem Transkriptionsansatz isoliert und im Northern-Blot nachgewiesen werden. Zur Bestimmung der „Startstelle(n)“ der Pol II musste das 5'-Ende der neu-entstandenen Transkripte bestimmt werden. Da das 5'-Ende der neu-synthetisierten RNA auf Grund der Syntheserichtung der Transkriptionsreaktion dem „ersten“ durch die Pol II eingebauten Nukleotid entspricht, muss das komplementäre Nukleotid auf dem Matrizenstrang diejenige Stelle sein, an der die Pol II mit der Transkription beginnt. Die Detektion des 5'-Endes der neu-entstandenen (-)-RNA liefert also gleichzeitig die Startstelle der Pol II auf dem zirkulären (+)-Strang (cPSTVd). Die Bestimmung des 5'-Endes erfolgte mittels der Primer-Extension-Reaktion. Da es weder Anhaltspunkte über die Anzahl der Startstelle(n), noch über die Lage der potentiellen Startstelle(n) in der cPSTVd-Sequenz gab, wurden zwei verschiedene Primer gewählt, die sequenziell genau „ein halbes Viroid“ voneinander entfernt lagen, so dass mindestens einer der Primer ein Signal liefern sollte. Unklar war, ob der nach der Aufreinigung eluierte „Schmier“ sich überhaupt extendieren ließ und wenn, ob die Transkripte über ein einheitliches 5'-Ende verfügen, so dass eine einzige Bande zu detektieren ist. Schließlich konnte nicht ausgeschlossen werden, dass die Pol II „wahllos“ mit der Transkription beginnt, d.h. keine spezielle Startsequenz benötigt, sondern vielmehr an jedem beliebigen Nukleotid beginnen kann. In diesem Fall wären keine distinkten Banden nach der Primer-Extension zu erwarten. Die in der PE-Reaktion verwendeten Primer und deren Position in der cPSTVd-Sequenz sind in Abb. 3.IV.15 dargestellt.

Zunächst wurde eine Primer-Extension-Analyse durchgeführt, die sich an ein Transkriptionsexperiment (und die darauffolgende Aufreinigung) anschloss, in dem 100 ng cPSTVd als exogenes Template eingesetzt wurden. Die Primer-Extension-Analyse mit den beiden verwendeten Primern AF9 und AF21 lieferte kein eindeutiges Ergebnis. So konnte mit dem Primer AF21 keinerlei Signal detektiert werden, wohingegen mit dem Primer AF9 die Detektion distinkter Banden möglich war, die aber auch in den Kontrollansätzen ohne cPSTVd als Template auftraten und somit nicht von *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA stammen konnten (Daten nicht gezeigt). Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der erfolgreichen Aufreinigung (s. 3.III.5, Abb. 3.III.13) schien es unverständlich, warum die spezifisch aufge-

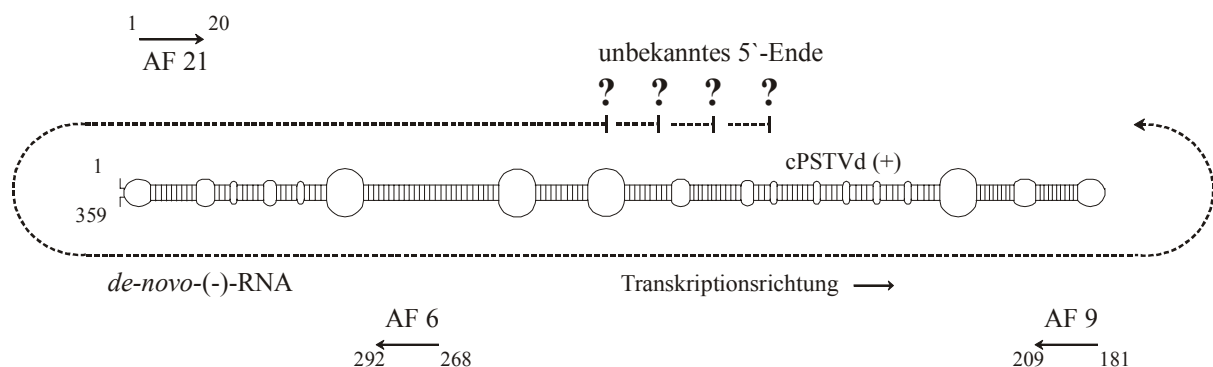


Abb. 3.IV.15

Position der betrachteten PE-Primer AF9, AF6, und AF21, die zum Nachweis *de-novo*-synthetisierter (-)-PSTVd-RNA verwendet wurden.

Die PE-Primer sind gegen (-)-Polarität gerichtet, haben also selber (+)-PSTVd-Sequenz. Ihre Nukleotidangaben beziehen sich auf das cPSTVd-Molekül.

reinierte *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA keine ausreichende Menge an Ausgangsprodukt für eine Primer-Extension-Analyse darstellte, um ein spezifisches Signal zu detektieren. Mehrere Erklärungen sind in diesem Zusammenhang denkbar:

- die *de-novo*-Transkripte weisen kein einheitliches 5' -Ende auf;
- durch die unterschiedliche Länge der Transkripte wird möglicherweise die Bindung des Primers verhindert, da die komplementären Bereiche des Transkripts fehlen;
- zu wenig Template in die Transkriptionsreaktion eingesetzt; es entsteht zu wenig Produkt, das dann auf Grund der Nachweisgrenze nicht detektiert werden kann
- bei der Aufreinigung kann es zur Degradation der neugebildeten Nukleinsäure kommen

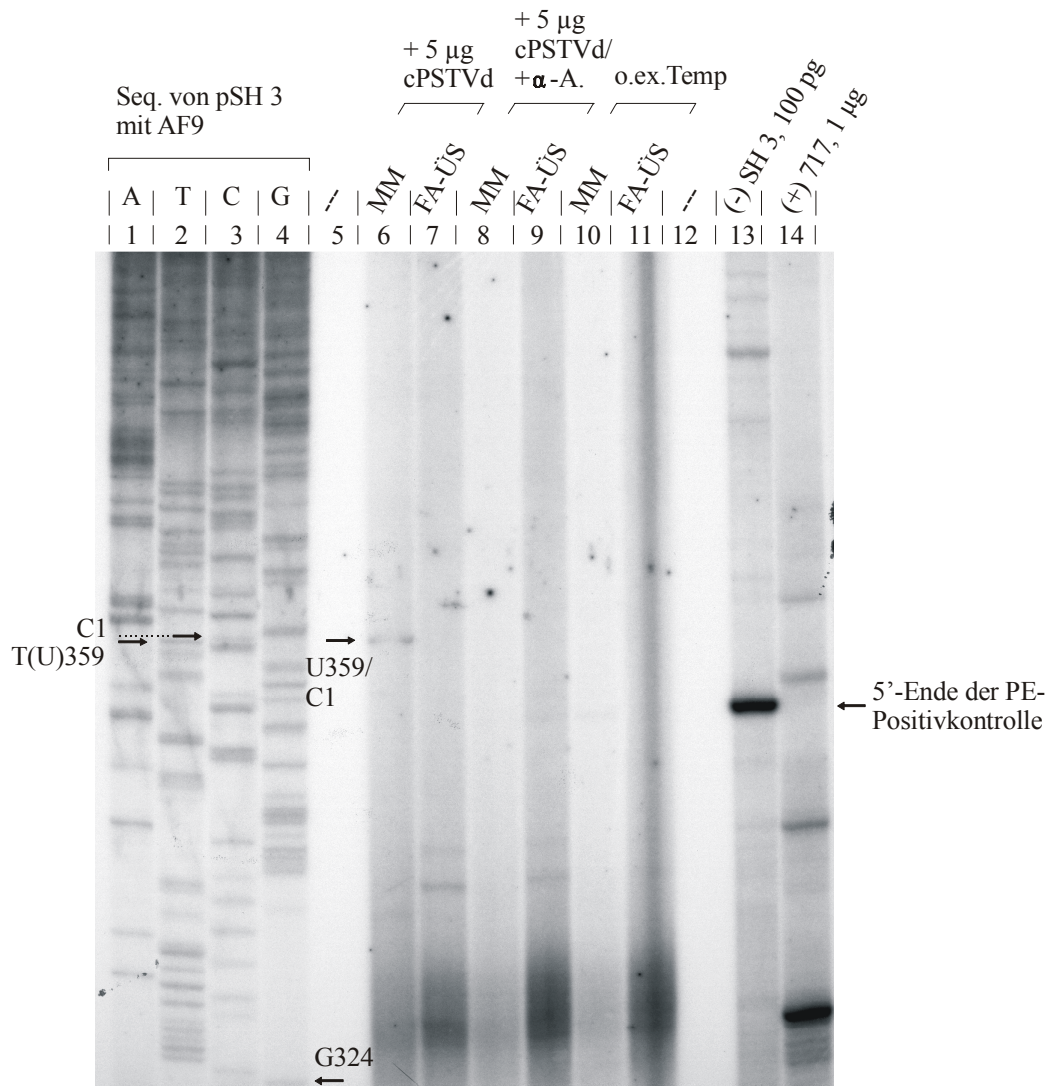
Um den Problemen zu begegnen wurden folgende Überlegungen angestellt:

- da Primer AF21 gar kein Signal lieferte, während AF9 zumindest ein, wenn auch unspezifisches Signal zeigte, wurde in den folgenden Primer-Extension-Analysen ausschließlich AF9 verwendet.
- sollten alle neu-entstandenen Transkripte über ein unterschiedliches 5'-Ende verfügen, so kann die Primer-Extension bestenfalls dasjenige 5'-Ende bestimmen, das die meisten der Transkripte aufweisen. Gibt es ein solches „hauptsächliches“ 5'-Ende nicht, bleiben die Analysen mittels Primer-Extension ergebnislos, da die Primer-Extension-Produkte, wenn sie ausnahmslos unterschiedliche Längen besitzen, die Methode unter die Nachweisgrenze rücken. Da aber von einem „hauptsächlichen“, wenn auch möglicherweise nicht für alle Transkripte identischen 5'-Ende der neu-synthetisierten (-)-RNA ausgegangen wurde, schien die Erhöhung der Konzentration des Ausgangstemplates eine Möglichkeit, dieses „hauptsächliches“ 5'-Ende detektieren zu können.

Da die Erhöhung der Menge an Ausgangstemplate essentiell schien, wurden im Folgenden 5 µg (statt 100 ng) cPSTVd als exogenes Template den entsprechenden Transkriptionsansätzen zugegeben. Darüber hinaus wurde ein frisch präparierter Kernextrakt verwendet, um ein Scheitern des Experimentes auf Grund des zu hohen Alters des Kernextraktes und der damit verbundenen abnehmenden Pol II-Aktivität ausschließen zu können. Es wurden drei Ansätze parallel betrachtet.

- 1) Transkriptionsansatz mit cPSTVd als exogenes Template
- 2) Transkriptionsansatz mit cPSTVd als exogenes Template, sowie 10^{-5} M α -Amanitin (Pol II-Inhibitor)
- 3) Transkriptionsansatz ohne exogenes Template (bzw. mit Wasser)

Die Transkriptionsreaktion einschließlich der Phenol/Chloroform-Extraktion wurde weitgehend entsprechend den von Fels etablierten Bedingungen durchgeführt (2.10.2). Allerdings wurde der Transkriptionsansatz zunächst ohne Template und ohne rNTPs für 5 min bei 28°C inkubiert, um ihn vollständig auf die Solltemperatur zu erwärmen und um der zugesetzten DNase ein Abdauen der endogenen DNA – die um die Bindung an die Pol II konkurriert – zu ermöglichen. Erst nachdem der Ansatz bereits 5 Minuten bei 28°C inkubiert, wurde das Template (5 µg cPSTVd) bzw. Wasser zugegeben und der Ansatz für weitere 5 min inkubiert. Diese Zeit sollte ausreichen, um die Ausbildung des Transkriptions-Initiationskomplexes zwischen dem cPSTVd, der Pol II, sowie weiterer Transkriptionsfaktoren zu ermöglichen (Wagner, mündl. Mitteilung). Im Anschluss wurden die rNTPs zugegeben und entsprechend dem Protokoll von Fels weiterverfahren. Nach der Transkription

**Abb. 3.IV.16****Bestimmung des 5' -Endes der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA.**

Primer-Extension-Analyse des *in-vitro*-Transkriptionsansatzes nach Aufreinigung durch Hybridisierung der Nukleinsäure an biotinylierte Sondenmoleküle und anschließender Isolation der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA über Dynabeads. In der PE verwendeter Primer: AF9, T_{PE} : 55°C. Aufgetragen wurde der gesamte Primer-Extension-Ansatz. Autoradiographie des entsprechenden Sequenziergels (8 % PAA, 40 %, 19:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE). Spuren 1-4: Sequenzierung: pSH 3 mit AF9; erstes lesbares Nukleotid: G 324; Spuren 6-11: Analyse nach Transkription im Kernextrakt: aufgetragen „MM“ und „FA“-Fraktionen der Dynabeads-Aufreinigung der 3. Hybridisierung („Fischen“ der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA); Spuren 6, 7: cPSTVd als exogenes Template; Spuren 8, 9: cPSTVd als exogenes Template und α -Amanitin; Spuren 10, 11: ohne exogenes Template (Nullkontrolle); Spur 13: 100 pg dimeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pSH 3) als Positivkontrolle für die PE; Spur 14: 1 µg dimeres (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pRH 717) als Kontrolle für die Spezifität des Primers; Exposition: 14 d bei -70°C, mit Verstärkerfolie. Nur im Ansatz mit cPSTVd als exogen zugegebenem Template ist ein spezifisches Signal zu detektieren (Spur 6). Bestimmtes 5' -Ende der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA: U359/C1

erfolgte die in dieser Arbeit etablierte Aufreinigung der neu-entstandenen (-)-PSTVd-RNA. Hierbei wurde wie unter 2.12.3 beschrieben verfahren. Die isolierte *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA konnte anschließend in einer Primer-Extension-Reaktion untersucht werden. Da die Trennung der „Ziel“-RNA von der biotinylierten Sonde nicht immer zu 100 % durch die Zugabe von Harnstoff gelang, wurden sowohl die „MM“--, als auch die „FA“-Fraktionen zur Primer-Extension-Analyse eingesetzt, die entsprechend (2.11.4) bei einer Temperatur von 55°C durchgeführt wurde. Als Kontrollen wurden 100 pg dimere (-)-Sonde (SH 3), sowie 1 µg dimere (+)-Sonde (pRH 717) eingesetzt. Dies war wichtig, um bei einem positiven Ergebnis der Primer-Extension zwischen einem „echten“ Signal (von *de-novo*-(-)-RNA) und einem möglicherweise „falschen“ Signal, das von einer der zur Isolation verwendeten Biotin-Sonden herrührt, zu diskriminieren. Das Ergebnis der Primer-Extension-Analyse ist in Abb. 3.IV.16 auf der vorherigen Seite dargestellt.

Mit Hilfe der Primer-Extension-Analyse konnte ein spezifisches Signal im Transkriptionsansatz mit cPSTVd detektiert werden (s. Spur 6). Anhand der nebenan aufgetragenen Sequenzierung konnte es als Nukleotid U359 bzw. C1 identifiziert werden. Eine exakte Diskriminierung zwischen diesen beiden Nukleotiden war nicht möglich. In allen anderen Ansätzen ist kein entsprechendes Signal zu erkennen. Dies ist in absoluter Übereinstimmung mit den bisherigen Experimenten. So sollte (bei erfolgreichem Verlauf) lediglich in der „MM“-Fraktion desjenigen Ansatzes mit cPSTVd als exogenem Template ein Signal zu detektieren sein, wohingegen die anderen Ansätze entweder mit einem Pol II-Inhibitor inkubiert wurden, also kein *de-novo*-Transkript entstehen sollte, oder vollständig ohne exogenes Template inkubiert wurden und somit auf Grund des fehlenden Templates für eine PSTVd-Transkription ebenfalls kein Signal liefern sollten. In den Spuren 6-11 sind die „MM“--, und „FA“-Fraktionen aller drei Transkriptionsansätze aufgetragen. Zu erwarten war, dass der Ansatz mit cPSTVd ein (oder mehrere) Signal(e) liefert; der Ansatz mit zugesetztem Pol II-Inhibitor – α -Amanitin – kein oder zumindest ein deutlich schwächeres Signal zeigt und in dem Ansatz ohne cPSTVd als exogenem Template kein Signal zu detektieren ist. Betrachtet man die erwähnten Spuren 6-11, so entspricht das Ergebnis exakt den Erwartungen. Ausschließlich im Ansatz mit cPSTVd kam es zur Transkription des zirkulären Viroid-(+)-Stranges durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II. Die anschließende Aufreinigung ermöglichte die Separation der *de-novo*-entstandenen (-)-PSTVd-RNA, so dass deren 5'-Ende bestimmt werden konnte. Es gelang die vollständige Trennung des Transkriptionsproduktes, nicht nur von den übrigen Nukleinsäuren des Transkriptionsansatzes, sondern auch von der Sonde, mit welcher es isoliert wurde (vgl. Spuren 6 und 7). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Transkription tatsächlich durch die Pol II vermittelt wird, da ihr spezifischer Inhibitor α -Amanitin vollständig die Neusynthese einer (-)-RNA verhinderte (vgl. Spuren 8 und 9). Im Ansatz ohne exogenes Template ist erwartungsgemäß ebenfalls kein Signal auf entsprechender Höhe zu detektieren, was eine unspezifische Aufreinigung von einer kernextrakteigenen Nukleinsäure ausschließt. Darüber hinaus kann ein „falsches“ Primer-Extension-Signal durch Bindung des Primers an eine der zur Aufreinigung verwendeten Sonden ebenfalls ausgeschlossen werden, da die Kontrollen (Spuren 13 und 14) kein entsprechendes Signal aufweisen. Es war also gelungen einen transkriptionsaktiven Kernextrakt zu präparieren, die in ihm durch die Pol II synthetisierte (-)-PSTVd-RNA zu isolieren und ihr 5' -Ende zu bestimmen.

3.IV.1 Unabhängige Reproduktion in einem zweiten Kernextrakt

Zur Reproduktion der gewonnenen Ergebnisse wurde das identische Experiment in einem neu-präparierten, unabhängigen Kernextrakt wiederholt. Die Versuchsbedingungen entsprachen exakt denen unter 3.IV. Das Ergebnis ist in Abb. 3.IV.17 dargestellt.

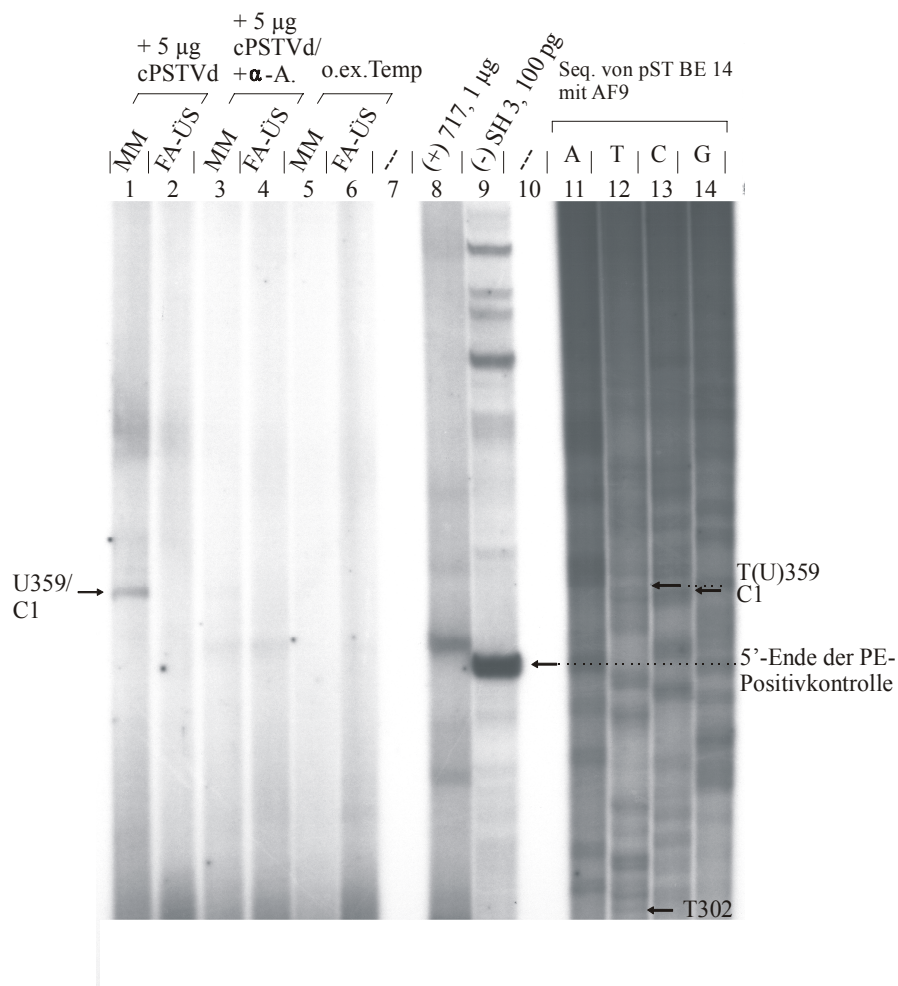


Abb. 3.IV.17

Reproduktion der Transkriptionsanalyse in einem zweiten, unabhängigen Kernextrakt.

Primer-Extension-Analyse des *in-vitro*-Transkriptionsansatzes nach Aufreinigung durch Hybridisierung der Nukleinsäure an biotinylierte Sondenmoleküle und anschließender Isolation der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA über Dynabeads. In der PE verwendeter Primer: AF9, T_{PE} : 55°C. Aufgetragen wurde der gesamte Primer-Extension-Ansatz. Autoradiographie des entsprechenden Sequenziergels (8 % PAA, 40 %, 19:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE). Spuren 1-6: Analyse nach Transkription im Kernextrakt: aufgetragen „MM“ und „FA“-Fraktionen der Dynabeads-Aufreinigung der 3. Hybridisierung („Fischen“ der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA); Spuren 1, 2: cPSTVd als exogenes Template; Spuren 3, 4: cPSTVd als exogenes Template und α -Amanitin; Spuren 5, 6: ohne exogenes Template (Nullkontrolle); Spur 8: 1 µg dimeres (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pRH 717) als Kontrolle für die Spezifität des Primers; Spur 9: 100 pg dimeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pSH 3) als Positivkontrolle für die PE; Spuren 12-14: Sequenzierung: pRTBE 14 mit AF9; erstes lesbares Nukleotid: T 302. Exposition: 14 d bei -70°C, mit Verstärkerfolie. Nur im Ansatz mit cPSTVd als exogen zugegebenem Template ist ein spezifisches Signal zu detektieren (Spur 1). Detektiertes 5' -Ende der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA: U359/C1

Die Exposition lieferte die Bestätigung des vorausgegangenen Experiments. Auch hier war ein entsprechendes Signal bei U359 bzw. C1 zu detektieren. Die nukleotidgenaue Zuordnung war bei dieser Exposition auf Grund ihrer Unschärfe schwieriger, ließ sich aber letztlich auf den identischen Bereich eingrenzen. Auch hier stimmten alle Kontrollen mit den Erwartungen überein. Das Fehlen des in Spur 1 auftretenden Signals in allen übrigen Spuren beweist auch in diesem Experiment sowohl die Identität des Signals als durch Transkription mit der Pol II entstandene *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA, als auch die Spezifität der Aufreinigung.

3.IV.2 Nachweis des 5'-Endes mit einem zweiten, unabhängigen Primer

Die vorausgegangenen Primer-Extension-Analysen wurden ausschließlich mit dem Primer AF9 durchgeführt, der in einem Abstand von 91 Nukleotiden von dem detektierten 5'-Ende an die *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA bindet. Um dieses Signal als das 5'-Ende der neu-entstandenen (-)-PSTVd-RNA zu verifizieren, wurde das Transkriptionsexperiment sowie Aufreinigung und die anschließende Primer-Extension erneut wiederholt, diesmal mit einem PE-Primer, der auf Grund seiner Sequenz und Position komplementär zum cPSTVd ein identisches Signal liefern sollte, wenn es sich bei dem bisher detektierten Signal um nachgewiesene (-)-Viroid-RNA handelt. Die Positionen der beiden betrachteten Primer ist in Abbildung 3.IV.15 dargestellt. Da der zweite Primer (AF6) sich innerhalb derjenigen Sequenz befindet, die bereits durch den ersten Primer (AF9) identifiziert wurde, muss auch für AF6 ein komplementärer Sequenzbereich existieren, wenn es sich bei der durch AF9 detektierten Nukleinsäure-Sequenz tatsächlich um aufgereinigte (-)-PSTVd RNA handelt.

Auch in diesem Experiment entsprachen die gewählten Bedingungen sowohl der Transkriptionsreaktion, als auch der Aufreinigung exakt den unter 3.IV beschriebenen. Lediglich die Temperatur der Primer-Extension-Reaktion wurde entsprechend des T_M -Wertes des verwendeten Primers auf 56°C angepasst. Die anschließende Analyse erfolgte in einem Sequenzigel und ist in Abb. 3.IV.18 auf der folgenden Seite dargestellt.

Durch die Verwendung eines zweiten unabhängigen Primers konnte das identische Signal detektiert werden. Auch innerhalb dieser Analyse trat es wie erwartet lediglich in der „MM“-Fraktion desjenigen Transkriptionsansatzes auf, dem cPSTVd als exogenes Template zugegeben worden war und in dem die Transkription nicht durch die Hemmung der Pol II durch die Zugabe von α -Amanitin unterbunden war. Vergleiche der Spuren 6-11 zeigen auch hier das identische Bild der vorausgegangenen Primer-Extension-Analysen. Auch hier tritt das spezifische Signal in keiner der anderen Spuren auf. Somit kann sicher davon ausgegangen werden, dass das detektierte Signal von neu-entstandener (-)-PSTVd-RNA herrührt, die im Kernextrakt durch die Transkription von cPSTVd mit der DNA-abhängigen Pol II entstanden ist (vgl. Spuren 1 und 3 [Ansatz mit α -Amanitin]). Im Anschluss an die Transkription konnte die *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA mit Hilfe der etablierten Aufreinigungsmethode aus dem Gesamtpool an Nukleinsäuren isoliert und ihr 5' -Ende in einer anschließenden Primer-Extension-Analyse bestimmt werden. Unterschiedliche Experimente, sowohl mit identischem Primer in verschiedenen, voneinander unabhängigen Kernextrakten, als auch die Analyse mit verschiedenen Primern im gleichen Kernextrakt lieferten ein identisches Ergebnis. Das detektierte 5' -Ende der *de-novo*-PSTVd(-)-RNA liegt also bei Nukleotid U359 bzw. C1.

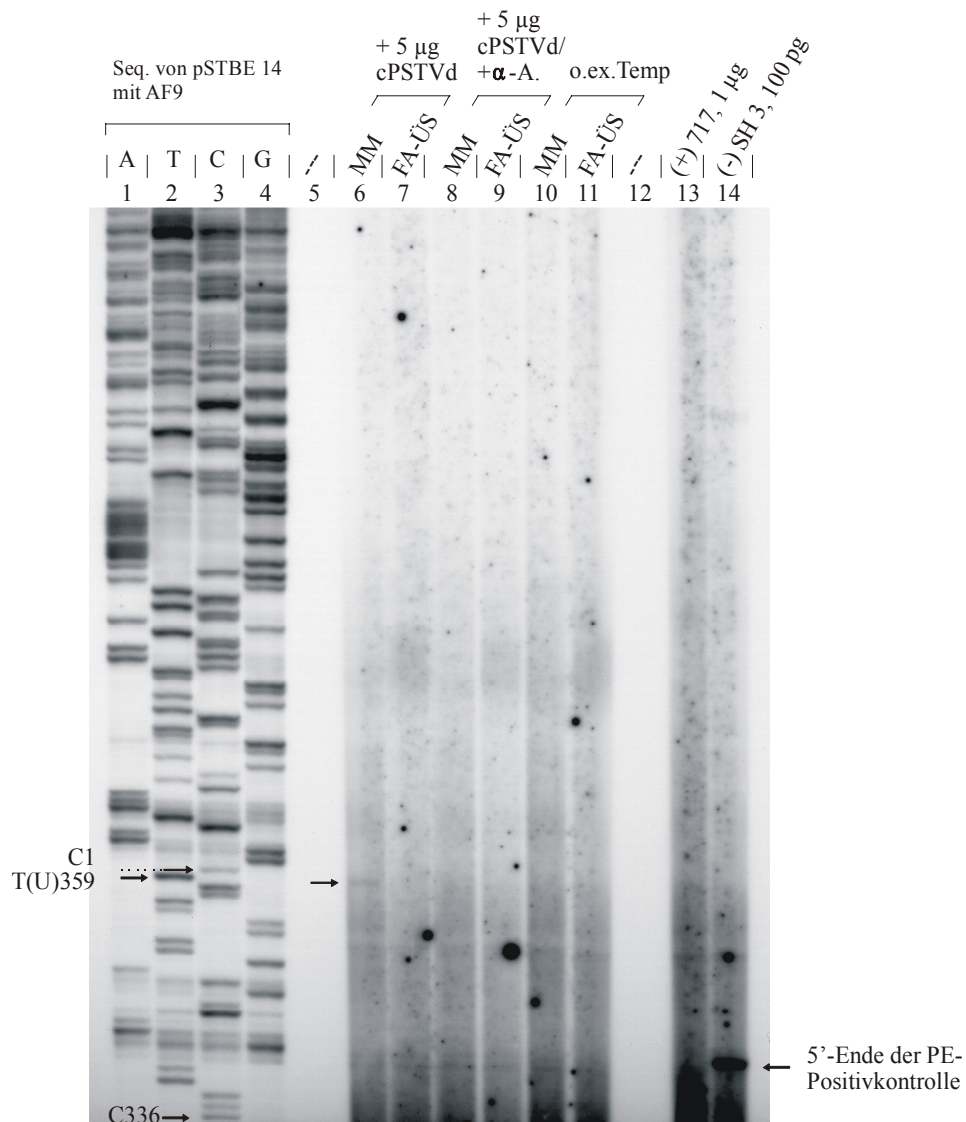


Abb. 3.IV.18

Reproduktion der Bestimmung des 5'-Endes der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA mit einem zweiten, unabhängigen Primer (AF6).

Primer-Extension-Analyse des *in-vitro*-Transkriptionsansatzes nach Aufreinigung durch Hybridisierung der Nukleinsäure an biotinylierte Sondenmoleküle und anschließender Isolation der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA über Dynabeads. In der PE verwendeter Primer: AF6, T_{PE} : 56°C. Aufgetragen wurde der gesamte Primer-Extension-Ansatz. Autoradiographie des entsprechenden Sequenziergels (8 % PAA, 40 %, 19:1, 8 M Harnstoff, 1 x TBE). Spuren 1-4: Sequenzierung: pRTBE 14 mit AF6; erstes lesbares Nukleotid: C 336; Spuren 6-11: Analyse nach Transkription im Kernextrakt: aufgetragen „MM“ und „FA“-Fraktionen der Dynabeads-Aufreinigung der 3. Hybridisierung („Fischen“ der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA); Spuren 6, 7: cPSTVd als exogenes Template; Spuren 8, 9: cPSTVd als exogenes Template und α-Amanitin; Spuren 10, 11: ohne exogenes Template (Nullkontrolle); Spur 13: 1 µg dimeres (+)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pRH 717) als Kontrolle für die Spezifität des Primers; Spur 14: 100 pg dimeres (-)-PSTVd-*in-vitro*-Transkript (pSH 3) als Positivkontrolle für die PE; Exposition: 14 d bei -70°C, mit Verstärkerfolie. Nur im Ansatz mit cPSTVd als exogenem zugegebenem Template ist ein spezifisches Signal zu detektieren (Spur 6). Bestimmtes 5' -Ende der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA: U359/C1

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Themenschwerpunkte untersucht. Der zunächst angestrebte Nachweis der Startstelle des zweiten Schrittes der PSTVd-Replikation – der Startstelle auf dem (-)-Strang –, wurde bis zum Nachweis der (+)-Strang-Transkripte in Abhängigkeit von (-)-Strang Template durchgeführt. Der Nachweis der *de-novo*-entstandenen Transkripte erfolgte über Northern-Blot-Analysen. Die Bestimmung des 5'-Endes dieser Transkripte war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, da sowohl die Transkriptionsreaktion, als auch die Isolierung und Aufreinigung von *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA sehr schwierig ist. Als System zur Analyse der Transkriptionsreaktion wurde ein *in-vitro*-System verwendet, das aus Zellkernextrakten einer nicht-infizierten Kartoffelzellkultur bestand.

Im Zuge der Experimente sollten Reproduktionsexperimente durchgeführt werden, die der Verifizierung der Startstellen auf dem zirkulären (+)-Strang dienen sollten. Hierbei stellte sich heraus, dass sich die Ergebnisse der vorausgegangenen Arbeit nicht reproduzieren ließen, sondern diese vielmehr eine Fehlinterpretation eines unspezifischen Signals darstellten. Aus diesem Grund wurde die Analyse des zweiten PSTVd-Transkriptionsschrittes (von (-) nach (+)) zurückgestellt und stattdessen die erneute Analyse der Transkriptionsstartstelle des ersten Transkriptionsschrittes vom zirkulären (+)-Strang zum (-)-Strang durchgeführt. Die Grundlage hierfür bildete eine vorausgegangene Arbeit, in der zwei „Initiationsstellen“ für den ersten Schritt der PSTVd-Replikation detektiert worden waren. Es handelte sich hierbei um die Nukleotide A 111 und A 325. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Kontrollexperimente gaben verstärkt Hinweise darauf, dass die Signale, die damals als Startstellen interpretiert wurden vielmehr Primer-Extension-Signale auf Grund von unspezifischer Bindung von Primern mit PSTVd-Sequenz an endogene Nukleinsäuren des Kernextraktes sind. Mögliche unspezifische Paarungen ergeben sich aus dem verwendeten *in-vitro*-System, bestehend aus Kernextrakten von Zellen nicht-infizierter Kartoffellinien (*S. tuberosum*, HH 258), die mit ihren endogenen Nukleinsäuren eine große Menge an „fremden“ Nukleinsäuren anbieten.

Um nun neu-synthetisierte PSTVd-RNA von den endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes zu trennen – und so eine unspezifische Wechselwirkung mit PSTVd-Primern zu verhindern – wurde ein Aufreinigungsverfahren etabliert, das es ermöglicht, spezifisch und ausschließlich die durch Transkription im Kernextrakt neu-entstandene PSTVd-RNA aufzureinigen. Nach gezielter Isolation der neu-entstandenen Transkripte konnten diese mittels Primer-Extension analysiert und ihr 5'-Ende bestimmt werden.

Im Folgenden soll hauptsächlich auf drei Punkte eingegangen werden.

- 1) Zunächst soll dargestellt werden, warum die Untersuchung des zweiten Transkriptionsschrittes (von (-) nach (+)), bzw. die Detektion und Analyse von *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA so schwierig ist
- 2) Anschließend soll erläutert werden, wie es zur Interpretation der experimentellen Daten der vorausgegangenen Arbeit kam, und wie man dieselben Ergebnisse im Rahmen der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erklären kann.
- 3) Schließlich soll auf die Spezifität der hier etablierten Aufreinigungsmethode eingegangen werden.

4.1 Methodische Aspekte

Zur generellen Analyse der PSTVd-Transkription – unabhängig ob von (-) nach (+) oder von (+) nach (-) – wurden aus nicht-infizierten Kartoffelzellkulturen präparierte Kernextrakte verwendet. Da zur Analyse der PSTVd-Transkription, einschließlich der späteren Analysen der neu-entstandenen Transkripte das Viroid extern, als sogenanntes exogenes Template dem Kernextrakt zugegeben wurde, musste eine nicht-infizierte Zellkultur verwendet werden, da nur so zum einen eine kontrollierte Menge an PSTVd zugegeben werden kann und zum anderen die entstandenen Transkripte eindeutig einem bestimmten Transkriptionsereignis zugeordnet werden können und nicht auf Grund steter Transkription permanent vorliegen. Zur Untersuchung der Transkriptionsreaktion wurden Zellen der Linie *S. tuberosum* HH 258 verwendet (s. auch 2.5.2). Der daraus präparierte Kernextrakt stellt ein *in-vitro*-System dar, das die *in-vivo*-Situation sehr gut repräsentiert. Bei erfolgreicher Präparation des Kernextraktes enthält dieser nicht nur eine transkriptionsaktive Polymerase II (Pol II), sondern eventuell auch relevante Transkriptionsfaktoren, so dass Transkriptionsanalysen ohne Zugabe weiterer Komponenten durchgeführt werden können. Theoretisch wäre auch die Verwendung einer aufgereinigten Polymerase II aus Weizenkeimen denkbar (Goodman *et al.*, 1984), allerdings befände man sich dann nicht mehr im homologen System und die gewonnenen Daten müssten hinsichtlich ihrer Aussagekraft differenziert diskutiert werden. Das Protokoll zur Präparation eines Kernextraktes wurde weitestgehend von Fels (1997) übernommen (s. auch 2.6.1 und 2.6.2).

4.1.1 Generelle Aktivität der Pol II

Die Aktivität der Polymerase II konnte bereits in früheren Experimenten mit Filterbindungsassays nachgewiesen werden (Nagel-Steger, 1990), jedoch erlaubt diese Art Experiment keinerlei Aussage über den Charakter des neu-entstandenen Transkripts – weder über die Länge, noch über das „erste“ neu-synthetisierte Nukleotid, das Rückschlüsse auf die Startstelle der Transkription erlauben würde. Hinzu kommt die Unsicherheit, ob die Zunahme an radioaktivem Signal nach der Hybridisierung an den Filter von dem Einbau radioaktiver Nukleotide in die neu-entstandenen Transkripte herrührt, oder ob ein unspezifisches Anhängen von Radioaktivität an das 3'-Ende vorhandener Nukleinsäuren stattgefunden hat. In diesem Zusammenhang wurde im Verlauf dieser Arbeit der Versuch unternommen, die Aktivität der Polymerase II in Anlehnung an die Experimente von Roberts und Okita (1991) nachzuweisen. Die Transkriptionsanalysen beruhen auch hier auf der Zugabe von exogenem Template zum Kernextrakt und der anschließenden Analyse der entstandenen Transkripte. Als exogenes Template wurde ein Plasmid verwendet, das über den 35S-Promotor verfügt, der als der stärkste Polymerase II-Promotor gilt. Das Plasmid mit dem 35S-Promotor, sowie einem dahinter einklonierten Reporter-Gen (GUS) sollte nach definierter Restriktion des Plasmids (s. 3.1.1) und anschließender Inkubation im Kernextrakt neu-entstandene Transkripte bekannter Länge liefern. Der direkte Nachweis neu-entstandener Transkripte über den Einbau von radioaktiv markiertem UTP während der Transkription sowie die anschließende gelelektrophoretische Analyse der entstandenen Transkripte war problematisch, da nicht nur das exogen zugegebene Template transkribiert wird, sondern auch die im Kernextrakt enthaltenen Nukleinsäuren. Darüber hinaus markierte die Enzymaktivität des Kernextraktes (für tierische Transkriptionssysteme beschrieben von Marzluff und Huang, 1985) viele endogene Nukleinsäuren radioaktiv am 3'-Ende, so dass Transkripte der „korrekten“ Länge nur schwer vor dem Hintergrund der gesamten radioaktiv markierten Nukleinsäure zu detektieren waren (s. 3.1.1).

Zwar konnte ein Signal detektiert werden, das bei Zugabe von exogenem Template auftrat, jedoch konnte die exakte Länge des Fragments nicht bestimmt und somit die Identität des Fragments als neu-entstandenes Transkript nicht eindeutig geklärt werden. Darüber hinaus trat das entsprechende Signal nur in einem von fünf untersuchten Kernextrakten auf und kann somit nur schwer als „typisches“ Signal angenommen werden. Die schwache Intensität, sowie die Beschränkung auf nur einen der getesteten Kernextrakte kann einerseits eine geringe Aktivität der Polymerase II bedeuten, oder andererseits die „Verteilung“ der Aktivität auf alle zur Verfügung stehenden Templates, so dass die Größenheterogenität der entstandenen Transkripte die Detektion des speziell gesuchten Fragments auf Grund der Nachweisgrenze unmöglich macht. Schließlich konnte auf Grund des DNA-Charakters des exogenen Templates keine DNase-Verdauung zur Eliminierung endogener DNA-Templates durchgeführt werden, wodurch natürlich eben diese kernextrakteigenen DNA-Moleküle ebenfalls als Transkriptionstemplates zur Verfügung stehen und um die Bindung an die Pol II konkurrieren. Auf Grund der Tatsache, dass bereits dasjenige Template mit dem stärksten Pol II-Promotor (35S-Promotor) nur ein schwaches, kaum vom Hintergrund zu diskriminierendes Signal lieferte, musste auf die direkte Transkriptionsanalyse von PSTVd als exogenem Template verzichtet werden, da PSTVd *per se* nicht das natürliche Template der Pol II ist und von einer effizienteren Transkription nicht auszugehen war. Der prinzipielle Nachweis der Pol II-Aktivität war somit nicht gelungen. Wie aber später gezeigt wurde, gelang der Nachweis einer aktiven Pol II durch die Transkription des PSTVd, was sich dadurch erklären lässt, dass das verwendete *in-vitro*-Transkriptionssystem speziell auf die Transkription von PSTVd ausgerichtet ist und der Kernextrakt dementsprechend präpariert wird.

4.2 Schritt 2 der PSTVd-Replikation: Transkription von (-) nach (+)

Wie bereits erwähnt stand zunächst die Analyse des zweiten PSTVd-Replikationsschrittes im Vordergrund. Ziel war es neu-synthetisierte (+)-PSTVd-RNA zu detektieren und wenn möglich ihr 5'-Ende zu bestimmen, um so Rückschlüsse auf den Startpunkt der Transkription auf dem PSTVd(-)-Strang ziehen zu können. Entsprechend dem etablierten Transkriptionsprotokoll nach Fels (1997) wurde ein lineares (-)-PSTVd-Transkript als exogenes Template in den Kernextrakt eingesetzt. Auf Grund der erwarteten geringen Menge an Transkriptionsprodukt (s. auch 3.I.2) wurde zunächst mit der Kombination aus Reverser Transkription (RT) und PCR (RT-PCR) versucht, neu-entstandene (+)-PSTVd-RNA zu detektieren. Es gelang jedoch weder mit RT-PCR, noch mit direkter Primer-Extension-Analyse (s. 3.I.3 und 3.I.4.2) neue (+)-PSTVd-RNA zu detektieren. Dass der Nachweis an *de-novo*-(+)-RNA mit den erwähnten Methoden nicht erfolgreich war, kann folgende Gründe haben:

1) geringe Stabilität der (-)-strängigen RNA als exogenes Template

Das im ersten Transkriptionsschritt als exogenes Template eingesetzte cPSTVd liegt im nativen Zustand weitgehend als geschlossene RNA mit fast vollständig durchgepaartem Doppelstrang vor, was einen Angriff durch die endogenen Nukleasen erschwert. Im Gegensatz hierzu ist die als exogenes Template zugegebene (-)-PSTVd-RNA ein lineares Template mit offenem 3'- und 5'-Ende. Diese Template ist somit generell leichter zugänglich für die RNasen des Kernextraktes, was dazu führt, dass die (-)-PSTVd-RNA wesentlich schneller abgebaut wird als der Zirkel. Eine schnellere Degradation des Templates bedeutet aber weniger Zeit für die Polymerase, neue (+)-PSTVd-RNA zu synthetisieren, da

sie an ein schwindendes Template binden muss. Der lineare Charakter und somit der schnelle Abbau des Transkriptionstemplates durch Nukleasen führt zu einer wesentlich geringeren Templatekonzentration auf Grund von Degradation, was schließlich zu einer verminderten (wenn überhaupt nachweisbaren) Transkriptionsausbeute führt. Darüber hinaus kann ein durch Degradation Längen-heterogenes Template auch zu heterogenen Transkriptionsprodukten führen, deren Detektion mittels RT-PCR oder PE nur dann möglich ist, wenn die Produkte über die Primer-komplementäre Sequenz verfügen. Ist diese jedoch auf Grund der Längenheterogenität nicht oder nur unvollständig synthetisiert, kann eine Primerbindung nicht erfolgen und die neu-entstandene RNA bleibt undetektiert. Da nicht zwischen einem Signal, das durch Primerbindung und -verlängerung, und einem Signal, das durch „Rückfaltung“ der linearen Template-RNA entstanden ist, unterschieden werden konnte, mussten beide Analysemethoden (RT-PCR und PE) ausschließlich mit biotinylierten Primern durchgeführt werden (s. auch 3.1.2.1).

2) HP II-Struktur als Promotorelement

Ein oft diskutiertes Promotorelement bei der PSTVd-Transkription von (-) nach (+) ist der HP II, der sich bei der sequenziellen Faltung des naszierenden Transkripts innerhalb einer sogenannten „multi-Hairpin“-Struktur in der (-)-PSTVd-Sequenz bildet. Mutationen im Hairpin führten zum Verlust der Infektiösität (Loss *et al.*, 1991), bzw. ausschließlich die Revertanten oder solche Viroide mit kompensatorischen Mutationen waren überlebensfähig (Qu *et al.*, 1993). Da die Ausbildung des HP II während der sequenziellen Faltung bei der Transkription von (+) nach (-) innerhalb der durchgeführten Experimente ausgeschlossen werden kann, da (-)-Transkripte, die mit der T7-Polymerase hergestellt wurden, als exogenes Transkriptionstemplate dem Kernextrakt zugegeben wurden, muss die HP II-Struktur artifiziell eingestellt werden. Dies konnte durch Inkubation in 1 x TE-Puffer und Denaturieren, gefolgt von schnellem Abkühlen auf Eis erreicht werden (Baumstark, 1997; Schröder, 1998). Das Problem des eingestellten Strukturmotivs ist die Stabilität. Da es sich um eine metastabile Struktur handelt, ist sie eben nur unter bestimmten Bedingungen (Temperatur, Salz) stabil. Der Wechsel der RNA nach der Einstellung der HP II-Struktur in den Kernextrakt kann unter Umständen zu einem Strukturshift und somit zu einem Verlust des HP führen. Da das gleichzeitig den Verlust des Promotorelements bedeutet, ist die (-)-PSTVd-RNA kein geeignetes Template für die Polymerase II mehr, was zur Folge hat, dass keine Neusynthese von (+)-PSTVd stattfindet.

3) eine oder mehrere Startstellen auf dem (-)-Strang

Eine weitere Schwierigkeit der Detektion von *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA liegt in der Möglichkeit, dass es keine spezifische Startstelle auf dem PSTVd(-)-Strang gibt und die Polymerase an mehreren Stellen, unter Umständen sogar an jedem beliebigen Nukleotid mit der Neusynthese von *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA beginnen kann, was zu Transkripten mit uneinheitlichem 5'-Ende führt. Wenn solche Transkripte, die kein einheitliches 5'-Ende besitzen, zusätzlich noch in sehr geringer Menge vorliegen, ist deren Detektion mit der PE-Analyse nicht mehr möglich, da die Nachweisgrenze unterschritten wird.

Zusammenfassend zeigen die diskutierten Argumente die Schwierigkeiten bei der Detektion und Analyse von *de-novo*-(+)-RNA als Produkt des zweiten Transkriptionsschrittes von (-) nach (+). Dennoch konnte im Rahmen dieser Arbeit die Synthese von *de-novo*-(+)-PSTVd-RNA nachgewiesen werden, da der Northern-Blot als Nachweissystem (s. auch 3.I.5) alle Transkriptionsprodukte erfasst, auch solche mit uneinheitlichem 5'- und/oder 3'-Ende, sowie längenheterogene Transkripte. Weitere Analysen sowie Optimierungsschritte konnten hinsichtlich des zweiten Transkriptionsschrittes im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

4.3 Schritt 1 der PSTVd-Replikation: Transkription von (+) nach (-): Unreproduzierbarkeit der früher publizierten Startstellen

Parallel zu den beschriebenen Experimenten zur Initiationsstelle auf dem (-)-Strang wurden auch Transkriptionsanalysen mit (+)-PSTVd-Template durchgeführt, die dem ersten Transkriptionsschritt des PSTVd von (+) nach (-) entsprechen. So sollten zum einen die Ergebnisse von Fels (1997) reproduziert werden und zum anderen sollten die Transkriptionsansätze mit (+)-PSTVd als Positivkontrolle für die generelle Aktivität der Pol II des Kernextraktes dienen. Im Anschluss an die Transkription im Kernextrakt, wurde in Anlehnung an die Arbeit von Fels (1997) das 5'-Ende der Nukleinsäure mittels Primer-Extension-Analysen direkt bestimmt. Im Gegensatz zu den vorausgegangenen Experimenten wurden in dieser Arbeit neben den Ansätzen mit cPSTVd als exogenem Template und einem Ansatz mit zusätzlich zugegebenem Pol II-Inhibitor – α -Amanitin – erstmals auch ein Ansatz betrachtet, der vollständig ohne PSTVd inkubiert wurde. Zunächst beschränkten sich die Reproduktionsexperimente auf das Nukleotid A 111, das als Startstelle detektiert worden war, da es sich hierbei um die vermeintlich „effizientere“ Startstelle handelt (Fels *et al.*, 2001). Es zeigte sich, dass auch in dem Ansatz ohne Template ein entsprechendes Signal auftrat, das in der PSTVd-Sequenz Nukleotid A 111 entsprechen würde (s. 3.II.1). Da auch die Wiederholung dieses Experiments das identische Ergebnis lieferte, war davon auszugehen, dass es sich bei diesem Signal nicht um das 5'-Ende *de-novo*-entstandener (-)-PSTVd-RNA handelt, sondern vielmehr um ein Primer-Extension-Produkt, das auf Grund von Primerbindung an eine endogene Nukleinsäure des Kernextraktes entstanden ist. Dafür spricht auch die Tatsache, dass Versuche des Nachweises von A 111 mit weiteren PSTVd-Primern, die auf Grund ihrer Lage ebenfalls an die neu-entstandene (-)-RNA binden sollten, erfolglos blieben (s. 3.II.3).

Die Bindung von kurzen PSTVd-Sequenzen an pflanzliche Nukleinsäuren, die nicht PSTVd-Sequenz aufweisen, wurde bereits 1989 von Cobbers beschrieben. Hier konnten mit Viroid-spezifischen, 9 Nt kurzen PSTVd-Primern solche Sequenzen detektiert werden, die bis zu 70 % Homologie zur sogenannten „intergenic spacer region“ (IGS) zwischen dem 3'-Ende des 25S rRNA-Gens und dem 5'-Ende des 18S rRNA-Gens haben, die gemeinsam in einem Vorläufer-Molekül synthetisiert werden und durch die IGS getrennt vorliegen. Interessanterweise weist ausgerechnet die Sequenz an den Positionen der von Cobbers verwendeten Primer keine vollständige Übereinstimmung auf, was darauf hindeutet, dass offensichtlich bestimmte pflanzliche Nukleinsäuren Bereiche aufweisen, die stark homolog zur PSTVd-Sequenz sind, und eine Paarung von Oligonukleotiden mit „echter“ PSTVd-Sequenz ermöglichen. So ist wahrscheinlich auch die „falsche“ Bindung des damals in der Primer-Extension-Reaktion verwendeten Primers (AF21) zu erklären, dessen Sequenz offensichtlich ein ausreichend hohes Maß an Komplementarität zu einer endogenen Nukleinsäure aufwies und so das verwirrende Signal lieferte. Da die damals als 5'-Enden der *de-novo*-synthetisierten (-)-RNA bestimmten Nukleotide A 111 und A 325 die bis dahin einzigen mittels Primer-Extension

charakterisierten Nukleotide waren und darüber hinaus den Ergebnissen vorausgegangenen RT-PCR-Analysen entsprachen bzw. diese ergänzten (Fels, 1997), wurde ihre Identität als „Initiationsstellen“ der Transkription nicht in Frage gestellt. Beide Nukleotide lagen genau in denjenigen Sequenzabschnitten, die als Bereiche potentieller Startstellen durch RT-PCR ermittelt wurden. Darüber hinaus schien genau jener Primer (AF21), der in der Primer-Extension-Analyse offensichtlich an eine Nicht-Viroid Nukleinsäure bindet in den RT-PCR-Analysen spezifisch gewesen zu sein. Hier wurde bereits damals im Gegensatz zu dem PE-Experiment ein Kontrollansatz völlig ohne PSTVd durchgeführt, der den Erwartungen entsprechend auch kein Signal zeigte. Daraus wurde unglücklicherweise der Schluss gezogen, dass in den PE-Experimenten zur Bestimmung des 5'-Endes der neu-entstandenen (-)-PSTVd-RNA auf eine entsprechende Kontrolle verzichtet werden könnte. Besonders gestützt wurden die Ergebnisse der Primer-Extension-Analysen von den *in-planta*-Studien, in denen Pflanzen mit PSTVd infiziert wurden, die bezüglich der beiden Nukleotide mutant waren, d.h. deren Sequenz dort vom Wildtyp abwich. Spätere Pflanzenaufschlüsse und die folgenden Analysen der präparierten PSTVd-RNA zeigten eben diese Nukleotide als zum Wildtyp revertiert (Hu, 2000; Bannach, 2001). Diese Ergebnisse stützten ebenfalls die Interpretation der beiden Nukleotide A 111 und A 325 als „Initiationsstellen“ der PSTVd-Replikation, die einem entsprechenden Selektionsdruck unterliegen, so dass die mutanten Sequenzen erst nach Reversion zur Wildtypsequenz replizieren konnten. Darüber hinaus war das durch PE-Analysen detektierte Signal α -Amanitin abhängig, wodurch die Pol II-Abhängigkeit des Signals gezeigt war.

Dennoch widersprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht unbedingt den bisher publizierten Daten; lediglich die Interpretation ist verschieden. So kann z. B. die α -Amanitin-Sensitivität der damals detektierten Signale so erläutert werden, dass auch diejenige endogene Nukleinsäure, welche zur vermeintlichen Startstelle führte, durch die Pol II transkribiert wird und deren Synthese somit α -Amanitin-sensitiv ist. Auch die Ergebnisse der site-directed-mutagenesis-Analysen erlauben die Interpretation der Nukleotide A 111 und A 325 als „relevante“ Nukleotide in der PSTVd-Replikation. Ob aber die betrachteten Nukleotide für die Transkription essentiell sind, oder aber eine andere essentielle Rolle im Lebenszyklus des PSTVd, kann alleine aus den Daten der Pflanzenexperimente nicht eindeutig geklärt werden. Es wäre z.B. auch denkbar, dass der physiologische Druck auf das PSTVd zur Reversion zum Wildtyp nicht direkt auf das mutante Nukleotid auf dem (+)-Strang entsteht, sondern erst nach der Transkription auf das entsprechend eingebaute komplementäre Nukleotid (auf dem (-)-Strang) der entscheidenden Druck ausgeübt wird und an diesem Punkt der Replikation die Reversion der Sequenz zum Wildtyp stattfindet. Auch in diesem Fall würde die Wildtypsequenz sich durchsetzen und in späteren Pflanzenaufschlüssen als die prominenteste Sequenz detektiert werden. Zusammenfassend kann jedoch das damals bestimmte Nukleotid A 111 als 5'-Ende neu-synthetisierter (-)-PSTVd-RNA ausgeschlossen werden, da die PE-Analyse der Nullkontrolle (Ansatz ohne PSTVd als exogenem Template) keinesfalls ein entsprechendes Signal liefern darf.

4.4 Etablierung eines Aufreinigungsverfahrens von *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA

Um die Analyse des 5'-Endes der neu-entstandenen (-)-PSTVd-RNA zu ermöglichen und gleichzeitig ein „falsches“ Signal durch den Einfluss kernextrakteigener Nukleinsäuren auszuschließen, wurde in dieser Arbeit ein Aufreinigungsverfahren etabliert, das es ermöglichen sollte, die neu-synthetisierte Viroid-RNA von den endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes zu separieren und sie anschließenden molekularbiologischen Untersuchungen zugänglich zu machen. Hierbei wurde die Separation der jeweiligen „Ziel“-RNA durch eine Biotin-Streptavidin-vermittelte Affinitätschromatographie, bzw. Hybridisierung erreicht. Zunächst wurde eine geeignete Biotin-markierte Sonde – ein PSTVd-*in-vitro*-Transkript mit der jeweils komplementären Sequenz zu der zu separierenden RNA – gegen die entsprechende PSTVd-Sequenz hybridisiert. Das so mit Biotin markierte Sonde-„Ziel“-RNA-Hybrid konnte anschließend durch Zugabe von paramagnetischen Streptavidinpartikeln über einen Magneten separiert werden. Die vollständige Aufreinigung gliederte sich in drei Schritte:

Im ersten Schritt wurde das eingesetzte Transkriptionstemplate (cPSTVd) aus dem Transkriptionsansatz entfernt. Die Entfernung war essentiell, da von einem hohen Überschuss an bekannter Menge Template mit (+)-Polarität gegenüber einer geringen unbekanntem Menge neu-transkribierter (-)-PSTVd-RNA ausgegangen werden musste. Da die Separation der *de-novo*-(-)-RNA von den endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes das Ziel war, und diese auf Grund der Polarität mit einer (+)-Sonde geschehen musste, mussten zuvor alle anderen PSTVd-Moleküle mit (+)-Polarität aus dem Ansatz entfernt werden, um eine spätere Konkurrenz zwischen (+)-Template und (+)-Sonde um die Bindung an die *de-novo*-(-)-RNA zu verhindern.

Nach einer ersten Entfernung des Zirkels wurde im zweiten Schritt noch einmal mit einer biotinylierten (-)-Sonde hybridisiert. Dies diente zum einen der Entfernung eventuell verbliebener, restlicher Zirkel, zum anderen wurde die zweite Hybridisierung in Anwesenheit von 8 M Harnstoff durchgeführt, um Hybride zwischen cPSTVd und *de-novo*-(-)-RNA – sogenannte „unerwünschte“ Hybride –, die sich während der ersten Hybridisierung gebildet hatten, aufzulösen (s. 3.III.5), das cPSTVd zu entfernen und die spätere Bindung der *de-novo*-(-)-RNA an die entsprechende (+)-Sonde zu ermöglichen. Verbliebe die *de-novo*-(-)-RNA in den „falschen“ Hybriden, wäre sie bereits gebunden und eine Hybridisierung der (+)-Sonde an die entsprechende komplementäre Sequenz der (-)-RNA wäre unmöglich. Somit würde die *de-novo*-(-)-RNA im Ansatz verbleiben, da ihr der zur Separation essentielle biotinylierte Hybridpartner fehlt, und die Trennung von den endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes wäre unvollständig.

Im dritten Schritt der Aufreinigung wurde schließlich mit einer biotinylierten (+)-Sonde die *de-novo*-(-)-RNA isoliert und diese konnte in spätere PE-Reaktionen eingesetzt werden

Bei der Aufreinigung waren folgende Schritte von entscheidender Bedeutung:

- 1) Sondenspezifität: speziell die Diskriminierung zwischen der gewünschten „Ziel“-RNA und „falschen“ Nukleinsäuren, wie z.B. endogenen Nukleinsäuren des Kernextraktes oder PSTVd-RNA mit anderer Polarität war entscheidend. Nur so konnte das zirkuläre (+)-Template vollständig entfernt werden, während aber die *de-novo*-(-)-RNA im Transkriptionsansatz verblieb. So konnte der Verlust der ohnehin geringen Menge an Transkriptionsprodukt auf ein Maß reduziert werden, dass dennoch eine anschließende Detektion ermöglichte.

- 2) die Prä-Aufreinigung der Sonden, um zu garantieren, dass auch jedes Sondenmolekül biotinyliert und somit zur Isolation der jeweiligen „Ziel“-RNA geeignet ist. Nicht biotinylierte Sondenmoleküle würden zwar an die „Ziel“-RNA hybridisieren, das entstandene Hybrid könnte dem Ansatz aber nicht entzogen werden, da die Biotinkomponente fehlt, die ans Streptavidin der Magnetpartikel bindet. Obwohl nur von einer sehr geringen Menge an nicht-biotinylierten Sondenmolekülen auszugehen war, sollte doch auch dieser geringe Prozentsatz ausgeschlossen werden, um jeden vermeidbaren Probenverlust zu verhindern.
- 3) Die Elution der „Ziel“-RNA von der zur Separation verwendeten Sonde, da ausschließlich die *de-novo*-(-)-RNA in die anschließende Primer-Extension eingesetzt werden sollte. Die reine *de-novo*-(-)-RNA als alleiniges Template in der PE-Reaktion bildete die Grundlage dafür, dass sowohl eine falsche Primerbindung an die (+)-Sonde verhindert wurde (was auf Grund der hohen Selbstkomplementarität des PSTVd nicht vollständig auszuschließen ist), als auch eine Konkurrenz zwischen PE-Primer und Sonde um die Bindung an die *de-novo*-RNA ausgeschlossen werden konnte.

Die Entwicklung, bzw. die einzelnen Schritte der Aufreinigungsmethode sind ausführlich in Kapitel 3.III dargestellt. Im Anschluss an die Etablierung des Aufreinigungsverfahrens konnte gezeigt werden, dass die spezifische Isolation der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA, sowie die Elution dieser von der zur Isolation verwendeten Sonde effizient und spezifisch gelingt. Es konnte anhand von *in-vitro*-Transkripten gezeigt werden, dass die „Ziel“-RNA nach der Aufreinigung in der entsprechenden Fraktion das stark dominierende Produkt ist (s. 3.III.3). Alle anderen beteiligten Nukleinsäuren werden vorher bereits entfernt. Mit diesem Verfahren konnte nun die eigentliche „Ziel“-RNA, nämlich die durch Transkription im Kernextrakt neu-entstandene (-)-PSTVd-RNA aus dem Transkriptionsansatz aufgereinigt und ihr 5'-Ende in einer anschließenden Primer-Extension-Analyse bestimmt werden.

4.5 Startstellen der PSTVd-Replikation

4.5.1 Identität des 5'-Endes der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA

Mit dem hier etablierten spezifischen Verfahren, das die Analyse der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA als aufgereinigte Nukleinsäure und somit als einziges Ausgangsprodukt erlaubt, konnte ihr 5'-Ende bestimmt werden. Auf Grund der vorgeschalteten Aufreinigung konnte ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um ein 5'-Ende einer fremden Nukleinsäure und nicht um das 5'-Ende der *de-novo*-PSTVd-(-)-RNA handelt. Darüber hinaus zeigt das Signal α -Amanitin-Sensitivität, d.h. bei Zugabe des Pol II-Inhibitors tritt das Signal nicht auf. Demzufolge scheint die Synthese der betreffenden Nukleinsäure von der Pol II vermittelt zu werden, da Pol I und Pol III von der eingesetzten α -Amanitin-Konzentration (10^{-6} M) in ihrer Aktivität unbeeinflusst sein sollten (Weinmann und Roeder, 1974; Wieland und Faulstich, 1978). Letztlich war in der Nullkontrolle, die wie oben ausführlich diskutiert, besonders wichtig ist, ohne PSTVd keinerlei Signal zu detektieren, was ebenfalls ein unspezifisches Signal in der PE ausschließt. Auch die zur Verifizierung durchgeführten Reproduktionen ergaben das identische Ergebnis; ebenfalls die Durchführung des Transkriptionsexperiments in einem zweiten Kernextrakt. Darüber hinaus konnte das detektierte Signal erstmals mit einem zweiten PSTVd-Primer verifiziert werden. Dies schließt auch die Möglichkeit des 5'-Endes einer fremden Nukleinsäure aus, da die Wahrscheinlichkeit, dass eine fremde Nukleinsäure zufällig über zwei PSTVd-Sequenzabschnitte verfügt, die mit den komplementären Bereichen der bei-

den gewählten Primer übereinstimmen eher gering ist. In allen Fällen ergab sich ein 5'-Ende der *de-novo*-PSTVd(-)-RNA bei U 359 bzw. C 1, wobei die exakte Zuordnung des Nukleotids nicht eindeutig möglich ist.

Da die Primer-Extension-Analyse bei extremer Heterogenität der PE-Produkte nur die Detektion des „hauptsächlichen“ 5'-Endes erlaubt, also desjenigen 5'-Endes, das am prominentesten auftritt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise noch weitere 5'-Enden (und somit eventuell weitere Startstellen) existieren, deren Längenheterogenität aber ihre Detektion in der PE nicht erlaubte. Ebenfalls kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass die bestimmten 5'-Enden Produkte einer schnellen Prozessierungsreaktion repräsentieren. Für eine solche Prozessierungsaktivität kommen generell 5'-Exo- und Endonukleasen in Betracht, wobei bisher lediglich in Hefe eine 5'-Exonukleaseaktivität beschrieben ist (Muhlrad *et al.*, 1994), wohingegen für pflanzliche Systeme keine entsprechende Nukleaseaktivität bekannt ist.

Das Auftreten des PE-Signals als Folge einer Degradation der *de-novo*-(-)-PSTVd-RNA noch während der Inkubation im Kernextrakt sollte aufgrund des zugesetzten RNase-Inhibitors weitgehend unterbunden sein (s. 2.11.2). Dass eine Degradation der *de-novo*-PSTVd-RNA während der Aufreinigung die in der PE detektierten 5'-Enden generiert, ist ebenfalls weitestgehend auszuschließen, da die zur Aufreinigung verwendeten Sondenmoleküle ebenfalls RNA-Charakter besitzen und demzufolge bei charakteristischer Degradation auch die Sondenmoleküle das identische 5'-Ende aufweisen müssten. Ein entsprechendes Fragment ist aber in der Primer-Extension nicht zu detektieren. Darüber hinaus zeigen auch *in-vitro*-Transkripte, die im Kernextrakt inkubiert wurden, keinerlei Abbruchfragmente, die dem detektierten Signal bei U 359/C 1 entsprechen (Fels *et al.*, 2001).

4.5.2 Stäbchenstruktur mit endständigem Hairpin als Erkennungsmotiv für die Pol II

Für die Analyse der Transkription des PSTVd wurden Kernextrakte aus nicht-infizierten Kartoffelzellkulturen als *in-vitro*-System verwendet. Die Transkription von PSTVd erfolgt durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II, deren Transkriptionsinitiation, bzw. die Erkennung ihres Templates normalerweise, d.h. bei ihrem natürlichen Template, durch spezifische Sequenzmotive erfolgt; ihre korrekte Positionierung auf dem Template wird durch zusätzliche Faktoren und Proteine vermittelt. Generell essentielle Sequenzelemente der Transkription mit der Polymerase II sind zum einen die TATA-Box, eine AT-reiche Konsensussequenz [TATAa/tAa/t] und die Initiatorsequenz (INR), eine Konsensussequenz bei tierischen Promotoren [YYANt/aYY]. Die spezifische Initiation der Transkription erfolgt mit Hilfe von Transkriptionsfaktoren (TF). Die Erkennung der TATA-Box erfolgt hierbei durch das TATA-binding Protein (TBP), eine Untereinheit des TFIID-Komplexes, der aus TBP und Transkriptions-aktivierenden Faktoren (TAF) besteht. Anschließend treten weitere generelle Transkriptionsfaktoren (GTF) und die Pol II in den Komplex ein und es entsteht der Präinitiationskomplex (PIC) (Navina und Roy, 1996). Durch dieses Zusammenwirken der beschriebenen Faktoren wird die korrekte Position der Pol II auf dem Matrizenstrang vermittelt. Im Anschluss wird der DNA-Doppelstrang unter ATP-Verbrauch/Hydrolyse und Helicaseaktivität (TFIIH) von Position -9 bis +1 auseinander gewunden und es entsteht der sogenannte offene Komplex, der den Start der Transkription ermöglicht (Jiang *et al.*, 1996; Holstege *et al.*, 1996; Hampsey, 1998; Martinez, 2001).

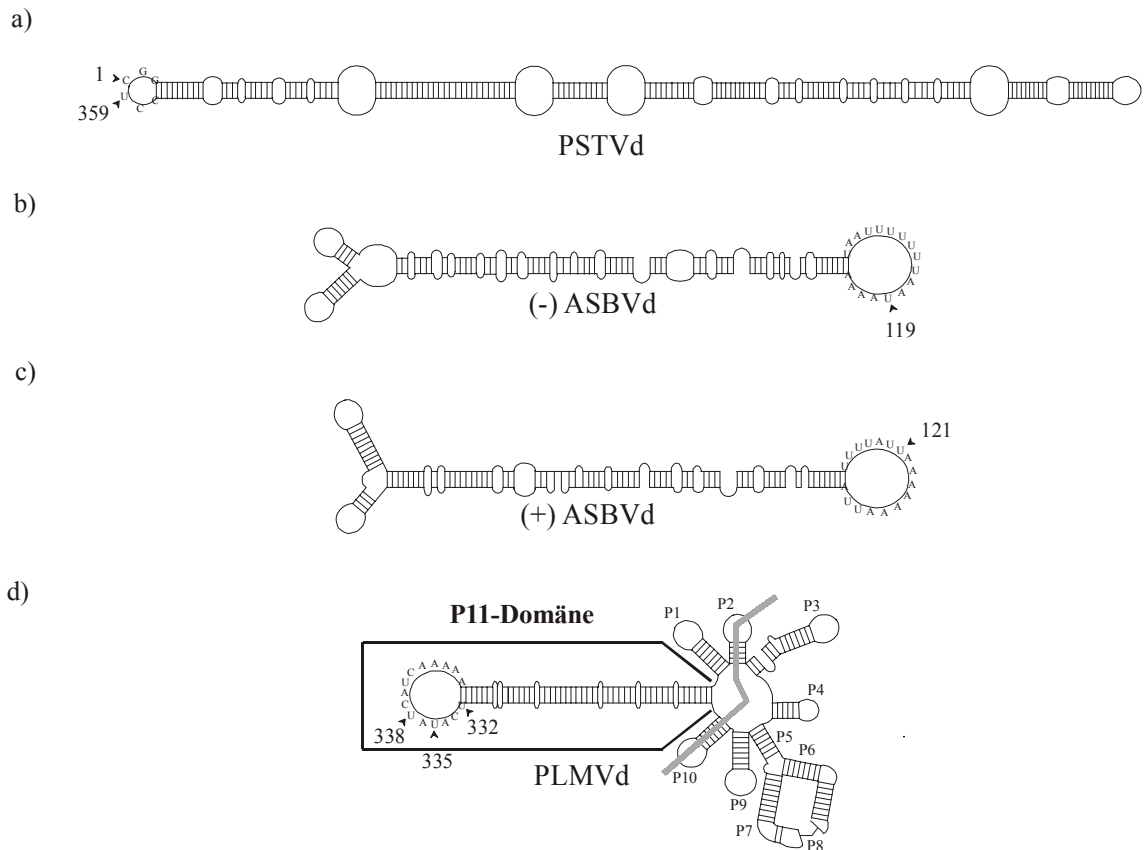
Bei RNA-Polymerase-Promotorelementen unterscheidet man eine Vielzahl von verschiedenen Promotoren. So ist z.B. bekannt, dass es nicht nur solche Promotoren gibt, die über eine TATA-Box sowie INR-Sequenz verfügen, sondern auch sogenannte „Mischpromotoren“, die entweder über eine TATA-Box, aber keine INR-Sequenz verfügen, als auch umgekehrt solche, die zwar eine INR-Sequenz aufweisen, denen aber das TATA-Element fehlt (Novina und Roy, 1996, Hampsey, 1998). Darüber hinaus sind auch solche Promotoren bekannt, welche die Transkription unabhängig von TATA- und INR-Element initiieren müssen, da ihnen beide Elemente fehlen (Novina und Roy, 1996).

Da das PSTVd weder über eine TATA-Box, noch über eine INR-Region verfügt, dennoch aber von der Pol II transkribiert wird, muss die Stäbchenstruktur selbst Bereiche repräsentieren, die als Promotorregion von der Pol II erkannt und akzeptiert werden.

Die Position der in dieser Arbeit identifizierten Startstelle bei U 359/C 1 des PSTVd zeigt, dass die Nukleotide im terminalen Loop am linken Ende des Stäbchens liegen. Die Stäbchenstruktur des PSTVd entspricht weitestgehend einer Hairpin-Struktur, d.h. einem doppelsträngigen Bereich, der durch einen Loop abgeschlossen wird. HP-Strukturen sind als mögliches Motiv für die Erkennung durch die Pol II beschrieben. Mutationsanalysen zeigten bereits, dass z.B. der HP II, der sich während der sequenziellen Faltung als charakteristisches Strukturmotiv im (-)-Strang von PSTVd bildet, für die Infektion essentiell ist (Loss *et al.*, 1991). Er wird insbesondere diskutiert als Promotorelement für den zweiten Transkriptionsschritt des PSTVd von (-) nach (+). Er bildet sich als Teil einer „multi-Hairpin“-Struktur und könnte eine Bindestelle für einen Transkriptionsfaktor darstellen. Dafür spricht auch, dass der HP II einen extrem hohen GC-Gehalt in seiner Helix aufweist und dass von kurzen GC-reichen Helices bekannt ist, dass sie eher eine DNA-typische A-Helixform einnehmen, als die für RNA typische B-Helix bilden. Dies würde erklären, warum ein Wechsel der Polymerase von ihrem natürlichen DNA-Template auf ein atypisches RNA-Template stattfindet. Dass HP-Bereiche eine Promotorfunktion für die Transkription mit der Pol II übernehmen können, spricht somit auch für die detektierte Startstelle im linken terminalen Loop des PSTVd.

Bereits 1984 zeigten Bindungsstudien mit aufgereinigter Polymerase II aus Weizenkeimen, dass das aufgereinigte Protein an die beiden terminalen Loops des PSTVd bindet (Goodman *et al.*, 1984). Mit Hilfe von analytischer Ultrazentrifugation wurde eine Bindekonstante von $1,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ bestimmt. Darüber hinaus konnte zwischen zwei verschiedenen Pol II-PSTVd-Komplexen diskriminiert werden. Zum einen existieren Komplexe, in denen ein Pol II-Molekül an ein PSTVd-Molekül gebunden war, aber auch solche, wo zwei Pol II-Moleküle an ein PSTVd-Molekül gebunden waren. In beiden Fällen erfolgte die Bindung der Pol II an den terminalen Loops des PSTVd. Auch diese Daten stimmen gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein und sprechen für einen Transkriptionsstart am terminalen Loop.

Darüber hinaus zeigten Experimente, die mit einem anderen Viroid, dem *peach latent mosaic viroid* (PLMVd), durchgeführt wurden, ebenfalls eine Bindung der Polymerase an die Enden der Viroid-RNA (Pelchat *et al.*, 2001). Da es sich beim PLMVd um ein Viroid handelt, dass im Gegensatz zu PSTVd im Chloroplasten repliziert wird, wurde hier als Modell-Polymerase in den Transkriptionsexperimenten die *E. coli*-Polymerase verwendet.

**Abb. 4.1****Schematische Darstellung der Sekundärstrukturen**

von (a) *potato spindle tuber viroid* (PSTVd), (b, c) *avocado sunblotch viroid* (ASBVd) ((+)- und (-)-Polarität) in Anlehnung an Navarro und Flores (2000) und (d) *peach latent mosaic viroid* (PLMVd) in Anlehnung an Pelchat *et al.*, 2002. Experimentell bestimmte Startstellen der Replikation sind mit einem Pfeil markiert. In allen Sekundärstrukturen liegt/liegen die Startstelle(n) im terminalen Loop einer Hairpinstruktur.

Transkriptionsexperimente mit verkürzten PLMVd-Transkripten als exogenem Template für die *E. coli*-Polymerase zeigten, dass die Hairpin-Struktur alleine vollständig ausreichte, um die Transkription zu vermitteln. Auch hier beginnt die Transkription im Hairpin-Loop einer relativ langen stem-loop-Struktur. Dies trifft für die Transkription beider Polaritäten des PLMVd, d.h. sowohl von (+) nach (-), als auch von (-) nach (+) zu. Also wird der Transkriptionsstart weniger durch die RNA-Sequenz, als durch die Sekundärstruktur der RNA determiniert (Pelchat *et al.*, 2001). Weiterführende Experimente zeigten, dass die Promotorelemente für die Pol II ausschließlich in der P11 Domäne liegen (s. Abb. 4.1).

Vergleiche mit PSTVd zeigen, dass die Sekundärstrukturen beider Viroide (PSTVd und PLMVd) eine unverzweigte Struktur (PSTVd) bzw. einen unverzweigten Strukturbereich (PLMVd) mit einem endständigen Loop aufweisen, weswegen ein Vergleich der Promotorregionen für die beiden verschiedenen Polymerasen (*E. coli*-Pol. und Pol II) durchaus zulässig ist. Auch die an den Loop angrenzende Helix ist bei beiden Viroiden – PLMVd und PSTVd – ähnlich. Beide Helices sind sogenannte „schwächere“ Helices, d.h. sie haben einen geringen G-C-Gehalt (Pelchat *et al.*, 2002). Dies ist wichtig, da der helikale Bereich nach Bindung der Polymerase an ihren „Promotor“ für die eigentliche Transkription aufgewunden werden muss.

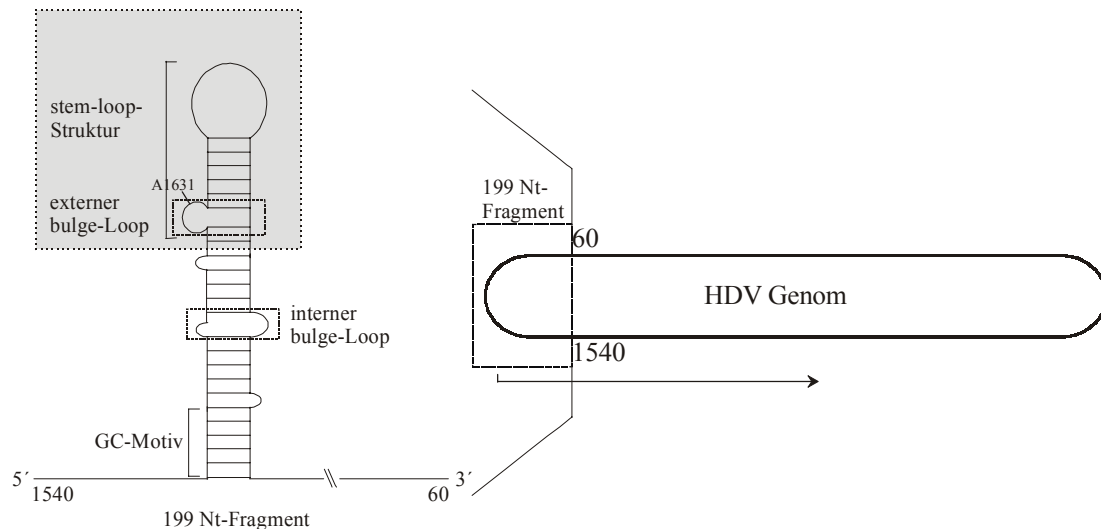
Da Viroide nicht die natürlichen Templates der Polymerasen sind, müssen sie im Gegensatz zu den typischen Templates viele Schritte der Replikation alternativ realisieren. Da unter Umständen Proteine, welche die zur Entwindung der Helix notwendige Helikaseaktivität vermitteln fehlen, muss das Aufschmelzen der an den Loop angrenzenden Helix auf einem anderen Weg, z.B. durch eine entsprechende instabilere Basenpaarung realisiert werden.

Das HP-Motiv als Promotorfragment ist nicht auf PSTVd und PLMVd beschränkt, sondern ein entsprechendes RNA-Motiv ist auch von anderen RNA-Templates bekannt. So startet z.B. auch die Replikation des *avocado sunblotch viroids* (ASBVd) innerhalb eines endständigen Loops mit einer angrenzenden „schwachen“ Helix (Navarro und Flores, 2000, s. auch Abb. 4.1). Auch die Transkription des ASBVd ist „promotor-driven“, d.h. sie wird durch ein bestimmtes Erkennungsmerkmal initiiert und startet nicht wahllos an einem beliebigen Nukleotid. Übereinstimmend mit den Ergebnissen des PLMVd ist die Polarität des zu transkribierenden Templates nicht entscheidend, sondern auch beim ASBVd ist es die Sekundärstruktur, die über die Funktion der RNA als Promotorelement entscheidet. Auch sie weist eine „quasi-Stäbchen“-Struktur auf, bei der die Startstellen in einem endständigen Loop liegen. Ebenfalls wird hier, wie auch für PLMVd und PSTVd, der partielle Doppelstrangcharakter der HP-Struktur als Erkennungssignal für die Polymerase (hier die postulierte nuclear encoded Polymerase, NEP) diskutiert, der den Wechsel der Polymerase von DNA zu RNA begünstigt.

Darüber hinaus entsprechen Startstellen in endständigen HP-loops auch der Situation in Promotoren viraler und subviraler RNAs einiger (+)-strängiger Pflanzenviren, bei denen ebenfalls endständige HP-loops entscheidend für die Promotoraktivität sind (Lauber *et al.*, 1997; Carpenter und Simon, 1998).

Auch bei der Replikation der Hepatitis- δ -Virus-(HDV)-RNA, der Satelliten-RNA des Hepatitis-B Virus, liegen die Startstellen in der Nähe zu endständigen Loops. Das HDV besteht ähnlich den Viroiden aus einer einzelsträngigen, zirkulär geschlossenen RNA, die aber im Gegensatz zu den Viroiden deutlich länger ist (1,7 kb), Ribozymaktivität besitzt und für ein Protein kodiert (das Hepatitis- δ -Antigen). Die Replikation erfolgt über einen doppelten „rolling-circle“-Mechanismus. Die RNA des HDV weist ähnlich der Viroid-RNA einen hohen Grad an Sequenzkomplementarität auf, was im nativen Zustand zur Bildung einer „doppelsträngigen“, unverzweigten Stäbchenstruktur führt. Da auch das HDV nicht für eine Polymerase kodiert, ist es wie die Viroide für die Replikation auf Wirtsfaktoren angewiesen. Für die Replikation werden aktuell zwei verschiedene Polymerasen diskutiert, zum einen die DNA-abhängige RNA-Polymerase II (wie für das PSTVd), und zum anderen eine nicht näher identifizierte Polymerase (Modahl *et al.*, 2000; Macnaughton *et al.*, 2002). Da die HDV-RNA ebenfalls über keine TATA-Box verfügt, sondern lediglich über eine INR-ähnliche Sequenz, muss auch hier die Transkriptionsinitiation durch alternative Promotorelemente erfolgen.

Bereits 1996 beschrieben Beard *et al.* den linken terminalen doppelsträngigen Bereich der genomischen HDV-RNA mit endständigem Loop als Erkennungselement für die Pol II. Es zeigte sich, dass ein auf ~200 Nt reduziertes Fragment der RNA ausreichte, um Transkription zu vermitteln (s. Abb. 4.2). Bei diesem Fragment handelte es sich um den extrem verkürzten linken stem-loop-Bereich, also auch hier wieder eine HP-Struktur, ähnlich den Viroiden (s. Abb. 4.2). Als Transkriptionsstart wurde das Nukleotid A 1631 bestimmt, wobei interessant ist, dass sowohl der interne bulge-loop (UCU), als auch der externe bulge-loop (direkt benachbart zum terminalen loop) essentiell für die Transkription sind. Speziell die Betrachtung des internen bulge-loops macht deutlich, dass es relevante Strukturen und/oder Nukleotide innerhalb einer RNA-Sequenz geben kann, die über das Stattfinden oder Ausbleiben von Transkription entscheiden, ohne dass sie selbst die eigentliche Startstelle repräsentieren. Vor diesem Hintergrund sind die Ergebnisse von Fels *et al.* (2001) bzw. die Mutationsanalysen

**Abb. 4.2****Schematische Darstellung der potentiellen Promotorregion der HDV-RNA.**

Dargestellt ist das minimale Transkriptionstemplate (199 Nt) und seine Lage innerhalb der gesamten genomischen HDV-RNA. Die Sekundärstruktur besteht auch hier aus einer stem-loop-Struktur. Als Promotorregion wird sowohl der stem-loop-Bereich, als auch der externe bulge-loop diskutiert (s. gestrichelter Kasten, grau unterlegt). Ebenfalls essentiell für Transkription ist der interne bulge-loop (s. gestrichelter Kasten, weiß unterlegt). Das GC-Motiv konnte durch Mutationsanalysen als Erkennungsmotiv ausgeschlossen werden. Ihm werden stabilisierende Effekte zugeschrieben. (Abb. verändert nach Beard *et al.*, 1996).

(Hu, 2000; Bannach, 2001) nicht weiter unverständlich. Vielmehr scheint es, dass die betrachteten und damals als Startstellen interpretierten Nukleotide A 111 und A 325 eben solche Nukleotide sind, die möglicherweise essentiell für die Transkription sind, selbst aber nicht die Identität von Startnukleotiden besitzen. Für die HDV-RNA konnte jedenfalls gezeigt werden, dass essentielle Strukturbereiche nicht unbedingt der Startstelle entsprechen müssen. Im Hinblick auf die Stäbchenstruktur zeigten weitere Experimente, dass ihre Zerstörung zum Verlust der Transkription führte.

Auch Transkriptionsanalysen der antigenomischen HDV-RNA zeigten eine stem-loop-Struktur als entscheidendes Promotorelement für die Transkription, deren Zerstörung den Verlust der Replikation zur Folge hatte (Filipovska und Konarska, 2000). Es kann jedoch bei den Betrachtungen sowohl der genomischen, als auch der antigenomischen HDV-RNA nicht eindeutig bestimmt werden, ob der endständige loop, ein bulge-loop oder die Helix des Stäbchens letztlich von der Pol II erkannt werden. Lediglich ist deutlich gezeigt, dass es die Sekundärstruktur und nicht die Sequenz der RNA ist, die für die Transkription entscheidend ist, und dass der Verlust des Stäbchens zum Verlust der Transkription führt.

Darüber hinaus ist die Bedeutung von RNA-Hairpin-Strukturen in der Regulation von Elongation und Termination der Transkription für Prokaryoten deutlich besser und umfassender charakterisiert (Uptain *et al.*, 1997) als für Eukaryoten. Generell lässt sich zusammenfassen, dass eine definierte Hairpin-loop-Domäne ein gemeinsames Erkennungsmotiv für die Replikation zu sein scheint, das von verschiedenen DNA-abhängigen RNA-Polymerasen unterschiedlicher Spezies erkannt und als Promotor akzeptiert wird.

4.6 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte Startstelle der PSTVd-Replikation ist ein weiterer Beitrag zur detaillierten Aufklärung des „rolling-circle“-Mechanismus. Darüber hinaus ist das in dieser Arbeit etablierte Aufreinigungsverfahren, neu-transkribierte PSTVd-RNA aus dem Transkriptionsansatz zu isolieren und so molekularbiologischen Untersuchungen zugänglich zu machen, ein geeignetes Verfahren – trotz aller Schwierigkeiten –, um auch den Transkriptionsschritt von (-) nach (+) zu untersuchen. Es müssten hierzu weitere Optimierungsarbeit hinsichtlich der unter 4.2 diskutierten Probleme linearer (-)-RNA als exogenem Template geleistet werden. Außerdem erlaubt das etablierte Aufreinigungsverfahren eine intensivere Untersuchung des ersten Replikationsschrittes. Es würden sich Mutationsanalysen sowohl bezüglich des detektierten Startnukleotids, als auch der angrenzenden Helix anbieten, mit denen die gewonnenen Ergebnisse untermauert und eventuell zusätzliche Erkenntnisse gewonnen werden können. Darüber hinaus könnte durch weitere Optimierungsarbeit die Ausbeute an isolierten, neu-synthetisierten Transkripten gesteigert werden, um weitere molekularbiologische Analysen durchführen und so die neu-entstandenen Transkripte weiter charakterisieren zu können.

5. Zusammenfassung

Viroide sind kleine Pflanzenpathogene, die nur aus einem zirkulären RNA-Genom bestehen. Sie werden hauptsächlich in zwei Familien unterteilt, *Pospiviroidae* und *Avsunviroidae*. Der namensgebende Vertreter der *Pospiviroidae* – das Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) – war Untersuchungsobjekt der vorliegenden Arbeit. Es besteht aus einer einzelsträngigen, zirkulär geschlossenen RNA von 359 Nukleotiden. Es kodiert für kein Protein und ist somit, sowohl was die Replikation des Genoms, als auch den Transport innerhalb der Pflanze angeht, vollständig auf Wirtsfaktoren angewiesen. Um die Wirts“maschinerie“ nutzen zu können, bedient sich das PSTVd einer Art „strukturellen Mimikry“, d.h. über speziell ausgebildete Strukturelemente wird die Erkennung durch wirtsspezifische Proteine bzw. Faktoren vermittelt und das Überleben im fremden Organismus garantiert. Über die spezifische Wechselwirkung des PSTVd mit den Proteinen des Wirts ist wenig bekannt. Sicher ist, dass die Replikation über einen asymmetrischen rolling-circle-Mechanismus verläuft, bei dem die Transkription der Viroid-RNA beider Polaritäten durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II (Pol II) erfolgt. In der vorliegenden Arbeit konnte das Startnukleotid für die Pol II auf dem zirkulären (+)-Strang bestimmt werden.

Zuvor war die Etablierung eines Verfahrens zur Aufreinigung der entstandenen (-)-RNA-Transkripte notwendig. Das Prinzip der Aufreinigung bestand in einer Biotin-Streptavidin-vermittelten Affinitätschromatographie. Durch insgesamt drei hintereinander durchgeführte Aufreinigungsschritte konnten sowohl die Nukleinsäuren des Transkriptionsansatzes, als auch das Transkriptionstemplate (cPSTVd) abgetrennt, und das reine neu-entstandene Transkript isoliert werden.

Grundlage für die Transkriptionsanalysen bildete ein *in-vitro*-System, bestehend aus einem Kernextrakt nicht-infizierter Kartoffelzellkulturen, in welchem die Pol II ausgehend von exogen zugegebenem PSTVd die entsprechende, komplementäre RNA synthetisiert. Das im Anschluss an die Transkription aufgereinigte und isolierte Transkript konnte schließlich mittels Primer-Extension-Analysen hinsichtlich seines 5'-Endes untersucht werden. Da das 5'-Endnukleotid des entstandenen Transkripts dem ersten Nukleotid entspricht, das von der Polymerase eingebaut wurde, konnten Rückschlüsse auf die Startstelle des cPSTVd gezogen werden. So konnte für das PSTVd auf dem zirkulären (+)-Strang eine Startstelle für die Pol II bei U 359/C 1 bestimmt werden, die in verschiedenen Transkriptionsansätzen mit unabhängig voneinander präparierten Kernextrakten bestätigt wurde. Erstmals gelang auch die Detektion der identischen Stelle mit einem zweiten, unabhängigen Viroidprimer. Durch Sequenz-, vor allem aber durch Strukturvergleiche der PSTVd-Startdomäne mit anderen Startnukleotiden sowie Promotorbereichen weiterer Viroide bzw. RNA-Promotoren konnte die Relevanz der Haarnadelstruktur im Startbereich als verbreitetes Promotorelement bestätigt werden. Nach diesen Ergebnissen verläuft die Erkennung der (+)-strängigen Viroid-RNA über die Erkennung der Sekundärstruktur, d.h. die Pol II erkennt die stem-loop-Struktur, wobei die Primärsequenz eine untergeordnete Rolle spielt. Diese Interpretation deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zur Untersuchung von RNA-Promotoren und untermauert die Hypothese, dass die „strukturelle Mimikry“ der entscheidende Vorteil des Viroids in einem fremden Organismus ist, der es erlaubt, die Wirtsproteine zum eigenen Überleben zu nutzen.

6. Literaturverzeichnis

- ARIAS, J. A., DIXON, R. A. und LAMB, C. J. (1993)
Dissection of the Functional Architecture of a Plant Defense Gene Promoter Using a Homologous *in Vitro* Transcription Initiation System. *Plant Cell* **5**, 485-496
- ARKHIPOVA, I. R. (1995)
Promoter elements in *Drosophila melanogaster* revealed by sequence analysis. *Genetics* **139**, 1359-1369
- ASCHERMANN, K. (2002)
Identifikation eines zellulären RNA-Wechselwirkungspartners von PSTVd *in vitro* und *in vivo*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- ASO, T., CONAWAY, J. W. und CONAWAY, R. C. (1994)
Role of Core Promoter Structure in Assembly of the RNA Polymerase II Preinitiation Complex. *J. Biol. Chem.* **269**, Nr. 42, 26575-26583
- ASO, T., CONAWAY, J. W. und CONAWAY, R. C. (1995)
The RNA Polymerase II elongation complex. *FASEB J.* **9**, 1419-1428
- BANNACH, O. (2001)
Mutagenese von Promotorelementen und Startstellen der PSTVd-Transkription. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- BAKO, L., NUOTIO, S., DUDITS, D., SCHELL, J. und KONCZ, C. (1994)
RNAPII: A specific target for the cell cycle kinase complex. In: Plant Promoters and Transcription Factors. (Nover, L. ed). *Springer Verlag Berlin, Heidelberg*
- BAUMSTARK, T. und RIESNER, D. (1995)
Only one of four possible secondary structures of the central conserved region of potato spindle tuber viroid is a substrate for processing in a potato nuclear extract. *Nucleic Acids Research* **23**, 4246-4254
- BAUMSTARK, T. (1997)
Alternative RNA-Strukturen in der Prozessierung von Viroiden. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- BEARD, M. R., MACNAUGHTON, T. B. und GOWANS, E. J. (1996)
Identification and Characterization of a Hepatitis Delta Virus RNA Transcriptional Promoter. *J. Virol.* **70**, 4986-4995
- BHATTACHARYYA, S., DEY, N. und MAITI, I. B. (2002)
Analysis of *cis*-sequence of subgenomic transcript promoter from the *Figwort mosaic virus* and comparison of promoter activity with the *cauliflower mosaic virus* promoters in monocot and dicot cells. *Virus Research* **90**, 47-62
- BIRNBOIM, H. C. und DOLY, J. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**, 1513-1523

- BONFIGLIOLI, R. G., MCFADDEN, G. I. und SYMONS, R.H. (1994)
In situ hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylacoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. *Plant J.* **6**, 99-103
- BRADFORD, M. M. (1976)
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- BRANCH, A. D. und DICKSON, E. (1980)
Tomato DNA contains no detectable regions complementary to PSTV as analyzed by Southern hybridization. *Virology* **104**, 10-26
- BRANCH, A. D. und ROBERTSON, H. D. (1984)
A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science* **223**, 450-455
- BRANCH, A. D., BENENFELD, B. J. und ROBERTSON, H. D. (1988)
Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9128-9132
- BREATHNACH, R. und CHAMBON, P. (1981)
Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**, 349-383
- BUCHER, P. (1990)
Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA Polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J. Mol. Biol.* **212**, 563-578
- BURKE, T. W. und KADONAGA, J. T. (1997)
The downstream core promoter element, DPE, is conserved from *Drosophila* to humans and is recognized by TAFII60 of *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 3020-3031
- BURLEY, S. K. und ROEDER, R. G. (1996)
Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 769-799
- CARPENTER, C. D. und SIMON, A. E. (1998)
Analysis of sequence and predicted structures required for viral satellite RNA accumulation by *in vivo* genetic selection. *Nucleic Acids Research* **26**, 2426-2432
- CHALKLEY, G. E. und VERRIJZER, C. P. (1999)
DNA binding site selection by RNA Polymerase II TAFs: a TAF(II)250-TAF(II) 150 complex recognizes the initiator *EMBO J.* **18**, 4835-4845
- COBBERS, J. M. J. L. (1989)
Suche nach GC-reichen Elementen und Viroidhomologien in Tomate. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- CORDEN, J., WASYLYK, B., BUCHWALDER, A., SASSONE-CORSI, P., KEDINGER, C. und CHAMBON, P. (1980)
Promoter sequences of eukaryotic protein-coding genes. *Science* **209**, 1406-1414

- DAGERT, M. und EHRLICH, S. D. (1979)
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**; 23-26
- DAVIES, J. W., KAESBERG, P. und DIENER, T. O. (1974)
Potato spindle tuber viroid. XII. An investigation of viroid RNA as a messenger for protein synthesis. *Virology* **61**, 281ff
- DIENER, T. O. (1971)
Potato spindle tuber „virus“. IV. A replicating low molecular weight RNA. *Virology* **45**, 411-428
- DIENER, T. O. (1987)
The Viroids. (T. O. Diener, ed.). *Plenum Publishing Corporation, New York*
- DIENER, T. O. (1991)
Subviral pathogens of plants: viroids and viroidlike satellite RNAs. *FASEB J.* **5**, 2808-2813
- DOMDEY, H., JANK, P., SÄNGER, H. L. und GROSS, H. J. (1987)
Studies on the primary and secondary structure of potato spindle tuber viroid: products of digestion with ribonuclease A and ribonuclease T1, and modification with bisulfite. *Nucleic Acids Research* **5**, 1221-1236
- DUDA, C. T. (1976)
Plant RNA Polymerases. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **27**, 119-132
- DVIR, A., CONAWAY, J. W. und CONAWAY, R. C. (2001)
Mechanism of transcription initiation and promoter escape by RNA Polymerase II. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 209-214
- FAN, H. und SUGIURA, M. (1995)
A plant basal *in vitro* system supporting accurate transcription of both RNA polymerase II- and III-dependent genes: supplement of green leaf component(s) drives accurate transcription of a light-responsive *rbcS* gene. *EMBO J.* **14**, 1024-1031
- FAUSTMANN, O., KERN, R., SÄNGER, H. L. und MÜHLBACH, H.-P. (1986)
Potato spindle tuber viroid (PSTV) oligomers of (+) and (-) polarity are synthesized in potato protoplasts after liposome-mediated infection with PSTV. *Virus Res.* **4**, 213-227
- FELDSTEIN, P. A., HU, Y. und OWENS, R. A. (1998)
Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6560-6565
- FELS, A. (1997)
Startstellen der Viroid-Replikation im Kernextrakt. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- FELS, A., HU, K. und RIESNER, D. (2001)
Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA Polymerase II starts predominantly at two specific sites. *Nucleic Acids Research* **29**, 4589-4597

- FILIPOVSKA, J. und KONARSKA, M. M. (2000)
Specific HDV RNA-templated transcription by pol II *in vitro*. *RNA* **6**, 41-54
- FLORES, R. und SEMANCIK, J. S. (1982)
Properties of a cell-free system for the synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6285-6288
- FLORES, R. (1989)
Synthesis of RNAs specific to Citrus Exocortis Viroid by a fraction rich in nuclei from infected *Gynura aurantiaca*: Examination of the nature of the products and solubilization of the polymerase-template complex. *J. Gen. Virol.* **70**, 2695-2706
- FLORES, R., DI SERIO, F. und HERNANDEZ, C. (1997)
Viroids: the non-coding genomes. *Semin. Virol.* **8**, 65-73
- FLORES, R. (2001)
A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *C. R. Acad. Sci. Paris. Sciences de la vie/ Life Sciences* **324**, 943-952
- GEIGER, J. H., HAHN, S., LEE, S. und SIGLER, P. B. (1996)
Crystal structure of the yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Science* **272**, 830-836
- GERBER, H. P., HAGMANN, M., SEIPEL, K., GEORGIEV, O., WEST, M. A., LITINGTUNG, Y., SCHAFFNER, W. und CORDEN, J. L. (1995)
RNA Polymerase II C-terminal domain required for transcription factor and its cognate promoters. *Nature* **374**, 660-662
- GIDONI, D., DYNAN, W. S. und TJIAN, R. (1984)
Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. *Nature* **312**, 409-413
- GOODMAN, T. C., NAGEL, L., RAPPOLD, W., KLOTZ, G. und RIESNER, D. (1984)
Viroid replication: equilibrium association constant and comparative activity measurements for the viroid-Polymerase Interaction. *Nucleic Acids Research* **12**, 6231-6246
- GOODRICH, J. A., CUTLER, G. und TJIAN, R. (1996)
Contacts in Context: Promoter Specificity and Macromolecular Interactions in Transcription. *Cell* **84**, 825-830
- GREEN, M. R. (2000)
TBP-associated factors (TAF_{II}s): multiple, selective transcriptional machinery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 465-503
- GROSS, H. J., LIEBL, U., ALBERTY, H., KRUPP, G., DOMDEY, H., RAMM, K. und SÄNGER, H. L. (1981)
A severe and mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchanges only. *Bioscience Reports* **1**, 235-241

- GROSS, H. J., KRUPP, G., DOMDEY, H., RABA, M., ALBERTY, H., LOSSOW, C. H., RAMM, K. und SÄNGER, H. L. (1982)
Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. *Eur. J. Biochem.* **121**, 249-257
- GUILFOYLE, T. J. (1981)
DNA-dependent RNA Polymerases. In : The Biochemistry of Plants, **Vol. 6: Proteins and Nucleic Acids.** (Stumpf und Conn, eds.). *Academic Press, New York*
- HAMPSEY, M. (1998)
Molecular Genetics of the RNA Polymerase II General Transcriptional Machinery. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 465-503
- HANAHAN, D. (1985)
Techniques for transformation of *E. coli*. *DNA cloning*, D. M. Glover(ed), Vol. I, 121-124
- HARDERS, J., LUKACS, N., ROBERT-NICOUD, M., JOVIN, T. M. und RIESNER, D. (1989)
Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.* **8**, 3941-3949
- HECKER, R., WANG, Z., STEGER, G. und RIESNER, D. (1988)
Analysis of RNA structures by temperature gradient gel electrophoresis: viroid replication and processing. *Gene* **72**, 59-74
- HEINEMANN, U., LAUBLE, H., FRANK, R. und BLÖCKER, H. (1987)
Crystal structure analysis of an A-DNA fragment at 1,8 Å resolution: d(GCCCCGGGC). *Nucleic Acids Research* **15**, 9531-9550
- HENCO, K., SÄNGER, H. L. und RIESNER, D. (1979)
Fine structure melting of viroids by kinetic methods. *Nucleic Acids Research* **6**, 3042-3059
- HILLEN, W., KLEIN, R. D. und WELLS, R. D. (1981)
Preparation of milligram amounts of 21 Deoxyribonucleic acid restriction fragments. *Biochemistry* **20**, 3748-3756
- HOLSTEGE, F. C. P., VAN DER VLIET, P. C. und TIMMERS, H. Th. M. (1996)
Opening of an RNA-Polymerase II promoter occurs in two distinct Steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *EMBO J.* **15**, 1666-1677
- HU, K. (2000)
Wechselwirkung beider Startstellen der Transkription von mutierten zirkulären Viroid-Molekülen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- HULTMARK, D., KLEMENZ, R. und GEHRING, W. J. (1986)
Translational and transcriptional control elements in the untranslated leader of the heat-shock gene hsp22. *Cell* **44**, 429-438

- JAVAHERY, R., KHACHI, A., LO, K., ZENZIE-GREGORY, B. und SMALE, S. T. (1994)
DNA sequence requirements for transcriptional initiator activity in mammalian cells.
Mol. Cell. Biol. **14**, 116-127
- JIANG, Y., YAN, M. und GRALLA, J. D. (1996)
A Three-Step Pathway of Transcription Initiation leading to Promoter Clearance at
Activated RNA Polymerase II Promoters. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1614-1621
- KADONAGA, J. T. (2002)
The DPE, a core promoter element for transcription by RNA Polymerase II.
EXPERIMENTAL and MOLECULAR MEDICINE **34**, 259-264
- KEESE, P. und SYMONS, R. H. (1985)
Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their
contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 4582-4586
- KLÜMPER, S. (2003)
Prozessierung des Kartoffel-Spindelknollensucht-Viroids (PSTVd): Charakterisierung
der beteiligten Enzyme der Wirtspflanze. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- KUTACH, A. K. und KADONAGA, J. T. (2000)
The downstream promoter element DPE appears to be as widely used as the TATA box
in *Drosophila* core promoters. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4754-4764
- LAUBER, E., GUILLEY, H., RICHARDS, K., JONARD, G. und GILMER, D. (1997)
Conformation of the 3'-end of beet necrotic yellow vein benevirus RNA 3 analyzed by
chemical and enzymatic probing and mutagenesis. *Nucleic Acids Research* **25**, 4723-
4729
- LEWIS, M. K. und BURGESS, R. R. (1980)
Transcription of the simian virus-40 DNA by wheat germ Polymerase II. *J. Biol. Chem.*
255, 4928-4936
- LIMA, M. I., FONSECA, M. E. N., FLORES, R. und KITAJIMA, E. W. (1994)
Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by *in situ*
hybridization. *Arch. Virol.* **138**, 385-390
- LIU, Y.-H. und SYMONS, R. H. (1998)
Specific RNA self-cleavage in coconut cadang cadang viroid: Potential for a role in
rolling circle replication. *RNA* **4**, 418-429
- LO, K. und SMALE, S. T. (1996)
Generality of a functional initiator consensus sequence. *Gene* **182**, 13-22
- LOSS, P., SCHMITZ, M., STEGER, G. und RIESNER, D. (1991)
Formation of a thermodynamically metastable structure containing hairpin II is critical
for infectivity of potato spindle tuber viroid RNA. *EMBO J.* **10**, 719-727
- MACNAUGHTON, T. B., SHI, S. T., MODAHL, L. und LAI, M. M. C. (2002)
Rolling Circle Replication of Hepatitis Delta Virus RNA Is Carried Out by Two
Different Cellular RNA Polymerases. *J. Virol.* **76**, 3920-3927

- MANIATAKI, E., TABLER, M. und TSAGRIS, M. (2003)
Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1. *RNA* **9**, 346-354; Erratum, Band 9, S.502
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F. und SAMBROOK, J. (1982)
Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*
- MARCOS, J. F. und FLORES, R. (1992)
Characterization of RNAs specific to Avocado Sunblotch Viroid synthesized *in vitro* by a cell-free system from infected Avocado leaves. *Virology* **186**, 481-488
- MARTINEZ, E., CHIANG, C. M., GE, H. und ROEDER, R. G. (1994)
TATA-binding protein-associated factor(s) in TFIID function through the initiator to direct basal transcription from a TATA-less class II promoter. *EMBO J.* **13**, 3115-3126
- MARTINEZ, E., GE, H., TAO, Y., YUAN, C. X., PALHAN, V. und ROEDER, R. G. (1998a)
Novel cofactors and TFIIA mediate functional core promoter selectivity by the human TAFII150-containing TFIID complex. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6571-6583
- MARTINEZ, E. (2002)
Multi-protein complexes in eukaryotic gene transcription. *Plant Mol. Biol.* **50**, 925-947
- MARTINI, N., EGEN, M., RÜNTZ, I. und STRITTMATTER, G. (1993)
Promoter sequences of a potato pathogenesis-related gene mediate transcriptional activation selectively upon fungal infection. *J. Gen. Genet.* **236**, 179-186
- MARZLUFF, W. F. und HUANG, R. C. (1985)
Transcription of RNA in isolated nuclei. In: Transcription and Translation, a practical approach. Hames, B. D. und Higgins, S. J. (eds.), *IRL Press, Oxford*
- MATSUI, T., SEGALL, J., WEIL, A. und ROEDER, R. G. (1980)
Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA Polymerase II. *J. Biol. Chem.* **255**, 11992-11996
- MÜHLBACH, H.-P. und SÄNGER, H. L. (1979)
Viroid replication is inhibited by α -Amanitin. *Nature* **278**, 185-188
- MÜHLBACH, H.-P. und SÄNGER, H. L. (1981)
Continuous replication of potato spindle tuber viroid (PSTV) in permanent cell cultures of potato and tomato. *Biosci. Rep.* **1**, 79-87
- MUHLRAD, D., DECKER, C. J. und PARKER, R. (1994)
Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5' \rightarrow 3' digestion of the transcript. *Genes and Development* **8**, 855-866
- MURASHIGE, T. und SKOOG, F. (1962)
Revised medium for growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* **15**, 473-497

NAGEL-STEGER, L. (1990)

Untersuchungen zur Replikation des Potato Spindle Tuber Viroids durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase II aus Wirtsgewebe. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

NAVARRO J.-A. und FLORES, R. (2000)

Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J.* **19**, 2662-2670

NAVARRO, J. A., VERA, A. und FLORES, R. (2000)

A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology* **268**, 218-225

NIKOLOV, D. B., CHEN, H., HALAY, E. D., USHEVA, A. A., HISATAKE, K., LEE, D. K., ROEDER, R. G. und BURLEY, S. K. (1995)

Crystal structure of a TFIIB-TBP-TATA-element ternary complex. *Nature* **377**, 119-128

NOVINA, C. D. und ROY, A. L. (1996)

Core promoters and transcriptional control. *Reviews, TIG* **12**, 351-355

OELSCHLÄGER, T., TAO, Y. KANG, Y. K. und ROEDER, R. G. (1998)

Transcription activation via enhanced preinitiation complex assembly in human cell-free system lacking TAF_{II}s. *Mol. Cell.* **1**, 925-931

ORPHANIDES, G., LAGRANGE, T. und REINBERG, D. (1996)

The general transcription factors of RNA Polymerase II. *Genes Dev.* **10**, 2657-2683

PELCHAT, M., COTE, F. und PERREAULT, J.-P. (2001)

Study of the polymerization step of the rolling circle replication of peach latent mosaic viroid. *Arch. Virol.* **146**, 1753-1763

PELCHAT, M., GRENIER, C. und PERREAULT, J.-P. (2002)

Characterization of a Viroid-Derived RNA Promoter for the DNA-Dependent RNA Polymerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **41**, 6561-6571

PUGH, B. F. und TJIAN, R. (1991)

Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes Dev.* **5**, 1935-1945

PURNELL, B. A., EMANUEL, P. A. und GILMOUR, D. S. (1994)

TFIID sequence recognition of the initiator and sequences farther downstream in *Drosophila* class II genes. *Genes Dev.* **8**, 830-842

QU, F., HEINRICH, C., LOSS, P., STEGER, G., TIEN, P. und RIESNER, D. (1993)

Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural elements. *EMBO J.* **12**, 2129-2139

RACKWITZ, H. R., ROHDE, W. und SÄNGER, H. L. (1981)

DNA-dependent RNA polymerase of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature* **291**, 297-301

- RICE, P., LONDGEN, I. und BLEASBY, A. (2000)
EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* **16**, 276-277
- RIESNER, D., HENCO, K., ROKOHL, U., KLOTZ, G., KLEINSCHMIDT, A. K., DOMDEY, H., JANK, P., GROSS, H. J. und SÄNGER, H. L. (1979)
Structure and structure formation of viroids. *J. Mol. Biol.* **133**, 85-115
- RIESNER, D. und GROSS, H. J. (1985)
Viroids. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 531-564
- RIESNER, D., HECKER, R. und STEGER, G. (1988)
Structure of Viroid Replication Intermediates as Studied by Thermodynamics and Temperature-Gradient Gel Electrophoresis. In: *Structure and Expression, Volume 1: From Proteins to Ribosomes* (Sarma, R. H. und Sarma, M. H., eds.), Adenine Press, 261-285
- RIESNER, D. (1990)
Structure of viroids and their replication intermediates: Are thermodynamic domains also functional domains?. *Semin. Virol.* **1**, 83-99
- RIESNER, D., BAUMSTARK, T., QU, F., KLAHN, T., LOSS, P., ROSENBAUM, V., SCHMITZ, M. und STEGER, G. (1992)
Physical Basis and Biological Examples of Metastable RNA Structures. In: *Structural Tools for the Analysis of Protein-Nucleic Acids Complexes* (Lilley, D. Henmann, H. und Suck, D., eds.); *Advances in Life Sciences*. Birkhäuser Verlag, Basel, 1992
- RIVERA-BUSTAMANTE, R. F. und SEMANCIK, J. S. (1989)
Properties of a viroid-replicating complex solubilized from nuclei. *J. Gen. Virol.* **70**, 2707-2716
- ROBERTS, M. W. und OKITA, T. W. (1991)
Accurate *in vitro* transcription of plant promoters with nuclear extracts prepared from plant cells. *Plant Mol. Biol.* **16**, 771-786
- ROEDER, R. G. (1996)
The role of general initiation factors in transcription by RNA Polymerase II. *TIBS* **21**, 327-335
- ROEDER, R. G. (1998)
Role of general and gene-specific cofactors in the regulation of eucaryotic transcription. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **63**, 201-218
- ROKOHL, U. (1982)
Spezifität der Wechselwirkungen von Viroiden mit Farbstoffliganden. Dissertation, Technische Hochschule, Darmstadt
- SÄNGER, H. L., KLOTZ, G., RIESNER, D., GROSS, H. J. und KLEINSCHMIDT, A.K. (1976)
Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 3852-3856

- SÄNGER, H. L. und HAAS, B. (1988)
Correlation between viroid structure and pathogenicity. *Colloq. Ges. Biol. Chem.* **38**, 1-20
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. und MANIATIS, T. (1989)
Molecular Cloning-a laboratory manual. *Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York*
- SAMMONS, D. W., ADAMS, L. D. und NISHIZAWA, E. E. (1981)
Ultrasensitive silverbased color staining of polypeptides in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **2**, 135-141
- SANGER, F., NICKLER, S. und COULSON, A. R. (1977)
DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 4363-5467
- SCHINDLER, I. M. und MÜHLBACH, H.-P. (1992)
Involvement of nuclear DNA-dependent RNA-Polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Science* **84**, 221-229
- SCHMITZ, A. und RIESNER, D. (1998)
Correlation between bending of the VM region and pathogenicity of different Potato Spindle Tuber Viroid strains. *RNA* **4**, 1295-1303
- SCHUMACHER, J., RANGLES, J. W. und RIESNER, D. (1983a)
A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem.* **135**, 288-295
- SCHUMACHER J., SÄNGER, H. L. und RIESNER, D. (1983b)
Subcellular localization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue. *EMBO J.* **2**, 1549-1555
- SCHRÖDER, A. R. W. (1998)
Konformationspezifische Antisense-RNAs für metastabile Viroid-Strukturen.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- SCHWEIZER, P. (1994)
In vitro Transcription of Plant Nuclear Genes. In: Plant Promoters and Transcription Factors. (Nover, L. ed.). Springer Verlag Berlin, Heidelberg
- SEMANCIK, J. S., CONEJERO, V. und GERHART, J. (1977)
Citrus exocortis viroid: Survey of protein synthesis in *Xenopus laevis* oocytes following addition of viroid RNA. *Virology* **80**, 218ff
- SEMANCIK, J. S. und HARPER, K. L. (1984)
Optimal conditions for cell-free synthesis of citrus exocortis viroid and the question of specificity of RNA polymerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4429-4433
- SENTENAC, A. (1985)
Eukaryotic RNA polymerases. *CRC Crit. Rev. Biochem* **18**, 31-90

- SMALE, S. T. und BALTIMORE, D. (1989)
The "initiator" as a transcription control element. *Cell* **57**, 103-113
- SMALE, S. T. (1994)
Core promoter architecture for eucaryotic protein-coding genes. In: *Transcription: Mechanisms and Regulation*. (Conaway R. C., Conaway, J. W., eds.), 63-81 Raven Press, New York, NY
- SMALE, S. T. (1997)
Transcription initiation from TATA-less promoters within eucaryotic protein-coding genes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1351**, 73-88
- SMALE, S. T., JAIN, A., KAUFMANN, J., EMAMI, K. H., LO, K. und GARRAWAY, I. P. (1998)
The initiator element: a paradigm for core promoter heterogeneity within metazoan protein-coding genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **58**, 21-31
- SPIESMACHER, E., MÜHLBACH, H.-P., TABLER, M. und SÄNGER, H. L. (1985)
Synthesis of (+) and (-)-RNA molecules of potato spindle tuber viroid (PSTVd) in isolated nuclei and its impairment by transcription inhibitors. *Biosci. Rep.* **5**, 251-265
- STARK-LORENZEN, P., GUITTON, M.-C., WERNER, R. und MÜHLBACH, H.-P. (1997)
Detection and tissue distribution of potato spindle tuber viroid in infected tomato plants by tissue print hybridization. *Arch. Virol.* **142**, 1289-1296
- STEGER, G., HOFMANN, H., FÖRTSCH, F., GROSS, H. J., RANGLES, J. W., SÄNGER, H. L. und RIESNER, D. (1984)
Conformational transitions in viroids and virusoids: Comparison of results from energy minimization algorithm and from experimental data. *J. Biomol. Struc. Dyn.* **2**, 543-571
- STEGER, G. (1994)
Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research* **22**, 2760-2768
- STEGER, G. und RIESNER, D. (2003)
Viroids and Viroid-like agents
- STRUHL, K. (1987)
Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. *Cell* **49**, 295-297
- SYMONS, R. H. (Hrsg.) (1990)
Viroids and related pathogenic RNAs. *Sem. Virology* **1**
- SYMONS, R. H. (1997)
Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Research* **25**, 2683-2689
- TAN, S., HUNZIKER, Y., SARGENT, D. F. und RICHMONT, T. J. (1996)
Crystal structure of a yeast TFIIA/TBP/DNA complex. *Nature* **381**, 127-1251

- TSAI, F. T und SIGLER, P. B. (2000)
Structural basis of preinitiation complex assembly on human pol II promoters. *EMBO J.* **19**, 25-36
- UPTAIN, S. M., KANE, C. M. and CHAMBERLIN, M. J. (1997)
Basic mechanisms of transcript elongation and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 117-172
- VERRIJZER, C. P. und TJIAN, R. (1996)
TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 338-339
- WARRILOW, D. und SYMONS, R. H. (1999)
Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato *in vivo*. *Arch. Virol.* **144**, 2367-2375
- WATSON, J. D., HOPKINS, N., ROBERTS, J. W., STEITZ, J. A. und WEINER, A. M. (1987)
Molecular biology of the gene, 707-709. Benjamin Cummings, Menlo Park, Calif.
- WAUGH, R., CLARK, G., VAUX, P. und BROWN, J. W. (1991)
Sequence and expression of potato U2 snRNA genes. *Nucleic Acids Research* **19**, 249-256
- WEINMANN, R. und ROEDER, R. G. (1974)
Role of DNA-dependent RNA polymerase 3 in the transcription of the tRNA and 5S RNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1790-1794
- WIELAND, T. und FAULSTICH, H. (1978)
Amatoxins, phallotoxins, phalloisin, and antamanide: the biologically active components of poisonous Amanita mushrooms. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **5**, 185-260
- WILD, U., RAMM, K., SÄNGER, H. L. und RIESNER, D. (1980)
Loops in viroids: Accessibility to RNA anticodon binding. *Eur. J. Biochem.* **103**, 227-235
- WU, C. H., MADABUSI, L., NISHIOKA, H., EMANUEL, P., SYPES, M., ARKHIPOVA, I. und GILMOUR, D. S. (2001)
Analysis of core promoter sequences located downstream from the TATA element in the hsp70 promoter from *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1593-1602
- ZAITLIN, M., NIBLET, C. L., DICKSON, E. und GOLDBERG, R. B. (1980)
Tomato DNA contains no detectable regions complementary to PSTV as assayed by solution and filter hybridization. *Virology* **104**, 1-9
- ZHOU, Q., LIEBERMANN, P. M., BOYER, T. G. und BERK, A. J. (1992)
Holo-TFIID supports transcriptional stimulation by diverse activators and from a TATA-less promoter. *Genes Dev.* **6**, 1964-1974

Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, November 2003