

**Kontaktstellen zwischen dem Viroid PSTVd
und der ribosomalen 5 S-RNA**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität

Düsseldorf

vorgelegt von

Petra Dorothea Stroeks

aus Düsseldorf

Düsseldorf 2007

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

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

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. D. Riesner
Zweite Berichterstatterin: Prof. Dr. S. Ott
Dritter Berichterstatter: Prof. Dr. D. Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2007

Meinem Vater

Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Detlev Riesner für die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Physikalische Biologie und die mir gewährte wissenschaftliche Freiheit aussprechen. Darüber hinaus möchte ich mich besonders für die Unterstützung bedanken, die zur Vereinbarung der wissenschaftlichen Arbeit mit der Erziehung meines Kindes erhalten habe.

Frau Prof. Dr. Sieglinde Ott und Herrn Prof. Dr. Dieter Willbold danke ich für die freundliche Übernahme der Berichterstattung.

Großer Dank gebührt auch Prof. Dr. Gerhard Steger für viele wertvolle Erklärungen zur *in silico*-Analyse und für die wichtige Hilfe während des Zusammenschreibens. Auch den anderen Mitgliedern der Rechner-Gruppe gilt mein Dank für ihre Hilfsbereitschaft.

Für so Vieles möchte ich Herrn Dr. Axel Schmitz danken, für sein Interesse von Beginn an bis zur sehr großen Hilfe in der Schlussphase und für die besondere Atmosphäre in unserem Labor.

Frau Elke Reinartz danke ich von Herzen, auf der einen Seite für ihre engagierte Mitarbeit an dem Projekt bis zum Schluss und darüber hinaus für ihre Freundschaft, die mir sehr viel bedeutet.

Ich danke allen Mitgliedern der Viroid-Gruppe auch den Ehemaligen, insbesondere Herrn Dr. Oliver Bannach und Frau Dipl.-Biol. Natalie Diermann, die beide besonders in der Schlussphase eine ganz wichtige Unterstützung waren. Auch den den anderen Mitgliedern des PSTVd-5S-RNA-Projekts Frau Dr. Katja Aschermann, Frau Dipl.-Biol. Olga Remennik und Frau Dipl.-Biol. Anja Schmitz danke ich für die schöne, freundschaftliche Zusammenarbeit. Herrn Bernd Esters gilt mein Dank für die Beantwortung so vieler Fragen und auch für die sehr gute Zusammenarbeit sowie die Hilfe bei Experimenten. Frau Heidi Gruber danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung, die immer zur rechten Zeit kam.

Bei Frau Dr. Volmering bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung und die aufbauenden Gespräche.

Allen meinen Freunden danke ich herzlich, besonders Ellen dafür, dass sie für mich da war und meine Arbeit aus „anderer“ Sicht betrachtet hat, Claire für ihr Verständnis und ihre Anteilnahme in stressigen Zeiten. Anja möchte ich an dieser Stelle noch einmal für ihre Freundschaft und Hilfsbereitschaft danken.

Schließlich danke ich meiner Familie von Herzen dafür, dass sie für mich da waren, meinem Bruder Thomas für Gespräche bei einem guten Espresso, meiner Tante Rita für ihr stets offenes Ohr und auch Peter, der uns mit Hilfsbereitschaft und Verständnis zur Seite stand.

Meiner Mutter bin ich zutiefst dankbar für ihre liebevolle Unterstützung während der gesamten Zeit. Vor allem dafür, dass sie mit Jona alles so gut gemeistert hat und einfach jederzeit für mich da war.

Jona danke ich, dass er so viel Glück in mein Leben bringt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ribonukleinsäure	1
1.2 Viroide	3
1.2.1 Taxonomie und Struktur	4
1.2.2 Der Replikationszyklus	6
1.2.3 Pathogenese	8
1.2.4 Transport	10
1.3 RNA als Wechselwirkungspartner	11
1.3.1 Ribosomale 5 S-RNA	12
1.3.2 Biophysikalische Eigenschaften der 5 S-RNA-PSTVd-Komplexe	15
1.4 Aufgabenstellung	15
2. Material	17
2.1 Chemikalien und Lösungen	17
2.2 Nukleinsäuren	18
2.2.1 Plasmide	18
2.2.2 Primer für PCR-Reaktionen	19
2.2.3 <i>In vitro</i> -Transkripte	21
2.2.4 Genomische DNA	24
2.2.5 Oligonukleotide für Konkurrenzexperimente, <i>primer extension</i> - und „Northern“-Analysen	24
2.3 Pflanzenmaterial	24

3. Methoden	27
3.1 Herstellung und Aufarbeitung von Nucleinsäuren	27
3.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion	27
3.1.2 Präzipitation von Nucleinsäure	27
3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	29
3.1.4 <i>in vitro</i> -Transkription mit der T7-RNA-Polymerase	34
3.1.5 RNA-Präparation aus Tomatenblättern	36
3.1.6 Gelelution	37
3.1.7 PSTVd und 5 S-RNA-spezifische Affinitätschromatographie	38
3.2 <i>In vitro</i> -Komplexeinstellung	42
3.3 Modifikation von Nucleinsäuren	42
3.3.1 Quervernetzung von RNA mittels Psoralen	42
3.3.2 Radioaktive Endmarkierung von DNA-Oligonukleotiden	43
3.4 Analyse von Nucleinsäuren	43
3.4.1 <i>Primer Extension</i> -Analyse	43
3.4.2 RNA-RNA-Gelshift-Analysen	45
3.4.3 Konkurrenzexperimente	46
3.4.4 Quantifizierung von Nucleinsäuren	46
3.4.5 Gelelektrophoresen	47
3.4.6 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
3.4.7 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
3.4.8 Bidirektionelle Polyacrylamid-Gelelektrophorese	48
3.4.9 Silberfärbung von Nucleinsäuren	49
3.4.10 „Northern“-Analysen	49
3.4.11 <i>In silico</i> -Analysen	53
4. Ergebnisse	55
4.1 Darstellung und Nachweis von RNA-RNA-Komplexen	56
4.1.1 Komplexe zwischen verschiedenen PSTVd bzw. 5 S-RNA und zellulären RNAs	56
4.1.2 Komplexe zwischen PSTVd und 5 S-RNA	59

4.2	<i>Primer Extension</i> -Analysen zur Identifizierung von Kontaktstellen zwischen PSTVd und 5 S-RNA	60
4.2.1	Experimentelles Vorgehen	60
4.2.2	Methodische Optimierung der RNA-Quervernetzung	61
4.2.3	Identifizierung von Kontaktstellen mittels PSTVd-spezifischer <i>primer extension</i> an nicht aufgereinigten Komplex-Ansätzen	68
4.2.4	Methodische Optimierung der Aufreinigung der Komplexe	72
4.2.5	Identifizierung von Kontaktstellen mittels PSTVd-spezifischer <i>primer extension</i> nach Aufreinigung	77
4.2.6	Identifizierung von Kontaktstellen mittels 5 S-RNA-spezifischer <i>primer extension</i> nach Aufreinigung	89
4.3	Eingrenzung der Wechselwirkungsposition durch den Einsatz von verkürzten PSTVd-Transkripten	93
4.3.1	RNA-RNA-Gelshift-Analysen	94
4.3.2	Filterhybridisierung	100
4.3.3	Identifizierung von Kontaktstellen zwischen den PSTVd-Teiltranskripten und der 5 S-RNA mittels <i>primer extension</i>	101
4.3.4	Kompetitionsexperimente mit DNA-Oligonukleotiden	105
4.4	<i>In silico</i> -Analyse zur Komplexbildung zwischen 5 S-RNA und PSTVd	108
4.4.1	Bindung der 5 S-RNA an die untere Variable Region von PSTVd	109
4.4.2	Bindung der 5 S-RNA an den Rechten Terminus von PSTVd	112
5.	Diskussion	117
5.1	Methodische Gesichtspunkte	117
5.1.1	<i>In vitro</i> -Komplexeinstellung	117
5.1.2	Aufreinigung der Komplexe	118
5.1.3	Vergleich der Methoden zur Bestimmung der Bindestelle	118
5.2	Theoretische Analyse der Modelle der Wechselwirkung	122
5.2.1	Sequenzvergleich der 5 S-RNA zwischen verschiedenen Vertretern der <i>Solanaceen</i>	125

5.2.2	Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen Vertretern der Gattung <i>Pospiviroids</i>	126
5.3	Mechanismen der Komplexbildung	130
5.4	Bedeutung der Wechselwirkung	131
5.4.1	Interferierende Wirkung der Wechselwirkung?	131
5.4.2	Transport von PSTVd	132
5.5	Ausblick	138
6.	Zusammenfassung	141
6.	Abstract	143
	Literaturverzeichnis	145

Abbildungsverzeichnis

1.1	Sekundärstruktur und funktionelle Domänen von PSTVd.	5
1.2	Thermische Denaturierung von PSTVd.	6
1.3	Asymmetrischer Rolling-Circle-Mechanismus der <i>Pospiviroidae</i>	7
1.4	Sekundärstruktur der 5 S-RNA.	12
1.5	Wechselwirkungen von 5 S-RNA innerhalb des Ribosoms.	13
4.1	RNA-RNA-Gelshift-Analyse von PSTVd bzw. 5 S-RNA und zellulären RNAs.	57
4.2	RNA-RNA-Gelshift-Analyse von PSTVd und 5 S-RNA.	58
4.3	Entstehung eines Psoralen-Crosslinks innerhalb einer Nukleinsäure-Helix.	60
4.4	Prinzip der <i>primer extension</i> -Analyse zur Bestimmung von Interaktionspunkten zwischen zwei RNA-Molekülen.	62
4.5	Lage der verwendeten Primer für die <i>primer extension</i> auf PSTVd.	63
4.6	Vergleichende <i>primer extension</i> -Analyse an nicht quervernetzter, UV-bestrahlter und quervernetzter RNA.	63
4.7	Optimierung der RNA-Quervernetzung: Variation der Bestrahlungszeit.	64
4.8	Optimierung der RNA-Quervernetzung: Variation der Psoralen-Konzentration.	66
4.9	Einsatz der optimierten Bedingungen der RNA-Quervernetzung bei nachfolgender <i>primer extension</i> mit anderen Primern (exemplarisch XC3).	67
4.10	Erneute Optimierung der RNA-Quervernetzung bei Verwendung anderer Primer (exemplarisch RGV2)	69

4.11	Identifizierung von Kontaktstellen zwischen 5 S-RNA und PSTVd mittels <i>primer extension</i> an nicht aufgereinigten Komplex-Ansätzen	71
4.12	Schematische Darstellung der Aufreinigung der Komplexe vor einer <i>primer extension</i> -Analyse.	73
4.13	Nachweis von Komplexen mittels <i>primer extension</i> nach der Aufreinigung und Elution von den Partikeln.	74
4.14	Nachweis von Komplexen mittels <i>primer extension</i> nach der Aufreinigung, gebunden an Microbeads® bzw. Dynabeads®.	75
4.15	Nachweis von Komplexen mittels <i>primer extension</i> nach der Aufreinigung, gebunden an Dynabeads®.	76
4.16	Schematische Darstellung zur Interpretation von <i>primer extension</i> -Abbruchsignalen.	78
4.17	Identifizierung von Kontaktstellen zwischen 5 S-RNA und PSTVd im Bereich der Variablen Region mittels <i>primer extension</i> an aufgereinigten Komplexen.	79
4.18	Lage der Komplex-spezifischen <i>primer extension</i> -Abbruchsignale im Bereich der Zentral Konservierten bzw. der Variablen Region.	80
4.19	Identifizierung von Kontaktstellen zwischen 5 S-RNA und PSTVd im Bereich des Rechten Terminus mittels <i>primer extension</i> an aufgereinigten Komplexen.	81
4.20	Vorhersage der Quervernetzbarkeit von Nukleotiden aufgrund der umgebenden Sequenz.	81
4.21	Lage der Komplex-spezifischen <i>primer extension</i> -Abbruchsignale im Bereich des Rechten Terminus.	82
4.22	Identifizierung von Kontaktstellen zwischen 5 S-RNA und PSTVd im Bereich der unteren VM-Region mittels <i>primer extension</i> an aufgereinigten Komplexen.	83
4.23	Lage der Komplex-spezifischen <i>primer extension</i> -Abbruchsignale im Bereich der unteren Virulenz Modulierenden Region.	84
4.24	Identifizierung von Kontaktstellen zwischen 5 S-RNA und PSTVd im Bereich der oberen CCR mittels <i>primer extension</i> an aufgereinigten Komplexen.	84

4.25	Lage der Komplex-spezifischen <i>primer extension</i> -Abbruchsignale im Bereich der oberen CCR.	85
4.26	Reproduktion der Abbruchsignale im Bereich der Variablen Region bzw. des Rechten Terminus.	86
4.27	Lage der Komplex-spezifischen <i>primer extension</i> -Abbruchsignale auf PSTVd.	88
4.28	Lage der verwendeten Primer für die <i>primer extension</i> auf 5 S-RNA.	89
4.29	Identifizierung von Kontaktstellen mittels <i>primer extension</i> auf der 5 S-RNA nach Aufreinigung.	90
4.30	Lage der Komplex-spezifischen <i>primer extension</i> -Abbruchsignale auf der 5 S-RNA.	91
4.31	Darstellung der Sequenzbereiche von PSTVd, die von den verschiedenen PSTVd-Teiltranskripten repräsentiert werden.	93
4.32	RNA-RNA-Gelshift-Analyse der verschiedenen PSTVd-Teiltranskripte und 5 S-RNA unter „Dimer-Bedingungen“.	94
4.33	RNA-RNA-Gelshift-Analyse der verschiedenen PSTVd-Teiltranskripte und 5 S-RNA unter „Monomer-Bedingungen“.	96
4.34	RNA-RNA-Gelshift-Analyse des Transkripts <i>Pr</i> und 5 S-RNA.	98
4.35	RNA-RNA-Gelshift-Analyse des Transkripts <i>Pom</i> und 5 S-RNA.	99
4.36	Filterhybridisierung der verschiedenen verkürzten PSTVd-Teiltranskripte mit 5 S-RNA.	100
4.37	Identifizierung von Kontaktstellen zwischen der 5 S-RNA und verschiedenen, verkürzten PSTVd-Transkripten mittels <i>primer extension</i>	102
4.38	Lage der Komplex-spezifischen <i>primer extension</i> -Abbruchsignale auf der 5 S-RNA bei Verwendung von PSTVd-Teiltranskripten.	103
4.39	Eingrenzung der Wechselwirkungsposition von 5 S-RNA an PSTVd aufgrund der Bindung der PSTVd-Teiltranskripte an 5 S-RNA.	104
4.40	Kompetition verschiedener DNA-Oligonukleotide bei der Komplexbildung zwischen PSTVd und 5 S-RNA.	106
4.41	Eingrenzung der Bindestelle zwischen PSTVd und 5 S-RNA anhand der Kompetitionsexperimente.	107
4.42	Dot-Plot zwischen PSTVd und 5 S-RNA: Variable Region-Helix V.	108

4.43	Modell der Wechselwirkung zwischen 5 S-RNA und der unteren Variablen Region von PSTVd.	110
4.44	Sekundärstruktur von PSTVd bei Ausbildung des Hairpin II.	112
4.45	Dot-Plot zwischen PSTVd und 5 S-RNA: Rechter Terminus-Loop D.	113
4.46	Modell der Wechselwirkung zwischen 5 S-RNA und dem Rechten Terminus von PSTVd.	114
4.47	Modell des Komplexes zwischen PSTVd und 5 S-RNA.	116
5.1	Vergleich der mit den verschiedenen Methoden eingegrenzten Wechselwirkungspositionen.	121
5.2	Modelle der Kontaktstellen zwischen PSTVd und 5 S-RNA.	122
5.3	<i>Kissing-Loop</i> -Wechselwirkung	124
5.4	Sequenzvergleich der 5 S-RNA verschiedener <i>Solanaceen</i>	125
5.5	Sequenzvergleich der 5 S-RNA verschiedener angiospermer Pflanzen.	127
5.6	Sequenzvergleich verschiedener Vertreter der Gattung <i>Pospiviroids</i> im Bereich der Variablen Region.	128
5.7	Sequenzvergleich verschiedener Vertreter der Gattung <i>Pospiviroids</i> im Bereich des Rechten Terminus.	129
5.8	Sequenzvergleich der verschiedenen, im Bereich des Rechten Terminus veränderten PSTVd-Varianten.	133
5.9	Modell für den intrazellulären Transport von PSTVd.	136

Tabellenverzeichnis

1.1	Unterschiede zwischen <i>Pospiviroidae</i> und <i>Avsunviroidae</i>	4
2.1	Plasmide als Matrizen für Sequenzierungen, PCR-Reaktionen und <i>in vitro</i> -Transkriptionen.	19
2.2	Zur Herstellung von PSTVd-Transkripten mit (+)-Sequenz eingesetzten Primer.	20
2.3	Sequenz der zur Herstellung von PSTVd-Transkripten (-)-Sequenz eingesetzten Primer.	21
2.4	Sequenz der zur Herstellung von Transkripten mit 5 S-RNA-Sequenz eingesetzten Primer.	21
2.5	Sequenz der zur Herstellung von Transkripten der anderen zellulären RNAs eingesetzten Primer.	22
2.6	<i>In vitro</i> -Transkripte mit PSTVd-Sequenz, hergestellt mit Plasmiden als Matrizen.	22
2.7	<i>In vitro</i> -Transkripte mit PSTVd-Sequenz, hergestellt mit PCR-Produkten als Matrizen.	23
2.8	<i>In vitro</i> -Transkripte, welche die Sequenz der 5 S-RNA bzw. verschiedener weiterer zellulärer RNAs repräsentieren.	23
2.9	Oligonukleotide mit komplementärer 5 S-RNA-Sequenz für Kompetitionsexperimente, <i>primer extension</i> -, „Northern“-Analysen.	24
2.10	Oligonukleotide mit (-)-PSTVd-Sequenz für Kompetitionsexperimente, <i>primer extension</i> -, und „Northern“-Analysen.	25
4.1	Optimierte Psoralenkonzentrationen für die Quervernetzung bei nachfolgender <i>primer extension</i> mit verschiedenen Primern.	70
4.2	Komplex-spezifische <i>primer extension</i> -Abbruchsignale auf PSTVd.	87

4.3	Komplex-spezifische <i>primer extension</i> -Abbruchsignale auf der 5 S-RNA.	92
5.1	Eigenschaften der im Bereich des Rechten Terminus veränderten PSTVd-Varianten und ihre Komplementarität zur 5 S-RNA.	134

Einleitung

1.1 Ribonukleinsäure

Ribonukleinsäure (RNA) unterscheidet sich bezüglich ihres chemischen Aufbaus nur geringfügig von Desoxyribonukleinsäure (DNA). Der bedeutendste Unterschied zwischen DNA und RNA ist, dass letztere in der Zelle in der Regel einzelsträngig vorliegt und daher, ähnlich wie Proteine, komplexe Formen annehmen kann. Diese Eigenschaft befähigt RNA dazu, vielfältige Funktionen zu übernehmen, während die DNA linear aufgebaut ist und auf die Speicherung der Information spezialisiert ist.

Seit längerem ist die Funktion der *messenger*-RNA (mRNA) als Informationsüberträger, der *transfer*-RNA (tRNA) als Adapter und die Funktion der Ribosomen als Katalysator der Proteinbiosynthese bekannt. Der ribosomalen RNA (rRNA) aber wurde zunächst lediglich die Funktion eines Gerüstmoleküls für die ribosomalen Proteine beigegeben, welche als Träger der katalytischen Aktivität zur Bildung der Peptidbindung galten.

Die Aufklärung der atomaren Struktur von *E. coli*-Ribosomen durch Nissen *et al.* (2000) zeigte aber, dass deren katalytisches Zentrum in der großen Untereinheit ausschließlich aus RNA besteht (zur Übersicht: Beringer & Rodnina, 2007; Spirin, 2004; Moore & Steitz, 2002; Cech, 2000). Durch biochemische Analysen von Noller *et al.* war bereits seit 1992 bekannt, dass die ribosomale RNA Peptidyltransferase(PT)-Aktivität besitzt. Eine neuere Studie zeigt indes, dass die Funktion der PT-Aktivität auch durch

ein ribosomales Protein beeinflusst wird (Maguire *et al.*, 2005). Vom größten Teil der ribosomalen Proteine wird vermutet, dass sie für die Lebensfähigkeit der Zelle und die Translation essentiell sind, da sie an der korrekten Assemblierung des Ribosoms beteiligt sind (Korepanov *et al.*, 2007).

Neben Ribosomen enthalten Zellen weitere Ribonukleoprotein-Partikel (RNP-Partikel), d.h. mit Proteinen komplexierte RNA-Moleküle. Das Signalerkennungspartikel (SRP) befindet sich im Cytoplasma und besteht aus 7SL-RNA und sechs an diese gebundene Proteine (Walter & Blobel, 1984). Es vermittelt den spezifischen Transport von Membran- und sekretorischen Proteinen an ihren Bestimmungsort. Dieser Prozess geht mit Konformationsänderungen innerhalb der SRP-RNA einher (Bradshaw & Walter, 2007). Die 7SL-RNA hat dabei eine katalytische Wirkung und ist für die Funktion des SRP unentbehrlich.

Im Kern befindet sich ein weiteres RNP-Partikel, das Spleißosom, dessen RNA-Komponente essentiell für seine Funktion ist. Dieses Partikel bewerkstelligt das Ausschneiden der Introns aus der Vorläufer-mRNA und die anschließende Verknüpfung der Exons (zur Übersicht: Nilsen, 2003). Innerhalb des Partikels bestehen neben Kontakten der fünf snRNAs mit Proteinen zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den RNA-Molekülen. Letztere spielen eine Schlüsselrolle sowohl bei der Erkennung der Spleißstellen als auch beim Spleißvorgang selbst. Ein Komplex aus U6- und U2-RNA wird als aktives Zentrum des Spleißosoms diskutiert (Valadkhan, 2007). Für das korrekte Spleißen sind Konformationsänderungen der RNA und der Proteine erforderlich (Staley, 1998).

Bei der RNA-Interferenz, für deren Entdeckung Andrew Fire und Craig Mello 2006 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin erhielten, erkennen sehr kleine RNA-Moleküle (miRNA, siRNA) ihre Ziel-RNAs, und hemmen die Genexpression (zur Übersicht: Zaratygui *et al.*, 2007; Dykxhoorn *et al.*, 2003; Fire *et al.*, 1998).

RNA kann nicht nur strukturell und informationsübertragend, sondern auch enzymatisch und regulatorisch wirken. Sie ist grundsätzlich in der Lage, Aufgaben zu übernehmen, die in der Zelle DNA und Proteine übernehmen. Daher wurde von Walter Gilbert im Jahre 1986 die RNA-Welt-Hypothese formuliert, nach der vor ca. 4 Milliarden Jahren Leben ausschließlich auf der Grundlage von RNA existierte.

Darüber hinaus kann RNA zur Informationsspeicherung dienen: etwa 80% aller Virus-Spezies enthalten nicht DNA, sondern RNA als Erbinformation. Die Genomgröße

von RNA-Viren liegt im Bereich von ca. 7 bis 20 Kilobasen (kb). Innerhalb eines reifen Virus-Partikels ist das Genom, welches einzel- oder doppelsträngig, zirkulär oder linear sein kann, von einem Kapsid aus Proteinen umgeben. Zur Synthese der viruskodierten Proteine bedienen sich Viren der Translationsmaschinerie der Wirtszelle.

1.2 Viroide

Bereits in den 1920er Jahren wurde eine Krankheit beobachtet, die aufgrund der Ähnlichkeit der Symptome den viralen Infektionen zugeordnet wurde, die Kartoffelspindelknollensucht (Schultz & Folsom, 1923). Erst viel später, im Jahre 1967, machten Diener & Raymer die Entdeckung, dass der Erreger dieser Krankheit lediglich eine *freie* RNA ist (zur Übersicht: Daròs *et al.*, 2006; Flores *et al.*, 2005; Diener, 2003; Riesner & Gross, 1985). Diese RNA ist von äußerst geringer Größe (359 Nukleotide) und zirkulär. Die Existenz eines solch kleinen Parasiten, der sich von einem Virus offenbar drastisch unterscheidet, passte überhaupt nicht zu den damaligen Lehrvorstellungen der Molekularbiologie. Es stellte sich aber heraus, dass diese RNA *in vivo* tatsächlich ausschließlich ohne proteinöse Hülle vorliegt und angesichts der geringen Größe auch keine Proteine kodieren kann (Diener, 1971). Weitere Krankheitserreger mit den gleichen Eigenschaften wurden entdeckt (Sänger, 1972; Lawson, 1968; Semancik & Weathers, 1968) und es erschien notwendig, diese Moleküle als eigene Klasse von subviralen Krankheitserregern zu betrachten: Viroide.

Es stellte sich nun die Frage, welche Art von Information die zwischen 246 und 399 Nukleotide langen Molekülen enthalten, die sie dazu befähigt, sich zu replizieren, sowie transportiert zu werden, und nicht zuletzt in der Zelle überhaupt zu „überleben“. Da Viroide nachweislich nicht für Proteine kodieren (Davies *et al.*, 1974), ist sicher, dass sie für ihren gesamten Infektionsszyklus auf Wechselwirkungen mit zellulären Faktoren angewiesen sind. Solche Wechselwirkungen werden durch die Fähigkeit zur Ausbildung bestimmter Strukturelemente oder Sequenzmotive vermittelt, in denen somit die genetische Information der Viroide liegt.

Die Erforschung der Viroide diente aber nicht nur einem besseren Verständnis dieser Krankheitserreger selbst, sie zeigte vielmehr auch, dass Viroide geeignete Modell-Moleküle

Tabelle 1.1: Unterschiede zwischen *Pospiviroidae* und *Avsunviroidae*. Nach Ding & Itaya (2007).

Merkmal	<i>Pospiviroidae</i>	<i>Avsunviroidae</i>
Ort	Nukleus	Chloroplast
Sekundärstruktur	stäbchenförmig	in der Regel verzweigt
Replikation	asymmetrischer Rolling-Circle-Mechanismus	symmetrischer Rolling-Circle-Mechanismus
Zentral Konser- vierte Region	stets vorhanden	nicht vorhanden
Ribozymaktivität	nein	ja

zum Verständnis von RNA-Funktionen im Allgemeinen sind (zur Übersicht: Ding & Itaya, 2007).

1.2.1 Taxonomie und Struktur

Viroide unterscheiden sich in ihrem molekularen Aufbau und ihrem Vermehrungsmechanismus klar von den Viren. Die einzelsträngigen, zirkulären RNA-Moleküle sind etwa zehn mal kleiner als das kleinste Virus-Genom. Im Gegensatz zu Viren bedienen sie sich ausschließlich der Transkriptions-, nicht aber der Translationsmaschinerie der Zelle. Als „virus-ähnlich“ treten *Viroide* demnach nur bezüglich des Krankheitsbildes in Erscheinung, das sie bei einem Teil ihrer Wirtspflanzen hervorrufen.

Von den etwa 40 bislang entdeckten, natürlichen Viroid-Spezies wird der Großteil den *Pospiviroidae* zugeordnet, die nativ eine stäbchenförmige Konformation einnehmen (siehe Tab. 1.1). Alle anderen Spezies gehören der zweiten Viroid-Familie an, den *Avsunviroidae*, die sich in Struktur und Infektionszyklus von den *Pospiviroidae* unterscheiden (zur Übersicht: Ding & Itaya, 2007; Flores *et al.*, 1998). Der namesgebende Vertreter der *Pospiviroidae*, das Kartoffelspindelknollen-Viroid (*Potato Spindle Tuber Viroid*), ist Gegenstand dieser Arbeit. Erkenntnisse über *Pospiviroidae* bilden daher den Schwerpunkt der folgenden Ausführungen (zur Übersicht: Schmitz & Steger, 2007).

In Abb. 1.1 ist PSTVd in der nativen Stäbchenkonformation gezeigt, die in fünf Domänen unterteilt werden kann (Keese & Symons, 1985). Diese Domänen wurden auf-

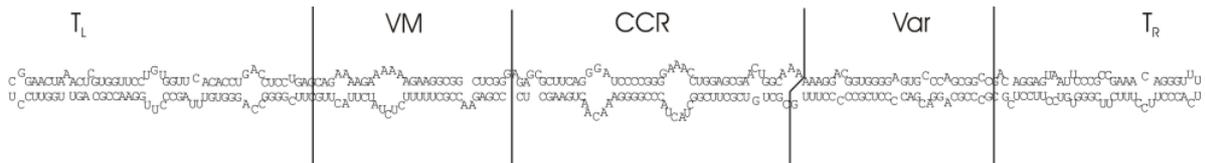


Abbildung 1.1: Sekundärstruktur und funktionelle Domänen von PSTVd. *Pospiviroidae* können in fünf Domänen unterteilt werden, deren Lage in der Sekundärstruktur von PSTVd gekennzeichnet sind: T_L: Linker Terminus; VM: Virulenz modulierende Region; CCR: Zentral Konservierte Region; Var: Variable Region und T_R: Rechter Terminus.

grund von Sequenzvergleichen definiert und konnten, vor allem anhand von Mutationsanalysen, verschiedenen Funktionen zugeordnet werden. Bestimmte Basenaustausche innerhalb der Virulenz-modulierenden Region (VM) haben einen großen Einfluss auf die pathogene Wirkung der entsprechenden Viroid-Varianten (Schnölzer *et al.*, 1985). Alle *Pospiviroidae* enthalten eine Zentral Konservierte Region (CCR). Diese wird vor allem mit der Prozessierung und Ligation in Zusammenhang gebracht (Schrader *et al.*, 2003; Baumstark *et al.*, 1997a) und enthält das Strukturelement Loop E, das in ähnlicher Form auch in zelleigenen RNAs (z.B. 5S-RNA) vorkommt. Die benachbarte Variable Region (Var) variiert an vielen Positionen zwischen den verschiedenen Vertretern der *Pospiviroidae*, ist aber dennoch von essentieller Bedeutung. Eine Destabilisierung dieses Bereichs hemmt die Replikation von PSTVd signifikant (Hu *et al.*, 1996). Ebenfalls an der Replikation beteiligt ist der linke Terminus (TL), denn dort beginnt die Transkription von PSTVd (Kolonko *et al.*, 2006). In Übereinstimmung dazu können Mutationen des linken terminalen Loops zu nicht-infektiösen PSTVd-Varianten führen. Mutationen der rechten terminalen Haarnadelstruktur wirken sich auf die Transportfähigkeit der Viroide aus (Ding *et al.*, 1997; Hammond, 1994; Owens & Hammond, 1990). Die beiden endständigen Hairpin-Loops unterscheiden sich in ihrer Stabilität, was in Einklang mit ihren unterschiedlichen Funktionen steht (Scholtysik, 2006). Die extrem hohe Stabilität des linken terminalen Loops könnte dazu dienen, dass dieser stets als Erkennungsmerkmal für den Transkriptionsstart zur Verfügung steht, die Dynamik des rechten Hairpin-Loops könnte demgegenüber vorteilhaft für die Ausbildung von Wechselwirkungen mit verschiedenen Transportfaktoren sein.

Bei der thermischen Denaturierung der PSTVd-Stäbchenkonformation *in vitro* werden verschiedene Zustände durchlaufen (siehe Abb. 1.2). Die Basendissoziation beginnt in den sogenannten Premelting-Regionen und führt bei weiterem Erhitzen über eine

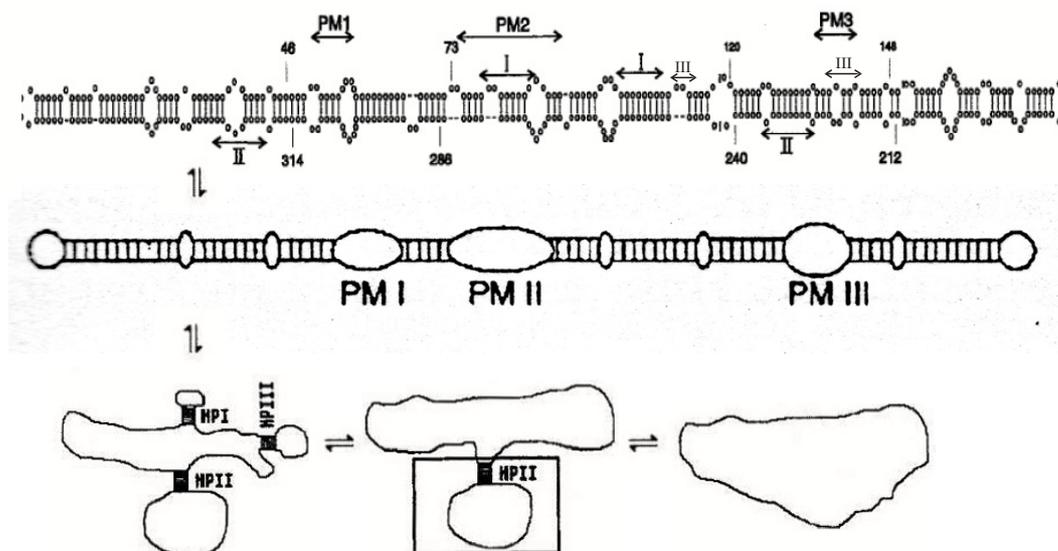


Abbildung 1.2: Thermische Denaturierung von PSTVd. Schematische Darstellung der Basendissoziation mit zunehmender Temperatur. Die Denaturierung beginnt in den Premelting Regionen. Es folgt ein Übergang zu einer Struktur, die drei Haarnadelstrukturen (HP I, II und III) enthält und endet schließlich im vollständig denaturierten Zirkel (verändert nach: Loss *et al.* (1991)).

Struktur, die drei Haarnadelstrukturen (Hairpins) enthält, zum offenen Zirkel, also zur vollständigen Denaturierung (Steger *et al.*, 1984; Henco *et al.*, 1979; Riesner *et al.*, 1979).

Das „Stäbchen“ stellt die thermodynamisch günstigste Konformation der PSTVd-RNA dar und ist die Infektions-, Transport- und Speicherform. Während des Replikationszyklus ist demgegenüber die Ausbildung metastabiler Strukturelemente von essentieller Bedeutung (Qu *et al.*, 1993; Loss *et al.*, 1991). Solche Strukturen können in der Zelle durch sequentielle Faltung der RNA entstehen (Repsilber *et al.*, 1999; Klaff *et al.*, 1996). Das bedeutet, dass sich der *de novo* synthetisierte Teil der RNA schon während der Transkription faltet, wobei Strukturelemente entstehen können, die in der thermodynamisch günstigsten Konformation fehlen. Der Hairpin II konnte in metastabilen Replikationsintermediaten von PSTVd *in vivo* nachgewiesen werden (Schröder & Riesner, 2002).

1.2.2 Der Replikationszyklus

Die Vertreter der *Pospiviroidae* werden nach einem asymmetrischen Rolling-Circle-Mechanismus repliziert (siehe Abb.1.3 und Feldstein *et al.*, 1998; Branch & Robertson, 1984, 1981). Der *per definitionem* (+)-strängige Viroid-Zirkel wird von der zelleigenen RNA-Polymerase II im Kern der Wirtszelle in die komplementäre Sequenz umgeschrie-

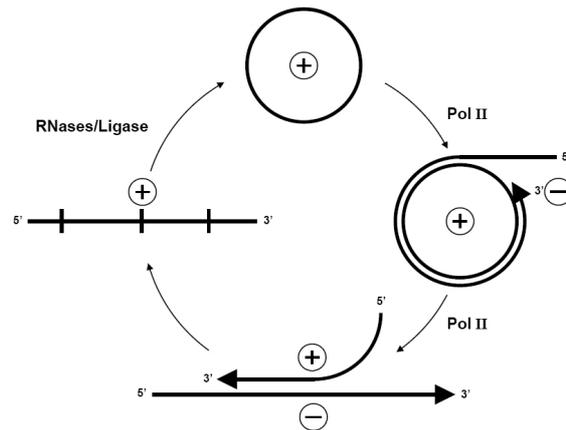


Abbildung 1.3: Asymmetrischer Rolling-Circle-Mechanismus der *Pospiviroidae*. Der zirkuläre (+)-strängige Viroid-Zirkel dient als *template* für die RNA-Polymerase II zur Synthese eines oligomeren (-)-Strangs. Dieser wird wiederum von der RNA-Polymerase II erkannt und in ein (+)-Strang-Oligomer umgeschrieben, ohne zuvor geschnitten und ligiert zu werden. Diese RNA muss eine metastabile Konformation einnehmen, um durch bislang nicht eindeutig identifizierte Wirtsfaktoren geschnitten und zum Zirkel ligiert zu werden. Aus: Schmitz & Steger (2007)

ben. Das entstandene (-)-strängige Oligomer dient wiederum als Matrize für die RNA-Polymerase II zur Synthese einer (+)-strängigen RNA, die von zelleigenen Enzymen zu Monomeren exakter Einheitslänge geschnitten und zum Zirkel ligiert wird. Der Replikationszyklus wird als asymmetrisch bezeichnet, da nur der oligomere (+)-Strang, nicht aber der (-)-Strang, prozessiert und ligiert wird.

Inhibitionsstudien belegten eindeutig, dass die RNA-Polymerase II direkt an der Transkription der PSTVd-RNA beteiligt ist (Schindler & Mühlbach, 1992). In Übereinstimmung dazu wurde nachgewiesen, dass die Weizenkeim-RNA-Polymerase II an beide Termini von PSTVd bindet (Goodman *et al.*, 1984), sowie dass die Transkription des (-)-Oligomers innerhalb des linken terminalen Loops von PSTVd beginnt (Kolonko *et al.*, 2006). Unklar ist indes, warum die RNA-Polymerase II, ein eigentlich DNA-abhängiges Enzym, die Viroid-RNA als *template* akzeptiert. Aufgrund von ergänzenden Mutationsanalysen wurde von Kolonko *et al.* (2006) das linke Stäbchenende mit wenigstens einer GC-Box als Erkennungsmotiv für die RNA-Polymerase II diskutiert.

Im Gegensatz zu den *Avsunviroidae*, deren RNA die enzymatische Aktivität zur Selbst-Spaltung trägt (zur Übersicht: Daròs *et al.*, 2006), sind *Pospiviroidae* sowohl für die Prozessierung als auch für die Ligation auf zelluläre Faktoren angewiesen. *In vitro*-Studien von PSTVd zeigten, dass die CCR alle notwendigen Elemente zur Prozessierung und Ligation der Viroide enthält (Schrader *et al.*, 2003; Baumstark *et al.*, 1997b). Der 3', der

5'-Schnitt und die Ligation geht nach Schrader *et al.* (2003) mit Konformationsänderungen innerhalb der CCR einher. Für den 5'-Schnitt ist die Ausbildung einer metastabilen, verzweigten Konformation Voraussetzung. Anschließend wird die thermodynamisch stabile, das Strukturelement Loop E enthaltende Sekundärstruktur eingenommen und es erfolgt der 3'-Schnitt und die Ligation. Klümper (2002) konnte nachweisen, dass die verschiedenen Schritte der Prozessierung tatsächlich von unterschiedlichen Wirtsfaktoren vermittelt werden.

1.2.3 Pathogenese

Viroide wurden entdeckt, weil sie Kulturpflanzen infizieren und dabei ähnliche Krankheitssymptome wie Pflanzenviren verursachen können. Die Symptome, die von Internodienstauungen über Blattmissbildungen, Chlorosen, seltener Nekrosen bis hin zum Absterben der Pflanze reichen, treten aber nicht in jedem Fall auf. Dies ist vielmehr vom Genotyp der Wirtspflanze und der Viroidvariante abhängig. Die verschiedenen Viroid-Spezies haben ein mehr oder weniger stark begrenztes Wirtsspektrum. Zu den Wirtspflanzen von PSTVd gehören verschiedene Vertreter der *Solanaceen*, unter denen sich sowohl Kultur- als auch Wildpflanzen befinden. Deutliche Krankheitssymptome werden lediglich von der Tomatenvarietät „Rutgers“ ausgeprägt, während die Infektion von Wildpflanzen wie Schwarzer Nachtschatten und sogar von anderen Tomatenvarietäten (z.B. „Rotkäppchen“) asymptomatisch verläuft. Der Grad der Symptomausprägung nach einer Infektion von Tomaten des Genotyps „Rutgers“ hängt darüber hinaus von der genauen Sequenz der Viroid-RNA ab (zur Übersicht: Riesner & Gross, 1985).

Da sich ein Großteil der Mutationen, welche die pathogene Wirkung von PSTVd beeinflussen, in der VM-Region befinden, konzentrierten sich verschiedene Studien auf eine Charakterisierung dieses Sequenzbereichs. Es zeigte sich aber, dass weder die Thermostabilität noch die Sekundärstruktur der VM-Region der verschiedenen PSTVd-Varianten mit deren Pathogenität korreliert (Matoušek *et al.*, 2007; Owens *et al.*, 1996).

Nach der Entdeckung von PSTVd-spezifischen kleinen RNAs in infizierten Pflanzen wurde ein neues Modell zur Pathogenität von PSTVd aufgestellt. Dieses beruht auf der Annahme, dass durch das Viroid ein *RNA-Silencing* ausgelöst wird (Papaefthimiou *et al.*, 2001). Bei diesem Vorgang wird, vermittelt durch kurze RNAs, die Ziel-RNA gespalten oder deren Translation gehemmt. *Target* der PSTVd-spezifischen kurzen RNAs könnte

eine komplementäre pflanzliche mRNA sein, was die pathogene Wirkung von PSTVd erklären würde.

Tatsächlich konnten Matoušek *et al.* (2007) eine Korrelation zwischen Symptomstärke und der Menge an kleinen PSTVd-spezifischen RNAs nachweisen. Eine *in silico*-Untersuchung legte weiterhin nahe, dass ein Austausch von drei Nukleotiden innerhalb der VM-Region, der die Pathogenität verstärkt, ebenfalls die Komplementarität der entsprechenden PSTVd-Sequenz zum Arabidopsis-Genom erhöht (Schmitz & Steger, 2007).

Unter dem Begriff *RNA-Silencing* werden mehrere Erscheinungen zusammengefasst, denen gemeinsam ist, dass kleine RNA-Moleküle die Genexpression schwächen (zur Übersicht Zaratiegui *et al.*, 2007; Dykxhoorn *et al.*, 2003). Bei dem *siRNA-Silencing* wird die Genexpression reguliert, indem eine Ziel-RNA, z.B. eine zelluläre mRNA oder eine RNA viralen Ursprungs, abgebaut wird (Hamilton & Baulcombe, 1999). Dabei wird eine doppelsträngige RNA vom Enzym Dicer geschnitten, wobei kleine RNA-Moleküle (siRNAs) entstehen. Diese siRNAs binden an den RISC (RNA-induced silencing complex), welcher sie zur Ziel-RNA leitet. Die siRNA bindet mit perfekter Komplementarität an die RNA und spaltet diese. Bei dem *miRNA-Silencing* wird demgegenüber eine genetisch kodierte Vorläufer-RNA durch Dicer unter Bildung einer miRNA geschnitten (zur Übersicht: Dykxhoorn *et al.*, 2003). Die Bindung einer pflanzlichen miRNA an die Ziel-RNA mit typischerweise nahezu perfekter Komplementarität bewirkt deren Spaltung, während durch die Bindung einer tierischen miRNA mit meist geringerer Komplementarität die Translation inhibiert wird (Rhoades *et al.*, 2002).

Es ist erkennbar, dass die kurzen PSTVd-spezifischen RNAs unterschiedlichen Ursprungs sein können. Einmal könnte die native „Stäbchenstruktur“ des PSTVd von der Zelle als doppelsträngig erkannt und in kleine RNAs (siRNAs) geschnitten werden, die das gesamte viroidale Genom repräsentieren. Auf der anderen Seite könnte PSTVd auch als Vorläufer einer miRNA fungieren, so dass kleine RNAs mit einheitlicher Sequenz bzw. mit wenigen verschiedenen Sequenzen entstehen. Eine Sequenzierung von isolierten, klonierten kurzen RNAs ergab, dass die RNAs mit (+)-PSTVd-Sequenz hauptsächlich von der oberen TL- und Variablen Region, sowie der unteren TR-Region stammen (Itaya *et al.*, 2007). Es erscheint indes fraglich, ob in dieser Untersuchung alle Sequenzen erfasst wurden. Vielmehr geht unter den verwendeten Bedingungen ein Großteil der kurzen RNAs verloren (Natalie Diermann, mündliche Mitteilung). Da die Aufreinigung unter nicht-

denaturierenden Bedingungen stattfand, ist insbesondere zu befürchten, dass jene kleinen RNAs, welche an ihre Ziel-RNA binden, nicht aufgereinigt werden. Möglicherweise wurden aus diesem Grund keine kleinen RNAs gefunden, die Sequenz-Abschnitte der VM-Region repräsentieren.

Wenig untersucht ist die Eigenschaft von Viroiden, bei den meisten Wirtspflanzen symptomlos zu bleiben, obwohl es auch hier in großen Mengen von ca. 10^4 Kopien pro Nukleolus akkumuliert (Schumacher *et al.*, 1983c). Daher wurde von Schmitz (2003) postuliert, dass der Großteil von PSTVd im Nukleolus an Proteine gebunden vorliegt. Auf der Grundlage von *in vitro*-Bindungsstudien wurde in diesem Zusammenhang eine Wechselwirkung zwischen PSTVd und dem Protein Nukleolin diskutiert.

1.2.4 Transport

Nach der Infektion ist PSTVd zunächst nur in der Pflanzenspitze und erst später auch in den Wurzeln und den weiter unten befindlichen Blättern nachweisbar. Die Ausbreitung wird als systemisch bezeichnet, da schließlich nahezu die gesamte Pflanze befallen wird. Eine Ausnahme bilden die Blätter, welche sich zwischen der Eintrittsstelle und den Wurzeln befinden (Palukaitis, 1987). Die Viroid-RNA kann auch in die Blüte gelangen, ist dort aber nur in den Kelch- und nicht in den Blütenblättern und im Fruchtknoten nachweisbar (Zhu *et al.*, 2001). Der Langstrecken-Transport von PSTVd erfolgt offenbar über das Phloem vom Ort der photosynthetisch aktiven Gewebe zu den Orten des Wachstums hin, also in Richtung des Assimilat-Transports („*from source to sink*“). Dieser Prozess beruht aber nicht rein auf einer Diffusion, sondern auf einem gerichteten Transport der Moleküle in verschiedene Pflanzenteile, der hoch reguliert ist und von Strukturmotiven auf der Viroid-RNA vermittelt wird. Es wird vermutet, dass diese Struktur motive auch in endogenen RNAs enthalten sind und von Viroiden „nachgeahmt“ werden, um die Transportsysteme des Wirtes nutzen zu können (zur Übersicht: Ding *et al.*, 2005).

Die Replikation der *Pospiviroidae* findet im Zellkern statt, wohin die Viroide folglich nach der Infektion gelangen müssen. Die PSTVd-RNA wird dabei aktiv transportiert (Woo *et al.*, 1999), wahrscheinlich im Komplex mit dem Protein VirP1, das ein Kernlokalisierungssignal trägt (Maniataki *et al.*, 2003). Dieses Protein bindet an ein sogenanntes RY-Motiv im Bereich des Rechten Terminus von PSTVd (Zhao *et al.*, 2001). Innerhalb des Kerns befindet sich (+)-PSTVd zu gleichen Teilen im Plasma und im Nukleolus, in dem es

folglich in höherer Konzentration vorliegt. Demgegenüber sind (-)-strängige Replikationsintermediate ausschließlich im Kernplasma nachweisbar (Qi & Ding, 2003; Harders *et al.*, 1989). Es findet also weiterhin ein intranukleärer, spezifischer Import von (+)-PSTVd in den Nukleolus statt, der möglicherweise durch den Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA) vermittelt wird (Bannach, 2006). Nach ihrer Vermehrung können Viroide weitere Zellen befallen, indem sie nach dem Import ins Cytoplasma die Plasmodesmata passieren (Ding *et al.*, 1997). Für den Langstrecken-Transport müssen sie aber in das Phloem importiert werden. Der Transport von der Leitbündelscheide in das vaskuläre System wird durch ein RNA-Motiv vermittelt, das sich im Bereich der VM-Region befindet (Zhong *et al.*, 2006). Eine umfassende Mutationsanalyse des Loops U43/C318 legte nahe, dass ausschließlich PSTVd-RNA mit Nukleotid-Kombinationen, welche kein *Watson-Crick*-Basenpaar erlauben, zum Eintritt in das Phloem in der Lage sind. Möglicherweise erleichtert dieses Strukturmotiv demnach die Bindung der RNA an ein Protein, das den Transport vermittelt.

Wenige Wochen nach der Infektion ist der endgültige PSTVd-Titer erreicht. Die durchschnittliche Kopienzahl pro Nukleus beträgt 10^4 Viroide (Harders *et al.*, 1989; Schumacher *et al.*, 1983c). Da aber nur etwa 20 % der Zellen befallen sind, können sich in einer individuellen, infizierten Zelle tatsächlich ca. $5 \cdot 10^5$ Viroide befinden.

1.3 RNA als Wechselwirkungspartner

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass Viroide *in vivo* mit Proteinen (Wolff *et al.*, 1985), aber auch mit Nucleinsäuren wechselwirken. Bereits 1992 konnte Gruner (1992) *in vivo* an pflanzliche Nucleinsäure gebundene Viroide nachweisen, allerdings ohne eine wechselwirkende, zelluläre RNA identifizieren zu können. *In vitro*-Hybridisierungen von Gesamt-RNA zeigten zwar eine Bindung von PSTVd an ribosomale 18 S- und 25 S-RNA, in Ribosomen konnten diese aber mittels Northern-Blot-Analyse nicht nachgewiesen werden (Thiel, 1999). Erst 2001 entwickelte Aschermann ein Affinitätschromatographisches Aufreinigungsverfahren, mit dem es gelang, Komplexe aus PSTVd und einer zellulären RNA aus einem *in vitro*-RNA-Extrakt zu isolieren. Die pflanzliche Komponente dieser Komplexe konnte auch identifiziert werden: es handelte sich um ribosomale 5 S-RNA. Die Existenz dieser PSTVd-5 S-RNA-Komplexe konnte sodann auch *in vivo* an Protoplasten infizierter Kartoffelzellkulturen bestätigt werden. Krause (2002) konnte, nach Anwendung dessel-

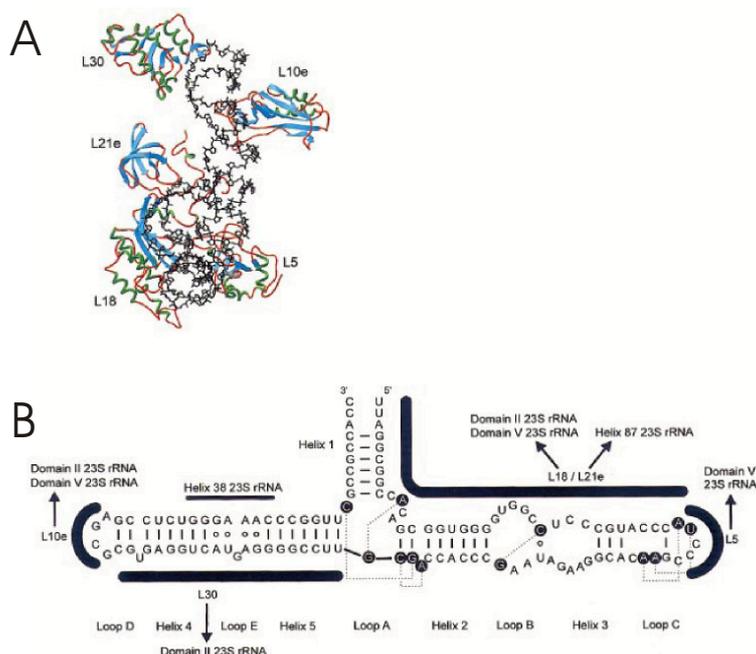


Abbildung 1.5: Wechselwirkungen von 5S-RNA innerhalb des Ribosoms. A) Das Modell zeigt die 5S-RNA innerhalb der Kristallstruktur der großen ribosomalen Untereinheit von *H. marismortui*. B) Sekundärstruktur der 5S-RNA von *H. marismortui*. Die Nukleotide, die an Wechselwirkungen mit Proteinen bzw. der 23S-RNA beteiligt sind, sind mit schwarzen Balken markiert. Die Nukleotide, die tertiäre Wechselwirkungen ausbilden, sind mit schwarzen Kreisen markiert (aus: Szymanski *et al.*, 2003).

Genen beeinträchtigt die Wachstumsrate von *Escherichia coli* drastisch (Ammons *et al.*, 1999). Ebenfalls bei *Escherichia coli* konnten Hinweise auf eine Beteiligung der 5S-RNA an der Signaltransduktion zwischen dem Peptidyltransferase- und GTPase-Zentrum der 23S-RNA gewonnen werden (Dokudovskaya *et al.*, 1996). Auch ein Einfluss der 5S-RNA auf die Stabilität der großen ribosomalen Untereinheit war zu beobachten (Holmberg & Nygard, 2000).

Wechselwirkungen

Das pflanzliche Ribosom enthält neben 50 Proteinen vier RNAs, nämlich 25S-, 5,8S- und 5S-RNA in der großen, und 18S-RNA in der kleinen Untereinheit. Es existieren wenige RNA-RNA-Kontakte, jedoch zahlreiche Wechselwirkungen zwischen der 5S-RNA und ribosomalen Proteinen innerhalb des Ribosoms (siehe Abb. 1.5 und zur Übersicht: Szymanski *et al.*, 2003). An *E. coli*-Ribosomen konnte aber ein Crosslink zwischen der 23S-RNA und der 5S-RNA im Bereich ihres Loop D identifiziert werden (Dokudovskaya

et al., 1996). Die Kristallstruktur von bakteriellen Ribosomen (*H. marismortui*) zeigte ebenfalls, dass ein Kontakt zwischen 23S- und 5S-RNA besteht, nämlich ein *A-minor*-Motiv zwischen dem Loop E der 5S-RNA und den Adeninen 955, 1013 und 1014 der 23S-RNA (Nissen *et al.*, 2001).

Die 5S-RNA ist aber nicht vollständig in Ribosomen inkorporiert, sondern liegt auch an Proteine gebunden vor an das ribosomale Protein. In der eukaryotischen Zelle handelt es sich hauptsächlich um das ribosomale Protein L5 und den Transkriptionsfaktor IIIA (TFIIIA). Mutationsanalysen zeigten, dass an der Wechselwirkung zwischen dem Protein L5 und 5S-RNA der Hairpin aus Helix III und Loop C beteiligt ist (Scripture & Huber, 1995). Die von Lu *et al.* (2003) gelöste Kristallstruktur des Komplexes zwischen einer trunkierten 5S-RNA von 61 Nukleotiden und der RNA-Bindedomäne von TFIIIA zeigte, dass die Zink-Finger 4 bis 6 des Proteins Kontakte zu dem zentralen Bereich der 5S-RNA, inklusive Loop E, Helix V, Loop A, Helix II und einem Teil von Helix IV, ausbilden. Im Cytoplasma von *Xenopus*-Oocyten wurden weiterhin sogenannte Thesaurisomen nachgewiesen, die 5S-RNA im Komplex mit dem Protein Thesaurin b (p43) enthalten (Viel *et al.*, 1991). In Rattenleberzellen befinden sich 5S-RNA-L5-RNP-Partikel, die mit Aminoacyl-tRNA-Synthetasen assoziieren (Ogata *et al.*, 2001).

Transport

Basierend auf der Bindung an die Proteine L5 und TFIIIA und deren Funktionen wurde ein Modell der Autoregulation der Transkription der 5S-RNA bei *Xenopus*-Oocyten entwickelt (zur Übersicht Szymanski *et al.*, 2003).

Nach ihrer Synthese durch die RNA-Polymerase III im eukaryotischen Zellkern wird die 5S-RNA im Komplex mit TFIIIA ins Cytoplasma exportiert. Innerhalb dieses 7S-RNP-Partikels kann sie gespeichert und bei Bedarf, der durch steigende Konzentrationen von L5 angezeigt wird, aus dem Komplex entlassen werden. In diesem Fall wird TFIIIA unter Bildung eines 5S-RNP-Partikels, der 5S-RNA und L5 enthält, freigesetzt. TFIIIA kann neben der RNA auch mit hoher Affinität den Promotor der 5S-rDNA binden, was zur Initiation der 5S-RNA-Transkription erforderlich ist (Lu *et al.*, 2003). Die mit L5 komplexierten 5S-RNA-Moleküle werden in den Nukleus bzw. Nukleolus transportiert und dort in Ribosomen inkorporiert. Dieser Mechanismus garantiert, dass die Transkription der 5S-RNA eng an die Synthese des Proteins L5 gekoppelt ist (Pittman *et al.*,

1999). Da die 5S-RNA nur im Komplex mit L5 in den Nukleus importiert wird, ist ferner gewährleistet, dass zur Assemblierung der Ribosomen 5S-RNA und L5 im richtigen Verhältnis zueinander vorliegen (Murdoch & Allison, 1996). Der Einbau der 5S-RNA in das Ribosom erfolgt im Komplex mit L5 und auch innerhalb des reifen Ribosoms bestehen Kontakte zwischen diesen Molekülen.

1.3.2 Biophysikalische Eigenschaften der 5S-RNA-PSTVd-Komplexe

Im Verlaufe der vorliegenden Arbeit wurde eine Untersuchung zur biophysikalischen Charakterisierung von *in vitro*-5S-RNA-PSTVd-Komplexen von Remennik (2003) fertig gestellt. Mittels TGGE konnte nachgewiesen werden, dass durch thermische Denaturierung und langsames Wiederabkühlen entstandene 5S-RNA-PSTVd-Komplexe die gleiche Thermostabilität aufweisen wie 5S-RNA-Dimere. Der Übergang der Komplexe in Einzelkomponenten erfolgte bei einer Na^+ -Konzentration von 20 mM bei 37°C. In der gleichen Arbeit konnten Komplexe zwischen PSTVd und 5S-RNA sowohl nach Inkubation bei 37°C und nach Prä-Transkription, d.h. Transkription von PSTVd in Anwesenheit von 5S-RNA, nachgewiesen werden.

1.4 Aufgabenstellung

Obwohl Kontakte mit zellulären Faktoren für Viroide essentiell sind, wurden bislang nur wenige Wechselwirkungspartner von PSTVd identifiziert. Neben einigen Proteinen ist 5S-RNA die einzige RNA, für die bislang eine Komplexbildung mit PSTVd *in vivo* nachgewiesen wurde (Aschermann, 2001). Sequenz-Analysen zeigten eine Vielzahl möglicher Bereiche auf dem PSTVd-Molekül, an denen ausgeprägte Komplementaritäten zur 5S-RNA bestehen. Eine der möglichen Wechselwirkungen befindet sich zwischen dem Loop E der 5S-RNA und dem Rechten Terminus von PSTVd, dessen Beteiligung am Transport von PSTVd durch Mutationen innerhalb der rechten Haarnadelstruktur belegt werden konnte (Hammond, 1994). Anhand einer *in silico*-Analyse zeigte Aschermann (2001), dass diese Mutationen einen Einfluss auf die Stabilität der soeben genannten Wechselwirkung haben. Diese Daten legen nahe, dass die Wechselwirkung *in vivo* von Bedeutung sein könnte. Betrachtet man auf der anderen Seite das komplexe 5S-RNA-spezifische Transportsystem in der eukaryotischen Zelle, so erschließt sich auch eine mögliche Funktion

dieser Wechselwirkung: PSTVd könnte im Komplex mit der 5S-RNA einen der Transportwege nutzen.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit sollte eine eingehende Charakterisierung der 5S-RNA-PSTVd-Komplexe sein mit dem Ziel, die Position(en) des Kontakts zwischen beiden RNAs zu ermitteln. Die Existenz definierter Bindestellen kann als Beleg für eine funktionelle Bedeutung der Wechselwirkung dienen und die Eingrenzung der Bindepotion auf dem PSTVd-Molekül erlaubt wahrscheinlich Rückschlüsse auf die Funktion der Komplexbildung mit der 5S-RNA für PSTVd. Auf diese Weise sollte es auch möglich sein, das von Aschermann (2001) entwickelte Modell zum Transport von PSTVd zu bestätigen oder zu verwerfen. Schließlich stellt die genaue Kenntnis der Bindestelle eine notwendige Grundlage für Mutationsanalysen *in vivo* dar.

Material

2.1 Chemikalien und Lösungen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen wurden stets mit hochreinem Milli-Q-Wasser (Millipore-Waters-GmbH, Neu Isenburg) angesetzt und, wenn sie länger gelagert wurden 20 min bei 120°C und 3 bar autoklaviert. Lösungen, die nicht autoklavierbar sind, wurden vor der Lagerung steril filtriert, wobei ein Filter mit einem Porendurchmesser von 0,2 μm (FP 030/3, Schleicher und Schuell, Dassel) verwendet wurde. Prozentangaben erfolgen, falls nicht anders vermerkt, in *weight per volume*(w/v). Die Zusammensetzung häufig eingesetzter Puffer ist im Folgenden angegeben, die der übrigen Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten des Methodenteils verzeichnet.

1 \times TE	10 mM Tris/HCl, pH 8.0
	1 mM EDTA
10 \times TBE	890 mM Tris
	890 mM Borsäure
	25 mM EDTA
	pH 8.3

10 × NaTAE	1 M	Natriumacetat
	400 mM	Tris/Essigsäure, pH 8.4
	10 mM	EDTA
		pH 8,3 mit Essigsäure
1 × TNE-Isolationspuffer	100 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	100 mM	Natriumchlorid
	10 mM	EDTA
10 × TNE-Hybridisierungspuffer	500 mM	Tris/HCl, pH 7.5
	1 M	Natriumchlorid
	10 mM	EDTA
20 × SSC	3 M	Natriumchlorid
	300 mM	Trinatriumcitrat
		pH 7.0 mit Salzsäure
70 % Formamid-Auftragspuffer	70 %	Formamid
	30 %	1 × TE-Puffer
	0,05 %	Bromphenolblau
	0,05 %	Xylencyanol

Das Psoralenderivat 4'-Aminomethyl-4,5'8-trimethyl-psoralen (AMT) wurde von der Firma HRI Research, Inc., Concord (CA), USA bezogen. Produkte des Digoxigenin-Systems und Biotin-16-uridin-5'-triphosphat wurden von Roche (Mannheim) geliefert. Das Chemolumineszenz Substrat CDP-Star[™] stammte von der Firma Tropix, Inc. Massachusetts, USA bzw. New England Biolabs Inc. Ipswich, UK.

2.2 Nukleinsäuren

2.2.1 Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab.2.1 verzeichnet. Sie dienten als *templates* für Sequenzierungen und PCR-Reaktionen und für *in vitro*-Transkriptionen (Abschnitte 3.4.1, 3.1.3 und 3.1.4 bzw. 2.2.3). Für die *in vitro*-

Tabelle 2.1: Plasmide als Matrizen für Sequenzierungen, PCR-Reaktionen und *in vitro*-Transkriptionen. Für den Einsatz bei der *in vitro*-Transkription wurden die Plasmide mit *Eco* RI linearisiert. Die PSTVd-Transkripte weisen die Sequenz des Stamms *Intermediate* auf. Das Plasmid pGEM5SLE enthält die 5 S-RNA-DNA-Sequenz von *Lycopersicon esculentum*

Plasmid	Polarität und Länge	Bereich
pRH715	(+)-Monomer (368 Nt)	147-359/1-146
pRH713	(+)-Monomer (368 Nt)	282-359/1-281
pRH716	(+)-Monomer (368 Nt)	146-1/359-147
pRH714	(+)-Monomer (368 Nt)	281-1/359-282
pRH717	(+)-Dimer (727 Nt)	282-359/1-359/1-281
pGEM5SLE	5S-DNA	

Transkription wurden die Plasmide in mit dem Restriktionsenzym *Eco* RI linearisierter Form von Herrn Bernd Esters zur Verfügung gestellt. Bei den als Transkriptionsmatrizen eingesetzten Plasmiden ist angegeben, welcher Bereich der PSTVd-Sequenz genau enthalten ist. Das Plasmid mit dimerer PSTVd-Sequenz wurde ausschließlich als *template* von PCR-Reaktionen eingesetzt (s.u.).

2.2.2 Primer für PCR-Reaktionen

Neben Plasmiden wurden als Transkriptionsmatrizen auch PCR-Produkte eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden PCR-Reaktionen mit verschiedenen Primern durchgeführt, deren Sequenz in den Tab. 2.2, 2.3, 2.4 und 2.5 angegeben ist. Einer der Primer enthielt stets ein *T7*-Promotorelement. Ein Primer weist die invertierte Sequenz, der andere die (+)-Sequenz der jeweiligen RNA auf, wobei Uracil durch Thymin ersetzt ist, da es sich um DNA-Oligonukleotide handelt. Zur Herstellung von Transkripten mit PSTVd-Sequenz dienten zunächst Plasmide (für PSTVd-Volllänge pRH717, für Teiltranskripte pRH715) als *template*, alternativ wurden PCR-Produkte reamplifiziert. Transkripte mit 5 S-RNA-Sequenz wurden mit Hilfe von PCR-Reaktionen mit genomischer DNA als *template* durchgeführt (Abschnitt 2.2.4). In Abschnitt 2.2.3 ist der von den auf diese Weise hergestellten Transkripten repräsentierte Sequenzbereich angegeben.

Tabelle 2.2: Zur Herstellung von PSTVd-Transkripten mit (+)-Sequenz eingesetzten Primer.
Die Sequenz des *T7*-Promotorelements ist **fett** gedruckt. *weist zusätzliches G am 5'-Ende auf.

Name	Sequenz	Position	Länge
AS1	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GGC CGA CAG GAG TAA TTC CC 3'	145-164	20(+17)
AS2	5' GCT GGG CAC TCC CCA C 3'	129-144	16
PS1	5' CAG TTC GCT CCA GGT TTC CCC GGG G 3'	91-115	25
PS2	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GGT TCC TCG GAA CTA AAC TCG 3'	353-14	21(+17)
PS3	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GGC TCG GAG GAG CGC TTC AGG 3'	88-68	21
PS4	5' CCC TGT TTC GGC GGG AAT TAC TCC 3'	176-151	24
PS5	5' CGA GGA ACC AAC TGC GGT TCC AAG G 3'	337-2	24
PS6	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GGC TTC GGC TAC TAC CCG G 3'	249-266	19(+17)*
PS7	5' GCG GTT CTC GGG AGC TTC AGT TGT TTC C 3'	268-295	28
PS8	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GGT TTT CAC CCT 3' TCC TTT CTT CG 3'	175-197	23(+17)
PS12	5' GGG CAC TCC CCA CCG TCC	141-124	18
PS13	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GGA CCA CCC CTC GCC C 3'	220-235	16
PS14Prr	5' GCG GGC GCG AGG AAG GAC 3'	218-201	18
PS15Prf	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GCG GCC GAC AGG AGT AAT TC 3'	218-143	20(+17)
PS16	5' AGG TCA GGT GTG AAC CAC AGG AAC C 3'	40-16	25
PS17	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GGC GAG GGT GTT TAG C 3'	336-321	16(+17)
PS27	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GCT GTC GCT TCG GCT ACT AC 3'	243-263	21

Tabelle 2.3: Sequenz der zur Herstellung von PSTVd-Transkripten (-)-Sequenz eingesetzten Primer. Das *T7*-Promotorelement ist in der Sequenz **fett** gedruckt. **Primer enthält zwei zusätzliche G am 5'-Ende.

Name	Sequenz	Position	Länge
AF21	5' CGG AAC TAA ACT CGT GGT TC 3'	20-1	20
AF6	5' GGA AAC AAC TGA AGC TCC CGA GAA C 3'	268-292	24
AF9	5' TCA CCC TTC CTT TCT TCG GGT GTC CTT C 3'	180-207	27
ND1	5' GAA GGC GGC TCG GAG GG 3'	61-78	17
ND2- <i>T7</i>	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GGA AGG ACA CCC GAA GAA AGG AAG GGT G 3'	208-168	28(+17)
ND3- <i>T7</i>	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GGA ACC ACG AGT TTA GTT CCG 3'	21-1	21(+17)
RGV1- <i>T7</i>	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GCC TGA AGC GCT CCT CCG AG 3'	87-69	20(+17)**
XC3- <i>T7</i>	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GCG GTT CTC GGG AGC TTC AGT TGT TTC C 3'	295-268	28(+17)*

Tabelle 2.4: Sequenz der zur Herstellung von Transkripten mit 5S-RNA-Sequenz eingesetzten Primer. Das *T7*-Promotorelement ist in der Sequenz **fett** gedruckt. Der Primer Le5St7bglII enthält am 5'-Ende zusätzlich zum T7-Promotor eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BglII.

Name	Sequenz	Position	Länge
(+)5S	5' AGG GAT GCA ACA CGA GGA CTT CCC 3'	1-24	24
(+)5S- <i>T7</i>	5' TAA TACGAC TCA CTA TA GGA TGC GAT CAT ACC ACA C 3'	1-20	19(+17)
Le5S2	5' GGA TGC GAT CAT ACC AGC AC 3'	1-20	20
Le5St7bglII	5' GCG CCA GAT CTT AAT ACG ACT CAC TAT A GGG ATG CAA CAC GAG GAC T 3'	2-21	19(+28)

2.2.3 *In vitro*-Transkripte

Zur Einstellung von Komplexen zwischen 5S-RNA und PSTVd wurden in der vorliegenden Arbeit vorwiegend *in vitro*-Transkripte verwendet. Die mit Hilfe von Transkriptions-

Tabelle 2.5: Sequenz der zur Herstellung von Transkripten der anderen zellulären RNAs eingesetzten Primer. Das *T7*-Promotorelement ist in der Sequenz *fett* gedruckt.

Name	Sequenz	Länge
rr2f	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GGT GAA TTA 5' ACT GAG AAG G 3'	24(+17)
rr2r	5' GGC AAC CAT CTT TTG ATG GG 3'	27
U14f	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GGT TTC AGA CAT CCA AGG AAG G 3'	22(+17)
U14r	5' GGT TAA TGA TGA TAA ATC CAA AGG 3'	24
7Sf	5' TAA TAC GAC TCA CTA TA GTT GAG CTT AGT AAC GTG G 3'	19(+17)
7Sr	5'AAA GGT GGT TGT TTA TTG GAG CAA 3'	24

Tabelle 2.6: *In vitro*-Transkripte mit PSTVd-Sequenz, hergestellt mit Plasmiden als Matrizen. Angegeben ist jeweils das verwendete Plasmid und Name, Polarität, Beginn und Länge des Transkriptionsprodukts.

Transkript	Plasmid	Polarität	Beginn	Länge[Nt]
PSTVd IVT 1	pRH715	(+)	147	368
PSTVd IVT 3	pRH713	(+)	282	368
PSTVd IVT 1b	pRH716	(-)	147	368
PSTVd IVT 3b	pRH714	(-)	282	368

plasmiden hergestellten *in vitro*-Transkripte enthalten gegenüber der PSTVd-Volllänge klonierungsbedingt 9 zusätzliche Nukleotide (Tab.2.6). Die Transkripte IVT 1b und IVT 3b weisen die (-)-PSTVd-Sequenz auf. Diese dienten entweder, markiert mit Digoxigenin, als „Northern“-Sonden oder, markiert mit Biotin, als Sonden für eine Dynabeads®-Aufreinigung von (+)-PSTVd. Die durch *in vitro*-Transkription mit PCR-Produkten als Matrize hergestellten RNAs mit PSTVd-Sequenz sind in Tab. 2.7 verzeichnet. Jene, welche die Sequenz verschiedener zellulärer RNAs enthalten, sind in 2.8 angegeben.

Tabelle 2.7: *In vitro*-Transkripte mit PSTVd-Sequenz, hergestellt mit PCR-Produkten als Matrizen. Die zur Herstellung von Transkriptionsmatrizen mittels PCR benötigten Primer, der von dem jeweiligen Transkript repräsentierte Bereich der PSTVd-Sequenz und die Länge des Transkripts sind angegeben. Die Vollängen-Transkripte PSTVd IVT 1 und IVT 3 sind lineare PSTVd-Transkripte mit (+)-Sequenz, die an unterschiedlichen Positionen „offen“ sind. Die PSTVd-Transkripte IVT 1b, IVT 3b, (-)-Pol, (-)-Por, (-)-Pul und (-)-Pur weisen die (-)-, alle anderen die (+)-Sequenz des Stamms *Intermediate* auf. * weist ein zusätzliches G am 5'-Ende auf, ** zwei zusätzliche G.

Transkript	Primer 1	Primer 2	Bereich	Länge [Nt]
PSTVd IVT 2	AS 1	AS 2	145-359/1-144	359
<i>Pol</i>	PS 1	PS 2	353-115	122
<i>Por</i>	PS 3	PS 4	68-176	109
<i>Pom</i>	PS 3	PS 12	68-141	74
<i>Pul</i>	PS 5	PS 6	249-2	103*
<i>Pur</i>	PS 7	PS 8	175-295	121
<i>Pum</i>	PS 7	PS 13	220-295	76
<i>Pum-k</i>	PS 7	PS 27	243-295	53
<i>Pr</i>	PS 14pr	PS 15prt7	141-218	78
<i>Pl</i>	PS 16	PS 17	321-40	78
<i>(-)-Pol</i>	AF 21	RGV1- <i>T7</i>	1-87	87**
<i>(-)-Por</i>	ND 1	ND 2- <i>T7</i>	61-208	148
<i>(-)-Pul</i>	AF 6	ND 3- <i>T7</i>	268-21	112
<i>(-)-Pur</i>	AF 9	XC 3- <i>T7</i>	180-292	113 *

Tabelle 2.8: *In vitro*-Transkripte, welche die Sequenz der 5 S-RNA bzw. verschiedener weiterer zellulärer RNAs repräsentieren. Das Transkript (-)-5 S-RNA wurde, mit Digoxigenin markiert, als „Northern“-Sonde und, mit Biotin markiert, als Sonde zur Aufreinigung von RNAs mit 5 S-RNA-Sequenz verwendet. Alle anderen Transkripte wurden zur Bildung von Komplexen mit PSTVd bzw. 5 S-RNA eingesetzt.

Transkript	Primer 1	Primer 2	Bereich	Polarität	Pflanze
(+)-5 S-RNA	(+)5S	(+)5S- <i>T7</i>	1-120	normal	Tomate
(-)-5 S-RNA	Le5S 2	Le5St7bgl II	1-120	invertiert	Tomate
rr2-RNA	rr2f	rr2r	1-341	normal	<i>Arabidopsis</i>
U 14-RNA	U 14f	U 14r	1-122	normal	<i>Arabidopsis</i>
7 S-RNA	7 Sf	7 Sr	1-308	normal	<i>Arabidopsis</i>

Tabelle 2.9: Oligonukleotide mit komplementärer 5 S-RNA-Sequenz für Konkurrenzexperimente, *primer extension*-, „Northern“-Analysen.

Name	Sequenz	Position	Länge
5S1	5' GGG AAT GCA ACA CGA GGA CT 3'	101-120	20
5S2	5' GGG GGT CAC CCA TCC TAG TAC 3'	75-95	21
5S3	5' GCA CGC TTA ACT TCG GAG TTC 3'	41-61	21
5S3b	5' AGC ACG CTT AAC TTC GGA GTT CTG ATG GAA T 3'	33-62	21
5S4	5' CCG GTG CGT TAG TGC TGG TAT GAT CG 3'	7-32	26

2.2.4 Genomische DNA

Zur Amplifikation der Transkriptionsmatrizen wurde genomische DNA aus *Lycopersicon esculentum* (5 S-RNA beider Polaritäten) und aus *Arabidopsis thaliana* (andere zelluläre RNAs) benötigt. Die genomische DNA wurde aus Blattgewebe der Pflanzen von Herrn Axel Schmitz nach einer von Schumacher (1984) beschriebenen und leicht modifizierten Methode präpariert.

2.2.5 Oligonukleotide für Konkurrenzexperimente, *primer extension*- und „Northern“-Analysen

Die Sequenzen jener DNA-Oligonukleotide, die für die *primer extension*-Analysen, für die Konkurrenzexperimente und für den spezifischen Nachweis von PSTVd bzw. 5 S-RNA nach „Northern-Blotting“ verwendet wurden, sind in Tab. 2.9 und 2.10 angegeben.

2.3 Pflanzenmaterial

PSTVd und 5 S-RNA wurden in der vorliegenden Arbeit vorwiegend durch *in vitro*-Transkription, zum Teil aber auch durch Gelelektion aus RNA-Extrakten von Tomatenpflanzen gewonnen. Die Tomatenpflanzen der Varietät *Rutgers* wurden in einem Gewächshaus gezogen, das auf 26 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % eingestellt war. Die Pflanzen wurden ein bis zwei Wochen nach der Aussaat pikiert und mit PSTVd *Intermediate* infiziert. Dazu wurde eines der Keimblätter mit *Carborundum* 320

Tabelle 2.10: Oligonukleotide mit (-)-PSTVd-Sequenz für Konkurrenzexperimente, *primer extension*-, und „Northern“-Analysen. *Oligonukleotid enthält zwei zusätzliche G.

Name	Sequenz	Position	Länge
AF7	5' GTT CGG TCC AGG TTT CCC CGG GGA T	113-89	25
NK5	5' GAG GTC AGG TGT GAA 3'	41-26	16
RGV2	5' GAG GTC AGG TGT GAA CCA CAG 3'	41-21	21
RGV5	5' GGA AGG ACA CCC GAA GAA AGG AAG GGT GAA AA 3'	208-177	32
PS11	5' GGC CGG GTA GTA GCC GAA GCG ACA G 3'	266-244	23+2*
PS14	5' GGA ACC ACG AGT TTA GTT CCG AGG 3'	21-357	24
PS15	5' GGG GCG AGG GTT GTT CCT GCG 3'	236-216	21
PS21b	5' GCT GGG CAC TCC CCA CCG TCC 3'	145-124	21
PS22	5' GCT TCA GTT GTT TCC ACC GGG 3'	280-262	21
PS24	5' ACA CCC GAA GAA AGG AAG GGT GAA AAC CCT G 3'	202-172	31
PS25	5' CCG CTG GGC ACT CCC CAC CGT CC 3'	146-124	23
PS26	5' GTA GCC GAA GCG ACA GCG CAA AGG GGG CGA GG 3'	259-228	32
TB1	5' TTT CGG CGG GAA TTA CTC CTG TCG G 3'	171-147	25
XC2	CCA ACT GCG GTT CCA AGG GC	354-335	20
XC3	GCG GTT CTC GGG AGC TTC AGT TGT TTC C	295-268	28

(Butzbacher Schleifmittelwerke) bestreut und darauf das Viroid-Inokulat, bestehend aus mind. 1 ng cPSTVd in 10 μ l 100mM Natriumphosphatpuffer pH 7,0, gegeben. Durch vorsichtiges Reiben mit einer Pipettenspitze wurde entstand eine Verletzung durch welche die Viroide in die Pflanze eintreten konnten. Die Pflanzen wurden ca. 5 Wochen nach der Infektion geerntet und vor der Herstellung der Extrakte stets zunächst bei -80°C eingefroren.

Methoden

3.1 Herstellung und Aufarbeitung von Nukleinsäuren

3.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Reinigung von Nukleinsäure-Lösungen, z.B. nach enzymatischen Reaktionen oder nach einer Gelelektion, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Wenn das Volumen der wässrigen Lösung weniger als 50 μ l betrug, wurde es mit dest. Wasser aufgefüllt. Dann wurden die Ansätze nacheinander mit einem Volumen reinem Phenol, einem Volumen Phenol-Chloroform (1:1) und schließlich einem Volumen reinem Chloroform zur Entfernung des Phenols ausgeschüttelt. Sollte eine DNA enthaltende Lösung extrahiert werden, so wurde stets äquilibriertes Phenol (pH 8,0) verwendet. Die Äquilibration von Phenol erfolgte durch Schütteln mit 100 mM Tris/HCl auf pH 8.0. RNA wurde in der Regel mit saurem Phenol (pH 4,0) extrahiert. Zwischen jedem Schritt wurden die Ansätze nach gründlichem Vortexen eine Minute lang bei 14.000 g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Phenol-Chloroform Extraktion mussten die Lösungen stets durch eine Fällung aufkonzentriert werden. Diese diente weiterhin der Salz- bzw. Pufferentfernung.

3.1.2 Präzipitation von Nukleinsäure

Lag die Nukleinsäure in einer zu niedrigen Konzentration oder in einem ungeeigneten Puffer vor, so wurde eine Fällung durchgeführt.

Fällung mit Natriumacetat und Ethanol

Die Nukleinsäure enthaltende Lösung wurde auf 300 mM Natriumacetat eingestellt und in der Regel mit 3 Volumen, mindestens jedoch 2,5 Volumen, 96 %igem Ethanol versetzt. Durch 15-minütige Inkubation auf Eis wurde die Nukleinsäure gefällt und durch eine nachfolgende 45-minütige Zentrifugation bei 25.000 *g* pelletiert. Der Überstand wurde, je nach Volumen, dekantiert oder mit einer Pipette abgenommen. Nach Zugabe von 70 %igem Ethanol zur Entfernung von Salzen wurde 15 min lang zentrifugiert, der Überstand auf gleiche Weise abgenommen und das Pellet mindestens 5 min lang getrocknet, bevor es in einem geeigneten Puffer bzw. Wasser aufgenommen wurde.

Fällung mit Ammoniumacetat und Ethanol

Im Gegensatz zu einer Fällung mit Natriumacetat bleiben bei Verwendung von Ammoniumacetat Nukleotide im Überstand und können so von den Nukleinsäuren getrennt werden. Diese Art der Fällung wurde in der vorliegenden Arbeit nach einer Markierung von Oligonukleotiden mit γ -³²P-ATP und nach *in vitro*-Transkription zur Herstellung radioaktiv markierter Transkripte eingesetzt. Die Lösung wurde mit einem halben Volumen 7,5-molarer Ammoniumacetat-Lösung und 5 Volumen 96 %igem Ethanol versetzt, über Nacht bei -20 °C oder 1 h auf Eis inkubiert und dann 30 min bei 25.000 *g* zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet wie oben beschrieben mit Hilfe von 70 %igem Ethanol von Salz befreit.

Fällung mit Natriumchlorid und PEG

Bei einer Fällung mit Polyethylenglykol (PEG₆₀₀₀) bleiben sowohl Nukleotide als auch viele, sekundäre Pflanzenstoffe im Überstand. Weiterhin ist eine fraktionierte Fällung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe möglich. In der vorliegenden Arbeit wurde die PEG-Fällung nach Herstellung von RNA-Molekülen durch *in vitro*-Transkription, nach einer Gelelution von RNA und zur Fällung von RNA-Extrakten aus Blattmaterial eingesetzt. In jedem Fall waren die Lösungen zuvor mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt worden; die PEG-Fällung führt zu einer weiteren Verbesserung der Reinheit.

Sollte die gesamte RNA eines Ansatzes gefällt werden (nach *in vitro*-Transkription bzw. Gelelution), so wurde die Lösung durch Zugabe einer 5 M Stammlösung auf 500 mM

NaCl und einer 50 %-igen Stammlösung auf 20 % PEG eingestellt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde der Ansatz eine Stunde lang bei 25000 *g* und 4 °C präzipitiert. Der PEG-haltige Überstand wurde sofort vorsichtig mit einer Pipette abgenommen, das Pellet mit 70 %igem Ethanol versetzt und direkt nochmals 15 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde 5 min luftgetrocknet und in einem geeigneten Puffer bzw. Wasser aufgenommen.

Die fraktionierte Fällung wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, um „große“ RNAs aus einem RNA-Extrakt oder Plasmide aus einem *in vitro*-Transkriptionsansatz zu entfernen. Dazu wurde, wiederum bei einer Salzkonzentration von 500 mM, im ersten Schritt eine niedrige PEG-Konzentration (in der Regel 6 %) gewählt. Wiederum folgte eine Inkubation auf Eis von 30 min und eine Zentrifugation bei 25000 *g* und 4 °C von 60 min. Dabei wurden ausschließlich „große“ Nukleinsäuren pelletiert. Im zweiten Schritt wurde die PEG-Konzentration des Überstandes bei gleichbleibender Salzkonzentration erhöht (auf 12 bis 20 %). Es wurde auf gleiche Weise inkubiert, zentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen wie bei der herkömmlichen PEG-Fällung. Bei diesem Schritt wird der Rest der Nukleinsäuren präzipitiert.

3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch eine Polymerase-Kettenreaktion können DNA-Moleküle sequenzspezifisch amplifiziert werden (Mullis *et al.*, 1986). In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR-Reaktion hauptsächlich zur Herstellung Transkriptionsmatrizen eingesetzt. Als *template* für die Polymerase-Kettenreaktion dienten in diesem Fall Plasmide, PCR-Produkte oder genomische DNA von *Arabidopsis thaliana* bzw. *Lycopersicon esculentum* cv. *Rutgers* (Abschnitt 2.2).

Zur Vervielfältigung der DNA wurden die Enzyme *Taq*-DNA-Polymerase, *Pfx*-DNA-Polymerase und Phusion-DNA-Polymerase verwendet. Im Gegensatz zur *Taq*-DNA-Polymerase weisen die beiden zuletzt genannten Enzyme eine 3' to 5'-Exonuklease-Aktivität (*proof reading*) auf, so dass die DNA fehlerfrei amplifiziert werden kann. Daher wurde die *Taq*-DNA-Polymerase nur bei wenigen Experimente zu Beginn der Arbeit eingesetzt und bald gegen die *Pfx*-DNA-Polymerase ersetzt. Der größte Teil der PCR-Produkte wurde aber mit der Phusion-DNA-Polymerase hergestellt. Die Sequenzen der bei der PCR eingesetzten Primer, einschließlich der entsprechenden *T_m*-Werte

bzw. Annealing-Temperaturen, sind in Abschnitt 2.2.5 nachzulesen. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde in der Regel das QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Wurden PCR-Produkte in großem Maßstab hergestellt, wurden die Ansätze mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und nachfolgender PEG-Fällung gereinigt. Lieferte die PCR auch unerwünschte Produkte, so wurde das gewünschte Produkt mittels Gelelektion isoliert (Abschnitt 3.1.6).

PCR mit der *Pfx*-DNA-Polymerase

PCR-Reaktionsansatz, *Pfx*-Polymerase

Volumen	Lösung	Konzentration im Ansatz
5 μ l	<i>Pfx</i> -Polymerase-Puffer (10 \times)	1 \times
5 μ l	Enhancer-Lösung (10 \times)	1 \times
1 μ l	MgSO ₄ (20 mM)	1 mM
0,3 μ l	dNTP-Mix (10 mM <i>each</i> NTP)	0,3 mM <i>each</i> NTP
0,3 μ l	Primer 1 (10 μ M)	0,3 μ M
0,3 μ l	Primer 2 (10 μ M)	0,3 μ M
0,02 μ l	<i>Pfx</i> -DNA-Polymerase (2,5 u/ μ l)	0,02 u/ μ l
x μ l	<i>template</i>	
<i>ad</i> 50 μ l	H ₂ O	

Die Proben wurden wie angegeben zusammen gegeben. Wurden mehrere Proben mit verschiedenen *templates* bzw. Primern angesetzt, so wurde ein Mastermix aus Enzympuffer, ggf. Enhancer, Magnesiumsulfat, dNTP-Mix und Polymerase hergestellt, der dann den vorbereiteten Reaktionsgefäßen mit Primern und *template* zugegeben wurde. Bei Verwendung von PCR-Produkten als *template* wurden zwischen 1 und 50 ng DNA, bei Plasmiden 1 ng DNA und bei genomischer DNA 4,8 ng (10⁴ Kopien) pro 50 μ l-Reaktionsansatz eingesetzt. Zuletzt wurden die Proben mit ca. 80 μ l Paraffin überschichtet, um eine Verdunstung der Lösung zu vermeiden. Die Proben konnten bei Raumtemperatur pipettiert werden, da die *Pfx*-DNA-Polymerase zunächst inaktiv an einen Platinum®-Antikörper gebunden vorlag. Durch eine zweiminütige Inkubation bei 94 °C erfolgt die Aktivierung des Enzyms (*Hot start*). Die PCR-Reaktion fand in einem Thermozykler (Modell Varius V45, Landgraf, Langenhagen) statt, der folgendermaßen

programmiert wurde:

Temperaturzyklus

Anzahl der Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer [s]
1 ×	Denaturierung (<i>hot start</i>)	94	120
38 ×	Denaturierung	94	15
	Annealing	50 - 57	30
	Polymerisation	68	24

Der T_m -Wert der Primer wurde mit Hilfe des Programms *Poland* berechnet (Steger, 1994). Wenn nötig wurde die PCR optimiert, indem die Annealing-Temperaturen variiert wurden. Folgende Temperaturen wurden schließlich zur Herstellung der Transkriptionsmatrizen für die verschiedenen RNAs eingesetzt:

Annealing Temperaturen bei der PCR

Name	Temperatur [°C]
U 14-PCR-Produkt	50 °C
rr2-PCR-Produkt	57 °C
7 S-PCR-Produkt	57 °C
PSTVd IVT 2 PCR-Produkt	57 °C
5 S-RNA	53 °C

Nach dem letzten Zyklus wurden die Proben auf 4 °C abgekühlt und danach entweder bei -20 °C tief gefroren oder sofort weiterverarbeitet.

PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase

Zur Herstellung von Matrizen zur *in vitro*-Transkription von 5 S-RNA und 5 S-RNA mit invertierter Sequenz wurden zu Beginn der vorliegenden Arbeit auch PCR-Reaktionen mit der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt.

Reaktionsansatz, *Taq*-Polymerase

Volumen	Lösung	Konzentration
5 μl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase-Puffer (10 \times)	1 \times
3 μl	MgCl ₂ (20 mM)	1,5 mM
0,5 μl	dNTP-Mix (10 mM <i>each</i> NTP)	0,1 mM <i>each</i> NTP
1 μl	Primer 1 (100 μM)	2 μM
1 μl	Primer 2 (100 μM)	2 μM
0,5 μl	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 u/ μl)	0,05 u/ μl
x μl	<i>template</i>	
<i>ad</i> 50	μl H ₂ O	

Grundsätzlich wurde wie bei Verwendung der *Pfx*-DNA-Polymerase vorgegangen, allerdings wurden die Ansätze zügig in den angegebenen Mengen bei 4 °C pipettiert. Der Thermozykler wurde folgendermaßen programmiert:

Anzahl der Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer [s]
1 x	Denaturierung	94	180
	Annealing	60	60
	Polymerisation	72	60
33 x	Denaturierung	94	90
	Annealing	60	60
	Polymerisation	72	60
1 x	Denaturierung	94	90
	Annealing	60	60
	Polymerisation	72	600

Nach der Reaktion wurden die Proben wiederum auf 4 °C abgekühlt und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -20 °C für eine spätere Anwendung aufbewahrt.

PCR mit der Phusion-DNA-Polymerase

Die Verwendung der Phusion-DNA-Polymerase hat den Vorteil, dass eine dsDNA-Bindedomäne an dieses Enzym mit *proof reading*-Aktivität fusioniert wurde. Da sich dadurch die Prozessivität des Enzyms deutlich erhöht, konnten im Vergleich zu anderen

Polymerasen kürzere Reaktionszeiten gewählt werden, wobei die gleiche Ausbeute an Produkt erzielt wurde. Das Enzym hat aber keinen *hot start*, so dass auch hier zügig und bei 4°C pipettiert wurde. Ansonsten wurde wie bei Verwendung der *Pfx*-DNA-Polymerase vorgegangen. Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

Reaktionsansatz, Phusion-Polymerase

Volumen	Lösung	Konzentration im Ansatz
5 μl	Puffer HF (10 \times)	1x
1 μl	dNTP-Mix (10 mM <i>each</i> NTP)	0,2 mM <i>each</i> NTP
0,4 μl	Phusion-DNA-Polymerase (2,5 u/ μl)	0,02 u/ μl
2,5 μl	Primer 1 (10 μM)	0,5 μM
2,5 μl	Primer 2 (10 μM)	0,5 μM
x μl	<i>template</i>	
<i>ad</i> 50	μl H ₂ O	

Der Themocycler wurde wie folgt programmiert:

Anzahl der Zyklen	Schritt	Temperatur [°C]	Zeitdauer [s]
1 x	Denaturierung	98	30
33 x	Denaturierung	98	10
	Annealing	46-72	20
	Polymerisation	72	10

Zur Berechnung der T_m-Werte erfolgte in diesem Fall nach der von Chester & Marshak (1993) beschriebenen *nearest-neighborhood*-Methode. Zu diesem Zweck wurde der Webdienst http://www.finnzymes.fi/Java/tm_determination.htm, den die Firma Finnzymes anbietet, eingesetzt. Ausgehend vom T_m-Wert wurden die Annealing-Temperaturen gewählt und nach Bedarf optimiert.

Annealing Temperaturen bei der PCR

Name	Temperatur [°C]
PSTVd IVT 2-PCR-Produkt	66 °C
<i>Pul</i> -PCR-Produkt	72 °C
<i>Pur</i> -PCR-Produkt	75 °C
<i>Pol</i> -PCR-Produkt	72 °C
<i>Por</i> -PCR-Produkt	72 °C
<i>Pum</i> -PCR-Produkt	70 °C
<i>Pom</i> -PCR-Produkt	70 °C
<i>Pr</i> -PCR-Produkt	81 °C
<i>Pl</i> -PCR-Produkt	75 °C
5 S-RNA-PCR-Produkt	75 °C
5 S-RNA-PCR-Produkt invertiert (-)	66 °C
rr2-PCR-Produkt	66 °C
U 14-PCR-Produkt	46 °C

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

Als *template* für die Transkription dienten entweder PCR-Produkte, die einen T7-Promotor enthielten oder T7-Transkriptionsplasmide, die zuvor mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* linearisiert worden waren (siehe Abschnitt 2.2.5). Alle *in vitro*-Transkriptionsreaktionen wurden mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase T7 durchgeführt.

Bei der Synthese von Digoxigenin-markierten *in vitro*-Transkripten wurde Digoxigenin-11-Uridin-5'triphosphat (Roche, Mannheim) in den Reaktionsansatz gegeben, wobei die Menge an modifiziertem UTP einem Fünftel des gesamten UTP entsprach. Wurden radioaktiv markierte Sonden hergestellt, so wurde dem Transkriptionsansatz $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP zugesetzt.

Reaktionsansatz, *in vitro*-Transkription

Volumen	Lösung	Konzentration im Ansatz
	<i>Eco</i> RI linearisiertes Plasmid bzw. PCR-Produkt	50 nM
4 μ l	IVT A	
2,5 μ l	NTP-Mix (10 mM each)	1,25 mM <i>each</i>
0,675 μ l	Dig-11-UTP (10 mM)	0,3375 mM
0,25 μ l	RNAsin (40 u/ μ l)	0,5 u/ μ l
4 μ l	IVT B	
1 μ l	T7-RNA-Polymerase (250 u/ μ l)	12,5 u/ μ l
<i>ad</i> 20	μ l H ₂ O	

Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur angesetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe der gleichen Menge T7-RNA-Polymerase fand nochmals eine zwei-stündige Inkubation bei 37°C statt. Wurden bei der *in vitro*-Transkription PCR-Produkte als *templates* eingesetzt, so fand anschließend eine Verdauung mittels DNase statt. Zu Beginn der Arbeit wurde dazu die DNase I (RNase-frei) verwendet, später ausschließlich das TURBO DNase-RNasefree™-Kit, jeweils nach den Angaben des Herstellers. Bei der Herstellung von ³²P- bzw. Digoxigenin-markierten Sonden, die zur Hybridisierung von Northern-Blots eingesetzt wurden, konnte auf die Verdauung der DNA verzichtet werden. Plasmide als *template* der *in vitro*-Transkription wurden zum Teil ebenfalls mit Turbo DNase verdaut, in der Regel aber durch einer fraktionierten PEG-Fällung (Abschnitt 3.1.2) aus dem Ansatz entfernt.

Zur Herstellung radioaktiv markierter RNAs für die RNA-RNA-Gelshift-Analysen wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

Reaktionsansatz, *in vitro*-Transkription, radioaktiv:

Volumen	Lösung
2 μ l	PCR-Produkt (50 ng)
2 μ l	IVT A
2 μ l	IVT B
1 μ l	NTP-Mix (je 10 mM ATP, GTP, CTP, 1 mM UTP)
3,5 μ l	α - ³² P-UTP (35 μ Ci)
0,5 μ l	T7-RNA-Polymerase (150 u)
0,5 μ l	RNAsin (20 u)
<i>ad</i> 20 μ l	H ₂ O

mit

IVT A	100 mM Natriumhydrogenphosphat
	50 mM DTT
IVT B	40 mM Magnesiumchlorid
	20 mM Spermidin-HCl, pH 7,7

Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur pipettiert, bei 37 °C für 1-2 Stunden inkubiert und einer Ammoniumacetat-Fällung unterzogen (Abschnitt 3.1.2). Anschließend wurde das Pellet direkt in 20 μ l Formamid-Auftragspuffer aufgenommen und geleluert (Abschnitt 3.1.6).

3.1.5 RNA-Präparation aus Tomatenblättern

Zur Herstellung von RNA-Extrakten wurden die jungen, oberen und mittleren Blätter von ca. 6 Wochen alten Tomatenpflanzen geerntet und bei -80 °C eingefroren. Die nächsten Isolationsschritte erfolgten bei 4 °C; die Lösungen und Arbeitsgeräte waren ebenfalls vorgekühlt. Das gefrorene Blattmaterial wurde zunächst in der Tüte zerstoßen und zunächst ohne Puffer in einem Waring Blendor gerührt. Dann wurde Aufschlusspuffer zugesetzt

(2 ml pro g Blattmaterial) und im Waring Blendor homogenisiert.

Aufschlusspuffer:

88,5	% TNE-Isolationspuffer
2	% SDS
1,5	% β -Mercaptoethanol
0,5	% Bentonit

Zur Entfernung der Proteine wird nun eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt (Abschnitt 3.1.1). Anschließend wurde mit der wässrigen Phase eine fraktionierte PEG-Fällung durchgeführt (Abschnitt 3.1.2). Nach dem Waschen mit 70 %igem Ethanol wurde das Pellet über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, damit evt. noch vorhandenes Phenol verdampfen kann. Das Pellet wurde in H₂O aufgenommen und die Konzentration der Nukleinsäure spektralphotometrisch bestimmt (Abschnitt 3.4.4). Schließlich wurde ein Aliquot des Ansatzes mittels denaturierender Gelelektrophorese analysiert.

3.1.6 Gelelution

Gelelution linearer RNAs

Aus RNA-Extrakten von Tomatenpflanzen, die zuvor fraktioniert mit PEG gefällt worden waren (Abschnitt 3.1.5), wurden verschiedene RNAs mittels Gelelution isoliert. Zur Gewinnung von linearen RNAs wurde die Gesamtnukleinsäure auf eine 1 mm dicke denaturierende PAGE (5 % PAA 29:1, 8 M Harnstoff, 0,5 × TBE) aufgetragen. Die Banden wurden mit Ethidiumbromid angefärbt, mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht und zügig mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden in ein Reaktionsgefäß mit 300 μ l Elutionspuffer überführt, 1 h lang bei 4 °C geschüttelt und schließlich der Überstand abgenommen. Nach der Zugabe von weiteren 300 μ l Elutionspuffer wurden die Ansätze mindestens 3 h lang bzw. über Nacht geschüttelt. Die Überstände wurden vereinigt, einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen und mittels PEG gefällt.

Elutionspuffer:

1× TNE
0,1 % SDS

Zur Gelelution von PCR-Produkten wurde ein Aliquot des unaufgearbeiteten PCR-Ansatzes auf eine 0,5 mm dicke denaturierende PAGE (5 %PAA 29:1, 8 M Harnstoff, 0,5 × TBE) aufgetragen. Die Banden wurden alternativ mit Ethidiumbromid oder mit Silber gefärbt und ausgeschnitten. Die Gelstückchen wurden über Nacht bei 4 °C in Wasser geschüttelt. Zur Reamplifikation des PCR-Produkts wurden 1 µl dieser Lösung in einem 50 µl-Ansatz als *template* eingesetzt.

Gelelution von zirkulärem PSTVd

Zur Elution von zirkulärem PSTVd kam eine bidirektionelle Gelelektrophorese zum Einsatz (Abschnitt 3.4.8). Nach der Färbung mit Ethidiumbromid wurden die Banden ausgeschnitten und dann in ca. 1 mm³ große Stückchen geschnitten. Die nun folgenden Schritte entsprachen der Gelelution von linearen RNAs, die im vorhergehenden Abschnitt beschrieben wurde.

Gelelution radioaktiv markierter *in vitro*-Transkripte

Hierzu wurde der gesamte gefällte Transkriptionsansatz in einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (5-10 % Acrylamid (30:0,8), 8 M Urea, 1 × TBE) aufgetrennt. Nach einer Exposition für ca. 20 s gegen einen Röntgenfilm (Kodak, x-omat AR) wurden die Transkriptbanden mit Hilfe des Röntgenfilms als Schablone ausgeschnitten und das Gelstück über Nacht in 300 µl 0,3 M NaOAc, 5 mM EDTA, 0,1 % SDS geschüttelt. Der Überstand wurde unter Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol gefällt und die Transkripte in 5 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen.

3.1.7 PSTVd und 5 S-RNA-spezifische Affinitätschromatographie

Um RNAs mit 5 S-RNA- bzw. PSTVd-Sequenz spezifisch aus einem Gemisch aufzureinigen, wurde ein affinitätschromatographisches Verfahren angewandt (Aschermann, 2001). Auf diese Weise konnten auch Moleküle mit aufgereinigt werden, die kovalent mit PSTVd

bzw. 5 S-RNA quervernetzt wurden (Abschnitt 3.3.1). Die Methode beruht auf einer hochspezifischen Bindung von Biotin an Streptavidin.

Hybridisierung der Transkripte

Biotinylierte Sonden wurden zunächst an die Ziel-RNA hybridisiert. Sollten 5 S-RNA-Sequenzen aufgereinigt werden, so dienten RNAs mit invertierter Sequenz voller Länge, also von 120 Nukleotiden, als Sonden. Diese wurden durch *in vitro*-Transkription mit PCR-Produkten als *template* hergestellt (Abschnitt 2.2.3). Zur Isolierung von (+)-PSTVd-Sequenzen wurden (-)PSTVd-RNAs, welche die komplette Sequenz und wenige zusätzliche Nukleotide enthielten, als Sonden eingesetzt (IVT 1b und 3b). Diese wurden durch *in vitro*-Transkription mit den Plasmiden pRH716 bzw. pRH718 als *template* hergestellt (Abschnitt 2.2.3). Wurden PSTVd-Teiltranskripte verwendet, so wurde eine PSTVd-Sonde zur Hybridisierung gewählt, die nicht innerhalb des von dem Teiltranskript repräsentierten Bereichs die Schnittstelle aufweist.

Komplex-Ansätze wurden, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben hergestellt und quervernetzt (Abschnitt 3.3.1). Die Sonden wurden dem Komplex-Ansatz zugesetzt, wobei das Volumen möglichst gering gehalten wurde. Die Hybridisierung fand in $1 \times$ -TNE-Puffer statt, indem die Lösung im Heatblock für 1 min bei 90°C thermisch denaturiert und durch Abschalten des Heatblocks langsam abgekühlt wurde. Nach Abkühlen auf 30°C wurden die Hybridisierungsansätze entweder bei -20°C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet. In letzterem Fall erfolgte im nächsten Schritt die Bindung der Sonden an die paramagnetischen Partikel. Es wurden zwei verschiedene Arten von paramagnetischen Partikeln eingesetzt, Dynabeads® (DynaL GmbH, Hamburg) und Microbeads (Miltenyi Biotech. Köln).

Separation der Nukleinsäure mit Hilfe der Dynabeads

In der vorliegenden Arbeit wurden Dynabeads® ausschließlich zur Aufreinigung von RNA verwendet und mussten daher stets zuvor von RNasen befreit werden. Dies erfolgte durch Behandlung der Partikel mit den Lösungen A und B:

Lösung A: 100 mM NaOH
50 mM NaCl
(mit DEPC behandelt)

Lösung B: 100 mM NaCl
(mit DEPC behandelt)

Die Partikel wurden in den Reaktionsgefäßen im Magneten, abhängig vom Volumen der Lösung für 1 bis 2 min immobilisiert. Daraufhin wurde die Aufbewahrungslösung mit einer Pipette abgenommen und das gleiche Volumen der Lösung A zugesetzt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2 min. Nach erneuter Immobilisierung wurde die Waschlösung abgenommen. Diese Schritte wurden anschließend jeweils noch einmal mit Lösung A und einmal mit Lösung B durchgeführt.

Den Hybridisierungsansätze wurden Dynabeads® zugesetzt. Die Menge der eingesetzten Dynabeads® richtete sich nach der Menge der aufzureinigenden biotinylierten Sonde und variierte zwischen 1 µg Partikel pro 1 bzw. 2 ng Sonde. Das Volumen des Bindungsansatzes war um ein Vierfaches größer als das Volumen der eingesetzten Dynabeads. Die Bindung des an die paramagnetischen Partikel gebundenen Streptavidin an das an die Sonden gebundene Biotin fand in 1 × B & W-Puffer durch 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur statt. Dabei wurde die Lösung im Reaktionsgefäß etwa 6 mal pro Minute invertiert. So sollte das Absinken der Partikel auf den Boden des Reaktionsgefäßes vermieden werden.

2 × B & W-Puffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,5
1 mM EDTA
2 M NaCl

Nach der Bindung wurden die Ansätze im Magneten für 2 min immobilisiert und mit 0,1 × SSC (Abschnitt 2.1) als Waschlösung versetzt. Das Volumen der Waschlösung war mindestens genauso groß wie das Volumen, in dem die eingesetzte Menge Dynabeads® zuvor in der Aufbewahrungslösung vorlag. Die Lösung wurde dann für 3 min inkubiert, wobei folgende Waschttemperaturen gewählt wurden:

Sonde und Waschtemperaturen bei der Aufreinigung

aufzureinigende RNA	Sonde	Temperatur
(+)-PSTVd IVT 1 und 2 (Volllänge)	(-)-PSTVd IVT 1b	70 °C
(+)-PSTVd IVT 3 (Volllänge)	(-)-PSTVd IVT 3b	70 °C
(+)-PSTVd-Teiltranskript	(-)-PSTVd IVT 1b oder 3b	60 °C
5 S-RNA	Transkript mit in- vertierter 5 S-RNA- Sequenz	60 °C

Nach erneuter Immobilisierung konnte die Waschlösung abgenommen werden. Nach mindestens zwei weiteren Waschschrritten wurde die RNA entweder von den Partikeln eluiert oder direkt an den Partikeln mittels *primer extension* analysiert. War eine sofortige Weiterverarbeitung nicht möglich, so konnten die Partikel in B & W-Puffer für wenige Tage bei 4 °C aufbewahrt werden.

Zur Elution der RNA wurde die Streptavidin-Biotin-Bindung zerstört, indem die gewaschenen Partikel in Formamid-Lösung aufgenommen wurden. Nach einer dreiminütigen Inkubation bei 70 °C wurden die Partikel immobilisiert und der Überstand, der die Sonden und die aufgereinigten RNA-Moleküle enthielt, wurde abgenommen. Dieser Schritt wurde mindestens 4 mal wiederholt und die gesammelten Überstände einer Ethanol-Fällung unterzogen (Abschnitt 3.1.2).

Wurden die Partikel mittels *primer extension* analysiert, so wurden sie sofort in Hybridisierungslösung aufgenommen (Abschnitt 3.4.1).

Separation der Nukleinsäure mit Microbeads

Die Hybridisierung der Sonden wurde, wie in Abschnitt 3.1.7 beschrieben, vorgenommen. Daraufhin wurden die Hybridisierungsansätze mit Microbeads® versetzt und zur Bindung des Streptavidin an das Biotin für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Aufgrund der geringen Größe der Microbeads® wird ein stärkeres Magnetfeld zur sofortigen Immobilisierung benötigt als bei Dynabeads®. Die Immobilisierung erfolgt nicht in herkömmlichen Reaktionsgefäßen, sondern innerhalb einer Säule, die in ein sehr starkes Magnetfeld gebracht wird. Nach drei Waschschrritten mit auf die jeweilige Waschtemperatur vorgeheizter

Waschlösung wurden die Microbeads® mit der an sie gebundenen Nukleinsäure ausserhalb des Magnetfelds mit 100 μ l Wasser von der Säule eluiert. Sie lagen nun in einem für die sich anschließende *primer extension*-Analyse zu hohen Volumen vor und wurden daher in einem Reaktionsgefäß in dem eigentlich zu den Dynabeads® gehörigen Magneten mindestens 24 h immobilisiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Partikel in *primer extension*-Hybridisierungslösung aufgenommen (Abschnitt 3.4.1).

3.2 *In vitro*-Komplexeinstellung

Zur Herstellung von Komplexen zwischen PSTVd und 5 S-RNA wurden die reinen Einzelkomponenten (*in vitro*-Transkripte oder Geleluate) gemischt, wobei, wenn nicht anders angegeben, die 5 S-RNA in einem dreifachen molaren Überschuss eingesetzt wurde und die RNA-Konzentration in Nukleotiden 12 mM betrug. Kontroll-Ansätze enthielten die reinen Einzelkomponenten. Die jeweilige RNA wurde in der gleichen Konzentration wie im Komplex-Ansatz eingesetzt, die RNA-Gesamt-Konzentration war also in diesen den Kontroll-Ansätzen niedriger. Die Lösungen wurde auf $1 \times$ TNE eingestellt und zur Denaturierung der RNA in den Reaktionsgefäßen in einem Becherglas mit ca. 800 ml Wasser, das zuvor auf einem Heizrührer auf 90 °C aufgeheizt wurde, versenkt. Danach erfolgte eine langsame Abkühlung. In den ersten 30 min wurde das Becherglas mit Aluminiumfolie verschlossen und verblieb auf dem Heizrührer. Dann wurde die Aluminiumfolie entfernt und das Glas auf eine Styroporplatte gestellt. Nach Abkühlung auf 30 °C wurden die Proben bei -20 °C eingefroren oder sofort weiterverarbeitet, d.h. in der Regel quervernetzt.

3.3 Modifikation von Nukleinsäuren

3.3.1 Quervernetzung von RNA mittels Psoralen

Zur Quervernetzung wurden Komplex- und Kontroll-Ansätze auf die gleiche Psoralen-Konzentration und auf eine RNA-Konzentration von 100 μ M in Nukleotiden eingestellt. Da Komplex- und Kontroll-Ansätze somit unterschiedlich stark verdünnt wurden, war es notwendig, die Salzkonzentrationen der Ansätze anzugleichen, indem den Komplex-Ansätzen TNE-Puffer zugesetzt wurde. Die Effektivität der Quervernetzung hängt u.a. von der Salzkonzentration ab. Es wurde ausschließlich das besonders gut wasserlösliche

Psoralen-Derivat 4'-Aminomethyl-4, 5', 8-trimethylpsoralen (AMT; HRI Research, Concord, USA) verwendet, das im Folgenden als Psoralen bezeichnet wird. Die Menge an Psoralen wurde variiert und ist in den entsprechenden Abschnitten angegeben. Nach der Zugabe von Psoralen wurden die Lösungen gründlich gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit das Psoralen in die Doppelhelix interkalieren kann. Noch während der Inkubation wurden die Lösungen auf offene Mikrotiterplatten pipettiert und anschließend auf Eis für 50 min in einem Bestrahlungsgerät der Firma Stratagene (Modell Stratalinker, La Jolla, USA) bei einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt.

3.3.2 Radioaktive Endmarkierung von DNA-Oligonukleotiden

In der vorliegenden Arbeit wurden γ - ^{32}P endmarkierte DNA-Oligonukleotide bei der *primer extension* und als Sonden zur Hybridisierung von Northern-Blots eingesetzt. Die verwendeten DNA-Oligonukleotide sind in Abschnitt 2.2.5 angegeben. Die radioaktive γ -Phosphatgruppe des ATP wurde mit Hilfe des Enzyms Polynukleotidkinase (PNK) auf das 5'-OH-Ende des Oligonukleotids übertragen.

Markierungsansatz:

5	pmol Oligonukleotid
2	μl $10 \times$ T4PNK-Puffer
1	μl PNK (New England Biolabs, 10 u/ μl)
10	pmol γ - ^{32}P -ATP (5000 Ci/mmol)
<hr/>	
<i>ad</i>	20 μl H_2O

Zur Phosphorylierung wurde der Ansatz entweder für 2 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Lösung mit Ammoniumacetat und Ethanol gefällt (Abschnitt 3.1.2).

3.4 Analyse von Nukleinsäuren

3.4.1 *Primer Extension*-Analyse

Die *primer extension*-Analyse wurde in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung von Psoralen-vermittelten Quervernetzungen zwischen RNA-Molekülen eingesetzt. Dazu

wurde die RNA in Hybridisierungslösung aufgenommen, die ein ^{32}P -markiertes Oligonukleotid enthielt:

Hybridisierungslösung:

2 μl	10 \times	TNE
1 μl	Oligonukleotid (500.000 - 1.000.000 cpm)	
17 μl	H_2O	

Zur Hybridisierung des Oligonukleotids an die *template*-RNA wurde der Ansatz auf 90°C aufgeheizt und langsam abgekühlt. Die Ansätze wurden weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert, nachdem eine Temperatur von $\leq 30^\circ\text{C}$ erreicht wurde.

***primer extension*-Analyse von freier RNA**

Nach der Hybridisierung des radioaktiv markierten Primers wurden die Ansätze mit Hilfe von Natriumacetat und Ethanol gefällt (Abschnitt 3.1.2) und daraufhin in $20\mu\text{l}$ Verlängerungslösung aufgenommen:

Verlängerungslösung

Volumen	Lösung	Konzentration im Ansatz
4 μl	5 \times <i>First Strand</i> -Puffer	1 \times
1 μl	dNTP 10 mM <i>each</i>	0,5 mM <i>each</i>
2 μl	DTT 0,1 M	10 mM
1 μl	RNAsin 40 u/ μl	2 u/ μl
1 μl	<i>Superscript II</i>	
<hr/>		
<i>ad</i> 20 μl	H_2O	

Die *primer extension*-Reaktion erfolgte während einer Inkubation der Ansätze bei 55°C für h. Vor der Auftrennung der *primer extension*-Produkte mittels denaturierender Gelelektrophorese (Abschnitt 3.4.7) war wiederum zur Verringerung des Volumens und zur Entfernung von Salzen eine Fällung mit Natriumacetat und Ethanol notwendig (Abschnitt 3.1.2).

***primer extension*-Analyse von an Dynabeads® gebundener RNA**

Wurde noch an Dynabeads® gebundene RNA mittels *primer extension* untersucht, so wurde auf die Ethanol-Fällung der die Partikel enthaltenden Fraktionen verzichtet. Nach der Hybridisierung der Primer wie in Abschnitt 3.1.7 wurden die Partikel im Magneten immobilisiert und der Überstand abgenommen und verworfen, da er nur eine sehr geringe Menge *template*-RNA mit gebundenem Primer enthielt. Die Partikel wurden in der Verlängerungslösung aufgenommen (s.o.) und für 1 h bei 55 °C inkubiert, wobei die Verlängerung des Primers stattfand. Nach dieser Reaktion wurden die Partikel wiederum im Magneten immobilisiert. Die Partikel wurden sofort in 100 %igem Formamid-Auftragspuffer aufgenommen und die Überstände zunächst einer Fällung mit Natriumacetat und Ethanol unterzogen (Abschnitt 3.1.2) und dann mit der die Dynabeads® enthaltenden Auftragspufferlösung vereinigt. Die *primer extension*-Produkte wurden mittels denaturierender Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 3.4.7).

Sequenzierung

Parallel zu den *primer extension*-Analysen wurde eine Sequenzierung mit dem gleichen Primer durchgeführt. Für die PSTVd-spezifischen Analysen wurde, je nach Primer, entweder das Plasmid pRH715 oder pRH713 als *template* eingesetzt. Dazu wurden 4 bis 6 µg Plasmid-DNA (*supercoiled*) alkalisch denaturiert, indem sie in 0,4 M NaOH für 10 bis 15 min bei 37 °C inkubiert wurden. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe von 7 µl 2 M Natriumacetat pH 4,0 neutralisiert und auf 20 µl aufgefüllt. Nach Ethanolfällung inkl. Salzentfernung wurde das Pellet in 10 µl Reaktionslösung für die Sequenzierung aufgenommen, welche den Primer in einer Konzentration von 0,1 µM enthielt. Für die Sequenzierung wurde das Sequencing Kit der Firma USB (Cleveland, USA), Version 2.0 verwendet. Die weitere Durchführung erfolgte gemäß der Herstellerangaben, wobei stets eine Reaktionszeit bei Raumtemperatur von höchstens 3 min eingehalten wurde.

3.4.2 RNA-RNA-Gelshift-Analysen

Für den direkten Nachweis von RNA-RNA-Komplexen wurden Gelshift-Analysen mit radioaktiv markierten Transkripten durchgeführt. Es wurde hier unter Zugabe von 5.000-20.000 cpm geleluiertes ³²P-markiertes *in vitro*-Transkripte eine Komplex-Einstellung im

3 μ l-Ansatz in $1 \times$ TNE durchgeführt. Die Konzentration der eingesetzten unmarkierten Transkripte wurde variiert (s.u.). Der gesamte Ansatz wurde direkt nach dem Abkühlen auf Eis mit dest. Wasser und $0,4 \times$ NaTAE-Auftragspuffer auf 10 μ l $0,2 \times$ NaTAE eingestellt und einer nativen Gelelektrophorese unterzogen (Abschnitt 3.4.6). nach der Auftrennung wurde das Gel auf 3MM-Papier (Whatman) gezogen und eingeschweißt gegen einen Röntgenfilm (Kodak, x-omat AR) exponiert.

„Dimer-Bedingungen“

Zunächst wurde die Komplex-Einstellung für Gelshift-Analysen an den Bedingungen orientiert, wie sie für die *primer extension*-Analysen etabliert waren (Abschnitt 3.2). Hier liegt die 5s-RNA als Dimer vor. Es wurden hier zusätzlich zum radioaktiven Transkript pro 3 μ l-Ansatz 3 μ g der Einzelkomponenten eingesetzt.

„Monomer-Bedingungen“

Für Experimente, bei denen die 5s-RNA als Monomer vorliegen sollte, wurden zusätzlich zum radioaktiven Transkript wie ausgetestet jeweils 10 pMol der Einzelkomponenten im 3 μ l-Ansatz eingesetzt.

3.4.3 Konkurrenzexperimente

Bei Konkurrenzexperimenten wurden unter gleichen Bedingungen 5 S-RNA-PSTVd-Komplexe unter Zugabe von 1 nmol Oligonukleotid als Kompetitor eingestellt und anschließend die Ausbeute an Komplexe mittels nativer Gelelektrophorese untersucht.

3.4.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurden UV-Spektren mit einem Spektralphotometer (Beckmann, DU 640) aufgenommen. Zwischen gemessener Absorption und Nukleinsäurekonzentration besteht folgende Beziehung (Sambrook *et al.*, 1989):

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

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

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

3.4.5 Gelelektrophoresen

Für die Elektrophoresen wurden Polyacrylamid-Gele eingesetzt. Dazu wurde eine 30 %ige Acrylamid-Stammlösungen hergestellt durch Lösen von Acrylamid und N,N'-Methylen-bisacrylamid in den Verhältnissen 30:1 oder 43:1. Die Stammlösungen wurden mit 5 g/l Amberlite Ionentauscher-Partikel für 30 min gerührt und anschließend filtriert.

3.4.6 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der RNA-RNA-Komplex-Ansätze wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen durchgeführt. Diese erfolgte in einer Gel-Apparatur der Firma Hoefer Scientific Instruments bei 10 °C. Die Acrylamid-Konzentration der 1mm dicken Gele lag bei 4,5 % bei einem Vernetzungsgrad von 43:1 (Acrylamid:Bisacrylamid). Als Gel- und Laufpuffer wurde 0,2 x NaTAE verwendet. Die Proben wurden mit einem Volumen Auftragspuffer (0,4 x NaTAE, 50 % Glycerin, 0,02 % Bromphenolblau/Xylencyanol) versetzt aufs Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 30 bis 150 min spannungsgesteuert bei 250 V.

3.4.7 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleinsäuren unter denaturierenden Bedingungen wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei erfolgte die Denaturierung durch Erhitzen des 7-8 M Harnstoff enthaltenden Gels auf ca. 55 °C. Die konstante Temperatur wird dadurch gewährleistet, dass in diesem Fall nicht die Spannung, sondern die Leistung konstant gehalten wurde. Die Höhe der Leistung variierte, je nach verwendeter Gelapparatur bzw. Größe des Gels, zwischen 40 bis 100 W. Zur Analyse von PCR-Produkten bzw. Transkriptionsansätzen wurden Gele in der Größe 20x20x0,05 cm hergestellt. Hier wurde 8M Harnstoff eingesetzt, die Acrylamidkonzentration lag bei 5-10 % bei einem

Vernetzungsgrad von 30:0,8 (Acrylamid : Bisacrylamid). Diese Gele wurden zur besseren Handhabung auf eine 0,2 mm dicke Gelbond-Folie (Serva, Electrophoresis GmbH, Heidelberg) gegossen. Die für die Northern-Blot-Analyse verwendeten Gele wurden ohne Gelbondfolie hergestellt. Als Gel- und Laufpuffer wurde 0,5 oder $1 \times$ TBE verwendet. Für die gleichmäßige Wärmeverteilung wurde eine Aluminiumplatte vor die Glasplatten gespannt. Das Gel wurde zunächst für 20 min bei 50 W auf ca. 55°C erwärmt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Formamid-Auftragspuffer versetzt, so dass die Formamid-Konzentration mind. 50% betrug. Nach einer Denaturierung für 2 min bei 95°C wurden die Proben auf Eis abgeschreckt. Die Elektrophorese erfolgte bei 46 W für 20-50 min.

Zur Auftrennung der *primer extension*-Proben wurde die S2-Sequenziergel-Apparatur der Firma GIBCO BRL verwendet. Hier wurde 7 M Harnstoff eingesetzt, die Acrylamidkonzentration lag bei 8% PAA bei einem Vernetzungsgrad von 19:1. Das Gel musste 30 min lang bei 100 W vorgeheizt werden, so dass Temperatur von ca. 55°C erreicht wurde. Die Proben wurden, wie oben beschrieben, vor dem Auftragen in Formamid-Auftragspuffer denaturiert und abgeschreckt. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 90 min bei 100 W.

3.4.8 Bidirektionelle Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Isolierung von zirkulärem PSTVd wurde eine vereinfachte Variante der bidirektionalen Gelelektrophorese nach Schumacher *et al.* (1983a) verwendet. Hierbei wurden in der ersten Dimension die PSTVd-Stäbchen unter nativen Bedingungen von größeren genomischen Nukleinsäuren getrennt. In der zweiten Dimension unter denaturierenden Bedingungen geht die Stäbchenstruktur in einen offenen Zirkel über, der im Vergleich zu kleineren linearen Nukleinsäure-Molekülen des Extraktes im Gel stark verzögert wird. Die Elektrophorese erfolgte in einer Gel-Apparatur der Firma Hoefer Scientific Instruments. Die Acrylamid-Konzentration der 1 mm dicken Gele lag bei 5% bei einem Vernetzungsgrad von 43:1 (Acrylamid:Bisacrylamid). Es wurden 4 M Harnstoff zugesetzt, als Gel- und Laufpuffer wurde $0,4 \times$ TBE verwendet. Die Nukleinsäure wurde mit einem Volumen Auftragspuffer ($0,8 \times$ TBE, 50% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau/Xylencyanol) versetzt, auf das Gel aufgetragen. In der ersten Dimension lief das Gel spannungsgesteuert bei 800 V für ca. 70 min bei 14°C . Nach einer Erwärmung auf 40°C wurde die Spannung umgepolt und die Elektrophorese 45 min bei 60°C fortgesetzt.

3.4.9 Silberfärbung von Nucleinsäuren

Die Silberfärbung wurde in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis von DNA oder RNA, die zuvor mittels Gelelektrophorese aufgetrennt worden war, eingesetzt. Das, ursprünglich zum Nachweis von Proteinen entwickelte Verfahren (Sammons *et al.*, 1981), wurde von Schumacher *et al.* (1983b) leicht modifiziert, um zur Färbung von Nucleinsäuren mit einer Nachweisgrenze von 10 bis 20 pg angewandt zu werden. Die Silberfärbung von Nucleinsäuren beruht auf einer Anlagerung von Ag^+ -Ionen an das negativ geladene Phosphatrückgrat und der anschließende Reduktion der Ionen zu metallischem Silber. Die zu färbenden Gele wurden in den nachfolgend aufgelisteten Lösungen, unter ständigem Schwenken, inkubiert:

1: Fixierung	Ethanol	10 %	mind. 10 min
	Essigsäure	0,5 %	
2: Färbung	Silbernitrat	1,9 g/l	20 bis 30 min
3: Waschen	dest. Wasser		3 × 15 s
4: Entwicklung	Natriumhydroxid	15 g/l	5 bis 15 min
	Natriumborhydrid	90 g/l	
	Formaldehyd 36 %	3,75 ml/l	
5: Stoppen	Natriumhydrogen- carbonat	7,5 g/l	10 min

Die Gele wurden anschließend in Polyethylenfolie eingeschweißt und dann eingescannt oder photographiert.

3.4.10 „Northern“-Analysen

Für einen sequenzspezifischen Nachweis mussten die zu analysierende Nucleinsäuren an eine Nylonmembran (Biodyne A, Pall Europe Ltd. Portsmouth, England) gebunden vorliegen. Hierfür wurden die Nucleinsäuren entweder gelelektrophoretisch aufgetrennt und

anschließend mittels Elektroblothing auf die Membran transferiert (Abschnitt 3.4.10 oder, in Wasser gelöst, direkt auf die Membran pipettiert (Dot Blot). Um die Nachweisempfindlichkeit der „Northern“-Analysen zu verbessern, wurden die Nukleinsäuren durch Inkubation der Membran für 5 min in 50 mM Natriumhydroxid, denaturiert (Aschermann, 2001). Daraufhin war eine Neutralisierung notwendig, die durch einminütiges Schwenken in $20 \times$ SSC erfolgte. Zur kovalenten Fixierung der RNA auf die Membran wurde eine Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 254 nm in einem Bestrahlungsgerät der Firma Stratagene durchgeführt (Modell Stratalinker, La Jolla, USA).

Transfer der Nukleinsäuren mittels Elektroblothing

Zum Transfer der Nukleinsäuren wurde die Nylonmembran luftblasenfrei auf die noch feuchte PAGE aufgelegt und haftete dann am Gel. Das Blothing wurde in einer „semi-dry“-Kammer durchgeführt (zu Beginn der Arbeit: Modell Transblot SD, Fa Biorad, München, später: PantherTM Semidry Electroblotter, OWL, Portsmouth). Auf die Anode wurden 3 bis 4 Lagen Whatman 3 MM-Papier (Whatman International Ltd. Maidstone, England), das zuvor mit $1 \times$ TBE getränkt worden war, luftblasenfrei aufgelegt, gefolgt von der Membran und dem an ihr haftenden Gel. Auf das Gel wurden weitere 3 bis 4 Lagen, in $1 \times$ TBE getränktes 3 MM-Papier gelegt, auf das die Kathode gepresst wurde. Durch das Anlegen einer Spannung wanderten die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode und hafteten an der Membran. Die Spannung variierte, wurde aber auf maximal 15 V begrenzt, die Stromstärke wurde auf 400 mA eingestellt.

Zum Nachweis von RNAs aufgrund ihrer Sequenz wurden entweder Digoxigenin-markierte *in vitro*-Transkripte oder radioaktiv markierte Oligonukleotide eingesetzt.

Filterhybridisierung mit Digoxigenin-markierten *in vitro*-Transkripten

Digoxigenin-markierte *in vitro*-Transkripte wurden zum Nachweis von PSTVd- bzw. 5 S-RNA-Sequenzen eingesetzt. Diese hatten etwa die gleiche Länge wie die nachzuweisende RNA und wiesen die invertierte Sequenz auf (Abschnitte 3.1.4).

Um den Hintergrund so minimieren, wurde die Membran mit den an diese gebundenen Nukleinsäuren zunächst einer Prähybridisierung unterzogen. Dazu wurde die Membran eingerollt und in ein Hybridisierungsröhrchen überführt, das 15 ml Hybridie-

rungslösung ohne Sonde enthielt.

Hybridisierungslösung:	5 %	Blocking-Reagenz
	5 ×	SSC
	0,1 %	N-Laurylsarcosin, Na-Salz
	0,02 %	SDS
	50 %	Formamid

Anschließend fand eine mind. einstündige Inkubation im Hybridisierungs-Ofen (Modell OV 2, Biometra, Göttingen) bei 55 °C statt. Nach dieser Prähybridisierung wurde die Digoxigenin-markierte Sonde (etwa 2 µg), die zuvor 1 min lang bei 90 °C in einer mind. 50 % Formamid enthaltenden Lösung denaturiert worden war, in die Prähybridisierungslösung gegeben. Alternativ wurden 10 bis 15 ml Hybridisierungslösung mit Sonde frisch angesetzt. Durch Inkubation im Hybridisierungs-Ofen über Nacht wurden die Sonden an die an die Membran gebundenen PSTVd- bzw. 5 S-RNA-Sequenzen hybridisiert. Als Hybridisierungstemperatur wurde 60 °C bei einem 5 S-RNA-spezifischen und 65 °C bei einem PSTVd-spezifischen Nachweis eingestellt. Das Volumen der Hybridisierungslösung wurde so gering wie möglich gewählt und entsprach bei einem etwa 20 cm langen Röhrchen etwa 10 bis 15 ml. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen einmal gespült, indem sie im Röhrchen in 15 bis 20 ml Waschlösung geschwenkt wurden, dann wurde die gleiche Menge Waschlösung zugegeben und es fand eine Inkubation im Hybridisierungs-Ofen bei 60 °C im Falle der 5 S-RNA-spezifischen und bei 75 °C bei der PSTVd-spezifischen Sonde statt. Der letzte Schritt wurde wiederholt.

Waschlösung:	0,1 %	SDS
	0,1 ×	SSC

Chemolumineszenzentwicklung mit dem CDP-StarTM-System

Zur Visualisierung der Sonden wird die Membran mit einem Digoxigenin-spezifischen Antikörper behandelt, der an ein Enzym, in der vorliegenden Arbeit eine Alkalische Phosphatase, gekoppelt ist. Dieses Enzym setzt das Reagenz CDP-StarTM um, wobei Chemolumineszenz entsteht, die in manchen Fällen bereits mit bloßem Auge sichtbar ist und durch Exposition auf einen Röntgenfilm festgehalten werden kann. Die Entwicklung

mit Hilfe des Digoxigenin/CDP-StarTm-Systems erfolgte, indem die Membran nacheinander in folgenden Lösungen mit einem Volumen von 50 ml in einer Schale geschwenkt wurde:

1. Puffer I	1 min
2. Puffer II ohne Antikörper	30 min
3. Puffer II mit Antikörper Menge 10 μ l Anti-DIG-F _{ab} - Alkalische Phosphatase-Antikörper	60 min
4. Puffer I	20 min (2 \times)
5. Puffer III ohne CDP-Star Tm	5 min
6. Puffer III mit CDP-Star Tm Menge 40 μ l	5 min

Filterhybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden

Zum Teil wurden zum Nachweis von 5 S-RNA bzw. PSTVd radioaktiv markierte Oligonukleotide eingesetzt. Die radioaktive Markierung der Oligonukleotide ist in Abschnitt 3.3.2 beschrieben, die Sequenz ist in Abschnitt 2.2.5 angegeben. Die Membran wurde im Hybridisierungsröhrchen mit 15 ml Hybridisierungslösung bei 50 °C für 4 h im Hybridisierungsöfen prähybridisiert. Die Hybridisierung fand nach Zugabe von 2-6 Mio. cpm) radioaktiv-markierter Sonde bei 55 °C während 16 bis 18 h statt.

Hybridisierungslösung:	5 \times	Denhardts-Reagenz
	0,1 %	Polyvinylpyrolidon PVP 360
	5 \times	SSC
	0,1 %	SDS
	250 μ g/ μ l	Heringssperm-DNA

Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sondenmoleküle wurde die Membran mit Waschlösung (s.o.) gespült und anschließend 1-2 mal für 30 min bei 55 °C gewaschen. Nach Einschweißen in Folie wurde ein Kokak X-Omat AR-Röntgenfilm in einer Expositionskassette für mehrere Stunden bzw. Tage exponiert.

3.4.11 *In silico*-Analysen

Mit Hilfe des Programms *mfold3.2* (Mathews *et al.*, 1999a; Zuker, 2003) wurden Berechnungen zu Sekundärstrukturen von RNAs durchgeführt. Dieses Programm berechnet optimale und suboptimale Sekundärstrukturen bei 37 °C, einer Ionenstärke von 1 M Na⁺ und einer RNA-Konzentration von 1 M.

Ergebnisse

Viroide werden in ihren Wirtspflanzen repliziert, vom Ort der Aufnahme oder Synthese in andere Bereich der Pflanze transportiert und rufen, je nach Varietät des Viroids bzw. der Pflanze, Krankheitssymptome hervor. Diese Fähigkeiten müssen auf Wechselwirkungen zellulärer Faktoren der Pflanzen mit der Viroid-RNA beruhen. Verschiedene zelluläre RNAs wurden bereits als Wechselwirkungspartner von Viroiden diskutiert, aber nur eine Wechselwirkung zwischen ribosomaler 5 S-RNA und PSTVd wurde bisher sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen (Krause, 2002; Aschermann, 2001).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde eine *in vitro*-Studie zur Komplexbildung von PSTVd bzw. 5 S-RNA mit verschiedenen zellulären RNAs durchgeführt. Dabei konnte aber lediglich eine Wechselwirkung zwischen der 5 S-RNA und einer zellulären RNAs nachgewiesen werden. Es erschien daher lohnender, die Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5 S-RNA genauer zu untersuchen. Den Schwerpunkt der Arbeit bilden Untersuchungen zur Bestimmung der genauen Kontaktstellen zwischen PSTVd und 5 S-RNA. Dazu wurde eine Methode gewählt, die auf einer kovalenten Verknüpfung (Crosslinks) der Komplexe und der nachfolgenden Identifizierung der Crosslinks mittels *primer extension* beruht. Nach aufwändiger Optimierungsarbeit konnte das Verfahren konnten Kontaktstellen zwischen beiden Molekülen identifiziert werden. Durch den Einsatz ergänzender Methoden gelang es, die Wechselwirkungsposition zu verifizieren bzw. genauer einzugrenzen und Kontaktstellen auf der PSTVd- und der 5 S-RNA einander zuzuordnen. Auf der Grundlage der experimentellen Daten konnte schließlich ein Modell zur Wechselwirkung von 5 S-RNA und PSTVd entwickelt werden.

4.1 Darstellung und Nachweis von RNA-RNA-Komplexen

4.1.1 Komplexe zwischen verschiedenen PSTVd bzw. 5 S-RNA und zellulären RNAs

Bei den von Aschermann (2001) durchgeführten Untersuchungen zur Wechselwirkung von PSTVd mit zellulärer RNA wurde ausschließlich 5 S-RNA als Interaktionspartner identifiziert. Aufgrund der Ausschlußgröße der Gelelektrophorese konnte aber eine Wechselwirkung mit großen RNAs nicht ausgeschlossen werden. Immerhin wurde eine Wechselwirkung der großen ribosomalen RNAs *in vitro* bereits von Thiel (1999) durch Filterhybridisierung nachgewiesen. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde versucht, das von Aschermann (2001) beschriebene Verfahren in abgewandelter Form zur Isolierung von Komplexen zwischen PSTVd und 18 S bzw. 25 S-RNA einzusetzen. Es waren keine Komplexe isolierbar. Dies und die Tatsache, dass aus Ribosomen keine Viroid-RNA freigesetzt werden konnte (Thiel, 1999), ließen einen Versuch, *in vivo* Komplexe zwischen 18 S- bzw. 25 S-RNA und PSTVd aufzureinigen, wenig aussichtsreich erscheinen.

Zur Einschätzung der Spezifität der Wechselwirkung von 5 S-RNA und PSTVd sollte geprüft werden, ob PSTVd bzw. 5 S-RNA auch mit anderen, kleinen RNAs wechselwirkt. Dazu wurden drei zelluläre RNAs durch *in vitro*-Transkription hergestellt: die 7S-, die U 14- und die rr2-RNA. Die 7S-RNA ist mit 308 Nukleotiden von ähnlicher Größe wie PSTVd (359 Nukleotide) und hat darüber hinaus strukturelle Gemeinsamkeiten mit diesem. Sie ist Bestandteil des „Signal Recognition Particle“ (siehe Abschnitt 1.1. Bei der U 14-RNA handelt es sich um eine kleine RNA von ähnlicher Größe (122 Nukleotide) wie die 5 S-RNA, die im Nukleolus lokalisiert ist und dort an der Prozessierung der 18 S-RNA beteiligt ist. Sie befindet sich wie der Großteil des PSTVd im Nukleolus. Die rr2-RNA repräsentiert die ersten 341 Nukleotide des 5' „External Transcribed Spacer“ (5' ETS) der prä-rRNA von *Arabidopsis thaliana*. Zur Untersuchung der Komplexbildung wurden RNA-RNA-Gelshift-Analysen durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Komplexe zwischen zwei Nukleinsäuren in der nativen Gelelektrophorese gegenüber Monomeren verzögert werden (siehe Abschnitt 3.4.2).

Die Experimente zeigten, dass PSTVd mit keiner und 5 S-RNA mit einer der zellulären RNAs wechselwirkt. In Abb. 4.1A ist exemplarisch eine RNA-RNA-Gelshift-Analyse von 7S-RNA mit PSTVd bzw. 5 S-RNA dargestellt. Es ist zu erkennen, dass

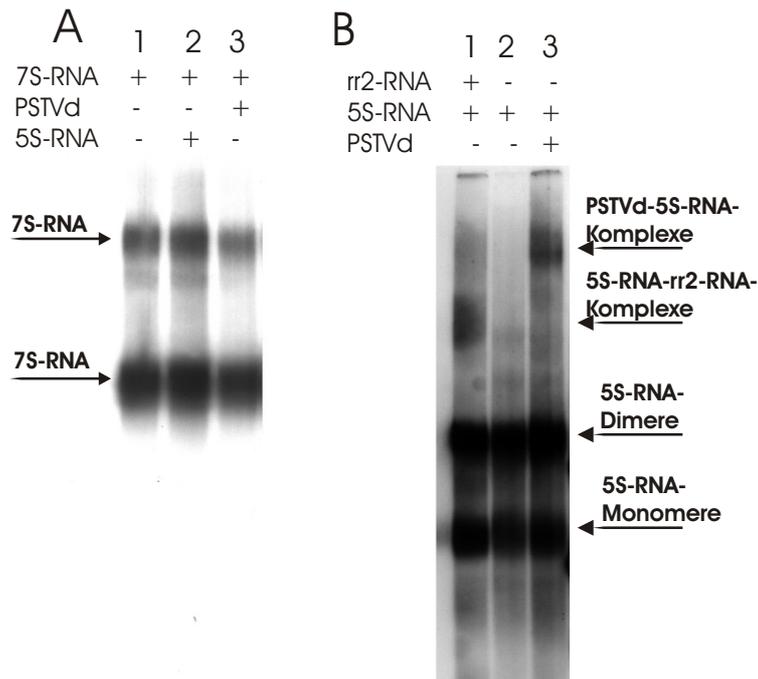


Abbildung 4.1: RNA-RNA-Gelshift-Analyse von PSTVd bzw. 5 S-RNA und zellulären RNAs.

Northern-Blots nativer PAGEs, 4,5 % PAA 43:1; $0,2 \times$ NaTAE; 10°C , 500 V; 45 min, Autoradiographien. Die RNA-Konzentration bei der Komplexbildung betrug 12,5 mM in Nukleotiden (Abschnitt 3.4.2). Das molare Verhältnis der RNAs betrug bei 7 S/5 S, rr2/5 S und PSTVd/5 S: 1:3; bei 7 S/PSTVd: 1:1. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

A) Komplexbildung von 7 S-RNA und 5 S-RNA bzw. PSTVd (7 S-RNA-spezifischer Nachweis).

Spur 1: Referenz-Ansatz: reine 7 S-RNA (100 ng in $10 \mu\text{l}$)

Spur 2: Komplex-Ansatz: 7 S- und 5 S-RNA (je 100 ng in $10 \mu\text{l}$)

Spur 3: Komplex-Ansatz: 7 S-RNA und PSTVd (je 100 ng in $10 \mu\text{l}$)

B) Komplexbildung von 5 S-RNA und rr2-RNA bzw. PSTVd (5 S-RNA-spezifischer Nachweis).

Spur 1: Komplex-Ansatz: 5 S-RNA und rr2-RNA (je 100 ng in $10 \mu\text{l}$)

Spur 2: Referenz-Ansatz: reine 5 S-RNA (100 ng in $10 \mu\text{l}$)

Spur 3: Komplex-Ansatz: 5 S-RNA und PSTVd (je 100 ng in $10 \mu\text{l}$)

weder im Komplex-Ansatz von 7 S-RNA und PSTVd (Spur 3) noch im Ansatz von 7 S- und 5 S-RNA (Spur 2) ein Signal gegenüber reiner 7 S-RNA (Spur 1) hinzutritt. Es sei angemerkt, dass zwei 7 S-RNA-spezifische Banden erkennbar sind, diese RNA liegt demnach unter den gewählten Bedingungen in zwei verschiedenen Konformationen oder als Dimer vor. Durch PSTVd-spezifische bzw. 5 S-RNA-spezifische Hybridisierungen der gleichen Ansätze konnte bestätigt werden, dass keine Komplexbildung zwischen diesen RNAs stattfindet (Daten nicht gezeigt). Ausschließlich zwischen 5 S-RNA und rr2-RNA konnten Komplexe nachgewiesen werden. In Spur 1 des in Abb. 4.1B gezeigten Gels, in der ein Komplex-Ansatz von rr2- und 5 S-RNA aufgetragen wurde, tritt ein gegenüber reiner 5 S-

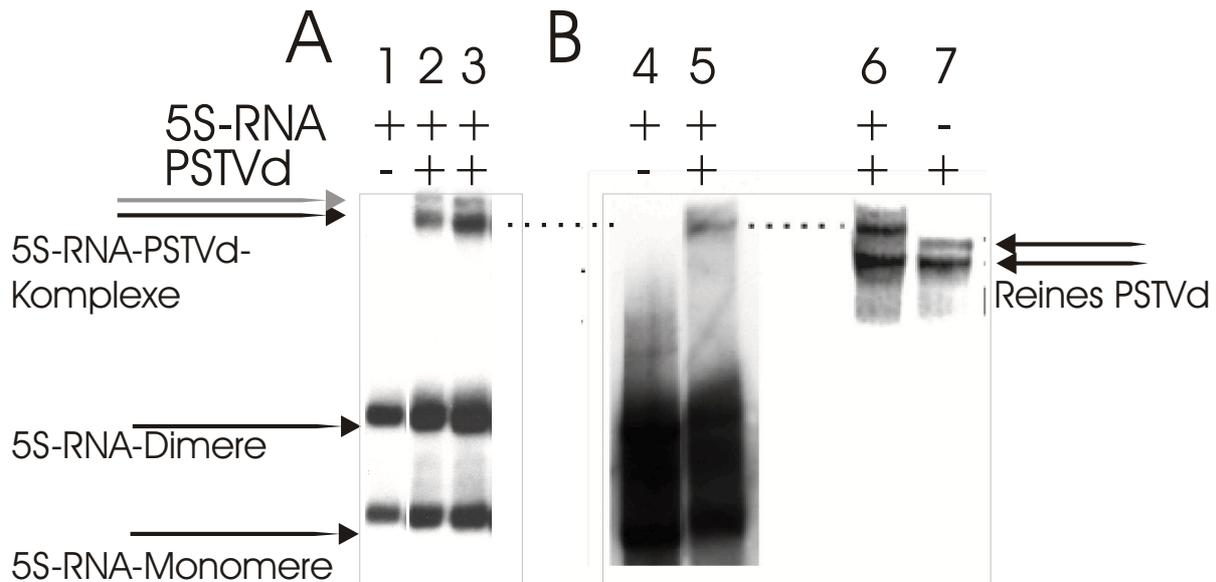


Abbildung 4.2: RNA-RNA-Gelshift-Analyse von PSTVd und 5 S-RNA. Northern-Blots nativer PAGEs, 4,5 % PAA 43:1; Puffer: $0,2 \times$ NaTAE; 10°C ; 500 V; 45 min, Autoradiographien. Die RNA-Konzentration bei der Komplexbildung betrug 11,5 mM in Nukleotiden, das molare Verhältnis von PSTVd/5 S war 1:3 (Abschnitt 3.4.2). Die Psoralen-Konzentration bei der Quervernetzung betrug $7,5 \mu\text{M}$ bei der Probe in Spur 7, bei allen anderen Proben $12,5 \mu\text{M}$. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

A) Komplexbildung von PSTVd und 5 S-RNA (ausschließlich 5 S-RNA-spezifischer Nachweis)

Spur 1: Referenz-Ansatz: 5 S-RNA rein (100 ng in $10 \mu\text{l}$)

Spuren 2 und 3: Komplex-Ansatz: PSTVd und 5 S-RNA (je 100 ng in $10 \mu\text{l}$)

B) Komplexbildung von PSTVd und 5 S-RNA (5 S-RNA-spezifischer (Spuren 4 und 5) und PSTVd-spezifischer (Spuren 6 und 7) Nachweis).

Spur 4: Referenz-Ansatz: 5 S-RNA rein (100 ng in $10 \mu\text{l}$)

Spur 5: Komplex-Ansatz: PSTVd und 5 S-RNA (je 100 ng in $10 \mu\text{l}$)

Spur 6: Komplex-Ansatz: PSTVd und 5 S-RNA (je 100 ng in $10 \mu\text{l}$)

Spur 7: Referenz-Ansatz: PSTVd rein (100 ng in $10 \mu\text{l}$)

RNA verzögertes Signal hinzu. Dieses Signal ist von ähnlicher Intensität wie die Bande der 5 S-RNA-PSTVd-Komplexe (siehe Abb. 4.1B, Spur 3).

Die Ergebnisse belegen, dass die Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5 S-RNA unter den gewählten Bedingungen eine signifikant höhere Bindekonstante hat. Nun sollten die Komplexe zwischen PSTVd und 5 S-RNA *in vitro* genauer charakterisiert werden. Im Folgenden werden 5 S-RNA-PSTVd-Komplexe in der Regel lediglich als Komplexe bezeichnet.

4.1.2 Komplexe zwischen PSTVd und 5 S-RNA

Um Komplexe zwischen PSTVd und 5 S-RNA herzustellen, wurden die RNAs zunächst durch *in vitro*-Transkription hergestellt. Es sei angemerkt, dass PSTVd-Transkripte, im Gegensatz zu aus Pflanzen aufgereinigtem PSTVd, nicht zirkulär sind, sondern eine Schnittstelle aufweisen. In Zusammenarbeit mit Remennik (2003) wurde ermittelt, dass sich die Ausbeute an Komplexen bei zunehmender RNA-Konzentration im Ansatz und auch bei einer Erhöhung der anfänglichen Denaturierungstemperatur von 70 °C auf 90 °C erhöht. Daher wurde die Gesamt-Konzentration an RNA im Ansatz möglichst hoch gewählt (12,5 mM in Nukleotiden RNA, wenn nicht anders angegeben). Die Darstellung der Komplexe erfolgte durch thermische Denaturierung bei 90 °C und langsame Abkühlung. Abb. 4.2A zeigt einen 5 S-RNA-spezifischen Northern-Blot zur Überprüfung der Komplex-Bildung. In der Referenz, die reine 5 S-RNA enthält, sind zwei Signale zu erkennen, die 5 S-RNA-Monomere und -Dimere enthalten (Gruner, 1992). In den Spuren 2 und 3 sind Komplexe aufgetragen, die bei zwei unterschiedlichen Konzentrationen quervernetzt worden waren. Es kommt gegenüber der Referenz jeweils ein stark verzögertes Signal hinzu, das somit auf Komplexe zurückzuführen ist. Das Signal ist in Spur 3 etwas stärker als in Spur 2. Dies ist offenbar auf eine erhöhte Gesamt-RNA-Menge zurückzuführen, denn die Banden der 5 S-RNA-Monomere und -Dimere sind ebenfalls leicht verstärkt.

Um zu überprüfen, ob dieses Signal auch tatsächlich PSTVd enthält, wurden nochmals Komplexe hergestellt und das Northern-Blotting parallel mit einer 5 S-RNA-spezifischen und einer PSTVd-spezifischen Sonde durchgeführt (Abb. 4.2B). Obwohl die Ausbeute an Komplexen in diesem Experiment niedriger war, ist in Spur 6 ein Signal zu erkennen, das gegenüber reinem PSTVd (Spur 7) leicht verzögert ist, und auf gleicher Höhe wie die Komplexbande im 5 S-RNA-spezifischen Nachweis liegt (Spur 5). Die Ergebnisse beider Nachweisvarianten stimmen somit überein und belegen eine erfolgreiche Komplexbildung. Allerdings zeigt ein Vergleich der Intensitäten der Banden auch, dass nur ein kleiner Teil des eingesetzten PSTVd und 5 S-RNA im Komplex miteinander vorliegt. Die Ausbeute an Komplexen variierte in verschiedenen Experimenten, daher wurde zur Überprüfung der erfolgreichen Komplexbildung im weiteren Verlauf der Arbeit stets ein 5 S-RNA-spezifischer Northern-Blot durchgeführt.

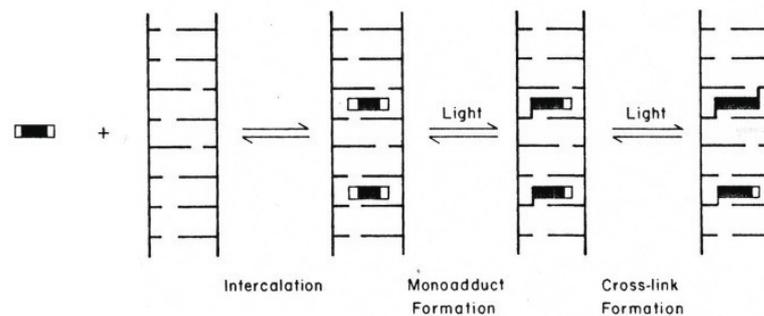


Abbildung 4.3: Entstehung eines Psoralen-Crosslinks innerhalb einer Nucleinsäure-Helix. Im ersten Schritt erfolgt die Interkalation des Psoralens in die Helix. Nach Absorption eines Photons (320 - 380 nm) können nun an Pyrimidinen Monoaddukte entstehen. Steht diesem Pyrimidin ein weiteres diagonal gegenüber, so kann sich nach Aufnahme eines weiteren Photons ein Crosslink bilden. Aus: Lipson & Hearst (1988).

4.2 *Primer Extension*-Analysen zur Identifizierung von Kontaktstellen zwischen PSTVd und 5 S-RNA

4.2.1 Experimentelles Vorgehen

Zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung der Komplexe sollte die Position der Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5 S-RNA bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde ein Verfahren angewandt, das auf einer spezifischen Markierung basengepaarter Bereiche in Nucleinsäuren beruht. Dieses Verfahren wurde bereits von Thiel (1999) angewandt, um nachzuweisen, dass *in vitro* und *in vivo* Kontakte zwischen PSTVd und zellulärer RNA bestehen. Die Nucleinsäuren werden dazu durch Inkubation mit dem Psoralen-Derivat 4'-Aminomethyl-4,5,8-trimethylpsoralen (AMT) und anschließender Bestrahlung mit UV-Licht kovalent quervernetzt (siehe Abschnitt. 3.3.1 und zur Übersicht: Lipson & Hearst, 1988; Cimino *et al.*, 1985). Eine kovalente Quervernetzung (Crosslink) kann dabei nur zwischen zwei Pyrimidin-Basen entstehen, die einander in einer Helix diagonal gegenüber stehen (siehe Abb. 4.3). Mit Hilfe einer nachfolgenden *primer extension*-Analyse können solche Crosslinks dann identifiziert werden: dazu wird die RNA mit geeigneten Primern, Nucleotiden und einer Reversen Transkriptase inkubiert. Das Enzym kann nun zur RNA komplementäre DNA synthetisieren. Diese Reaktion bricht jedoch ab, wenn eine mittels Psoralen quervernetzte Nucleotidposition auf dem *template* erreicht wird (Ericson & Wollenzien, 1988). Die genaue Position der Nucleotide, an denen die Reaktion abbricht, kann bestimmt werden, indem parallel zur *primer extension*-Reaktion

eine Sequenzierung mit dem gleichen Primer erfolgt. Die Reaktionsansätze dieser Sequenzierung und die *primer extension*-Produkte werden zusammen mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen.

Zur Anwendung dieses Verfahrens zur Bestimmung der genauen Bindestelle von 5S-RNA an PSTVd sollten die Komplexe *in vitro* aus reinen Einzelkomponenten hergestellt und dann quervernetzt werden (siehe Abb. 4.4 und Abschnitt 3.3.1). Anschließend sollte die Position jener Quervernetzungen, die innerhalb der Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S-RNA liegen, mittels *primer extension* identifiziert werden. Zur Etablierung des Verfahrens mussten die einzelnen experimentellen Schritte zunächst optimiert werden. Die methodische Optimierung wird in den Abschnitten 4.1.2, 4.2.2 und 4.2.4 beschrieben. Die Ergebnisse der Anwendung sind in den Abschnitten 4.2.3, 4.2.5 und 4.2.6 dargestellt.

4.2.2 Methodische Optimierung der RNA-Quervernetzung

Zur kovalenten Quervernetzung wurden die Nukleinsäuren mit Psoralen inkubiert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt (vgl. Abschnitt 3.3.1). Das Konzentrationsverhältnis von Psoralen zur RNA wirkt sich auf die Anzahl der Quervernetzungen aus, die gebildet werden. Je höher die Konzentration an Psoralen, desto mehr Moleküle können in die Nukleinsäurehelices interkalieren und so eine Quervernetzung vermitteln. Auch eine längere Bestrahlungsdauer kann die Effizienz der Quervernetzung steigern. Northern-Blot-Analysen an RNA aus PSTVd-infizierten Pflanzen zeigten aber, dass die Effizienz der Quervernetzung nur bis zu einem zweifachen Überschuss an Psoralen gegenüber der RNA (in Nukleotiden) gesteigert wird. Eine weitere Erhöhung des Psoralen-RNA-Verhältnisses (10-facher Überschuss) wirkte sich sogar ungünstig aus (Thiel, 1999). In der Arbeit von Thiel (1999) wurden die PSTVd enthaltenden RNA-Extrakte letztendlich mittels *primer extension* analysiert. Da in der vorliegenden Arbeit ebenfalls *primer extension* an PSTVd-Molekülen durchgeführt werden sollte, wobei anstelle von RNA-Extrakten reine Einzelkomponenten von 5S-RNA und PSTVd eingesetzt werden sollten, erschienen die experimentellen Bedingungen gut vergleichbar. Die Bedingungen der RNA-Quervernetzung wurden daher zunächst in Anlehnung an jene Arbeit gewählt.

Aliquots eines Komplex-Ansatzes zwischen PSTVd und 5S-RNA wurden 1) mit einem zweifachen Überschuss an Psoralen gegenüber der RNA in Nukleotiden versetzt und 60 min UV-bestrahlt, 2) nur 60 min UV-bestrahlt und 3) blieben unbehandelt. Alle

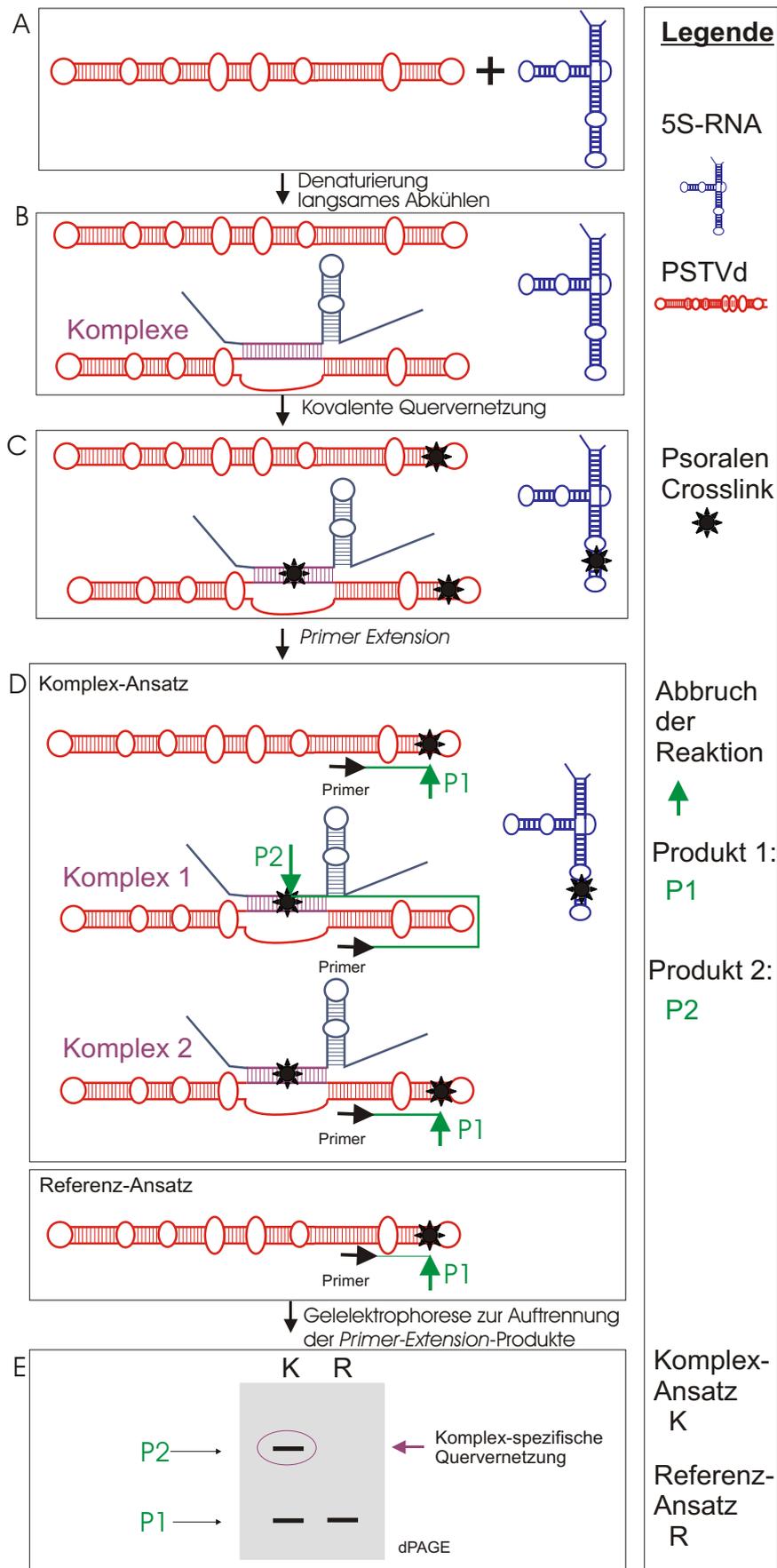


Abbildung 4.4: Prinzip der *primer extension*-Analyse zur Bestimmung von Interaktionspunkten zwischen zwei RNA-Molekülen. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

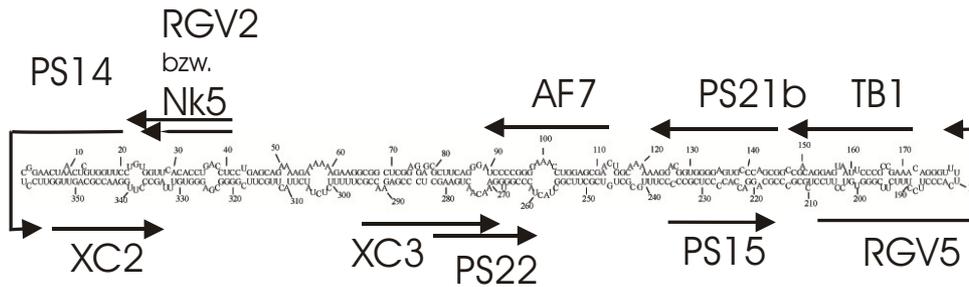


Abbildung 4.5: Lage der verwendeten Primer für die *primer extension* auf PSTVd.

	1	2	3	4	5	6
5S-RNA-Zugabe	-	-	-	+	+	+
Psoralen-Zugabe	-	-	+	-	-	+
UV-Bestrahlung	-	+	+	-	+	+



Abbildung 4.6: Vergleichende *primer extension*-Analyse an nicht quervernetzter, UV-bestrahlter und quervernetzter RNA. Denaturierende PAGE, 8 % PAA (19:1), 7 M Urea, 1 × TBE, 55 °C, 100 W, Autoradiographie. Komplexbildung siehe Abschnitt 3.4.2. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

- Spur 1: reines PSTVd – unbehandelt
- Spur 2: reines PSTVd – UV-bestrahlt
- Spur 3: reines PSTVd – quervernetzt
- Spur 4: Komplex-Ansatz – unbehandelt
- Spur 5: Komplex-Ansatz – UV-bestrahlt
- Spur 6: Komplex-Ansatz – quervernetzt

Ansätze wurden als *template* einer *primer extension*-Reaktion mit dem Primer NK5 eingesetzt. Die Lage aller verwendeten Primer auf dem PSTVd-Molekül ist in Abb. 4.5 zu erkennen. Abb. 4.6 zeigt das Sequenziergel, in dem die *primer extension*-Produkte aufgetrennt wurden: vergleicht man das Abbruchmuster der quervernetzten (Spuren 3 und

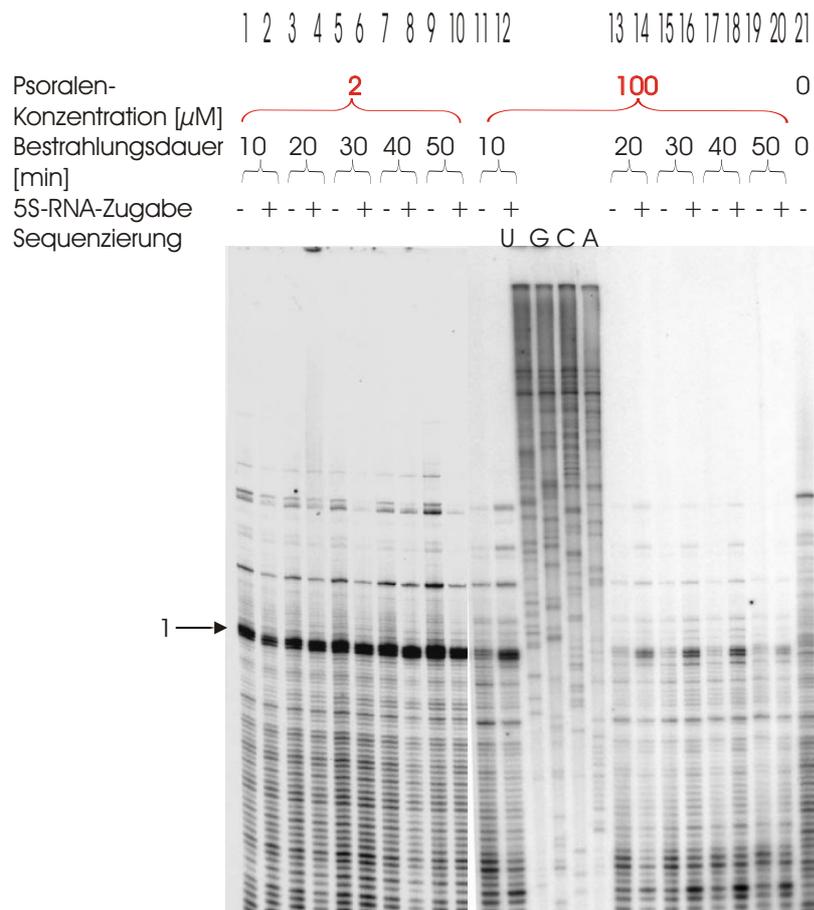


Abbildung 4.7: Optimierung der RNA-Quervernetzung: Variation der Bestrahlungszeit. Denaturierende PAGE, 8 % PAA (19:1), 7 M Urea, 1 \times TBE, 55 $^{\circ}\text{C}$, 100 W, Autoradiographie. Komplexbildung siehe Abschnitt 3.4.2. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer und Psoralen-Konzentration sind oberhalb der Spuren angegeben. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Spur 1: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20: Komplex-Ansätze mit PSTVd und 5S-RNA

Spur 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 und 21: Referenz-Ansätze mit reinem PSTVd

6) mit der nicht quervernetzten (Spuren 1 und 4) bzw. lediglich UV-bestrahlten Ansätze (Spuren 2 und 5), so ist zu erkennen, dass nur bei der quervernetzten Probe längere Produkte fehlen. In einem weiteren Experiment konnte ausgeschlossen werden, dass allein die Anwesenheit des Psoralens die *primer extension*-Reaktion stört (Daten nicht gezeigt).

Dieses Experiment zeigt, dass eine *primer extension*-Analyse von RNA, die unter diesen Bedingungen quervernetzt wurde, nicht optimal verläuft. Grund dafür ist aber nicht eine Degradation der RNA durch die UV-Bestrahlung oder eine Hemmung der Reaktion durch das Psoralen. Vielmehr darf die Quervernetzung bei nachfolgender *primer extension* nicht zu effizient sein. Im Extremfall könnte jedes Molekül an jeder möglichen Position quervernetzt sein und folglich würde die Reaktion der Reversen Transkriptase

stets am ersten quervernetzten Nukleotid abbrechen (siehe Abb. 4.4D Komplex 2). An dieser Position muss sich aber nicht die gesuchte intermolekulare Quervernetzung mit der 5 S-RNA befinden. Während nämlich PSTVd an zahlreichen Positionen intramolekular quervernetzbar ist, ist zu erwarten, dass die intermolekulare Quervernetzung nur an einer bzw. an wenigen Positionen entsteht. Bei der Optimierung musste demnach folgendes berücksichtigt werden:

1) Ist die Effizienz zu hoch, so entstehen so viele intramolekulare Quervernetzungen, dass die gesuchte intermolekulare Quervernetzung nicht nachweisbar ist (siehe Abb. 4.4D Komplex 1).

2) Ist die Effizienz zu niedrig, so entstehen insgesamt zu wenig intermolekulare Quervernetzungen zwischen PSTVd und 5 S-RNA.

Variation der Bestrahlungsdauer

Es sollten Bedingungen gefunden werden, unter denen die Effizienz der Quervernetzung herabgesetzt ist. Dazu wurden Zeitreihen bei zwei Psoralen-Konzentrationen durchgeführt: $100\ \mu\text{M}$ (äquimolar) und $2\ \mu\text{M}$ (50-facher Unterschuss von Psoralen zu Nukleotiden der RNA). Die Bestrahlungsdauer wurde von 10 bis 50 min variiert. Die Komplex- und Referenz-Ansätze wurden direkt in einer *primer extension*-Reaktion mit dem Primer AF7 als *template* eingesetzt.

Abb. 4.7 zeigt ein Sequenziergel, in dem die Produkte dieser *primer extension*-Reaktion aufgetrennt wurden. Die Bestrahlungsdauer der Proben hat aber auf die Effizienz der Quervernetzung offenbar keinen Einfluss. Lediglich das Abbruchmuster der bei $100\ \mu\text{M}$ AMT für 50 min bestrahlten Proben (Spuren 19 und 20) ist gegenüber dem der Proben mit kürzerer Bestrahlungsdauer abgeschwächt. Für alle folgenden Experimente wurde eine Bestrahlungsdauer von 40 min gewählt. Es ist aber erkennbar, dass demgegenüber die Psoralen-Konzentration bei der Quervernetzung einen deutlichen Einfluss auf das Abbruchmuster hat. Bei den bei $100\ \mu\text{M}$ quervernetzten Proben ist das Abbruchmuster insgesamt deutlich schwächer. Offenbar ist ein großer Teil der RNA-Moleküle bereits kurz nach dem Primer quervernetzt, so dass die Reaktion abbricht. Die entstandenen Produkte sind so kurz, dass sie im unteren Bereich des Gels erkennbar bzw. aus dem Gel gelaufen sind. Bei $2\ \mu\text{M}$ AMT verläuft die *primer extension* dagegen zufrieden stellend (Spuren 1 bis 10). Ähnlich wie bei der nicht quervernetzten Probe in Spur 21 sind

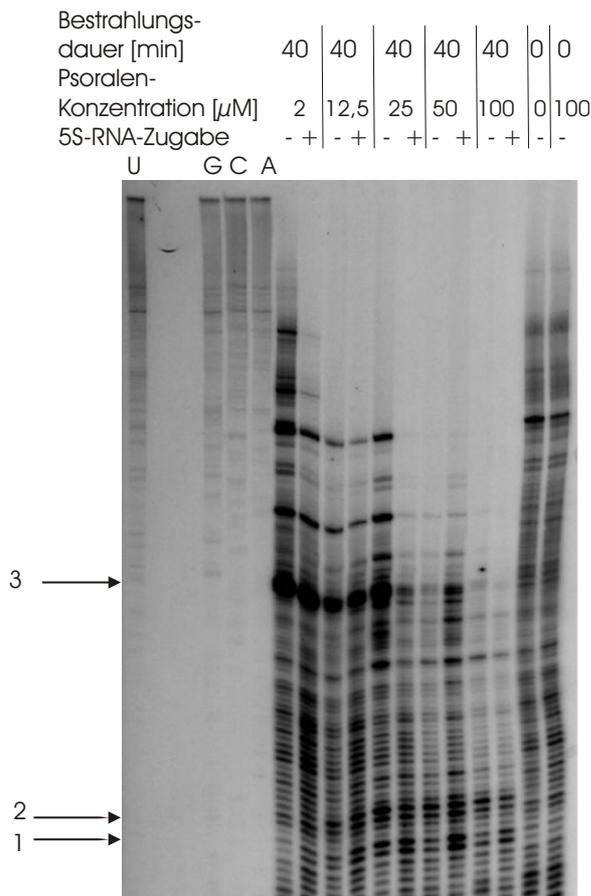


Abbildung 4.8: Optimierung der RNA-Quervernetzung: Variation der Psoralen-Konzentration. Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7 M Urea, $1 \times$ TBE, 55°C , 100 W, Autoradiographie. Komplexbildung siehe Abschnitt 3.4.2. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer und Psoralen-Konzentration sind oberhalb der Spur angegeben. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Spuren 1, 3, 5, 7, 9, 11, 12: Referenz-Ansätze mit reinem PSTVd

Spuren 2, 4, 6, 8, 10: Komplex-Ansätze mit PSTVd und 5S-RNA

hier auch, wie gewünscht, längere Produkte, die sich oberhalb des starken Abbruchsignals befinden (siehe Pfeil), entstanden.

Variation der Psoralen-Konzentration

Bei einer niedrigen Psoralen-Konzentration wird auch der Anteil an PSTVd-Molekülen geringer, die eine Quervernetzung zur 5S-RNA ausbilden, so dass auch der Nachweis dieser intermolekularen Quervernetzung schwieriger wird. Daher sollte nun die höchste Psoralen-Konzentration ermittelt werden, bei der, wie gewünscht, auch längere Produkte entstehen. Komplex-Ansätze und Referenzproben wurden quervernetzt, wobei die Psoralen-Konzentrationen zwischen 2 und $100 \mu\text{M}$ variiert wurde, und dann als *template* einer *primer extension* mit dem Primer AF7 eingesetzt. In Abb. 4.8 ist zu erkennen, dass der Einsatz niedrigerer Psoralen-Konzentrationen dazu führt, dass, wie gewünscht, auch längere *primer extension*-Produkte entstehen. Bei Erhöhung der Psoralen-Konzentration nimmt die Intensität der Banden bei kürzeren Laufstrecken deutlich ab (oberhalb von Pfeil 3). Auch der starke Abbruch an der mit Pfeil 3 gekennzeichneten Position nimmt bei Zunah-

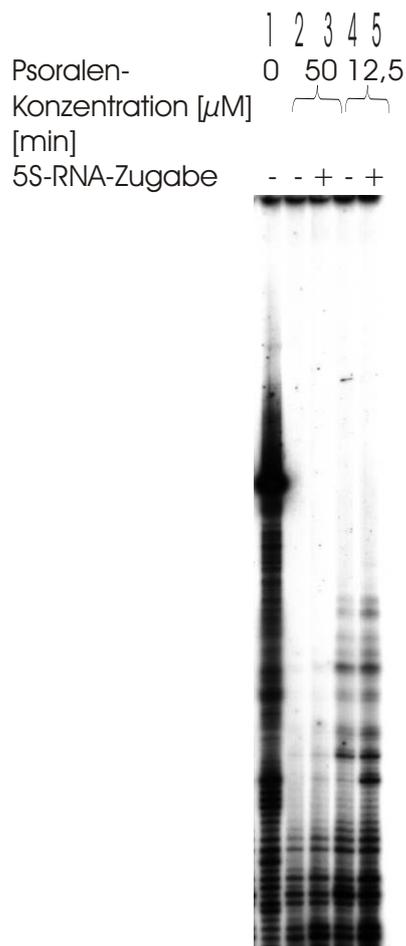


Abbildung 4.9: Einsatz der optimierten Bedingungen der RNA-Quervernetzung bei nachfolgender *primer extension* mit anderen Primern (exemplarisch XC3). Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7M Urea, $1 \times$ TBE, 55°C , 100 W, Autoradiographie. Komplexbildung siehe Abschnitt 3.4.2. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer: 40 min; Psoralen-Konzentration ist oberhalb der Spur angegeben. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text. Spuren 1, 2 und 4: Referenz-Ansätze mit reinem PSTVd
Spuren 3 und 5: Komplex-Ansätze mit PSTVd und 5S-RNA

me der Psoralen-Konzentration ab. Bei $100 \mu\text{M}$ AMT ist schließlich das gesamte Abbruchmuster schwächer ausgeprägt und die Banden längere Produkte kaum noch nachweisbar. Offenbar bricht die Reaktion der Reversen Transkriptase in diesem Fall bereits nach dem Einbau weniger Nukleotide ab. Die entsprechenden kurzen Produkte sind unter den verwendeten Elektrophorese-Bedingungen aus dem Gel gelaufen. Bei einer Konzentration von $2 \mu\text{M}$ Psoralen fehlen dagegen zwei Abbruchsignale bei kurzen Laufstrecken (siehe Pfeil 1 und 2), die bei einer Erhöhung der Konzentration bis $50 \mu\text{M}$ verstärkt werden.

Trotz der optimierten Quervernetzung ist nicht möglich, mit nur einem Primer das gesamte Viroid auf Quervernetzungen hin zu untersuchen. Daher wurden *primer extension*-Analysen mit verschiedenen weiteren Primern durchgeführt, deren Lage auf dem PSTVd-Molekül in Abb. 4.5 zu sehen ist. In Anlehnung an das obige Experiment wurden für die Quervernetzung zwei Psoralen-Konzentrationen im mittleren Bereich gewählt: $12,5$ und $50 \mu\text{M}$.

Es zeigte sich aber, dass die optimale Psoralen-Konzentration beim Einsatz unterschiedlicher Primer deutlich variiert. Während die *primer extension* mit dem Primer AF7 bei $12,5 \mu\text{M}$ gut funktioniert und bei $50 \mu\text{M}$ noch möglich ist, entstanden bei Verwendung anderer Primer selbst bei der niedrigeren Konzentration nur kurze Produkte. Dies ist in Abb. 4.9 exemplarisch anhand einer *primer extension* mit dem Primer XC3 gezeigt und gilt ebenso für die Primer XC2, PS15, RGV2 und PS14. Wie in den Spuren 3 und 4 zu sehen ist, fehlen aber die gewünschten Produkte mit längeren Laufstrecken, wenn $12,5 \mu\text{M}$ Psoralen zur Quervernetzung verwendet wurde. Bei Verwendung von $50 \mu\text{M}$ Psoralen (Spuren 2 und 3) bricht die Reaktion offenbar wenige Nukleotide nach dem Primer vollständig ab. Es war daher notwendig, die Bedingungen der Quervernetzung bei Verwendung verschiedener Primer erneut zu optimieren und dabei Psoralen-Konzentrationen zu verwenden, die noch unterhalb von $12,5 \mu\text{M}$ liegen. Dies führte schließlich zum Erfolg. Abb. 4.10 zeigt eine *primer extension*-Analyse mit dem Primer RGV2. Die Psoralen-Konzentrationen wurden bei diesem Experiment von 1 bis $12,5 \mu\text{M}$ variiert. Man kann erkennen, dass die Reaktion mit diesem Primer nur noch sehr kurze Produkte liefert, wenn eine Psoralen-Konzentration von $7,5 \mu\text{M}$ oder mehr bei der Quervernetzung eingesetzt wurde, bei 1 bis $2,5 \mu\text{M}$ AMT verläuft die *primer extension* dagegen optimal (Spuren 2 bis 5).

Die auf diese Weise individuell bestimmten optimalen Psoralen-Konzentrationen sind in Tab. 4.1 zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass zum Teil nur sehr niedrige Psoralen-Konzentrationen zur Quervernetzung toleriert werden, dies aber bei Verwendung unterschiedlicher Primer deutlich variiert. Für manche Primer ist die höchst mögliche Konzentration um ein Hundert- bis Zweihundertfaches niedriger als die von Thiel (1999) bestimmte Konzentration für eine möglichst effiziente Quervernetzung (100 bis $200 \mu\text{M}$).

4.2.3 Identifizierung von Kontaktstellen mittels PSTVd-spezifischer *primer extension* an nicht aufgereinigten Komplex-Ansätzen

Vorbemerkungen

Nach der Optimierung sollten Kontaktstellen zwischen PSTVd und 5 S-RNA mittels *primer extension* identifiziert werden. Daher ist es an dieser Stelle notwendig, einige Hinweise zur Interpretation der Abbrüche einer *primer extension*-Reaktion zu geben.

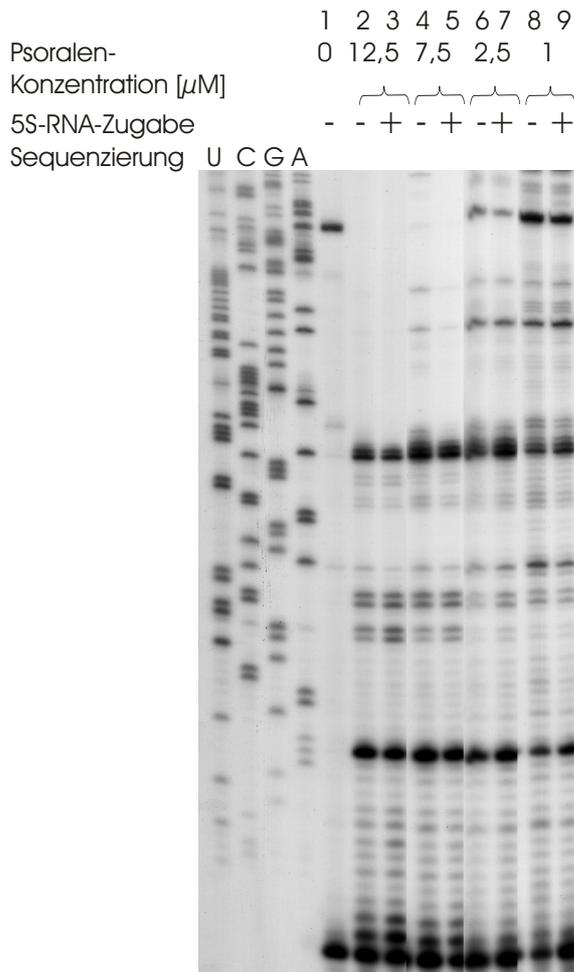


Abbildung 4.10: Erneute Optimierung der RNA-Quervernetzung bei Verwendung anderer Primer (exemplarisch RGV2) Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7M Urea, 1 \times TBE, 55 $^{\circ}\text{C}$, 100 W, Autoradiographie. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer: 40 min; Psoralen-Konzentration ist oberhalb der Spur angegeben. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Spuren 1, 2, 4, 6 und 8: Referenz-Ansätze mit reinem PSTVd

Spuren 3, 5, 7 und 9: Komplex-Ansätze PSTVd und 5S-RNA

Neben Quervernetzungen können auch strukturelle Merkmale der Nukleinsäure zu einem bevorzugten Abbruch der Reaktion der Reversen Transkriptase führen. Durch Vergleich des Abbruchmusters einer quervernetzten und einer nicht quervernetzten Referenzprobe der jeweiligen Nukleinsäure kann unterschieden werden, an welchen Positionen der Abbruch auf eine kovalente Quervernetzung bzw. auf ein strukturelles Merkmal zurückzuführen ist. Innerhalb der komplexen Strukturen der RNAs mit basengepaarten Bereichen können auch zahlreiche intramolekulare Quervernetzungen ausgebildet werden. Sowohl PSTVd als auch 5S-RNA können zudem Dimere ausbilden (5S-RNA: Ogata *et al.* (2001) und PSTVd: Steger *et al.* (1986)), die an diversen Positionen durch Psoralen verknüpft werden. Wird ein Abbruchsignal auf eine Quervernetzung zurückgeführt, so muss demnach geklärt werden, ob dieses innerhalb solcher intra- bzw. homomolekularer Wechselwirkungen liegt oder innerhalb einer Wechselwirkung zwischen 5S-RNA und PSTVd. Dies kann anhand von Referenzproben überprüft werden: wird die *primer extension* mit einem PSTVd-spezifischen Primer durchgeführt, so muss als Referenz reines PSTVd die-

Tabelle 4.1: Optimierte Psoralenkonzentrationen für die Quervernetzung bei nachfolgender *primer extension* mit verschiedenen Primern. In der ersten Spalte ist der verwendete Primer, in der zweiten die verwendete Psoralen-Konzentration und in der dritten das resultierende Psoralen-RNA-Verhältnis angegeben.

Primer	Optimale Psoralen-Konzentration [μM]	Psoralen-RNA-Verhältnis (RNA in Nukleotiden)
AF7	12,5	1:8
TB1	12,5	1:8
PS21b	12,5	1:8
PS22	2,5	1:40
XC2	2,5	1:40
PS15	2,5	1:40
XC3	1	1:100
PS14	1	1:100
RGV2	1	1:100

nen, das in gleicher Weise thermisch denaturiert, abgekühlt und kovalent quervernetzt wurde. Diese Referenzprobe enthält alle Quervernetzungen, die innerhalb eines oder zwischen zwei PSTVd-Molekülen entstehen. Auch Psoralen-Monoaddukte, die bei einer unvollständigen Psoralen-Verknüpfungsreaktion entstehen, sind enthalten (siehe Abb. 4.3). Tritt ein *primer extension*-Abbruchsignal auch in der Referenzprobe auf, so befindet sich der zugehörige Crosslink innerhalb einer intra- oder homomolekularen Wechselwirkung der jeweiligen RNA und kann nicht auf die gesuchte Interaktionsposition zwischen PSTVd und 5 S-RNA zurückgeführt werden. Ein Abbruchsignal dagegen, das in der *primer extension* der Komplexe im Vergleich zur Referenz verstärkt ist, kann auf eine Quervernetzung zwischen PSTVd und 5 S-RNA zurückgeführt werden.

Komplex-spezifische Quervernetzungen

Lediglich mit dem Primer XC3 zeigte die *primer extension* an nicht aufgereinigten Komplex-Ansätzen ein verändertes Abbruchmuster der Komplexe gegenüber der Referenz. In Spur 3 des in Abb. 4.11 gezeigten Sequenziergels, die *primer extension*-Produkte

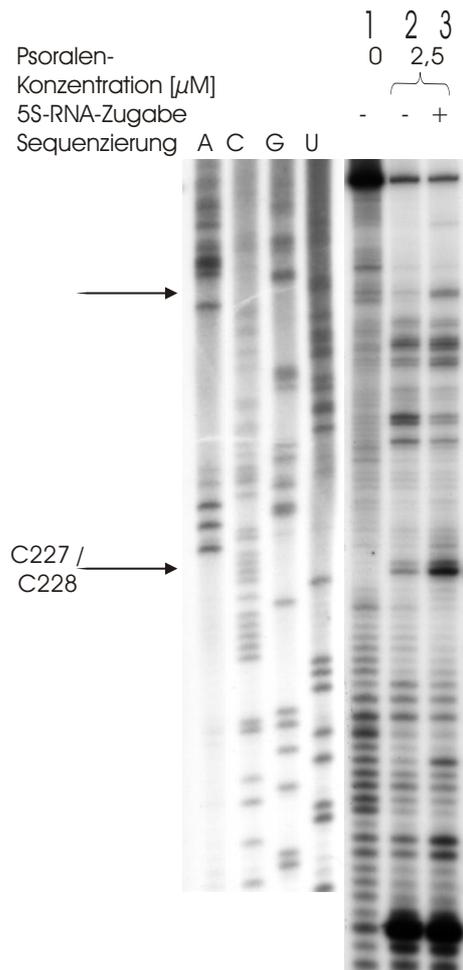


Abbildung 4.11: Identifizierung von Kontaktstellen zwischen 5S-RNA und PSTVd mittels *primer extension* an nicht aufgereinigten Komplex-Ansätzen Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7 M Urea, $1 \times$ TBE, 55°C , 100 W, Autoradiographie. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer: 40 min; Psoralen-Konzentration ist oberhalb der Spur angegeben. Verwendeter Primer: XC3. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Spuren 1, 2: Referenz-Ansätze mit reinem PSTVd

Spuren 3: Komplex-Ansatz mit PSTVd und 5S-RNA

der Komplexe enthält, ist an Position C227/C228 ein starkes Abbruchsignal zu erkennen, das in der Referenz nur schwach auftritt. Weiterhin ist eine schwache Abweichung bei kürzerer Laufstrecke zu erkennen. Dieses war je nach Experiment mehr oder weniger deutlich ausgeprägt. Auf dem 5S-RNA-Molekül konnten dagegen nur sehr leichte Abweichungen von Komplex- gegenüber Referenz-Ansätzen beobachtet werden, die demnach wenig aussagekräftig waren (Daten nicht gezeigt).

Folgende Überlegungen wurden nun angestellt: die Bedingungen der Quervernetzung waren so optimiert worden, dass eine anschließende *primer extension*-Analyse gut funktioniert. Für einige Primer waren dabei nur sehr niedrige Psoralen-Konzentrationen tolerabel. Wieviele Quervernetzungen unter diesen Bedingungen zwischen PSTVd und 5S-RNA entstehen, blieb unklar. Da nur ein relativ kleiner Teil der Moleküle im Komplex miteinander vorliegt, ist auf jeden Fall zu erwarten, dass der Hintergrund an intra- und homomolekularen Signalen hoch ist. Um diesen Hintergrund zu reduzieren und die Nachweisempfindlichkeit somit zu steigern, sollten die Komplexe aufgereinigt werden. Ein

verstärktes Auftreten des *primer extension*-Abbruchs an Position C227/C228 an aufgereinigten Komplexen würde die Beteiligung des entsprechenden Nukleotids an der Wechselwirkung weiter belegen. Außerdem sollte es auf diese Weise möglich sein, das am Crosslink beteiligte Nukleotid auf dem 5 S-RNA-Molekül zu identifizieren und, wenn vorhanden, weitere Komplex-spezifische *primer extension*-Signale auf beiden Molekülen nachweisen zu können.

4.2.4 Methodische Optimierung der Aufreinigung der Komplexe

Nach Herstellung und Quervernetzung enthielten die Ansätze neben Komplexen einen hohen Anteil an freiem PSTVd und freier 5 S-RNA. Bei den *primer extension*-Analysen mit PSTVd-spezifischen Primern stört die Anwesenheit des freien PSTVd durch die Bildung eines starken Hintergrunds an Abbruchsignalen aufgrund von intra- und homomolekularen Crosslinks. Freie 5 S-RNA kann dagegen in diesem Fall toleriert werden, da der Primer nicht an sie binden kann. Zur Aufreinigung der Komplexe wurde also ein Verfahren benötigt, das eine möglichst effektive Abtrennung des nicht an 5 S-RNA gebundenen PSTVd ermöglicht. Mit einem von Aschermann (2001) beschriebenen, affinitätschromatographischen Aufreinigungsverfahren können Nukleinsäuren sequenzspezifisch aus einem Gemisch isoliert werden. Dieses Verfahren erschien für diese Anforderungen als besonders geeignet: durch Verwendung einer 5 S-RNA-spezifischen Sonde sollten im vorliegenden Fall quervernetzte Komplexe (und freie 5 S-RNA) aus dem Gemisch aufgereinigt werden. Neben freiem PSTVd werden auch PSTVd-Moleküle, die zwar mit 5 S-RNA wechselwirken, aber nicht kovalent an diese gebunden sind, entfernt, da nicht quervernetzte Komplexe bei der Hybridisierung der (Vollängen-)Sonde dissoziieren. Führt man also dann eine *primer extension* mit PSTVd-spezifischen Primern durch, so dienen ausschließlich jene PSTVd-Moleküle als *template*, die mit der 5 S-RNA quervernetzt sind (siehe Abb. 4.12).

Zur Etablierung des Aufreinigungsverfahrens wurden die Ansätze, enthaltend Komplexe sowie freies PSTVd und 5 S-RNA, nach der Quervernetzung gegen biotinylierte *in vitro*-Transkripte hybridisiert, welche eine zur 5 S-RNA komplementäre Sequenz aufwiesen. Dann wurden Streptavidin-Partikel zugegeben: in diesem Fall Dynabeads®. Nach der Biotin-Streptavidin-vermittelten Bindung der Sonden an die Partikel und mehreren Waschschritten wurden die Nukleinsäuren eluiert (siehe Abschnitt 3.1.7) und als *templa-*

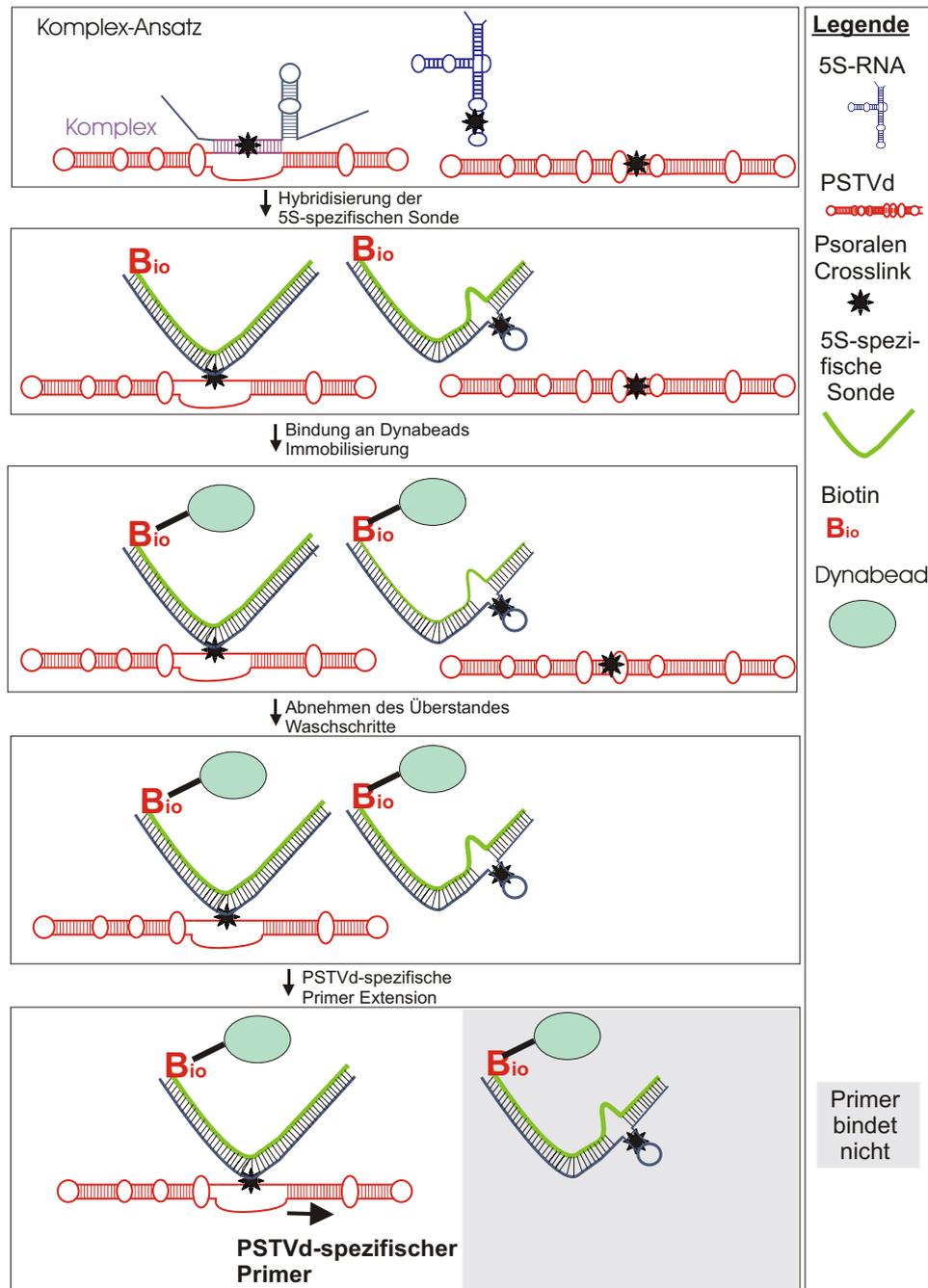


Abbildung 4.12: Schematische Darstellung der Aufreinigung der Komplexe vor einer *primer extension*-Analyse. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

te einer PSTVd-spezifischen *primer extension*-Reaktion eingesetzt. Liefert diese Reaktion Produkte, so kann dies als Nachweis gelten, dass Komplexe aufgereinigt wurden. Mehrere Experimente dieser Art wurden durchgeführt. Dabei lieferte die *primer extension*-Reaktion in manchen Fällen Produkte, oftmals aber auch nicht. In Abb. 4.13 ist exemplarisch eine solche *primer extension*-Analyse gezeigt. In den Spuren 4 und 7 des

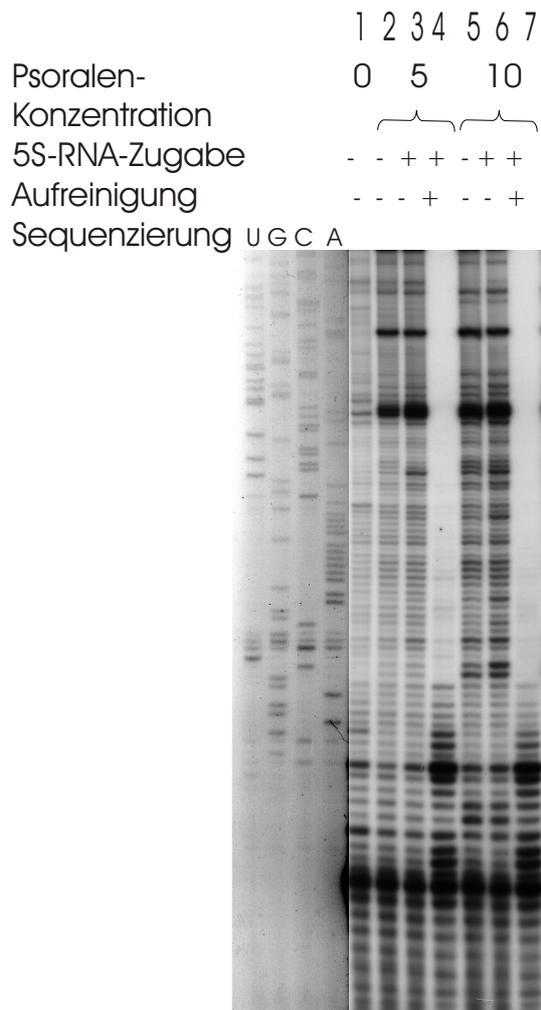


Abbildung 4.13: Nachweis von Komplexen mittels *primer extension* nach der Aufreinigung und Elution von den Partikeln. Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7 M Urea, 1 × TBE, 55 °C, 100 W, Autoradiographie. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer: 40 min; Psoralen-Konzentration: 12,5 μM. Verwendeter Primer: AF7. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Spuren 1, 2 und 5: Referenz-Ansätze mit reinem PSTVd

Spuren 3 und 6: Komplex-Ansätze mit PSTVd und 5 S-RNA (Ausgangsmaterial der Aufreinigung)

Spuren 4 und 7: Eluate der Dynabead®-Aufreinigung

Sequenziergels wurden die Produkte einer *primer extension*-Reaktion mit dem Eluat einer 5 S-RNA-spezifischen Aufreinigung als *template* aufgetragen. Im Gegensatz zu der Referenz mit reinem PSTVd (Abb. 4.13 Spuren 1, 2 und 5) und dem Ausgangsmaterial der Aufreinigung (siehe Abb. 4.13 Spuren 3 und 6) wurden in dieser Reaktion kaum Produkte gebildet. Offenbar ging die RNA während der Aufreinigung verloren oder wurde degradiert. Bei welchem Schritt der Aufreinigung dies passiert blieb unklar.

Zur Lösung des Problems wurde versucht, auf den Elutionsschritt zu verzichten, d.h. noch an die Dynabeads® gebundene Komplexe als *template* der *primer extension* einzusetzen. Bei entsprechenden Vorversuchen wurden neben Dynabeads® auch Microbeads® eingesetzt. Diese ebenfalls paramagnetischen Streptavidin-Partikel sind wesentlich kleiner als die Dynabeads® (vgl. Abschnitt 3.1.7).

Es wurden wiederum quervernetzte Komplexe mit 5 S-RNA-spezifischen Sonden hybridisiert. Jeweils ein Aliquot des Ansatzes wurde mit Microbeads® und eines mit Dyna-

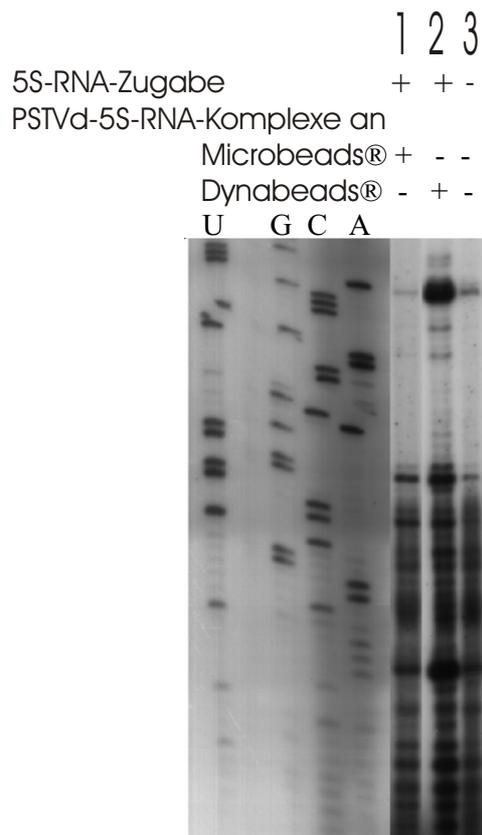


Abbildung 4.14: Nachweis von Komplexen mittels *primer extension* nach der Aufreinigung, gebunden an Microbeads® bzw. Dynabeads®. Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7 M Urea, 1× TBE, 55°C, 100 W Autoradiographie. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer: 40 min; Psoralen-Konzentration: 12,5 µM. Verwendeter Primer: RGV2. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Spur 1: Komplexe an Microbeads®

Spur 2: Komplexe an Dynabeads®

Spur 3: Referenz-Ansatz mit reinem PSTVd

beads® aufgereinigt. Die Partikel mit der daran gebundenen RNA wurden nun direkt als *template* einer PSTVd-spezifischen *primer extension*-Reaktion eingesetzt. Liefert eine solche Reaktion Produkte, so wäre gezeigt, dass eine *primer extension* von an die Partikel gebundenen Komplexen grundsätzlich möglich ist. Das bisher verwendete Protokoll der *primer extension* schloss aber zwei Ethanol-Fällungen ein (siehe Abschnitt 3.4.1). Laut Herstellerangaben bleiben die paramagnetischen Partikel bei einer Ethanol-Fällung nicht intakt. Es war zu befürchten, dass dann die gebundene RNA schlechter zugänglich für die Reverse Transkriptase wäre. Daher wurde die *primer extension*-Analyse ohne Fällungsschritte durchgeführt (siehe Abschnitt 3.4.1). Die Dynabeads® wurden aus dem entsprechenden Ansatz nach thermischer Denaturierung in 100%igem Formamid-Auftragspuffer entfernt und der Überstand in Spur 2 des in Abb. 4.14 gezeigten Sequenziergels aufgetragen. Eine Entfernung der Microbeads® war nicht möglich, daher wurde in diesem Fall der gesamte Ansatz, der die Microbeads® und neu entstandene DNA enthält, auf das Sequenziergel aufgetragen (Abb. 4.14 Spur 1). In beiden Spuren des Gels sind Produkte der *primer extension*-Reaktion zu erkennen. Es waren offenbar Komplexe an die Partikel gebunden. Trotz des Nachweises von Komplexen ist das Ergebnis insge-

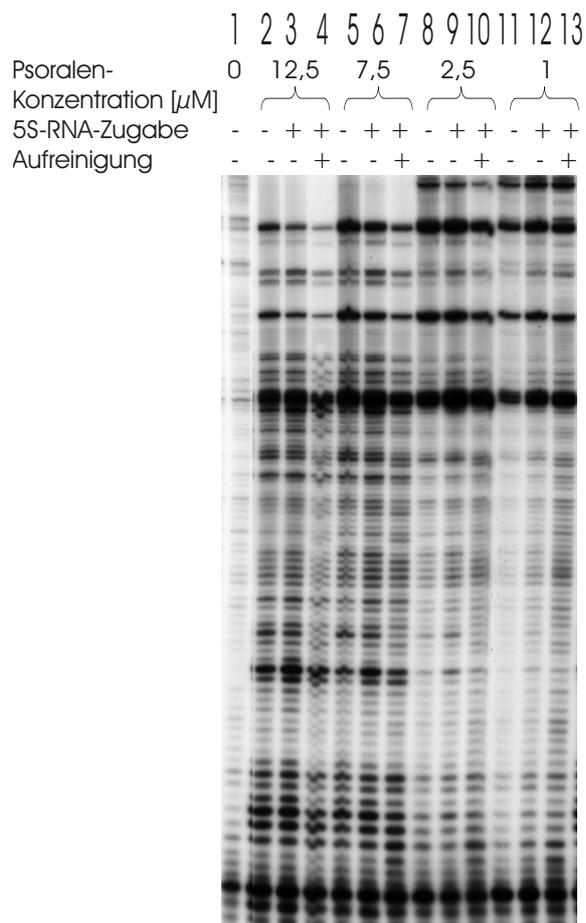


Abbildung 4.15: Nachweis von Komplexen mittels *primer extension* nach der Aufreinigung, gebunden an Dynabeads®. Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7M Urea, $1 \times$ TBE, 55°C , 100 W, Autoradiographie. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer: 40 min, die Psoralen-Konzentration ist oberhalb der Spur angegeben. Verwendeter Primer: AF7. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text. Spuren: 1, 2, 5, 8 und 11: Referenz-Ansätze mit reinem PSTVd
Spuren: 3, 6, 9 und 12: Komplex-Ansätze mit PSTVd und 5S-RNA (Ausgangsmaterial der Aufreinigung)
Spuren: 4, 7, 10 und 13: Komplexe an Dynabeads®

samt nicht zufriedenstellend, denn die Banden sind unscharf und es wurden lediglich sehr kurze Produkte bei der *primer extension*-Reaktion gebildet. Möglicherweise sind die Salz-Bedingungen aufgrund der fehlenden Fällungsschritte in der *primer extension*-Reaktion und auch der Gelelektrophorese nicht optimal. Da die Proben in einem größeren Volumen auf das Gel aufgetragen werden mussten, sind nicht alle Moleküle gleichzeitig eingelaufen. Dies könnte der Grund für das Verwischen der Banden sein.

Um die Fällungsschritte zu ersetzen, wurden daher die Dynabeads® sowohl nach der Hybridisierung des Primers und nach der *primer extension*-Reaktion immobilisiert. Nach der *primer extension* lagen Produkte an die Partikel gebunden und im Überstand vor. Daher wurde der Überstand gefällt und danach mit der Fraktion der Partikel wieder vereinigt. Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden die Dynabeads® durch Denaturierung und anschließende Immobilisierung aus den Ansätzen entfernt (siehe Abschnitt 3.4.1). Das Ergebnis einer auf diese Weise durchgeführten *primer extension* an Dynabeads® ist in Abb. 4.15 dargestellt. Das Auftreten von Produktbanden in den Spu-

ren 4, 7, 10 und 13 zeigt, dass sich Komplexe an den Dynabeads® befunden haben. Die *primer extension* an den Partikeln verläuft auf diese Weise optimal.

4.2.5 Identifizierung von Kontaktstellen mittels PSTVd-spezifischer *primer extension* nach Aufreinigung

Nach der Optimierung des Verfahrens konnte nun mit verschiedenen Primern die gesamte PSTVd-RNA auf Quervernetzungen zur 5S-RNA hin untersucht werden. Als *template* der *primer extension*-Reaktion wurden stets eingesetzt: 1) reines PSTVd ohne Quervernetzung, 2) reines PSTVd mit Quervernetzung als Referenz, 3) ein nicht aufgereinigter Komplex-Ansatz, der neben Komplexen freies PSTVd und freie 5S-RNA enthielt (Ausgangsmaterial der Aufreinigung) und 4) Komplexe, die zuvor einer 5S-RNA-spezifischen Dynabead®-Aufreinigung unterzogen wurden. Alle *primer extension*-Produkte wurden mittels denaturierender Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Identifizierung von Kontaktstellen wurde das Abbruchmuster der aufgereinigten Komplexe mit jenem des quervernetzten PSTVd als Referenz verglichen. Durch den Einsatz verschiedener Primer konnten *mehrere* Abweichungen nachgewiesen werden.

Wie in Abschnitt 4.2.3 angegeben, ist ein Abbruchsignal, das in der *primer extension* der Komplexe gegenüber der Referenz verstärkt ist, auf eine Quervernetzung zwischen PSTVd und 5S-RNA zurückzuführen. Es zeigte sich, dass diese Interpretation nicht in jedem Fall zulässig ist. Gäbe es nur eine einzige Abweichung, so wäre diese sehr wahrscheinlich auf die Quervernetzung zur 5S-RNA zurückzuführen, da mindestens *eine* Quervernetzung mit der 5S-RNA Voraussetzung für eine Aufreinigung eines PSTVd-Moleküls ist (siehe Abschnitt 4.2.4). Da jedoch nicht nur eine, sondern mehrere Abweichungen identifiziert wurden, kann nicht jedes verstärkte Abbruchsignal als Quervernetzungspunkt zwischen PSTVd und 5S-RNA interpretiert werden. Ein solches Signal zeigt in diesem Fall nur, dass das PSTVd im Komplex an der entsprechenden Position gegenüber dem reinen PSTVd *verändert* ist. Diese „Veränderung“ kann die gesuchte Quervernetzung zur 5S-RNA sein, aber auch als Folge einer veränderten Struktur des PSTVd im Komplex mit der 5S-RNA auftreten. Eine veränderte Struktur kann wiederum auf zweierlei Weise ein verändertes Abbruchmuster der *primer extension*-Reaktion bewirken. Einmal können sich innerhalb des Komplexes strukturelle Merkmale wie Loops, die einen bevorzugten

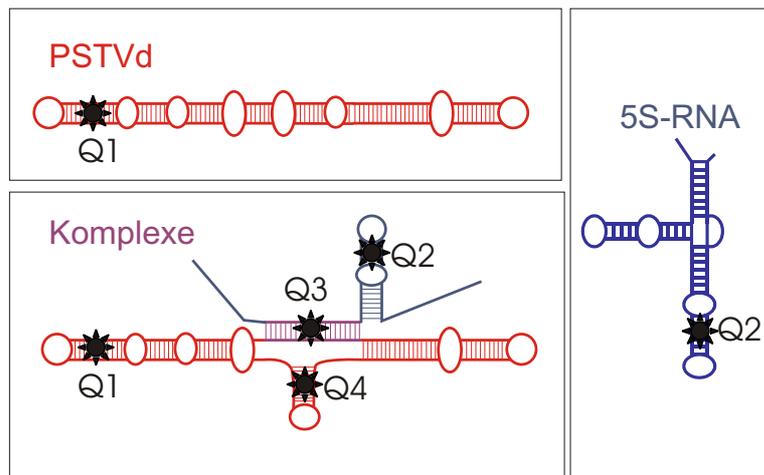


Abbildung 4.16: Schematische Darstellung zur Interpretation von *primer extension*-Abbruchsignalen. Folgende Quervernetzungen sind in diesem Fall entstanden:

Q1: intramolekulare Quervernetzung von PSTVd

Q2: intramolekulare Quervernetzung von 5 S-RNA

Q3: intermolekulare Quervernetzung zwischen PSTVd und 5 S-RNA

Q4: intramolekulare Quervernetzung von PSTVd aufgrund einer Strukturänderung bei der Komplexbildung.

Die Quervernetzung Q3 und Q4 werden in der Referenzprobe mit reinem PSTVd nicht gebildet. In einer *primer extension* der Komplexe mit einem PSTVd-spezifischen Primer treten in diesem Fall an beiden Positionen Abbruchsignale auf, die in der Referenz mit reinem PSTVd fehlen. Nur die Quervernetzung Q3 stellt aber die gesuchte Quervernetzung zur 5S-RNA dar. Die Quervernetzung Q1 tritt in der *primer extension* von Komplexen und Referenz auf und kann demnach auf eine intramolekulare Quervernetzung von PSTVd zurückgeführt werden. Die Quervernetzung Q2 tritt in einer PSTVd-spezifischen *primer extension* nicht auf.

Abbruch der Reaktion der Reversen Transkriptase bewirken, an einer anderen Position befinden als in reinen PSTVd-Komplexen. Andererseits könnten in einer veränderten Struktur auch intramolekulare Quervernetzungen von PSTVd an einer anderen Position als in reinem PSTVd gebildet werden. Welcher Art die „Veränderung“ ist, kann aufgrund des Vergleichs mit den Referenzproben nicht entschieden werden (siehe Abb. 4.16). Struktur- und Crosslink-Abbrüche unterscheiden sich aber prinzipiell dadurch, dass an einem Crosslink die Reaktion *immer* abbricht, an einem strukturellen Merkmal nur mit einer höheren Wahrscheinlichkeit als an einer anderen Position, so dass Struktur-Abbrüche in der Regel relativ schwach sind. Starke Abbruchsignale sind daher mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Quervernetzungen zurückzuführen.

Die nachgewiesenen Abweichungen waren nicht alle von gleicher Intensität. Weiterhin ist an einem Teil der entsprechenden Positionen aufgrund der Sequenz keine Quervernetzung möglich. Im Folgenden werden daher die einzelnen Abweichungen genau beschrieben

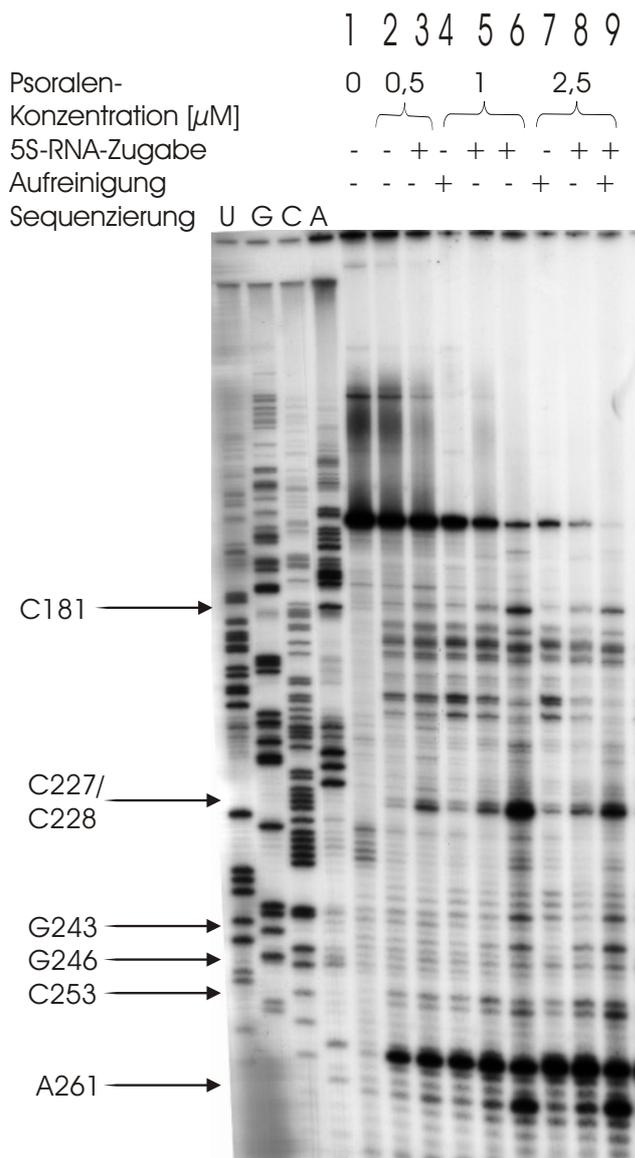


Abbildung 4.17: Identifizierung von Kontaktstellen zwischen 5S-RNA und PSTVd im Bereich der Variablen Region mittels *primer extension* an aufgereinigten Komplexen. Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7M Urea, 1 \times TBE, 55 $^{\circ}$ C, 100 W, Autoradiographie. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer: 40 min, die Psoralen-Konzentration ist oberhalb der Spuren angegeben. Verwendeter Primer: XC3. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Spuren 1, 2, 4 und 7: Referenz-Ansätze mit reinem PSTVd

Spuren 3, 5 und 8: Komplex-Ansätze mit PSTVd und 5S-RNA (Ausgangsmaterial der Aufreinigung)

Spuren 4 und 9: Komplexe an Dynabeads $^{\circledR}$

und schließlich in verschiedene Kategorien eingeteilt, um die Bedeutung des entsprechenden Nukleotids bei der Komplexbildung zwischen PSTVd und 5S-RNA besser einschätzen zu können.

Variable Region

Zur Identifizierung von „Veränderungen“ im Bereich der unteren Variablen Region und eines Teils der unteren CCR (etwa U180 bis A261) wurde der Primer XC3 verwendet, der innerhalb der unteren CCR an PSTVd bindet. Die *primer extension* des nicht quervernetztem PSTVd zeigt wenige, schwache Strukturabbrüche. Das Abbruchsignal an Position 227/228, das bereits in der *primer extension* der nicht aufgereinigten Komplex-Ansätze nachweisbar war (siehe Abschnitt 4.2.3) ist nach der Aufreinigung der Komplexe nochmals

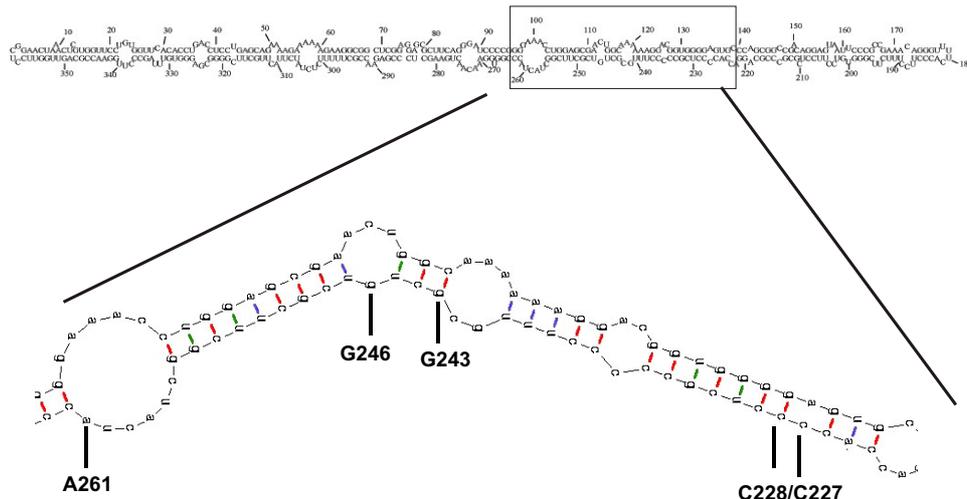


Abbildung 4.18: Lage der Komplex-spezifischen *primer extension*-Abbruchsignale im Bereich der Zentral Konservierten bzw. der Variablen Region. Die Strukturvorhersage wurde mit Hilfe des Programms *mfold2.3* durchgeführt (Zucker, 2003; Walter *et al.*, 1994). Es wurde eine Temperatur von 30 °C eingestellt. Die Positionen, an denen ausschließlich die Komplexe, nicht aber reines PSTVd, quervernetzt sind, sind gekennzeichnet.

deutlich verstärkt (Abb. 4.17 Spur 9). Eine weitere deutliche Abweichung im Abbruchmuster der Komplexe und reinem PSTVd befindet sich an Position 261, mehrere leichte Abweichungen sind an den Positionen 243, 246 und 253/254 zu beobachten. Weiterhin sind Abweichungen bei längeren Laufstrecken um C181 zu beobachten. Da diese außerhalb des optimalen Auftrennungsbereichs des Sequenziergels liegen, wurden sie mit dem Primer PS15 reproduziert (s.u.). Alle mit diesem Primer nachgewiesenen Abweichungen sind in Abb. 4.18 zusammengefasst. An mehreren Positionen befinden sich Nucleotide, die entweder selbst aufgrund der umgebenden Sequenz quervernetzbar sind (Position 253) oder einem quervernetzbaren Nucleotid in 5'-Richtung benachbart sind (Positionen 261, 243 und 246). An den Nucleotiden C227/C228 ist dagegen aufgrund der umgebenden Sequenz dagegen keine Quervernetzung möglich (siehe Abb. 4.20). An Position 226 befindet sich aber ein prinzipiell quervernetzbares Cytosin. Offenbar bricht die Reaktion der Reversen Transkriptase aus sterischen Gründen hier sowohl *ein* Nucleotid, als auch bereits *zwei* Nucleotide vor der Quervernetzung ab.

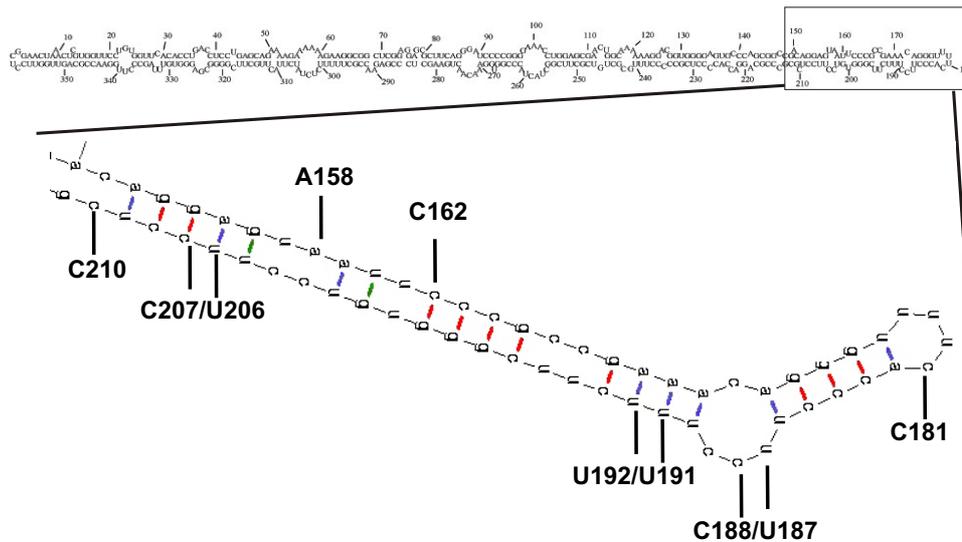


Abbildung 4.21: Lage der Komplex-spezifischen *primer extension*-Abbruchsignale im Bereich des Rechten Terminus. Die Strukturvorhersage erfolgte mit Hilfe des Programms *mfold2.3*. Es wurde eine Temperatur von 30 °C eingestellt. Die Positionen, an denen mittels *primer extension* Abweichungen der aufgereinigten Komplexe gegenüber reinem PSTVd aufweisen, sind gekennzeichnet.

riablen Region bindet (siehe Abb. 4.5). Das *primer extension*-Abbruchmuster von PSTVd ohne Quervernetzung zeigt, dass wiederum wenige, relativ schwache Strukturabbrüche stattfinden (Spur 7). Ein deutliches Abbruchsignal ist dagegen in Spuren 3 und 6 an Position C181 zu erkennen, in denen *primer extension*-Produkte der Komplexe aufgetragen wurden. Dieses Signal fehlt in Referenz mit reinem PSTVd und ist auch in der *primer extension* des Ausgangsmaterials der Aufreinigung (Spuren 15 und 18) nicht verstärkt; dort ist es offenbar vor dem Hintergrund an homo- bzw. intramolekularen Crosslinks nicht nachweisbar. Durch die Aufreinigung werden Moleküle, die diese Quervernetzung tragen, angereichert und der Hintergrund von nicht mit 5S-RNA quervernetztem PSTVd entfernt, so dass ein Nachweis dieses Abbruchsignals möglich wird. Weitere Abweichungen sind an den Positionen 187/188 und 191/192 zu beobachten. In der Referenz sind hier doppelte Abbruchsignale vorhanden, die in der *primer extension* der Komplexe folgendermaßen verändert sind: von dem doppelten Abbruchsignal an Position 187/188 wird in dem Ansatz mit Komplexen (Spuren 16 und 19) nur das Signal an Nukleotid 188 verstärkt. An Position 191/192 wird nur das Signal an Nukleotid 192 verstärkt und es kommt ein Abbruchsignal an Position 193 hinzu. An Position 158 und 162 treten in einer *primer extension*-Reaktion der Komplexe sehr schwache Abbruchsignale auf, die in der Referenz

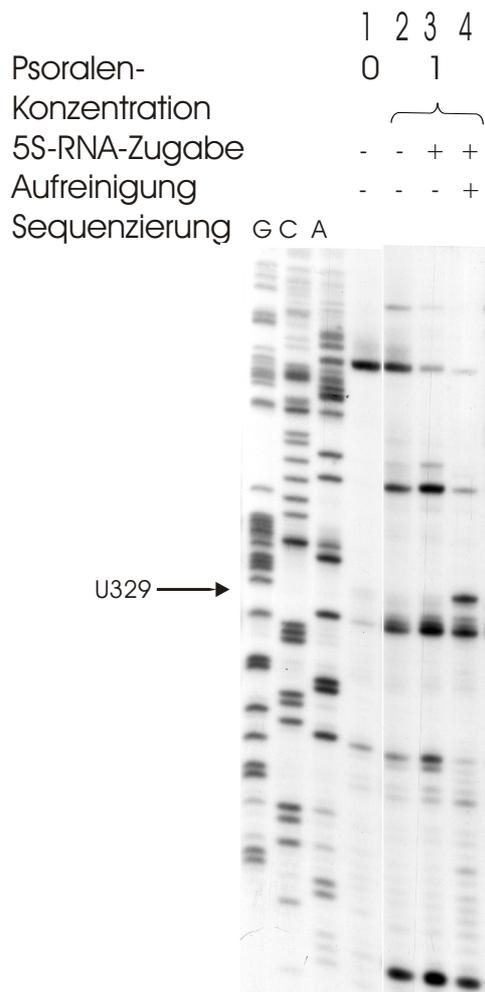


Abbildung 4.22: Identifizierung von Kontaktstellen zwischen 5S-RNA und PSTVd im Bereich der unteren VM-Region mittels *primer extension* an aufgereinigten Komplexen. Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7M Urea, 1× TBE, 55 °C, 100 W, Autoradiographie. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer: 40 min, Psoralen-Konzentration 1 μM. Verwendeter Primer: RGV2. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Spuren 1 und 2: Referenz-Ansätze mit reinem PSTVd

Spur 3: Komplex-Ansatz mit PSTVd und 5S-RNA (Ausgangsmaterial der Aufreinigung)

Spur 4: Komplexe an Dynabeads®

fehlen, an Position 206/207 und 210 erfolgt dagegen in der Referenz mit reinem PSTVd ein Abbruch, der in der *primer extension* der Komplexe fehlt.

Die Position aller in diesem Experiment ermittelten Abweichungen im Bereich des Rechten Terminus ist in Abb. 4.21 zu sehen. An zwei Positionen befinden sich Nukleotide, die aufgrund der Sequenz quervernetzbar sind (Position 181) bzw. einem quervernetzbaaren Nukleotid benachbart sind (Position 158). Zwischen den Nukleotiden 183 und 196 besteht die Sequenz von PSTVd ausschließlich aus Pyrimidinen (siehe Abb. 4.21). Im Bereich der Abbruchsignale an den Positionen 187/188 und 191/192/193 ist daher keine Watson-Crick-Helix möglich, innerhalb der sich zwei Pyrimidine diagonal gegenüber stehen.

Virulenz modulierende Region

Die untere Virulenz modulierende Region konnte mit Hilfe des Primers RGV2, der in der oberen VM-Region an PSTVd bindet, auf „Veränderungen“ hin untersucht werden.

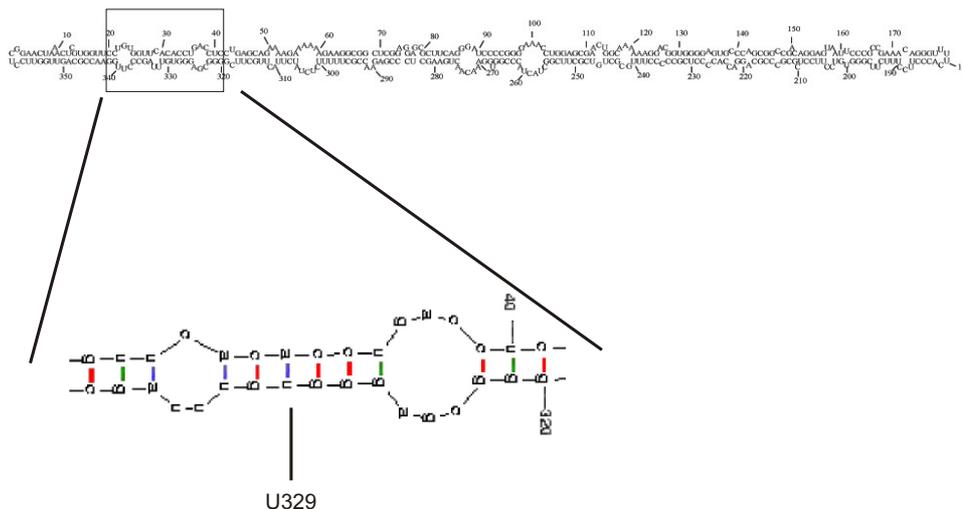


Abbildung 4.23: Lage der Komplex-spezifischen *primer extension*-Abbruchsignale im Bereich der unteren Virulenz Modulierenden Region. Die Strukturvorhersage wurde mit Hilfe des Programms *mfold2.3* durchgeführt. Es wurde eine Temperatur von 30 °C eingestellt. Die Positionen, an denen ausschließlich die Komplexe, nicht aber reines PSTVd, quervernetzt sind, sind gekennzeichnet.

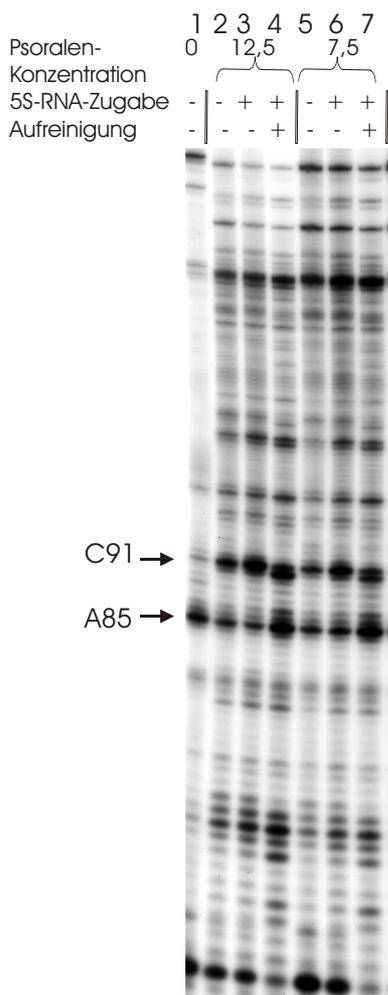


Abbildung 4.24: Identifizierung von Kontaktstellen zwischen 5 S-RNA und PSTVd im Bereich der oberen CCR mittels *primer extension* an aufgereinigten Komplexen. Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7 M Urea, 1 × TBE, 55 °C, 100 W, Autoradiographie. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer: 40 min, die Psoralen-Konzentration ist oberhalb der jeweiligen Spur angegeben. Verwendeter Primer: PS21b. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Spuren 1, 2 und 5: Referenz-Ansätze mit reinem PSTVd

Spuren 3 und 6: Komplex-Ansatz mit PSTVd und 5 S-RNA (Ausgangsmaterial der Aufreinigung)

Spuren 4 und 7: Komplexe an Dynabeads®

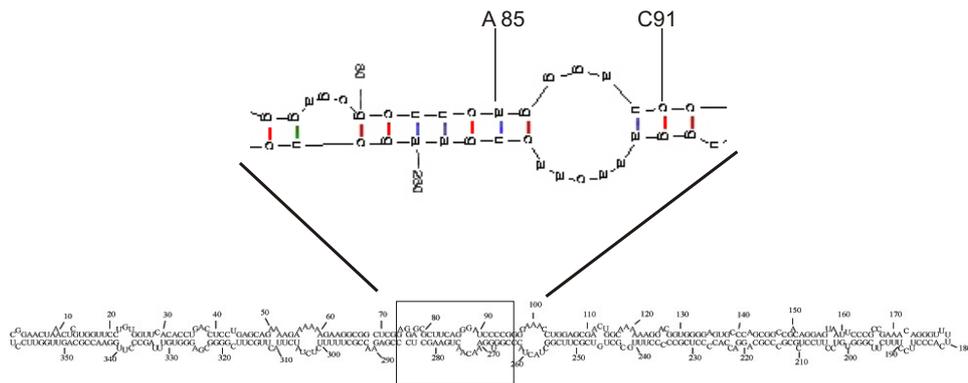


Abbildung 4.25: Lage der Komplex-spezifischen *primer extension*-Abbruchsignale im Bereich der oberen CCR. Die Strukturvorhersage wurde mit Hilfe des Programms *mfold2.3* durchgeführt. Es wurde eine Temperatur von 30 °C eingestellt. Die Positionen, an denen ausschließlich die Komplexe, nicht aber reines PSTVd, quervernetzt sind, sind gekennzeichnet.

An Position 329 tritt in der *primer extension* der Komplexe ein Abbruchsignal auf, das in der Referenz fehlt (siehe Abb. 4.22: vgl. die Spuren 11 und 13). Bei diesem Nucleotid handelt es sich um ein aufgrund der umgebenden Sequenz quervernetzbares Uracil, das sich innerhalb der unteren VM-Region von PSTVd befindet (siehe Abb. 4.23).

Zentral Konservierte Region

„Veränderungen“ im Bereich der oberen CCR konnten mittels *primer extension* mit dem Primer PS21b, der innerhalb der oberen Variablen Region an PSTVd bindet, bestimmt werden. In den Spuren 4 und 6 des in Abb. 4.24 gezeigten Sequenziergels wurden die Produkte der *primer extension*-Reaktion mit dem Primer PS21b an Komplexen aufgetragen. Die Abbruchsignale an Position C91 und A85 sind leicht gegenüber der Referenz (Abb. 4.24 Spuren 2 und 5) verstärkt. Eine Quervernetzung ist jeweils an benachbarten Nucleotiden (U90 und C84) grundsätzlich möglich (siehe Abb. 4.25).

In allen anderen Bereichen von PSTVd stimmte das Abbruchmuster der Komplexe mit der Referenz überein (Daten nicht gezeigt).

Reproduktion der Ergebnisse mit verschiedenen PSTVd-Transkripten

Für die bisherigen Untersuchungen wurde das PSTVd-*in vitro*-Transkript IVT1 verwendet, das an Position 147 beginnt und zusätzliche Nucleotide enthält (Abschnitt 2.2.3). Es ist nicht auszuschließen, dass die zusätzlichen Nucleotide einen Einfluss auf die Kom-

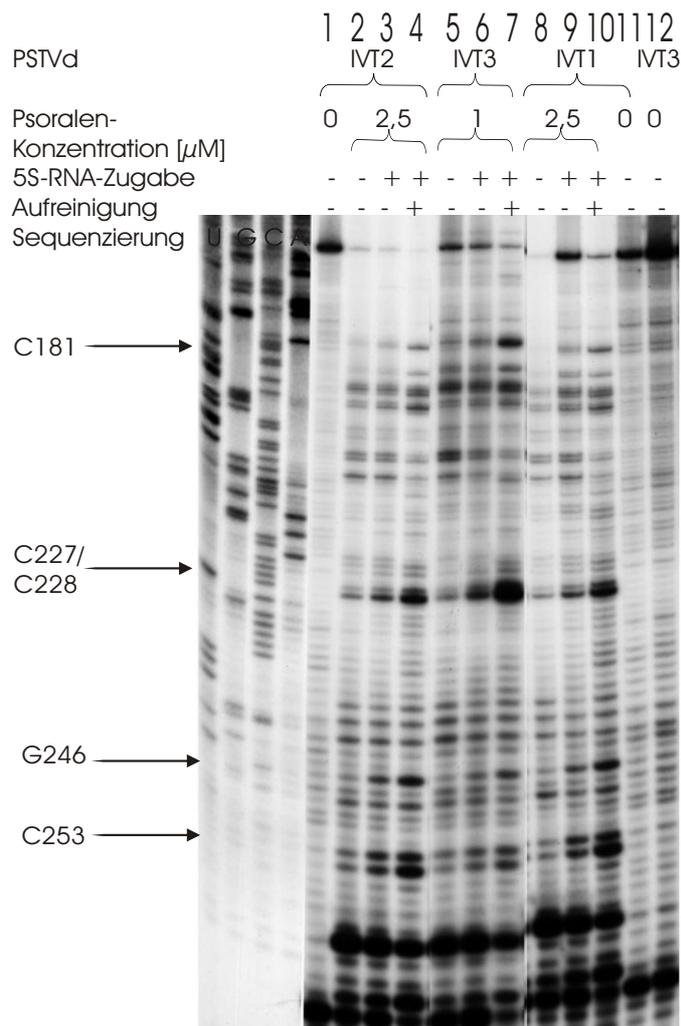


Abbildung 4.26: Reproduktion der Abbruchsignale im Bereich der Variablen Region bzw. des Rechten Terminus. Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7M Urea, 1 \times TBE, 55 $^{\circ}$ C, 100 W, Autoradiographie. Komplexbildung siehe Abschnitt 3.4.2. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer: 40 min, die Psoralen-Konzentration ist oberhalb der jeweiligen Spur angegeben. Verwendeter Primer: PS22. Transkripte siehe Abschnitt 2.2.3. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Spuren 1 und 2: Referenz-Ansätze mit reinem PSTVd (IVT 2)

Spur 3: Komplex-Ansatz mit PSTVd (IVT 2) und 5 S-RNA (Ausgangsmaterial der Aufreinigung)

Spur 4: Komplexe an Dynabeads[®] (PSTVd IVT 2)

Spuren 5, 6, 7 und 14: anstelle von PSTVd IVT 2 wurde IVT 3 verwendet
Spuren 8, 9, 10 und 15: anstelle von PSTVd IVT 2 wurde IVT 1 verwendet

plexbildung haben. Daher sollten die Ergebnisse an Komplexen aus 5 S-RNA und PSTVd exakter Länge reproduziert werden (IVT2). Die *in vitro*-Transkription dieses Transkripts beginnt an Position 145. Die *primer extension*-Analysen an Komplexen zwischen 5 S-RNA und dem Transkript IVT 2 lieferten aber das gleiche Ergebnis wie mit dem Transkript IVT 1 (Daten nicht gezeigt).

Weiterhin ist vorstellbar, dass auch der Beginn des Transkripts für die Komplexbildung eine Rolle spielt. Die Transkription von PSTVd IVT 1 bzw. 2 beginnt an Position 147 bzw. 145 und befindet sich demnach in enger Nachbarschaft zum Rechten Terminus und genau auf dem Gegenstrang der wechselwirkenden Nukleotide innerhalb der Variablen Region. In diesem Bereich wurden Abbruchsignale in der *primer extension* nachgewiesen, die als Folge einer Wechselwirkung von PSTVd und 5 S-RNA auftreten. Es ist vorstellbar, dass sich eine Wechselwirkung mit PSTVd besser oder möglicherweise nur ausbildet, wenn an dieser Position die Sequenz unterbrochen ist. Daher wurden auch Komplexe zwi-

Tabelle 4.2: Komplex-spezifische *primer extension*-Abbruchsignale auf PSTVd.

Position	Signalstärke	Quervernetzung möglich	PSTVd-Transkripte	Primer
C181	++	+	IVT 1, 2, 3	PS15, PS22, XC3
C227/C228	++	+	IVT 1, 2, 3	XC3, PS22
A261	++	+	IVT 1, 2	XC3, XC2
C91	+	+	IVT 1, 2	PS21b
A158	+	+	IVT 1, 2, 3	PS15
C162	+	–	IVT 1, 2, 3	PS15
C188	+	–	IVT 1, 2, 3	PS15
C193	+	–	IVT 1, 2, 3	PS15
G243	+	+	IVT 1, 2	XC3
G246	+	+	IVT 1, 2, 3	XC3, PS22
U252/C253	+	+	IVT 1, 2, 3	XC3, PS22
U329	+	+	IVT 1, 2, 3	RGV2, PS14
A85	+/-	+	IVT 1, 2	PS21b

schen 5S-RNA und dem PSTVd-*in vitro*-Transkript IVT 3, das an Position 282 beginnt, mittels *primer extension* untersucht. Anstelle des Primers XC3 wurde der Primer PS22 verwendet, da der Beginn dieses Transkripts innerhalb der Bindestelle des Primers XC3 liegt. Die Bindestelle von PS22 befindet sich gegenüber XC3 wenige Nukleotide *upstream*. Alle Abbruchsignale, außer jene an Position 261 und G243, konnten reproduziert werden. Das Nukleotid 261 ist für eine *primer extension* innerhalb der PSTVd-IVT 3-5S-RNA-Komplexe nicht zugänglich, da es nur 21 Nukleotide vom 3'-Ende des Transkripts liegt. Das Nukleotid G243 war in der *primer extension* der Komplexe mit dem Primer PS22 nicht verstärkt (siehe Abb. 4.26 Spuren 4, 7, 10 und 13). Die Abweichung an Position G243 war allerdings auch bei Verwendung des Primers XC3 sehr leicht. Insgesamt stehen die Daten also in gutem Einklang miteinander.

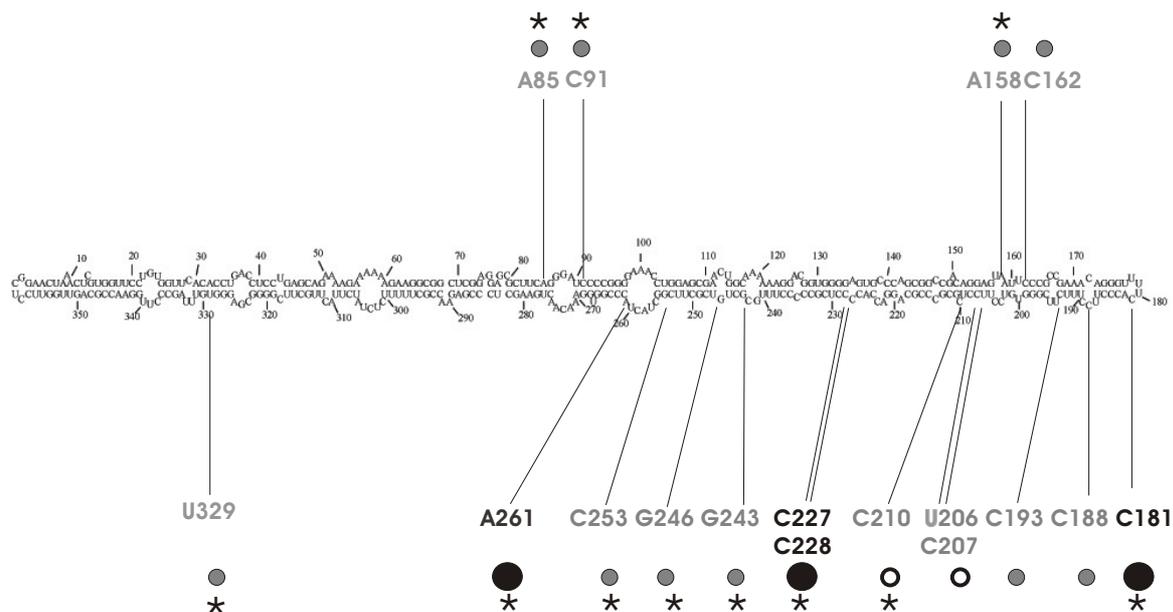


Abbildung 4.27: Lage der Komplex-spezifischen *primer extension*-Abbruchsignale auf PSTVd. Gekennzeichnet sind Positionen an denen die *primer extension*-Abbrüche der Komplexe gegenüber der Referenz 1) deutlich verstärkt (schwarzer Kreis), 2) leicht verstärkt (grauer Kreis) und 3) abgeschwächt (leerer Kreis) sind. Jene Positionen, an denen das entsprechende Nukleotid oder ein in 5'-Richtung benachbartes Nukleotid quervernetzbar ist, sind mit einem Sternchen markiert.

Zusammenfassung der Ergebnisse der *primer extension*-Analyse

Die innerhalb der Komplexe veränderten Nukleotide sind in der in Abb. 4.27 dargestellten Sekundärstruktur von PSTVd gekennzeichnet und können in folgende Kategorien eingeteilt werden:

1) Deutliche Abweichungen, die sich aufgrund der Sequenz an quervernetzbaaren Positionen befinden und deren Ursache demnach eine Quervernetzung zur 5S-RNA sein könnte: Positionen 181, 227/228, 261.

2) Schwache Abweichungen, die sich aufgrund der Sequenz an quervernetzbaaren Positionen befanden und deren Ursache eine Quervernetzung mit der 5S-RNA sein könnte: Positionen 85, 91, 158, 243, 246, 253/254 und 329.

3) Schwache Abweichungen, an denen keine Quervernetzung möglich ist und somit entweder auf ein strukturelles Merkmal oder ein Monoaddukt zurückzuführen sind: Positionen 162, 188 und 192.

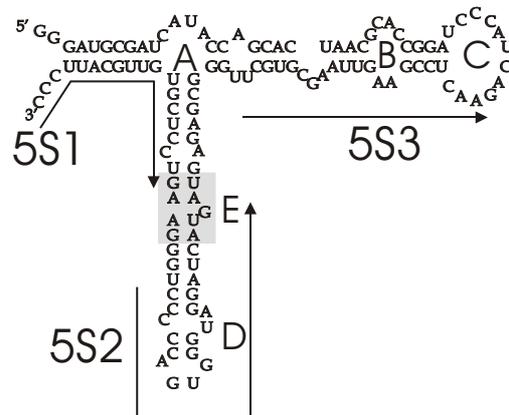


Abbildung 4.28: Lage der verwendeten Primer für die *primer extension* auf 5S-RNA.

4) Signale, die in der *primer extension* der Komplexe gegenüber der Referenz abgeschwächt sind und daher eindeutig auf eine veränderte Struktur zurückzuführen sind: Positionen 206/207 und 210

In Tab. 4.2 sind die Positionen und Eigenschaften aller Abweichungen erfasst. Weiterhin ist angegeben, welche Abweichungen mit einem zweiten Primer verifiziert wurden. Die Daten grenzen die Wechselwirkungsposition von PSTVd und 5S-RNA ein, erlauben aber keine eindeutige Identifizierung der Quervernetzung zwischen beiden Molekülen. Um die Bindeposition von PSTVd und 5S-RNA genauer zu bestimmen, waren daher ergänzende Experimente nötig.

4.2.6 Identifizierung von Kontaktstellen mittels 5S-RNA-spezifischer *primer extension* nach Aufreinigung

Eine Eigenschaft der gesuchten Quervernetzung zwischen PSTVd und 5S-RNA ist, dass sowohl ein Nukleotid von PSTVd als auch von 5S-RNA beteiligt sein muss. Um die Position dieses Nukleotids auf 5S-RNA-Seite zu bestimmen, mussten die Ansätze mit Komplexen einer PSTVd-spezifischen Aufreinigung unterzogen und in der anschließenden *primer extension*-Reaktion 5S-RNA-spezifische Primer verwendet werden. Als Primer wurde ein Oligonukleotid verwendet, das genau am 3'-Ende der 5S-RNA bindet (siehe Abb. 4.28). So konnten auf der 5S-RNA mehrere Abweichungen im Abbruchmuster der Komplexe

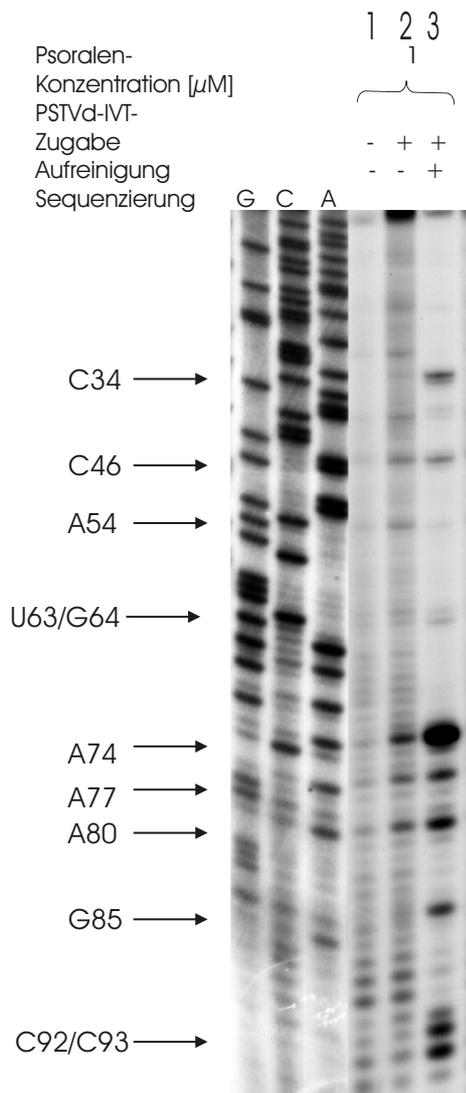


Abbildung 4.29: Identifizierung von Kontaktstellen mittels *primer extension* auf der 5 S-RNA nach Aufreinigung. Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7M Urea, 1 \times TBE, 55 $^{\circ}\text{C}$, 100 W, Autoradiographie. Komplexbildung siehe Abschnitt 3.4.2. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer: 40 min; Psoralen-Konzentration: 1 μM . Verwendeter Primer: 5S1. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text. Spuren 1 und 4: Referenz-Ansätze mit reiner 5 S-RNA

Spuren 2 und 5: Komplex-Ansätze mit 5 S-RNA und PSTVd (Ausgangsmaterial der Aufreinigung)

Spuren 3 und 6: Komplexe an Dynabeads®

und der Referenz, in diesem Fall reine 5 S-RNA, nachgewiesen werden. Diese werden im Folgenden beschrieben.

In Spur 3 des in Abb. 4.29 gezeigten Sequenziergels ist zu erkennen, dass die *primer extension*-Abbruchsignale der Komplexe an den Positionen 74, 85 und 92/93 deutlich und an den Positionen A77 und A80 leicht gegenüber der Referenz verstärkt sind. Auffällig ist, dass das gesamte Abbruchmuster nach Aufreinigung der PSTVd-5 S-RNA-Komplexe *upstream* des Nukleotids 74 sehr stark abgeschwächt ist (Abb. 4.29: Spuren 3, 5 und 8). Aufgrund dieses nahezu vollständigen Abbruchs sind jene Signale, die sich *upstream* von Nukleotid 74 befinden, nicht gut mit der Referenz vergleichbar. Trotz dieser insgesamt schwächeren Signalstärke sind die Abbrüche an den Positionen 46 und 33/34 bei den Komplexen leicht gegenüber der Referenz verstärkt, die Abbruchsignale an den Positionen 63/64 in Referenz- und Komplex-Ansätzen in etwa gleich und an Position 54 leicht

Tabelle 4.3: Komplex-spezifische *primer extension*-Abbruchsignale auf der 5 S-RNA.

Position	Signalstärke	Quervernetzung möglich	PSTVd-Transkripte	Primer
C92/C93	++	+	IVT 1, 3	5S1
G85	++	+	IVT 1, 3	5S1
A74	++	+	IVT 1, 3	5S1, 5S2
A80	+	+	IVT 1, 3	5S1
A77	+	+	IVT 1, 3	5S1
U63/G64	+	+	IVT 1, 3	5S1
A54	+	+	IVT 1, 3	5S1, 5S2
C46	+	+	IVT 1, 3	5S1, 5S2
U33/C34	+	+	IVT 1, 3	5S1, 5S2, 5S3

2) Schwache Abweichungen, deren Ursache eine Quervernetzung mit PSTVd sein könnte: an Position 77, 80, 63/64, 46 und 34.

Der nahezu vollständige Abbruch an Position 74 deutet darauf hin, dass der Großteil der 5 S-RNA im Bereich ihres 3'-Endes (zwischen Nukleotid 74 und 120) mit PSTVd quervernetzt ist. In Übereinstimmung dazu befinden sich innerhalb dieses Bereichs auch die größten Abweichungen im Abbruchmuster von Komplexen und Referenz. Der Bereich von Nukleotid 100 bis 120 am 3'-Ende der 5 S-RNA konnte nicht mittels *primer extension* auf Quervernetzungen hin untersucht werden, da er innerhalb der Bindestelle des Primers 5S1 liegt. In diesem Bereich könnten sich demnach auch Quervernetzungen zwischen 5 S-RNA und PSTVd befinden, die auf diesem Wege nicht erfasst wurden.

Sowohl auf der PSTVd- als auch auf der 5 S-RNA konnten mehrere Positionen identifiziert werden, an denen die Komplexe gegenüber den reinen Komponenten verändert sind. Innerhalb dieses veränderten Bereichs bestehen Kontakte zwischen 5 S-RNA und PSTVd statt. Es ist aber nicht möglich zu unterscheiden, welche der Abweichungen genau auf einer direkten Quervernetzung zwischen PSTVd und 5 S-RNA und welche auf intramolekulare Quervernetzungen aufgrund von Strukturänderungen bei der Komplexbildung zurückzuführen sind.

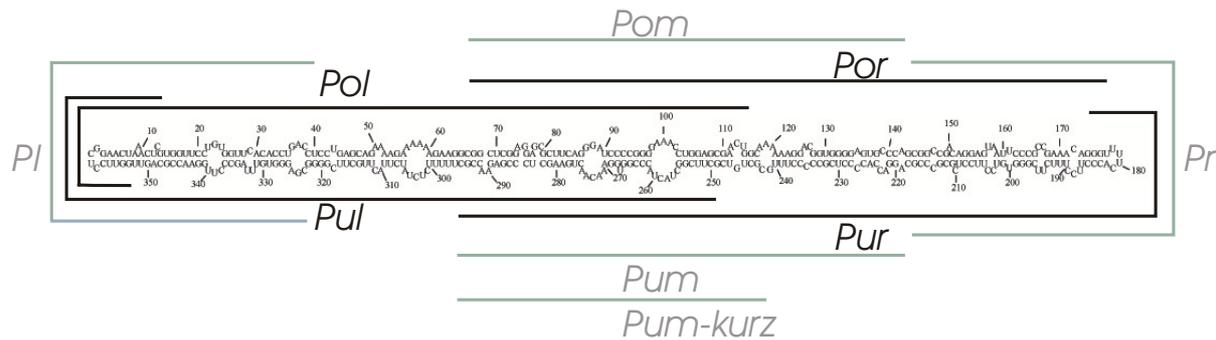


Abbildung 4.31: Darstellung der Sequenzbereiche von PSTVd, die von den verschiedenen PSTVd-Teiltranskripten repräsentiert werden.

4.3 Eingrenzung der Wechselwirkungsposition durch den Einsatz von verkürzten PSTVd-Transkripten

Findet eine Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S-RNA an einer bestimmten Position statt, so kann dies Strukturänderungen innerhalb des gesamten „Rest-Moleküls“ nach sich ziehen. Eine solche Strukturänderung ist zwar eine Folge der Komplexbildung, muss sich aber nicht in unmittelbarer Nähe der Bindestelle befinden. Verwendet man verkürzte PSTVd-Transkripte zur Komplexbildung, so verkleinert man diese möglicherweise interferierende Wirkung des „Rest-Moleküls“ von PSTVd. Die Position der direkten Wechselwirkung kann genauer eingegrenzt werden, indem geprüft wird, welche PSTVd-Teiltranskripte direkt mit der 5S-RNA wechselwirken können.

In Abb. 4.31 ist dargestellt, welchen Bereich von PSTVd die verwendeten PSTVd-Teiltranskripte repräsentieren. Die genaue Sequenz der Transkripte ist in Abschnitt 2.2.3 angegeben. Die Transkripte *Pol*, *Pul*, *Por* und *Pur* umfassen jeweils ein Drittel des PSTVd voller Länge und überschneiden sich in den Randbereichen. Durch diese vier Transkripte ist also schon das gesamte PSTVd abgedeckt. Um eine genauere Eingrenzung der Wechselwirkung zu ermöglichen, wurden aber weitere Transkripte verwendet: die Transkripte *Pum*, *Pom*, *Pr*, *Pl* und *Pum-kurz*. Um zu prüfen, welche der PSTVd-Transkripte mit 5S-RNA wechselwirken, wurden RNA-RNA-Gelshift-Analysen durchgeführt (siehe Abschnitte 3.4.2 und 4.1).

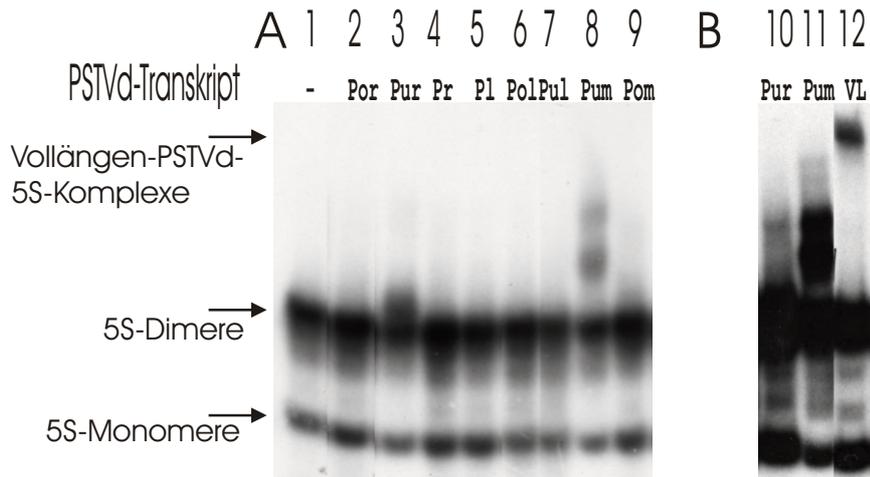


Abbildung 4.32: RNA-RNA-Gelshift-Analyse der verschiedenen PSTVd-Teiltranskripte und 5 S-RNA unter „Dimer-Bedingungen“. Native PAGE, 4,5 % PAA (43:1); $0,2 \times$ NaTAE; 10°C , 500 V, Autoradiographie. Komplexbildung siehe 3.4.2. Alle Spuren enthalten einen Anteil an ^{32}P -markierter 5 S-RNA. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

A) Spur 1: reine dimere 5 S-RNA als Referenz

Spur 2: Komplex-Ansatz mit *Por* und 5 S-RNA

Spur 3: Komplex-Ansatz mit *Pur* und 5 S-RNA

Spur 4: Komplex-Ansatz mit *Pr* und 5 S-RNA

Spur 5: Komplex-Ansatz mit *Pl* und 5 S-RNA

Spur 6: Komplex-Ansatz mit *Pol* und 5 S-RNA

Spur 7: Komplex-Ansatz mit *Pul* und 5 S-RNA

Spur 8: Komplex-Ansatz mit *Pum* und 5 S-RNA

Spur 9: Komplex-Ansatz mit *Pom* und 5 S-RNA

B) Spur 10: Komplex-Ansatz mit *Pur* und 5 S-RNA

Spur 11: Komplex-Ansatz mit *Pum* und 5 S-RNA

Spur 12: Komplex-Ansatz mit PSTVd-Volllänge und 5 S-RNA

4.3.1 RNA-RNA-Gelshift-Analysen

In getrennten Ansätzen wurden die verkürzten PSTVd-Transkripte mit 5 S-RNA versetzt. Als Referenz diente ein Ansatz, der reine 5 S-RNA enthielt. Die Konzentrations- und Salzbedingungen wurden zunächst in Anlehnung an die Experimente mit Vollängen-PSTVd gewählt (siehe Abschnitt 3.4.2). Nach thermischer Denaturierung bei 90°C und langsamer Abkühlung zur Bildung von Komplexen wurden Aliquots der Ansätze direkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Gelelektrophorese wurde unter nativen Bedingungen, bei 10°C und einer Salzkonzentration von 20 mM, durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt einen geringen Anteil an ^{32}P -markierter 5 S-RNA (siehe Abschnitt 3.1.4), der mittels Autoradiographie nachgewiesen wurde. Eine kovalente Quervernetzung war in diesem Fall nicht notwendig, da die Komplexe während der Gelelektrophorese stabil bleiben.

Abb. 4.32A zeigt eine Autoradiographie dieser nativen PAGE. In allen Spuren ist zu-
un-terst die Bande der monomeren 5 S-RNA und, deutlich verzögert, eine etwas stärkere
Bande, die 5 S-RNA-Dimere enthält, erkennbar. Unter diesen Bedingungen ist offen-
bar die Dimer-Bildung von 5 S-RNA bevorzugt, sie werden daher im Folgenden als
„Dimer-Bedingungen“ bezeichnet. In zwei der Spuren, in denen Ansätze von PSTVd-
Teiltranskripten und 5 S-RNA aufgetragen wurden, weicht das Bandenmuster von der
Referenz ab. In Spur 3 (Abb. 4.32) ist ein Ansatz mit dem Transkript *Pur* und 5 S-
RNA aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die 5 S-RNA-Dimer-Bande nach oben hin
verbreitert ist. Diese Schwärzung ist daher wahrscheinlich auf *Pur*-5 S-RNA-Komplexe
zurückzuführen. Deutlicher nachweisbar sind Komplexe aus 5 S-RNA und dem Transkript
Pum: in Spur 8 sind zwei verzögerte Signale zu sehen, die in der Referenz fehlen. Komplexe
zwischen 5 S-RNA und allen anderen PSTVd-Teiltranskripten waren nicht nachweisbar.
In Abb. 4.32B ist das Laufverhalten der Komplexe zwischen 5 S-RNA und *Pur* bzw. *Pum*
(Spuren 10 bzw. 11) im Vergleich zu Voll-längen-PSTVd-5 S-RNA-Komplexen (Spur 12)
gezeigt.

Komplexe zwischen 5 S-RNA und dem Transkript *Pur* weisen ein ähnliches Laufver-
halten auf wie 5 S-RNA-Dimere. In einem weiteren Experiment sollten daher die Bedin-
gungen bei der Komplexbildung so geändert werden, dass keine oder wenige 5 S-RNA-
Dimere entstehen, es sollten also „Monomer-Bedingungen“ eingestellt werden. Zu diesem
Zwecke wurde die RNA in deutlich geringerer Konzentration eingesetzt, die Salzbedin-
gungen und die Denaturierungstemperatur wurden beibehalten (siehe Abschnitt 3.4.2).
Abb. 4.33 zeigt eine Autoradiographie der nativen PAGE, in der diese Ansätze aufgetrennt
wurden. In Spur 2, die eine Referenzprobe reiner 5 S-RNA unter „Dimer-Bedingungen“
enthält, ist zu erkennen, dass in dem Ansatz der 5 S-RNA unter „Monomer-Bedingungen“
zwei Banden auftreten, die wahrscheinlich Monomere in zwei verschiedenen Konformatio-
nen enthalten; die Dimer-Bande fehlt aber wie erwartet. Wiederum sind in zwei Spuren mit
verkürzten Transkripten und 5 S-RNA Komplex-Banden zu erkennen. In Spur 10, in der
ein Komplex-Ansatz von 5 S-RNA und *Pur* aufgetragen wurde, ist ein verzögertes Signal
zu erkennen, das in der Referenz fehlt (Abb. 4.33 Spur 1) und demnach auf *Pur*-5 S-RNA-
Komplexe zurückzuführen ist. Diese Komplexe sind, wie erwartet, gegenüber 5 S-RNA-
Dimeren geringfügig verzögert. In Spur 11 wurde ein Komplex-Ansatz von 5 S-RNA und
Pum aufgetragen. Hier kommt gegenüber reiner 5 S-RNA ein Signal hinzu, das bezüglich

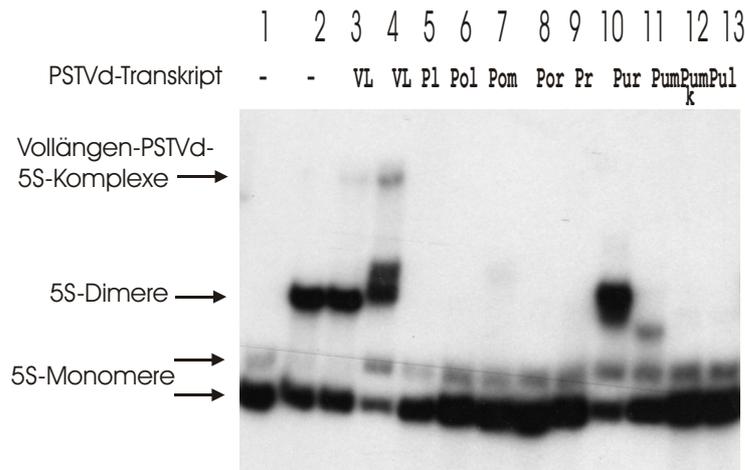


Abbildung 4.33: RNA-RNA-Gelshift-Analyse der verschiedenen PSTVd-Teiltranskripte und 5 S-RNA unter „Monomer-Bedingungen“. Native PAGE, 4,5% PAA (43:1); $0,2 \times$ NaTAE; 10°C , 500 V), Autoradiographie. Komplexbildung siehe Abschnitt 3.4.2. Alle Spuren enthalten einen Anteil an ^{32}P -markierter 5 S-RNA. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Spur 1: reine monomere 5 S-RNA als Referenz

Spur 2: reine dimere 5 S-RNA als Referenz

Spur 3: Vollängen-PSTVd-5 S-RNA-Komplexe (Dimer-Bedingungen)

Spur 4: Vollängen-PSTVd-5 S-RNA-Komplexe

Spur 5: Komplex-Ansatz mit *Pl* und 5 S-RNA

Spur 6: Komplex-Ansatz mit *Pol* und 5 S-RNA

Spur 7: Komplex-Ansatz mit *Pom* und 5 S-RNA

Spur 8: Komplex-Ansatz mit *Por* und 5 S-RNA

Spur 9: Komplex-Ansatz mit *Pr* und 5 S-RNA

Spur 10: Komplex-Ansatz mit *Pur* und 5 S-RNA

Spur 11: Komplex-Ansatz mit *Pum* und 5 S-RNA

Spur 12: Komplex-Ansatz mit *Pum-kurz* (abgekürzt mit *Pumk*) und 5 S-RNA

Spur 13: Komplex-Ansatz mit *Pul* und 5 S-RNA

der Laufstrecke zwischen 5 S-RNA-Monomeren und -Dimeren liegt, offenbar *Pum*-5 S-RNA-Komplexe. Die unter „Dimer-Bedingungen“ nachgewiesenen Komplexe zwischen 5 S-RNA und diesem Transkript waren dagegen deutlich gegenüber der 5 S-RNA-Dimer-Bande verzögert (siehe Abb. 4.32 Spur 8). Das unterschiedliche Laufverhalten zeigt, dass ein Unterschied zwischen den *Pum*-5 S-RNA-Komplexen unter „Monomer- und „Dimer-Bedingungen“ besteht. Dieser besteht wahrscheinlich darin, dass *Pum* unter „Monomer-Bedingungen“ an 5 S-RNA-Monomere und unter „Dimer-Bedingungen“ an Dimere bindet. Im Gegensatz dazu kann *Pur* offenbar nicht an 5 S-RNA-Dimere binden, denn *Pum*-5 S-RNA-Komplexe sind gegenüber *Pur*-5 S-RNA-Komplexen verzögert, obwohl das Transkript *Pum* kürzer ist als *Pur*. Prinzipiell könnte die Ursache dafür auch eine veränderte Struktur der *Pum*-5 S-RNA- gegenüber den *Pur*-5 S-RNA-Komplexen sein, denn unter

nativen Bedingungen werden die Nukleinsäuren nicht nur aufgrund ihrer Länge, sondern auch ihrer Struktur aufgetrennt. Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da *Pum* die gleiche Sequenz aufweist wie *Pur* und lediglich verkürzt ist. Das Laufverhalten der Vollängen-PSTVd-5 S-RNA-Komplexe stimmt, wie jenes der *Pur*-5 S-RNA-Komplexe, unter Mono- und Dimer-Bedingungen überein, was nahelegt, dass 5 S-RNA-Monomere an die PSTVd-Volllänge binden. Es ist hervorzuheben, dass keine Komplexe zwischen dem Transkript *Pum-kurz* und 5 S-RNA nachweisbar waren (Abb. 4.33 Spur 12). Diesem Transkript fehlen gegenüber *Pum* lediglich die 22 Nukleotide am 5'-Ende (220 bis 242). Diese Daten belegen, dass der entsprechende Bereich für eine stabile Bindung des Transkripts *Pum* an die 5 S-RNA essentiell ist.

Die oben beschriebenen Experimente unter „Dimer“- und „Monomer-Bedingungen“ wurden mehrfach durchgeführt. Sie wurden zum Teil abgewandelt, indem, anstelle der 5 S-RNA, die PSTVd-Teiltranskripte ³²P-markiert wurde. Die Komplexbildung zwischen 5 S-RNA und den Transkripten *Pum* und *Pur* konnte stets reproduziert werden. *Pur*-5 S-RNA-Komplexe waren weiterhin nach Quervernetzung als einzige auch im denaturierenden Gel nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Komplexe zwischen 5 S-RNA und den Transkripten *Pul*, *Pol*, *Por* und *Pl* waren dagegen reproduzierbar nicht nachweisbar. Es konnten aber Hinweise auf eine Komplexbildung zwischen 5 S-RNA und *Pr* bzw. *Pom* gewonnen werden, die im Folgenden erörtert werden.

***Pr*-5 S-RNA-Komplexe**

Wie soeben beschrieben, kann das Transkript *Pur* (sowie die Vollängen-PSTVd) offenbar nur an die 5 S-RNA-Monomere binden, wohingegen das Transkript *Pum* an Dimere und Monomere binden kann. Dies legt nahe, dass der Bereich von *Pur*, der dem Transkript *Pum* fehlt, die Dimerbildung der 5 S-RNA stört, also auch mit der 5 S-RNA wechselwirkt. Genau diesen Bereich (und wenige weitere Nukleotide) umfasst das Transkript *Pr* (siehe Abb. 4.31). In Übereinstimmung dazu konnten in der *primer extension*-Analyse deutliche Abbrüche in dem von *Pr* repräsentierten Bereich nachgewiesen werden. Beides stellt einen Hinweis auf eine Komplexbildung dieses Bereichs mit der 5 S-RNA dar.

Auch eine direkte Wechselwirkung zwischen *Pr* und 5 S-RNA war nachweisbar. In der in Abb. 4.33 dargestellten RNA-RNA-Gelshift-Analyse unter „Monomer-Bedingungen“ treten keine Komplexe zwischen 5 S-RNA und *Pr* auf. In einem weiteren ähnlichen Ex-

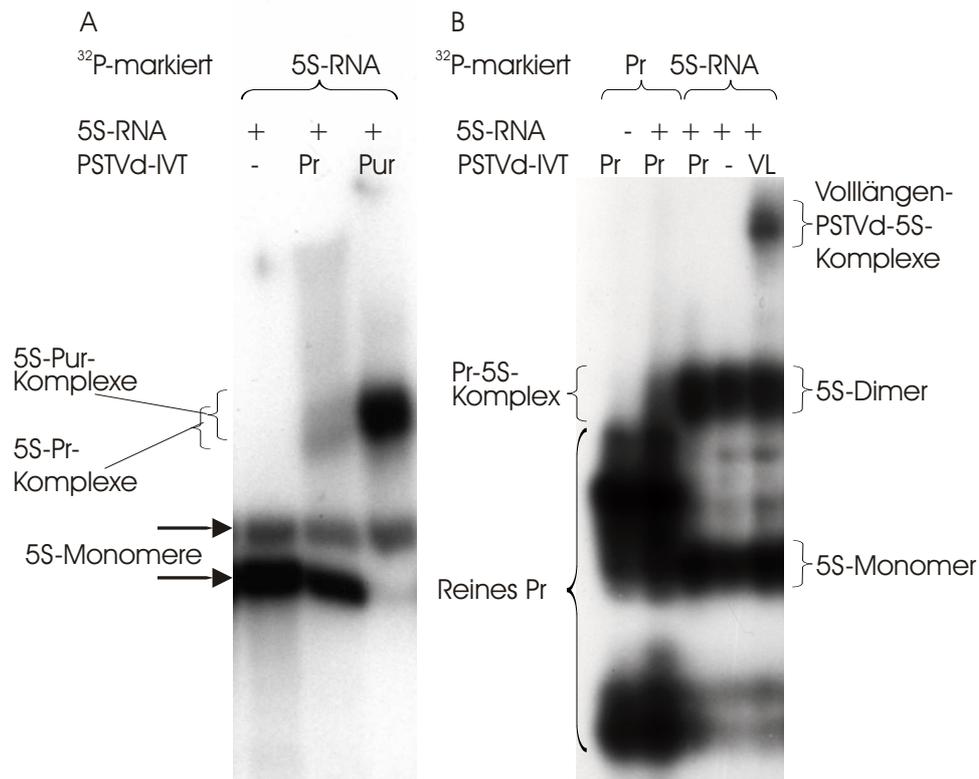


Abbildung 4.34: RNA-RNA-Gelshift-Analyse des Transkripts *Pr* und 5 S-RNA. A) unter „Dimer-Bedingungen“ und B) unter „Monomer-Bedingungen“. Native PAGEs, 4,5% PAA (43:1); $0,2 \times$ NaTAE, 10 °C, 500 V, Autoradiographien. Komplexbildung siehe Abschnitt 3.4.2. Die Spuren 1 bis Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

A) Alle Spuren enthalten einen Anteil an ³²P-markierter 5 S-RNA.

Spur 1: reines 5 S-RNA als Referenz

Spur 2: Komplex-Ansatz: *Pr* und 5 S-RNA (Nachweis der 5 S-RNA)

Spur 3: Komplex-Ansatz: *Pur* und 5 S-RNA (Nachweis der 5 S-RNA)

B) Spuren 4 und 5 enthalten einen Anteil an ³²P-markiertem *Pr*, Spuren 6 bis 8 von ³²P-markierter 5 S-RNA.

Spur 4: reines *Pr* als Referenz

Spur 5: Komplex-Ansatz: *Pr* und 5 S-RNA (Nachweis des *Pr*)

Spur 6: Komplex-Ansatz: *Pr* und 5 S-RNA (Nachweis der 5 S-RNA)

Spur 7: reine 5 S-RNA als Referenz

Spur 8: Komplex-Ansatz: Volllängen-PSTVd und 5 S-RNA (Nachweis der 5 S-RNA)

periment konnten diese dagegen als schwaches, verzögertes Signal nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.34 A Spur 2). Offenbar wird nur eine relativ geringe Menge an *Pr*-5 S-RNA-Komplexen im Bereich der Nachweisgrenze gebildet. Es ist erkennbar, dass das verzögerte Signal ein ähnliches Laufverhalten aufweist wie *Pur*-5 S-RNA-Komplexe. Diese wiederum laufen wie 5 S-RNA-Dimere. Dies bestätigt die in Abb. 4.34B dargestellte RNA-RNA-Gelshift-Analyse von *Pr* und 5 S-RNA unter „Dimer-Bedingungen“. In den Spuren 1 und 2 ist jeweils das enthaltene *Pr*, in den Spuren 3 und 4 die enthaltene 5 S-RNA ³²P-markiert.

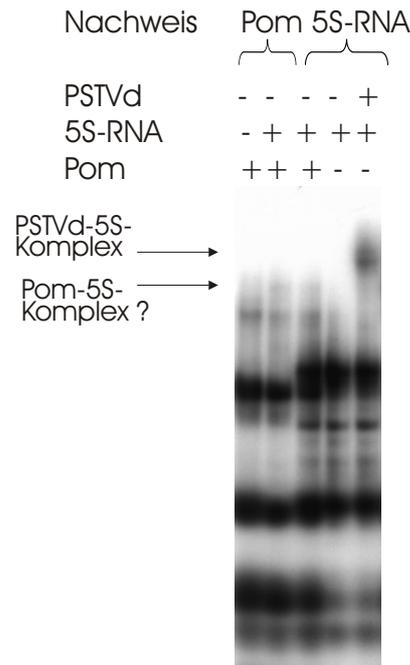


Abbildung 4.35: RNA-RNA-Gelshift-Analyse des Transkripts *Pom* und 5 S-RNA. Die Komplexbildung fan unter „Dimer-Bedingungen“ statt (Abschnitt 3.4.2. Native PAGE, 4,5 % PAA (43:1); $0,2 \times$ NaTAE; 10°C , 500 V, Autoradiographie. Die Spuren 1 und 2 enthalten einen Anteil an ^{32}P -markiertem *Pom*, die Spuren 3 und 4 an ^{32}P -markierter 5 S-RNA. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text.

Spur 1: reines *Pom* als Referenz

Spur 2: Komplex-Ansatz *Pom* und 5 S-RNA (Nachweis von *Pom*)

Spur 3: Komplex-Ansatz mit *Pom* und 5 S-RNA (Nachweis der 5 S-RNA)

Spur 4: reine 5 S-RNA als Referenz

In Spur 2 ist ein schwacher „Schmier“ zu erkennen, der in Spur 1 mit reinem *Pr* fehlt und demnach auf *Pr*-5 S-RNA-Komplexe enthält. In Spur 3 muss dieses Signal auch enthalten sein, es ist hier aber offenbar von 5 S-RNA-Dimeren überlagert, da in diesem Fall die 5 S-RNA radioaktiv markiert war.

Die oben beschriebenen Experimente zur Komplexbildung von *Pur* und *Pum* legten nahe, dass der von *Pr* repräsentierte Bereich des Transkriptes *Pur* die 5 S-RNA-Dimerbildung stört. Daher wäre zu erwarten, dass dies auch bei einer Bindung des Transkriptes *Pr* an die 5 S-RNA der Fall ist. Tatsächlich ist aber der Anteil an 5 S-RNA-Dimeren im Ansatz mit *Pr*-5 S-RNA-Komplexen und der Referenz gleich (Spuren 3 und 4). Dies schliesst aber nicht aus, dass auch das Transkript *Pr* an den gleichen Bereich der 5 S-RNA bindet, sondern bestätigt lediglich, dass der Anteil der *Pr*-Moleküle, die im Komplex mit der 5 S-RNA vorliegen, gering ist.

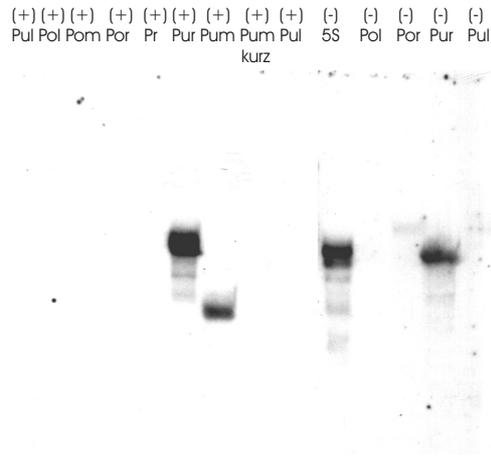


Abbildung 4.36: Filterhybridisierung der verschiedenen verkürzten PSTVd-Teiltranskripte mit 5 S-RNA. Northern-Blot einer denaturierenden PAGE, 4,5 % PAA (43:1); 8 M Urea, $1 \times$ TBE, 55°C , 46 W, Autoradiographie. Das jeweils aufgetragene Transkript ist oberhalb der Spur angegeben. Der Northern-Blot wurde mit ^{32}P -markierter 5 S-RNA hybridisiert.

***Pom*-5 S-RNA-Komplexe**

In Abb. 4.35 ist eine RNA-RNA-Gelshift-Analyse der *Pom*-5 S-RNA-Komplexe gezeigt. Nach der Komplexbildung unter „Dimer-Bedingungen“ wurden Aliquots der Ansätze entweder mit einem kleinen Teil *Pom* oder 5 S-RNA, der jeweils ^{32}P -markiert war, versetzt. In den Spuren, in denen *Pom*-5 S-RNA-Komplexe aufgetragen wurden (Abb. 4.35 Spuren 2 und 3) ist eine kaum erkennbare, verzögerte Schwärzung vorhanden, die in der Referenz mit reiner 5 S-RNA fehlt. Bei gleicher Laufstrecke befindet sich aber in der Referenz mit reinem *Pom* ebenfalls eine Schwärzung, die lediglich etwas schwächer ist. Dies legt nahe, dass diese Bande reine *Pom*-Moleküle mit abweichender Konformation enthält und entweder überhaupt keine oder eine nur sehr geringe Menge *Pom*-5 S-RNA-Komplexe gebildet wurde.

4.3.2 Filterhybridisierung

Die Komplexe der Einzelkomponenten bilden bei den RNA-RNA-Gelshift-Analysen einen starken Hintergrund im Gel. Es schien daher nicht ausgeschlossen, dass auf diese Weise nicht alle Komplexe zwischen den PSTVd-Teiltranskripten und 5 S-RNA nachgewiesen werden konnten. Daher sollte die Bindung der verschiedenen PSTVd-Transkripte an die 5 S-RNA ohne diesen Hintergrund untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten die Ergebnisse mittels Filterhybridisierung verifiziert werden.

Die PSTVd-Teiltranskripte wurden mittels denaturierender Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Membran wurde mit ^{32}P -markierter 5S-RNA hybridisiert, die mittels Autoradiographie nachgewiesen wurde (siehe Abschnitt 3.4.10). Auf der in Abb. 4.36 dargestellten Autoradiographie ist zu erkennen, dass die 5S-RNA an die Transkripte *Pur* und *Pum* bindet. Durch sehr lange Exposition des Gels auf einen Röntgenfilm ist auch ein Signal in der Spur zu erkennen, in der das Transkript *Pr* aufgetragen wurde (Daten nicht gezeigt). Wechselwirkungen aller anderer Transkripte an 5S-RNA waren nicht nachweisbar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Transkripte *Pur* und *Pum* mit 5S-RNA wechselwirken. Weiterhin wurden in verschiedenen Experimenten Hinweise auf eine Komplexbildung von 5S-RNA mit *Pr* gewonnen werden. Während eine sehr schwache Wechselwirkung zwischen *Pom* und 5S-RNA nicht ausgeschlossen werden konnte, waren Komplexe zwischen 5S-RNA und allen anderen PSTVd-Teiltranskripten, in allen Experimenten übereinstimmend, nicht nachweisbar.

Remennik (2003) konnte auch eine Komplexbildung von 5S-RNA mit (-)-PSTVd-Transkripten nachweisen, wobei diese deutlich weniger effektiv als (+)-PSTVd gebunden wurden. Um die Bindestelle einzugrenzen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Bindung verschiedener (-)-PSTVd-Teiltranskripte (Abschnitt 2.2.3) an die 5S-RNA mittels Filterhybridisierung analysiert. Dabei war ein deutliches Signal bei (-)-*Pur* und ein sehr schwaches bei (-)-*Por* nachweisbar (siehe Abb. 4.36).

4.3.3 Identifizierung von Kontaktstellen zwischen den PSTVd-Teiltranskripten und der 5S-RNA mittels *primer extension*

Zur vollständigen Absicherung wurden Komplexe zwischen 5S-RNA und einem Teil der PSTVd-Teiltranskripte mittels *primer extension* analysiert. Quervernetzte Komplexansätze zwischen 5S-RNA und den Transkripten *Pur*, *Pum*, *Pr*, *Pul* und *Pol* wurden nach einer PSTVd-spezifischer Dynabead®-Aufreinigung als *template* einer *primer extension* mit dem Primer 5S1 eingesetzt. Es muss nochmals betont werden, dass schon das Auftreten von Produkten in der *primer extension* eine Wechselwirkung der betreffenden RNAs nachweist, weil die *templates* PSTVd-spezifisch aufgereinigt wurden, die

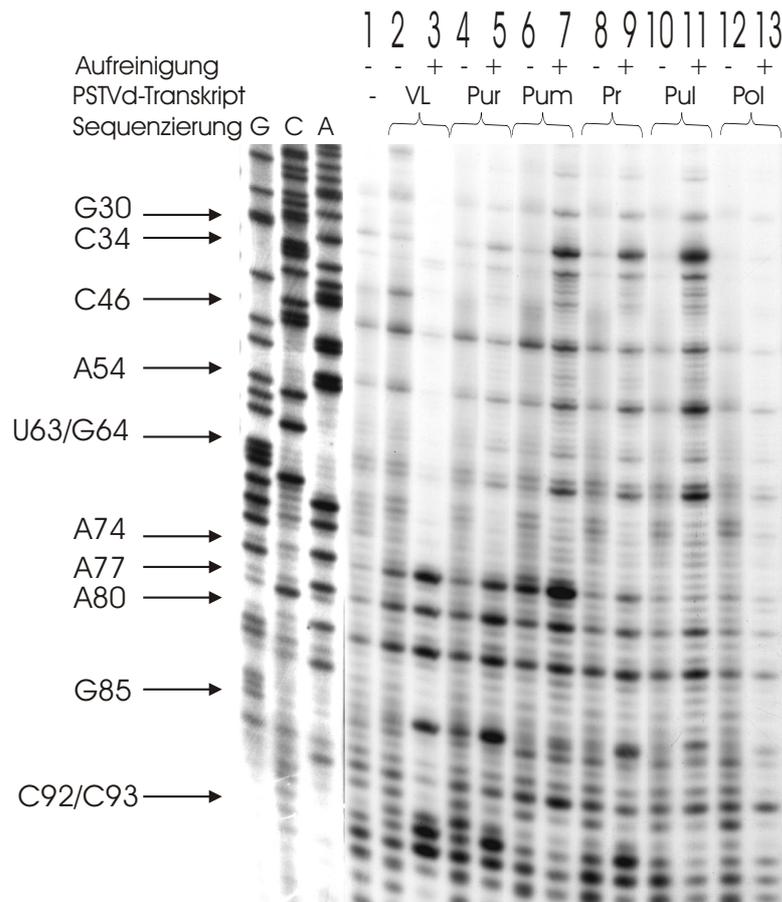


Abbildung 4.37: Identifizierung von Kontaktstellen zwischen der 5 S-RNA und verschiedenen, verkürzten PSTVd-Transkripten mittels *primer extension*. Denaturierende PAGE, 8% PAA (19:1), 7M Urea, $1 \times$ TBE, 55°C , 100 W, Autoradiographie. Das jeweils verwendete PSTVd-Transkript ist oberhalb der Spur angegeben (Vollängen-PSTVd wurde mit VL abgekürzt). Komplexbildung siehe Abschnitt 3.4.2. Quervernetzung: Bestrahlungsdauer: 40 min, Psoralen-Konzentration: $2,5 \mu\text{M}$. Verwendeter Primer: 5S1. Weitere Erläuterungen befinden sich im Text. Spur 1: Referenz-Ansatz der reinen 5 S-RNA
Spuren 2, 4, 6, 8, 10 und 12: Komplex-Ansätze von 5 S-RNA und PSTVd-Transkript ohne Aufreinigung
Spuren 3, 5, 7, 9, 11 und 13: Komplex-Ansätze von 5 S-RNA und PSTVd-Transkript nach Aufreinigung

primer extension jedoch mit einem 5 S-RNA-spezifischen Primer erfolgt. Weiterhin kann dieses *primer extension*-Abbruchmuster mit jenem der Vollängen-Komplexe verglichen werden. Ist ein spezifisches Abbruchsignal sowohl bei Verwendung der PSTVd-Volllänge als auch eines verkürzten Transkripts nachweisbar, so ist dies ein Hinweis darauf, dass dieses verkürzte Transkript an der gleichen Position an 5 S-RNA bindet wie der betreffende Teil der PSTVd-Volllänge. So konnten verstärkte Abbruchsignale an bestimmten Positionen der 5 S-RNA einer Wechselwirkung an PSTVd im Bereich des jeweiligen Teiltranskripts zugeordnet werden.

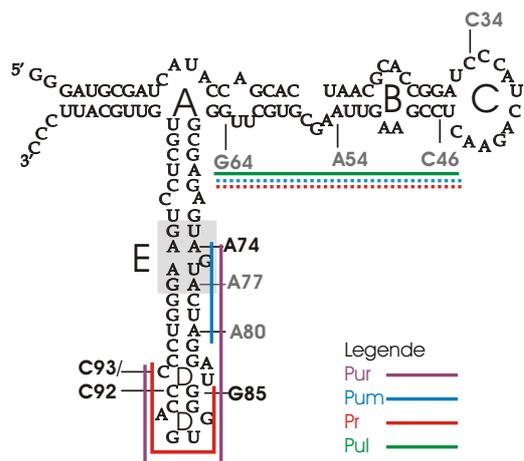


Abbildung 4.38: Lage der Komplex-spezifischen *primer extension*-Abbruchsignale auf der 5S-RNA bei Verwendung von PSTVd-Teiltranskripten. Die Positionen der Komplex-spezifischen Abbruchsignale der 5S-RNA im Komplex mit Vollängen-PSTVd sind gekennzeichnet. Mit Hilfe den farbigen Linien werden diese Abbruchsignale einer Wechselwirkung mit dem jeweiligen verkürzten PSTVd-Transkript zugeordnet.

In den Spuren 5, 7, 9 und 11 des in Abb. 4.37 gezeigten Sequenziergels sind deutlich, in Spur 13 demgegenüber nur sehr schwach, Produkte nachweisbar. Dies belegt, dass alle verwendeten PSTVd-Teiltranskripte außer *Pol* mit der 5S-RNA wechselwirken. Das Abbruchmuster der Komplexe zwischen 5S-RNA und den Transkripten *Pur*, *Pr*, *Pum* und *Pul* unterscheidet sich aber voneinander. In der *primer extension* der *Pur*-5S-RNA-Komplexe (Abb. 4.37 Spur 5) sind die Abbrüche an den Positionen 74/77/80, 85 und 92/93 verstärkt. Das Abbruchmuster entspricht also jenem von Komplexen zwischen 5S-RNA und PSTVd voller Länge (Abb. 4.37 Spur 3). In der *primer extension*-Reaktion der *Pr*-5S-RNA-Komplexe (Abb. 4.37 Spur 9) sind die Abbrüche an den Positionen G85 und C92/C93 ebenfalls verstärkt, jene an den Positionen A74/A77/A80 fehlen dagegen. Bei den *Pum*-5S-RNA-Komplexen verhält es sich genau umgekehrt: hier treten die Abbruchsignale an den Positionen A74/A77/A80 auf, es fehlen aber die Abbruchsignale an den Positionen 92/93 und 85 (4.37 Spur 7).

Auch im Ansatz mit *Pul* und 5S-RNA waren *primer extension*-Produkte nachweisbar, obwohl eine Komplexbildung dieser RNAs weder mittels Gelshift noch Filter-Hybridisierung nachweisbar war. Möglicherweise wurde nur eine äußerst geringe Menge an Komplexen gebildet, die unterhalb der Nachweisgrenze des Northern-Blot lagen. Während die Abbruchsignale an den Positionen A74/A77/A80, G85 und C92/C93 fehlen, sind jene *upstream* des Nukleotids 74, insbesondere an Position U63/G64 und A54, gegenüber der Referenz verstärkt. Diese Signale sind auch in der *primer extension* der *Pum*-5S-RNA-Komplexe deutlich verstärkt. Die Transkripte *Pul* und *Pum* überschneiden sich und enthalten beide die PSTVd-Sequenz zwischen den Nukleotiden 249 bis 295. Dies könnte

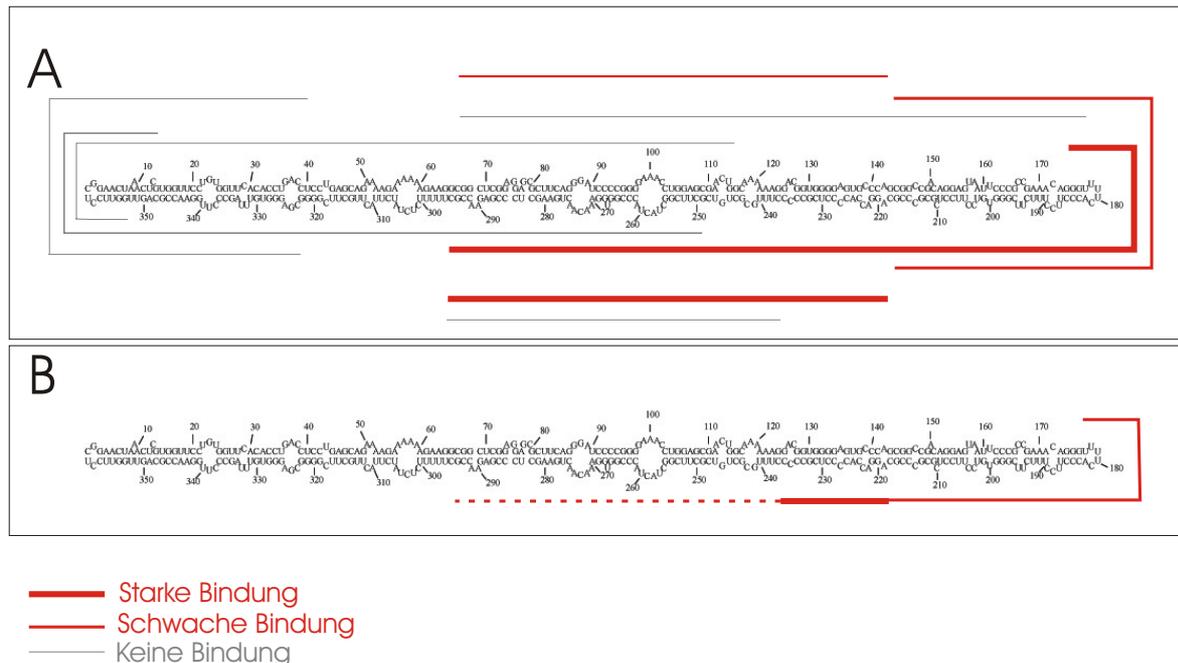


Abbildung 4.39: Eingrenzung der Wechselwirkungsposition von 5 S-RNA an PSTVd aufgrund der Bindung der PSTVd-Teiltranskripte an 5 S-RNA. A: Die Linien stellen die verschiedenen PSTVd-Teiltranskripte dar. B: Die Linien stellen Bereiche dar, innerhalb derer eine Bindung der PSTVd-Teiltranskripte an PSTVd stattfindet. Mit der fett gedruckten Linie ist jener Bereich gekennzeichnet, der für die Bindung essentiell ist. Die gestrichelte Linie soll andeuten, dass hier eine Wechselwirkung nicht ausgeschlossen ist. RNA-RNA-Gelshift und Filterhybridisierung belegten übereinstimmend, dass keine Wechselwirkung stattfindet, die *primer extension*-Analysen gaben indes Hinweise auf eine schwache Wechselwirkung.

bedeuten, dass eine Wechselwirkung dieses Sequenzbereichs mit der 5 S-RNA im Bereich der Nukleotide U63/G64 bzw. A54 stattfindet. Unverständlich erscheint allerdings, dass die Abbruchsignale an Position U63/G64 und A54 auch in der *primer extension* der *Pr*-5 S-RNA-Komplexe verstärkt sind.

Anhand der in diesem Abschnitt dargestellten *primer extension*-Analyse konnte eine Wechselwirkung mehrerer verkürzter PSTVd-Transkripte mit der 5 S-RNA nochmals belegt werden. Alle Abbruchsignale, die bereits in der *primer extension* an Vollängen-5 S-RNA-Komplexe auftraten, konnten mit verkürzten Transkripten reproduziert werden, was als Hinweis dienen kann, dass letztere an den gleichen Positionen der 5 S-RNA binden wie die entsprechenden Sequenzabschnitte des Vollängen-PSTVd. In Abb. 4.38 ist anhand der Sekundärstruktur von 5 S-RNA zu sehen, an welchen Positionen die Abbruchsignale nach Komplexbildung mit den Transkripten *Pur*, *Pum*, *Pr* oder *Pul* jeweils verändert sind.

Aufgrund dieser Daten können die Signale an Position 74/77/80 einer Quervernetzung der 5 S-RNA an das Transkript *Pum* und jene an Position 85 und 92/93 an das Transkript *Pr* zugeordnet werden. Alle drei Abbruchsignale liefert die Reaktion mit Komplexen zwischen 5 S-RNA und dem Transkript *Pur* als *template*, das die gesamte Sequenz von *Pum* und eine Teilsequenz von *Pr* umfasst. Die Daten deuten darauf hin, dass die Abbruchsignale *upstream* des Nukleotids 74, insbesondere U63/G64 bzw. A54, auf einer Wechselwirkung zwischen *Pum* bzw. *Pul* und 5 S-RNA unter Beteiligung der Nukleotide 249 bis 295 seitens PSTVd beruhen. Die mittels RNA-RNA-Gelshift-Analyse, Filterhybridisierung und *primer extension* nachgewiesenen Bindepositionen der verschiedenen PSTVd-Teiltranskripte sind in Abb. 4.39 dargestellt.

4.3.4 Konkurrenzexperimente mit DNA-Oligonukleotiden

Es wurde nachgewiesen, dass die PSTVd-Teiltranskripte *Pur*, *Pum* und *Pr* mit der 5 S-RNA wechselwirken. Bei der Interpretation der Ergebnisse musste allerdings bedacht werden, dass sich verkürzte Transkripte nicht zwangsläufig genauso verhalten wie die gleiche Sequenz im Kontext des Vollängen-PSTVd. Die Ergebnisse der *primer extension*-Analysen legen jedoch tatsächlich nahe, dass sich die Teiltranskripte in Bezug auf die Bindeposition an die 5 S-RNA wie die entsprechenden Sequenzen im Kontext der Volllänge verhalten. Mittels Konkurrenz von Oligonukleotiden kann dagegen die Komplexbildung des Vollängen-PSTVd mit 5 S-RNA untersucht werden. Um die Ergebnisse zu untermauern und die in Abb. 4.39 postulierte Bindeposition der 5 S-RNA an Vollängen-PSTVd zu bestätigen, wurden daher Konkurrenzexperimente mit verschiedenen DNA-Oligonukleotiden durchgeführt.

Bei diesen Experimenten wurden Ansätze, die PSTVd und 5 S-RNA enthielten, mit einem Überschuss eines bestimmten Oligonukleotids versetzt und danach zur Komplexbildung aufgeheizt, langsam abgekühlt und mittels nativer Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.4.3). In Abb. 4.40 A ist zu erkennen, dass nach Zugabe des PSTVd-spezifischen Oligonukleotids PS15 keine Komplexe nachweisbar sind (siehe Abb. 4.40A Spur 3), in den Kontrollproben der Komplexe mit 7 S-RNA-spezifischem bzw. ohne Oligonukleotid (Spuren 1 bzw. 5 respektiv) dagegen schon. Um die Bindestelle weiter einzugrenzen, wurden neben PS15 verschiedene weitere PSTVd-spezifische Oligonukleotide eingesetzt. In Abb. 4.40C ist zu erkennen, dass auch die Anwesenheit der Oligonukleotide

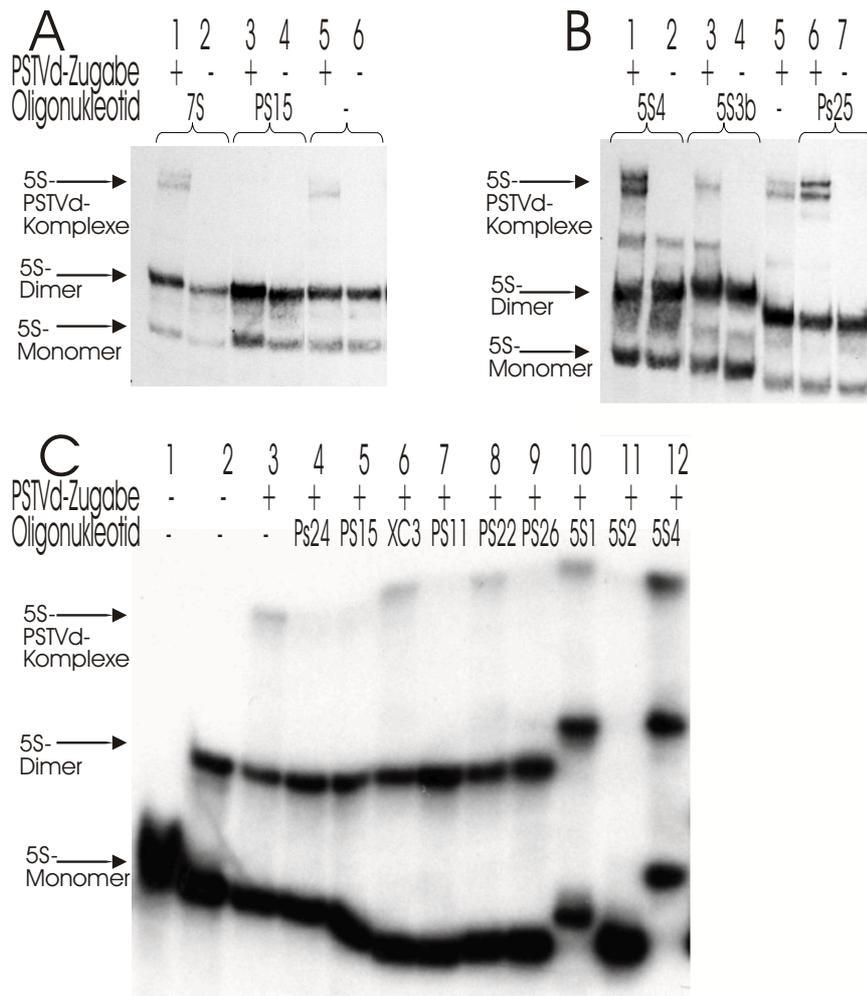


Abbildung 4.40: Konkurrenz verschiedener DNA-Oligonukleotide bei der Komplexbildung zwischen PSTVd und 5 S-RNA. A/B) Northern-Blots nativer PAGEs; C) Native PAGE (jeweils 4,5 % PAA (43:1); 0,2 × NaTAE; 10 °C, 500 V), Autoradiographien. Komplexbildung siehe Abschnitt 3.4.3. Das verwendete Oligonukleotid ist jeweils oberhalb der Spuren angegeben. A/B) Nachweis mit einer 5 S-RNA-spezifischen Sonde; C) alle Ansätze enthalten einen Anteil an ³²P-markierter 5 S-RNA.

PS24, PS15, PS11 oder PS26 die Komplexbildung zwischen 5 S-RNA und PSTVd stört (siehe Abb. 4.40C Spuren 4, 5, 7 und 9). Die Oligonukleotide XC3 und PS22 haben dagegen keinen Einfluss auf die Komplexbildung (siehe Abb. 4.40C Spuren 6 und 8) und in Anwesenheit des Oligonukleotids PS25 werden sogar etwas mehr Komplexe gebildet als ohne Oligonukleotid (siehe Abb. 4.40B Spuren 6 und 5). Auf der Grundlage dieser Experimente kann die Bindestelle der 5 S-RNA an PSTVd, wie in Abb. 4.41A dargestellt, eingegrenzt werden. Die Komplexbildung zwischen PSTVd und 5 S-RNA kann durch die Zugabe von Oligonukleotiden, die komplementär zu diesem Bereich sind, fast vollständig

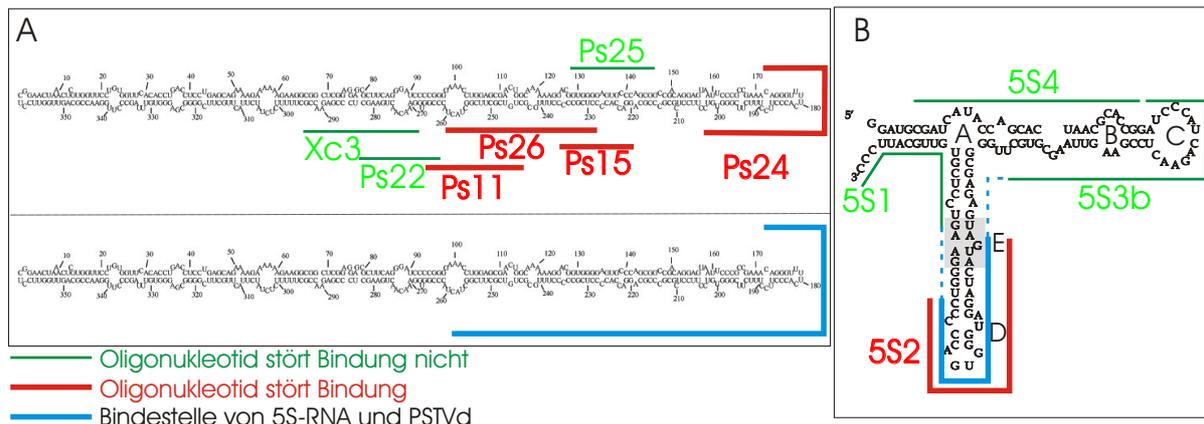


Abbildung 4.41: Eingrenzung der Bindestelle zwischen PSTVd und 5 S-RNA anhand der Konkurrenzexperimente. Lage der DNA-Oligonukleotide A) auf Seite des PSTVd. B) auf Seite der 5 S-RNA. Die gestrichelte blaue Linie soll andeuten, dass nicht ausgeschlossen ist, dass eine weitreichendere Wechselwirkung besteht, da Oligonukleotide, die diese Abschnitte binden, nicht eingesetzt wurden.

unterdrückt werden. Dies zeigt, dass die „Haupt-Wechselwirkung“ zwischen PSTVd und 5 S-RNA unter Beteiligung dieser Nucleotide stattfindet. Wechselwirkungen zwischen 5 S-RNA und PSTVd im Bereich der oberen CCR bzw. unteren VM-Region, für die wenige Hinweise gefunden wurden, spielen also, wenn vorhanden, eine untergeordnete Rolle.

Weiterhin wurden Konkurrenzexperimente mit DNA-Oligonukleotiden durchgeführt, die eine zur 5 S-RNA komplementäre Sequenz aufwiesen (siehe Abb. 4.40B und C): vergleicht man die Referenz der Komplexe ohne Oligonukleotid (B: Spur 5; C: Spur 3) so ist zu erkennen, dass die Komplexbildung zwischen PSTVd und 5 S-RNA in Gegenwart der Oligonukleotide 5S1 bzw. 5S3b kaum (Abb. 4.40C Spur 10 bzw. 4.40B Spur 3) und in Gegenwart von 5S4 positiv (Abb. 4.40B und Spur 1 4.40C Spur 12) beeinflusst wird. Bindet dagegen das Oligonukleotid 5S2 an die 5 S-RNA, so wird sowohl die Bildung von Komplexen als auch von 5 S-RNA-Dimeren unterdrückt (Abb. 4.40C Spur 11). Auf diese Weise kann auf 5 S-RNA-Seite die Wechselwirkung, wie in Abb. 4.41B dargestellt, eingegrenzt werden.

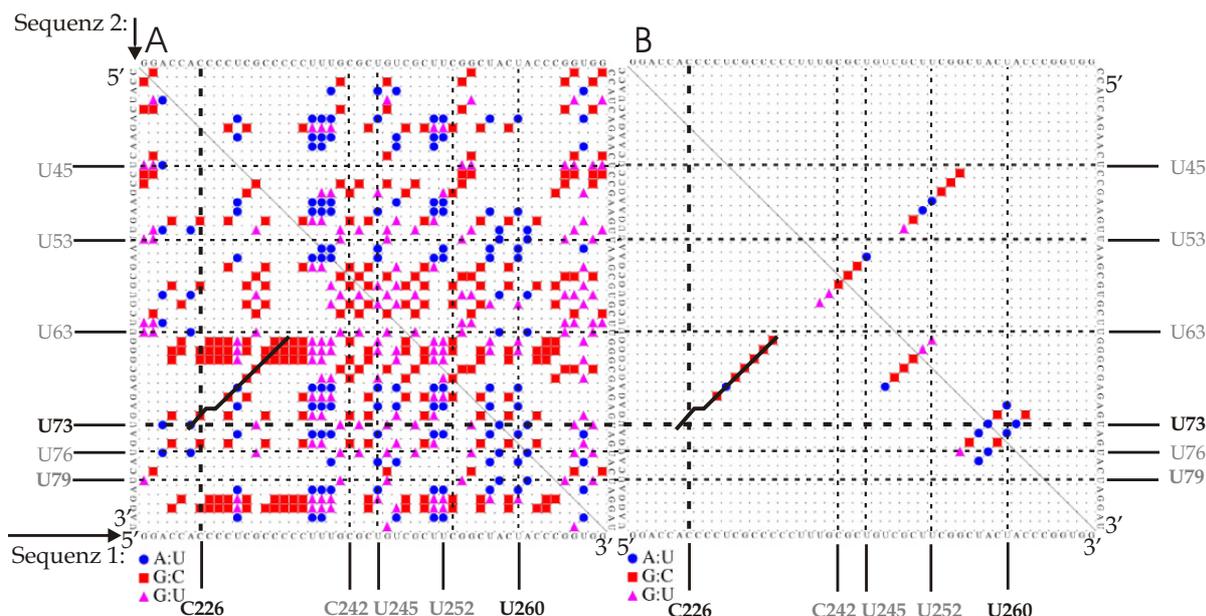


Abbildung 4.42: Dot-Plot zwischen PSTVd und 5 S-RNA: Variable Region-Helix V. Sequenz 1: PSTVd: Nukleotid 220 bis 269; Sequenz 2: 5 S-RNA: Nukleotid 35 bis 84. Als minimale Helixlänge wurden in A) 2 Basenpaare und in B) 6 Basenpaare gewählt. Die Positionen, an denen mittels *primer extension* Quervernetzungen nachgewiesen wurden, sind gekennzeichnet und deren Position auf dem PSTVd- bzw. 5 S-RNA-Molekül angegeben. Die diagonale, durchgängige Linie innerhalb des Plots markiert eine Helix, innerhalb der eine Quervernetzung zwischen dem Nukleotid C226 von PSTVd und U73 der 5 S-RNA möglich ist.

4.4 *In silico*-Analyse zur Komplexbildung zwischen 5 S-RNA und PSTVd

Auf der Grundlage der experimentellen Daten sollte nun ein Modell der Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5 S-RNA erstellt werden. Mit Hilfe des Dot-Plot-Algorithmus (Schmitz & Gräf, 2004) können komplementäre Bereiche zwischen zwei Nukleinsäuren *in silico* bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit konnten auf diese Weise Komplementaritäten zwischen den experimentell bestimmten wechselwirkenden Bereichen gefunden werden.

4.4.1 Bindung der 5 S-RNA an die untere Variable Region von PSTVd

Die *Primer Extension*-Analysen belegen, dass PSTVd an Position C226 und/oder U260 mit der 5 S-RNA quervernetzt ist. Dass die 5 S-RNA im Komplex mit *Pum*, aber nicht mit *Pul*, an Position U73 quervernetzt ist, legt nahe, dass tatsächlich die Nukleotide C226 und U73 quervernetzt sind. In Übereinstimmung dazu waren Komplexe zwischen 5 S-RNA und dem Transkript *Pum-kurz* nicht nachweisbar.

Eine Quervernetzung zwischen C226 und U73 ist theoretisch möglich: wie in dem Dot-Plot in Abb. 4.42A zu erkennen ist, befinden sich an dieser Position zwei benachbarte Basenpaare. Die Nukleotide C226 und U73 stehen einander diagonal gegenüber. In direkter Nähe, zwischen Nukleotid 229 und 335, ist eine 7 Basenpaare lange Helix zwischen PSTVd und 5 S-RNA zu erkennen. In Abb. 4.43C ist ein Modell der Komplexe im Bereich der Variablen Region von PSTVd und der Helix V der 5 S-RNA gezeigt, das auf dieser insgesamt 9 Basenpaare umfassenden Wechselwirkung, die durch einen Loop unterbrochen ist, beruht.

Zur Abschätzung der thermodynamischen Stabilität dieser Wechselwirkung wurde das Programm *mfold3.2* eingesetzt (Zuker, 2003), das die Daten von Mathews *et al.* (1999b) verwendet. Mit Hilfe dieses Programms kann die Freie Energie einer Wechselwirkung bei 37 °C berechnet werden. Zunächst wurde die Freie Energie des Hybrids Var-Helix V bestimmt. Dazu wurde die Sequenz der an der Wechselwirkung beteiligten Nukleotide von 5 S-RNA und PSTVd, unterbrochen von fünf „n“, eingegeben.

$$\Delta G_{\text{Hybrid}} = -11,8 \text{ kcal/mol}$$

Dieser Wert musste noch um den Beitrag der fünf als Hilfsmittel eingegebenen „n“, der $\Delta G_{\text{n5-Loop}} = +5,6 \text{ kcal/mol}$ betrug, korrigiert werden. Bei der Bildung des Hybrids wird folglich eine Energie von $-17,4 \text{ kcal/mol}$ frei.

Um abzuschätzen, ob die Wechselwirkung stattfindet, muss zusätzlich berücksichtigt werden, wie hoch die Freie Energie der intramolekularen Basenpaarungen ist, die bei der Komplexbildung nicht stattfinden können. Diese geht folglich verloren. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Freie Energie des nativen PSTVd berechnet. Dabei wurde die Sequenz beginnend an Position 147 eingegeben. Dies entspricht dem in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich verwendeten PSTVd-Transkripts IVT 1:

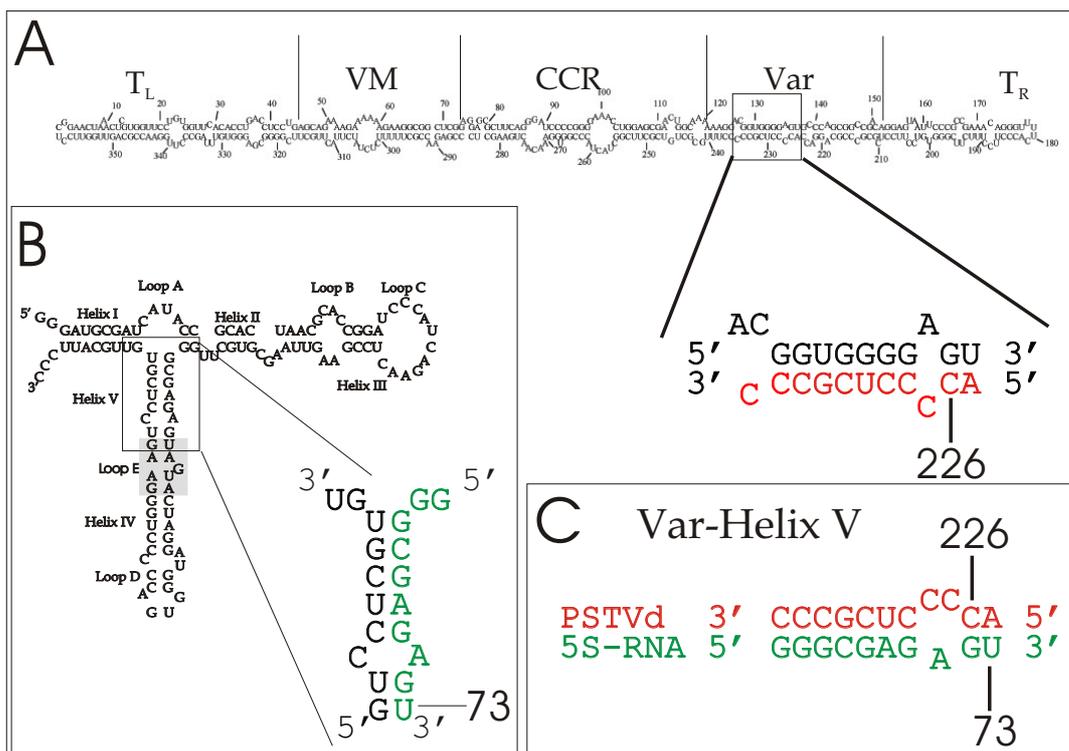


Abbildung 4.43: Modell der Wechselwirkung zwischen 5S-RNA und der unteren Variablen Region von PSTVd.

A) Sekundärstruktur des PSTVd. Der Ausschnitt zeigt die Vergrößerung eines Bereichs innerhalb der Variablen Region von PSTVd

B) Sekundärstruktur der 5S-RNA. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung im Bereich der Helix V der 5S-RNA

C) Modell der Komplexe im Bereich der Variablen Region von PSTVd und der Helix V der 5S-RNA

Die an der Wechselwirkung beteiligten Nukleotide von PSTVd sind jeweils rot (Nukleotide 225 bis 235), von 5S-RNA grün (Nukleotide 64 bis 73) markiert; an den gekennzeichneten Nukleotid-Positionen wurden Quervernetzungen nachgewiesen.

$$\Delta G_{\text{PSTVd147}} = -162,1 \text{ kcal/mol}$$

Daraufhin wurde die Freie Energie eines PSTVd-Moleküls berechnet, dem die Nukleotide 225 bis 235 nicht zur Basenpaarung zur Verfügung stehen:

$$\Delta G_{\text{PSTVd147}(-225-235)} = -156,69 \text{ kcal/mol}$$

Die Differenz dieser Energien ist also die Freie Energie jener intramolekularen Basenpaarung von PSTVd, die bei der Komplexbildung nicht gewonnen wird:

$$\Delta\Delta G_1 = -162,1 \text{ kcal/mol} - (-156,69) \text{ kcal/mol} = -5,41 \text{ kcal/mol}$$

Analog wurde die Differenz der Freien Energien der 5 S-RNA und eines 5 S-RNA-Moleküls, dem die Nukleotide 73 bis 82 nicht zur Verfügung stehen, berechnet, die ebenfalls bei der Komplexbildung nicht gewonnen wird:

$$\Delta G_{5S} = -37 \text{ kcal/mol} \quad \Delta G_{5S(-73-82)} = -30,03 \text{ kcal/mol}$$

$$\Delta\Delta G_2 = -37 \text{ kcal/mol} - (-30,03) \text{ kcal/mol} = -6,97 \text{ kcal/mol}$$

Nach der Abschätzung geht bei der Komplexbildung eine Freie Energie von etwa $-(\Delta\Delta G_1 + \Delta\Delta G_2) = -12,38 \text{ kcal/mol}$ verloren, während eine Freie Energie von etwa $\Delta G_{\text{Hybrid}} = -17,4 \text{ kcal/mol}$ gewonnen wird. Das Gleichgewicht liegt unter diesen Bedingungen somit auf Seiten der Komplexe.

Wie in Abb. 4.42B zu erkennen ist, gibt es zwischen PSTVd *downstream* von dieser Wechselwirkung komplementäre Bereiche (zwischen Nukleotid 235 und 261). Einige im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente legen eine solche Wechselwirkung nahe. So störten Nukleotide, die in diesem Bereich an PSTVd binden, die Komplexbildung zwischen PSTVd und 5 S-RNA. Weiterhin konnten Komplexe zwischen dem Transkript *Pul* und 5 S-RNA mittels *primer extension*-Extension nachgewiesen werden. In dieser Analyse wurden „Veränderungen“ der 5 S-RNA im Komplex mit *Pul* im Bereich des Loop B und der Helices II und III nachgewiesen. Eine eindeutige Zuordnung dieser Signale auf Quervernetzungen zwischen *Pul* und 5 S-RNA innerhalb der in Abb. 4.42B gezeigten hypothetischen Wechselwirkungen ist aber nicht möglich. Mittels RNA-RNA-Gelshift-Analyse und Filterhybridisierung konnten Komplexe zwischen den Transkripten *Pul* bzw. *Pum-kurz* und 5 S-RNA nicht nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass Komplexe zwischen *Pul* und 5 S-RNA entweder in sehr geringer Menge entstehen oder nur nach kovalenter Quervernetzung stabil sind, so dass sie mittels *primer extension*, aber nicht mittels RNA-RNA-Gelshift/Filterhybridisierung nachweisbar sind. In Hinblick auf Vollängen-Komplexe ist denkbar, dass Komplexe mit PSTVd zwischen Nukleotid 235 und 261 nur entstehen, wenn auch die in Abb. 4.43C gezeigte Wechselwirkung ausgebildet wird.

Schließlich bleibt festzuhalten, dass die *primer extension*-Analyse an aufgereinigten Vollängen-PSTVd-5 S-RNA-Komplexen ein deutliches Abbruchsignal an Position A261 lieferte, was nahelegt, dass das PSTVd im Komplex mit der 5 S-RNA auch an dieser Position verändert ist. Die Ergebnisse legen aber übereinstimmend nahe, dass der Loop E von PSTVd nicht direkt an der Wechselwirkung zur 5 S-RNA beteiligt ist.

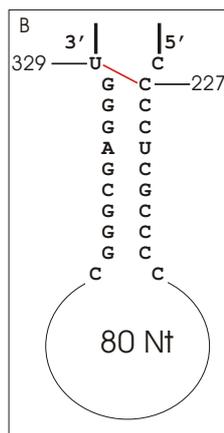


Abbildung 4.44: Sekundärstruktur von PSTVd bei Ausbildung des Hairpin II. Die Nukleotide C227 und U329 stehen einander diagonal gegenüber, wobei sich nur das Nukleotid C227 innerhalb der Helix befindet. Dort könnte evt. ein Crosslink entstehen, der durch die rote Linie angedeutet werden soll. Das Strukturelement Hairpin II wird während der thermischen Denaturierung von PSTVd gebildet (Abschnitt 1.2.1).

Auffällig ist, dass sich die Nukleotide U329 und C227/C228 genau in jenem Bereich befinden, der an der Ausbildung des Strukturelements Hairpin II beteiligt ist (siehe Abb. 4.44). An beiden Positionen lieferte die *primer extension* der aufgereinigten Komplexe Abbruchsignale. Dies könnte bedeuten, dass die 5S-RNA beispielsweise an den Rechten Terminus bindet und das "Rest-Molekül von PSTVd dann das Strukturelement Hairpin II ausbildet. Die Signale wären in diesem Fall auf eine intramolekulare Quervernetzung von PSTVd zurückzuführen (siehe Abb. 4.44). Das Nukleotid C227 befindet sich innerhalb der Hairpin II-Wechselwirkung und steht dem Nukleotid U329 diagonal gegenüber, das sich seinerseits aber nicht innerhalb der Helix befindet. Es ist fraglich, ob in diesem Fall eine Quervernetzung überhaupt möglich ist. Alle Experimente legen weiterhin übereinstimmend nahe, dass der Bereich um die Nukleotide C227/228 direkt an der Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S-RNA beteiligt sind und das Abbruchsignal an Position C227/C228 auf eine Quervernetzung mit der 5S-RNA an Position U73 zurückzuführen ist.

4.4.2 Bindung der 5S-RNA an den Rechten Terminus von PSTVd

Auch an Position C181 von PSTVd konnte eine Quervernetzung mit der 5S-RNA nachgewiesen werden, wobei auf 5S-RNA-Seite das Nukleotid U84 oder C92 beteiligt sein muss. In Übereinstimmung dazu konnte eine direkte Wechselwirkung des Transkripts *Pr* nachge-

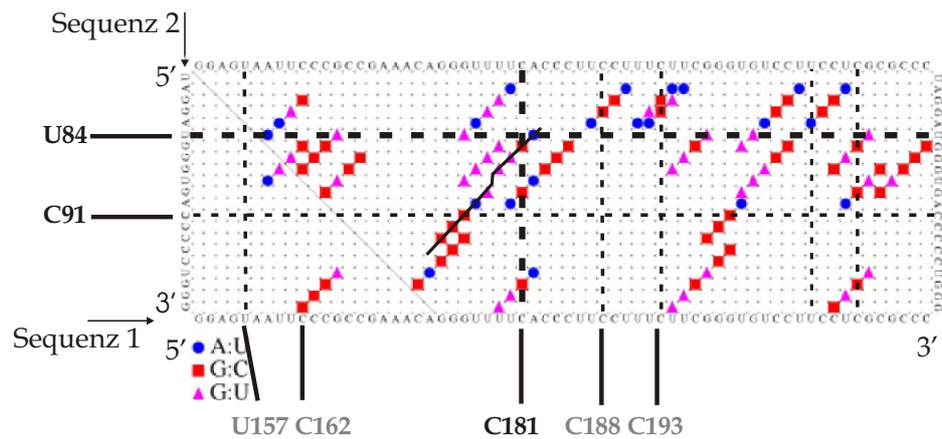


Abbildung 4.45: Dot-Plot zwischen PSTVd und 5 S-RNA: Rechter Terminus-Loop D. Sequenz 1: PSTVd: Nukleotid 153 bis 216; Sequenz 2: 5 S-RNA: Nukleotid 79 bis 99. Als minimale Länge wurden 4 Basenpaare gewählt. Die Positionen, an denen mittels *primer extension* Quervernetzungen bzw. Veränderungen nachgewiesen wurden, sind gekennzeichnet und deren Position auf dem PSTVd- bzw. 5 S-RNA-Molekül angegeben. Die diagonale, durchgängige Linie innerhalb des Plots markiert eine Helix, innerhalb der eine Quervernetzung zwischen dem Nukleotid C181 von PSTVd und U84 der 5 S-RNA möglich ist.

wiesen werden, die jedoch schwächer war als jene mit dem Transkript *Pum*. Ein Dot-Plot der entsprechenden Bereiche von PSTVd und 5 S-RNA ist in Abb. 4.45 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass eine Quervernetzung der Nukleotide C181 und C92 nicht möglich ist. Demgegenüber gibt es durchaus eine Wechselwirkung von 4 Basenpaaren, innerhalb der die Nukleotide C181 und U84 quervernetzbar sind. Weitere mögliche Helices befinden sich in enger Nachbarschaft, so dass in diesem Bereich insgesamt eine Wechselwirkung von 12 Basenpaaren mit zwei Mismatches möglich wäre. Auf der Grundlage dieser Daten wurde ein Modell der Wechselwirkung zwischen dem Rechten Terminus von PSTVd und dem Loop D der 5 S-RNA erstellt, das in Teil C der Abb. 4.46 dargestellt ist. Das Nukleotid C92 steht innerhalb der in Abb. 4.46C gezeigten Wechselwirkung dem U177 des PSTVd diagonal gegenüber. An dieser Position wurde jedoch kein Abbruchsignal in der *primer extension* der Komplexe auf der PSTVd-RNA nachgewiesen. Dies könnte bedeuten, dass alle Komplexe, an denen eine Wechselwirkung zwischen dem Rechten Terminus von PSTVd und dem Loop D der 5 S-RNA stattfindet, einen Crosslink an Position C181/U84 aufweisen, aber nur ein Teil der Moleküle einen Crosslink an Position U177/C91 (jeweils PSTVd/5 S-RNA). Grund dafür könnte zum einen sein, dass sich (z.B. aus sterischen Gründen) an Position C181/U84 ein Crosslink leichter bildet oder dass nur

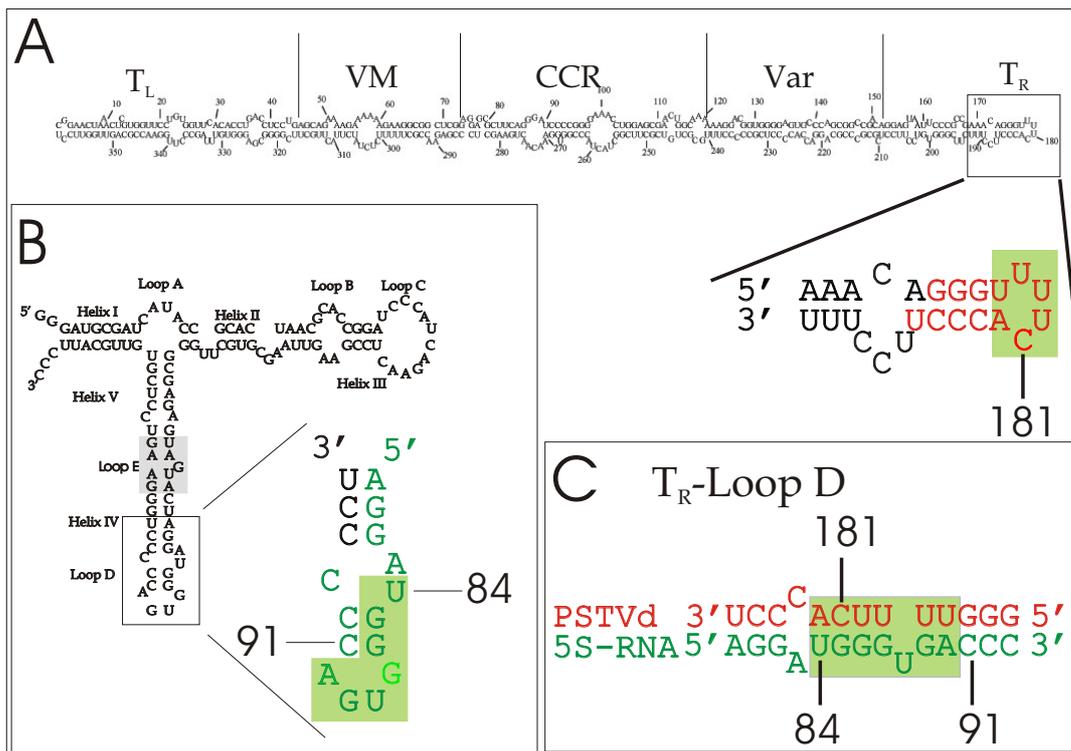


Abbildung 4.46: Modell der Wechselwirkung zwischen 5 S-RNA und dem Rechten Terminus von PSTVd.

A) Sekundärstruktur des PSTVd. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung des Rechten Terminus von PSTVd

B) Sekundärstruktur der 5 S-RNA. Der Ausschnitt zeigt eine Vergrößerung des Loop D der 5 S-RNA

C) Modell der Komplexe im Bereich des Rechten Terminus von PSTVd und des Loop D der 5 S-RNA

Die an der Wechselwirkung beteiligten Nukleotide von PSTVd sind jeweils rot (Nukleotide 174 bis 186), von 5 S-RNA grün (Nukleotide 80 bis 93) markiert, an den gekennzeichneten Nukleotid-Positionen wurden Quervernetzungen nachgewiesen. Grün unterlegt ist eine verkürzte Wechselwirkung, an der hauptsächlich bei den unkomplexierten Molekülen ungepaarte Nukleotide beteiligt sind.

in einem Teil der Komplexe die gesamte Wechselwirkung stattfindet. Da die Verlängerung der Primer in der *primer extension*-Reaktion von 3' nach 5' verläuft, könnte in diesem Fall der Crosslink auf der 5S-RNA nachgewiesen werden, auf PSTVd aber nicht. Alternativ ist möglich, dass sich an Position C92 ein intramolekularer Crosslink der 5S-RNA befindet. Dies ist aber unwahrscheinlich, da mittels Tinoco-Plot der 5S-RNA *in silico* keine Helix zu finden war, innerhalb der das Cytosin an Position C91 quervernetzbar wäre. Wiederum wurde eine Abschätzung der Stabilität mit Hilfe des Programms *mfold* 3.2 durchgeführt. Es ergab sich dabei eine Freie Energie der Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5S-RNA von $-14,7$ kcal/mol, die einer Freien Energie von $-18,7$ kcal/mol

gegenüber steht, die verloren geht, da die intramolekularen Basenpaaren nicht stattfinden können. Wahrscheinlicher ist demnach die Ausbildung einer verkürzten Wechselwirkung, an der hauptsächlich Nukleotide beteiligt sind, die in den unkomplexierten Molekülen basengepaart sind (Abb 4.46, eingerahmter Bereich). Dieser *Kissing-Loop*-Kontakt umfasst drei GU-, zwei AU- und ein GC-Basenpaar. Findet diese Wechselwirkung statt, so können seitens PSTVd ein AU- und seitens der 5S-RNA zwei GC-Basenpaare nicht gebildet werden. Eine Berechnung der Freien Energie dieser Wechselwirkung kann nicht mit Hilfe des Programms *mfold* durchgeführt werden. Vergleichbare *Kissing-Loop*-Wechselwirkungen wurden immerhin bereits beschrieben.

Es erscheint grundsätzlich möglich, dass zwischen einem PSTVd- und einem 5S-RNA-Molekül gleichzeitig der Kontakt Var-Helix V und T_R-Loop D ausbildet. Dieser gesamte Komplex zwischen PSTVd und 5S-RNA ist in Abb. 4.47A schematisch dargestellt. Einen Ausschnitt der Sekundärstruktur des Komplexes im Bereich der wechselwirkenden Nukleotide zeigt Abb. 4.47B.

Diskussion

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Bestimmung der genauen Positionen der Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5 S-RNA. Mit verschiedenen, sich ergänzenden Methoden wurden die wechselwirkenden Bereiche eingegrenzt sowie Interaktionspunkte auf beiden Molekülen bestimmt und einander zugeordnet. Basierend auf einer Analyse der Komplementarität dieser Sequenzabschnitte konnten Modelle zweier Bindestellen, die sich in der Variablen Region und am Rechten Terminus von PSTVd befinden, entwickelt werden.

5.1 Methodische Gesichtspunkte

5.1.1 *In vitro*-Komplexeinstellung

Komplexe zwischen PSTVd und 5 S-RNA wurden von Aschermann (2001) aus Protoplasten infizierter Kartoffelzellkulturen und von Krause (2002) aus Zellkernen infizierter Tomatenpflanzen aufgereinigt und nachgewiesen. Diese Untersuchungen, welche die Existenz der Komplexe *in vivo* belegten, ließen allerdings keine Aussagen über deren Eigenschaften zu. Zur genaueren Charakterisierung der Wechselwirkung war es daher nötig, die Komplexe *in vitro* herzustellen. Es ist nicht sicher, ob die Eigenschaften der *in vivo* existierenden und der *in vitro* hergestellten Komplexe vollständig übereinstimmen. Dennoch können letztere als sinnvolle Modellsysteme für die *in vivo* nachgewiesene Wechselwirkung betrachtet werden.

Zur Komplexeinstellung wurden vorwiegend *in vitro*-Transkripte verwendet. PSTVd-*in vitro*-Transkripte nehmen nach thermodynamischer Struktureinstellung die gleiche stäbchenförmige Struktur ein, in der PSTVd in der Pflanze vorliegt. Sie sind aber im Gegensatz zu aus Pflanzen aufgereinigtem PSTVd nicht zirkulär geschlossen. Um auszuschließen, dass die Position dieser „offenen“ Stelle einen Einfluss auf die Komplexbildung hat, wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere PSTVd-Transkripte mit unterschiedlichen Endpunkten eingesetzt (Abschnitt 2.2.3).

5.1.2 Aufreinigung der Komplexe

Für die *primer extension*-Analysen mit PSTVd-spezifischen Primern wurden die Komplexe aufgereinigt, indem sie einer 5 S-RNA-spezifischen Affinitätschromatographie unterzogen wurden. Mit Hilfe dieses Verfahrens werden ausschließlich PSTVd-Moleküle, die kovalent an 5 S-RNA gebunden sind, aufgereinigt. Die Waschbedingungen wurden so gewählt, dass die Komplexe ohne Quervernetzung dissoziieren (Abschnitte 1.3.2 und 3.2 und Remennik, 2003). Eine unspezifische Bindung der RNAs an die paramagnetischen Partikel findet nach den Angaben von Aschermann (2001) unter den gewählten Bedingungen ebenfalls nicht statt. Somit könnte allenfalls eine geringe Menge von nicht kovalent an 5 S-RNA gebundenem PSTVd nach der Aufreinigung vorhanden sein. Entsprechendes gilt für ungebundene 5 S-RNA nach einer Aufreinigung der Komplexe mit PSTVd-spezifischen Primern vor den 5 S-RNA-spezifischen *primer extension*-Analysen.

5.1.3 Vergleich der Methoden zur Bestimmung der Bindestelle

Zur genauen Charakterisierung der Wechselwirkungsposition zwischen PSTVd und 5 S-RNA wurden verschiedene Methoden eingesetzt, die sich ergänzende Informationen lieferten. In den folgenden Abschnitten wird erläutert, was die einzelnen Methoden leisten können und wo deren Grenzen liegen.

Die Bindefähigkeit verschiedener verkürzter Transkripte eines oder beider Wechselwirkungspartner kann mittels RNA-RNA-Gelshift oder Filterhybridisierung untersucht werden. Auf diese Weise kann sicher bestimmt werden, ob der von dem Transkript repräsentierte Sequenzbereich an die andere RNA direkt binden kann oder nicht. Es muss dabei aber berücksichtigt werden, dass die Konkurrenz intramolekularer Basenpaare bei

der Komplexbildung der verkürzten Transkripte schwächer oder auch stärker sein kann als bei Molekülen voller Länge. Diese Methode eignet sich sehr gut zur schnellen Eingrenzung des wechselwirkenden Bereichs und hat den Vorteil, dass ausschließlich Bereiche identifiziert werden, die *direkt* an der Wechselwirkung beteiligt sind.

Kompetitionsexperimente lassen indirekte Schlüsse über die Wechselwirkungsposition zu. Konkurriert die Anwesenheit eines Oligonukleotids mit der Komplexbildung, so belegt dies, dass der von ihm gebundene Bereich an der Wechselwirkung beteiligt ist. Ist die Komplex-Ausbeute bei Zugabe eines Oligonukleotids erhöht, so legt dies nahe, dass durch dessen Bindung der wechselwirkende Bereich zugänglicher gemacht wird. Grund dafür könnte sein, dass das Oligonukleotid an den Gegenstrang der Wechselwirkungsposition bindet. Zu berücksichtigen ist, dass auch eine Bindung von Oligonukleotiden in nicht wechselwirkenden Bereichen die Komplexbildung beeinflussen kann, z.B. indem die Struktur des Moleküls destabilisiert wird oder die Bildung einer bestimmten Sekundärstruktur induziert wird.

Anhand der *primer extension*-Analysen können Interaktionspunkte zwischen zwei Nucleinsäure-Molekülen identifiziert werden. Zu diesem Zweck müssen zuvor Psoralen-vermittelte Quervernetzungen eingeführt werden, die sich ausschließlich innerhalb einer Helix bilden können. Eine Quervernetzung belegt somit eindeutig die Existenz von mindestens zwei Basenpaaren an der entsprechenden Position. Diese können a priori intra- und intermolekularer Natur sein.

Die Bestimmung der Position quervernetzter Nucleotide mittels *primer extension* beruht darauf, dass an diesen Stellen die Reaktion der Primer-Verlängerung abbricht. Dies erfolgt an der gesuchten intermolekularen, aber auch an intramolekularen Crosslinks. Darüber hinaus finden Abbrüche aber auch an Psoralen-Monoaddukten und an strukturellen Merkmalen statt (vgl. Abschnitte 4.2.3 und 4.2.5). Mit Hilfe von Referenzproben der jeweiligen unkomplexierten RNA können die Komplex-spezifischen Abbruchsignale identifiziert werden. Diese zeigen aber nicht unbedingt die Position der Wechselwirkung an, sondern können auch auf eine Veränderung der Struktur nicht wechselwirkender Bereiche zurückzuführen sein.

Bei dieser Vorgehensweise kann folglich nicht ausgeschlossen werden, dass die RNAs gar nicht miteinander quervernetzt sind, sondern alle Komplex-spezifischen Abbruchsignale auf Veränderungen innerhalb nicht wechselwirkender Bereiche zurückzuführen sind.

Dies ist vor allem dann zu befürchten, wenn nur sehr niedrige Psoralen-Konzentrationen eingesetzt werden können. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein Konzept entwickelt, durch das sicher gestellt ist, dass ausschließlich quervernetzte Komplexe untersucht werden. Die Sensitivität des Verfahrens wird erhöht, da der Hintergrund unkomplexierter Moleküle entfernt wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die für eine anschließende *primer extension*-Analyse tolerable Psoralen-Konzentration der RNA-Quervernetzung bereits deutlich variiert, wenn unterschiedliche Bereiche des gleichen Moleküls untersucht werden (Abschnitt 4.2.2). Eine eingehende Optimierung der Quervernetzungsbedingungen ist beim Einsatz dieser Methode unerlässlich.

Werden mehrere Komplex-spezifische Abbruchsignale nachgewiesen und erstrecken sich diese über einen größeren Bereich des Moleküls, so können ergänzend Komplexe zwischen verkürzten Transkripten der RNAs mittels *primer extension* untersucht werden. Nach der Komplexbildung erfolgt in diesem Fall die Aufreinigung mit einer Sonde, welche an die verkürzte RNA bindet. Die anschließende *primer extension* findet mit einem Primer statt, der an die andere RNA bindet. Treten keine Produkt-Banden auf, obwohl in dem von dem Transkript repräsentierten Bereich Quervernetzungen nachgewiesen wurden, so ist der entsprechende Sequenzabschnitt nicht direkt an der Wechselwirkung beteiligt. Er hat in diesem Fall aufgrund der Komplexbildung eine Konformationsänderung erfahren. Das Auftreten von Produkten belegt dagegen, dass der Abschnitt direkt an der Wechselwirkung beteiligt ist. Des Weiteren lassen Unterschiede zwischen dem *primer extension*-Abbruchmuster dieser „Teiltranskript-Komplexe“ und dem der Vollängentranskript-Komplexe ggf. genauere Aussagen über die Bindestellen zu. In der vorliegenden Arbeit konnten auf diese Weise verschiedene *primer extension*-Signale der PSTVd- und der 5S-RNA-spezifischen Analysen einander zugeordnet werden (vgl. Abschnitt 4.3.3).

Das Verfahren kann auch zur Untersuchung von RNA-RNA-Wechselwirkungen *in vivo* bzw. *in situ* angewandt werden. Psoralen-vermittelte Quervernetzungen können in diesem Fall an Protoplasten, isolierten Zellkernen oder direkt in der Pflanze eingeführt werden (Krause, 2002; Thiel, 1999; Gruner, 1992). Die Kombination verschiedener Methoden ermöglicht auch die Untersuchung von durch eine RNA-RNA-Wechselwirkung induzierte Konformationsänderungen. Funktionelle Konformationsänderungen von RNAs wurden bereits beschrieben; ein Beispiel sind regulatorische Bereiche von mRNAs, sogenannte *Riboswitches* (Edwards *et al.*, 2007). Ein weiteres Beispiel sind Konformationsänderungen

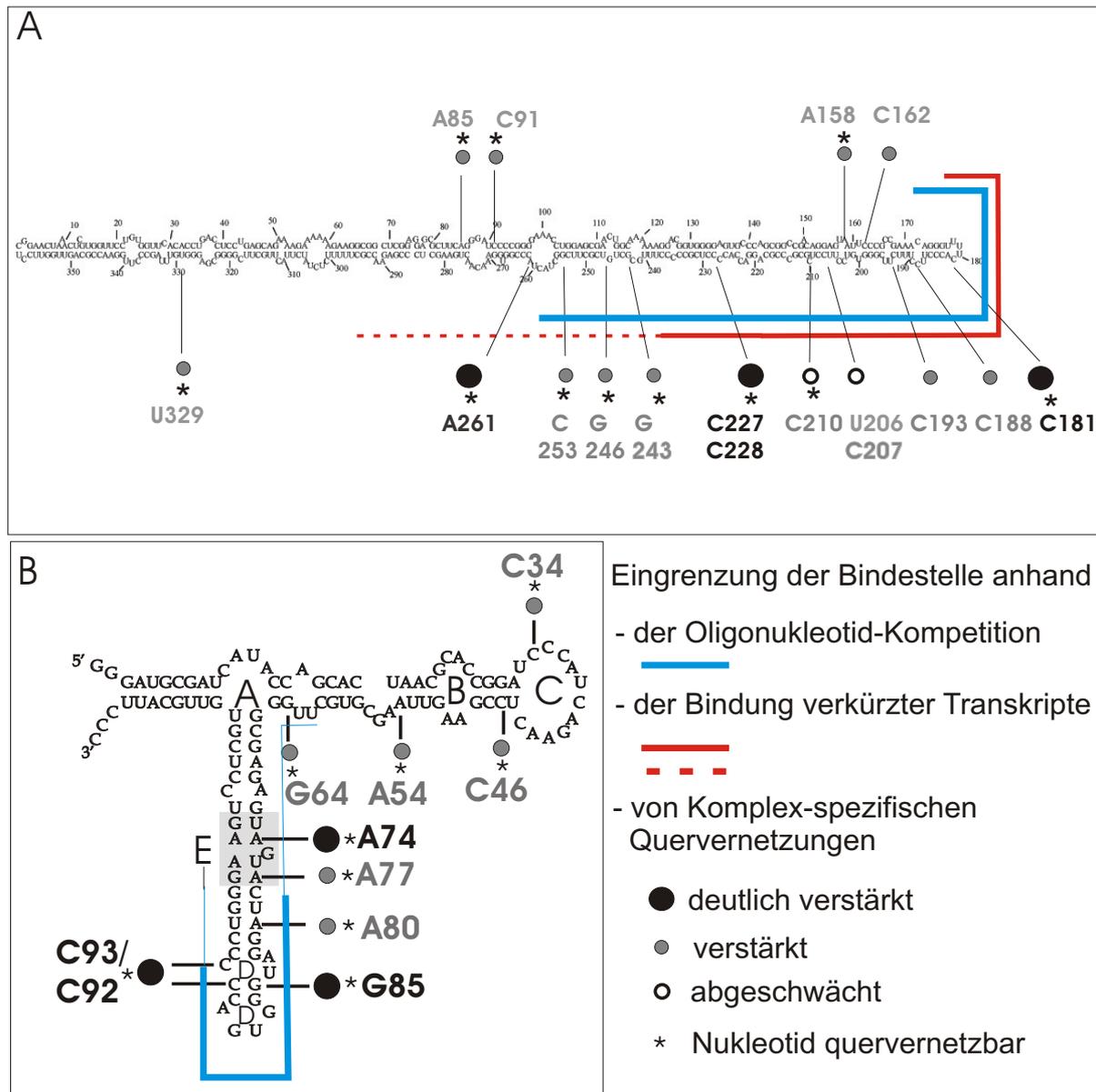


Abbildung 5.1: Vergleich der mit den verschiedenen Methoden eingegrenzten Wechselwirkungspositionen. A) PSTVd B) 5 S-RNA. Die Positionen auf der 5 S-RNA wurden ausschließlich mittels *primer extension* und Oligonukleotid-Kompetition bestimmt.

der 5 S-RNA, die sich auf die Funktionsfähigkeit der Ribosomen auswirken (Kouvela *et al.*, 2007).

Bei der Anwendung dieser Methode muss stets berücksichtigt werden, dass ausschließlich Wechselwirkungen nachgewiesen werden können, die zwei einander gegenüberliegende Pyrimidine enthalten. Cytosine haben dabei gegenüber Uracilen eine signifikant niedrigere Bindekonstante für Psoralen (Cimino *et al.*, 1985).

Innerhalb der Wechselwirkung Var-Helix V sind die Nukleotide C226 und U73 quervernetzt, was die Existenz der Basenpaare C226-G74/A225-U73 eindeutig belegt (Abschnitte 4.2.5 und 4.2.6). In Übereinstimmung dazu wurde mittels RNA-RNA-Gelshift gezeigt, dass der den Crosslink enthaltende Bereich (Nukleotide 220 bis 242) von PSTVd essentiell für die Ausbildung dieser Wechselwirkung ist (Abschnitt 4.3.1). Sowohl dieser Sequenzabschnitt als auch die an der Wechselwirkung beteiligten Nukleotide der 5S-RNA sind innerhalb der unkomplexierten Moleküle hauptsächlich basengepaart (siehe Abschnitt 4.4.1). Demnach konkurriert die Bildung dieser Wechselwirkung mit der Bildung intramolekularer Helices. Eine energetische Betrachtung der Bildung dieser Wechselwirkung belegte jedoch, dass jene gegenüber den intramolekularen Basenpaarungen tatsächlich thermodynamisch günstiger ist.

In direkter Nachbarschaft *downstream* dieser Wechselwirkung befinden sich weitere komplementäre Bereiche (U240 bis G255). Die experimentellen Befunde weisen darauf hin, dass diese weitreichendere Wechselwirkung nicht ausgebildet wird, wenn der Bereich zwischen Nukleotid 220 und 242 fehlt. Nicht ausgeschlossen ist aber, dass sie als Folge der Wechselwirkung Var-Helix V auftritt.

Das Modell der Wechselwirkung zwischen dem Rechten Terminus und dem Loop D umfasst neben dem terminalen Loop auch angrenzende Bereiche (siehe Abschnitt 4.4.2). Innerhalb des Komplexes ist ein Nukleotid des terminalen Loops mit einem Nukleotid des Loop D kovalent quervernetzt, was die Existenz der Basenpaare C181-G83/A180-U84 belegt (Abschnitte 4.2.5 und 4.2.6). Welche Nukleotide darüber hinaus an der Wechselwirkung beteiligt sind, ist nicht sicher. Die Enthalpie der gesamten möglichen Wechselwirkung am Rechten Terminus ist gegenüber der intramolekularen Wechselwirkung der unkomplexierten Moleküle größer, d.h. thermodynamisch ungünstiger. Die Bildung einer verkürzten Wechselwirkung konkurriert dagegen lediglich mit der Bildung weniger intramolekularer Basenpaarungen, da hauptsächlich Loop-Nukleotide beider Moleküle an diesem Kontakt beteiligt sind (Abb. 5.3A). Die Energiebilanz eines solchen *Kissing-Loop*-Wechselwirkung kann nicht auf oben beschriebene Weise berechnet werden, es wurden aber bereits ähnliche Kontakte nachgewiesen (zur Übersicht: Brunel *et al.*, 2002). Wild *et al.* hatten bereits 1980 festgestellt, dass Wechselwirkungen zwischen zwei Hairpin-Loops unter physiologischen Bedingungen durchaus stabil sind. Für die Trinukleotid-Wechselwirkung zweier Moleküle tRNA^{Phe}(yeast) an den terminalen Loop sowie den benachbarten internen Loop wurde in

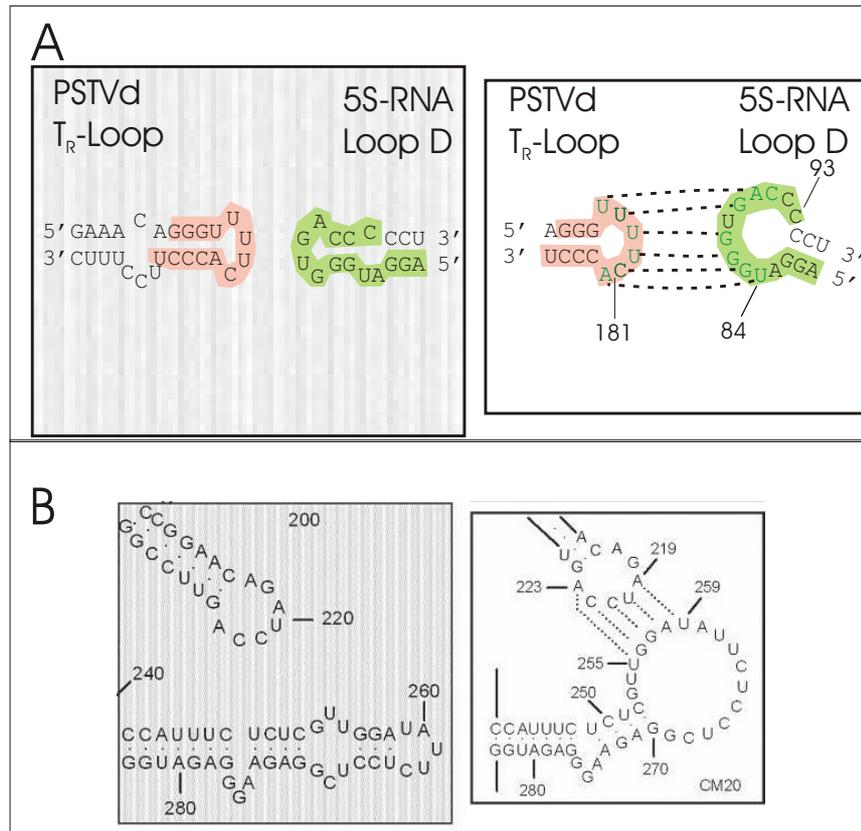


Abbildung 5.3: Kissing-Loop-Wechselwirkung A) zwischen dem rechten terminalen Loop von PSTVd und dem Loop D der 5 S-RNA. Der grün bzw. rosa unterlegte Bereich kennzeichnet den gesamten komplementären Bereich T_R-Loop D. Grün gefärbt sind jene Nukleotide, die an dem Loop-Loop-Kontakt beteiligt sind. B) intramolekularer *Kissing-Loop* bei CChMVd.

der soeben genannten Studie eine Bindekonstante von $7,5 \cdot 10^5$ gemessen. Li *et al.* (2006) zeigten, dass sogar ein minimaler, nur aus zwei GC-Basenpaaren bestehender *Kissing-Loop* bei 22 °C mechanisch stabil ist. In Abb. 5.3B ist zum Vergleich der intramolekulare *Kissing-Loop* des Viroids CChMVd, das eine verzweigte Struktur aufweist, gezeigt. Eine ähnliche Wechselwirkung, allerdings intramolekularer Natur, wird beispielsweise von dem Viroid CChMVd, das eine verzweigte Struktur aufweist, dargestellt (Gago *et al.*, 2005).

Fraglich ist, ob innerhalb des *in vitro*-Komplexes zwischen einem PSTVd- und einem 5 S-RNA-Molekül beide Wechselwirkungen gleichzeitig ausgebildet werden. Dies ist immerhin aufgrund der Lage der komplementären Bereiche auf Sekundärstrukturebene möglich (Abschnitt 4.4). Die RNA-RNA-Gelshift-Analysen legen nahe, dass die 5 S-RNA-Dimerbildung durch die Interaktion mit PSTVd gestört wird und die 5 S-RNA im Komplex mit PSTVd somit monomer vorliegt (Abschnitt 4.3.1). Es ist aber dennoch nicht

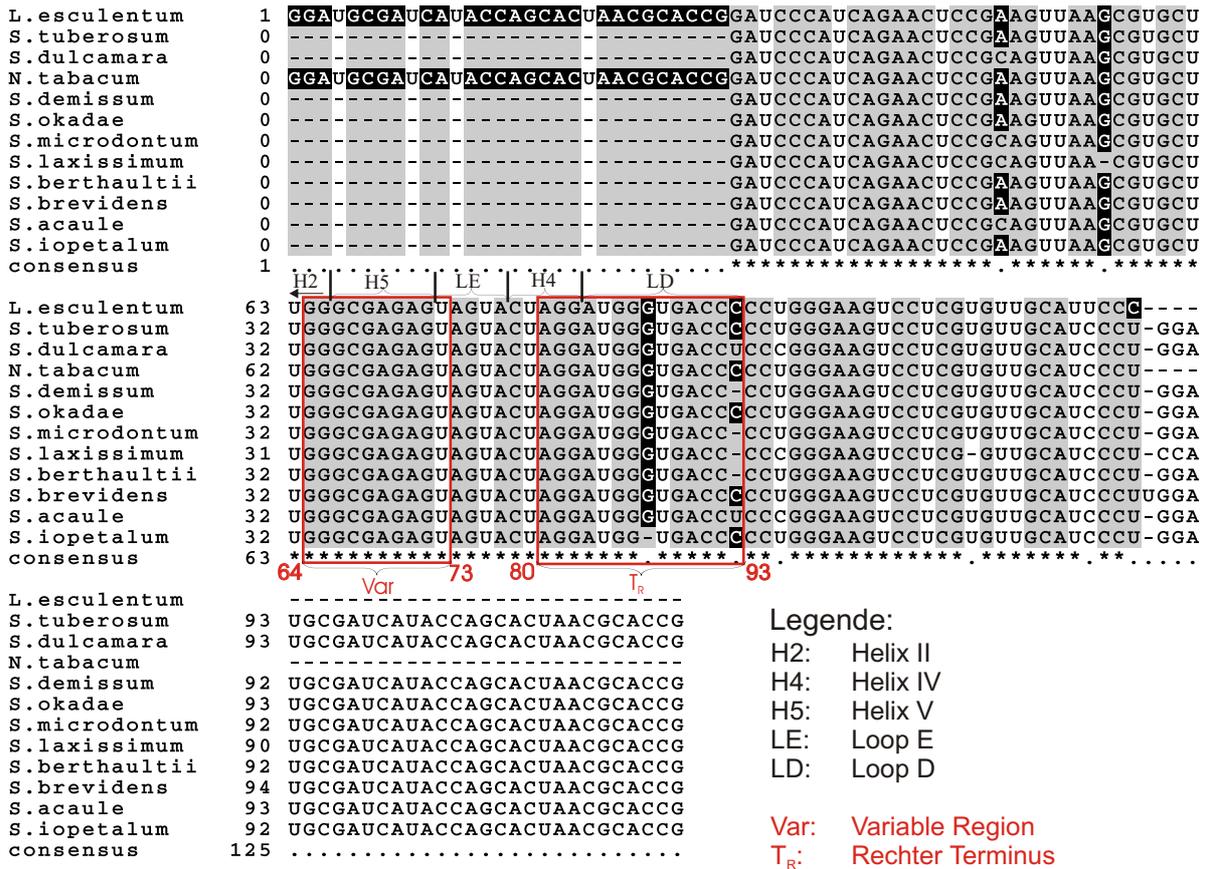


Abbildung 5.4: Sequenzvergleich der 5 S-RNA verschiedener *Solanaceae*. Das Alignment wurde mit Hilfe des Programms *ClustalW* erstellt. An Positionen, an denen die Sequenzen nicht vollständig übereinstimmen, sind jene Nukleotide schwarz unterlegt, die der 5 S-RNA aus Tomate entsprechen. Die roten Rahmen kennzeichnen die Sequenzbereiche auf dem 5 S-RNA-Molekül, die bei der Komplexbildung zwischen der 5 S-RNA aus Tomate und PSTVd dem Modell nach basengepaart sind. Die Position der die Wechselwirkung begrenzenden Nukleotide der 5 S-RNA ist unterhalb seitlich und die Region auf PSTVd, mit der die Wechselwirkung ausgebildet wird, unterhalb der Rahmen angegeben. Der Name des Strukturbereichs, den die jeweilige Sequenz innerhalb der unkomplexierten 5 S-RNA einnimmt, befindet sich oberhalb der Sequenzen.

ausgeschlossen, dass innerhalb des Komplexes zwei 5 S-RNA-Moleküle an verschiedenen Positionen von PSTVd binden.

5.2.1 Sequenzvergleich der 5 S-RNA zwischen verschiedenen Vertretern der *Solanaceae*

Zu den Wirtspflanzen von PSTVd gehören neben der Tomate verschiedene weitere Pflanzen. Sollte die nachgewiesene Wechselwirkung von biologischer Relevanz sein, so wäre eine Voraussetzung, dass sie auch in den anderen Wirtspflanzen stattfinden kann. Der Großteil

der infizierbaren Pflanzen gehört der Familie der *Solanaceen* an. Ein Sequenz-Alignment zeigt, dass weite Teile der Sequenz der 5 S-RNA zwischen den verschiedenen Vertretern der *Solanaceen* konserviert sind (Abb. 5.4). Dies gilt auch für die wechselwirkenden Bereiche. Der mit der Variablen Region wechselwirkende Bereich (Helix V) stimmt in allen Sequenzen vollständig überein. Innerhalb des Sequenzbereichs, der mit dem Rechten Terminus basenpaart (Loop D), haben lediglich an zwei Positionen Basenaustausche stattgefunden. In allen Fällen erscheint eine Komplexbildung möglich. Die Deletion des Nukleotids G87 der 5 S-RNA von *Solanum iopetalum* könnte allerdings einen deutlichen Einfluss auf die Komplexbildung mit PSTVd haben. Es ist aber nicht erwiesen, ob diese eine Wirtspflanze von PSTVd ist (Singh *et al.*, 2003).

Die Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*) ist nachweislich keine Wirtspflanze von PSTVd (Daròs & Flores, 2004; Matoušek *et al.*, 2004), obwohl die Wirtsfaktoren zur Replikation vorhanden zu sein scheinen. Die im Komplex zwischen PSTVd und 5 S-RNA basengepaarten Bereiche stimmen aber zwischen Tomate und *Arabidopsis* fast vollständig überein (siehe Abb. 5.5), so dass eine Wechselwirkung zwischen PSTVd und der *Arabidopsis*-5 S-RNA möglich ist. Es besteht demnach kein Zusammenhang zwischen der Tatsache, dass die *Arabidopsis* keine Wirtspflanze ist und der Komplexbildung zwischen PSTVd und 5 S-RNA.

5.2.2 Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen Vertretern der Gattung *Pospiviroids*

Sollte die Wechselwirkung mit der 5 S-RNA eine allgemeingültige Funktion haben, so wäre zu erwarten, dass sie auch von anderen Vertretern der *Pospiviroidae* ausgebildet werden kann. Der Name „Variable Region“ bezieht sich auf die Tatsache, dass dieser Bereich zwischen nah verwandten *Pospiviroidae* relativ stark variiert (Keese & Symons, 1985). Daher wurde ein Sequenz-Alignment zwischen verschiedenen Vertretern der Familie der *Pospiviroidae* durchgeführt, die allesamt zur Gattung der *Pospiviroids* gehören. Dies ist in Abb. 5.6A dargestellt und zeigt, dass der mit der 5 S-RNA wechselwirkende Bereich innerhalb der Variablen Region zwischen jenen *Pospiviroids*, deren Wirtspflanzen hauptsächlich zu den *Solanaceen* gehören, lediglich an einer Position abweicht. Die Komplementarität dieser Viroid-Spezies zur 5 S-RNA ist in Abb. 5.6B in der ersten Spalte dargestellt. Die

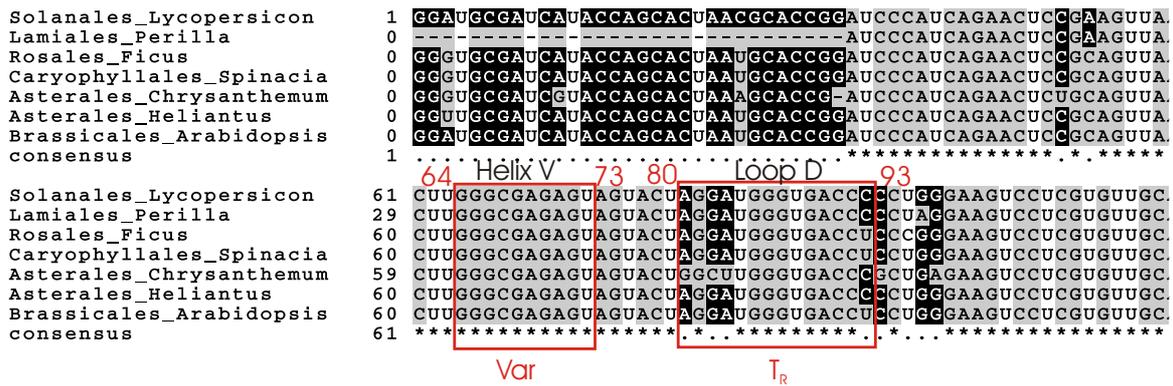


Abbildung 5.5: Sequenzvergleich der 5 S-RNA verschiedener angiospermer Pflanzen. Die Pflanzen gehören unterschiedlichen Ordnungen innerhalb der Klasse der Rosopsida an. Das *Alignment* wurde mit Hilfe des Programms *ClustalW* erstellt. An Positionen, an denen die Sequenzen nicht vollständig übereinstimmen, sind jene Nukleotide schwarz unterlegt, die der 5 S-RNA aus Tomate entsprechen. Die roten Rahmen kennzeichnen die Sequenzbereiche auf dem 5 S-RNA-Molekül, in denen bei dem Modell der Komplexbildung Basenpaarungen mit PSTVd stattfinden. Die Angaben zur Position der die Wechselwirkung begrenzenden Nukleotide und des Sequenzbereichs von PSTVd, mit dem die Wechselwirkung ausgebildet wird, befindet sich unterhalb der Rahmen.

allenfalls geringfügigen Veränderungen betreffen hauptsächlich ungepaarte Nukleotide. Einige Sequenzen erlauben sogar eine verlängerte Wechselwirkung.

Die Wirtspflanzen von CSVd, CIVd, IrVd und CEVd gehören nicht zu den *Solanaceen*. Lediglich die Sequenz der 5 S-RNA der Chrysanthe ist aber bekannt. Ansonsten standen nur 5 S-RNA-Sequenzen von Pflanzen zur Verfügung, die zur gleichen Ordnung wie die Wirtspflanze der jeweiligen Viroid-Spezies gehören. Ein Sequenz-*Alignment* dieser RNAs zeigt immerhin eine vollständige Übereinstimmung der Sequenz im Bereich der Helix V (Abb. 5.5). Setzt man voraus, dass dies tatsächlich auch für die 5 S-RNA der tatsächlichen Wirtspflanzen gilt, so ändert sich die Komplementarität bei CEVd und CIVd nur geringfügig, bei IrVd und CSVd jedoch deutlich. Alle Sequenzen erlauben die Ausbildung von mindestens 9 Basenpaaren, wobei indes an unterschiedlichen Positionen Fehlpaarungen vorhanden sind (Abb. 5.6B, 2. Spalte).

Die Sequenz der Bindestelle am Rechten Terminus ist zwischen allen Vertretern der Gattung *Pospiviroids*, deren Wirtspflanzen zu den *Solanaceen* gehören, vollständig konserviert (Abb. 5.7A). Dies gilt darüber hinaus für CSVd und CLVd. Die Sequenz der Bindestelle auf Seiten der 5 S-RNA (Loop D) weicht bei der Chrysanthe deutlich gegenüber der Tomate ab. Zwischen allen anderen Pflanzen variiert die Sequenz lediglich an

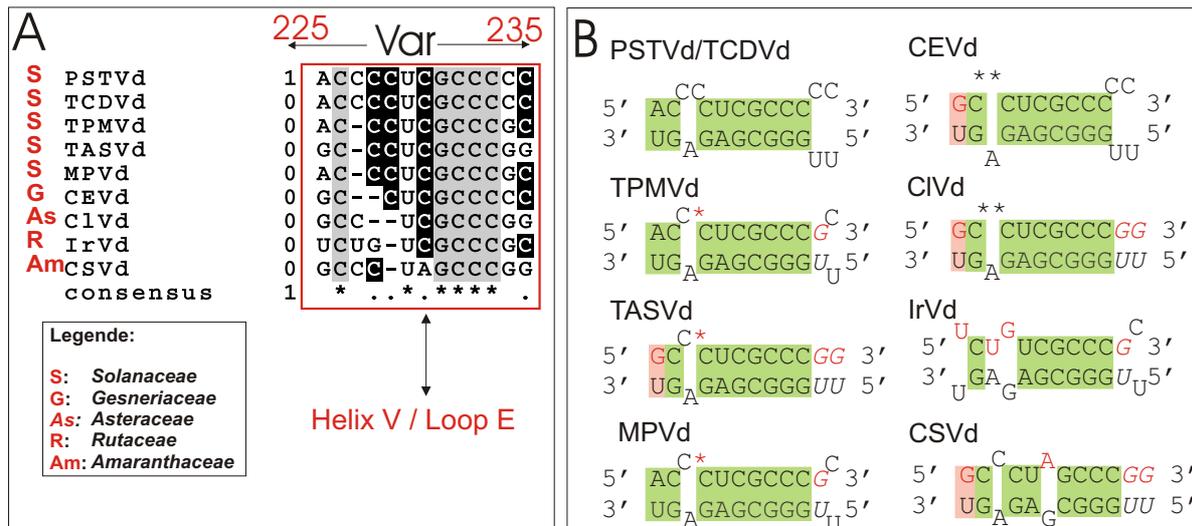


Abbildung 5.6: Sequenzvergleich verschiedener Vertreter der Gattung *Pospiviroids* im Bereich der Variablen Region. A) Sequenz-Alignment eines Ausschnitts der Variablen Region verschiedener *Pospiviroidae*. Der gewählte Sequenzbereich enthält dem Modell nach Basenpaare zwischen PSTVd und 5S-RNA. Das Alignment wurde mit dem Programm *ClustalW* erstellt und manuell nachbearbeitet. Die Angaben zur Position der die Wechselwirkung begrenzenden Nukleotide befindet sich oberhalb, der Name des Sequenzbereichs der 5S-RNA, mit dem die Wechselwirkung ausgebildet wird, oberhalb des roten Rahmens. Seitlich ist angegeben, welcher Familie die Wirtspflanzen der jeweiligen Viroid-Spezies hauptsächlich angehören. B) Sequenzkomplementarität verschiedener *Pospiviroidae* im Bereich der Variablen Region und der Helix V der 5S-RNA. Die gegenüber PSTVd abweichenden Nukleotide sind rot gekennzeichnet; kursiv sind Positionen, an denen gegenüber PSTVd und 5S-RNA zusätzliche Basenpaare möglich sind. Positionen, an denen Nukleotide gegenüber PSTVd fehlen, sind mit Sternchen markiert. Komplementäre Bereiche, die genau übereinstimmen, sind hell grün unterlegt. Rosa unterlegt sind Positionen, an denen die Komplementarität übereinstimmt, aber der Typ des resultierenden Basenpaars verändert ist.

einer Position (Abb. 5.5). Die Komplementarität der Rechten Termini von CSVd, CIVd, CEVd und IrVd zu dem Bereich des Loop D der entsprechenden 5S-RNA ist in Abb. 5.7B dargestellt. In allen Fällen ist die Ausbildung von Basenpaaren zwischen den Nukleotiden des terminalen Loops mit Loop D-Nukleotiden der 5S-RNA möglich. Die Komplementarität der 5S-RNA gegenüber CIVd und PSTVd stimmt genau überein. Während CSVd im Bereich der verkürzten Wechselwirkung ebenfalls die gleichen Basenpaare mit der 5S-RNA ausbilden kann wie PSTVd, sind randständig Veränderungen erkennbar. Bei CEVd und IrVd weicht die Sequenz des Rechten Terminus deutlich von PSTVd ab, was sich auch in einer veränderten Komplementarität zur 5S-RNA widerspiegelt. Die Sequenz lässt aber ebenfalls eine Wechselwirkung zwischen den Nukleotiden des terminalen Loops und dem Loop D zu, die von komplementären Bereichen umgeben sind.

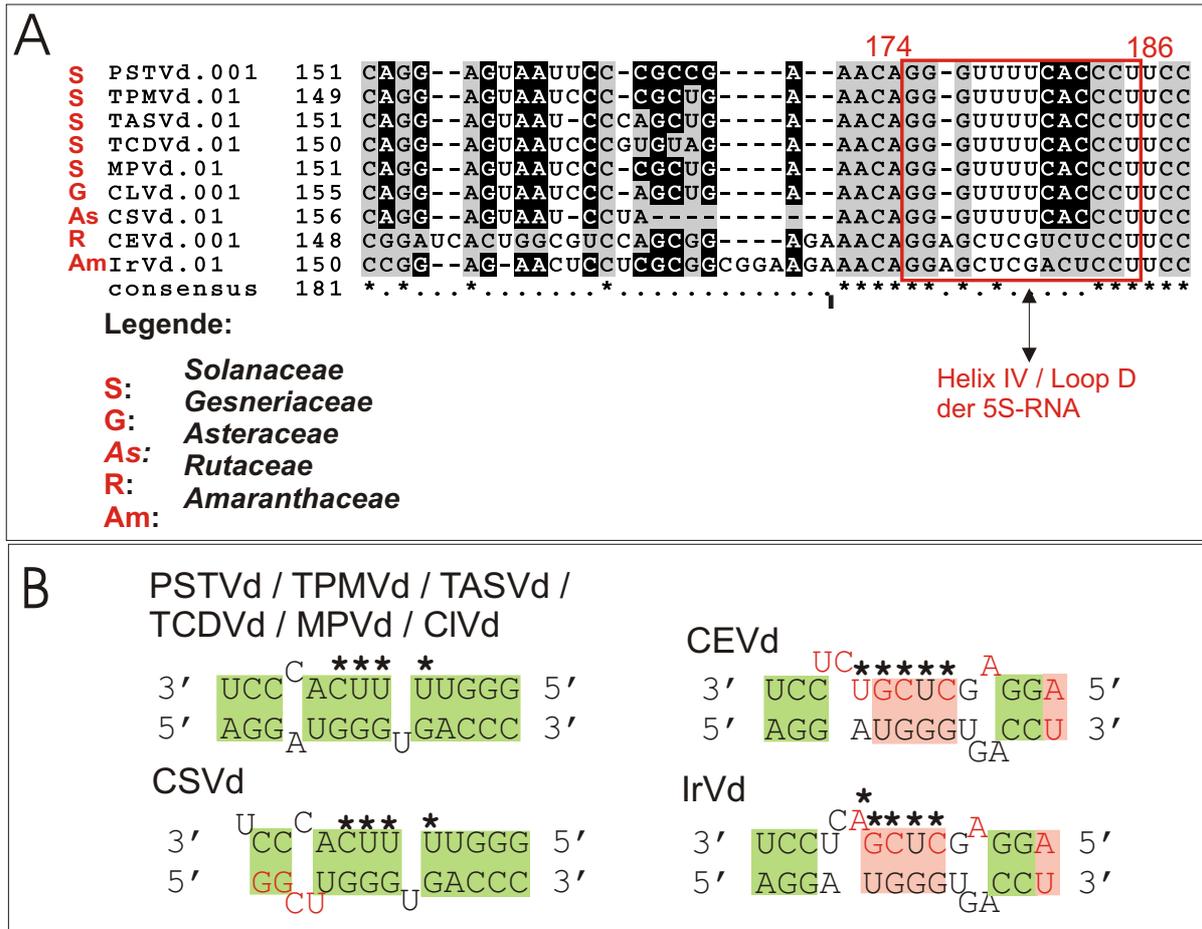


Abbildung 5.7: Sequenzvergleich verschiedener Vertreter der Gattung *Pospiviroids* im Bereich des Rechten Terminus. A) Sequenz-Alignment des Rechten Terminus verschiedener Vertreter der *Pospiviroids*. Das Alignment wurde mit Hilfe des Programms *ClustalW* erstellt. Seitlich ist angegeben, welcher Familie die Wirtspflanzen der jeweiligen Viroid-Spezies hauptsächlich angehören. Erläuterungen zu den verwendeten Sequenzen der 5S-RNA entsprechen den Angaben in Abb. 5.6. Die roten Rahmen kennzeichnen den Sequenzbereich, der bei der Komplexbildung mit der 5S-RNA dem Modell nach basengepaart ist. Die Angaben zur Position der die Wechselwirkung begrenzenden Nukleotide befindet sich oberhalb, der Name des Sequenzbereichs der 5S-RNA, mit dem die Wechselwirkung ausgebildet wird, unterhalb der Rahmen. B) Sequenzkomplementarität zwischen der 5S-RNA und dem Rechten Terminus verschiedener *Pospiviroids*. Die Nukleotide des terminalen Loops sind mit Sternchen gekennzeichnet. Die gegenüber PSTVd bzw. 5S-RNA aus *L. esculentum* veränderten Nukleotide sind rot gekennzeichnet. Komplementäre Bereiche, die genau übereinstimmen, sind grün unterlegt. Rosa unterlegt, sind Positionen, an denen Basenpaare möglich, aber ihr Typ verändert ist.

Der Sequenzvergleich der wechselwirkenden Bereichs zwischen 5S-RNA-Molekülen verschiedener *Solanaceen* ergab wiederum, dass die Ausbildung beider Kontakte auch in anderen Wirtspflanzen von PSTVd möglich ist und somit von funktioneller Relevanz sein könnte (Abschnitt 5.2.1). Das *Alignment* des rechten Terminus verschiedener Viroid-

Spezies zeigte, dass alle Sequenzen, deren Wirtspflanzen zu den *Solanaceen* gehören sowie CIVd und CSVd, den Kontakt mit dem Loop D der 5 S-RNA erlauben (Abschnitt 5.2.2). Die Sequenz des rechten terminalen Loops ist bei CEVd und IrVd deutlich verändert, trotzdem ist eine ausgeprägte Komplementarität zum Loop D der 5 S-RNA auch bei diesen Spezies vorhanden. Die Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen Vertretern der *Pospiviroids* legten darüber hinaus nahe, dass der Großteil dieser Spezies die Wechselwirkung Var-Helix V ausbilden können. Lediglich bei CSVd erscheint dies fraglich. Es ist daher möglich, dass die Wechselwirkung zwischen 5 S-RNA und PSTVd eine allgemeingültige Funktion hat.

5.3 Mechanismen der Komplexbildung

Die Komplexe wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch thermische Denaturierung und langsames Abkühlen hergestellt, wobei thermodynamisch günstige Strukturen entstehen. Die *in vivo* existierenden Komplexe müssen demgegenüber auch bei niedrigeren Temperaturen entstehen können. Remennik (2003) zeigte, dass sich *in vitro* tatsächlich bereits nach Inkubation bei 37 °C Komplexe zwischen PSTVd und 5 S-RNA bilden können. Diese waren nur nachweisbar, wenn sie durch kovalente Quervernetzung stabilisiert wurden. Es ist wahrscheinlich, dass es sich hierbei um Kontakte zwischen Loop-Bereichen der Moleküle handelt. Auch bei einer Erhöhung der Temperatur auf 47 bzw. 60 °C konnten ausschließlich quervernetzte Komplexe nachgewiesen werden. Zur Entstehung von Komplexen, die ohne Quervernetzung stabil waren und folglich eine längere Wechselwirkung enthalten, war eine Denaturierung bei 90 °C erforderlich. Offenbar konnte diese stabile Wechselwirkung nur ausgebildet werden, nachdem die Sekundärstruktur von PSTVd vollständig aufgelöst wurde, was unter den eingesetzten Salzbedingungen erst bei Temperaturen deutlich oberhalb von 60 °C der Fall ist.

Bezogen auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legt dies nahe, dass bei den bei 37 bis 60 °C gebildeten Komplexen ausschließlich die Wechselwirkung T_R -Loop D besteht und nur nach vorheriger Denaturierung bei 90 °C darüber hinaus die Wechselwirkung Var-Helix V entstehen kann. Tatsächlich denaturiert der mit 5 S-RNA wechselwirkende Sequenzbereich der Variablen Region erst bei hohen Temperaturen (Abschnitt 1.2.1). Dies lässt allerdings fraglich erscheinen, ob sich diese Wechselwirkung *in vivo* zwischen fer-

tig synthetisierten PSTVd- und 5 S-RNA-Molekülen ausbilden kann. Dies wäre bei einer cotranskriptionellen Komplexbildung, die *in vivo* ebenfalls stattfinden könnte, vorstellbar, da in diesem Fall die an der Wechselwirkung Var-Helix V beteiligten Sequenzabschnitte möglicherweise noch zugänglicher wären. Nach Prätranskription *in vitro*, d.h. einer Transkription von PSTVd in Anwesenheit von 5 S-RNA, konnten Komplexe indes nur nach Quervernetzung nachgewiesen werden (Remennik, 2003). In diesem Fall hat demnach wiederum ausschließlich die Wechselwirkung T_R-Loop D stattgefunden. Da in der Zelle indes andere Konzentrationsbedingungen herrschen und zudem Proteine die Komplexbildung positiv beeinflussen könnten, scheint eine Ausbildung der Wechselwirkung *in vivo* dennoch nicht ausgeschlossen.

5.4 Bedeutung der Wechselwirkung

Die Viroid-RNA wurde anhand von Sequenzvergleichen in verschiedene Domänen unterteilt (Keese & Symons, 1985), die zum Teil bestimmten Funktionen zugeordnet werden konnten (siehe Abschnitt 1.2.1). Folglich kann die Position der wechselwirkenden Bereiche möglicherweise Hinweise auf die Bedeutung der Wechselwirkung geben.

5.4.1 Interferierende Wirkung der Wechselwirkung?

Die Variable Region von PSTVd wird vorwiegend mit der Replikation von PSTVd in Zusammenhang gebracht und enthält den Premelting Loop 3 (PM3), den 5'-Teil des Hairpin II und eine GC-Box. Der PM3, also einer der drei Bereiche, welche die geringste thermodynamische Stabilität besitzen, befindet sich in direkter Nachbarschaft zu dem mit 5 S-RNA wechselwirkenden Abschnitt. Mutationen, die den PM3-Bereich stabilisieren, hemmen die Replikation (Hu *et al.*, 1996). Dies beruht wahrscheinlich darauf, dass sie die Ausbildung des Strukturelements Hairpin II erschweren. Der 5 S-RNA-wechselwirkende Bereich auf dem PSTVd-Molekül entspricht genau der 5'-seitigen Teil-Sequenz des HP II. Die Wechselwirkung Var-Helix V konkurriert also mit der Bildung des HP II. Sowohl die (-)- als auch die (+)-Strang-Sequenz von PSTVd erlaubt die Ausbildung dieses Strukturelements. *In vivo* scheint dieses Element aber ausschließlich ein funktioneller Bestandteil (-)-strängiger Replikationsintermediate zu sein. Bislang gibt es aber keine Indizien für eine Ausbildung des HP-II bei der (+)-Strang-abhängigen Transkription. Eine Wechselwirkung zwischen

(-)-strängigem PSTVd und 5 S-RNA wurde ebenfalls *in vitro* nachgewiesen, diese war aber gegenüber der Bindung des (+)-Strangs deutlich schwächer. Es ist indes unwahrscheinlich, dass an dieser Wechselwirkung die entsprechende HPII-Sequenz des (-)-Strangs beteiligt ist, da verkürzte (-)PSTVd-Transkripte, die diesen Bereich enthalten, nicht mit der 5 S-RNA wechselwirkten. Eine interferierende Wirkung der Wechselwirkung zwischen PSTVd und 5 S-RNA durch eine Behinderung der Ausbildung des Hairpin II ist daher unwahrscheinlich.

Die Wechselwirkung Var-Helix V scheint nach diesen Überlegungen *in vivo* nicht ausgeschlossen, es erschließt sich aber weder eine interferierende, noch eine funktionelle Bedeutung aufgrund der Wechselwirkungsposition in der Variablen Region.

5.4.2 Transport von PSTVd

Zur Ausbildung der Wechselwirkung T_R -Loop D *in vivo* müssen nur wenige Basenpaare der fertig synthetisierten PSTVd- bzw. 5 S-RNA-Moleküle denaturiert werden, da es sich um eine „Kissing“-Loop-Wechselwirkung handelt. Eine derartige Wechselwirkung wird erleichtert, wenn sich bestimmte Nukleotide der Loops in geeigneter Weise anordnen. Voraussetzung dafür ist eine gewisse Flexibilität der Loop-Struktur, die Hairpin-Loops sowie internen Loops in der Regel zugesprochen wird (Wild *et al.*, 1980). Eine Struktur-Untersuchung der terminalen Loops von PSTVd zeigte tatsächlich, dass der T_R hochdynamisch ist (Scholtysik, 2006). Nach der initialen Erkennung kann sich – möglicherweise vermittelt durch Proteine – eine weitreichendere Wechselwirkung ausbilden (Brunel *et al.*, 2002). Funktionell bedeutsame kurze Wechselwirkungen zwischen RNAs existieren auch *in vivo* und spielen beispielsweise eine wichtige Rolle beim Spleißvorgang und bei der RNA-Interferenz (Abschnitt 1.1). Intermolekulare „Kissing“-Loop-Interaktionen haben eine wichtige Bedeutung bei verschiedenen Prozessen, z.B. der Dimerisierung retroviraler genomischer RNA (Brunel *et al.*, 2002). Die Ausbildung der intramolekularen *Kissing-Loop*-Wechselwirkung bei CChMVd ist für die *in vitro*-Faltung und die *in vivo*-Stabilität dieses Viroids erforderlich (Gago *et al.*, 2005).

Dem rechten terminalen Loop wird aufgrund einer Mutationsanalyse von Hammond (1994) eine Rolle bei der systemischen Verbreitung von PSTVd in der Pflanze beigegeben. Ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Wechselwirkung T_R -Loop D und dem Transport von PSTVd liegt somit nahe (Abschnitt 1.2.4).

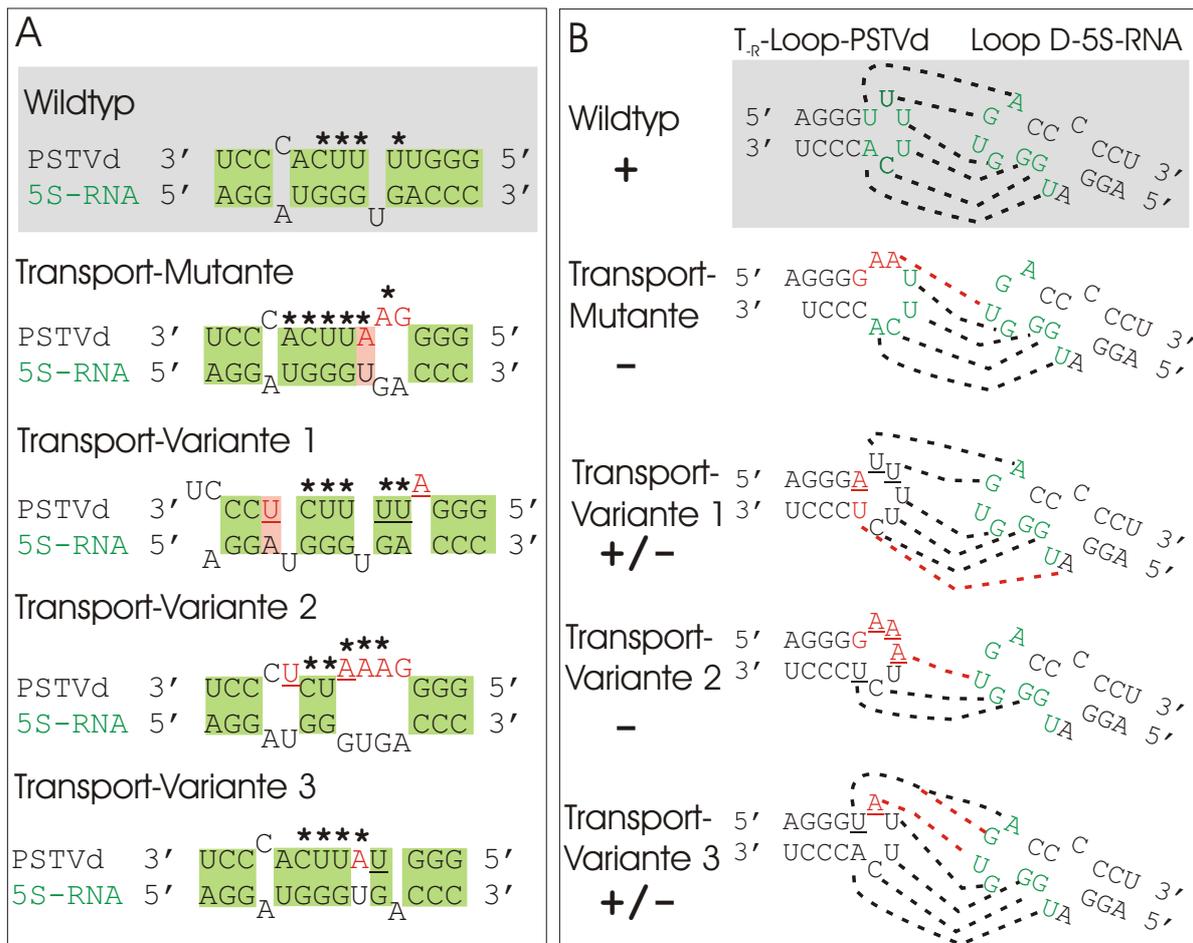


Abbildung 5.8: Sequenzvergleich der verschiedenen, im Bereich des Rechten Terminus veränderten PSTVd-Varianten. Diese Sequenzvarianten wurden von Hammond (1994) beschrieben. A) Vergleich der Sequenzkomplementarität von Wildtyp-PSTVd und der Varianten zur 5 S-RNA. Komplementäre Bereiche, die genau übereinstimmen, sind grün unterlegt. B) Anhand der Sekundärstruktur des Rechten Terminus vom Wildtyp bzw. verschiedener Varianten von PSTVd im Vergleich zu 5S-RNA. Die gestrichelten Linien deuten an, an welchen Positionen eine *Kissing-Loop*-Wechselwirkung stattfinden kann. Die roten gestrichelten kennzeichnen Basenpaare, die zwischen Wildtyp-PSTVd und 5S-RNA nicht gebildet werden können. A und B) Die gegenüber PSTVd veränderten Nukleotide sind rot markiert. Die Nukleotide, die in den Varianten gegenüber der Mutante verändert sind, sind unterstrichen. Bedeutung der Zeichen: - : kein Transport; +/- Transport zum Teil wiederhergestellt; + Transport nicht gestört.

Auch Aschermann (2001) postulierte aufgrund einer ausgeprägten Sequenzkomplementarität zwischen dem rechten terminalen Loop von PSTVd und dem Loop E der 5S-RNA, dass bei PSTVd-Varianten, deren systemische Verbreitung gestört ist (Hammond, 1994), auch die Fähigkeit zur Ausbildung dieser Wechselwirkung eingeschränkt ist.

In der soeben erwähnten Studie von Hammond (1994) wurden Tomatenpflanzen mit einer Mutante infiziert, die ausschließlich nach *Agrobacterium*-vermittelter Inokulation

Tabelle 5.1: Eigenschaften der im Bereich des Rechten Terminus veränderten PSTVd-Varianten und ihre Komplementarität zur 5 S-RNA.

	Gall- und Wurzelgewebe	grüne Blätter	nach mechanischer Inokulation infektiös	Komplementarität zur 5 S-RNA [Bp]
Wildtyp	+	+	+	6
Mutante	-	-	-	4 (+1)
Variante 1	+	+	-	5 (+1)
Variante 2	+	-	-	2 (+1)
Variante 3	+	+	+	5 (+1) bzw. 4(+2)

infektiös war. Eine Sequenzanalyse der in den infizierten Pflanzen auftretenden Viroide zeigte, dass die inokulierte Mutante in den Zellen nicht amplifiziert worden war. Es traten aber neben einer Rückmutation zur Wildtyp-Sequenz drei Varianten von PSTVd auf, deren Sequenz im Bereich der rechten Haarnadelstruktur gegenüber Wildtyp-PSTVd und der inokulierten Mutante verändert war (siehe Abb. 5.8). Diese Varianten unterschieden sich bezüglich ihrer Verbreitung innerhalb der Pflanze (siehe Tab. 5.1).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass der rechte terminale Loop von PSTVd *in vitro* an die 5 S-RNA bindet. Demgegenüber wurde aber gezeigt, dass seitens der 5 S-RNA nicht der Loop E, sondern den Loop D beteiligt ist.

Wie sich die Basenaustausche der von Hammond (1994) analysierten PSTVd-Varianten auf die Komplementarität mit dem Loop D auswirkt, zeigt Abb. 5.8 A. Es ist erkennbar, dass die mögliche Wechselwirkung bei allen PSTVd-Varianten verändert ist. Dabei ist die Komplementarität bei Variante 2 am stärksten gestört, bei der eigentlichen Transportmutante und der Variante 1 leicht reduziert und bei Variante 3 lediglich verändert. Betrachtet man nur die Nukleotide des terminalen Loops, so fällt indes auf, dass bei der eigentlichen Mutante und Variante 2, deren Transportfähigkeit am stärksten gestört ist, die Basenpaare G89-U178 und A90-U177 (5 S-RNA-PSTVd respektiv) nicht ausgebildet werden können. Möglicherweise sind diese essentiell für die korrekte initiale Erkennung bei der *Kissing-Loop*-Wechselwirkung, was den Einfluss dieser Basenaustausche auf die Transportfähigkeit der Viroide erklären könnte.

Die unterschiedliche Verbreitung der Varianten könnte bedeuten, dass verschiedene Faktoren an den Rechten Terminus binden und möglicherweise für unterschiedliche Transportschritte verantwortlich sind. Die soeben vorgenommene Betrachtung der Komplementarität der Transportvarianten von PSTVd mit der 5S-RNA zeigt immerhin, dass die Ausbildung dieser Wechselwirkung durch die Basenaustausche beeinflusst werden könnte. Dies belegt den Zusammenhang zwischen dem Transport des Viroids und der Wechselwirkung mit der 5S-RNA.

Die 5S-RNA wird von der RNA-Polymerase III im Nukleoplasma synthetisiert und gelangt in den Nukleolus, wo sie bei der Assemblierung der Ribosomen benötigt wird. Die Ribosomen werden ins Cytoplasma transportiert. Der intrazelluläre Transport der 5S-RNA wurde eingehend an *Xenopus*-Oocyten untersucht (zur Übersicht Szymanski *et al.*, 2003; Pieler & Rudt, 1997). Einem Modell zufolge wird die Transkription in *Xenopus*-Oocyten autoreguliert: die 5S-RNA wird nach ihrer Transkription im Komplex mit TFIIIA ins Cytoplasma transportiert. Dort wird das TFIIIA von dem ribosomalen Protein L5 verdrängt und die 5S-RNA im Komplex mit diesem Protein in den Nukleus bzw. Nukleolus transportiert. Die Existenz dieses Transportsystems in somatischen Zellen wurde bisher nicht bewiesen. Speicherpartikel aus 5S-RNA und TFIIIA bzw. L5 existieren zumindest in größeren Mengen nicht im Cytoplasma somatischer Zellen von *Arabidopsis* und *Homo sapiens* (Mathieu *et al.*, 2003; Rosorius *et al.*, 2000). Es gibt jedoch Hinweise auf eine Beteiligung der Proteine L5 bzw. TFIIIA am intrazellulären Transport der 5S-RNA, da bei *Arabidopsis thaliana* GFP-TFIIIA- bzw. GFP-L5-Fusionsproteine im Nukleolus akkumulieren (Mathieu *et al.*, 2003). Der Einbau des Proteins L5 in das Ribosom erfolgt bei Pflanzen sehr wahrscheinlich auch im Komplex mit der 5S-RNA. *In vitro* wurde gezeigt, dass sowohl *Arabidopsis*-TFIIIA als auch *Arabidopsis*-L5 die 5S-RNA binden kann (Mathieu *et al.*, 2003). Eine Untersuchung der Translation von humanem L5 zeigte, dass die Anwesenheit der 5S-RNA für die cotranslationelle Faltung des Proteins essentiell ist (Lin *et al.*, 2001), was nahe legt, dass 5S-RNA im Cytoplasma auch außerhalb von Ribosomen vorliegt. Die Ergebnisse legen zumindest nahe, dass RNPs bestehend aus 5S-RNA und TFIIIA bzw. L5 in den Nukleolus transportiert und dort gespeichert werden.

*** nach der Replikation und der Prozessierung der Viroide im Nukleoplasma, akkumulieren Viroid-5S-Komplexe im Nukleolus(2).

** Die Bildung eines ternären Komplexes mit L5 ist dagegen möglich *(3)*

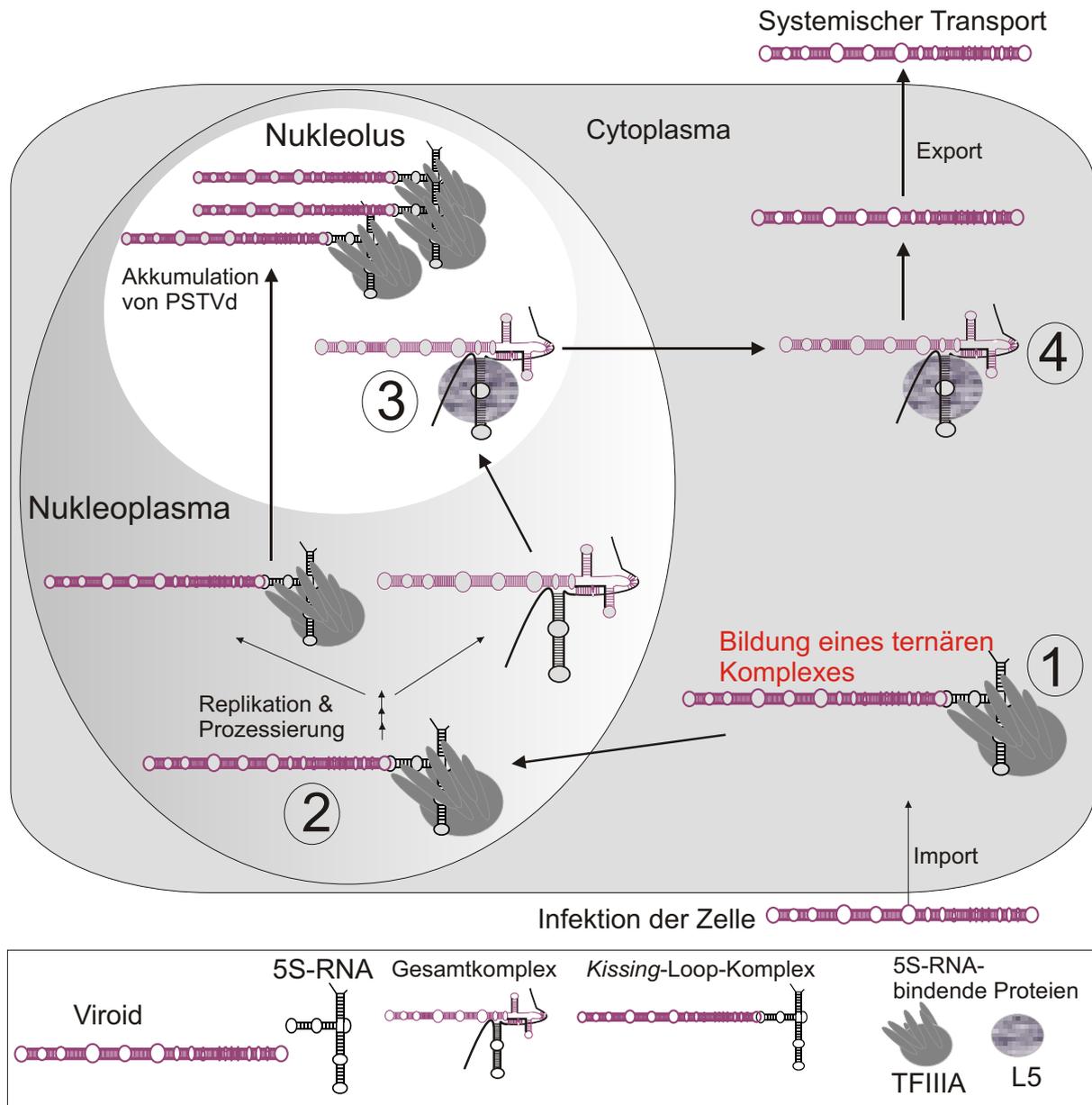


Abbildung 5.9: Modell für den intrazellulären Transport von PSTVd. Das Viroid gelangt über Plasmodesmata in die Zelle und bildet dort einen ternären Komplex mit 5S-RNA und dem Transkriptionsfaktor IIIA (1), der in den Nukleus transportiert wird. Nach der Replikation und der Prozessierung der Viroide im Nukleoplasma, akkumulieren Viroid-5S-Komplexe im Nukleolus (2). Möglicherweise bildet cotranskriptionell ein Teil der PSTVd-Moleküle einen Komplex mit 5S-RNA aus, der beide Bindestellen umfasst (Gesamtkomplex). Diese Wechselwirkung behindert die Bindung zwischen 5S-RNA und TFIIIA. Die Bildung eines ternären Komplexes mit L5 ist dagegen möglich (3) und könnte den Export ins Cytoplasma vermitteln (4).

Auf der Grundlage der Komplexbildung zwischen dem rechten terminalen Loop von PSTVd mit der 5S-RNA und der Lokalisation der 5S-RNA und jener an diese bindender

Proteine wurde ein Modell zum Transport von Viroiden, vermittelt durch die 5 S-RNA, formuliert.

PSTVd gelangt über die Plasmodesmata von Zelle zu Zelle und befindet sich dann im Cytoplasma. Dort findet die *Kissing-Loop*-Wechselwirkung mit der 5 S-RNA statt, die wiederum eine Komplexbildung mit dem Protein TFIIA vermittelt. Anschließend erfolgt der Transport des ternären Komplexes in den Nukleus, wo die Replikation der Viroide stattfindet. Alternativ ist aber auch vorstellbar, dass dieser Transport innerhalb eines ternären Komplexes mit 5 S-RNA und L 5 erfolgt, da dieses ebenfalls ein Kernlokalisierungssignal trägt. Viroide und TFIIA akkumulieren schließlich im Nukleolus, wo auch die 5 S-RNA im Komplex mit L 5 in die Ribosomen eingebaut wird. PSTVd könnte demnach im Komplex mit 5 S-RNA und TFIIA im Nukleolus gespeichert werden. Möglicherweise bildet sich cotranskriptionell auch ein Komplex zwischen PSTVd und 5 S-RNA aus, der neben dem *Kissing-Loop* auch die Wechselwirkung Var-Helix V umfasst, der von TFIIA nicht gebunden werden kann. Ein Export dieser Komplexe aus dem Nukleus ins Cytoplasma, der für den Befall weiterer Zellen erforderlich ist, könnte, gebunden an das Protein L 5, erfolgen, möglicherweise in das Ribosom inkorporiert (Abb. 5.9).

Eine Studie von Bannach (2006) legte eine Bindung von PSTVd an TFIIA nahe. Daher ist zumindest bei der Komplexbildung mit diesem Protein nicht auszuschließen, dass die 5 S-RNA nach Vermittlung des Kontakts dissoziiert. In diesem Fall würde eine Konkurrenz zwischen der 5 S-RNA und PSTVd um diesen Transportfaktor bestehen. Voraussetzung für die Ausbildung eines ternären Komplexes zwischen PSTVd, 5 S-RNA und TFIIA bzw. L 5 ist, dass die Protein-RNA-Interaktion nicht die Bindestelle von PSTVd auf der 5 S-RNA umfasst. Tatsächlich bindet das Protein L 5 die 5 S-RNA aber im Bereich der Helix III bzw. des Loop C, so dass die Bildung dieses Komplexes weder mit der Wechselwirkung Var-Helix V noch mit T_R-Loop D konkurriert. Die Kristallstruktur eines Komplexes zwischen einem trunkierten 5 S-RNA-Molekül und der RNA-Bindedomäne von TFIIA und Ribonuclease-Footprints belegten immerhin, dass der Loop D nicht direkt an der Interaktion beteiligt ist (Lu *et al.*, 2003; McBryant *et al.*, 1995). Vielmehr bindet TFIIA den zentralen Bereich der 5 S-RNA, der auch die Helix V umfasst. Das bedeutet aber, dass die Wechselwirkung Var-Helix V nicht stattfinden kann, wenn TFIIA an die 5 S-RNA gebunden ist. Zwischen fertig synthetisierten Molekülen, wie sie im Cytoplasma vorliegen, ist die Ausbildung der Loop-Loop-Wechselwirkung T_R-Loop D ohnehin

wahrscheinlicher als die Wechselwirkung Var-Helix V, welche die Denaturierung stabiler intramolekularer Helices erfordern würde. Wie in Abschnitt 5.3 dargelegt, ist eine solche Interaktion während der Transkription von PSTVd im Nukleus eher vorstellbar. Ein Komplex zwischen PSTVd und 5S-RNA, der diese Wechselwirkung enthält, könnte in diesem Fall aber ausschließlich von L5 und nicht von TFIIA gebunden werden. Da PSTVd zur Infektion neuer Zellen ins Cytoplasma gelangen muss, liegt die Vermutung nahe, dass es im Komplex mit 5S-RNA und L5 in das Ribosom inkorporiert und so transportiert werden könnte. In Ribosomen konnte PSTVd zwar mittels Northern-Analyse nicht nachgewiesen werden (Thiel, 1999), die Existenz einer geringen Menge an PSTVd in den Ribosomen ist aber nicht ausgeschlossen. Zur Infektion neuer Zellen ist nur eine geringe Menge an PSTVd-Molekülen erforderlich.

5.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bindestellen zwischen PSTVd und der ribosomalen 5S-RNA aus *Lycopersicon esculentum* bestimmt. Die Kombination verschiedener Methoden erlaubte zwischen Bereichen, die direkt wechselwirken und solchen, die aufgrund der Komplexbildung strukturell verändert sind, zu unterscheiden. Bezüglich der Wechselwirkungspositionen *in vitro* sind somit keine Fragen offen. Allenfalls eine Verifizierung der Interaktionspositionen an *in vivo* quervernetzten Komplexen stünde noch aus.

Das Viroid wird durch verschiedene RNA-Transportsysteme in der Pflanze systemisch verbreitet. Es eignet sich daher besonders gut als Modell zur Untersuchung des zellulären RNA-Transports. Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Wechselwirkung steht wahrscheinlich mit dem intrazellulären Transport von PSTVd in Zusammenhang. Die Daten legen nahe, dass sich das Viroid, vermittelt durch die Interaktion mit der 5S-RNA, der Transportsysteme dieser zellulären RNA bedient. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die 5S-RNA und PSTVd, aufgrund ähnlicher Struktur motive, um die Transportfaktoren konkurrieren. Eine Untersuchung der Wechselwirkung des PSTVd-5S-RNA-Komplexes mit den 5S-RNA-bindenden Proteinen könnte ein erster Schritt sein, um den Mechanismus dieses Vorgangs zu beleuchten.

RNA-RNA-Wechselwirkungen wurde lange Zeit gegenüber Protein-Protein- bzw. Protein-RNA-Interaktionen eine untergeordnete Rolle beigemessen. Es wird aber zuneh-

mend deutlich, dass solche Interaktionen eine Schlüsselrolle bei bedeutenden zellulären Vorgängen, wie dem Spleißen und dem RNA-Silencing, spielen. Verschiedene Aufgaben, wie die Erkennung und Positionierung von Nukleinsäuren oder die Regulation der Aktivität einer RNA, können von RNA-Molekülen einfacher und schneller vermittelt werden als von Proteinen.

Das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Konzept ist ein leistungsfähiges Verfahren, das auch zur genaueren Charakterisierung anderer funktioneller RNA-RNA-Wechselwirkungen geeignet ist. Es bietet sowohl die Möglichkeit zur schnellen Eingrenzung der wechselwirkenden Bereiche *in vitro* als auch der genauen Bestimmung von Interaktionspunkten *in vitro* und *in vivo* (Abschnitt 5.1.3).

Zur Untersuchung des Spleißvorgangs, der mit einer spezifischen Abfolge von Interaktionen zwischen snRNA-Molekülen verbunden ist (zur Übersicht Valadkhan, 2007), ist das Konzept beispielsweise besonders gut geeignet. Interaktionspositionen zwischen snRNA-Molekülen wurden zwar bereits durch Psoralen-vermittelte Quervernetzung und nachfolgende *primer extension* untersucht. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Verfahren bietet sich aber zur verbesserten Analyse dieser Wechselwirkungen an, denn die Sensitivität der Methode konnte durch den Aufreinigungsschritt deutlich erhöht werden. Dies könnte von Vorteil sein, da verschiedene Kontakte zwischen den snRNAs möglicherweise nur für kurze Zeit existieren und somit nur in kleineren Mengen vorhanden sind. Darüber hinaus erlaubt das Konzept durch Kombination sich verschiedener Methoden, zwischen direkt wechselwirkenden Bereichen und Konformationsänderungen aufgrund der Komplexbildung zu unterscheiden. Solche Konformationsänderungen könnten von entscheidender Bedeutung für die Funktion einer Wechselwirkung sein.

Innerhalb des *in vitro*-PSTVd-5 S-RNA-Komplexes existiert eine *Kissing-Loop*-Wechselwirkung am Rechten Terminus und eine Wechselwirkung innerhalb der Variablen Region, die nur nach vollständiger Denaturierung von PSTVd entstehen kann. Die Kontakte sind also von deutlich unterschiedlicher Natur und könnten zur Untersuchung genereller Mechanismen von RNA-RNA-Wechselwirkungen dienen.

Zusammenfassung

Viroide sind kleine RNA-Moleküle, die sich autonom in Pflanzen vermehren. Nach der Infektion werden sie systemisch innerhalb der Pflanze verbreitet. Da die RNA nicht kodogen ist, sind Viroide während ihres gesamten Infektionszyklus auf Wechselwirkungen mit Wirtsfaktoren angewiesen. Sie bilden Struktur- und Sequenzmotive zur Bindung an Wirtsfaktoren aus, die Vorgänge wie die Transkription bzw. den Transport vermitteln. Die Identifizierung von zellulären Wechselwirkungspartnern der Viroide ist daher von großer Bedeutung für das Verständnis dieser besonderen Krankheitserreger.

In vorausgegangenen Arbeiten wurde die Existenz von Komplexen zwischen dem Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) und der ribosomalen 5 S-RNA *in vivo* belegt (Aschermann, 2001; Krause, 2002). Neben wenigen Proteinen ist die 5 S-RNA das einzige zelluläre Molekül, welches nachweislich mit PSTVd wechselwirkt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Komplex zwischen PSTVd und der 5 S-RNA *in vitro* charakterisiert. Zu diesem Zweck wurde ein Verfahren zur Identifizierung wechselwirkender Bereiche zwischen RNA-Molekülen etabliert, das die Methoden *primer extension*, RNA-RNA-Gelshift und Oligonukleotid-Kompetition miteinander kombiniert. Dieses erlaubt eine Unterscheidung zwischen Sequenzabschnitten, die direkt wechselwirken, und solchen, die aufgrund der Komplexbildung in ihrer Konformation verändert sind. Weiterhin konnte die Sensitivität der *primer extension*-Analyse verbessert werden, so dass diese auch eingesetzt werden kann, wenn nur ein kleiner Teil der Moleküle im Komplex miteinander vorliegt. Durch Anwendung des Verfahrens konnten an der Wechselwirkung beteiligte Sequenzabschnitte auf PSTVd und 5 S-RNA bestimmt und einander zugeordnet werden. Diese befinden sich

zwischen dem rechten terminalen Loop von PSTVd und dem Loop D der 5 S-RNA bzw. der Variablen Region von PSTVd und Helix V der 5 S-RNA. Auf dieser Basis wurden Sekundärstrukturmodelle zweier Kontaktstellen entwickelt. Die Wechselwirkung zwischen dem rechten terminalen Loop von PSTVd und dem Loop D der 5 S-RNA stellt demnach einen *Kissing-Loop*-Kontakt dar, der nach initialer Erkennung in eine weitreichendere Wechselwirkung übergehen könnte. Die Bindung zwischen der Variablen Region von PSTVd und der Helix V der 5 S-RNA ist dagegen nur nach Auflösung intramolekularer Helices der beiden Moleküle möglich.

Ein Sequenzvergleich der 5 S-RNA verschiedener Vertreter der *Solanaceen* belegt, dass die Wechselwirkung auch in diesen Wirtspflanzen von PSTVd stattfinden kann. Mutationen des rechten terminalen Loops beeinflussen laut vorausgegangenen Arbeiten anderer die Transportfähigkeit der entsprechenden PSTVd-Varianten (Hammond, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde belegt, dass sich diese Mutationen auf die Komplementarität mit dem Loop D der 5 S-RNA auswirken. Zusammen mit Erkenntnissen zur Lokalisation der 5 S-RNA und der 5 S-RNA-bindenden Proteine wurde ein Modell entwickelt, wonach intrazelluläre Transportschritte von PSTVd durch die Komplexbildung mit der 5 S-RNA vermittelt werden könnten.

Abstract

Viroids are small RNA molecules that replicate autonomously in plants. After infection, they spread systemically within the whole plant. Since viroids do not encode for any proteins, they have to utilize cellular factors for all of their biological functions like replication and transport. The interaction with these factors is mediated by both RNA sequence and RNA secondary structure motifs, respectively.

In previous works by Aschermann (2001) und Krause (2002), evidence for the existence of complexes between the potato spindle tuber viroid (PSTVd) and the ribosomal 5 S RNA was found *in vivo* (Aschermann, 2001; Krause, 2002). Besides several proteins, this RNA is the only cellular molecule that has been shown to directly bind PSTVd. In this work, the complex between PSTVd and 5 S RNA was characterized *in vitro*. To identify the positions that establish the contact of both RNAs, a procedure was developed that combines the methods (i) primer extension, (ii) gel shift, and (iii) competition of oligonucleotides. This allows for distinguishing between directly interacting and - due to distantly located interactions - conformationally altered parts of the molecules. Furthermore, the sensitivity of the primer extension based analysis was enhanced, therefore it can be used even when only a small amount of the molecules interact with each other. Using the three methods two interacting regions of PSTVd and 5 S RNA were identified and assigned to each other. These are the right terminal loop of PSTVd with hairpin loop D of 5 S RNA and the variable region of PSTVd with helix V of 5 S RNA, respectively. Based on the obtained data it was possible to develop models of the complex, which illustrate the secondary structure of the interacting parts of the molecules. The interaction between

the right terminal loop of PSTVd and loop D of 5 S RNA is a kissing loop interaction and could expand after the initial recognition step. For the interaction between the variable region of PSTVd and helix V of 5 S RNA, however, the denaturation of internal base pairs is required.

According to sequence analysis of 5 S RNA from five other solanaceous plants these interactions could take place also in these host plants of PSTVd. It is known from previous work that mutations of the right terminal loop of PSTVd affect the transport of the mutant molecules (Hammond, 1994). Here it was concluded that these mutations may weaken the interaction between PSTVd and 5 S loop D. Together with the knowledge about the localization of 5 S RNA and 5 S RNA binding proteins a model was developed, that describes how intracellular trafficking of PSTVd could be mediated by the interaction of PSTVd with 5 S RNA.

Literaturverzeichnis

- Ammons, D., Rampersad, J. & Fox, G.E. (1999). 5 S rRNA gene deletion cause an unexpectedly high fitness loss in *Escherichia coli*. *NAR*, **27**(27), 637–642.
- Aschermann, K. (2001). Identifikation eines zellulären RNA-Wechselwirkungspartners von PSTVd *in vitro* und *in vivo*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Bannach, O. (2006). Viroid-Protein-Komplexe und deren Bedeutung für Replikation und Transport von Viroiden. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Barciszewska, M.Z., Szymanski, M., Erdmann, V.A. & Barciszewski, J. (2000). 5 S ribosomal RNA. *Biomacromolecules.*, **1**(3), 297–302.
- Barciszewska, M.Z., Szymanski, M., Erdmann, V.A. & Barciszewski, J. (2001). Structure and functions of 5 S rRNA. *Acta Biochimica Polonica*, **48**(1), 191–198.
- Baumstark, T., Schröder, A.R. & Riesner, D. (1997). Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.*, **16**, 599–610.
- Baumstark, T., Schröder, A.R. & Riesner, D. (1997). Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J.*, **16**, 599–610.
- Beringer, M. & Rodnina, M.V. (2007). The Ribosomal Peptidyl Transferase. *Molecular Cell*, **26**(3), 311–21.
- Bradshaw, N. & Walter, P. (2007). The signal recognition particle (SRP) RNA links conformational changes in the SRP to protein targeting. *Mol. Biol. Cell.*, **18**(7), 2728–34.
- Branch, A. D. & Robertson, H. D. (1981). Longer-than-unit length viroid minus strands are present in RNA from infected plants. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **78**, 6381–6385.

- Branch, A. D. & Robertson, H. D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science*, **223**, 450–455.
- Brunel, C., Marquet, R., Romby, P. & Ehresmann, C. (2002). RNA loop-loop interactions as dynamic functional motifs. *Biochimie*, **84**(9), 925–44.
- Cech, T.F. (2000). Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science*, **289**, 878–879.
- Chester, N. & Marshak, D.R. (1993). Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, **209**(2), 284–290.
- Cimino, G.D., Gamper, H.B., Isaacs, S.T. & Hearst, J.E. (1985). Psoralens as photoactive probes of nucleic acid structure and function: organic chemistry, photochemistry, and biochemistry. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 1151–93.
- Daròs, J.A., Elena, S.F. & Flores, R. (2006). Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *EMBO Rep.*, **7**(6), 593–598.
- Daròs, J.A. & Flores, R. (2004). *Arabidopsis thaliana* has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family *Pospiviroidae*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**(17), 6792–6797.
- Davies, J.W., Kaesberg, P. & Diener, T.O. (1974). Potato spindle tuber viroid. XII. An investigation of viroid RNA as a messenger for protein synthesis. *Virology*, **61**, 281–286.
- Diener, T.O. (2003). Discovering viroids—a personal perspective. *Nat. Rev. Microbiol.*, **1**(1), 75–80.
- Diener, T.O. & Raymer, W.B. (1967). Potato Spindle Tuber Virus: A plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science*, **158**, 378–381.
- Diener, T. O. (1971). Potato spindle tuber „Virus“, IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, **45**, 411–428.
- Ding, B. & Itaya, A. (2007). Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **20**, 7–20.
- Ding, B., Itaya, A. & Zhong, X. (2005). Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**(6), 606–612.
- Ding, B., Kwon, M.O., Hammond, R. & Owens, R. (1997). Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant J.*, **12**, 931–936.

- Dokudovskaya, S., Dontsova, O., Shpanchenko, O., Bogdanov, A. & Brimacombe, R. (1996). Loop IV of 5S ribosomal RNA has contacts both to domain II and to domain V of the 23S RNA. *RNA*, **2**, 146–152.
- Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D. & Sharp, P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**(6), 57–467.
- Edwards, T.E., Klein, D.J. & Ferré-D'Amaré, A.R. (2007). Riboswitches: small-molecule recognition by gene regulatory RNAs. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **17**(3), 273–9.
- Ericson, G. & Wollenzien, P. (1988). Use of reverse transcription to determine the exact locations of psoralen photochemical crosslinks in RNA. *Analytical Biochemistry*, **174**, 215–223.
- Feldstein, P. A., Hu, Y. & Owens, R. A. (1998). Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 6560–6565.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**(6669), 806–11.
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, A.E., Daròs, J.A. & Di Serio, F. (2005). Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **43**, 117–139.
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M. & Diener, T.O. (1998). A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Arch. Virol.*, **143**, 623–629.
- Gago, S., de la Peña, M. & Flores, R. (2005). A kissing-loop interaction in a hammerhead viroid RNA critical for its in vitro folding and in vivo viability. *RNA*, **11**(7), 1073–1083.
- Gilbert, W. (1986). Origin of life: The RNA world. *Nature*, **319**, 618.
- Goodman, T.C., Nagel, L., Rappold, W., Klotz, G. & Riesner, D. (1984). Viroid replication: equilibrium association constant and comparative activity measurements for the viroid-polymerase interactions. *Nucleic Acids Res.*, **12**, 6231–6246.
- Gruner, R. (1992). Wechselwirkungen des Viroids der Kartoffel-Spindelknollensucht (PSTVd) mit Wirtsfaktoren in Zellkernen der Tomate (*Lycopersicon esculentum* M.). Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Hamilton, A.J. & Baulcombe, D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**(5441), 950–952.
- Hammond, R. W. (1994). Agrobacterium-mediated inoculation of PSTVd cDNAs onto tomato reveals the biological effect of apparently lethal mutations. *Virology*, **201**, 36–45.
- Harders, J., Lukács, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, T.M. & Riesner, D. (1989). Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by *in situ* hybridization and confocal laser scanning microscopy. *EMBO J.*, **8**, 3941–3949.
- Henco, K., Sängler, H.L. & Riesner, D. (1979). Fine structure melting of viroids as studied by kinetic methods. *Nucleic Acids Res.*, **6**, 3041–3059.
- Holmberg, L. & Nygard, O. (2000). Release of ribosome-bound 5 S rRNA upon cleavage of the phosphodiester and between nucleotides A54 and A55 in 5 S rRNA. *Biol. Chem.*, **381**, 1041–1046.
- Hu, Y., Feldstein, P.A., Bottino, P.J. & Owens, R.A. (1996). Role of the variable domain in modulating potato spindle tuber viroid replication. *Virology*, **219**, 45–56.
- Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A.R., Molina, C., Nelson, R.S. & Biao Ding, B. (2007). A structured viroid RNA is substrate for Dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RISC-mediated degradation. *J. Virol.*, **81**, 2980–2994.
- Keese, P. & Symons, R.H. (1985). Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangement and their contribution to viroid evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 4582–4586.
- Klaff, P., Riesner, D. & Steger, G. (1996). RNA structure and the regulation of gene expression. *Plant Molecular Biology*, **32**, 89–106.
- Klümper, S. (2002). Prozessierung des Kartoffel-Spindelknollensucht-Viroids (PSTVd): Charakterisierung der beteiligten Enzyme der Wirtspflanze. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Kolonko, N., Bannach, O., Aschermann, K., Hu, K.H., Moors, M., Schmitz, M., Steger, G. & Riesner, D. (2006). Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. *Virology*, **347**(2), 392–404.

- Korepanov, A.P., Gongadze, G.M., Garber, M.B., Court, D.L. & Bubunencko, M.G. (2007). Importance of the 5 S rRNA-binding Ribosomal Proteins for Cell Viability and Translation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, **366**(4), 1199–1208.
- Kouvela, E.C., Gerbanas, G.V. & Xaplanteri, M.A. (2007). Changes in the conformation of 5S rRNA cause alterations in principal functions of the ribosomal nanomachine. *Nucleic Acids Res.*, **35**(15), 5108–5119.
- Krause, A. (2002). Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen Viroid und 5 S-RNA in Tomatenpflanzen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Lawson, R.H. (1968). Some properties of chrysanthemum stunt virus. *Phytopathology*, **58**, 585.
- Li, P.T., Bustamante, C. & Tinoco, I. Jr. (2006). Unusual mechanical stability of a minimal RNA kissing complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**(43), 15847–52.
- Lin, E., Lin, S.-W. & Lin, A. (2001). The participation of 5 S rRNA in the cotranslational formation of eukaryotic 5 S ribonucleoprotein complex. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 2510–2516.
- Lipson, S.E. & Hearst, J.E. (1988). Psoralen cross-linking of ribosomal RNA. *Methods Enzymol.*, **164**, 330–341.
- Loss, P., Schmitz, M., Steger, G. & Riesner, D. (1991). Formation of a thermodynamically metastable structure containing hairpin II is critical for infectivity of potato spindle tuber viroid RNA. *EMBO J.*, **10**, 719–727.
- Lu, D., Searles, M.A. & Klug, A. (2003). Crystal structure of a zinc-finger-RNA complex reveals two modes of molecular recognition. *Nature*, **426**(6962), 96–100.
- Maguire, B.A., Beniaminov, A.D., Ramu, H., Mankin, A.S. & Zimmermann, R.A. (2005). A protein component at the heart of an RNA machine: the importance of protein l27 for the function of the bacterial ribosome. *Mol. Cell*, **20**(3), 427–35.
- Maniataki, E., Martinez de Alba, A.E., Sägesser, R., Tabler, M. & 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**(3), 346–354.
- Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M. & Turner, D.H. (1999). Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.*, **288**, 911–940,
<http://www.ibc.wustl.edu/~zucker/mfold-3.0.html>.

- Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M. & Turner, D.H. (1999). Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. *J. Mol. Biol.*, **288**, 911–940.
- Mathieu, O., Yukawa, Y., Prieto, J.L., Vaillant, I., Sugiura, M. & Tourmente, S. (2003). Identification and characterization of transcription factor IIIA and ribosomal protein L5 from *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.*, **31**(9), 2424–33.
- Matoušek, J., Kozlová, P., Orctová, L., Schmitz, A., Pešina, K., Bannach, O., Diermann, D., Steger, G. & Riesner, D. (2007). Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase of nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol. Chem.*, **388**(1), 1–13.
- Matoušek, J., Orctová, L., Steger, G. & Riesner, D. (2004). Biolistic inoculation of plants with viroid nucleic acids. *J. Virol. Meth.*, **122**, 153–164.
- McBryant, S.J., Veldhoen, N., Gedulin, B., Leresche, A., Foster, M.P., Wright, P.E., Romaniuk, P.J. & Gottesfeld, J.M. (1995). Interaction of the RNA binding fingers of *Xenopus* transcription factor IIIA with specific regions of 5 S ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.*, **248**(1), 44–57.
- Moore, P.B. & Steitz, T.A. (2002). The involvement of RNA in ribosome function. *Nature*, **418**(6894), 229–235.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51 Pt 1**, 263–273.
- Murdoch, K.J. & Allison, L.A. (1996). A role for ribosomal protein L5 in the nuclear import of 5 S rRNA in *Xenopus* oocytes. *Exp. Cell Res.*, **227**, 323–343.
- Nilsen, T.W. (2003). The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays*, **25**(12), 1147–9.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B. & Steitz, T.A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, **289**(5481), 920–30.
- Nissen, P., Ippolito, J.A., Ban, N., Moore, P.B. & Steitz, T.A. (2001). RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: The A-minor motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 4899–4903.
- Noller, H.F., Hoffarth, V. & Zimniak, L. (1992). Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science*, **256**(5062), 1416–1419.

- Ogata, K., Kurahashi, A., Tanaka, S., Ohsue, H. & Kazuhiro, K. (2001). Occurrence of 5SrRNA in High Molecular Weight Complexes of Aminoacyl-tRNA Synthetases in a Rat Liver Supernatant1. *J. Biochem.*, **110**, 1030–1036.
- Owens, R. & Hammond, R. (1990). Mutational analysis of viroids. *Sem. Virol.*, **1**, 101–107.
- Owens, R. A., Steger, G., Hu, Y., Fels, A., Hammond, R. W. & Riesner, D. (1996). RNA structural features responsible for potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology*, **222**, 144–158.
- Palukaitis, P. (1987). Potato spindle tuber viroid: Investigations of the long-distance, intra-plant transport route. *Virology*, **158**, 101–107.
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A., Denti, M., Baulcombe, D., Tsagris, M. & Tabler, M. (2001). Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.*, **29**(11), 2395–2400.
- Pieler, T. & Rudt, F. (1997). Nucleocytoplasmic transport of 5S ribosomal RNA. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **8**(1), 79–82.
- Pittman, R.H., Andrews, M.T. & Setzer, D.R. (1999). A feedback loop coupling 5S rRNA synthesis to accumulation of a ribosomal protein. *J. Biol. Chem.*, **274**, 33198–33201.
- Qi, Y. & Ding, B. (2003). Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell*, **15**(11), 2566–2577.
- Qu, F., Heinrich, C., Loss, P., Steger, G., Tien, P. & Riesner, D. (1993). Multiple pathways of reversion in viroids for conservation of structural elements. *EMBO J.*, **12**, 2129–2139.
- Remennik, O. (2003). Biophysikalische Charakterisierung des 5S rRNA-PSTVd-*in vitro*-Komplexes. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Repsilber, D., Wiese, U., Rachen, M., Schröder, A.R., Riesner, D. & Steger, G. (1999). Formation of metastable RNA structures by sequential folding during transcription: Time-resolved structural analysis of potato spindle tuber viroid (–)-stranded RNA by temperature-gradient gel electrophoresis. *RNA*, **5**, 574–584.

- Rhoades, M.W., Reinhart, B.H., Lim, L.P., Burge, C.B., Bartel, B. & Bartel, D.P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, **110**(4), 513–520.
- Riesner, D. & Gross, H.J. (1985). Viroids. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 531–564.
- Riesner, D., Henco, K., Rokohl, U., Klotz, G., Kleinschmidt, A.K., Domdey, H., Jank, P., Gross, H.J. & Sanger, H.L. (1979). Structure and structure formation of viroids. *J. Mol. Biol.*, **133**, 85–115.
- Rosorius, O., Fries, B., Stauber, R.H., Hirschmann, N., Bevec, D. & Hauber, J. (2000). Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals. *J. Biol. Chem.*, **275**, 12061–12068.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T., Hrsg. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sammons, D.W., Adams, L.D. & Nishizawa, E.E. (1981). Ultrasensitive silver-based colour staining of polypeptids in polyacrylamid gels. *Electrophoresis*, **2**(3), 135–141.
- Sanger, H.L. (1972). An infectious and replicating RNA of low molecular weight: The agent of the exortis disease of Citrus. *Adv. Biosc.*, **8**, 103–116.
- Schindler, I.M. & Muhlbach, H.P. (1992). Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Sci.*, **8**, 221–229.
- Schmitz, A. (2003). Untersuchungen zum Pathogenitatsmechanismus von Viroid-RNA. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Schmitz, M. & Gräf, S. (2004).
<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/DOTPLOT/dotplot.html>
- Schmitz, M. & Steger, G. (2007). Potato spindle tuber viroid (PSTVd). *Plant Viruses*, **1**, 106–115.
- Schnolzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H. & Sanger, H. L. (1985). Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTVd). *EMBO J.*, **4**, 2181–2190.
- Scholtysik, R. (2006). Struktur der terminalen loops des Viroids PSTVd. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Schrader, O., Baumstark, T. & Riesner, D. (2003). A mini-RNA containing the tetraloop, wobble-pair and loop E motifs of the central conserved region of potato

- spindle tuber viroid is processed into a minicircle. *Nucleic Acids Res.*, **31**(3), 988–998.
- Schröder, A.R. & Riesner, D. (2002). Detection and analysis of hairpin II, an essential metastable structural element in viroid replication intermediates. *Nucleic Acids Res.*, **30**(15), 3349–3359.
- Schultz, E.S. & Folsom, D.A. (1923). "Spindle Tuber" disease of Irish potatoes. hints to potato growers. *Science*, **57**(149).
- Schumacher, J. (1984). Subzelluläre Verteilung von Viroiden in Tomatenpflanzen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Schumacher, J., Randles, J.W. & Riesner, D. (1983). A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem.*, **135**, 288–295.
- Schumacher, J., Randles, J.W. & Riesner, D. (1983). A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem.*, **135**, 288–295.
- Schumacher, J., Sängler, H.L. & Riesner, D. (1983). Subcellular localization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue. *EMBO J.*, **2**, 1549–1555.
- Scripture, J.B. & Huber, P.W. (1995). Analysis of the binding of *Xenopus* ribosomal protein L5 to oocyte 5S rRNA. The major determinants of recognition are located in helix III-loop C. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27358–27365.
- Semancik, J.S. & Weathers, L.G. (1968). Exocortis virus of Citrus: association of infectivity with nucleic acid preparations. *Virology*, **36**, 326–328.
- Singh, R.P., Ready, K.F.M. & Nie, X. (2003). Viroids of solanaceous species. In *Viroids*. (Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W. & Semancik, J.S., Hrsg.). CSIRO Publishing, Australia, S. 125–133.
- Spirin, A.S. (2004). The ribosome as an RNA-based molecular machine. *RNA Biol.*, **1**(1), 3–9.
- Staley, J.P. (1998). Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things. *Cell*, **92**(3), 315–26.
- Steger, G. (1994). Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: Prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 2760–2768.

- Steger, G., Tabler, M., Brüggemann, W., Colpan, M., Klotz, G., Sängler, H.-L. & Riesner, D. (1986). Structure of viroid replicative intermediates: physico-chemical studies on SP6 transcripts of cloned oligomeric potato spindle tuber viroid. *Nucleic Acids Res.*, **14**, 9613–9630.
- Steger, G., Hofmann, H., Förtsch, J., Gross, H.J., Randles, J.W., Sängler, H.L. & Riesner, D. (1984). Conformational transitions in viroids and virusoids: Comparison of results from energy minimization algorithm and from experimental data. *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **2**, 543–571.
- Szymanski, M., Barciszewska, M.Z., Erdmann, V. & Barciszewski, J. (2003). 5 S rRNA: structure and interactions. *Biochem. J.*, **371**, 641–651.
- Thiel, V. (1999). Wechselwirkung von Viroiden mit zellulärer RNA. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Valadkhan, S. (2007). The spliceosome: a ribozyme at heart? *Biol. Chem.*, **388**(7), 693–7.
- Viel, A., le Maire, M., Philippe, H., Morales, J., Mazabraud, A. & Denis, H. (1991). Structural and functional properties of thesaurin a (42 Sp50), the major protein of the 42 S particles present in *Xenopus laevis* previtellogenic oocytes. *J. Biol. Chem.*, **266**, 10392–10399.
- Walter, A.E., Turner, D.H., Kim, J., Lyttle, M.H., Muller, P., Mathews, D.H. & Zuker, M. (1994). Coaxial stacking of helices enhances binding of oligoribonucleotides and improves predictions of RNA folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 9218–9222.
- Walter, P. & Blobel, G. (1984). Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*, **299**(5885), 691–8.
- Wild, U., Ramm, K., Sängler, H.L. & Riesner, D. (1980). Loops in Viroids - Accessibility to tRNA Anticodon Binding. *Eur. J. Biochem.*, **103**, 227–235.
- Wolff, P., Gilz, R., Schumacher, J. & Riesner, D. (1985). Complexes of viroids with histones and other proteins. *Nucleic Acids Res.*, **13**, 355–367.
- Woo, Y.M., Itaya, A., Owens, R.A., Tang, L., Hammond, R.W., Chou, H.C., Lai, M.M. & Ding, B. (1999). Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *Plant. J.*, **17**(6), 627–635.

- Zaratiegui, M., Irvine, D.V. & Martienssen, R.A. (2007). Noncoding RNAs and Gene Silencing. *Cell*, **128**, 763–776.
- Zhao, Y., Owens, R.A. & Hammond, R.W. (2001). Use of a vector based on Potato virus X in a whole plant assay to demonstrate nuclear targeting of Potato spindle tuber viroid. *J. Gen. Virology*, **82**, 1491–1497.
- Zhong, X., Tao, X., Stombaugh, J., Leontis, N. & Ding, B. (2006). Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking. *EMBO J.*, Epub, 1–11.
- Zhu, Y., Green, L., Woo, Y.-M., Owens, R. & Ding, B. (2001). Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology*, **279**, 69–77.
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **31**(13), 3406–15.

Eidesstattliche Erklärung:

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

Düsseldorf, den 26.11.2007